

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-506349
(P2025-506349A)

(43)公表日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全283頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-543542(P2024-543542)	(71)出願人	519062144
(86)(22)出願日	令和5年2月1日(2023.2.1)		アコーオス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年7月23日(2024.7.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2023/012083		2 1 0, ボストン, サマー ストリート
(87)国際公開番号	WO2023/150142		6 4 5, スイート 2 0 0
(87)国際公開日	令和5年8月10日(2023.8.10)	(74)代理人	100092783
(31)優先権主張番号	63/305,923		弁理士 小林 浩
(32)優先日	令和4年2月2日(2022.2.2)	(74)代理人	100103182
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 日野 真美
		(74)代理人	100120134
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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		弁理士 大森 規雄
	最終頁に続く	(74)代理人	100139310
			弁理士 吉光 真紀
		(72)発明者	シモンズ, エマニュエル ジョン
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 前庭神経鞘腫関連症状を治療するための抗 V E G F 抗体構築物及び関連する方法

(57)【要約】

本開示は、プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含む構築物であって、該コード配列が血管内皮増殖因子 (V E G F) 結合剤またはその一部をコードする、構築物を提供する。いくつかの実施形態では、構築物は A A V 構築物である。いくつかの実施形態では、A A V 構築物は A A V 粒子の一部である。本明細書に記載の構築物及び A A V 粒子を含む組成物は、難聴、例えば、前庭神経鞘腫に関連する難聴の治療に有用であり得る。

【選択図】 図 4 A、4 B



FIG. 4A

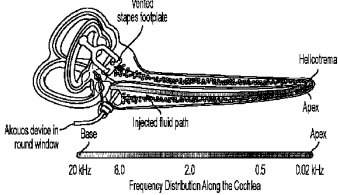


FIG. 4B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含む構築物であって、前記コード配列が血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部をコードする、前記構築物。

【請求項 2】

前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、またはCB7プロモーターである、請求項 1 に記載の構築物。

【請求項 3】

前記 VEGF 結合剤が、抗体もしくはその断片であるか、または抗体もしくはその断片を含む、請求項 1 または 2 に記載の構築物。

10

【請求項 4】

前記抗体断片が、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fd'断片、相補性決定領域（CDR）、単鎖Fv、またはFcドメインである、請求項 3 に記載の構築物。

【請求項 5】

前記 VEGF 結合剤が、免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、もしくはそれらの組み合わせであるか、または免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、もしくはそれらの組み合わせを含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 6】

前記 VEGF 結合剤が、
（i）配列番号 16 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、
（ii）配列番号 20 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、または
（iii）それらの組み合わせ、
を含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の構築物。

20

【請求項 7】

前記 VEGF 結合剤が、ラニズマブであるか、またはラニズマブを含む、請求項 6 に記載の構築物。

【請求項 8】

前記コード配列が、
（i）配列番号 13 を含む核酸配列、
（ii）配列番号 19 を含む核酸配列、または
（iii）それらの組み合わせ、
を含む、請求項 1～3 または 5～6 のいずれか 1 項に記載の構築物。

30

【請求項 9】

前記コード配列が、それぞれがシグナルペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの核酸配列が、インターロイキン 2（IL2）シグナルペプチドをコードする、請求項 9 に記載の構築物。

【請求項 11】

前記コード配列が、自己切断ペプチドをコードする 1 つ以上の配列を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の構築物。

40

【請求項 12】

前記自己切断ペプチドが、those as a signal ウイルス 2A（T2A）ペプチドである、請求項 11 に記載の構築物。

【請求項 13】

前記コード配列が、配列番号 21 に記載の核酸配列であるか、または配列番号 21 に記載の核酸配列を含む、請求項 1～3 または 5～12 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 14】

前記コード配列及びプロモーターに隣接する、2 つの AAV 逆位末端反復（ITR）を

50

さらに含む、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の構築物。

【請求項 15】

前記 2 つの AAV ITR が、AAV2 ITR であるか、または AAV2 ITR に由来する、請求項 14 に記載の構築物。

【請求項 16】

前記 2 つの AAV ITR が、配列番号 45 または 47 に記載の核酸配列を含む 5' ITR と、配列番号 46 または 48 に記載の核酸配列を含む 3' ITR を含む、請求項 14 または 15 に記載の構築物。

【請求項 17】

前記構築物が、配列番号 90、91、92、または 106 のいずれかに記載の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の構築物。

10

【請求項 18】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物を含む AAV 粒子。

【請求項 19】

AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43、もしくは AAV Anc80 カプシドであるか、または AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43、もしくは AAV Anc80 カプシドに由来する AAV カプシドをさらに含む、請求項 18 に記載の AAV 粒子。

20

【請求項 20】

前記 AAV カプシドが、AAV Anc80 カプシド、任意選択で AAV Anc80 L65 カプシドである、請求項 19 に記載の AAV 粒子。

【請求項 21】

前記 AAV カプシドが、配列番号 113 または配列番号 114 に記載のポリペプチドを含む、請求項 19 または 20 に記載の AAV 粒子。

【請求項 22】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物または請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子を含む、組成物。

【請求項 23】

前記組成物が、薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物である、請求項 22 に記載の組成物。

30

【請求項 24】

約 1×10^{11} v g / mL ～ 約 1×10^{15} v g / mL の用量で製剤化される、請求項 22 または 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

約 1×10^{10} ～ 約 1×10^{13} v g / 蝸牛の用量で製剤化される、請求項 22～24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

約 0.01 mL ～ 0.1 mL の容量で投与される、請求項 22～25 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 27】

内耳細胞を、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項 28】

細胞を、

(i) 請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、ならびに

(ii) AAV Rep 遺伝子、AAV Cap 遺伝子、AAV VA 遺伝子、AAV E2a 遺伝子、及び AAV E4 遺伝子を含む 1 つ以上の構築物

50

と接触させることを含む、方法。

【請求項 29】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を対象の内耳に導入することを含む、方法。

【請求項 30】

前記対象の聴力レベルを測定することをさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記対象の前記聴力レベルを基準聴力レベルと比較することをさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記対象の前記聴力レベルが、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を導入した後に測定され、前記基準聴力レベルが、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を導入する前に測定された前記対象の聴力レベルである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

対象における血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合剤またはその一部のレベルを測定することをさらに含む、請求項 29～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記対象における前記血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合剤またはその一部の前記レベルを、前記血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合剤またはその一部の基準レベルと比較することをさらに含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

対象の腫瘍の体積を測定することをさらに含む、請求項 29～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記対象の腫瘍の体積を基準腫瘍体積と比較することをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、難聴を治療する方法。

【請求項 38】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、哺乳動物における内耳障害を治療する方法。

【請求項 39】

前記内耳障害が、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症 II 型である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、哺乳動物における前庭神経鞘腫を治療する方法。

【請求項 41】

新生血管形成を特徴とする耳科疾患及び／または前記耳科疾患に関連する 1 つ以上の症状の治療に使用するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

内耳障害の前記治療に使用するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記内耳障害が、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症 II 型である、請求項 4 2 に記載の使用のための構築物。

【請求項 4 4】

神経鞘腫の前記治療に使用するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の AAV 粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 4 5】

新生血管形成を特徴とする耳科疾患及び／または前記耳科疾患に関連する 1 つ以上の症状を治療するための医薬を製造するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 4 6】

内耳障害を治療するための医薬を製造するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

20

【請求項 4 7】

前記内耳障害が、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症 II 型である、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前庭神経鞘腫を治療するための医薬を製造するための、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 4 9】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 37～40 のいずれか 1 項に記載の方法、請求項 41～44 のいずれか 1 項に記載の使用のための AAV 構築物、または請求項 45～48 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 5 0】

請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の構築物、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の粒子、または請求項 22～26 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 2 月 2 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 305,923 号に対する優先権を主張するものであり、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【背景技術】

【0002】

難聴には、伝音性（外耳道または中耳から生じる）、感音性（内耳または聴神経から生じる）、または混合性があり得る。感音性難聴は、哺乳動物の内耳の細胞（例えば、有毛細胞）の機能不全によって引き起こされる難聴を含む。感音性難聴の非限定的な原因としては、騒音への曝露、頭部外傷、ウイルス感染、自己免疫性内耳疾患、遺伝性難聴、加齢、内耳の奇形、メニエール病、耳硬化症、及び腫瘍が挙げられる。本明細書で説明されるように、難聴の別の原因は、前庭神経鞘腫（VS）であり得、これは、例えば、内耳から脳につながる神経上で発生する腫瘍である。

50

【発明の概要】

【0003】

本開示は、対象への抗VEGFタンパク質（例えば、ラニズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプト）の投与が、新生血管形成と関連する状態、疾患、または障害の治療に有用であり得るという認識を提供する。本開示は、抗VEGFタンパク質の投与が必ずしも容易であるとは限らないことをさらに認識している。例えば、抗VEGFタンパク質の投与は、新生血管形成に関連する細胞及び組織において局所的に適切なレベルの抗VEGFタンパク質を提供するような方法で達成されるべきである。

【0004】

本開示は、抗VEGFタンパク質（例えば、ラニズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプト）を発現し得る抗VEGF構築物の投与が、新生血管形成と関連する状態、疾患、または障害の治療に有用であり得ることを提供する。特に、抗VEGFタンパク質（例えば、ラニズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプト）をコードする組換えAAV（rAAV）構築物は、耳及び目の新生血管形成と関連する状態、疾患、または障害を治療するのに特に有用であり得、特に、rAAV Anc80カプシドとともに使用してrAAV Anc80-抗VEGF粒子を形成する場合に有用であり得る。

10

【0005】

とりわけ、本開示は、プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含む構築物を提供し、該コード配列は、血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部（本明細書では総称して抗VEGFタンパク質とも呼ばれる）をコードする。

20

【0006】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、またはCB7プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号49または50、配列番号64、及び／または配列番号65に記載の核酸配列を含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、コード配列は、霊長類コード配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、ヒトコード配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、操作されたコード配列であるか、またはそれを含む。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、VEGF結合剤またはその一部は、霊長類VEGF結合剤である。いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、ヒトVEGF結合剤であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、ヒト化VEGF結合剤であるか、またはそれを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、少なくとも1つのVEGFタンパク質に結合することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのVEGFタンパク質は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのVEGFタンパク質は、VEGF-Aである。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、少なくとも1つのポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、抗体またはその断片であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd断片、Fd'断片、相補性決定領域（CDR）、単鎖Fv、またはFcドメインである。いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、もしくはそれらの組み合わせであるか、またはそれを含む。

【0011】

50

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 1 6 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 2 0 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 1 6 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドと、配列番号 2 0 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドとを含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、ラニビズマブであるか、またはそれを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 3 に記載の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 9 に記載の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 3 に記載の核酸配列と、配列番号 1 9 に記載の核酸配列とを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 0 3 に記載の核酸配列であるか、またはそれを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 2 4 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 2 5 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、配列番号 2 4 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドと、配列番号 2 5 に記載のアミノ配列を含むポリペプチドとを含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、ベバシズマブであるか、またはそれを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 0 8 に記載の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 0 9 に記載の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 0 8 に記載の核酸配列と、配列番号 1 0 9 に記載の核酸配列とを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 2 2 に記載の核酸配列であるか、またはそれを含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、コード配列は、それぞれがシグナルペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの核酸配列は、インターロイキン 2 (I L 2) シグナルペプチドをコードする。

【0020】

いくつかの実施形態では、コード配列は、自己切断ペプチドをコードする 1 つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、t h o s e a a s i g n a ウイルス 2 A (T 2 A) ペプチドである。

【0021】

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、F c ドメインを含む。いくつかの実施形態では、F c ドメインは、配列番号 1 1 1 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、コード配列は、配列番号 1 1 0 に記載の核酸配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、V E G F 結合剤は、V E G F 受容体の 1 つ以上の細胞外ドメインを含む。いくつかの実施形態では、V E G F 受容体の 1 つ以上の細胞外ドメインは、配列番号 1 1 2 に記載のアミノ配列を含む細胞外ドメインを含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、VEGF結合剤は、VEGF受容体の2つの細胞外ドメインを含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、コード配列は、それぞれがシグナルペプチドをコードする1つ以上の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの核酸配列は、IL2シグナルペプチドをコードする。

【0026】

いくつかの実施形態では、構築物は、2つのAAV逆位末端反復(ITR)を含む。いくつかの実施形態では、2つのAAV ITRは、コード配列及びプロモーターに隣接する。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、2つのAAV ITRは、AAV2 ITRであるか、またはそれに由来する。

【0028】

いくつかの実施形態では、2つのAAV ITRは、配列番号45または47に記載の核酸配列を含む5' ITRと、配列番号46または48に記載の核酸配列を含む3' ITRとを含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号90、91、92、93、94、106、または107のいずれかに記載の核酸配列を含む。

20

【0030】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号95または96のいずれかに記載の核酸配列を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする耳科疾患の治療に使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物の使用は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする耳科疾患を治療するための医薬を製造するために提供される。いくつかの実施形態では、耳科疾患に関連する1つ以上の症状は、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞(cochlear aperture obstruction)、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、または死亡を含む。

30

【0032】

本開示は、本明細書に記載の構築物を含むAAV粒子をさらに提供する。

【0033】

いくつかの実施形態では、rAAV粒子は、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43、もしくはAAV Anc80カプシドであるか、またはそれに由来するrAAVカプシドを含む。いくつかの実施形態では、rAAVカプシドは、rAAV Anc80カプシドである。いくつかの実施形態では、rAAV Anc80カプシドは、rAAV Anc80L65カプシドである。

40

【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする耳科疾患の治療に使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子の使用は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする耳科疾患を治療するための医薬を製造するためのものである。いくつかの実施形態では、耳科疾患に関連する1つ以上

50

の症状は、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、または死亡を含む。

【0035】

本開示は、本明細書に記載の構築物及び／または本明細書に記載のAAV粒子を含む組成物を提供する。

【0036】

いくつかの実施形態では、組成物は、医薬組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を含む。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、リン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも1 mM、少なくとも2 mM、少なくとも3 mM、少なくとも4 mM、少なくとも5 mM、少なくとも6 mM、少なくとも7 mM、または少なくとも8 mMのリン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大15 mM、最大14 mM、最大13 mM、最大12 mM、最大11 mM、または、最大10 mMのリン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、5～12 mM、6～10 mM、または7～9 mMのリン酸二ナトリウムを含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、リン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも0.1 mM、少なくとも0.2 mM、少なくとも0.3 mM、少なくとも0.4 mM、少なくとも0.5 mM、少なくとも0.6 mM、少なくとも0.7 mM、少なくとも0.8 mM、少なくとも0.9 mM、少なくとも1.0 mM、少なくとも1.1 mM、少なくとも1.2 mM、少なくとも1.3 mM、少なくとも1.4 mM、または少なくとも1.5 mMのリン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大2.0 mM、最大1.9 mM、最大1.8 mM、最大1.7 mM、最大1.6 mM、または最大1.5 mMのリン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、0.5～2.0 mM、または1.0～2.0 mMのリン酸一カリウムを含む。

20

30

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも1.5 mM、少なくとも1.6 mM、少なくとも1.7 mM、少なくとも1.8 mM、少なくとも1.9 mM、少なくとも2.0 mM、少なくとも2.1 mM、少なくとも2.2 mM、少なくとも2.3 mM、少なくとも2.4 mM、少なくとも2.5 mM、少なくとも2.6 mM、または少なくとも2.7 mMの塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大3.5 mM、最大3.4 mM、最大3.3 mM、最大3.2 mM、最大3.1 mM、最大3.0 mM、最大2.9 mM、または最大2.8 mMの塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、2.0～3.5 mM、または2.5～3.0 mMの塩化カリウムを含む。

40

【0040】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも50 mM、少なくとも75 mM、少なくとも100 mM、少なくとも110 mM、少なくとも120 mM、少なくとも130 mM、少なくとも140 mM、少なくとも150 mM、少なくとも160 mM、または少なくとも170 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大250 mM、最大240 mM、最大230 mM、最大220 mM、最大210 mM、最大200 mM、最大190 mM、または最大180 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、

50

150～250mM、または150～200mMの塩化ナトリウムを含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、ポロキサマー188を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも0.0005%、少なくとも0.0006%、少なくとも0.0007%、少なくとも0.0008%、少なくとも0.0009%、または少なくとも0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大0.002%、最大0.0019%、最大0.0018%、最大0.0017%、最大0.0016%、最大0.0015%、最大0.0014%、最大0.0013%、最大0.0012%、最大0.0011%、または最大0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、0.0005～0.002%、または0.0005～0.0015%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、約8.10mMのリン酸二ナトリウム、約1.5mMのリン酸一カリウム、約2.7mMの塩化カリウム、約172mMの塩化ナトリウム、及び約0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、8.10mMのリン酸二ナトリウム、1.5mMのリン酸一カリウム、2.7mMの塩化カリウム、172mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

20

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{15} vg/mLの用量（例えば、量）で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、 2.5×10^{12} vg/mL+/-10%の用量（例えば、量）で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、 5×10^{12} vg/mL+/-10%の用量（例えば、量）で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、 1×10^{13} vg/mL+/-10%の用量（例えば、量）で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、約8.10mMのリン酸二ナトリウム、約1.5mMのリン酸一カリウム、約2.7mMの塩化カリウム、約172mMの塩化ナトリウム、及び約0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、8.10mMのリン酸二ナトリウム、1.5mMのリン酸一カリウム、2.7mMの塩化カリウム、172mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{13} vg/蝸牛の用量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約 2.3×10^{11} vg/蝸牛の用量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約 4.5×10^{11} vg/蝸牛の用量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約 9×10^{11} vg/蝸牛の用量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、約8.10mMのリン酸二ナトリウム、約1.5mMのリン酸一カリウム、約2.7mMの塩化カリウム、約172mMの塩化ナトリウム、及び約0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記

40

50

載の医薬組成物は、8.10 mMのリン酸二ナトリウム、1.5 mMのリン酸一カリウム、2.7 mMの塩化カリウム、172 mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

【0045】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約0.01 mL～0.1 mLの容量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のAAV粒子、例えばrAAV-抗VEGF粒子を含む組成物（例えば、医薬組成物）は、約0.09 mLの容量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、約8.10 mMのリン酸二ナトリウム、約1.5 mMのリン酸一カリウム、約2.7 mMの塩化カリウム、約172 mMの塩化ナトリウム、及び約0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、8.10 mMのリン酸二ナトリウム、1.5 mMのリン酸一カリウム、2.7 mMの塩化カリウム、172 mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、耳科疾患、例えば哺乳動物における耳科疾患の治療に使用するためのものであり、耳科疾患は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物の使用は、耳科疾患、例えば哺乳動物における耳科疾患を治療するための医薬を製造するために提供され、耳科疾患は、新生血管形成及び／または耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする。いくつかの実施形態では、耳科疾患に関連する1つ以上の症状は、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、死亡、またはそれらの組み合わせを含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、内耳障害、例えば哺乳動物における内耳障害の治療に使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物の使用は、内耳障害、例えば哺乳動物における内耳障害を治療するための医薬を製造するために提供される。いくつかの実施形態では、内耳障害は、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症II型を含む。いくつかの実施形態では、内耳障害は、前庭神経鞘腫であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、内耳障害は、神経線維腫症II型であるか、またはそれを含む。前庭神経鞘腫は、聴神経腫ともまた呼ぶことができ、両方の用語が、本明細書では同じ意味で用いられる。

【0048】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、前庭神経鞘腫、例えば哺乳動物における前庭神経鞘腫の治療に使用するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物の使用は、前庭神経鞘腫、例えば哺乳動物における前庭神経鞘腫を治療するための医薬を製造するために提供される。

【0049】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0050】

本開示はまた、細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載のrAAV粒子、及び／または本明細書に記載の組成物を含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、細胞は、*in vivo*、*ex vivo*、または*in vitro*に存在する。

【0052】

いくつかの実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト細胞は、対象の耳の中に存在する。

【0053】

いくつかの実施形態では、細胞は不死化され、安定な細胞株を生成する。

【0054】

本開示は、システムを提供する。システムは、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、本明細書に記載の組成物、及び／または本明細書に記載の細胞を含む。

【0055】

本開示は、方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物と接触させることを含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、細胞は、対象の細胞である。

【0057】

いくつかの実施形態では、細胞は、耳細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、内耳細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、外有毛細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、内有毛細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は柱状細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞はヘンゼン細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞はクラウジウス細胞である。

【0058】

いくつかの実施形態では、内耳細胞は、*in vitro* または *ex vivo* に存在する。

【0059】

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物を、対象の内耳に導入することを含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、構築物、r A A V 粒子、または組成物は、対象の蝸牛に導入される。いくつかの実施形態では、構築物、r A A V 粒子、または組成物は、正円窓膜注入を介して導入される。

【0061】

いくつかの実施形態では、構築物、r A A V 粒子、または本明細書で開示する組成物を、対象の蝸牛に投与することによって、対象の蝸牛内の構築物、r A A V 粒子、または、組成物によりコードされた導入遺伝子の発現がもたらされる。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、抗 V E G F タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、抗 V E G F タンパク質は、対象の蝸牛内の 1 つ以上の細胞で発現する。いくつかの実施形態では、抗 V E G F タンパク質は、外有毛細胞、内有毛細胞、柱状細胞、ヘンゼン細胞、クラウジウス細胞、またはこれらの組み合わせで発現する。いくつかの実施形態では、1 つ以上の蝸牛細胞での抗 V E G F タンパク質の発現は、1 つ以上の蝸牛細胞の生存及び／または機能に、最小限の影響を有する（例えば、影響を及ぼさない）。

【0062】

いくつかの実施形態では、方法は、対象の聴力レベルを測定することを含む。いくつかの実施形態では、聴力レベルは、聴性脳幹反応（A B R）検査を実施することによって測定される。

【0063】

いくつかの実施形態では、方法は、対象の聴力レベルを基準聴力レベルと比較することを含む。いくつかの実施形態では、基準聴力レベルは、公表されたまたは過去の基準聴力レベルである。

【0064】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、対象の聴力レベルは、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入された後に測定され、基準聴力レベルは、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入される前に測定された対象の聴力レベルである。

【0065】

いくつかの実施形態では、方法は、対象における血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルを測定することを含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルは、対象の内耳で測定される。いくつかの実施形態では、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルは、対象の蝸牛において測定される。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、方法は、対象における血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルを、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部の基準レベルと比較することを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部の基準レベルは、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部の公表されたまたは過去の基準レベルである。

【0069】

20

いくつかの実施形態では、対象における血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルは、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入された後に測定され、血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部の基準レベルは、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入される前に測定された、対象における血管内皮増殖因子（V E G F）結合剤またはその一部のレベルである。

【0070】

いくつかの実施形態では、方法は、対象の腫瘍寸法または体積を測定することを含む。いくつかの実施形態では、寸法は、腫瘍全体の最大直径または長さである。

【0071】

30

いくつかの実施形態では、方法は、対象の腫瘍寸法または体積を、それぞれ基準の腫瘍寸法または体積と比較することを含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、基準の腫瘍寸法または体積は、公表されたまたは過去の基準の腫瘍寸法または体積である。

【0073】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍寸法または体積は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入された後に測定され、基準の腫瘍寸法または体積は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物が導入される前に測定された対象の腫瘍寸法または体積である。

40

【0074】

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、難聴を治療する方法である。

【0075】

いくつかの実施形態では、対象は、新生血管形成を特徴とする耳科疾患に罹患しているか、またはそのリスクがある。いくつかの実施形態では、耳科疾患は、前庭神経鞘腫であるか、またはそれを含む。

【0076】

50

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の r A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、内耳障害を治療する方法である。いくつかの実施形態では、内耳障害は、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症 I I 型である。

【0077】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【0078】

いくつかの実施形態では、耳科疾患に関連する1つ以上の症状は、本明細書に記載の構築物、本明細書に記載の A A V 粒子、及び／または本明細書に記載の組成物の投与後に緩和または軽快される。いくつかの実施形態では、1つ以上の症状は、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、または死亡を含む。

10

【0079】

いくつかの実施形態では、方法は、前庭神経鞘腫を治療する方法である。

【0080】

いくつかの実施形態では、方法は、V E G F のレベルを調節する方法である。

【0081】

いくつかの実施形態では、方法は、活性 V E G F のレベルを調節する方法である。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、方法は、V E G F の活性を低下させる方法である。

【0083】

本開示は、細胞を、本明細書に記載の構築物と、A A V R e p 遺伝子、A A V C a p 遺伝子、A A V V A 遺伝子、A A V E 2 a 遺伝子、及び A A V E 4 遺伝子を含む1つ以上の構築物と接触させることを含む方法を提供する。

【0084】

いくつかの実施形態では、細胞は、内耳細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、外有毛細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、内有毛細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は柱状細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞はヘンゼン細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞はクラウジウス細胞である。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、対象の耳の中に存在する。いくつかの実施形態では、内耳細胞は、i n v i t r o または e x v i v o に存在する。

30

【0085】

本開示は、本明細書に記載の1つ以上の細胞を含む細胞の集団を提供し、該集団は、安定した細胞株であるか、またはそれを含む。

【0086】

方法及び材料が、本発明で使用するために本明細書に記載されているが、当該技術分野で知られている他の適切な方法及び材料も使用することができる。材料、方法、及び例は、例示的なものであり、限定することを意図していない。本明細書に記載された全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、及び他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。矛盾が生じる場合は、定義を含めて本明細書が優先される。

40

【0087】

定義

本開示の範囲は、本明細書に添付の特許請求の範囲によって定義され、本明細書に記載の特定の実施形態によって限定されない。当業者は、本明細書を読んで、そのような記載された実施形態と同等であり得るか、または別途特許請求の範囲に含まれ得る様々な変更を認識するであろう。一般に、本明細書で使用される用語は、特に明確に指示がない限り、当該技術分野で理解される意味に従う。特定用語の明示的な定義が以下に提供されるが、本明細書全体で特定の例におけるこれらの及び他の用語の意味は、文脈から当業者に

50

は明らかであろう。

【0088】

特許請求の範囲において請求項の要素を修飾するための「第1」、「第2」、「第3」などの順序を示す用語の使用は、それ自体が、請求項のある要素の、別の要素に対する優先、先行、または順序を、またはある方法の行為が実行される時間的順序を、暗示するものではなく、ある特定の名称を有する請求項のある要素を、同一の名称（順序を示す用語の使用を別にして）を有する別の要素から区別し、これらの請求項の要素を区別するためのラベルとして使用されているに過ぎない。

【0089】

本明細書で使用される冠詞「a」及び「an」は、その反対のことが明示されない限り、複数形の指示対象を含むと理解されるべきである。ある群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または記載は、その反対のことが示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つ、2つ以上、または全ての群メンバーが、所与の製品またはプロセスにおいて存在するか、それに用いられるか、または別途関連している場合に、成立すると考えられる。いくつかの実施形態では、群のきっかり1つのメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在するか、それに用いられるか、または別途関連している。いくつかの実施形態では、2つ以上、または全ての群メンバーが、所与の製品またはプロセスに存在するか、それに採用されるか、または別途関連している。本開示は、別途指示されない限り、または矛盾もしくは不整合が生じることが当業者に明らかでない限り、列挙された請求項のうちの1つ以上からの1つ以上の限定、要素、条項、説明用語などが、同じ基本請求項に従属する別の請求項（または、適切な場合には任意の他の請求項）に導入される、あらゆる変形、組み合わせ、及び並べ替えを包含することを理解されたい。要素がリストとして（例えば、マーカッシュグループまたは類似の形式で）提示されている場合、要素の各亜群も開示され、任意の要素（複数可）が、その群から削除され得ることを理解されたい。一般に、実施形態または態様が特定の要素、特徴などを「含む（comprising）」と言及される場合、特定の実施形態または態様は、そのような要素、特徴など「からなる（consist）」または「本質的にそれらからなる（consist essentially of）」、ということが理解されるべきである。簡潔にするために、それらの実施形態は、あらゆる場合において、本明細書でそれほど多くの言葉で具体的に記載されていない。また、任意の実施形態または態様を特許請求の範囲から明示的に除外することが、その特定の除外が本明細書に記載されているかどうかにかかわらず可能であることも理解されたい。

【0090】

本明細書を通して、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが文字列（例えば、ポリヌクレオチドの場合、アデノシン、シチジン、グアノシン、及びチミジンをそれぞれ示すA、C、G、T）によって表される場合、当該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、左から右に、5'から3'またはN末端からC末端の順に示される。

【0091】

投与：本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、典型的には、対象またはシステムへの作用物質の送達を達成するための、対象またはシステムへの組成物の投与を指す。いくつかの実施形態では、作用物質は、組成物であるか、またはそれに含まれ、いくつかの実施形態では、作用物質は、組成物またはその1つ以上の成分の代謝を通じて生成される。当業者であれば、適切な状況において、対象、例えばヒトへの投与のために利用され得る様々な経路を認識するであろう。例えば、いくつかの実施形態では、投与は、全身的または局所的であり得る。いくつかの実施形態では、全身投与は、静脈内投与であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、局所的であり得る。局所投与は、例えば、正円窓膜を通じた注入、または鼓室階、中央階への注入、内リンパ、外リンパ、及び／またはカナロストミー後の内リンパを通じた注入による蝸牛の外リンパへの送達を含むことができる。いくつかの実施形態では、投与は、単回投与のみを含んでもよい。いくつかの実施形態では、投与は、一定回数の投与の適用を含んでもよい。いくつかの実施形態では、投

与は、間欠的（例えば、時間的に分離された複数の投与）及び／または周期的（例えば、共通の期間によって分離された個々の投与）投与である投与を含んでもよい。いくつかの実施形態では、投与は、少なくとも選択された期間にわたる、連続投与（例えば、灌流）を含んでもよい。

【0092】

アレル：本明細書で使用する場合、「アレル」という用語は、特定の多型ゲノム遺伝子座の2つ以上の既存の遺伝子バリエーションのうちの1つを指す。

【0093】

軽快：本明細書で使用する場合、「軽快」という用語は、対象の状態の予防、軽減、または状態の緩和、または状態の改善を指す。軽快には、疾患、障害、または状態の完全な回復または完全な予防が含まれ得るが、必須ではない。

【0094】

アミノ酸：本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、最も広い意味で、例えば、1つ以上のペプチド結合の形成を通じて、ポリペプチド鎖に組み込まれ得る任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造、例えば、 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は非天然アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はD-アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸はL-アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然に存在するペプチドに一般的に見られる20種類の標準L-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」は、合成的に調製されたか、天然源から得られたかにかかわらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチド中のカルボキシ末端のアミノ酸及び／またはアミノ末端のアミノ酸を含むアミノ酸は、上記の一般的な構造と比較して、構造修飾を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造と比較して、メチル化、アミド化、アセチル化、PEG化、グリコシル化、リン酸化、及び／または置換（例えば、アミノ基、カルボン酸基、1つ以上のプロトン、及び／またはヒドロキシル基の）により修飾され得る。いくつかの実施形態では、このような修飾は、例えば、修飾アミノ酸を含むポリペプチドの血中半減期を、それ以外は同一の非修飾アミノ酸を含むものと比較して変化させ得る。いくつかの実施形態では、そのような修飾は、修飾アミノ酸を含むポリペプチドの関連する活性を、それ以外は同一の非修飾アミノ酸を含むものと比較して著しく変化させない。

【0095】

抗体：本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の標的抗原に特異的に結合するのに十分な標準的な免疫グロブリン配列要素を含むポリペプチドを指す。当該技術分野で知られているように、天然に産生されるようなインタクト抗体は、2つの同一の重鎖ポリペプチド（各約50kD）と、2つの同一の軽鎖ポリペプチド（各約25kD）から構成され、互いに結合して一般的に「Y字型」構造と称されるものになるおよそ150kDの四量体の作用物質である。各重鎖は、1つのアミノ末端可変（VH）ドメイン（Y字構造の先端に位置する）と、それに続く3つの定常ドメイン：CH1、CH2、及びカルボキシ末端CH3（Yの幹部分の基部に位置する）の少なくとも4つのドメイン（それぞれ約110アミノ酸長）から構成される。「スイッチ」として知られている短い領域は、重鎖可変領域及び定常領域を接続する。「ヒンジ」は、CH2及びCH3ドメインを抗体の残りの部分に接続する。このヒンジ領域中の2つのジスルフィド結合は、インタクト抗体において2つの重鎖ポリペプチドを互いに接続する。各軽鎖は、アミノ末端可変（VL）ドメインと、それに続くカルボキシ末端定常（CL）ドメインの2つのドメインから構成され、この2つのドメインは、互いに別の「スイッチ」によって分離されている。インタクト抗体の四量体は、重鎖と軽鎖が1つのジスルフィド結合により互いに連結した2つの重鎖-軽鎖二量体から構成され、2つの他のジスルフィド結合が重鎖ヒンジ領域を互いに接続することにより、二量体が互いに接続して四量体を形成している。天然に産生される抗体はまた、典型的にはCH2ドメイン上で、グリコシル化されている。天然抗体

10

20

30

40

50

の各ドメインは、圧縮された逆平行βバレルで互いにパッキングされた2枚のβシート（例えば、3本鎖、4本鎖、または5本鎖シート）から形成された「免疫グロブリンフォールド」を特徴とする構造を有する。各可変ドメインは、「相補性決定領域」（CDR1、CDR2、及びCDR3）として知られる3つの超可変ループと、4つのある程度不変の「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3、及びFR4）を含む。天然抗体が折り畳まれるとき、FR領域はドメインの構造的フレームワークを提供するβシートを形成し、重鎖と軽鎖の両方のCDRループ領域は、Y構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を作るように3次元空間にまとめられる。天然に存在する抗体のFc領域は、補体系の要素に結合し、また、エフェクター細胞（例えば、細胞毒性を媒介するエフェクター細胞を含む）上の受容体にも結合する。当該技術分野で知られているように、Fc領域のFc受容体に対する親和性及び／または他の結合特性は、グリコシル化または他の修飾によって調節され得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って産生及び／または利用される抗体は、グリコシル化Fcドメインを含み、そのようなグリコシル化を修飾または操作したFcドメインを含む。本発明の目的のために、特定の実施形態では、天然抗体に見られるような十分な免疫グロブリンドメイン配列を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチドの複合体は、そのようなポリペプチドが天然に産生されるか（例えば、抗原に反応する生物によって産生される）、または組換え工学、化学合成、または他の人工システムもしくは方法論によって産生されるかどうかにかかわらず、「抗体」と称され、及び／または「抗体」として使用され得る。いくつかの実施形態では、抗体はポリクローナルであり、いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナルである。いくつかの実施形態では、抗体は、マウス、ウサギ、霊長類、またはヒト抗体に特徴的な定常領域配列を有する。いくつかの実施形態では、抗体配列要素は、当該技術分野で知られているように、ヒト化、霊長類化、キメラなどである。さらに、本明細書で使用される場合「抗体」という用語は、適切な実施形態では（別段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り）、代替形態の抗体の構造的特徴及び機能的特徴を利用するための、任意の当該技術分野で知られている、または開発された構築物もしくは構成を指すことができる。例えば、いくつかの実施形態では、本発明に従って利用される抗体は、これらに限定されないが、インタクトなIgA、IgG、IgE、またはIgM抗体、二重または多重特異性抗体（例えば、Zybodyes（登録商標）など）、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、及び単離されたCDRまたはそのセットなどの抗体断片、単鎖Fv、ポリペプチド-Fc融合体、単ドメイン抗体（例えば、IgNARまたはその断片などのサメ単ドメイン抗体）、カメロイド抗体、マスク抗体（例えば、Probodyes（登録商標））、Small Modular Immunopharmaceutical（SMIP（商標））、単鎖またはタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））、VHH、Anticalins（登録商標）、Nanobodies（登録商標）、ミニボディ、BiTE（登録商標）、アンキリンリピートタンパク質またはDARPIN（登録商標）、Avimers（登録商標）、DART、TCR様抗体、Adnectins（登録商標）、Affilins（登録商標）、Trans-bodies（登録商標）、Affibodies（登録商標）、TrimerX（登録商標）、MicroProteins、Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）、及びKALBITOR（登録商標）から選択される構成のものである。いくつかの実施形態では、抗体は、重鎖及び／または軽鎖可変ドメインを含むことができる。いくつかの実施形態では、抗体は、定常ドメインを含まなくてもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、天然に産生された場合に有するであろう共有結合修飾（例えば、グリカンの結合）を欠いていてもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、共有結合修飾（例えば、グリカンの結合、ペイロード［例えば、検出可能部分、治療薬部分、触媒的部分など］、または他のペンダント基［例えば、ポリエチレングリコールなど］）を含んでもよい。

【0096】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、「およそ」または「約」という用語は、言及された基準値と類似する値を含む、1つ以上の目的の値に適用され得る。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、別段の記載がない限り、または別途内容から明らかでない限り、言及された基準値の±10%（を上回るまたは下回る）以内に入る値の範囲を指す（かかる数が可能な値の100%を超え得る場合を除く）。例えば、いくつかの実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、基準値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満の値の範囲を包含し得る。

【0097】

関連する／結合する：本明細書で使用される場合、「関連する／結合する」という用語は、一方の存在、レベル、及び／または形態が他方のそれと関連する場合、2つの事象または実体は互いに「関連する」と表される。例えば、特定の实体（例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャー、代謝物、微生物など）は、その存在、レベル、及び／または形態が、疾患、障害、または状態の発生率及び／または感受性と関連する場合（例えば、関連集団全体において）、特定の疾患、障害、または状態と関連するとみなされる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体が、直接的または間接的に相互作用し、その結果、それらが互いに物理的に近接している、及び／または近接したままである場合、それらは互いに物理的に「結合する」。いくつかの実施形態では、互いに物理的に結合している2つ以上の実体は、互いに共有結合的に連結している。いくつかの実施形態では、互いに物理的に結合している2つ以上の実体は、互いに共有結合的に連結していないが、例えば、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁性、及びそれらの組み合わせによって非共有結合的に結合している。

【0098】

生物学的に活性な：本明細書で使用される場合、「生物学的に活性な」という用語は、目的の作用物質または実体によって達成される観察可能な生物学的効果または結果を指す。例えば、いくつかの実施形態では、特異的結合相互作用は、生物学的活性である。いくつかの実施形態では、生物学的経路または事象の調節（例えば、誘導、増強、または阻害）は、生物学的活性である。いくつかの実施形態では、生物学的活性の存在または程度は、目的の生物学的経路または事象によって産生される直接的または間接的な生成物の検出を通じて評価される。

【0099】

特徴的部分：本明細書で使用される場合、「特徴的部分」という用語は、広義には、その存在（または非存在）が、物質の特定の特徴、特性、または活性の存在（または非存在）と関連する物質の部分の指す。いくつかの実施形態では、物質の特徴的部分は、共通の特定の特徴、特性または活性を有する所与の物質及び関連する物質に見られ、共通の特定の特徴、特性または活性を有していない物質には見られない部分である。いくつかの実施形態では、特徴的部分は、インタクトな物質と、共通の少なくとも1つの機能的特徴を有する。例えば、いくつかの実施形態では、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的部分」は、共にタンパク質またはポリペプチドの特徴を成す連続的なアミノ酸ストレッチまたは連続的なアミノ酸ストレッチの集合を含む部分である。いくつかの実施形態では、そのような連続ストレッチの各々は、一般に、少なくとも2、5、10、15、20、50、またはそれ以上のアミノ酸を含む。一般に、物質（例えば、タンパク質、抗体などの）の特徴的部分は、上記の配列及び／または構造の同一性に加えて、関連するインタクトな物質と、共通の少なくとも1つの機能的特徴を有する部分である。いくつかの実施形態では、特徴的部分は生物学的に活性であり得る。

【0100】

特徴的な配列：本明細書で使用される場合、「特徴的な配列」という用語は、ポリペプチドまたは核酸のファミリーの全てのメンバーに見られる配列であり、したがって、当業者がファミリーのメンバーを定義するために使用することができる。

【0101】

特徴的な配列要素：本明細書で使用される場合、「特徴的な配列要素」という語句は、ポリマー（例えば、ポリペプチドまたは核酸の）に見られる、そのポリマーの特徴的部分

を表す配列要素を指す。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素の存在は、ポリマーの特定の活性または特性の存在またはレベルと相関する。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素の存在（または非存在）は、特定のポリマーを、そのようなポリマーの特定のファミリーまたはグループのメンバー（または非メンバー）として定義する。特徴的な配列要素は、典型的には、少なくとも2つの単量体（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の単量体（例えば、連続的に連結した単量体）を含む。いくつかの実施形態では、特徴的な配列要素は、共通の配列要素を有するポリマー間で長さが異なっている、いなくともよい1つ以上のスパーサー領域によって間隔をあけられた連続的な単量体の少なくとも第1及び第2のストレッチを含む。

10

【0102】

併用療法：本明細書で使用される場合、「併用療法」という用語は、対象が2つ以上の治療レジメン（例えば、2つ以上の治療薬）に同時に曝露される状況を指す。いくつかの実施形態では、2つ以上の作用物質が同時に投与され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上の作用物質が逐次的に投与され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上の作用物質は、重複する投与レジメンで投与され得る。

【0103】

同等：本明細書で使用される場合、「同等」という用語は、互いに同一ではあり得ないが、その比較を可能にするには十分類似しており、その結果、当業者が観測した差異または類似性に基づいて、結論を合理的に導き得ることを理解するであろう2つ以上の作用物質、実体、状況、条件のセット、対象、集団などを指す。いくつかの実施形態では、同等の作用物質、実体、状況、条件のセット、対象、集団などのセットは、複数の実質的に同一の特徴と、1つまたは少数の異なる特徴を特徴とする。当業者であれば、任意の所与の状況において、2つ以上のそのような作用物質、実体、状況、条件のセット、対象、集団などが、同等であるとみなされるために、状況に応じてどの程度の同一性が必要であるかを理解されよう。例えば、当業者であれば、異なる一連の環境、刺激、作用物質、実体、状況、条件のセット、対象、集団などの下で、またはこれらの一連のものにより得られた結果または観察された現象の相違が、変動するそれらの特徴の変動によって引き起こされるか、またはそれを示すという合理的な結論を保証するのに十分な数及び種類の実質的に同一な特徴によって特徴付けられた場合、一連の作用物質、実体、状況、条件のセット、対象、集団などは、互いに同等であることを認識するであろう。

20

30

【0104】

構築物：本明細書で使用される場合、「構築物」という用語は、少なくとも1つの異種ポリヌクレオチドを保持することができるポリヌクレオチドを含む組成物を指す。いくつかの実施形態では、構築物は、プラスミド、トランスポゾン、コスミド、人工染色体（例えば、ヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC））またはウイルス構築物、及び任意の Gateway（登録商標）プラスミドであり得る。構築物は、例えば、発現のための十分なシス作用エレメントを含むことができ、発現のための他のエレメントは、宿主霊長類細胞により、または *in vitro* 発現システムで供給され得る。構築物は、適切な制御エレメントに結合した際に複製可能な任意の遺伝子エレメント（例えば、プラスミド、トランスポゾン、コスミド、人工染色体、またはウイルス構築物など）を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、「構築物」は、クローニング及び／または発現構築物、及び／またはウイルス構築物（例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）構築物、アデノウイルス構築物、レンチウイルス構築物、またはレトロウイルス構築物）を含み得る。

40

【0105】

保存的：本明細書で使用される場合、「保存的」という用語は、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換を含む、保存的アミノ酸置換を表す事例を指す。一般に、保存的アミノ酸置換は

50

、例えば、リガンドに結合する受容体の能力など、タンパク質の目的の機能特性を実質的に変化させない。類似の化学的特性を有する側鎖を持つアミノ酸のグループの例としては、以下が挙げられる：グリシン（Gly、G）、アラニン（Ala、A）、バリン（Val、V）、ロイシン（Leu、L）、及びイソロイシン（Ile、I）などの脂肪族側鎖；セリン（Ser、S）及びスレオニン（Thr、T）などの脂肪族-ヒドロキシ側鎖；アスパラギン（Asn、N）及びグルタミン（Gln、Q）などのアミド含有側鎖；フェニルアラニン（Phe、F）、チロシン（Tyr、Y）、及びトリプトファン（Trp、W）などの芳香族側鎖；リジン（Lys、K）、アルギニン（Arg、R）、及びヒスチジン（His、H）などの塩基性側鎖；アスパラギン酸（Asp、D）及びグルタミン酸（Glu、E）などの酸性側鎖；ならびにシステイン（Cys、C）及びメチオニン（Met、M）などの含硫側鎖。保存的アミノ酸置換基としては、例えば、バリン／ロイシン／イソロイシン（Val／Leu／Ile、V／L／I）、フェニルアラニン／チロシン（Phe／Tyr、F／Y）、リジン／アルギニン（Lys／Arg、K／R）、アラニン／バリン（Ala／Val、A／V）、グルタミン酸／アスパラギン酸（Glu／Asp、E／D）、及びアスパラギン／グルタミン（Asn／Gln、N／Q）が挙げられる。いくつかの実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発で使用されるように、タンパク質中の任意の天然の残基のアラニンとの置換であり得る。いくつかの実施形態では、保存的置換は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる G o n n e t , G . H . e t a l . , 1 9 9 2 , S c i e n c e 2 5 6 : 1 4 4 3 - 1 4 4 5 に開示された P A M 2 5 0 対数尤度行列において正の値を有するように行われる。いくつかの実施形態では、置換は、その置換が P A M 2 5 0 対数尤度行列において非負の値を有する、中程度に保守的な置換である。当業者であれば、異なる種由来の同じタンパク質間で保存されていないアミノ酸の変化（例えば、置換、付加、欠失など）は、タンパク質の機能に影響を与える可能性が低く、したがって、これらのアミノ酸は変異のために選択されるべきであることを理解するであろう。異なる種由来の同じタンパク質間で保存されているアミノ酸は、変化（例えば、欠失、付加、置換など）させてはならず、それは、これらの変異がタンパク質の機能に変化をもたらす可能性が高いためである。

10

20

30

40

50

【表 1】

保存的アミノ酸置換		
アミノ酸	コード	以下と置換する
アラニン	A	D-ala, Gly, Aib, β -Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リジン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4 または 5-フェニルプロリン, AdaA, AdaG, cis-3,4 または 5-フェニルプロリン, Bpa, D-Bpa
プロリン	P	D-Pro, L-I-チアゾリン-4-カルボン酸, D-または-L-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸(Kauer, 米国特許第 4,511,390 号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる))
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
トレオニン	T	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG

10

20

30

40

50

【0106】

対照：本明細書で使用される場合、「対照」という用語は、結果が比較される標準としての「対照」という当該技術分野で理解される意味を指す。典型的には、対照は、変動要素についての結論を出すために変動要素を分離することにより、実験における整合性を高めるために用いる。いくつかの実施形態では、対照は、比較対象物を得るための試験反応またはアッセイと同時にされる反応またはアッセイである。例えば、ある実験では、「試験」（すなわち、試験される変動要素）が適用される。第2の実験では、「対照」に、当該試験される変動要素は適用されない。いくつかの実施形態では、対照は、既存対照（例えば、既に実施された試験もしくはアッセイ、または既に知られている量もしくは結果

の)である。いくつかの実施形態では、対照は、印刷、または他の方法で保存された記録であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、対照は陽性対照である。いくつかの実施形態では、対照は陰性対照である。

【0107】

判定、測定、評価、検討、アッセイ、及び分析：本明細書で使用される場合、「判定」、「測定」、「評価」、「検討」、「アッセイ」、及び「分析」という用語は、測定の任意の形態を指すために互換的に使用することができ、ある要素が存在するか否かを判定することを含む。これらの用語には、定量的及び／または定性的な判定の両方が含まれる。アッセイは、相対的であっても絶対的であってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、「～の存在をアッセイする」は、存在するものの量を判定すること、及び／または存在の有無を判定することであり得る。

10

【0108】

操作された：一般に、本明細書で使用される場合、「操作された」という用語は、人の手によって操作された状態を指す。例えば、細胞または生物が、その遺伝情報が変化するように操作された（例えば、以前に存在しなかった新しい遺伝子物質が、例えば、形質転換、交配、体細胞交雑、トランスフェクション、形質導入、または他の機構によって導入されたか、または以前に存在した遺伝子物質が、例えば、置換または欠失変異によって、または交配プロトコルによって変化または除去された）場合、「操作された」とみなされる。一般的な慣行であり、当業者には理解されているとおり、操作されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫は、通常、実際の操作が先行する実体に対して行われていても、依然として「操作された」とみなされる。いくつかの実施形態では、「操作された」は、コード配列の「ヒト化」を含む。いくつかの実施形態では、「ヒト化」は、イントロン及び調節エレメントなどのヒト非コード配列を非ヒト配列に導入することを含むことができる。いくつかの実施形態では、「ヒト化」は、ヒトの使用のためにヌクレオチド配列をコドン最適化することを含むことができる。いくつかの実施形態では、「ヒト化」は、ポリペプチドの一部（例えば、ドメイン、例えば、フレームワーク領域または相補性ドメイン領域など）またはヌクレオチド配列（例えば、コードされたまたは非コードの）をヒトポリペプチドまたはヌクレオチド配列で置き換えることを含むことができる。

20

【0109】

賦形剤：本明細書で使用される場合、「賦形剤」という用語は、例えば、所望の稠度または安定化効果を提供または寄与するために、医薬組成物に含めることができる不活性（例えば、非治療薬）物質を指す。いくつかの実施形態では、好適な医薬賦形剤としては、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられ得る。

30

【0110】

発現：本明細書で使用される場合、核酸配列の「発現」という用語は、核酸配列から任意の遺伝子産物（例えば、転写産物、例えば、mRNA、例えば、ポリペプチドなど）を生成することを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子産物は転写産物であり得る。いくつかの実施形態では、遺伝子産物はポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、核酸配列の発現は、以下のうちの1つ以上を含む：（1）DNA配列からのRNAテンプレートの生成（例えば、転写による）；（2）RNA転写産物のプロセッシング（例えば、スプライシング、編集、5'キャップ形成、及び／または3'末端形成による）；（3）ポリペプチドまたはタンパク質へのRNAの翻訳；及び／または（4）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。

40

【0111】

機能的：本明細書で使用される場合、「機能的」という用語は、それを特徴付ける特性及び／または活性を呈する形態で存在するものを表す。例えば、いくつかの実施形態では、「機能的」生物学的分子は、それを特徴付ける特性及び／または活性を呈する形態にあ

50

る生物学的分子である。いくつかのそのような実施形態では、機能的な生物学的分子は、「非機能的」バージョンが「機能的」分子と同じまたは同等の特性及び／または活性を呈さないという点で、非機能的である別の生物学的分子と比較して特徴付けられる。生物学的分子は、1つの機能、2つの機能（すなわち、二機能性）、または多くの機能（すなわち、多機能性）を有してもよい。

【0112】

遺伝子：本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、遺伝子産物（例えば、RNA産物、例えば、ポリペプチド産物）をコードする染色体中のDNA配列を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子は、コード配列（すなわち、特定の産物をコードする配列）を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、非コード配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、遺伝子は、コード（例えば、エクソン）配列及び非コード（例えば、イントロン）配列の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、例えば、遺伝子発現の1つ以上の態様（例えば、細胞型特異的発現、誘導性発現など）を制御またはこれに影響を及ぼし得る1つ以上の調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）及び／またはイントロン配列を含み得る。本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、一般に、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸の一部を指し、この用語は、文脈から当業者にとって明らかであるように、任意選択で調節配列を包含し得る。この定義は、「遺伝子」という用語の非タンパク質コード発現単位への適用を排除することを意図したものではなく、ほとんどの場合、本明細書で使用するこの用語は、ポリペプチドをコードする核酸を指すことを明確にすることを意図したものである。いくつかの実施形態では、遺伝子はポリペプチドをコードし得るが、そのポリペプチドは機能的でない可能性があり、例えば、遺伝子バリエーションは、野生型遺伝子と比較して同じように、または全く機能しないポリペプチドをコードし得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、いくつかの実施形態では、閾値レベルを超えて毒性である可能性がある転写産物をコードし得る。いくつかの実施形態では、遺伝子はポリペプチドをコードし得るが、そのポリペプチドは、機能的でない可能性があり、及び／または閾値レベルを超えて毒性である可能性がある。

【0113】

難聴：本明細書で使用される場合、「難聴」という用語は、生物の聴力の部分的または完全な不能に対して使用され得る。いくつかの実施形態では、難聴は後天性であり得る。いくつかの実施形態では、難聴は遺伝性であり得る。いくつかの実施形態では、難聴は遺伝子性であり得る。いくつかの実施形態では、難聴は、疾患または外傷（例えば、身体的外傷、難聴をもたらす1つ以上の作用物質による治療など）の結果であり得る。いくつかの実施形態では、難聴は、1つ以上の既知の遺伝的原因及び／または症候群によるものであり得る。いくつかの実施形態では、難聴は、未知の病因であり得る。いくつかの実施形態では、難聴は、補聴器または他の治療の使用によって軽減される場合もあれば、軽減されない場合もある。

【0114】

異種：本明細書で使用される場合、「異種」という用語は、別の領域及び／または別の分子と比較した、特定の分子の1つ以上の領域に関して使用され得る。例えば、いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドドメインとは、ポリペプチドドメインが自然には一緒に（例えば、同じポリペプチド内で）存在しないことを指す。例えば、人の手によって作製された融合タンパク質において、あるポリペプチド由来のポリペプチドドメインは、異なるポリペプチド由来のポリペプチドドメインに融合され得る。このような融合タンパク質では、2つのポリペプチドドメインは、自然には一緒に存在しないため、互いに対して「異種」とみなされることになる。

【0115】

同一性：本明細書で使用される場合、「同一性」という用語は、高分子間、例えば、核酸分子間（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。いくつかの実施形態では、高分子は、それらの配列が少なく

とも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一である場合、互いに「実質的に同一」であるとみなされる。2つの核酸またはポリペプチド配列の同一性パーセントの計算は、例えば、最適な比較のために2つの配列を整列させることによって行うことができる（例えば、最適なアラインメントのために第1及び第2の配列の一方または両方にギャップを導入することができ、非同一配列は比較のために無視することができる）。いくつかの実施形態では、比較のために整列された配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%であり、次いで、対応する位置のヌクレオチドが比較される。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置と同じ残基（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）で占められている場合、2つの分子（すなわち、第1及び第2の）は、その位置において同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮した、比較される2つの配列が共通で有する同一の位置の数の関数である。配列の比較及び2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。例えば、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、Meyers and Miller (CABIOS, 1989, 4: 11-17、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)のアルゴリズムを使用して決定することができ、これは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。いくつかの実施形態では、ALIGNプログラムで行われる核酸配列比較は、PAM120ウェイト残基テーブル、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用する。

10

20

【0116】

改善、増加、増強、抑制、または低減：本明細書で使用される場合、「改善する」、「増加する」、「増強する」、「抑制する」、「低減する」、またはそれらの文法的同等物は、ベースラインまたは他の基準測定値と比較した値を示す。いくつかの実施形態では、値は、ベースラインまたは他の基準測定値と統計的に有意な差がある。いくつかの実施形態では、適切な基準測定値は、特定の作用物質もしくは治療が存在しない（例えば、その前及び／または後に）以外は同等な条件下での、または適切な同等な基準作用物質の存在下での、特定のシステム（例えば、単一の固体）における測定値であるか、またはそれを

30

【0117】

核酸： 本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、その最も広義において、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込まれ得る任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる、または組み込まれ得る、化合物及び／または物質である。文脈から明らかなように、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び／またはヌクレオシド）を指し、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然の核酸残基であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然の核酸類似体であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しない点で核酸と異なる。代替的にまたは付加的に、いくつかの実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合ではなく、1つ以上のホスホロチオエート及び／または5'-N-ホスホロアミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上の天然ヌクレオシド（例えば

40

50

、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロローピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0（6）-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、インターカレート塩基、及びこれらの組み合わせ）であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸は、天然の核酸のものと比較して、1つ以上の修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、RNAまたはタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、1つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、天然源からの単離、相補的テンプレートに基づく重合による酵素的合成（*in vivo*または*in vitro*）、組換え細胞またはシステムでの複製、及び化学的合成のうちの1つ以上によって調製される。いくつかの実施形態では、核酸は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000またはそれ以上の残基長である。いくつかの実施形態では、核酸は部分的または全体的に一本鎖であり、いくつかの実施形態では、核酸は部分的または全体的に二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリペプチドをコードする、またはそれをコードする配列に相補的である少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、核酸は、酵素活性を有する。

10

20

30

40

50

【0118】

作動可能に連結された：本明細書で使用される場合、記載されている構成要素が、それらの意図される様式でそれらが機能することを可能にする関係にある並置を指す。機能的エレメントに対して「作動可能に連結された」制御エレメントは、機能的エレメントの発現及び／または活性が、その制御エレメントに適合する条件下で達成されるように結合される。いくつかの実施形態では、「作動可能に連結された」制御エレメントは、目的のコードエレメントと連続している（例えば、共有結合的に連結している）；いくつかの実施形態では、制御エレメントは、目的の機能的エレメントにトランスで、または他の方法で作用する。いくつかの実施形態では、「作動可能に連結された」とは、調節配列と異種核酸配列との間の機能的連結を指し、後者の発現をもたらす。例えば、第1の核酸配列は、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係に配置される場合、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、例えば、機能的連結は、転写制御を含み得る。例えば、プロモーターは、そのプロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されたDNA配列は、互いに連続することができ、例えば、2つのタンパク質コード領域を繋げるために必要な場合、同じリーディングフレームにある。

【0119】

医薬組成物：本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、活性剤が1つ以上の薬学的に許容される担体とともに製剤化された組成物を指す。いくつかの実施形態では、活性剤は、関連する集団に投与された場合に所定の治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適した単位用量で存在する。いくつかの実施形態

では、医薬組成物は、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化されてもよく、これには、例えば、注射剤、例えば、水性もしくは非水性の溶液もしくは懸濁液、または外耳道に投与されるように設計された点耳薬の投与に適合されたものが含まれる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、特定の器官または区画のいずれかへの注入、例えば、耳への直接注入、または全身への注入、例えば静脈内注入による投与のために製剤化され得る。いくつかの実施形態では、製剤は、ドレンチ（水性または非水性溶液または懸濁液）、錠剤、ポーラス、散剤、顆粒剤、ペースト、カプセル剤、散剤などであるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、活性剤は、単離された、精製された、または純粋な化合物であるか、またはそれを含み得る。

【0120】

薬学的に許容される：本明細書で使用される場合、例えば、本明細書で開示される医薬組成物を製剤化するために使用される担体、希釈剤、または賦形剤に関して使用することができる「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤、または賦形剤が組成物の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに有害ではないことを意味する。

【0121】

薬学的に許容される担体：本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、対象化合物をある器官もしくは身体の一部から別の器官もしくは身体の一部に運搬または輸送することに関与する液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒封入材料などの薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合し、かつ患者に有害でないという意味において「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として機能することができる材料のいくつかの例としては、糖、例えば、ラクトース、グルコース、及びスクロース；デンプン、例えば、トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプン；セルロース、及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロース；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えば、カカオバター及び坐剤用ワックス；油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ヒマワリ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、及び大豆油；グリコール、例えば、プロピレングリコール；ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコール；エステル、例えば、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；アルギン酸；無発熱物質水；等張生理食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；pH緩衝液；ポリエステル、ポリカーボネート、及び／またはポリ酸無水物；ならびに医薬製剤に用いられる他の非毒性の適合物質が挙げられる。

【0122】

ポリアデニル化：本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化」は、ポリアデニル部分またはその修飾バリエーションとメッセンジャーRNA分子との共有結合による連結を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャーRNA（mRNA）分子は、3'末端でポリアデニル化される。いくつかの実施形態では、3'ポリ（A）テールは、酵素であるポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によってプレmRNAに付加されるアデニンヌクレオチドの長い配列（例えば、50、60、70、100、200、500、1000、2000、3000、4000、または5000）（配列番号117）である。高等真核生物では、ポリ（A）テールは、特定の配列であるポリアデニル化シグナルまたは「ポリ（A）配列」を含む転写産物に付加され得る。ポリ（A）テール及びそれに結合したタンパク質は、エキソヌクレアーゼによる分解からmRNAを保護するのを助ける。ポリアデニル化は、転写の終結、mRNAの核外への搬出、及び翻訳に影響を与える可能性がある。通常、ポリアデニル化は、DNAのRNAへの転写直後に核内で生じるだけでなく、さらに、その後に細胞質でも生じ得る。転写が終結した後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼに関連するエンドヌクレアーゼ複合体の作用により切断され得る。切断部位は、切断部位の近くにある塩基配列AAUAAAの存在を特徴とし得る。mRNAが切断された後、アデノシン残基が、切断部位の遊離した3'末端に付加され得る。本明細書で使用される場合、「ポリ（A）配列」は、エンドヌクレアーゼによるmRNAの切断、及び切断されたmRNA

10

20

30

40

50

Aの3'末端への一連のアデノシンの付加を誘発する配列である。

【0123】

ポリペプチド：本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、典型的にはペプチド結合によって連結された残基（例えば、アミノ酸）の任意の重合鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、人の手の作用によって設計及び／または作製されるという点で操作されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはその両方を含むか、またはそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端、ポリペプチドのC末端、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1つ以上のペンダント基または他の修飾、例えば、1つ以上のアミノ酸側鎖の修飾または結合を含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなペンダント基または修飾は、アセチル化、アミド化、脂質化、メチル化、PEG化など（それらの組み合わせを含む）であり得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、またはその両方を含み得、当該技術分野で知られている任意の様々なアミノ酸修飾または類似体を含み得る。いくつかの実施形態では、有用な修飾は、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化などであるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、及びそれらの組み合わせを含み得る。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すのに用いられる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、抗体、抗体断片、その生物学的に活性な部分、及び／またはその特徴的部分である。

【0124】

ポリヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、核酸の任意の重合鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の天然の核酸残基であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の天然の核酸類似体であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド類似体は、ホスホジエステル骨格を利用しない点で核酸と異なる。代替的にまたは付加的に、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合ではなく、1つ以上のホスホロチオエート及び／または5'-N-ホスホロアミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオシド類似体（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C-5-プロモウリジン、C-5-フルオロウリジン、C-5-ヨードウリジン、C-5-プロピニル-ウリジン、C-5-プロピニル-シチジン、C-5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、0(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、インターカレート塩基、及びこれらの組み合わせ）であるか、それを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然の核酸のものと比較して、1つ以上の修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAまたはタンパク質などの機能的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のイント

ロンを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然源からの単離、相補的テンプレートに基づく重合による酵素的合成 (*in vivo* または *in vitro*)、組換え細胞またはシステムでの複製、及び化学的合成のうちの1つ以上によって調製される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 またはそれ以上の残基長である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは部分的または全体的に一本鎖であり、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは部分的または全体的に二本鎖である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする、またはそれをコードする配列の相補体である少なくとも1つのエレメントを含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、酵素活性を有する。

10

20

30

40

50

【0125】

タンパク質：本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも2つのアミノ酸の鎖）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなどであってもよい）を含んでもよく、及び／またはそうでなければプロセッシングもしくは修飾されていてもよい。当業者であれば、「タンパク質」は、細胞によって産生される完全なポリペプチド鎖（シグナル配列を有することも有さないこともある）であり得るか、またはその特徴的部分であり得ることを理解するであろう。当業者であれば、タンパク質が複数のポリペプチド鎖、例えば、1つ以上のジスルフィド結合によって連結されたもの、または他の手段によって結合したものを含み得る場合があることを理解するであろう。

【0126】

組換え：本明細書で使用される場合、「組換え」という用語は、組換え手段によって設計、操作、調製、発現、作製、製造、及び／または単離されたポリペプチド、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現構築物を用いて発現されたポリペプチド；組換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブラリから単離されたポリペプチド；動物（例えば、マウス、ウサギ、ヒツジ、魚など）から単離されたポリペプチドであって、トランスジェニックであるか、さもなければポリペプチドもしくはその1つ以上の構成要素（複数可）、部分（複数可）、エレメント（複数可）、もしくはドメイン（複数可）をコードする及び／またはそれを直接発現する1つもしくは複数の遺伝子、または遺伝子構成要素を発現するように操作された動物から単離されたポリペプチド；及び／または、選択された核酸配列エレメントを互いにスプライシングまたはライゲーションすること、選択された配列エレメントを化学的に合成すること、及び／またはポリペプチドもしくはその1つ以上の構成要素（複数可）、部分（複数可）、エレメント（複数可）、もしくはドメイン（複数可）をコードする及び／またはそれを直接発現する核酸を別の方法で生成することを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、もしくは単離されたポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、そのような選択された配列エレメントの1つ以上は、天然に見出される。いくつかの実施形態では、そのような選択された配列エレメントの1つ以上は、*in silico* で設計される。いくつかの実施形態では、1つ以上のそのような選択された配列エレメントは、例えば、目的の供給源生物（例えば、ヒト、マウスなど）の生殖系列において、例えば、天然供給源または合成供給源に由来する公知の配列エレメントの変異誘発（例えば、*in vivo* または *in vitro*）から生じる。

【0127】

基準：本明細書で使用される場合、「基準」という用語は、比較が行われる標準または対照を表す。例えば、いくつかの実施形態では、目的の作用物質、動物、個体、集団、試料、配列、または値は、基準または対照の作用物質、動物、個体、集団、試料、配列、ま

たは値と比較される。いくつかの実施形態では、基準または対照は、目的の試験または判定と実質的に同時に試験及び／または判定される。いくつかの実施形態では、基準または対照は、既存の基準または対照であり、任意選択で有形の媒体に具現化される。典型的には、当業者には理解されるであろうが、基準または対照は、評価中のものと同等の条件または環境下で判定または特性決定される。当業者であれば、特定の可能性のある基準または対照への信頼及び／または比較を正当化するのに十分な類似性が存在する場合を理解するだろう。いくつかの実施形態では、基準は陰性対照基準である。いくつかの実施形態では、基準は陽性対照基準である。

【0128】

調節エレメント：本明細書で使用される場合、「調節エレメント」または「調節配列」という用語は、1つ以上の特定の遺伝子の発現を何らかの方法で調節するDNAの非コード領域を指す。いくつかの実施形態では、そのような遺伝子は、所与の調節エレメントに並置されているか、またはその「近傍にある」。いくつかの実施形態では、そのような遺伝子は、所与の調節エレメントからかなり離れた場所に位置する。いくつかの実施形態では、調節エレメントは、1つ以上の遺伝子の転写を損なうか、または促進する。いくつかの実施形態では、調節エレメントは、調節される遺伝子に対してシスに位置し得る。いくつかの実施形態では、制御エレメントは、調節される遺伝子に対してトランスに位置し得る。例えば、いくつかの実施形態では、調節配列は、調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現を調節する核酸配列を指す。いくつかのそのような実施形態では、この配列は、遺伝子産物の発現を調節するエンハンサー配列及び他の調節エレメントであってもよい。

【0129】

試料：本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、典型的には、目的の供給源から得られた、またはそれに由来する材料のアリコートを指す。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、生物学的または環境的供給源である。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、細胞または生物、例えば、微生物（例えば、ウイルス）、植物、または動物（例えば、ヒト）であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、目的の供給源は、生物学的組織または生体液であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、生物学的組織または生体液は、羊水、房水、腹水、胆汁、骨髄、血液、母乳、脳脊髄液、耳垢、乳糜、糜汁、射精液、内リンパ、滲出液、糞便、胃酸、胃液、リンパ、粘液、心膜液、外リンパ、腹膜液、胸膜液、膿、粘膜分泌物、唾液、皮脂、精液、血清、恥垢、喀痰、滑液、汗、涙、尿、膺分泌物、硝子体液、吐物、及び／またはそれらの組み合わせもしくは成分（複数可）であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、生体液は、細胞内液、細胞外液、血管内液（血漿）、間質液、リンパ液、及び／または細胞通過液であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、生体液は、植物滲出液であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的組織または試料は、例えば、吸引、生検（例えば、細針または組織生検）、スワブ（例えば、口腔、鼻腔、皮膚、または膺スワブ）、スクレイピング、手術、洗浄または灌流（例えば、気管支肺胞、管、鼻、眼、口腔、子宮、膺、または他の洗浄または灌流）により得てもよい。いくつかの実施形態では、生体試料は、個体から得られた細胞であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、試料は、任意の適切な手段によって目的の供給源から直接得られた「一次試料」である。いくつかの実施形態では、文脈から明らかなように、「試料」という用語は、一次試料を処理することによって（例えば、1つ以上の成分を除去することによって、及び／または1つ以上の作用物質を添加することによって）得られる調製物を指す。例えば、半透膜を用いたろ過である。このような「処理された試料」は、例えば、試料から抽出されたか、または一次試料を核酸の増幅もしくは逆転写、特定の成分の単離及び／または精製などの1つ以上の技術に供することによって得られた核酸もしくはタンパク質を含み得る。

【0130】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、生物、典型的には哺乳動物

10

20

30

40

50

(例えば、ヒト、いくつかの実施形態では、出生前のヒト形態を含む)を指す。いくつかの実施形態では、対象は、関連する疾患、障害、または状態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態に罹患しやすい。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態の1つ以上の症状または特徴を呈する。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態のいかなる症状または特徴も呈さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害、または状態に対する感受性、またはそのリスクを特徴付ける1つ以上の特徴を有する人である。いくつかの実施形態では、対象は患者である。いくつかの実施形態では、対象は、診断及び／または治療が行われる及び／または行われたことのある個体である。

【0131】

実質的に：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、目的の特徴もしくは特性の全てまたはほぼ全ての範囲もしくは程度を表す定性的状態を指す。当業者には、生物学的及び化学的な現象が、完了する、及び／または完了まで進行する、または絶対的な結果を達成するもしくはそれを回避することは、たとえあってもまれであることを理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、多くの生物学的及び化学的現象に本来的に存在する完全性の潜在的な欠如を表現するために本明細書で使用される。

【0132】

治療：本明細書で使用される場合、「治療」（「治療する」または「治療すること」ともいう）という用語は、特定の疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状、特徴、及び／または原因の部分的または完全な緩和、軽快、排除、逆転、軽減、抑制、発症の遅延、重症度の低減、及び／または発生率の低減を行う治療法の任意の実施を指す。いくつかの実施形態では、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の兆候を呈さない対象、及び／または疾患、障害、及び／または状態の初期兆候のみを呈する対象の治療であり得る。代替的にまたは付加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の確立された徴候を呈する対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／または状態に罹患していると診断された対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、所与の疾患、障害、及び／または状態の発症リスクの増大と統計的に相関する1つ以上の感受性因子を有することが知られている対象の治療であり得る。

【0133】

腫瘍：本明細書で使用される場合、「腫瘍」という用語は、細胞または組織の異常増殖を指す。いくつかの実施形態では、腫瘍は、前がん性（例えば、良性）、悪性、前転移性、転移性、及び／または非転移性である細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は、がんに関連しているか、またはがんの徴候である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、分散型腫瘍または液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍であり得る。

【0134】

バリエーション：本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、あるもののバージョンを指し、例えば、別のバージョンと何らかの形で異なる遺伝子配列を指す。あるものがバリエーションであるかどうかを判断するために、通常、基準バージョンが選択され、バリエーションはその基準バージョンと比較して異なっている。いくつかの実施形態では、バリエーションは、野生型配列と同じまたは異なる（例えば、増加または減少した）レベルの活性または機能性を有することができる。例えば、いくつかの実施形態では、バリエーションは、例えば、阻害性核酸、例えば、miRNAによる分解に抵抗するようにコドン最適化されている場合、野生型配列と比較して改善された機能性を有することができる。このようなバリエーションは、本明細書において機能獲得型バリエーションと呼ばれる。いくつかの実施形態では、バリエーションは、活性もしくは機能性の低下もしくは排除、または負の結果（例えば、細胞死につながる慢性脱分極をもたらす電気活性の増加）をもたらす活性の変化を有する。このようなバリエーションは、本明細書では機能喪失型バリエーションと呼ばれる。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子配列は、機能的なタンパク質をコードし、その遺伝子

10

20

30

40

50

を含むゲノムを有する種のメンバーの大部分に存在する野生型配列である。いくつかのそのような実施形態では、機能獲得型バリエーションは、野生型遺伝子配列に対して1つ以上のヌクレオチドの相違を含む遺伝子配列であり得る。いくつかの実施形態では、機能獲得型バリエーションは、対応する野生型（例えば、非コドン最適化）バージョンよりも改善された特性（例えば、分解に対する感受性が低い、例えば、miRNA媒介性分解に対する感受性が低い）を有し得る転写産物またはポリペプチドをコードするコドン最適化配列である。いくつかの実施形態では、機能喪失型バリエーションは、野生型転写産物及び／またはポリペプチドと比較して何らかの形で欠陥がある（例えば、機能低下、非機能化）転写産物またはポリペプチドをもたらす1つ以上の変化を有する。

【0135】

VEGF阻害剤：本明細書で使用される場合、「VEGF阻害剤」という用語は、「抗VEGFタンパク質」という用語と交換可能に使用される。

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】前庭神経鞘腫（VS）が発生する一般的な領域を含む、ヒト耳の代表的な解剖学的構造の概略図である。

【図2】内耳道内のVS（幅5mm未満）の位置をグラフ化した図である。この分析では、小型の内耳道内VS（内耳道内に完全に位置するもの）の大部分は、MRIスキャンからの測定値に基づく、内耳道底に近い位置（例えば、蝸牛の基底部分から数ミリメートル以内）に位置していた（Koehn 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。これらの38個の腫瘍の発生源を内耳道の長さの外側、中央、内側3分の1に局限した場合、60%が外側3分の1（内耳に隣接）内で発生していた（Koehn 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）；これらの腫瘍の分布を、内耳道の長さ（個人間の適度な内耳道の長さ[mm]のばらつきについて正規化）のパーセントの関数として分析すると、曲線下面積の約85%が内耳道の外側（内耳に隣接）半分内にあった（Koehn 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図3】内耳の概略図であり、左側の前庭系と右側の蝸牛（鼓室階、前庭階）との間の外リンパの流体連通を示す。米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）のA～Bに示されるように、外リンパは薄紫色で示されている。Aは、渦巻き状蝸牛の概略図である。図示した蝸牛の回転数は、マウス内耳を代表するものである。Bは、蝸牛の断面を示す概略図である。この概略図では、鼓室階と前庭階は外リンパで満たされ、中階は内リンパで満たされている（Talei 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図4】本明細書に記載の投与方法の概略図である。Aは、本明細書に記載の送達デバイスの画像を含む（付録A、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。図示されている送達デバイスは、正円窓膜を通じて注入流体を蝸牛内に投与するためのものであり、挿入深さをガイドするためのストッパーを備える。ストッパーは、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図4Aに緑色で示されている。Bは、卵円窓内の送達デバイスの、鼓室階から前庭階へ（蝸牛頂点のヘリコトレマでの連通を介して）、そしてアブミ骨底板に配置された通気部を通じて蝸牛外に出る注入流体の予想される流れを示す画像を含む（Talei 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図5】Aは、簡略化された内因性AAV構築物の模式図である。Bは、簡略化された組換えAAV（rAAV）構築物の模式図である。

【図6A】本明細書に記載の例示的なrAAV構築物の一連の概略図である。例示的なrAAV-抗VEGF構築物であり、とりわけ、自己切断ペプチドをコードする配列によって分離された免疫グロブリン重鎖可変ドメインと免疫グロブリン軽鎖可変ドメインとをコードする配列を含むものである。このような構築物は、本明細書では「V_H/V_L構築物」または「rAAV-V_H/V_L構築物」と呼ばれる。例示的なrAAV-V_H/V_Lとしては、ラニビズマブをコードするrAAV-V_H/V_LであるrAAV-ラニビズマブ

10

20

30

40

50

及び r A A V-ラニビズマブ-PC が挙げられる。

【図 6 B】本明細書に記載の例示的な r A A V 構築物の一連の概略図である。例示的な r A A V-抗 V E G F 構築物であり、とりわけ、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、任意選択の免疫グロブリン重鎖定常ドメイン、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、任意選択の免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、及び緑色蛍光タンパク質 (G F P) をコードする配列を含むものである。これらの構成要素のそれぞれは、自己切断ペプチドをコードする配列によって分離され得る。そのような構築物は、「A B G F P 構築物」または「r A A V-A B G F P 構築物」と呼ばれ得る。例示的な r A A V-A B G F P としては、ラニビズマブまたはベバシズマブをコードする r A A V-A B G F P である r A A V-ラニビズマブ-G F P 及び r A A V-ベバシズマブ-G F P が挙げられる。

10

【図 6 C】本明細書に記載の例示的な r A A V 構築物の一連の概略図である。例示的な r A A V-抗 V E G F 構築物であり、とりわけ、免疫グロブリン重鎖 (免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む) と免疫グロブリン軽鎖 (免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメインを含む) とをコードする配列を含み、その鎖が自己切断ペプチドをコードする配列によって分離されるものである。そのような構築物は、本明細書では「A B 構築物」または「r A A V-A B 構築物」と呼ばれる。例示的な r A A V-A B としては、ベバシズマブをコードする r A A V-A B である r A A V-ベバシズマブ及び r A A V-ベバシズマブ-PC が挙げられる。

【図 6 D】本明細書に記載の例示的な r A A V 構築物の一連の概略図である。例示的な r A A V 構築物であり、とりわけ、V E G F 受容体細胞外ドメイン 1、V E G F 受容体細胞外ドメイン 2、及びヒト免疫グロブリン γ (I g G) F c の一部をコードする配列を含むものである。そのような構築物は、「V E G F T R A P 構築物」または「r A A V-T R A P 構築物」と呼ばれ得る。例示的な r A A V-T R A P としては、アフリベルセプトをコードする r A A V-T R A P である r A A V-アフリベルセプト及び r A A V-アフリベルセプト-PC が挙げられる。

20

【図 7】本明細書に記載の例示的な r A A V-抗 V E G F 構築物のトランスフェクションまたは形質導入を用いた、異なる抗 V E G F タンパク質、ラニビズマブ及びベバシズマブの H E K 細胞発現を示すウェスタンブロットを含む。レーンは図の上部に沿って記されており、予測されたタンパク質サイズは図の左側に記されている。レーン 2 ~ 8 は還元タンパク質を含み、レーン 10 ~ 16 は非還元タンパク質を含む。レーン 1 : 染色済みの P a g e R u l e r (商標) タンパク質ラダー。レーン 2 : 非トランスフェクト / 陰性対照。レーン 3 : r A A V-ベバシズマブ-PC 構築物によるトランスフェクション。レーン 4 : r A A V-ラニビズマブ-G F P 構築物によるトランスフェクション。レーン 5 : r A A V-ラニビズマブ-PC 構築物によるトランスフェクション。レーン 6 : 感染多重度 (M O I) 7.5×10^4 の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。レーン 7 : 2.2×10^5 の M O I の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。レーン 8 : 5.5×10^5 の M O I の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。レーン 9 : 染色済みの P a g e R u l e r (商標) タンパク質ラダー。レーン 10 : 非トランスフェクト / 陰性対照。レーン 11 : r A A V-ベバシズマブ-PC 構築物によるトランスフェクション。レーン 12 : r A A V-ラニビズマブ-G F P 構築物によるトランスフェクション。レーン 13 : r A A V-ラニビズマブ-PC 構築物によるトランスフェクション。レーン 14 : 7.5×10^4 の M O I の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。レーン 15 : 2.2×10^5 の M O I の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。レーン 16 : 5.5×10^5 の M O I の r A A V A n c 80-ベバシズマブ-PC 粒子による形質導入。

30

40

【図 8 A】O c t e t (登録商標) H T X バイオセンサー装置により、O c t e t (登録商標) 解析ソフトウェア、D a t a A n a l y s i s H T 10.0 を使用して測定した、本明細書に記載の特定の抗 V E G F タンパク質の親和性を示す一連のグラフである。結合剤として組換えヒト V E G F を用いた緩衝液中での対照マウス抗ヒト V E G F モノク

50

ローナル抗体（抗hVEGF MmAb）の親和性を示すグラフである。このアッセイでは、抗hVEGF MmAbを100 μg/mLでCM中で調製し、次に1×キネティクス緩衝液で最終濃度10 μg/mLに希釈した。

【図8B】Octet（登録商標）HTXバイオセンサー装置により、Octet（登録商標）解析ソフトウェア、Data Analysis HT10.0を使用して測定した、本明細書に記載の特定の抗VEGFタンパク質の親和性を示す一連のグラフである。結合剤として組換えヒトVEGFを使用して、配列番号90に対応するrAAV-ラニビズマブ-PC構築物をトランスフェクトしたHEK細胞からの培養培地中の分泌型タンパク質の親和性を示すグラフである。

【図8C】Octet（登録商標）HTXバイオセンサー装置により、Octet（登録商標）解析ソフトウェア、Data Analysis HT10.0を使用して測定した、本明細書に記載の特定の抗VEGFタンパク質の親和性を示す一連のグラフである。結合剤として組換えヒトVEGFを使用して、配列番号93に対応するrAAV-ベバシズマブ-PC構築物をトランスフェクトしたHEK細胞からの培養培地中の分泌型タンパク質の親和性を示すグラフである。

【図8D】Octet（登録商標）HTXバイオセンサー装置により、Octet（登録商標）解析ソフトウェア、Data Analysis HT10.0を使用して測定した、本明細書に記載の特定の抗VEGFタンパク質の親和性を示す一連のグラフである。結合剤として組換えヒトVEGFをトランスフェクトしなかったHEK細胞からの対照培養培地（CM）中の分泌型タンパク質の親和性を示すグラフである。

【図9】AAV進化系統の系統発生及び祖先配列再構築のグラフ図である。樹状図は、AAVの進化経路をモデル化しており、AAV4及び5血清型の初期の種分化が、Anc80という単一のノードに並行している。実線付きの白丸は、祖先配列再構築によって再構築された進化的中間体を表す。点線付きの白丸は、AAVAnc80バリエーション周辺の確率的配列空間のライブラリを表す。サブクレードは明確さのために折り畳まれている（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図10】AAVAnc80カプシド表面の構造モデリングの概略図である。ビリオンの外部（上）及び内部（下）を視覚化するVP1三量体でのAAV2（左）とAAV8（右）とを比較したアミノ酸変化の構造マッピングである。AAVAnc80にはいくつかの異なる残基があり、Anc80Libにはいくつかの曖昧な、したがってダイモルフィックな残基がある（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。米国仮特許出願第63/152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図10に示すように、異なる残基は青で示され、曖昧でダイモルフィックな残基は赤で示される。

【図11】新生児マウスにおける正円窓膜送達による天然に存在するAAV血清型及びAAVAnc80バリエーションのin vivoでの蝸牛形質導入を表す代表的な蛍光画像を含む。マウス（P1）に、高感度GFP（eGFP）をコードする構築物を含む異なるAAVカプシド（AAV1、AAV2、AAV8、AAV6 [図示せず]、及びAAVAnc80）を注入した。ファロイジンはアクチンを標識し、米国仮特許出願第63/152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図11に赤で示されている。eGFP陽性内有毛細胞（IHC）及び外有毛細胞（OHC）の定量化により、高感度GFPをコードする構築物を含むrAAVAnc80（rAAVAnc80-eGFP）の送達後、基底部から頂部までおよそ90~100%の形質導入効率を示された（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図12】新生児マウスにおける正円窓膜送達によるrAAVAnc80粒子のin vivoでの前庭形質導入を表す代表的な蛍光画像を含む。マウス（P1）に、AAVAnc80-eGFP及びファロイジン染色標識アクチンを注入した。eGFPは緑で示され、ファロイジンは米国仮特許出願第63/152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図12において赤で示されている。形質導入は、卵形囊のI型及びII型有毛細胞の両方（パネル（A））、ならびに半規管稜の細胞（パネル（B））

）で観察された（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【図13】成体マウスにおける後半規管送達によるrAAV Anc80粒子の*in vivo*での蝸牛形質導入を表す代表的な蛍光画像を含む。マウス（7週齢）にrAAV Anc80-eGFP粒子を注入した。パネル（A）は、注入した蝸牛の中央蝸牛軸の断面の低倍率図を含み、パネルで（I）と表されるIHC、パネルで（O）と表されるOHC、パネルで（SL）と表されるラセン板縁、パネルで（RM）と表されるライスナー膜、及びパネルで（SG）と表されるラセン神経節における、eGFPシグナルを示す。パネル（B1）及びパネル（B2）は、蝸牛の頂部領域（パネル（B1））及び中間部領域（パネル（B2））のコルチ器の高倍率図を含む。eGFP陽性細胞の定量化により、IHCのおよそ100%が形質導入されたのに対し、OHCの形質導入は頂部から基底部に向かって減少していることが示された。パネル（C）は、eGFPシグナルがラセン神経節の細胞のサブセット（ニューロン及びサテライトグリア細胞）で検出されたことを示す低倍率図である（Suzuki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。この図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図13に示されている。

10

【図14】成体マウスにおける後半規管送達によるrAAV Anc80-eGFPの*in vivo*での前庭形質導入を表す代表的な蛍光画像を含む。マウス（7週齢）にrAAV Anc80-eGFPを注入した。パネル（A1）及びパネル（A2）は、前庭の断面の低倍率図を含み、卵形囊及び球形囊の両方におけるeGFPシグナルを示す。パネル（B）及びパネル（C）は、前庭の末端器官（パネル（B）：卵形囊；パネル（C）：膨大部稜）の断面の高倍率図を含み、支持細胞及び有毛細胞でのeGFP発現を示す。白塗り矢印は、形質導入された支持細胞の例を示す（有毛細胞は図示せず）（Suzuki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。この図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図14に示されている。

20

【図15】成体マウスにおける耳道の開窓を伴った正円窓膜送達を介した天然に存在するAAV2血清型の*in vivo*での蝸牛及び前庭形質導入をrAAV Anc80バリエーションと比較して表す代表的な蛍光画像を含む。マウス（4週齢）に、eGFPをコードする異なるAAV粒子（AAV2及びrAAV Anc80を図示し；AAV1、AAV8、及びAAV9は図示せず）を注入した。AAV2と比較して、rAAV Anc80媒介性形質導入は、同等のIHC及びOHC形質導入率を示した（パネル（A1）とパネル（A2））が、より広い形質導入を、ラセン神経節細胞（パネル（B1）とパネル（B2））及び球形囊の有毛細胞（パネル（C1）とパネル（C2）：全体；パネル（D1）とパネル（D2）：一部）で示した（Omichi 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。この図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図15に示されている。

30

【図16】本明細書に開示される抗VEGFタンパク質を含むrAAV Anc80粒子（rAAV Anc80-抗VEGF）によるWT新生児（P2）マウスの蝸牛外植片の形質導入後の、蝸牛外植片におけるRNA発現及び蝸牛外植片培地における分泌型タンパク質発現のグラフ図である。rAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子（配列番号93に記載の構築物）またはrAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子（配列番号90に記載の構築物）によりWTマウスの蝸牛外植片の細胞が形質導入され、抗VEGFタンパク質をコードするmRNAの発現及び分泌を駆動した。Aは、RNA発現分析を表し、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PCまたはrAAV Anc80-ベバシズマブ-PCをそれぞれ与えられた外植片の細胞におけるラニビズマブ及びベバシズマブをコードするmRNAの発現を示す。ビヒクルを与えられた外植片では発現は検出されなかった。結果は、平均+SDとして示される。Bは、様々な濃度（1.4E10、2.8E10、または4.2E10vg）のrAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子を与えられた外植片

40

50

の培地で検出されたラニビズマブのメソスケールディスカバリー（MSD）法による定量化を表す。ラニビズマブは、rAAVANC80-ラニビズマブ-PC粒子を与えられた外植片の培地で検出されたが、ビヒクルを与えられた外植片では検出されなかった。白丸は個々の試料（ $n=4$ ／群）におけるラニビズマブ濃度を示し、バーは平均を示す。

【図17】本明細書に記載のrAAVANC80-抗VEGF粒子により形質導入されたCBA／CaJマウスの内耳を示す、第1の試験（本明細書では「試験1」と呼ぶ）の代表的な低倍率蛍光染色画像を含む。画像は、1.4E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、1.2E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子、またはビヒクル対照のいずれかを蝸牛内投与した後の、顕微鏡下切開した蝸牛の中間回転の代表的な蝸牛の顕微鏡写真である。抗VEGFタンパク質発現を検出するために、感覚上皮を以下に対する一次抗体で免疫染色した：有毛細胞マーカーであるファロイジン（これらの顕微鏡写真においてラセン板縁のわずかな非特異的標識も示す）及びラニビズマブ（「抗Fab染色」）。米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図17に示すように、ファロイジンは赤で示され、ラニビズマブは緑で示されている。ラニビズマブとベバシズマブが共通で有するタンパク質のFabセグメントを検出するために、ヒト抗ラニビズマブ抗体を使用した。IHC、及びOHCの外側にある支持細胞で明確な標識が検出された。蝸牛の神経線維領域ではバックグラウンド染色が検出され（例えば、粒子注入蝸牛とビヒクル注入蝸牛の両方で神経線維の標識が明らかであった）、この特定領域での信頼できる発現評価ができなかった。

【図18】試験1からの代表的な蛍光染色画像を含み、1.4E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、または1.2E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子により形質導入されたCBA／CaJマウスの内耳を、非注入及び／またはビヒクル注入対照と比較して表す。IHC及びOHCを抗ミオシンVIIa抗体で免疫染色し、公開されている蝸牛図（Viberg and Canlon, 2004、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を用いて8、16、及び32kHz領域で画像化した。対照の非注入耳の画像は、対照ビヒクル注入耳の対側の耳から得たものである。スケールバー＝20µm。この図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図18に示されている。

【図19】試験1からの代表的な共焦点画像を含み、rAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）により形質導入されたCBA／CaJマウスの集団の形質導入された有毛細胞及びニューロンを表す。パネル（A）及びパネル（C）は、抗Fab抗体で免疫染色された形質導入細胞を表す。パネル（B）及びパネル（D）は、抗ニューロフィラメント200で免疫染色された神経細胞突起を表す。ビヒクル注入試料（パネル（A）及び（B））ならびにrAAVANC80-ラニビズマブ-PC粒子注入試料（パネル（C）及び（D））はいずれも、内溝領域に、形質導入された神経細胞突起があるが、コルチ器にはない。rAAVANC80-ラニビズマブ-PC粒子注入試料のみが、形質導入された内有毛細胞及び外有毛細胞を有する。スケールバー＝20µm。この図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63／152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図19に示されている。

【図20】試験1からのグラフ図であり、1.4E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、または1.2E10vg／蝸牛でrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子により形質導入されたCBA／CaJマウスのIHC及びOHC数のヒストグラムを、非注入及び／またはビヒクル注入対照と比較して表す。この分析で利用されたデータセットの代表的な集団は図18に示されている。Aは、非注入対照、ビヒクル注入対照、及び被験物質についてのOHC数を表す。Bは、非注入対照、ビヒクル注入対照、及び被験物質についてのIHC数を表す。A及びBの両方の数を、治療群及び周波数領域の関数として定

量化及びグラフ化した。各群のNは、9匹または10匹のいずれかであり、データは、平均+/-平均の標準誤差（S.E.M）として示される。対照の非注入耳の定量は、対照のビヒクル注入耳の対側の耳から行った。ブラケットを除いて、非注入耳と比較して* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ を得た。p値は、二元配置ANOVAと、その後の事後Tukey検定によって決定した。

【図21】有毛細胞（HC）及び非有毛細胞（非HC）の形質導入頻度のグラフ図である。この分析で利用されたデータセットの代表的な集団は図18に示されている。Aは、非注入対照、ビヒクル注入対照、及び被験物質についての有毛細胞（HC）数を表す。Bは、非注入対照、ビヒクル注入対照、及び被験物質についての非有毛細胞（非HC）数を表す。データは試験1からのものであり、1.4E10vg/蝸牛でrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、または1.2E10vg/蝸牛でrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子により形質導入されたCBA/Jマウスの集団の代表値である。形質導入された（Fab+）有毛細胞（A）及び非有毛細胞（B）の定量値は、両方の性別からのデータを組み合わせて、治療群及び周波数領域の関数としてグラフ化される。各群のNは、9匹または10匹のいずれかであり、データは、平均+/-平均の標準誤差（S.E.M）として示される。対照の非注入耳の定量値は、対照ビヒクル注入耳の対側の耳から得たものである。試料間にばらつきがあるため、統計的な比較は行わなかった。

【図22】試験2からの代表的な高倍率画像を含み、1.4E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子による蝸牛の形質導入の蛍光染色を表す。抗ラニビズマブ（mAb）標識を示す注入された蝸牛の3つの領域からの蝸牛の顕微鏡写真（63×）を示す。各列は注入されたマウスから取得した共焦点画像スタックによる最大投影を表し、各行は蝸牛の頂部（8kHz）、中間部（16kHz）、及び基底部（32kHz）の周波数領域を表す。各行の右側には、免疫染色で陽性の初代細胞タイプが記載されている。蝸牛の神経線維領域ではかなりのバックグラウンド染色が検出され（例えば、注入蝸牛と非注入蝸牛〔非注入蝸牛は図示せず〕の両方で神経線維の標識が明らかであった）、この特定領域での信頼できる発現評価ができなかった。抗ラニビズマブが緑色で標識されたこの図に提供されたパネルのカラー画像は、米国仮特許出願第63/152,832号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図22に示されている。

【図23】試験2からの血清中の分泌型抗VEGFタンパク質の検出及び定量化のグラフ図であり、1.4E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子の蝸牛内送達後のものである。抗VEGFタンパク質が、ビヒクル注入マウスの血清に比べてrAAVANC80-ラニビズマブ-PC粒子注入マウスの血清において高い濃度であることが電気化学発光を用いて検出された。白丸は個々の試料（ビヒクル、n=7；ラニビズマブ、n=9）における抗VEGFタンパク質濃度を示し、バーは平均を示す。

【図24】試験1からのマウス脳脊髄液（CSF）中の分泌型抗VEGFタンパク質の検出及び定量化のグラフ図であり、1.4E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、または1.2E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子の蝸牛内送達後のものである。抗VEGFタンパク質（ラニビズマブまたはベバシズマブ）は、rAAVANC80-抗VEGF粒子を投与したマウスのCSFにおいてMSDを用いて検出されたが、ビヒクルを投与したマウスのCSFにおいては検出されなかった。白丸は個々の試料（ビヒクル、n=10；ラニビズマブ、n=9；ベバシズマブ、n=4）における抗VEGFタンパク質濃度を示し、バーは平均を表す。

【図25】1.4E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ラニビズマブ-PC（配列番号90に記載の構築物）粒子、または1.2E10vg/蝸牛でのrAAVANC80-ベバシズマブ-PC（配列番号93に記載の構築物）粒子の蝸牛内投与前後の試験1マウスの聴性脳幹反応（ABR）閾値のグラフ図である。平均ABR閾値は、ビヒクル注入

10

20

30

40

50

マウス及び rAAV Anc80 粒子注入マウスを含む、蝸牛内手術後の全群で上昇した。平均 ABR 閾値は、rAAV Anc80 粒子を注入した耳及びビヒクルを注入した耳において、手術前に測定したベースライン ABR と比較して上昇した。エラーバーは標準偏差を表す。

【図 26】 rAAV Anc80-ラニズマブ-PC 粒子（配列番号 90 に記載の構築物）の蝸牛内送達後の試験 2 マウスの歪成分耳音響放射（DPOAE）及び ABR 閾値のグラフ図である。蝸牛及び聴力機能（A が DPOAE、B が ABR をそれぞれ示す）は、例示的な rAAV Anc80-ラニズマブ-PC 粒子を投与されたマウスにおいて、非注入マウスと比較して正常な平均閾値を示した。* は、rAAV Anc80-ラニズマブ-PC 粒子を投与された 1 匹のマウスが機能試験中に死亡したため、この動物では DPOAE 及び Chirp 音誘発 ABR のみが死亡前に測定され、したがって、8、16、及び 32 kHz の ABR では $N=2$ であったことを示す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図 27】 VS までの距離と比較した抗 VEGF タンパク質濃度（rAAV Anc80-ラニズマブ粒子（配列番号 91 に記載の構築物）を与えられた NHP の測定濃度を使用してモデル化した）を表す概略説明図及びグラフモデルを提供する。A は、計算モデル化アプローチの概略図である：90 μ L 球内の一定の抗 VEGF タンパク質の供給源の三次元拡散を、球の表面、例えば、鼓室階／底（fundus）の境界からの距離（mm）に関連して表すものである。底から腫瘍（5 mm 未満の幅）の内側境界及び外側境界までの距離は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる Koen 2020（直近では図 2）から得られたデータより推定した。B は、外リンパの抗 VEGF タンパク質濃度は拡散距離とともに減少するが、内耳道内の腫瘍の近傍では報告された生物学的に活性な範囲（Y 軸で 10～100%、X 軸で 0～11 mm の間の領域）内にとどまることを示す保守的なモデル化アプローチを表す。推定された抗 VEGF タンパク質濃度は、拡散係数の選択によって異なり、報告された 3 つの拡散係数に基づく範囲（実点による網掛け領域）として表される。網掛けを含む B のカラー画像は、米国仮特許出願第 63/152,832 号（参照によりその内容全体は本明細書に組み込まれる）の図 27 B に提供される。生物学的に活性な範囲、及び予測される治療関連範囲は、約 28 ng/mL と推定され；in vitro 細胞増殖アッセイにおいて VEGF-A の生物学的活性を 50% 阻害するのに必要な濃度は、Genentech 2017（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように 11～27 ng/mL である。

【図 28】 内有毛細胞（IHC）の形質導入事象を、アブミ骨底板の通気部を伴って AAV Anc80-eGFP を蝸牛内（RWM）に投与された 7 匹の NHP（片側 6 匹、両側 1 匹）と、アブミ骨底板の通気部なしで AAV Anc80-eGFP を蝸牛内（RWM）に投与された 2 匹の NHP（両側）について示す。蝸牛を、3 週間の生存期間後に IHC での eGFP 発現について分析した。マカク IHC では、高用量（NHP の M6～M9 で見られる）で約 80%～100% の形質導入効率が達成でき、低用量（NHP の M1～M3 で見られる）で eGFP 発現の頂部から基底部への勾配が観察された。アブミ骨底板の通気部なしで手術を受けた動物では、蝸牛の頂部 75% の領域で散発的な形質導入が観察されただけであった。

【図 29】 本開示の態様による、内耳に流体を送達するためのデバイスの斜視図を示す。

【図 30】 本開示の態様による、曲針サブアセンブリの側面図を示す。

【図 31】 本開示の態様による、内耳に流体を送達するためのデバイスの斜視図を示す。

【図 32】 本開示の態様による、デバイスの遠位端に結合した曲針サブアセンブリの斜視図を示す。

【図 33】 実施例 12 で用いた実験セットアップの概略図である。

【図 34】 NHP における rAAV Anc80-ラニズマブ粒子の蝸牛内送達後の、平均 ABR 閾値シフトを表す、一連のグラフ表示である。ビヒクル（A）、または、6.0 E10 vg/蝸牛（B）もしくは 3.0 E11 vg/蝸牛（図 34 C）の用量における、rAAV Anc80-ラニズマブ粒子のいずれかの、蝸牛内注射の 1、2、3、及び 6 ヶ月後に対する、（蝸牛内注射前の、同じ耳で取得したベースライン ABR と比較しての

） A B R 閾値のシフトを示す。各時点における群平均（ $\pm S D$ ）は、研究における各 N H P での両側測定値を反映する。

【図 3 5】実施例 1 4 で用いた実験セットアップの概略図である。

【図 3 6】 A A V - 抗 V E G F の用量のそれぞれに対する、 N H P の外リンパにおける抗 V E G F 濃度を示すグラフである。各用量群は 3 つの N H P を有し、ビヒクル群は 2 つの N H P を有した。

【図 3 7】内耳道（ I A C ）底からの様々な距離における、推定の抗 V E G F 濃度（ y 軸）の演算モデルを示すグラフである。報告された、生物学的に活性な閾値濃度は、図 2 7 に示すものに類似している。赤色を付けた領域は、早期前庭神経鞘腫（ V S ）が報告されている位置を意味する（ K o e n e t a l . , 2 0 2 0 ）。色の付いた線は、モデリ 10

ングした用量のそれぞれからの、抗 V E G F タンパク質の推定量を示す。 A A V 抗 V E G F の用量は全て、 V S 腫瘍が通常発見される位置において、生物学的に活性な閾値を上回る抗 V E G F タンパク質量を産生すると予想される。

【図 3 8】実施例 1 5 で用いた実験セットアップの概略図である。

【図 3 9】蝸牛顕微鏡写真における、タンパク質発現の定量方法を示す。

【図 4 0】試験した全ての用量における、 3 つの周波数位置（ 0 . 2 5 k H z 、 4 k H z 、及び 2 2 . 6 k H z ）での、蝸牛の抗 V E G F タンパク質発現を表す、代表的な画像である。 A は、 1 ヶ月目における抗 V E G F タンパク質発現を示す。 B は、 6 ヶ月目における抗 V E G F タンパク質発現を示す。 C は、内有毛細胞、柱状細胞、外有毛細胞、ヘンゼン細胞、及びクラウジウス細胞を含む、専用の有毛細胞における、抗 V E G F 、ファロイ 20

ジン、及び H o e c h s t 染色を示す。 D は、 C の画像の一部の、高解像拡大図である。【図 4 1】 6 3 倍の顕微鏡写真での、 N H P 蝸牛における抗 V E G F 発現を示すグラフである。データは、ビヒクル対照、または、 1 倍、 2 倍、及び 4 倍用量の A A V 抗 V E G F のいずれかで治療した動物における、 1 , 3 , 及び 6 ヶ月目における抗 V E G F 発現を示す。グラフの 3 つのバーの各群に関して、最初のバーは 1 ヶ月目のデータを表し、 2 番目のバーは 3 ヶ月目のデータを表し、最後のバーは 6 ヶ月目のデータを表す。ビヒクル対照 20

に対する抗 V E G F タンパク質発現を示し、蝸牛周波数位置全てを合計した。【図 4 2】 3 つの周波数位置： 0 . 2 5 k H z 、 4 k H z 、及び 2 2 . 6 k H z における、研究群全てにまたがる、 N H P 蝸牛での有毛細胞の全体生存を表すグラフである。動物を、ビヒクル対照、または、 1 倍、 2 倍、もしくは 4 倍用量の A A V 抗 V E G F のいずれ 30

かで治療した。 A 及び B の各周波数位置に関して、最初、 4 番目、 7 番目、及び 1 0 番目のバーは、 1 ヶ月目のデータを表し、 2 番目、 5 番目、 8 番目、及び 1 1 番目のバーは、 3 ヶ月目のデータを表し、 3 番目、 6 番目、 9 番目、及び 1 2 番目のバーは、 6 ヶ月目のデータを表す。 A は、内有毛細胞の生存を示し、 B は、外有毛細胞の生存を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 1 3 7 】

特定の実施形態では、本開示は、新生血管形成に関連する耳科疾患を有する対象の治療を意図した r A A V - 抗 V E G F 粒子に関する。特定の実施形態では、新生血管形成に関連するそのような耳科疾患は、前庭神経鞘腫（ V S ）、または内耳道内の前庭蝸牛神経周囲の細胞で形成される良性腫瘍である。特定の実施形態では、初期の V S に関連する一般 40

的な症状として、難聴、耳鳴り、及びめまいが挙げられ、腫瘍が成長し続けると、脳幹が圧迫されるおそれがあり、より深刻な病的状態、まれなケースでは死亡につながるこ

とが大いに懸念される。

【 0 1 3 8 】

特定の実施形態では、本開示は、例えば本明細書に記載の内耳障害を有する対象の治療を意図した r A A V - 抗 V E G F 粒子に関する。いくつかの実施形態では、内耳障害は、前庭神経鞘腫、または神経線維腫症 I I 型を含む。いくつかの実施形態では、内耳障害は、前庭神経鞘腫であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、内耳障害は、神経線維腫症 I I 型であるか、またはそれを含む。

【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本開示は、前庭神経鞘腫を有する対象の治療を意図した r A A V - 抗 V E G F 粒子に関する。

【0140】

特定の場合では、血管内皮増殖因子 (V E G F) の阻害剤による治療は、現在の標準治療である外科的切除及び／または放射線治療などの侵襲的な代替手段を用いるのではなく、進行性の V S 腫瘍を弱める可能性をもたらす。特定の実施形態では、臨床データは、有効性の観点から、V S 腫瘍を有する患者における全身投与 V E G F 阻害剤の使用を裏付けるが、V E G F 阻害剤の長期的な全身投与は、重大な安全上の懸念が伴う。特定の実施形態では、r A A V - 抗 V E G F は、抗 V E G F タンパク質の局所的な発現及び分泌を促進するために内耳への遺伝子導入によって V S を有する個体を治療するように設計及び意図される。特定の実施形態では、目的は、V S 部位で治療用 V E G F 阻害剤 (例えば、抗 V E G F タンパク質、例えば、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及び／またはアフリベルセプト) を局所的に曝露し、それにより全身曝露を制限し、全身投与に伴う副作用の可能性を最小化することである。

10

【0141】

特定の実施形態では、内耳の蝸牛及び前庭細胞は、r A A V - 抗 V E G F によって形質導入され、抗 V E G F タンパク質を、V S 腫瘍が位置する前庭蝸牛神経の間質及び神経周囲腔と拡散的に連続した蝸牛流体である外リンパに分泌する。特定の実施形態では、内耳道に沿った拡散に対する障壁がないことにより、外リンパで発現した治療用抗 V E G F タンパク質が神経間質内の意図する V S 標的に到達するための潜在的な経路が提供される。特定の実施形態では、蝸牛軸の形質導入細胞は、所望の抗 V E G F タンパク質が神経の間質液に直接分泌されるように配置される。

20

【0142】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物 (例えば、r A A V - 抗 V E G F を含む) の漸増用量が、片側 (例えば、散發性) 進行性 V S を有する個体 (例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒト患者) に対して片側蝸牛内注射を介して投与される。特定の実施形態では、これらの腫瘍の成長速度は可変であり、一部の V S 腫瘍は進行しない。特定の実施形態では、個体 (例えば、哺乳動物、例えば、ヒト) は、連続した画像評価で安定した腫瘍の証拠を有する個体を除いた、進行の明確な証拠を示す腫瘍を有する個体に限定され得る。特定の実施形態では、これらの腫瘍の成長速度は可変であり、一部の V S 腫瘍は進行しない。特定の実施形態では、個体 (例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒト患者) は、連続した画像評価で腫瘍体積が増加している証拠を有する個体を除いた、進行していないことの明確な証拠を示す腫瘍を有する個体に限定され得る。

30

【0143】

定の実施形態では、より大きな腫瘍 (複数可) (例えば、脳幹を圧迫する可能性がより高い腫瘍) を有する個体 (例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒト患者) は、本明細書に記載の組成物による治療から除外されるが、それは、いくつかの実施形態では、これらの個体が、命に関わるおそれのある腫瘍関連発症のリスクが高く、これを外科的切除及び放射線治療の現在の標準治療で回避できる可能性があるためである。特定の実施形態では、より大きな腫瘍 (例えば、脳幹を圧迫する可能性がより高い腫瘍) を有する個体 (例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒト患者) は、本明細書に記載の組成物による治療の明確な対象となるが、それは、いくつかの実施形態では、これらの個体が、命に関わるおそれのある腫瘍関連発症のリスクが高く、これを外科的切除及び放射線治療の現在の標準治療よりも侵襲性の低い方法で、及び／またはより効力が高く、もしくはは同等の効力で本明細書に記載の組成物を使用して回避できる可能性があるためである。

40

【0144】

特定の実施形態では、腫瘍サイズが脳幹に影響を与える可能性が低い、成長中の腫瘍を有する個体 (例えば、哺乳動物、例えば、ヒト) は、必要に応じて将来の外科的切除及び／または放射線照射の候補のままでありながら、本明細書に記載の組成物による介入 (例

50

例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ 療法)から最大の利益を享受する可能性がある。特定の実施形態では、腫瘍サイズが脳幹に影響を与える可能性がある、成長中の腫瘍を有する個体(例えば、哺乳動物、例えば、ヒト)は、必要に応じて将来の外科的切除及び／または放射線照射の候補のままでありながら、本明細書に記載の組成物による介入(例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ 療法)から最大の利益を享受する可能性がある。

【0145】

特定の実施形態では、本明細書では、個体、例えば哺乳動物、例えばヒトの内耳に、(a)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド及びシグナルペプチドに作動可能に連結された抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド；または(b)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗原結合抗体断片(例えば、 Fab または $scFv$)を含むポリペプチド、をコードする構築物のヌクレオチド配列を含む $rAAV$ 粒子の有効量、例えば、治療有効量を導入することを含む方法が提供される。

10

【0146】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物(例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$)は、耳科外科医によって管理された無菌条件下で手術室で投与され得る。

【0147】

いくつかの実施形態では、本明細書では、個体、例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒトの内耳及び／または内耳道における、抗体のレベルを増加させる方法であって、哺乳動物の内耳に、(a)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド及びシグナルペプチドに作動可能に連結された抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド；または(b)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗原結合抗体断片(例えば、 Fab または $scFv$)を含むポリペプチド、をコードするヌクレオチド配列を含む $rAAV$ 粒子の有効量、例えば、治療有効量を導入することを含み、該導入が、個体、例えば哺乳動物、例えばヒトの内耳における抗体または抗原結合抗体断片のレベルの上昇をもたらす、方法が提供される。

20

【0148】

いくつかの実施形態では、本開示は、個体、例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒトの内耳障害を治療するための方法であって、哺乳動物の内耳に、(a)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド及びシグナルペプチドに作動可能に連結された抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド；または(b)シグナルペプチドに連結された抗原結合抗体断片を含むポリペプチド、をコードするヌクレオチド配列を含む $rAAV$ 粒子の有効量、例えば、治療有効量を導入することを含み、該導入が、哺乳動物の内耳障害の治療をもたらす、方法を提供する。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書では、個体、例えば、それを必要とする哺乳動物、例えば、ヒトの内耳における $VEGF$ 活性を低下させる方法であって、哺乳動物の内耳に、(a)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド及びシグナルペプチドに作動可能に連結された抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド；または(b)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗原結合抗体断片(例えば、 Fab または $scFv$)を含むポリペプチド、をコードするヌクレオチド配列を含む $rAAV$ 粒子の有効量、例えば、治療有効量を導入すること[ここで、(a)のポリペプチドは、 $VEGF$ に特異的に結合して $VEGF$ 活性を低下させる抗体をコードし、(b)のポリペプチドは、 $VEGF$ に特異的に結合して $VEGF$ 活性を低下させる抗原結合抗体断片をコードする]を含み、該導入が、個体、例えば、哺乳動物またはヒトの内耳における $VEGF$ 活性の低下をもたらす、方法が提供される。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書では、個体(例えば、哺乳動物、例えば、ヒト)の内耳における新生血管形成に関連する耳科疾患、例えば、 VS 、または神経線維腫症 II 型を治療する方法であって、個体の内耳に、(a)シグナルペプチドに作動可能に連結された抗体重鎖可変ドメインを含むポリペプチド及びシグナルペプチドに作動可能に連結さ

50

れた抗体軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド；または（b）シグナルペプチドに作動可能に連結された抗原結合抗体断片（例えば、F a bまたはs c F v）を含むポリペプチド、をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を導入すること〔ここで、（a）のポリペプチドは、V E G Fに特異的に結合してV E G F活性を低下させる抗体をコードし、（b）のポリペプチドは、V E G Fに特異的に結合してV E G F活性を低下させる抗原結合抗体断片をコードする〕を含み、該導入が、新生血管形成を伴う耳科疾患、例えば、個体の内耳におけるV Sの治療をもたらす、方法が提供される。

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書では、シグナルペプチドに作動可能に連結された可溶性V E G F受容体をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の内耳に導入することを含む方法が提供される。

【0152】

いくつかの実施形態では、本開示は、それを必要とする個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の内耳における可溶性V E G F受容体のレベルを増加させる方法であって、個体の内耳に、シグナルペプチドに作動可能に連結された可溶性V E G F受容体をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を導入することを含み、該導入が、個体の内耳における可溶性V E G F受容体のレベルの増加をもたらす、方法を提供する。

【0153】

いくつかの実施形態では、本明細書では、それを必要とする個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の内耳障害を治療するための方法であって、シグナルペプチドに作動可能に連結された可溶性V E G F受容体の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を個体の内耳に導入することを含み、該導入が、個体の内耳障害の治療をもたらす、方法が提供される。

【0154】

いくつかの実施形態では、本明細書では、それを必要とする個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の内耳におけるV E G F活性を低下させる方法であって、シグナルペプチドに作動可能に連結された可溶性V E G F受容体の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を個体の内耳に導入することを含み、該導入が、個体の内耳におけるV E G F活性の低下をもたらす、方法が提供される。

【0155】

いくつかの実施形態では、本明細書では、個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の内耳（例えば、内耳道を含む）における新生血管形成、V S、または神経線維腫症2型に関連する耳科疾患を治療する方法であって、シグナルペプチドに作動可能に連結されたV E G F受容体の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列をコードするヌクレオチド配列を含むr A A V粒子の有効量（例えば、治療有効量）を個体の内耳に導入することを含み、該導入が、個体の内耳における新生血管形成、V S、または神経線維腫症I I型に関連する耳科疾患の治療をもたらす、方法が提供される。

【0156】

他の実施形態では、本開示はまた、本明細書に記載の任意のr A A V粒子を含むキットも提供する。

【0157】

組成物、キット、及び方法のさらなる非限定的な態様が本明細書に記載されており、これらは制限なく任意の組み合わせで使用することができる。

【0158】

本開示は、特に、内耳道におけるV S腫瘍環境に近接し、拡散的に連続している蝸牛及び前庭系の細胞において、分泌型抗V E G Fタンパク質を局所的に発現させることにより

10

20

30

40

50

、新生血管形成に関連する耳科疾患、例えばVSを有する個体を治療するための遺伝子治療方法、例えば、本明細書に開示される組成物を使用する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、抗VEGFタンパク質（rAAV-抗VEGF）をコードする相補的DNA（cDNA）を含有する構築物を含むrAAV粒子を使用して蝸牛に遺伝子導入することを含む。論に拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、rAAV-抗VEGF（例えば、rAAV Anc80-抗VEGF）によって形質導入された内耳の蝸牛及び前庭細胞は、外リンパならびに前庭蝸牛神経（上前庭神経と下前庭神経及び蝸牛神経で構成される）の間質及び神経周囲腔に抗VEGFタンパク質を分泌できると考えられている。VS腫瘍の大部分は、前庭蝸牛神経を収容する内耳道の外側3分の1、蝸牛に最も近い部分に発生する（図1～3）。この内耳道に沿った拡散に対する障壁がないことにより、蝸牛神経は、その外側端に外リンパ、その内側端にCSFを有する流体の連続体に浸されており、したがって、外リンパから神経間質への拡散は、外リンパで発現した治療用抗VEGFタンパク質が、意図するVS標的に到達するための潜在的な経路を提供する。VEGF阻害剤が腫瘍の制御及び退縮をもたらす正確な機序は完全には理解されていないが、いくつかの実施形態では、機序は、内皮細胞増殖の阻害による血管透過性の低下及び／または異常な血管新生、ならびに腫瘍血管系の正常化を含む（Brastianos 2009、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0159】

現在までに、ヒトにおけるrAAV粒子を用いた内耳への導入を含む遺伝子導入臨床試験は知られていないが、高度から重度難聴の治療のためにヒトアトナール（Atonal）転写因子（Hath1）の相補的DNA（cDNA）をコードする構築物を含むアデノウイルス粒子を評価する臨床試験が、2014年に開始され2019年に完了した（Clinicaltrials.gov 2020a [NCT02132130]、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0160】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される送達アプローチは、内耳細胞の形質導入のための合成AAVカプシド（例えば、AAV Anc80）、及び／または蝸牛に直接標的化送達するためのデバイスを含む。

【0161】

VS患者の現在の標準治療には、いくつかのアプローチといくつかの治療目的が含まれている（Doherty 2006；Kaul 2018、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。治療には、画像診断／観察、手術、及び放射線治療が含まれる。治療目的には、聴力温存が含まれ得るが、多くの場合、患者は完全または部分的な聴覚障害を呈し、腫瘍のサイズと成長により、治療の必然的な結果として難聴を甘受する、より積極的な介入が必要になる場合がある。手術及び放射線照射はどちらも副作用を伴うが、重要なことには、どちらも観察のみと比較して生活の質の指標の改善とは関連していない（Carlson 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）ため、腫瘍の成長の影響を軽減できる侵襲性の低い治療法が明らかに必要とされている。

30

【0162】

NF2患者における腫瘍の成長及び関連する難聴を制御するためのベバシズマブの全身投与による臨床効果は、重大なリスクがないわけではなく、治療効果を維持するために必要とされる継続的な静脈内注入が重篤な合併症のリスクも高めている。NF2に対してベバシズマブを使用した研究のメタ分析では、125名の患者を含む5つの臨床試験集団のメタ分析に基づいて、重篤な毒性（グレード3または4）のプールされた発生率は17%であった（Lu 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。高血圧、タンパク尿、肝臓酵素の上昇、動脈血栓塞栓事象（ATE）、静脈血栓塞栓事象、出血、ならびに手術及び創傷治療合併症は全て、高用量のベバシズマブ療法と関連している（Chen 2009；Hanna 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。本明細書では、特に、VSを治療するための代替的アプローチが開

40

50

示され、例えば、高レベルの循環抗 V E G F タンパク質（例えば、ベバシズマブ）を必要とせず、いくつかの実施形態では、治療薬分子への全身曝露に関連する事象に関して患者のリスクを低くすることができる。

【0163】

いくつかの実施形態では、r A A V - 抗 V E G F を内耳に送達するための蝸牛内投与経路の使用、内耳細胞の形質導入、及びその後の抗 V E G F タンパク質（例えば、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及び／またはアフリベルセプト）の発現及び／または分泌により、腫瘍に近接した治療薬の持続的なデポが生成され得る。いくつかの実施形態では、r A A V - 抗 V E G F によって形質導入された内耳の蝸牛及び前庭細胞は、抗 V E G F タンパク質を近くの室（例えば、外リンパ、及び蝸牛軸の細胞、例えば、ラセン神経節ニューロン及びサテライトグリア細胞）に分泌し得る、及び／または蝸牛神経の間質液に直接タンパク質を分泌し得る。いくつかの実施形態では、内耳道に沿った拡散に対する障壁がないことにより、蝸牛神経は、その外側端（V S 腫瘍の大部分が発生する蝸牛に最も近い場所 [図 1 ~ 3] ）に外リンパ、その内側端に C S F を有する流体の連続体に浸されることになる。いくつかの実施形態では、外リンパから神経間質への拡散は、外リンパで発現した治療用抗 V E G F タンパク質が、意図する V S 標的に到達するための潜在的な経路を提供する。

10

【0164】

いくつかの実施形態では、r A A V - 抗 V E G F を内耳に送達するための蝸牛内投与経路の使用、内耳細胞の形質導入、及びその後の抗 V E G F タンパク質（例えば、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及び／またはアフリベルセプト）の発現及び／または分泌により、非蝸牛組織または流体区画に、治療上関連しないまたは検出不能なレベルの抗 V E G F タンパク質がもたらされる。いくつかの実施形態では、抗 V E G F タンパク質は、血清、C S F、肝臓、脾臓、脳幹、聴覚皮質、下顎リンパ節、またはそれらの組み合わせにおいて、治療上関連しないまたは検出不能なレベルで存在する

20

【0165】

いくつかの実施形態では、腫瘍表面での抗 V E G F タンパク質への局所曝露は、血流からの抗 V E G F タンパク質の溢出と比較して、V E G F にアクセスし中和するための拡散経路が異なるにもかかわらず、腫瘍の成長を制御することができる。例えば、L i c h t e n b e l d e t a l . , 1999（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、抗 V E G F タンパク質をマウスの腫瘍に局所的に適用し、血管透過性の有意な低下を観察したが、注目すべきは、同程度でマウスの血管透過性の低下を達成した全身投与と比較して20倍低い用量であったことである（Y u a n 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

30

【0166】

理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、V S を取り囲む流体での抗 V E G F タンパク質への低レベルだが持続的な曝露が、例えば、腫瘍血管の透過性の低下及び腫瘍血管系の正常化などの様々な機序を通じて、腫瘍の成長を安定化及び／または低減し得ると考えられている。いくつかの実施形態では、抗 V E G F タンパク質の循環レベルを最小限に抑えることにより、r A A V - 抗 V E G F の耳への局所送達、及び結果として生じる抗 V E G F タンパク質の腫瘍微小環境での曝露が、抗 V E G F タンパク質の全身投与に伴う有害事象のリスクを最小化しながら、永続的な治療上の利点を提供することができる。

40

【0167】

前庭神経鞘腫（V S）

V S（聴神経腫瘍とも呼ばれる）は、前庭蝸牛神経（第8脳神経とも呼ばれる）を覆うシュワン細胞の新形成に起因する、良性で、通常は成長の遅い腫瘍（複数可）である。V Sは、多くの場合、音及び平衡感覚に関する情報を内耳から脳へ伝達する役割を担う神経である前庭蝸牛神経の上前庭枝または下前庭枝で発生する（例えば、図1~3を参照）。これらの腫瘍は、多くの場合、内耳道内に発生し（例えば、内耳のすぐ近く）、小脳橋角

50

にまで及ぶことがある。腫瘍は、散発性の片側性腫瘍として発生するか、まれではあるが両側性腫瘍（一般的に神経線維腫症2型（NF2）の状態が発生する）として発生する可能性がある。VSの発生が多い領域は、前庭蝸牛神経に沿った部分である（例えば、図1～3を参照）。小さな小管内腫瘍（幅5mm未満）が、例えば、蝸牛に最も近い、内耳道の外側3分の1内に生じ得る（Koehn 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0168】

VSに関連する一般的な症状としては、難聴、耳鳴り、及びめまいが挙げられる。腫瘍が成長を続け、内耳道の外側及び頭蓋腔内へと拡大すると、脳幹を圧迫する可能性があり、より重篤な病的状態及び生存に対する危機が重大な懸念となる。現在の標準治療では、小さいまたは成長していない腫瘍は観察のみであり得るが、大きい及び／または進行性の腫瘍には外科的切除及び／または放射線治療が適応されている。

10

【0169】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、VSに関連する症状及び／またはVSを治療するための現在の標準治療法を低減及び／または軽快することができる。そのような症状としては、これらに限定されないが、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、及び／または死亡が挙げられ得る。

20

【0170】

発見されたVS腫瘍が無症状で、他の徴候のために画像診断を受けていた患者で確認された数が増えていることは注目に値する（Reznitsky 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの症例では、VSの症状は、蝸牛神経の圧迫及び前庭蝸牛神経（第8脳神経）の前庭枝の侵襲から生じ得る。顔面神経は腫瘍によって引き伸ばされて広がることが多いが、顔面麻痺は一般にまれである。いくつかの症例では、顔面の感覚情報を脳へ伝達する役割を担う近傍の三叉神経が圧迫され、顔面の感覚異常を生じ得る。組織学的には良性であっても、いくつかの症例では、大きな腫瘍が脳幹を圧迫し、水頭症、小脳ヘルニア、そしてまれに死亡に至る。

【0171】

VSによって誘発される難聴は、例えば、蝸牛神経の圧迫及び／または蝸牛の機能障害によって生じると考えられており、このことは、ほとんどの症例で蝸牛の病変が存在することによって裏付けられている。VS誘発型難聴の機序としては、例えば、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化（例えば、腫瘍からの毒性サイトカイン）、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、及び／または蝸牛血管供給の途絶が含まれると仮定されている（Roosli 2012；Dilwali 2015；Remenschneider 2017、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

30

【0172】

現在の治療法は、腫瘍の成長に関連するリスクを低減し得るが、難聴または耳鳴りの安定化とは関連せず、多くの場合、片側性の残存聴力の低下、難治性頭痛、及び顔面神経の損傷などの副作用をもたらす可能性がある（Pedrosa 1994；Sampath 1997；Sardhara 2020、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。まれではあるが、放射線治療は、二次性悪性腫瘍のさらなるリスクも伴う（Kapurch 2016、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。VSの現在の治療レジメンによる聴力温存の推定値は様々であるが、外科的切除術の大規模な後ろ向き比較において、Ansariは、使用した外科的アプローチ、ならびに腫瘍サイズ及び位置に応じて、平均的な術後難聴の範囲が40.6～82.7%であったことを報告した。これには中頭蓋窩法及び後S状静脈洞法などの外科的アプローチが含まれ、腫瘍サイズによっては、特に聴力温存を大いに促進するために、経迷路法によるアプローチ

40

50

よりも優先され得る（Ansari 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。神経外科学会からのガイドラインでは、放射線手術、顕微手術、または観察を検討している患者に、10年以内に50～75%の確率で難聴になることを予期して助言を行うことを推奨しており、これらの治療の選択肢のそれぞれで10年後の聴力温存の可能性が中程度に低い（>25～50%と定義）確率しかないことを記述している（Carlson 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。現在利用可能なVSの標準治療には、聴力改善の可能性を伴うものはない。

【0173】

散発性VSの治療に関する意思決定は複雑である。腫瘍の存在は、通常、磁気共鳴画像法（MRI）によって確認され、初期の標準治療は症状の重症度と腫瘍サイズに基づいて10
いる。診断時には、およそ20～30%の症例が1cm未満、およそ30%の症例が1～2cm（両端値を含む）、残りの症例（およそ40～50%）が2cm超である（Peris-Celda 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。MRIスキャナーの可用性及び利用率の増加に伴い、一般に、これらの腫瘍は、より早期に（より小さく）発見され、無症状の段階で発見されることが多くなっている（Reznitsky 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。特定の実施形態では、本開示は、0.5cm未満、1cm未満、2cm未満、3cm未満、4cm未満、または5cm未満の腫瘍の成長を停止もしくは遅延させる、及び／または縮小させるのに特に適している可能性がある組成物及び方法を提供する。

【0174】

いくつかの症例では、VSは可変であり、多くの場合予測不可能な成長速度を示す。このような腫瘍の固有の挙動は、画像診断法、腫瘍サイズの推定、及び成長の定義のばらつきによってさらに複雑になる（Kondziolka 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。全体的な腫瘍の成長は平均しておよそ1mm／年であるが、全腫瘍の30～60%は低成長または明らかな成長を示さず、成長するものについては、年間線形速度は2～3mm／年である（Paldor 2016；Lees 2018、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。小さな腫瘍を有する一部の患者では、治療はMRIスキャンのみから構成され、腫瘍が測定可能な成長を示す場合、または症状が悪化する場合にのみ追加の治療が検討される（MacKeith 2013；Kirchmann 2017、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に30
組み込まれる）。腫瘍が成長し続け、したがって脳幹圧迫などの続発症のリスクが大幅に増加している一部の患者では、現在の治療の選択肢は、外科的切除、放射線照射（Golfinos 2016、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、またはこれらのアプローチのいくつかの組み合わせを含む。これらの治療は、腫瘍の成長に関連するリスクを低減し得るが、難聴の長期安定化（Carlson 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）または耳鳴りの改善（Sardhara 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）とは関連せず、多くの場合、片側性の残存聴力の低下、難治性頭痛（Pedrosa 1994、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、及び顔面神経の損傷（Sampath 1997、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）などの副作用をもたらす可能性がある。現在、全VS症例の約40
半数は、最終的に外科的切除及び／または放射線照射を必要とする。いくつかの実施形態では、本開示は、難聴、語音理解の低下、耳鳴り、生活の質の低下、脳幹圧迫、及び／または死亡などの腫瘍の成長に関連するリスクを低減する組成物及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍の成長、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、及び／または死亡などの関連するリスクを低減する組成物及び方法を提供する。

【0175】

外科的治療及び放射線治療の両方における近代かつ最新の改善にもかかわらず、いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、観察という保守的なアプローチが支持されており；腫瘍が成長していない限り、これは、残存する聴力機能を温存し、介入治療による悪影響の可能性を最小限に抑えるための現時点での最善の戦略となっている（Mac Keith 2013；Kirchmann 2017；Torres Maldonado 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、改善された治療は、VSの停滞及び／または退縮を促進し、したがって、外科的切除または放射線治療を含むより侵襲的なアプローチの必要性を回避することができるものである。

【0176】

米国では、VSの総発生率は、人口10万人あたりの新規症例が1.09～1.98と推定され、したがって、米国では毎年3,300～6,300人の患者がVSと診断されている（Kshetry 2015；Ostrom 2018、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。報告されている発生率が近年増加していることは、人口の高齢化と画像診断技術の継続的な向上の組み合わせに起因している。VS患者の現在の標準治療には、いくつかのアプローチといくつかの治療目的が含まれている（Doherty 2006；Kaul 2018、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。治療には、画像診断／観察、手術、及び放射線治療が含まれる。治療目的には、聴力温存が含まれ得るが、多くの場合、患者は完全または部分的な聴覚障害を呈し、腫瘍のサイズと成長により、治療の必然的な結果として難聴を甘受する、より積極的な介入が必要になる場合がある。手術及び放射線照射はどちらも副作用を伴うが、重要なことには、どちらも観察のみと比較して生活の質の指標の改善とは関連していない（Carlson 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）ため、腫瘍の成長の影響を軽減できる侵襲性の低い治療法が明らかに必要とされている。

【0177】

成長中の腫瘍、または脳幹を圧迫している腫瘍、または脳幹を最終的に圧迫する可能性がある腫瘍を有する患者の多くでは、観察のみでは許容できず、神経機能への影響を防ぐために外科的切除または放射線照射が必要になる場合がある。症例によっては、顔面神経を少しも損傷させずに、腫瘍全体を摘出することは不可能である。これらの場合、顔面神経機能を維持するために垂全摘出が行われることが多いが、この治療法では、成長を続ける可能性のある腫瘍が残存する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、外科的切除及び／または放射線治療と組み合わせた併用療法として利用され得る。いくつかの実施形態では、そのような併用療法アプローチは、顔面神経損傷、または残存腫瘍の細胞成長のリスクを低減する。

【0178】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを利用する本明細書に記載の治療アプローチは、外科的切除及び／または放射線照射などの現在の標準治療と関連する副作用を回避及び／または最小限に抑えながら、腫瘍の成長を薬学的に弱める。

【0179】

VSの現在の標準治療は、画像診断技術が進歩し、腫瘍の成長を特定及び追跡する能力が向上したため、過去2～30年にわたり進化してきた。多くの腫瘍が低速または低成長を示し、低い成長速度が維持される限り聴力に影響を与えないであろうという認識の高まりとともに、保守的で観察的な「経過観察（wait and rescans）」アプローチへ向かう傾向が進んでいる（Mac Keith 2013；Reznitsky 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0180】

特定の実施形態では、本明細書に記載の介入、方法、及び／または組成物は、例えば、腫瘍の成長の停止、聴力の安定化、及び／または外科的切除及び／または放射線治療などのより侵襲的な治療アプローチの必要性の回避によって保守的な治療アプローチを強化する可能性を含む、利点を含んでいる。VSの成長を停止させることは実質的な臨床的利益をもたらすと考えられるが、いくつかの実施形態では、ペバシズマブで治療したNF2患

者のV S腫瘍の研究（Huang 2018；Plotkin 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）で示されるように、本明細書に記載の組成物（例えばrAAV-抗VEGF）を利用する方法及び治療が、腫瘍の停滞のみならず、腫瘍の収縮、語音理解の回復、及び語音理解の知覚された困難の軽減を促進する可能性がある。さらに、全身投与されたVEGF阻害剤を用いた研究では、NF2患者のV Sに関連する症状を含む、NF2関連の生活の質の改善が示されている（Plotkin 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。しかしながら、これらの全身投与は、多くの場合、負の副作用を伴う。これらの初期の研究結果は、抗VEGFタンパク質治療が、V Sに関連する症状を軽快し、潜在的に闘う可能性があることを示唆し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）は、侵襲性の低い治療法、及び腫瘍と拡散的に連続した抗VEGFタンパク質の持続的かつ局所的な発現を可能にし得、新生血管形成と関連する耳科疾患（例えば、V S）を有する患者に対して、副作用を伴う全身治療を行わずに抗VEGF治療のより集中的かつ改善された利点をもたらす可能性がある。

10

【0181】

V Sにおける血管内皮増殖因子（VEGF）とVEGF阻害剤

新たな血管の発生及び脈管化は、多くの腫瘍の成長モデルにおいて重要な因子であることが判明しており、V Sの成長に重要である可能性がある。VEGFは血管新生の主要な調節因子の一つである。特定の場合では、VEGFタンパク質及びその受容体は散発性V S腫瘍で発現され（Cayee-Thomasen 2003；Plotkin 2009、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、例えば182個の切除された散発性V S腫瘍の研究において調査された全ての腫瘍はVEGF受容体を発現していた（Koutsimpelas 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。場合によっては、このタイプの神経鞘腫におけるVEGFタンパク質及び／または受容体の発現レベルは、連続MRIによって測定された腫瘍の成長速度及び／または成長指数（Cayee-Thomasen 2005；Koutsimpelas 2007、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）ならびに微小血管密度（Koutsimpelas 2007、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）と相関することが示されており、VEGF発現がV Sの成長に関与することが示唆される。さらに、VEGF阻害剤（ベバシズマブ）による全身治療は、V Sを有するNF2患者の成長を制御し、聴力を改善するのに有効であった。理論に束縛されるものではないが、VEGF阻害剤を使用することにより、血管の成長、例えば、腫瘍の脈管化を制御することで、腫瘍の成長、例えば、V Sの成長を制御できると考えられる。

20

30

【0182】

VEGF遺伝子は血管内皮増殖因子（VEGF）をコードし、以前はfms様チロシンキナーゼ（Flt-1）として知られていた。VEGFタンパク質は、血管内皮細胞の移動及び増殖を誘導するヘパリン結合性タンパク質である。野生型VEGFタンパク質をコードするタンパク質及びヌクレオチド配列の非限定的な例を本明細書に記載する。

【0183】

いくつかの実施形態では、腫瘍表面での抗VEGFタンパク質への局所曝露は、血流からの抗VEGFタンパク質の溢出と比較して、VEGFにアクセスし中和するための拡散経路が異なるにもかかわらず、腫瘍の成長を制御する可能性を有する。例えば、Lichtenbelt et al., 1999（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、抗VEGFタンパク質をマウスの腫瘍に局所的に適用し、血管透過性の有意な低下を観察したが、注目すべきは、同程度でマウスの血管透過性の低下を達成した全身投与と比較して20倍低い用量であったことである（Yuan 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGFを含む）は、V Sを囲む流体での抗VEGFタンパク質への低レベルだが持続的な曝露を提供し、したがって、腫瘍の成長を安定化及び／または低減する可能性を有する。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物（例え

40

50

ば、rAAV-抗VEGFを含む）は、腫瘍血管の透過性の低下及び／または腫瘍血管系の正常化によって腫瘍の成長を安定化及び／または低減する。

【0184】

特定の実施形態では、VSに対する抗VEGFタンパク質療法、例えば本明細書に記載の療法は、外科的切除及び／または放射線治療などの侵襲的代替手段を必要とせずに腫瘍の成長を弱め、それにより例えば外科的切除及び／または放射線治療の合併症を回避する。全身投与されたVEGF阻害剤（ベバシズマブ）は、神経線維腫症2型（NF2）（NF2の生殖細胞変異から生じる腫瘍もVEGF及びその受容体を高度に発現する）の患者において、VSの成長及び難聴続発症の安定化または軽減に有効性を示す可能性があることが示唆されている（Plotkin 2009；Plotkin 2012；Lu 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。しかしながら、NF2患者でのVSの成長を制御するためのVEGF阻害剤の全身投与もまた、副作用を伴う可能性があり、125名の患者を含む5つの臨床試験参加者の集団のメタ分析において、重篤な毒性（グレード3または4）のプールされた発生率は17%であった（Lu 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0185】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）は、例えば、抗VEGFタンパク質の発現及び分泌を促進する、内耳への遺伝子導入によってVSを有する個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）を治療する方法において使用することができる。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、抗VEGFタンパク質への局所曝露（例えば、内耳での）を提供する。特定の実施形態では、VS部位での抗VEGFタンパク質への局所曝露（例えば内耳での）は、全身曝露を制限し、及び／または副作用の可能性を低減、例えば最小化する。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）は、全長マウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体由来のヒト化モノクローナル抗体断片（Fab）であるラニビズマブ（48キロダルトン[kDa]）を含む。特定の実施形態では、ラニビズマブはVEGFに結合し、その受容体VEGFR-1及び／またはVEGFR-2へのVEGF結合を阻害し、それにより、血管漏出、異常な血管新生、及び／または腫瘍の成長を低減する（Genentech 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

30

【0186】

特定の実施形態では、内耳の蝸牛及び前庭細胞は、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGFを含む）によって形質導入される。特定の実施形態では、これらの細胞タイプ及び／または他の細胞タイプは、腫瘍が存在する前庭蝸牛神経（例えば、上前庭神経と下前庭神経及び蝸牛神経で構成される）の間質及び神経周囲腔と拡散的に連続した内耳流体である外リンパに抗VEGFタンパク質を分泌し得る。いくつかの実施形態では、VS腫瘍の大部分は、前庭蝸牛神経を収容する内耳道の外側3分の1（蝸牛に最も近い部分）に発生する。いくつかの実施形態では、この内耳道に沿った拡散に対する障壁がないことにより、蝸牛神経は、その外側端に外リンパ、その内側端にCSFを有する流体の連続体に浸されており、したがって、外リンパから神経間質への拡散は、外リンパで発現した治療用抗VEGFタンパク質が、意図するVS標的に到達するための潜在的な経路を提供する（Rask-Andersen 2006、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、蝸牛軸内のラセン神経節ニューロン及び／またはそれらのサテライトグリア細胞が、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGFを含む）によって形質導入及び／またはトランスフェクトされ、これらの細胞は、蝸牛神経の間質液に直接タンパク質を分泌されるように配置される。

40

【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）の蝸牛内投与は、基礎病因にかかわらず、新生血管形成に関連する耳科疾患（例えば、VS）を有する個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）において、将来的な治療の必要性

50

を排除し、生理的聴力を温存する可能性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）の蝸牛内投与は、外科的切除及び／または放射線治療などの侵襲的な治療アプローチ、ならびに関連する生理的聴力の低下を遅延させる可能性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）の蝸牛内投与の後に、その後の標準治療が続く。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）の蝸牛内投与は、放射線治療の前及び／または後に行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）の投与は、腫瘍の感受性を高め、より低い放射線量を可能にすることによって、放射線治療に対する個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）の奏効を改善し得る（Koutsimpelas 2012; Gao 2015、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0188】

上述のように、新たな血管の発生及び脈管化は、VSの成長において重要な因子であることが判明しており（Koutsimpelas 2007; Wong 2010、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、VEGFは血管新生の主要な調節因子の1つである。血管新生効果に加えて、VEGFは、放射線照射によって誘発されるアポトーシスに対する細胞の保護及び耐性ももたらす（Koutsimpelas 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。過去10年間で、VEGF阻害剤によりVSの成長を停止または逆転できることを実証する臨床データが出てきている。ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））は、現在、NF2の状態において、VS患者での有効性の予備的証拠が実証されている唯一の薬理学的製剤である。

20

【0189】

最初の臨床的証拠は、10年以上前にPlotkinらによるセミナル論文で発表された（Plotkin 2009、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。の研究では、ベースラインの腫瘍サイズが $2.2 \sim 38.7 \text{ cm}^3$ 、ベースラインの年間成長率が $9 \sim 121\%$ で、ほとんどが難聴を呈している10名のNF2患者（男性6名、女性4名、年齢中央値25歳）に、平均12ヶ月間（ $3 \sim 19$ ヶ月）、2週間ごとにベバシズマブ 5 mg/kg を全身投与した。ベバシズマブを繰り返し投与した後、10名中9名の患者で腫瘍が縮小し、6名の患者がMRIで腫瘍体積が少なくとも 20% 減少するという奏効を示した。11～16ヶ月のフォローアップ期間中も6名中4名の患者で奏効が維持された。腫瘍が小さくなった10名中9名の最良の治療効果の中央値は、 26% の体積減少であった。聴力検査が可能な7名の患者のうち、ベースライン検査と比較して、4名は単語認識スコアの有意な増加として定義される改善を示し、2名は安定した難聴を示し、1名は進行性の難聴を示した（Plotkin 2009、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。かかる結果は、本アプローチが、腫瘍の成長が持続している患者に見られる進行性の難聴を回復させる可能性があることを示唆し得る。

30

【0190】

この最初の発表の後、ベバシズマブを全身静脈内投与した（2週間ごとに 5 mg/kg を $6 \sim 41$ ヶ月間；期間の中央値14ヶ月）NF2患者31名の大規模な後ろ向き検討が報告された（Plotkin 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。同様の患者集団の本研究では、評価された患者の 57% が、ベースラインからの単語認識スコアの増加として定義される聴力の改善を示し、 55% が、ベースラインと比較して腫瘍体積の少なくとも 20% の減少と定義されるX線写真での奏効を示した。長期的な治療効果を評価すると、1年後には患者の 90% で聴力が安定または改善し、これらの患者の 61% では3年後もその傾向が維持された。さらに、患者の 88% が1年間の治療後に腫瘍サイズが安定または減少し、これらの患者の 54% が3年後も安定したままであった（Plotkin 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

40

【0191】

直近では、Plotkinらが、進行性VSを有するNF2患者におけるベバシズマブ全身静脈内投与の多施設前向き第2相有効性試験の結果を発表した（Plotkin 2

50

019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。この試験では、患者(年齢中央値23歳)は、ベバシズマブを10mg/kgで2週間ごとに6ヶ月間全身投与され、その後、5mg/kgで3週間ごとに18ヶ月間全身投与された。これまでの知見と一致して、中間試験の結果は、治療の6ヶ月後に参加者の41%で聴力の改善が見られ、32%でX線写真での奏効が見られたことを示した。

【0192】

Sを有するNF2患者に対する全身投与したベバシズマブの予備的な有効性及び安全性は、米国及び欧州にわたって実施された8つの臨床試験の治療結果のメタ分析でも検討されている(Killien 2019; Karajannis 2019; Lu 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。これらの8つの研究全体で196の神経鞘腫を有する161名のNF2患者が、2週間ごとに5~10mg/kgの範囲のベバシズマブを投与され(研究全体の平均範囲は11~22ヶ月)、治療結果を評価された。これらの研究全体で、合わせたデータから、神経鞘腫のおよそ41%でX線写真での奏効(少なくとも20%の体積減少)、神経鞘腫のおよそ47%で腫瘍の安定性、神経鞘腫のおよそ7%で腫瘍の進行(少なくとも20%の体積増加)が確認された。聴力測定データが得られた患者では、これらのベバシズマブの投与は、およそ20%の個体で聴力改善、およそ69%の個体で聴力温存(難聴の安定化)、およそ6%の個体で難聴の悪化と関連していた。報告されたフォローアップ期間中、11%の患者でその後の外科的介入が必要となった。さらに、重篤な毒性(高血圧、タンパク尿、及び無月経を含む)などのベバシズマブの副作用も評価された。125名の患者を含む臨床試験参加者の5つの集団のメタ分析に基づいて、重篤な毒性(グレード3または4)のプールされた発生率は17%であった(Lu 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。特定の実施形態では、本開示は、治療用抗VEGFタンパク質の全身送達に関連する負の結果を潜在的に回避しながら、新生血管形成に関連する耳科疾患を効果的に治療するという長年のニーズを満たすのに適した方法及び組成物を提供する。

【0193】

上記の一連の臨床データ(腫瘍収縮において約30%~60%を超える奏効率を示す)は、VEGF阻害剤の全身的使用に共通の副作用を伴うにもかかわらず、VSの成長を抑制し、難聴の関連症状を改善するためのVEGF阻害剤の全身的使用を支持している(Plotkin 2009; Plotkin 2012; Lu 2019; Plotkin 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。治療を行わない場合、VSの平均成長率は0.4~2.9mm/年で変動し(Yoshimoto 2005、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、最大212名の患者の試験では、腫瘍の自然縮小は腫瘍の0~11%であったと報告されており(Tschudi 2000; Slattery 2004; Peyre 2013; Schnurman 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、または患者1261名の大規模な研究では、腫瘍の自然縮小は腫瘍の3.8%であったと報告されている(Huang 2013、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。全身性の抗VEGFタンパク質治療の限界は、これまで、全身への悪影響が避けられないことであった特定の実施形態では、本開示は、抗VEGFタンパク質を投与する方法を提供する。特定の実施形態では、アデノ随伴ウイルス(AAV)送達機構を利用する方法及び組成物が提供される。特定の実施形態では、そのようなAAVは、組換え構築物を含み、組換えAAV(rAAV)と称される。このような構築物の実施形態は、以下でさらに詳細に説明される。特定の実施形態では、局所的な抗VEGFタンパク質、例えば、rAAV-抗VEGFを、蝸牛内に、例えば、腫瘍、例えば、VSの位置に近接して送達するための組成物が提供される。いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤、例えばrAAV-抗VEGFの蝸牛内への投与は、VEGF阻害剤の全身送達に伴う副作用を軽減する。

【0194】

VSの治療のために蝸牛内投与経路を介して送達される遺伝子治療粒子の生物学的に活性な用量範囲を評価するには不十分であるにもかかわらず、いくつかのマウスモデルを利

用して、VEGF阻害剤が腫瘍の血管透過性を低下させるという生物学的妥当性を裏付けるデータが生成されている。頭蓋窓モデルを用いて、Yuanらは様々なヒト腫瘍細胞株を移植し、VEGF／VPF（血管透過性因子）に対する中和抗体またはリン酸緩衝生理食塩水対照を静脈内ボラス投与した（Yuan 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。著者らは、抗体治療群のアルブミンへの腫瘍血管透過性に対応する対照群よりも低く、連続治療後に腫瘍血管の直径が小さくなり、最終的に消失したことを示した。これらのデータは、内因性VEGF／VPFの中和によって腫瘍の血管透過性が低下可能であることを実証している（Yuan 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。より最近では、坐骨神経モデルと頭蓋内窓モデルの両方を使用して、Gaoらは、両側VSに対する抗VEGFタンパク質治療の背後にある機序を特徴付けた（Gao 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。このグループは、ヒトHEI193神経鞘腫細胞を、マウス坐骨神経鞘または頭蓋窓移植マウスの右半球の軟膜とクモ膜との間のいずれかに注入した。腫瘍サイズが4mm径に達した後、VEGF阻害剤ベバシズマブを5mg／kg／週、腹腔内（IP）投与した。得られたデータは、ベバシズマブがマウスの腫瘍浮腫を緩和し、神経機能を改善し、腫瘍血管系を一過性に正常化したことを示した。

10

【0195】

これらの研究から、マウスにおける神経鞘腫の進行を遅らせるためのVEGF阻害剤の使用について科学的根拠を裏付ける概念実証データが得られ、これは、アバスチン（登録商標）で全身治療したNF2患者における予備臨床データ（Plotkin 2009；Plotkin 2012；Lu 2019；Plotkin 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）と一致する。これらの先行研究の1つの限界は、限られた標的部位における永続的な曝露レベルを反映していないことである。

20

【0196】

特定の実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物（例えば、rAAV-抗VEGFを含む）は、限られた標的部位、例えば、内耳において、持続的なVEGF阻害剤のレベルをもたらす。理論に拘束されることを望むものではないが、本明細書に開示される組成物、例えばVEGF阻害剤は、周囲の液槽からの直接取り込みを通じてVS腫瘍細胞に入り得ると考えられており、その液槽は、神経間質を通じて内耳の外リンパ区画と連通しており、そこから抗VEGFタンパク質の内耳供給が拡散され得る。腫瘍を有するマウスにおいて、抗VEGFタンパク質を血流を通じてではなく腫瘍組織に局所的に適用すると、血管透過性の低下などの有益な効果がもたらされた（Lichtenfeld 1999、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

30

【0197】

特定の実施形態では、本開示は、VEGF阻害剤、例えばrAAV-抗VEGFを腫瘍部位に局所的に送達するのに適した方法及び組成物を提供する。いくつかの実施形態では、これらの方法及び組成物は、抗VEGFタンパク質による腫瘍の成長の制御の利点を維持しながら、VEGF阻害剤の全身投与について記録されている重篤な毒性のリスクを最小化する可能性を有する。特定の実施形態では、本開示は、内耳細胞の形質導入に適した方法及び組成物を提供する。いくつかの実施形態では、内耳細胞の形質導入は、腫瘍の部位及び／またはその近傍において、最小限の全身曝露で抗VEGFタンパク質の長期的な発現を可能にし得る。

40

【0198】

VEGFポリヌクレオチド配列

とりわけ、本開示は、ポリヌクレオチド、例えば、VEGF遺伝子またはその特徴的部分を含むポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドを含む組成物、ならびにそのようなポリヌクレオチド及び／または組成物を利用する方法を提供する。

【0199】

いくつかの実施形態では、VEGF遺伝子またはその特徴的部分を含むポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであり得る。いくつかの実施形態では、DNAは、ゲノムDNA

50

A または cDNA であり得る。いくつかの実施形態では、RNA は、mRNA であり得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、VEGF 遺伝子のエクソン及び／またはイントロンを含む。

【0200】

いくつかの実施形態では、遺伝子産物は、VEGF 遺伝子またはその特徴的部分を含むポリヌクレオチドから発現される。いくつかの実施形態では、このようなポリヌクレオチドの発現は、1 つ以上の制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、スプライス部位、ポリアデニル化部位、翻訳開始部位など）を利用することができる。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、1 つ以上の制御エレメントを含むことができる。

【0201】

いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、哺乳動物 VEGF 遺伝子である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、マウス VEGF 遺伝子である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、霊長類 VEGF 遺伝子である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、ヒト VEGF 遺伝子である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、ゲノム DNA 配列である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、タンパク質産物をコードする RNA 配列である。いくつかの実施形態では、VEGF 遺伝子は、タンパク質産物をコードする相補的 RNA 配列をコードする相補的 DNA 配列である。

【0202】

いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、ヒト染色体位置 6 p 21.1 ; 現在の 2020 アセンブリの位置 NC_000006.12 (43770209..43786487) に見出され、NCBI 参照配列番号: NG_008732.1 で VEGF-A としても知られている。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、VEGF-A 遺伝子内に包含される cDNA 配列（例えば、VEGF-A 転写バリエーション 1、転写バリエーション 2、転写バリエーション 3 など）である。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、VEGF-A の少なくとも 9 つの既知の転写アイソフォームのうちの 1 つであり、当業者であれば、これらの転写アイソフォームは選択的スプライシングを受けて選択的翻訳アイソフォームを生成し得ることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム A をコードする転写バリエーション 1 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001025366.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム B をコードする転写バリエーション 2 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_003376.6)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム C をコードする転写バリエーション 3 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001025367.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム D をコードする転写バリエーション 4 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001025368.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム E をコードする転写バリエーション 5 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001025369.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム F をコードする転写バリエーション 6 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001025370.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム G をコードする転写バリエーション 7 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001033756.3)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム H をコードする転写バリエーション 8 によって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001171622.2)。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF-A 遺伝子は、VEGF アイソフォーム R をコードする転写バリエーションによって表される cDNA 配列である (NCBI 参照配列: NM_001204385.2)。

10

20

30

40

50

【0203】

いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、ヒト染色体位置 11q13.1、位置 NC__000011.10 (64234584...64239264) に見出され、VEGF-B (NCBI 参照配列: NG__029823.1) として知られている。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、VEGF-B 遺伝子内に包含される cDNA 配列、例えば、VEGF-B 転写バリエーション 167 (NCBI 参照配列: NM__001243733.2)、及び／または転写バリエーション 186 (NCBI 参照配列: NM__003377.5) である。

【0204】

いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、ヒト染色体位置 4q34.1-q34.3、位置 NC__000004.12 (176683538...176792922、相補体) に見出され、VEGF-C (NCBI 参照配列: NG__034216.1) として知られている。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、VEGF-C 遺伝子内に包含される cDNA 配列、例えば、VEGF-C 転写バリエーション 1 (NCBI 参照配列: NM__005429.5) である。

【0205】

いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、ヒト染色体位置 Xp22.2、位置 NC__000023.11 (15345596...15384413、相補体) に見出され、VEGF-D (NCBI 参照配列: NG__012509.1) として知られている。いくつかの実施形態では、例示的なヒト VEGF 遺伝子は、VEGF-D 遺伝子内に包含されるゲノム配列または cDNA 配列、例えば、VEGF-D 転写バリエーション 1 (NCBI 参照配列: NM__004469.5) である。

【0206】

VEGF タンパク質配列

特定の実施形態では、目的のタンパク質は、VEGF-A 遺伝子のアイソフォームである。この遺伝子は、PDGF (血小板由来増殖因子) / VEGF (血管内皮増殖因子) ファミリー (PDGF / VEGF) のメンバーである。これは、ヘパリン結合タンパク質をコードしており、通常ジスルフィド結合したホモ二量体として存在する。この増殖因子は、血管内皮細胞の増殖及び移動を誘導し、生理的及び病理学的な血管新生の両方に必須である。異なるアイソフォームをコードする選択的にスプライシングされた転写バリエーションが記載されている。上流の非 AUG (CUG) コドンからの選択的翻訳の開始が、さらなるアイソフォームをもたらすという実質的な証拠が存在する。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、内因性 VEGF-A の機能の阻害剤である。

【0207】

例示的なヒト VEGF-A アイソフォーム L-VEGF₂₀₆ 前駆体 (アイソフォーム A としても知られる) アミノ酸配列 (配列番号 1)

MTDRQTD TAPSPSYHL LPGRRTVDAAASRGQGPEPAPGG
GVEGVGAR GVALKLFVQL LGCSRFGGAVVRAGEAEP SGAA
RSASSSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
GEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGRRVARRGAEESGPP
HSPSRRG SASRAGPGRASE TMNFLLSWVHWSLALLLYLHH
AKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD
IFQEYPDEIEYIFKPS CVPLMRCGGCCNDEGLECVPTES
NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQE
KKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCC LMPWSLP
GPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLEL
NERTCRCDKPRR

【0208】

例示的なヒト VEGF-A アイソフォーム L-VEGF₁₈₉ 前駆体 (アイソフォーム B としても知られる) アミノ酸配列 (配列番号 2)

MTDRQTD TAPSPSYHL L PGRRRRTVDAAASRGQGPEPAPGG
GVEGVGARGVALKLFVQLLGCSRFGGAVVRAGEAEP SGAA
RSASSGREEPQPEEGEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
GEAAVCADSAPAARAPQALARASGRGGGRVARRGAEESGPP
HSPSRRRGSASRAGPGRASETMNFLLSWVHWSLALLLYLHH
AKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVD
IFQEYPDEIEYIFKPS CVPLMRCGGGCCNDEGLECVPTES
NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQE
KKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQ
DPQTCKCSCCKNTDSRCKARQLELNERTCRC DKPRR

10

【0209】

例示的なヒトVEGF-AアイソフォームVEGF₁₁₁前駆体アミノ酸配列（配列番号3）

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV
VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPL
MRCGGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRCDKPRR

【0210】

例示的なヒトVEGF-AアイソフォームVEGF₁₂₁前駆体アミノ酸配列（配列番号4）

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV
VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPL
MRCGGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKCDKPRR

20

【0211】

例示的なヒトVEGF-AアイソフォームVEGF₁₄₅前駆体アミノ酸配列（配列番号5）

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV
VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPL
MRCGGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRY
KSWSVCDKPRR

30

【0212】

例示的なヒトVEGF-AアイソフォームVEGF_{165A}前駆体アミノ酸配列（配列番号6）

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV
VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPL
MRCGGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQT
CKCSCCKNTDSRCKARQLELNERTCRC DKPRR

40

【0213】

例示的なヒトVEGF-AアイソフォームVEGF₁₈₉前駆体アミノ酸配列（配列番号7）

MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEV
VKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPL
MRCGGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGQHIGEM
SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRY
KSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCCKNTDSRCKARQ
LELNERTCRC DKPRR

【0214】

50

例示的なヒト VEGF-A アイソフォーム VEGF₂₀₆ 前駆体アミノ酸配列（配列番号 8）

MN F L L S W V H W S L A L L L Y L H H A K W S Q A A P M A E G G G Q N H H E V
V K F M D V Y Q R S Y C H P I E T L V D I F Q E Y P D E I E Y I F K P S C V P L
M R C G G C C N D E G L E C V P T E E S N I T M Q I M R I K P H Q G Q H I G E M
S F L Q H N K C E C R P K K D R A R Q E K K S V R G K G K G Q K R K R K K S R Y
K S W S V Y V G A R C C L M P W S L P G P H P C G P C S E R R K H L F V Q D P Q
T C K C S C K N T D S R C K A R Q L E L N E R T C R C D K P R R

【0215】

特定の実施形態では、目的のタンパク質は、VEGF-B 遺伝子のアイソフォームである。この遺伝子は、PDGF/VEGF のメンバーをコードする。VEGF ファミリーメンバーは、血管の形成を調節し、内皮細胞の生理機能に関与する。このメンバーは、VEGFR-1（血管内皮増殖因子受容体 1）及び NRP-1（ニューロピリン-1）に対するリガンドである。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、内因性 VEGF-B の機能の阻害剤である。

【0216】

例示的なヒト VEGF-B アイソフォーム VEGF_{B-167} 前駆体アミノ酸配列（配列番号 9）

M S P L L R R L L L A A L L Q L A P A Q A P V S Q P D A P G H Q R K V V S W I D
V Y T R A T C Q P R E V V V P L T V E L M G T V A K Q L V P S C V T V Q R C G G
C C P D D G L E C V P T G Q H Q V R M Q I L M I R Y P S S Q L G E M S L E E H S
Q C E C R P K K K D S A V K P D S P R P L C P R C T Q H H Q R P D P R T C R C R
C R R R S F L R C Q G R G L E L N P D T C R C R K L R R

【0217】

例示的なヒト VEGF-B アイソフォーム VEGF_{B-186} 前駆体アミノ酸配列（配列番号 10）

M S P L L R R L L L A A L L Q L A P A Q A P V S Q P D A P G H Q R K V V S W I D
V Y T R A T C Q P R E V V V P L T V E L M G T V A K Q L V P S C V T V Q R C G G
C C P D D G L E C V P T G Q H Q V R M Q I L M I R Y P S S Q L G E M S L E E H S
Q C E C R P K K K D S A V K P D R A A T P H H R P Q P R S V P G W D S A P G A P
S P A D I T H P T P A P G P S A H A A P S T T S A L T P G P A A A A D A A A S
S V A K G G A

【0218】

特定の実施形態では、目的のタンパク質は、VEGF-C 遺伝子のアイソフォームである。この遺伝子によってコードされるタンパク質は、PDGF/VEGF ファミリーのメンバーである。コードされたタンパク質は、血管新生及び内皮細胞の増殖を促進し、さらに血管の透過性にも影響を与えることができる。前駆体タンパク質は、さらに、VEGFR-2 及び VEGFR-3 受容体に結合して活性化することができる完全にプロセシングされた形態に切断される。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、内因性 VEGF-C の機能の阻害剤である。

【0219】

例示的なヒト VEGF-C 前駆体アミノ酸配列（配列番号 11）

M H L L G F F S V A C S L L A A A L L P G P R E A P A A A A A F E S G L D L S D
A E P D A G E A T A Y A S K D L E E Q L R S V S S V D E L M T V L Y P E Y W K M
Y K C Q L R K G G W Q H N R E Q A N L N S R T E E T I K F A A A H Y N T E I L K
S I D N E W R K T Q C M P R E V C I D V G K E F G V A T N T F F K P P C V S V Y
R C G G C C N S E G L Q C M N T S T S Y L S K T L F E I T V P L S Q G P K P V T
I S F A N H T S C R C M S K L D V Y R Q V H S I I R R S L P A T L P Q C Q A A N
K T C P T N Y M W N N H I C R C L A Q E D F M F S S D A G D D S T D G F H D I C
G P N K E L D E E T C Q C V C R A G L R P A S C G P H K E L D R N S C Q C V C K

10

20

30

40

50

N K L F P S Q C G A N R E F D E N T C Q C V C K R T C P R N Q P L N P G K C A C
E C T E S P Q K C L L K G K K F H H Q T C S C Y R R P C T N R Q K A C E P G F S
Y S E E V C R C V P S Y W K R P Q M S

【0220】

特定の実施形態では、目的のタンパク質は、VEGF-D遺伝子のアイソフォームである。この遺伝子によってコードされたタンパク質は、PDGF／VEGFファミリーのメンバーであり、血管新生、リンパ管新生、及び内皮細胞の増殖において活性である。この分泌型タンパク質は、VEGFR-2及びVEGFR-3受容体に結合し、それを活性化する複数のプロセッシング形態を生成する複雑なタンパク質分解成熟を受ける。このタンパク質は、構造的及び機能的にVEGF-Cに類似している。いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、内因性VEGF-Dの機能の阻害剤である。

10

【0221】

例示的なヒトVEGF-D前駆体アミノ酸配列（配列番号12）

M Y R E W V V V N V F M M L Y V Q L V Q G S S N E H G P V K R S S Q S T L E R S
E Q Q I R A A S S L E E L L R I T H S E D W K L W R C R L R L K S F T S M D S R
S A S H R S T R F A A T F Y D I E T L K V I D E E W Q R T Q C S P R E T C V E V
A S E L G K S T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E S L I C M N T S T S Y
I S K Q L F E I S V P L T S V P E L V P V K V A N H T G C K C L P T A P R H P Y
S I I R R S I Q I P E E D R C S H S K K L C P I D M L W D S N K C K C V L Q E E
N P L A G T E D H S H L Q E P A L C G P H M M F D E D R C E C V C K T P C P K D
L I Q H P K N C S C F E C K E S L E T C C Q K H K L F H P D T C S C E D R C P F
H T R P C A S G K T A C A K H C R F P K E K R A A Q G P H S R K N P

20

【0222】

VEGF、VEGF-R、及びVEGF結合タンパク質

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、VEGFに結合できるタンパク質である。いくつかの実施形態では、VEGF結合タンパク質は、抗体及び／またはその断片であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、VEGF結合タンパク質は、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）タンパク質及び／またはその断片であるか、またはそれを含み得る。

【0223】

上記のように、VEGF阻害剤が腫瘍の血管透過性を低下させるという生物学的妥当性を裏付け得るデータが生成されている。いくつかの実施形態では、そのようなデータは、VEGF阻害剤が腫瘍の血管透過性を低下させるという生物学的妥当性を裏付けるデータを生成するために利用されてきたマウスモデルを使用して生成された。いくつかの実施形態では、このようなマウスモデルは、例えば、VSの治療のために、蝸牛内投与経路を介して送達される遺伝子治療粒子の生物学的に活性な用量範囲を評価するのに理想的ではない。頭蓋窓モデルを用いて、Yuanらは様々なヒト腫瘍細胞株を移植し、VEGF／VPF（血管透過性因子）に対する中和抗体またはリン酸緩衝生理食塩水対照を静脈内ボラス投与した（Yuan 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。著者らは、抗体治療群のアルブミンへの腫瘍血管透過性に対応する対照群よりも低く、連続治療後に腫瘍血管の直径が小さくなり、最終的に消失したことを示した。これらのデータは、内因性VEGF／VPFの中和によって腫瘍の血管透過性が低下可能であることを実証している（Yuan 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。より最近では、坐骨神経モデルと頭蓋内窓モデルの両方を使用して、Gaoらは、両側VSに対する抗VEGFタンパク質治療の背後にある機序を特徴付けようとした（Gao 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。このグループは、ヒトHEI193神経鞘腫細胞を、マウス坐骨神経鞘または頭蓋窓移植マウスの右半球の軟膜とクモ膜との間のいずれかに注入した。腫瘍サイズが4mm径に達した後、VEGF阻害剤ベバシズマブを5mg/kg/週、腹腔内（IP）投与した。得られたデータは、ベバシズマブがマウスの腫瘍浮腫を緩和し、神経機能を改善し、腫瘍血管系を一過性に正常化する

30

40

50

ことを示す。

【0224】

まとめると、これらの研究から、マウスにおける神経鞘腫の進行を遅らせるためのVEGF阻害剤の使用について科学的根拠を裏付ける概念実証データが得られ、これは、アバスチン（登録商標）で全身治療したNF2患者における予備臨床データ（Plotkin 2009；Plotkin 2012；Lu 2019；Plotkin 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）と一致する。これらの先行研究の1つの限界は、限られた標的部位における永続的な曝露レベルを反映していないことである。

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物は、限られた標的部位、例えば個体、例えば哺乳動物、例えばヒトの内耳において、持続的なVEGF阻害剤、例えばrAAV-抗VEGFのレベルをもたらす。理論に拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤は、周囲の液槽からの直接取り込みを通じてVS腫瘍細胞に入り得ると考えられており、その液槽は、神経間質を通じて内耳の外リンパ区画と連通しており、そこから抗VEGFタンパク質の内耳供給が拡散され得る。腫瘍を有するマウスにおいて、抗VEGFタンパク質を血流を通じてではなく腫瘍組織に局所的に適用すると、血管透過性の低下などの有益な効果がもたらされた（Lichtenbeild 1999、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0226】

抗VEGF抗体

本明細書に記載される任意の抗体のいくつかの実施形態では、該抗体は、VEGF抗原（例えば、本明細書に記載される任意の例示的なVEGFタンパク質、例えば、成熟ヒトVEGF-A、成熟ヒトVEGF-B、成熟ヒトVEGF-C、及び成熟ヒトVEGF-Dのうちの1つ以上）に結合することができる（例えば、本明細書に記載の任意の結合親和性）。

【0227】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、抗体は、VEGF（例えば、本明細書に記載される任意の例示的なVEGFタンパク質のうちの1つ以上、例えば、成熟ヒトVEGF-A、成熟ヒトVEGF-B、成熟ヒトVEGF-C、及び成熟ヒトVEGF-Dのうちの1つ以上）の活性を低下させることができる。いくつかの実施形態では、抗体は、VEGF（例えば、本明細書に記載される任意の例示的なVEGFタンパク質のうちの1つ以上、例えば、成熟ヒトVEGF-A、成熟ヒトVEGF-B、成熟ヒトVEGF-C、及び成熟ヒトVEGF-Dのうちの1つ以上）がその受容体の1つ以上（例えば、1つ以上のVEGF受容体）に結合するのを阻害することができる。例えば、WO1998/045331、US9,079,953、US2015/0147317、US2016/0289314、Plotkin et al., *Otology & Neurotology* 33:1046-1052 (2012)；及びFerrara et al. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 333(2):328-335（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。いくつかの実施形態では、抗体は、下流シグナル伝達（例えば、VEGF受容体、例えば、本明細書に記載の任意の例示的なVEGF受容体の1つ以上、例えば、ヒトVEGFR-1、ヒトVEGFR-2、及びヒトVEGFR-3のうちの1つ以上の下流のシグナル伝達）を低下させることができる。いくつかの実施形態では、VEGF活性の低下は、間接的に、以下を通じて検出され得る。例えば、VS腫瘍サイズ、及び／または本明細書に記載のVS関連症状の変化、例えば、聴力の増加（例えば、聴力の1%～約400%の増加（または本明細書に記載のこの範囲の任意の部分範囲））またはVS腫瘍サイズの減少（例えば、1%～99%、1%～95%、1%～90%、1%～85%、1%～80%、1%～75%、1%～70%、1%～65%、1%～60%、1%～55%、1%～50%、1%～45%、1%～40%、1%～35%、1%～30%、1%～25%、1

10

20

30

40

50

%～20%、1%～15%、1%～10%、1%～5%、5%～99%、5%～95%、5%～90%、5%～85%、5%～80%、5%～75%、5%～70%、5%～65%、5%～60%、5%～55%、5%～50%、5%～45%、5%～40%、5%～35%、5%～30%、5%～25%、5%～20%、5%～15%、5%～10%、10%～99%、10%～95%、10%～90%、10%～85%、10%～80%、10%～75%、10%～70%、10%～65%、10%～60%、10%～55%、10%～50%、10%～45%、10%～40%、10%～35%、10%～30%、10%～25%、10%～20%、10%～15%、15%～99%、15%～95%、15%～90%、15%～85%、15%～80%、15%～75%、15%～70%、15%～65%、15%～60%、15%～55%、15%～50%、15%～45%、15%～40%、15%～35%、15%～30%、15%～25%、15%～20%、15%～15%、15%～10%、15%～5%、20%～99%、20%～95%、20%～90%、20%～85%、20%～80%、20%～75%、20%～70%、20%～65%、20%～60%、20%～55%、20%～50%、20%～45%、20%～40%、20%～35%、20%～30%、20%～25%、20%～20%、20%～15%、25%～99%、25%～95%、25%～90%、25%～85%、25%～80%、25%～75%、25%～70%、25%～65%、25%～60%、25%～55%、25%～50%、25%～45%、25%～40%、25%～35%、25%～30%、25%～25%、25%～20%、25%～15%、25%～10%、25%～5%、30%～99%、30%～95%、30%～90%、30%～85%、30%～80%、30%～75%、30%～70%、30%～65%、30%～60%、30%～55%、30%～50%、30%～45%、30%～40%、30%～35%、30%～30%、30%～25%、30%～20%、30%～15%、30%～10%、30%～5%、35%～99%、35%～95%、35%～90%、35%～85%、35%～80%、35%～75%、35%～70%、35%～65%、35%～60%、35%～55%、35%～50%、35%～45%、35%～40%、35%～35%、35%～30%、35%～25%、35%～20%、35%～15%、35%～10%、35%～5%、40%～99%、40%～95%、40%～90%、40%～85%、40%～80%、40%～75%、40%～70%、40%～65%、40%～60%、40%～55%、40%～50%、40%～45%、40%～40%、40%～35%、40%～30%、40%～25%、40%～20%、40%～15%、40%～10%、40%～5%、45%～99%、45%～95%、45%～90%、45%～85%、45%～80%、45%～75%、45%～70%、45%～65%、45%～60%、45%～55%、45%～50%、45%～45%、45%～40%、45%～35%、45%～30%、45%～25%、45%～20%、45%～15%、45%～10%、45%～5%、50%～99%、50%～95%、50%～90%、50%～85%、50%～80%、50%～75%、50%～70%、50%～65%、50%～60%、50%～55%、50%～50%、50%～45%、50%～40%、50%～35%、50%～30%、50%～25%、50%～20%、50%～15%、50%～10%、50%～5%、55%～99%、55%～95%、55%～90%、55%～85%、55%～80%、55%～75%、55%～70%、55%～65%、55%～60%、55%～55%、55%～50%、55%～45%、55%～40%、55%～35%、55%～30%、55%～25%、55%～20%、55%～15%、55%～10%、55%～5%、60%～99%、60%～95%、60%～90%、60%～85%、60%～80%、60%～75%、60%～70%、60%～65%、60%～60%、60%～55%、60%～50%、60%～45%、60%～40%、60%～35%、60%～30%、60%～25%、60%～20%、60%～15%、60%～10%、60%～5%、65%～99%、65%～95%、65%～90%、65%～85%、65%～80%、65%～75%、65%～70%、65%～65%、65%～60%、65%～55%、65%～50%、65%～45%、65%～40%、65%～35%、65%～30%、65%～25%、65%～20%、65%～15%、65%～10%、65%～5%、70%～99%、70%～95%、70%～90%、70%～85%、70%～80%、70%～75%、70%～70%、70%～65%、70%～60%、70%～55%、70%～50%、70%～45%、70%～40%、70%～35%、70%～30%、70%～25%、70%～20%、70%～15%、70%～10%、70%～5%、75%～99%、75%～95%、75%～90%、75%～85%、75%～80%、75%～75%、75%～70%、75%～65%、75%～60%、75%～55%、75%～50%、75%～45%、75%～40%、75%～35%、75%～30%、75%～25%、75%～20%、75%～15%、75%～10%、75%～5%、80%～99%、80%～95%、80%～90%、80%～85%、80%～80%、80%～75%、80%～70%、80%～65%、80%～60%、80%～55%、80%～50%、80%～45%、80%～40%、80%～35%、80%～30%、80%～25%、80%～20%、80%～15%、80%～10%、80%～5%、85%～99%、85%～95%、85%～90%、90%～99%、90%～95%、または95%～99%の減少)、及び／またはV S、もしくは神経線維腫症I I型の1つ以上の症状(例えば、聴力低下、耳鳴り、回転性めまい、生活の質の低下など)の重症度と比較した、哺乳動物におけるV S、または神経線維腫症I I型の1つ以上の症状の重症度、及び／または本明細書に記載の任意のr A A V粒子を投与する前の、哺乳動物におけるV S、または神経線維腫症I I型のそれぞれのサイズ。いくつかの実施形態では、V E G F活性の低下は*i n v i t r o*アッセイで検出され得る。

10

20

30

40

50

【0228】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、または多価抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、s c F v-F c、V H Hドメイン、V N A Rドメイン、(s c F v)₂、ミニボディ、またはB i T Eであり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、D V D-I g、及び二重親和性再標的化抗体(D A R T)、t r i o m a b、共通のL Cを有するk i h I g G、クロスマブ、オルト-F a b I g G、2-イン

ー1ーIgG、IgG-ScFv、scFv2-Fc、バイーナノボディ、タンデム抗体、DART-Fc、scFv-HAS-scFv、DNL-Fab3、DAF(2-インー1または4-インー1)、DutaMab、DT-IgG、ノブインホール共通LC、ノブインホールアセンブリー、チャージペア抗体、Fab-アーム交換抗体、SEEDボディ、Triomab、LUZ-Y、Fcab、kλ-ボディ、直交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)-IgG、IgG(L,H)-Fc、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody、DVI-IgG、ナノボディ、ナノボディ-HSA、ダイアボディ、TandAb、scダイアボディ、scダイアボディ-CH3、ダイアボディ-CH3、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HCAb、scダイアボディ-Fc、ダイアボディ-Fc、タンデムscFv-Fc、イントラボディ、ドックアンドロック二重特異性抗体、ImmTAC、HSAボディ、scダイアボディ-HAS、タンデムscFv、IgG-IgG、Cov-X-ボディ、及びscFv1-PEG-scFv2であり得る。

10

【0229】

抗体のさらなる例としては、Fv断片、Fab断片、F(ab')₂断片、及びFab'断片が挙げられる。抗体のさらなる例としては、IgGの抗原結合断片(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4の抗原結合断片)(例えば、ヒトもしくはヒト化IgG(例えば、ヒトもしくはヒト化IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4)の抗原結合断片)、IgAの抗原結合断片(例えば、IgA1もしくはIgA2の抗原結合断片)(例えば、ヒトもしくはヒト化IgA(例えば、ヒトもしくはヒト化IgA1もしくはIgA2)の抗原結合断片)、IgDの抗原結合断片(例えば、ヒトもしくはヒト化IgDの抗原結合断片)、IgEの抗原結合断片(例えば、ヒトもしくはヒト化IgEの抗原結合断片)、またはIgMの抗原結合断片(例えば、ヒトもしくはヒト化IgMの抗原結合断片)が挙げられる。

20

【0230】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される任意の抗体は、VEGFに特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される任意の抗体は、PDGF/VEGFに特異的に結合し得る。

30

【0231】

VHHDドメインは、ラクダ科に見出だすことができる単一の単量体可変抗体ドメインである。VNARDドメインは、軟骨魚類に見出だすことができる単一の単量体可変抗体ドメインである。VHHDドメイン及びVNARDドメインの非限定的な態様は、例えば、Cromie et al., Curr. Top. Med. Chem. 15:2543-2557, 2016; De Genst et al., Dev. Comp. Immunol. 30:187-198, 2006; De Meyer et al., Trends Biotechnol. 32:263-270, 2014; Kijanka et al., Nanomedicine 10:161-174, 2015; Kovaleva et al., Expert. Opin. Biol. Ther. 14:1527-1539, 2014; Krah et al., Immunopharmacol. Immunotoxicol. 38:21-28, 2016; Mujic-Delic et al., Trends Pharmacol. Sci. 35:247-255, 2014; Muylldermans, J. Biotechnol. 74:277-302, 2001; Muylldermans et al., Trends Biochem. Sci. 26:230-235, 2001; Muylldermans, Ann. Rev. Biochem. 82:775-797, 2013; Rahbarizadeh et al., Immunol. Invest. 40:299-338, 2011; Van Audenhov

40

50

e et al., *EBioMedicine* 8:40–48, 2016; Van Bockstaele et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212–1224, 2009; Vincke et al., *Methods Mol. Biol.* 911:15–26, 2012; 及び Wesolowski et al., *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157–174, 2009 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0232】

いくつかの実施形態では、「Fv」断片は、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合二量体を含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、「Fab」断片は、Fv断片の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、「F(ab')₂」断片は、ジスルフィド結合によってヒンジ領域付近で連結した2つのFab断片を含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、「二重可変ドメイン免疫グロブリン」または「DVD-Ig」は、例えば、DiGiammarino et al., *Methods Mol. Biol.* 899:145–156, 2012; Jakob et al., *MABs* 5:358–363, 2013; ならびに米国特許第7,612,181号; 同第8,258,268号; 同第8,586,714号; 同第8,716,450号; 同第8,722,855号; 同第8,735,546号; 及び同第8,822,645号 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されている多価性及び多重特異性結合タンパク質を指す。

【0236】

いくつかの実施形態では、薬物親和性応答性標的安定性(DARTS)アッセイについて記載され、例えば、Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799–801, 2014 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に示されるように実行される。

【0237】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の抗体の解離定数(KD)は、例えば、VEGFタンパク質(例えば、本明細書に記載の任意のVEGFタンパク質、例えば、成熟ヒトVEGF-A、成熟ヒトVEGF-B、成熟ヒトVEGF-C、及び成熟ヒトVEGF-Dのうちの1つ以上)に対して表面プラズモン共鳴(SPR)を用いてリン酸緩衝生理食塩水中で測定して、 1×10^{-5} M未満(例えば、 0.5×10^{-5} M未満、 1×10^{-6} M未満、 0.5×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 0.5×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 0.5×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 0.5×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 0.5×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 0.5×10^{-11} M未満、または 1×10^{-12} M未満)である。

【0238】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の抗体のKDは、VEGFタンパク質(例えば、本明細書に記載の任意のVEGFタンパク質、例えば、成熟ヒトVEGF-A、成熟ヒトVEGF-B、成熟ヒトVEGF-C、及び成熟ヒトVEGF-Dのうちの1つ以上)に対して表面プラズモン共鳴(SPR)を用いてリン酸緩衝生理食塩水中で測定して、約 1×10^{-12} M～約 1×10^{-5} M、約 0.5×10^{-5} M、約 1×10^{-6} M、約 0.5×10^{-6} M、約 1×10^{-7} M、約 0.5×10^{-7} M、約 1×10^{-8} M、約 0.5×10^{-8} M、約 1×10^{-9} M、約 0.5×10^{-9} M、約 1×10^{-10} M、約 0.5×10^{-10} M、約 1×10^{-11} M、または約 0.5×10^{-11} M (

10

20

30

40

50

両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、または約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (両端値を含む) ; 約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、または約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (両端値を含む) ; または約 $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ~ 約 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (両端値を含む) である。

10

20

30

【0239】

本明細書に記載の任意の抗体のKD値を決定するために、当該技術分野で知られている様々な異なる方法が使用され得る (例えば、電気泳動移動度シフトアッセイ、フィルター結合アッセイ、表面プラズモン共鳴、及び二分子結合動態アッセイなど)。

【0240】

本明細書に記載の任意の抗体のいくつかの実施形態では、対象 (例えば、ヒト) における抗体の半減期は、類似対象における対照抗体 (例えば、本明細書に記載の任意の対照抗体または条件) の半減期と比較して、約 0.5 倍 ~ 約 4 倍 (例えば、約 0.5 倍 ~ 約 3.5 倍、約 0.5 倍 ~ 約 3 倍、約 0.5 倍 ~ 約 2.5 倍、約 0.5 倍 ~ 約 2 倍、約 0.5 倍 ~ 約 1.5 倍、約 0.5 倍 ~ 約 1 倍、約 1 倍 ~ 約 4 倍、約 1 倍 ~ 約 3.5 倍、約 1 倍 ~ 約 3 倍、約 1 倍 ~ 約 2.5 倍、約 1 倍 ~ 約 2 倍、約 1.5 倍 ~ 約 4 倍、約 1.5 倍 ~ 約 3.5 倍、約 1.5 倍 ~ 約 3 倍、約 1.5 倍 ~ 約 2.5 倍、約 1.5 倍 ~ 約 2 倍、約 2 倍 ~ 約 4 倍、約 2 倍 ~ 約 3.5 倍、約 2 倍 ~ 約 3 倍、約 2 倍 ~ 約 2.5 倍、約 2.5 倍 ~ 約 4 倍、約 2.5 倍 ~ 約 3.5 倍、約 2.5 倍 ~ 約 3 倍、約 3 倍 ~ 約 4 倍、約 3 倍 ~ 約 3.5 倍、または約 3.5 倍 ~ 約 4 倍) 減少する。例えば、Leabman et al., MAb s. 5 (6) : 896-903, 2013 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、Fc領域内に哺乳動物の半減期を減少させる1つ以上のアミノ酸置換を有し、対照抗体は、Fc領域内のこのような1つ以上のアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを欠く (例えば、全てを欠く)。

40

50

【0241】

いくつかの実施形態では、VEGFに特異的に結合する抗体は、ベバシズマブ（Avastatin（登録商標））である。ベバシズマブ（フルサイズ抗体約150kDa）は、VEGF-Aの全てのアイソフォームを阻害する。ベバシズマブは、2004年に結腸癌向けに米国食品医薬品局（FDA）の承認を受けており、静脈内（IV）用量の場合4.0～7.5mg/kgを2～3週間（血漿中半減期21日）、硝子体内（IVT）用量の場合0.05mL中に1.25mg（半減期5.6日）である。ベバシズマブのVEGF165（VEGF-A）に対するKDは58pMである。例えば、WO2017/050825（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0242】

いくつかの実施形態では、VEGFに特異的に結合する抗体は、ラニビズマブ（Lucentis（登録商標））である。ラニビズマブ（約50kDa）は、VEGF-Aの全てのアイソフォームを阻害する。ラニビズマブは、2006年に眼科使用向けにFDAの承認を受けており、静脈内（IV）用量の場合4.0～7.5mg/kgを2～3週間（血漿中半減期0.5日）、硝子体内（IVT）用量の場合0.05mL中に0.5mg（半減期3.2日）である。ラニビズマブのVEGF-A₁₆₅（配列番号6によって表されるVEGF-Aアイソフォーム165）に対するKDは46pMである。例えば、WO2014/178078（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【0243】

いくつかの実施形態では、VEGFに特異的に結合する抗体は、セバシズマブ（APX003/SIM-BD0801）またはその特徴的部分である。

【0244】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）内に含まれる抗VEGFタンパク質コード配列は、網膜、ならびに膠芽腫及び他のがんでの病理学的な脈管化に対して承認されているVEGF阻害剤から選択され、例えば、ベバシズマブ（Avastin（登録商標））；アフリベルセプト（Eylea（登録商標））；ジブーアフリベルセプト（Zaltrap（登録商標））；プロルシズマブ（Beovu（登録商標））；及び／またはラニビズマブ（Lucentis（登録商標））が挙げられる。さらに、いくつかの実施形態では、非臨床及び臨床開発の様々な段階にあるこれらの製品の多くのバイオシミラー、及びラニビズマブのバイオシミラーであるRazuma b（登録商標）が利用され得る。

【0245】

ラニビズマブ、アフリベルセプト、及びプロルシズマブは、それぞれ滲出型加齢黄斑変性（AMD）に対する硝子体内反復投与が承認されており、ラニビズマブ及びアフリベルセプトは、さらに網膜静脈閉塞症（RVO）、糖尿病黄斑浮腫（DME）、及び糖尿病網膜症（DR）に対する硝子体内反復投与が承認されている。標的化局所送達とそれに伴う全身曝露の減少により、VEGF阻害剤の静脈内治療レジメンよりも、安全性プロファイルの改善（血栓塞栓事象の発生率の低下を含む）がもたらされ得ることが確認されている。ここれらの治療薬の遺伝子治療バージョンは、現在、AMD及びDMEに対して臨床開発中である（Clinicaltrials.gov 2020b、2020c、及び2020d [NCT03066258, NCT03748784, 及びNCT04418427]、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。アフリベルセプトは、ヒトIgG1のFc部分に融合したヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメインの部分からなる組換え融合タンパク質（97kDa）であり、滲出型AMD及びDMEの臨床試験において、硝子体内反復投与により眼に局所的に送達された場合に有効であることが示されている。ベバシズマブと同様に、ジブーアフリベルセプトも静脈内注入が承認されており、出血及び創傷治癒に関して同様のリスクと警告を伴う（Sanofi-Aventis US 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0246】

滲出型加齢黄斑変性（AMD）患者の研究では、硝子体内注入を介して投与されたベバシズマブ及びラニビズマブなどの抗VEGFタンパク質の臨床用量の局所的送達、4ヶ月目の視力の有意な改善と関連していた；しかしながら、同時点で、VEGF血漿レベルは、ベバシズマブを注入したコホートでのみ有意に低下した（Carneiro 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。特定の実施形態では、本開示に記載の方法及び組成物は、ベバシズマブの全身送達に関連する、及び／または急性局所送達に関連する可能性のある、血漿VEGFレベルの低下に対する解決策を提供する。特定の研究では、薬物動態学的研究での知見と一致する結果が実証されており、例えば、ウサギでは、硝子体内注入後に血清中にベバシズマブが検出されるが、ラニビズマブは検出されない（Bakri 2007、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。AMDにおけるピボタル試験の臨床安全性データの検討は、最長2年間のラニビズマブの硝子体内反復投与は、重大な安全性リスクとは関連しないことを示唆している（Schmidt-Erfurth 2010、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0247】

ラニビズマブ

ラニビズマブは、ヒト化モノクローナル抗体断片（Fab）であり、硝子体内投与により眼内に局所的に送達された場合、アフリベルセプトと同様の臨床効果及び同等の血栓塞栓事象の発生率を有する（Genentech 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。ラニビズマブは、VEGFに結合してこれを中和するIgG1 Fabである。ラニビズマブは、ヒトVEGF-Aタンパク質の全ての既知のアイソフォームに結合し、同族の受容体（VEGFR-1及びVEGFR-2）との相互作用を妨げることによって、生物学的活性を阻害すると考えられている。ラニビズマブは、Lucentis（登録商標）というブランド名で販売されている。網膜静脈閉塞症後の黄斑浮腫、加齢黄斑変性（滲出型）、及び糖尿病黄斑浮腫などの適応症でFDAに承認されている。ベバシズマブと比較して、ラニビズマブは8倍を超える高い結合能と66倍を超える高い結合親和性を示す（Klettner 2008；Yang 2014、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。これらの違いにより、ラニビズマブのVEGF誘導性内皮増殖に対するIC50は、ベバシズマブの6分の1となり、ラニビズマブはVEGF活性に対して0.37ナノモル（nM）（1ミリリットルあたり約17ナノグラム [ng/ml]）のラニビズマブ；Yang 2014、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）まで臨床的に関連する影響を及ぼす。重要なことに、ラニビズマブはまた、Fc領域を欠いているため、分子はFcのリサイクリングを回避でき、フルサイズ抗体（149kDa）よりも著しく小さくなる（48kDa）（Meyer 2011、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、このより小さい分子サイズは、標的部位への拡散、腫瘍間質への血管外漏出能力、及び／または腫瘍内の標的部位への拡散効率を改善するのに有利であり得る（Xenaki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、rAAV遺伝子治療産物に発展するためのラニビズマブのコード配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）は、蝸牛に送達され得、蝸牛内投与は、低い全身曝露をもたらし得、それにより静脈内投与と比較して改善された安全性プロファイルをもたらすことができる。

20

30

40

【0248】

特定の実施形態では、本開示は、Fc領域を欠く抗VEGFタンパク質であるラニビズマブを含む組成物を提供する。ベバシズマブに見られる抗体Fc領域は、Fc受容体媒介性の輸送を通じた生物学的障壁を越えたベバシズマブの分散、及びベバシズマブの免疫応答の活性化を可能にすると考えられる（Kim 2009；Meyer 2011、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。特定の研究では、ベバシズマブと比較して、ラニビズマブは、高度に希釈した場合に17倍高い結合能と6倍高い結合親和性を示し得ることが示唆されており（Ferrara 2006；Klettner 2008、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、このこ

50

とから低濃度での、より高い特異的活性が示唆される。いくつかの実施形態では、ラニビズマブのより小さい分子サイズ（48 kDa、ベバシズマブの149 kDaと比較）はまた、標的部位への拡散、腫瘍間質への血管外漏出能力、及び／または腫瘍内の標的部位への拡散効率を改善するのに有利であり得る（Xenaki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0249】

いくつかの実施形態では、VEGF及び／またはその抗原提示断片に特異的に結合する本明細書に記載の抗VEGFタンパク質は、抗体である。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ラニビズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である配列であるか、またはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、及び／またはラニビズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である配列であるか、またはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。

【0250】

いくつかの実施形態では、VEGF及び／またはその抗原提示断片に特異的に結合する本明細書に記載の抗VEGFタンパク質は、抗体である。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、特に、ラニビズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、及び／またはラニビズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ラニビズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み（配列番号20によって表される）、及び／または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ラニビズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む（配列番号16、17、または18によって表される）。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、ラニビズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインにおける3つのCDR、及び／またはラニビズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインにおける3つのCDRを含む。

【0251】

例示的なラニビズマブ重鎖ヌクレオチド配列（配列番号13）

```
G A G G T G C A G C T G G T G G A A T C T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C
C T G G C G G C T C T C T G A G A C T G A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A
C G A C T T C A C C C A C T A C G G C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C
C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T
A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G
A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C
C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T
A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C T A C T A C T A C G G C A C C A G C C A
C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A
G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C
T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C
T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G
A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C
A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C
T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C
```

A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A
A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G G T G G A A C C C A A G A G C T G C G A
C A A G A C C C A C A C C G G C A A G

【0252】

例示的なラニビズマブ重鎖ヌクレオチド配列（配列番号14）

G A G G T G C A G C T G G T G G A A T C T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C
C T G G C G G C T C T C T G A G A C T G A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A
C G A C T T C A C C C A C T A C G G C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C
C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T
A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G
A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C
C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T
A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C T A C T A C T A C G G C A C C A G C C A
C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A
G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C
T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C
T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G
A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C
A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C
T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C
A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A
A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G G T G G A A C C C A A G A G C T G C G A
C A A G A C C C A C A A G

10

20

【0253】

例示的なラニビズマブ重鎖ヌクレオチド配列（配列番号15）

G A G G T G C A G C T G G T G G A A T C T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C
C T G G C G G C T C T C T G A G A C T G A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A
C G A C T T C A C C C A C T A C G G C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C
C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T
A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G
A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C
C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T
A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C T A C T A C T A C G G C A C C A G C C A
C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A
G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C
T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C
T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G
A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C
A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C
T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C
A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A
A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G G T G G A A C C C A A G A G C

30

40

【0254】

例示的なラニビズマブ重鎖アミノ酸配列（配列番号16）

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 T G K

50

【0255】

例示的なラニビズマブ重鎖アミノ酸配列（配列番号17）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA
PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTS HWYFDVWGQGGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL

【0256】

例示的なラニビズマブ重鎖アミノ酸配列（配列番号18）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA
PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTS HWYFDVWGQGGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

【0257】

例示的なラニビズマブ軽鎖ヌクレオチド配列（配列番号19）

GACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCCT
CTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCA
GGACATCTCCAACCTACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCC
GGCAAGGCCCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCAACAAGCAGCC
TGCACTCCGGCGGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAG
CGGCACCGACTTCAACCCTGACCATATCTAGCCTGCAAGCCT
GAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCG
TGCTTTGGACATTTGGCCAGGGGCACAAAGGTGGAAATCAA
GCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCT
AGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGT
GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAAGAGAAGCCAAGGTGCA
GTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAA
GAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATA
GCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCACCAAGGGC
CTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACC GG GCGAAT
GT

【0258】

例示的なラニビズマブ軽鎖アミノ酸配列（配列番号20）

DIQLTQSPSSLASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKP
GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

【0259】

重鎖及び軽鎖ラニビズマブヌクレオチド配列を含む例示的な切断可能ポリペプチド（配列番号103）

ATGTACCGGATGCAAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTC
TGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATC
TGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTG
AGCTGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCACCCCACTACGGCA

T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G
G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C
G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A
C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G
A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C
T A C T A C T A C G G C A C C A G C C A C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G
G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A
G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T
A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G
A C T A C T T T T C C C G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G
C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G
C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G
T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A
T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G
G T G G A A C C C A A G A G C T G C G A C A A G A C C C A C A C C G G C A A G C
G G A A G A G A A G A G G C T C T G G C G A A G G C A G A G G C A G C C T G C T
T A C A T G T G G C G A C G T G G A A G A G A A C C C C G G A C C T A T G T A T
A G A A T G C A G C T C C T G T C C T G C A T T G C C C T G A G C C T G G C T C
T C G T G A C C A A C A G C G A C A T C C A G C T G A C A C A G A G C C C C A G
C A G C C T G T C T G C C T C T G T G G G A G A C A G A G T G A C C A T C A C C
T G T A G C G C C A G C C A G G A C A T C T C C A A C T A C C T G A A C T G G T
A T C A G C A A A A G C C C G G C A A G G C C C C T A A G G T G C T G A T C T A
C T T C A C A A G C A G C C T G C A C T C C G G C G T G C C C A G C A G A T T T
T C T G G C T C T G G C A G C G G C A C C G A C T T C A C C C T G A C C A T A T
C T A G C C T G C A G C C T G A G G A C T T C G C C A C C T A C T A C T G C C A
G C A G T A C A G C A C C G T G C C T T G G A C A T T T G G C C A G G G C A C A
A A G G T G G A A A T C A A G C G G A C T G T G G C C G C T C C T A G C G T G T
T C A T C T T T C C A C C T A G C G A C G A G C A G C T G A A G T C T G G C A C
A G C C T C T G T C G T G T G C C T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G A
G A A G C C A A G G T G C A G T G G A A A G T G G A C A A T G C C C T G C A G A
G C G G C A A C A G C C A A G A G A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C C A A
G G A T A G C A C C T A T A G C C T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G A G C
A A G G C C G A C T A C G A G A A G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G A A G
T G A C C C A C C A G G G C C T T T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G C T T
C A A C C G G G G C G A A T G T

【0260】

重鎖及び軽鎖ラニビズマブを含む例示的な切断可能ポリペプチド（配列番号21）

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S 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 T G K R K R R G S G E G R G S L L T C G D V E E N P G P M Y
R M Q L L S C I A L S L A L V T N S D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T
C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K V L I Y F T S S L H S G V P S R F
S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S T V P W T F G Q G T
K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S
K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【0261】

ベバシズマブ

ベバシズマブは、VEGFに対するヒト化モノクローナル全長抗体であり、膠芽腫、大腸癌、肺癌、腎臓癌、子宮頸癌、及び卵巣癌の治療のために静脈内注入が承認されている。しかしながら、ベバシズマブ治療の主な欠点は、定期的な静脈内注入を継続する必要があることと、高血圧、タンパク尿、肝臓酵素の上昇、動脈血栓塞栓事象（ATE）、静脈血栓塞栓事象、出血、ならびに手術及び創傷治療合併症を含む、全身循環における高用量投与に伴う副作用である。現在、ベバシズマブは、VS患者での有効性の予備的臨床証拠が実証されている唯一の薬理学的製剤である。

【0262】

いくつかの実施形態では、VEGF及び／またはその抗原提示断片に特異的に結合する本明細書に記載の抗VEGFタンパク質は、抗体である。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ベバシズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である配列であるか、またはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、及び／またはベバシズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインに対して少なくとも80%（例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%）同一である配列であるか、またはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。

【0263】

いくつかの実施形態では、VEGF及び／またはその抗原提示断片に特異的に結合する本明細書に記載の抗VEGFタンパク質は、抗体である。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ベバシズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、及び／またはベバシズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ベバシズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、及び／または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ベバシズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。

【0264】

いくつかの実施形態では、VEGF及び／またはその抗原提示断片に特異的に結合する本明細書に記載の抗VEGFタンパク質は、抗体である。いくつかの実施形態では、そのような抗体は、ベバシズマブの免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン軽鎖（例えば、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン軽鎖定常ドメインを含む）、及び／またはベバシズマブの免疫グロブリン重鎖定常ドメインであるか、またはそれを含む免疫グロブリン重鎖（例えば、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及び免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む）を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ベバシズマブの免疫グロブリン軽鎖定常ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン軽鎖定常ドメインを含み、及び／または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ酸置換を含むことを除いて、ベバシズマブの免疫グロブリン重鎖定常ドメインの配列であるか、もしくはそれを含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む。

【0265】

いくつかの実施形態では、第1の抗原結合ドメインは、ベバシズマブの免疫グロブリン

10

20

30

40

50

軽鎖可変ドメインにおける3つのCDR、及び／またはペバシズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインにおける3つのCDRを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合ドメインは、ペバシズマブの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインにおける3つのCDR、及び／またはペバシズマブの免疫グロブリン重鎖可変ドメインにおける3つのCDRを含む。

【0266】

例示的なペバシズマブヌクレオチド配列（配列番号22）

```
A T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T C T C
T G G C C C T G G T C A C C A A T T C T G A G G T G C A G C T G G T G G A A T C
T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C C T G G C G G C T C T C T G A G A C T G
A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A C A C C T T C A C C A A C T A C G G C A
T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G
G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C
G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A
C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G
A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C
C A C T A C T A C G G C A G C A G C C A C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G
G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A
G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T
A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G
A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G
C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G
C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G
T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A
T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G
G T G G A A C C C A A G A G C T G C 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 C 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 A G 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 T C C A A G C C G G G A A G A G A T G A C C 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 C G T G 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 A 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
T C C A G A T G G C A G C A G G G C 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 T C T
G A G C C T G T C T C C T G G C A A G C G G A A G A G A A G A G G C T C T G G C
G A A G G C A G A G G C A G C C T G C T T A C A T G T G G C G A C G T G G A A G
A G A A C C C C G G A C C T A T G T A T A G A A T G C A G C T C C T G T C C T G
C A T T G C C C T G A G C C T G G C T C T C G T G A C C A A C A G C G A C A T C
C A G A T G A C A C A G A G C C C C A G C A G C C T G T C T G C C T C T G T G G
G A G A C A G A G T G A C C A T C A C C T G T A G C G C C A G C C A G G A C A T
C T C C A A C T A C C T G A A C T G G T A T C A G C A A A A G C C C G G C A A G
G C C C C T A A G G T G C T G A T C T A C T T C A C A A G C A G C C T G C A C T
```

CCGGCGTGCC CAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCAC
CGACTTCAACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGAC
TTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGTGCCCTT
GGACATTTGGCCAGGGGCACAAAGGTGGAAATCAAGCGGGAC
TGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGAC
GAGCAGCTGAAGTCTGGGCACAGCCTCTGTCTGTGTGCCTGC
TGAAACAACCTTCTACCC CAGAGAAGCCCAAGGTGCAGTGGAA
AGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAAGAGAGC
GTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGA
GCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAAGCA
CAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGAACCCACCAAGGGCCTTTCT
AGCCCTGTGACCAAGAGGCTTCAACCGGGGCGAATGT

【0267】

重鎖及び軽鎖ベバシズマブアミノ酸配列を含む例示的な切断可能なポリペプチド（配列番号23）

MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY
AADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYP
HYYGSSHWYFDVWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKRKR RGS
EGRGSL L TCGDVEENPGPMYRMQLLSICIALSLALVTNSDI
QMTQSPSSL SASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGK
APKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQYSTVPWTFGQGT KVEIKRTVAAPS VFI FPPSD
EQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKS FNRGEC

【0268】

例示的なベバシズマブ重鎖ヌクレオチド配列（配列番号108）

ATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTC
TGGCCCTGGTCACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATC
TGGCGGCGGACTTGTTCAACCTGGCGGGCTCTCTGAGACTG
AGCTGTGCGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACCTACGGCA
TGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCCTTGAATG
GGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATAC
GCCGCGGACTTCAAGCGGAGATTCAACCTTCAAGCCTGGACA
CCAGCAAGAGCACCGGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACCGCGCGTGTA CTACTGCGCCAAGTATCCC
CACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGG
GACAGGGCACACTGGTCA CAGTGTCTAGCGCCTCTACAAA
GGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCT
ACCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGG
ACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAAATCTGG

CGCTCTGACAAGCGGCGTGACACACCTTTCCAGCTGTGCTG
CAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAG
TGCCAAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
TGTGAACCAACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG
GTGGAACCCAAGAGGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTC
CATGTCTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGGACCTTCCGTGT
CCTGTTTCTCTCCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGC
AGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC
ACGAGGATCCCGAAGTGAAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG
CGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAA
CAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAGAGTACAAGTG
CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCTCTCTATCGAGAAA
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAAG
TTTACACACTGCTCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAA
CCAGGTGTCCCTGACCTGCTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCT
TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAG
AGAACAACTACAAGACAACCCCTCTCTGTGCTGGACAGCGA
CGGCTCATTTCTTCTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAG
TCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGA
TGACAGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAGTCTCT
GAGCCTGTCTCTCTGGCAAG

【0269】

例示的なベバシズマブ重鎖アミノ酸配列（配列番号24）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFFTNYGMNWVRQA
PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN
HYTQKSLSLSPGK

【0270】

例示的なベバシズマブ軽鎖ヌクレオチド配列（配列番号109）

GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCCT
CTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCA
GGACATCTCCAACCTACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCC
GGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTCAACAAGCAGCC
TGCACTCCGGCGTGCCCAAGCAGATTTTCTGGCTCTGGCAG
CGGCACCGACTTCAACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCT
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCG
TGCTTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAAATCAA
GCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCACCT
AGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGT
GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAAGAGAAGCCAAGGTGCA
GTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGGCAACAGCCA

G A G A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C C A A G G A T A G C A C C T A T A
G C C T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G A G C A A G G C C G A C T A C G A
G A A G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G A A G T G A C C C A C C A G G G C
C T T T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G C T T C A A C C G G G G C G A A T
G T

【0271】

例示的なベバシズマブ軽鎖アミノ酸配列（配列番号25）

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P
G K A P K V L I Y F T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q Y S T V P W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C

10

20

【0272】

VEGF TRAP

可溶性VEGF受容体（本明細書では、VEGF TRAPとも呼ばれる）は、シグナルペプチド（例えば、本明細書に記載の例示的なシグナルペプチドのいずれか）に作動可能に連結された1つ以上（例えば、2つまたは3つ）の哺乳動物VEGF受容体（複数可）（例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、及びVEGFR-3のうちの1つ以上）の細胞外領域の一部を含むポリペプチドであり、該可溶性VEGF受容体は、1つ以上の哺乳動物VEGFタンパク質（複数可）（例えば、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、及びVEGF-Dのうちの1つ以上（例えば、2、3、または4つ）、例えば、ヒト野生型VEGF-A、ヒト野生型VEGF-B、ヒト野生型VEGF-C、及びヒト野生型VEGF-Dのうちの1つ以上（例えば、2、3、または4つ）に特異的に結合することができる。

【0273】

いくつかの例では、可溶性VEGF受容体は、VEGFR-1の細胞外領域の一部（例えば、約10アミノ酸～約732アミノ酸、約10アミノ酸～約700アミノ酸、約10アミノ酸～約650アミノ酸、約10アミノ酸～約600アミノ酸、約10アミノ酸～約550アミノ酸、約10アミノ酸～約500アミノ酸、約10アミノ酸～約450アミノ酸、約10アミノ酸～約400アミノ酸、約10アミノ酸～約350アミノ酸、約10アミノ酸～約300アミノ酸、約10アミノ酸～約250アミノ酸、約10アミノ酸～約200アミノ酸、約10アミノ酸～約150アミノ酸、約10アミノ酸～約100アミノ酸、約10アミノ酸～約50アミノ酸、約50アミノ酸～約732アミノ酸、約50アミノ酸～約700アミノ酸、約50アミノ酸～約650アミノ酸、約50アミノ酸～約600アミノ酸、約50アミノ酸～約550アミノ酸、約50アミノ酸～約500アミノ酸、約50アミノ酸～約450アミノ酸、約50アミノ酸～約400アミノ酸、約50アミノ酸～約350アミノ酸、約50アミノ酸～約300アミノ酸、約50アミノ酸～約250アミノ酸、約50アミノ酸～約200アミノ酸、約50アミノ酸～約150アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約732アミノ酸、約100アミノ酸～約700アミノ酸、約100アミノ酸～約650アミノ酸、約100アミノ酸～約600アミノ酸、約100アミノ酸～約550アミノ酸、約100アミノ酸～約500アミノ酸、約100アミノ酸～約450アミノ酸、約100アミノ酸～約400アミノ酸、約100アミノ酸～約350アミノ酸、約100アミノ酸～約300アミノ酸、約100アミノ酸～約250アミノ酸、約100アミノ酸～約200アミノ酸、約100アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約732アミノ酸、約150アミノ酸～約700アミノ酸、約150アミノ酸～約650アミノ酸、約150アミノ酸～約600アミノ酸、約150アミノ酸～約550アミノ酸、約150アミノ酸～約500アミノ酸、約150アミノ酸～約450アミノ酸、約150アミノ酸～約400アミノ酸、約150アミノ酸～約350アミノ酸、約150アミノ酸～約300アミノ酸、約150アミノ酸～約2

30

40

50

50アミノ酸、約150アミノ酸～約200アミノ酸、約200アミノ酸～約732アミノ酸、約200アミノ酸～約700アミノ酸、約200アミノ酸～約650アミノ酸、約200アミノ酸～約600アミノ酸、約200アミノ酸～約550アミノ酸、約200アミノ酸～約500アミノ酸、約200アミノ酸～約450アミノ酸、約200アミノ酸～約400アミノ酸、約200アミノ酸～約350アミノ酸、約200アミノ酸～約300アミノ酸、約200アミノ酸～約250アミノ酸、約250アミノ酸～約732アミノ酸、約250アミノ酸～約700アミノ酸、約250アミノ酸～約650アミノ酸、約250アミノ酸～約600アミノ酸、約250アミノ酸～約550アミノ酸、約250アミノ酸～約500アミノ酸、約250アミノ酸～約450アミノ酸、約250アミノ酸～約400アミノ酸、約250アミノ酸～約350アミノ酸、約250アミノ酸～約300アミノ酸、約300アミノ酸～約732アミノ酸、約300アミノ酸～約700アミノ酸、約300アミノ酸～約650アミノ酸、約300アミノ酸～約600アミノ酸、約300アミノ酸～約550アミノ酸、約300アミノ酸～約500アミノ酸、約300アミノ酸～約450アミノ酸、約300アミノ酸～約400アミノ酸、約300アミノ酸～約350アミノ酸、約350アミノ酸～約732アミノ酸、約350アミノ酸～約700アミノ酸、約350アミノ酸～約650アミノ酸、約350アミノ酸～約600アミノ酸、約350アミノ酸～約550アミノ酸、約350アミノ酸～約500アミノ酸、約350アミノ酸～約450アミノ酸、約350アミノ酸～約400アミノ酸、約400アミノ酸～約732アミノ酸、約400アミノ酸～約700アミノ酸、約400アミノ酸～約650アミノ酸、約400アミノ酸～約600アミノ酸、約400アミノ酸～約550アミノ酸、約400アミノ酸～約500アミノ酸、約400アミノ酸～約450アミノ酸、約450アミノ酸～約732アミノ酸、約450アミノ酸～約700アミノ酸、約450アミノ酸～約650アミノ酸、約450アミノ酸～約600アミノ酸、約450アミノ酸～約550アミノ酸、約450アミノ酸～約500アミノ酸、約500アミノ酸～約732アミノ酸、約500アミノ酸～約700アミノ酸、約500アミノ酸～約650アミノ酸、約500アミノ酸～約600アミノ酸、約500アミノ酸～約550アミノ酸、約550アミノ酸～約732アミノ酸、約550アミノ酸～約700アミノ酸、約550アミノ酸～約650アミノ酸、約550アミノ酸～約600アミノ酸、約600アミノ酸～約732アミノ酸、約600アミノ酸～約700アミノ酸、約600アミノ酸～約650アミノ酸、約650アミノ酸～約732アミノ酸、約650アミノ酸～約700アミノ酸、または約700アミノ酸～約732アミノ酸) (例えば、野生型ヒトVEGFR-1からの連続配列(例えば、野生型ヒトVEGFR-1(例えば、配列番号27、29、31、もしくは33)からの細胞外領域に1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、または7つ)の免疫グロブリン様ドメインを含む連続配列、または野生型ヒトVEGFR-1からの連続配列と少なくとも80%(例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%)同一である配列、例えば、配列番号27、29、31、もしくは33の連続配列と少なくとも80%(例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも99%)同一である配列)を含む。

10

20

30

40

50

【0274】

いくつかの例では、可溶性VEGF受容体は、VEGFR-2の細胞外領域の一部(例えば、約20アミノ酸～約745アミノ酸、または本明細書に記載のこの範囲の任意の部分範囲)(例えば、野生型ヒトVEGFR-2からの連続配列(例えば、野生型ヒトVEGFR-2(例えば、配列番号35)からの細胞外領域に1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、または7つ)の免疫グロブリン様ドメインを含む連続配列、または野生型ヒトVEGFR-2からの連続配列と少なくとも80%(例えば、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、または少なくとも9

9%) 同一である配列、例えば、配列番号 35 における連続配列と少なくとも 80% (例えば、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 86%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 94%、少なくとも 96%、少なくとも 98%、または少なくとも 99%) 同一である配列) を含む。

【0275】

いくつかの例では、可溶性 VEGF 受容体は、VEGFR-1 の細胞外領域の一部 (例えば、本明細書に記載の VEGFR-1 の細胞外領域の任意の部分) 及び VEGFR-2 の細胞外領域の一部 (例えば、本明細書に記載の VEGFR-2 の細胞外領域の任意の部分) を含む。例えば、可溶性 VEGF 受容体は、野生型ヒト VEGFR-1 からの細胞外領域に 1 つ以上 (例えば、2、3、4、5、6、または 7 つ) の免疫グロブリン様ドメインと、野生型ヒト VEGFR-2 からの細胞外領域に 1 つ以上 (例えば、2、3、4、5、6、または 7 つ) の免疫グロブリン様ドメインを含み得る (例えば、アフリベルセプト)。

10

【0276】

いくつかの例では、可溶性 VEGF 受容体は、VEGFR-3 の細胞外領域の一部 (例えば、約 20 アミノ酸～約 751 アミノ酸、または本明細書に記載のこの範囲の任意の部分範囲) (例えば、野生型ヒト VEGFR-3 からの連続配列 (例えば、野生型ヒト VEGFR-3 (例えば、配列番号 37、39、または 41) からの細胞外領域に 1 つ以上 (例えば、1、2、3、4、5、6、または 7 つ) の免疫グロブリン様ドメインを含む連続配列、または野生型ヒト VEGFR-3 からの連続配列と少なくとも 80% (例えば、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 86%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 94%、少なくとも 96%、少なくとも 98%、または少なくとも 99%) 同一である配列、例えば、配列番号 37、39、または 41 における連続配列と少なくとも 80% (例えば、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 86%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 94%、少なくとも 96%、少なくとも 98%、または少なくとも 99%) 同一である配列) を含む。

20

【0277】

異なる哺乳動物 VEGFR-1、異なる哺乳動物 VEGFR-2、及び異なる哺乳動物 VEGFR-3 の細胞外領域の非限定的な例が本明細書に記載されている。野生型 VEGF 受容体タンパク質をコードするタンパク質及びヌクレオチド配列の非限定的な例を以下に示す。当業者であれば理解することができるように、種間で保存されているアミノ酸における置換がタンパク質の機能の変化をもたらす可能性が高い一方で、種間で保存されていないアミノ酸位置における置換は、タンパク質の機能に影響を及ぼす可能性が低い。

30

【0278】

ヒト染色体位置 13q12.3 に見出される VEGFR-1 遺伝子は、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) ファミリーのメンバーを含む 33 のエクソンをコードする。VEGFR ファミリーメンバーは、7 つの免疫グロブリン (Ig) 様ドメインを有する細胞外リガンド結合領域、膜貫通セグメント、及び細胞質ドメイン内のチロシンキナーゼ (TK) ドメインを含む受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である。このタンパク質は、VEGF-A、VEGF-B、及び胎盤増殖因子に結合し、血管新生及び脈管形成に重要な役割を果たす。この受容体の発現は、血管内皮細胞、胎盤栄養膜細胞、及び末梢血単球に見出される。この遺伝子には、異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが見つかっている。アイソフォームには、全長膜貫通型受容体アイソフォームと短縮型の可溶性アイソフォームが含まれる。

40

【0279】

例示的なヒト VEGFR-1 アイソフォーム 1 cDNA 配列 (配列番号 26)

A T C G A G G T C C G C G G G A G G C T C G G A G C G C G C C A G G C G G A C A
C T C C T C T C G G C T C C T C C C G G C A G C G G C G G C G G C T C G G A G
C G G G C T C C G G G G C T C G G G T G C A G C G G C C A G C G G G C G C C T G

50

G C G G C G A G G A T T A C C C G G G G A A G T G G T T G T C T C C T G G C T G
G A G C C G C G A G A C G G G C G C T C A G G G C G C G G G G C C G G C G G C G
G C G A A C G A G A G G A C G G A C T C T G G C G G C C G G G T C G T T G G C C
G C G G G G A G C G C G G G C A C C G G G C G A G C A G G C C G C G T C G C G C
T C A C C A T G G T C A G C T A C T G G G A C A C C G G G G T C C T G C T G T G
C G C G C T G C T C A G C T G T C T G C T T C T C A C A G G A T C T A G T T C A
G G T T C A A A A T T A A A A G A T C C T G A A C T G A G T T T A A A A G G C A
C C C A G C A C A T C A T G C A A G C A G G C C A G A C A C T G C A T C T C C A
A T G C A G G G G G G A A G C A G C C C A T A A A T G G T C T T T G C C T G A A
A T G G T G A G T A A G G A A A G C G A A A G G C T G A G C A T A A C T A A A T
C T G C C T G T G G A A G A A A T G G C A A A C A A T T C T G C A G T A C T T T
A A C C T T G A A C A C A G C T C A A G C A A A C C A C A C T G G C T T C T A C
A G C T G C A A A T A T C T A G C T G T A C C T A C T T C A A A G A A G A A G G
A A A C A G A A T C T G C A A T C T A T A T A T T T A T T A G T G A T A C A G G
T A G A C C T T T C G T A G A G A T G T A C A G T G A A A T C C C C G A A A T T
A T A C A C A T G A C T G A A G G A A G G G A G C T C G T C A T T C C C T G C C
G G G T T A C G T C A C C T A A C A T C A C T G T T A C T T T A A A A A A G T T
T C C A C T T G A C A C T T T G A T C C C T G A T G G A A A A C G C A T A A T C
T G G G A C A G T A G A A A G G G C T T C A T C A T A T C A A A T G C A A C G T
A C A A A G A A A T A G G G C T T C T G A C C T G T G A A G C A A C A G T C A A
T G G G C A T T T T G T A T A A G A C A A A C T A T C T C A C A C A T C G A C A A
A C C A A T A C A A T C A T A G A T G T C C A A A T A A G C A C A C C A C G C C
C A G T C A A A T T A C T T A G A G G C C A T A C T C T T G T C C T C A A T T G
T A C T G C T A C C A C T C C C T T G A A C A C G A G A G T T C A A A T G A C C
T G G A G T T A C C C T G A T G A A A A A A A T A A G A G A G C T T C C G T A A
G G C G A C G A A T T G A C C A A A G C A A T T C C C A T G C C A A C A T A T T
C T A C A G T G T T C T T A C T A T T G A C A A A A T G C A G A A C A A A G A C
A A A G G A C T T T A T A C T T G T C G T G T A A G G A G T G G A C C A T C A T
T C A A A T C T G T T A A C A C C T C A G T G C A T A T A T A T G A T A A A G C
A T T C A T C A C T G T G A A A C A T C G A A A A C A G C A G G T G C T T G A A
A C C G T A G C T G G C A A G C G G T C T T A C C G G C T C T C T A T G A A A G
T G A A G G C A T T T C C C T C G C C G G A A G T T G T A T G G T T A A A A G A
T G G G T T A C C T G C G A C T G A G A A A T C T G C T C G C T A T T T G A C T
C G T G G C T A C T C G T T A A T T A T C A A G G A C G T A A C T G A A G A G G
A T G C A G G G A A T T A T A C A A T C T T G C T G A G C A T A A A A C A G T C
A A A T G T G T T T A A A A A C C T C A C T G C C A C T C T A A T T G T C A A T
G T G A A A C C C C A G A T T T A C G A A A A G G C C G T G T C A T C G T T T C
C A G A C C C G G C T C T C T A C C C A C T G G G C A G C A G A C A A A T C C T
G A C T T G T A C C G C A T A T G G T A T C C C T C A A C C T A C A A T C A A G
T G G T T C T G G C A C C C C T G T A A C C A T A A T C A T T C C G A A G C A A
G G T G T G A C T T T T G T T C C A A T A A T G A A G A G T C C T T T A T C C T
G G A T G C T G A C A G C A A C A T G G G A A A C A G A A T T G A G A G C A T C
A C T C A G C G C A T G G C A A T A A T A G A A G G A A A G A A T A A G A T G G
C T A G C A C C T T G G T T G T G G C T G A C T C T A G A A T T T C T G G A A T
C T A C A T T T G C A T A G C T T C C A A T A A A G T T G G G A C T G T G G G A
A G A A A C A T A A G C T T T T A T A T C A C A G A T G T G C C A A A T G G G T
T T C A T G T T A A C T T G G A A A A A A T G C C G A C G G A A G G A G A G G A
C C T G A A A C T G T C T T G C A C A G T T A A C A A G T T C T T A T A C A G A
G A C G T T A C T T G G A T T T T A C T G C G G A C A G T T A A T A A C A G A A
C A A T G C A C T A C A G T A T T A G C A A G C A A A A A A T G G C C A T C A C

10

20

30

40

50

T A A G G A G C A C T C C A T C A C T C T T A A T C T T A C C A T C A T G A A T
G T T T C C C T G C A A G A T T C A G G C A C C T A T G C C T G C A G A G C C A
G G A A T G T A T A C A C A G G G G A A G A A A T C C T C C A G A A G A A A G A
A A T T A C A A T C A G A G A T C A G G A A G C A C C A T A C C T C C T G C G A
A A C C T C A G T G A T C A C A C A G T G G C C A T C A G C A G T T C C A C C A
C T T T A G A C T G T C A T G C T A A T G G T G T C C C C G A G C C T C A G A T
C A C T T G G T T T A A A A A C A A C C A C A A A A T A C A A C A A G A G C C T
G G A A T T A T T T T A G G A C C A G G A A G C A G C A C G C T G T T T A T T G
A A A G A G T C A C A G A A G A G G A T G A A G G T G T C T A T C A C T G C A A
A G C C A C C A A C C A G A A G G G C T C T G T G G A A A G T T C A G C A T A C
C T C A C T G T T C A A G G A A C C T C G G A C A A G T C T A A T C T G G A G C
T G A T C A C T C T A A C A T G C A C C T G T G T G G C T G C G A C T C T C T T
C T G G C T C C T A T T A A C C C T C T T T A T C C G A A A A A T G A A A A G G
T C T T C T T C T G A A A T A A A G A C T G A C T A C C T A T C A A T T A T A A
T G G A C C C A G A T G A A G T T C C T T T G G A T G A G C A G T G T G A G C G
G C T C C C T T A T G A T G C C A G C A A G T G G G A G T T T G C C C G G G A G
A G A C T T A A A C T G G G C A A A T C A C T T G G A A G A G G G G C T T T T G
G A A A A G T G G T T C A A G C A T C A G C A T T T G G C A T T A A G A A A T C
A C C T A C G T G C C G G A C T G T G G C T G T G A A A A T G C T G A A A G A G
G G G G C C A C G G C C A G C G A G T A C A A A G C T C T G A T G A C T G A G C
T A A A A A T C T T G A C C C A C A T T G G C C A C C A T C T G A A C G T G G T
T A A C C T G C T G G G A G C C T G C A C C A A G C A A G G A G G G C C T C T G
A T G G T G A T T G T T G A A T A C T G C A A A T A T G G A A A T C T C T C C A
A C T A C C T C A A G A G C A A A C G T G A C T T A T T T T T T C T C A A C A A
G G A T G C A G C A C T A C A C A T G G A G C C T A A G A A A G A A A A A A T G
G A G C C A G G C C T G G A A C A A G G C A A G A A A C C A A G A C T A G A T A
G C G T C A C C A G C A G C G A A A G C T T T G C G A G C T C C G G C T T T C A
G G A A G A T A A A A G T C T G A G T G A T G T T G A G G A A G A G G A G G A T
T C T G A C G G T T T C T A C A A G G A G C C C A T C A C T A T G G A A G A T C
T G A T T T C T T A C A G T T T T C A A G T G G C C A G A G G C A T G G A G T T
C C T G T C T T C C A G A A A G T G C A T T C A T C G G G A C C T G G C A G C G
A G A A A C A T T C T T T T A T C T G A G A A C A A C G T G G T G A A G A T T T
G T G A T T T T G G C C T T G C C C G G G A T A T T T A T A A G A A C C C C G A
T T A T G T G A G A A A A G G A G A T A C T C G A C T T C C T C T G A A A T G G
A T G G C T C C T G A A T C T A T C T T T G A C A A A A T C T A C A G C A C C A
A G A G C G A C G T G T G G T C T T A C G G A G T A T T G C T G T G G G A A A T
C T T C T C C T T A G G T G G G T C T C C A T A C C C A G G A G T A C A A A T G
G A T G A G G A C T T T T G C A G T C G C C T G A G G G A A G G C A T G A G G A
T G A G A G C T C C T G A G T A C T C T A C T C C T G A A A T C T A T C A G A T
C A T G C T G G A C T G C T G G C A C A G A G A C C C A A A A G A A A G G C C A
A G A T T T G C A G A A C T T G T G G A A A A A C T A G G T G A T T T G C T T C
A A G C A A A T G T A C A A C A G G A T G G T A A A G A C T A C A T C C C A A T
C A A T G C C A T A C T G A C A G G A A A T A G T G G G T T T A C A T A C T C A
A C T C C T G C C T T C T C T G A G G A C T T C T T C A A G G A A A G T A T T T
C A G C T C C G A A G T T T A A T T C A G G A A G C T C T G A T G A T G T C A G
A T A C G T A A A T G C T T T C A A G T T C A T G A G C C T G G A A A G A A T C
A A A A C C T T T G A A G A A C T T T T A C C G A A T G C C A C C T C C A T G T
T T G A T G A C T A C C A G G G C G A C A G C A G C A C T C T G T T G G C C T C
T C C C A T G C T G A A G C G C T T C A C C T G G A C T G A C A G C A A A C C C
A A G G C C T C G C T C A A G A T T G A C T T G A G A G T A A C C A G T A A A A

10

20

30

40

50

G T A A G G A G T C G G G G C T G T C T G A T G T C A G C A G G C C C A G T T T
C T G C C A T T C C A G C T G T G G G C A C G T C A G C G A A G G C A A G C G C
A G G T T C A C C T A C G A C C A C G C T G A G C T G G A A A G G A A A A T C G
C G T G C T G C T C C C C G C C C C C A G A C T A C A A C T C G G T G G T C C T
G T A C T C C A C C C C A C C C A T C T A G A G T T T G A C A C G A A G C C T T
A T T T C T A G A A G C A C A T G T G T A T T T A T A C C C C C A G G A A A C T
A G C T T T T G C C A G T A T T A T G C A T A T A T A A G T T T A C A C C T T T
A T C T T T C C A T G G G A G C C A G C T G C T T T T T G T G A T T T T T T T A
A T A G T G C T T T T T T T T T T T G A C T A A C A A G A A T G T A A C T C C
A G A T A G A G A A A T A G T G A C A A G T G A A G A A C A C T A C T G C T A A
A T C C T C A T G T T A C T C A G T G T T A G A G A A A T C C T T C C T A A A C
C C A A T G A C T T C C C T G C T C C A A C C C C C G C C A C C T C A G G G C A
C G C A G G A C C A G T T T G A T T G A G G A G C T G C A C T G A T C A C C C A
A T G C A T C A C G T A C C C C A C T G G G C C A G C C C T G C A G C C C A A A
A C C C A G G G C A A C A A G C C C G T T A G C C C C A G G G A T C A C T G G C
T G G C C T G A G C A A C A T C T C G G G A G T C C T C T A G C A G G C C T A A
G A C A T G T G A G G A G G A A A A G G A A A A A A A G C A A A A A G C A A G G
G A G A A A A G A G A A A C C G G G A G A A G G C A T G A G A A A G A A T T T G
A G A C G C A C C A T G T G G G C A C G G A G G G G G A C G G G G C T C A G C A
A T G C C A T T T C A G T G G C T T C C C A G C T C T G A C C C T T C T A C A T
T T G A G G G C C C A G C C A G G A G C A G A T G G A C A G C G A T G A G G G G
A C A T T T T C T G G A T T C T G G G A G G C A A G A A A A G G A C A A A T A T
C T T T T T T G G A A C T A A A G C A A A T T T T A G A A C T T T A C C T A T G
G A A G T G G T T C T A T G T C C A T T C T C A T T C G T G G C A T G T T T T G
A T T T G T A G C A C T G A G G G T G G C A C T C A A C T C T G A G C C C A T A
C

10

20

30

40

50

T T T T G G C T C C T C T A G T A A G A T G C A C T G A A A A C T T A G C C A G
A G T T A G G T T G T C T C C A G G C C A T G A T G G C C T T A C A C T G A A A
A T G T C A C A T T C T A T T T T G G G T A T T A A T A T A T A G T C C A G A C
A C T T A A C T C A A T T T C T T G G T A T T A T T C T G T T T T G C A C A G T
T A G T T G T G A A A G A A A G C T G A G A A G A A T G A A A A T G C A G T C C
T G A G G A G A G G A G T T T T C T C C A T A T C A A A A C G A G G G C T G A T
G G A G G A A A A A G G T C A A T A A G G T C A A G G G A A A A C C C C G T C T
C T A T A C C A A C C A A A C C A A T T C A C C A A C A C A G T T G G G A C C C
A A A A C A C A G G A A G T C A G T C A C G T T T C C T T T T C A T T T A A T G
G G G A T T C C A C T A T C T C A C A C T A A T C T G A A A G G A T G T G G A A
G A G C A T T A G C T G G C G C A T A T T A A G C A C T T T A A G C T C C T T G
A G T A A A A A G G T G G T A T G T A A T T T A T G C A A G G T A T T T C T C C
A G T T G G G A C T C A G G A T A T T A G T T A A T G A G C C A T C A C T A G A
A G A A A A G C C C A T T T T C A A C T G C T T T G A A A C T T G C C T G G G G
T C T G A G C A T G A T G G G A A T A G G G A G A C A G G G T A G G A A A G G G
C G C C T A C T C T T C A G G G T C T A A A G A T C A A G T G G G C C T T G G A
T C G C T A A G C T G G C T C T G T T T G A T G C T A T T T A T G C A A G T T A
G G G T C T A T G T A T T T A T G A T G T C T A T C G A G G T C C G C G G G A G
G C T C G G A G C G C G C C A G G C G G A C A C T C C T C T C G G C T C C T C C
C C G G C A G C G G C G G C G G C T C G G A G C G G G C T C C G G G G C T C G G
G T G C A G C G G C C A G C G G G C G C C T G G C G G C G A G G A T T A C C C G
G G G A A G T G G T T G T C T C C T G G C T G G A G C C G C G A G A C G G G C G

CTCAGGGCGCGGGGGCCGGCGGGCGGGCGAACGAGAGGACGGGA
CTCTGGCGGGCCGGGGTCTGTTGGCCGCGGGGGAGCGCGGGGCAC
CGGGCGAGCAGGCCGCGTCTGCGCTCACCATGGTTCAGCTAC
TGGGACACCGGGGGTCCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTC
TGCTTCTCACAAGGATCTAGTTTCAGGTTTCAAAAATTAAAAAGA
TCCTGAACCTGAGTTTAAAAAGGCAACCCAGCACATCATGCAA
GCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGGGAAGCAG
CCCATAAATGGTCTTTTGCTGTAAATGGTGAGTAAGGAAAG
CGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCCTGTGGAAAGAAAT
GGCAAACAATTCTGCAGTACTTTTAAACCTTGAAACACAGCTCTC
AAGCAAACCACACTGGGCTTCTACAGCTGCAAATATCTAGC
TGTACCTACTTCAAGAAGAAAGGAACAAGAAATCTGCAATCTC
TATATATTTATTAGTGATACAGGTAGACCCTTTTCGTAGAGA
TGTACAGTGAAATCCCCGAAATTTATACACATGACTGAAGG
AAGGGAGCTCGTTCATTCCTCGCCGGGTTACGTTCACCTAAC
ATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTTGA
TCCCTGATGGAAACGCGATAATCTGGGACAGTAGAAAGGG
CTTCATCATATCAAATGCAACGTTACAAAGAAATAGGGGCTT
CTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCAATTTGTATAAGA
CAAACCTATCTCACACATCGACAAACCATAATCATAGA
TGTCCAAATAAGCACACCACGCCAGTCAAATTTACTTAGA
GGCCATACTCTTGTCTCAATTGTACTGTACCACTCCCT
TGAAACACGAGAGTTCAAATGACCTGGAGTTACCCCTGATGA
AAAAAATAAGAGAGGCTTCCGTAAGGCGACGAATTTGACCAA
AGCAATTTCCCATGCGCAACATATTTCTACAGTGTCTTACTA
TTGACAAAATGCAGAACAAAGACAAAGGACTTTTATACTTG
TCGTGTAAGGAGTGGAACCATCATTTCAAATCTGTTTAACACC
TCAGTGCATATATATGATAAAGCATTCATCACTGTGAAAC
ATCGAAACACAGCAGGTGCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCG
GTCTTACC GGCTCTCTATGAAAGTGAAAGGCATTTTCCCTCG
CCGGAAGTTGTATGGTTAAAAAGATGGGTTTACCTGCGACTG
AGAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAAT
TATCAAGGACGTAACTGAAGAGGATGCAGGGGAATTTATACA
ATCTTTGCTGAGCATAAACAGTCAAATGTGTTTTAAAAACC
TCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAAACCCCGAGATTTA
CGAAAGAGGCCGCTGTCTCATCGTTTCCAGACCCGGGCTCTCTAC
CCACTGGGCGAGCAGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATG
GTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGGTTCTGGCACCCCTG
TAACCATAATCATTCGGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTTC
AATAATGAAGAGTCCTTTATCCTGGATGCTGACAGCAACA
TGGGAACAGAAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAAT
AATAGAAAGGAAGAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGTG
GCTGACTCTAGAATTTCTGGAATCTACATTTGCAATAGCTT
CCAATAAAGTTTGGGACTGTGGGAAGAAACATAAGCTTTT
TATCACAGATGTGCCAAATGGGGTTTTCATGTTAACTTGGAA
AAAAATGCCGACGGAAGGAGAGGACCTGAAACTGTCTTGCA
CAGTTAAACAAGTTCTTATACAGAGACGTTACTTGGATTTT
ACTGCGGACAGTTAATAACAGAAACAATGCACCTACAGTATT
AGCAAGCAAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCAGCTCCATCA
CTCTTAATCTTACCATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTCTC

10

20

30

40

50

A G G C A C C T A T G C C T G C A G A G C C A G G A A T G T A T A C A C A G G G G
G A A G A A A T C C T C C A G A A G A A A G A A A T T A C A A T C A G A G A T C
A G G A A G C A C C A T A C C T C C T G C G A A A C C T C A G T G A T C A C A C
A G T G G C C A T C A G C A G T T C C A C C A C T T T A G A C T G T C A T G C T
A A T G G T G T C C C C G A G C C T C A G A T C A C T T G G T T T A A A A A C A
A C C A C A A A A T A C A A C A A G A G C C T G G A A T T A T T T T A G G A C C
A G G A A G C A G C A C G C T G T T T A T T G A A A G A G T C A C A G A A G A G
G A T G A A G G T G T C T A T C A C T G C A A A G C C A C C A A C C A G A A G G
G C T C T G T G G A A A G T T C A G C A T A C C T C A C T G T T C A A G G A A C
C T C G G A C A A G T C T A A T C T G G A G C T G A T C A C T C T A A C A T G C
A C C T G T G T G G C T G C G A C T C T C T T C T G G C T C C T A T T A A C C C
T C T T T A T C C G A A A A A T G A A A A G G T C T T C T T C T G A A A T A A A
G A C T G A C T A C C T A T C A A T T A T A A T G G A C C C A G A T G A A G T T
C C T T T G G A T G A G C A G T G T G A G C G G C T C C C T T A T G A T G C C A
G C A A G T G G G A G T T T G C C C G G G A G A G A C T T A A A C T G G G C A A
A T C A C T T G G A A G A G G G G C T T T T G G A A A A G T G G T T C A A G C A
T C A G C A T T T G G C A T T A A G A A A T C A C C T A C G T G C C G G A C T G
T G G C T G T G A A A A T G C T G A A A G A G G G G G C C A C G G C C A G C G A
G T A C A A A G C T C T G A T G A C T G A G C T A A A A A T C T T G A C C C A C
A T T G G C C A C C A T C T G A A C G T G G T T A A C C T G C T G G G A G C C T
G C A C C A A G C A A G G A G G G C C T C T G A T G G T G A T T G T T G A A T A
C T G C A A A T A T G G A A A T C T C T C C A A C T A C C T C A A G A G C A A A
C G T G A C T T A T T T T T T C T C A A C A A G G A T G C A G C A C T A C A C A
T G G A G C C T A A G A A A G A A A A A A T G G A G C C A G G C C T G G A A C A
A G G C A A G A A A C C A A G A C T A G A T A G C G T C A C C A G C A G C G A A
A G C T T T G C G A G C T C C G G C T T T C A G G A A G A T A A A A G T C T G A
G T G A T G T T G A G G A A G A G G A G G A T T C T G A C G G T T T C T A C A A
G G A G C C C A T C A C T A T G G A A G A T C T G A T T T C T T A C A G T T T T
C A A G T G G C C A G A G G C A T G G A G T T C C T G T C T T C C A G A A A G T
G C A T T C A T C G G G A C C T G G C A G C G A G A A A C A T T C T T T T A T C
T G A G A A C A A C G T G G T G A A G A T T T G T G A T T T T G G C C T T G C C
C G G G A T A T T T A T A A G A A C C C C G A T T A T G T G A G A A A A G G A G
A T A C T C G A C T T C C T C T G A A A T G G A T G G C T C C T G A A T C T A T
C T T T G A C A A A A T C T A C A G C A C C A A A G A G C G A C G T G T G G T C T
T A C G G A G T A T T G C T G T G G G A A A T C T T C T C C T T A G G T G G G T
C T C C A T A C C C A G G A G T A C A A A T G G A T G A G G A C T T T T G C A G
T C G C C T G A G G G A A G G C A T G A G G A T G A G A G C T C C T G A G T A C
T C T A C T C C T G A A A T C T A T C A G A T C A T G C T G G A C T G C T G G C
A C A G A G A C C C A A A A G A A A G G C C A A G A T T T G C A G A A C T T G T
G G A A A A A C T A G G T G A T T T G C T T C A A G C A A A T G T A C A A C A G
G A T G G T A A A G A C T A C A T C C C A A T C A A T G C C A T A C T G A C A G
G A A A T A G T G G G T T T A C A T A C T C A A C T C C T G C C T T C T C T G A
G G A C T T C T T C A A G G A A A G T A T T T C A G C T C C G A A G T T T A A T
T C A G G A A G C T C T G A T G A T G T C A G A T A C G T A A A T G C T T T C A
A G T T C A T G A G C C T G G A A A G A A T C A A A A C C T T T G A A G A A C T
T T T A C C G A A T G C C A C C T C C A T G T T T G A T G A C T A C C A G G G C
G A C A G C A G C A C T C T G T T G G C C T C T C C C A T G C T G A A G C G C T
T C A C C T G G A C T G A C A G C A A A C C C A A G G C C T C G C T C A A G A T
T G A C T T G A G A G T A A C C A G T A A A A G T A A G G A G T C G G G G C T G
T C T G A T G T C A G C A G G C C C A G T T T C T G C C A T T C C A G C T G T G

10

20

30

40

50

GGCACGTCAGCGAAGGGCAAGCGCAGGTTTCACCTACGACCA
CGCTGAGCTGGAAAGGAAATCGCGTGCTGCTCCCCGCCCC
CCAGACTACAACCTCGGTGGTCTGTACTCCACCCCAACCA
TCTAGAGTTTGTACACGAAGCCTTATTTCTAGAAGCACATG
TGTATTTATACCCCCAGGAAACTAGCTTTTGGCCAGTATTA
TGCATATATAAGTTTACACCTTTATCTTTCCATGGGAGGCC
A

GCTGCTTTTTTGTGATTTTTTTAATAGTGCTTTTTTTTTTTT
TGACTAACAAGAATGTAACCTCCAGATAGAGAAATAGTGAC
AAGTGAAGAACACTACTGCTAAATCCTCATGTTACTCAGT
GTTAGAGAAATCCTTCCTAAACCCAATGACTTCCCTGCTC
CAACCCCCCGCCACCTCAGGGGCACGCGAGGACCAGTTTGTATT
GAGGAGCTGCACCTGATCACCCAATGCATCACGTACCCAC
TGGGCCAGCCCTGCAGCCCAAAACCCAGGGGCAACAAGCCC
GTTAGCCCCAGGGGATCACTGGCTGGCCTGAGCAACATCTC
GGGAGTCCTCTAGCAGGCCTAAGACATGTGAGGAGGAAAA
GGAAAAAAGCAAAAAGCAAGGGAGAAAAAGAGAAACCGGG
AGAAGGCATGAGAAAGAATTTGAGACGCACCATGTGGGCA
CGGAGGGGGACGGGGGCTCAGCAATGCCATTTCAGTGGCTT
CCCAGCTCTGACCCCTTCTACATTTGAGGGCCAGCCAGGA
GCAGATGGACAGCGATGAGGGGGACATTTTCTGGATTCTGG
GAGGCAAGAAAAAGGACAAATATCTTTTTTTGGAACTAAAGC
AAATTTTATGAACCTTTACCTATGGAAAGTGGTTCTATGTCCA
TTCTCATTCGTGGCATGTTTTGTATTGTAGCACTGAGGGGT
GGCACTCAACTCTGAGCCCATACTTTTTGGCTCCTCTAGTA
AGATGCACCTGAAAACTTAGCCAGAGTTAGGTTGTCTCCAG
GCCATGATGGCCTTACACTGAAAAATGTCACATTTCTATTTT
GGGTATTAATATATAGTCCAGACACTTAACCTCAATTTCTT
GGTATTTATTTCTGTTTTTGACACAGTTAGTTGTGAAAGAAAGC
TGAGAAGAATGAAAAATGCAGTCCTGAGGAGAGGAGTTTTTC
TCCATATCAAAACGAGGGGCTGATGGAGGAAAAAAGGTCAAT
AAGGTCAAGGGGAAAAACCCCGTCTCTATACCAACCAAAACCA
ATTCACCAACACAGTTGGGGACCCAAAAACACAGGAAGTCAG
TCACGTTTTCTTTTTCATTTAATGGGGGATTCCACTATCTCA
CACTAATCTGAAAGGATGTGGAAGAGCATTAGCTGGCGCA
TATTAAGCACTTTAAGCTCCTTGAGTAAGAAAGGTGGTATG
TAATTTATGCAAGGTATTTCTCCAGTTGGGGACTCAGGATA
TTAGTTAATGAGCCATCACTAGAAAGAAAAAGCCCATTTTCA
ACTGCTTTGAAACTTGCCTGGGGTCTGAGCATGATGGGAA
TAGGGAGACAGGGGTAGGAAAGGGGCGCCTACTCTTCAGGGT
CTAAAGATCAAGTGGGCCCTTGGATCGCTAAGCTGGCTCTG
TTTGATGCTATTTATGCAAGTTAGGGTCTATGTATTTATG
ATGTCTGCACCTTCTGACGCCAGTCAAGAAAGCTGGAGAGGC
AACAGTGGATTGCTGCTTCTTGGGGAGAAAGAGTATGCTTC
CTTTTATCCATGTAATTTAACTGTAGAACCTGAGCTCTAA
GTAACCGAAGAATGTATGCCTCTGTTCTTATGTGCCACAT
CCTTGTTTTAAAGGCTCTCTGTATGAAGAGATGGGGACCGTC
ATCAGCACATTCCCTAGTGAGCCTACTGGCTCCTGGGCAGC

10

20

30

40

50

GGCTTTTGTGGGAAGACTCACTAGCCAGAAAGAGAGGGAGTGG
GACAGTCCTCTCCACCAAGATCTAAATCCAAACAAAAGCA
GGCTAGAGCCAGAAAGAGAGGACAAATCTTTGTTCTTCTCTC
TTCTTTTACATACGCAAAACCACTGTGACAGCTGGGCAATTT
TATAAATCAGGTAACCTGGAAGGAGGTTAAACACAGAAAAA
AGAAGACCTCAGTCAATTCTCTACTTTTTTTTTTTTTTCC
AAATCAGATAATAGCCCAGCAAAATAGTGATAACAATAATA
ACCTTAGCTATTTCATGTCTTGATTTCAATAATTAAATTCTT
AATCATTAAGAGACCATAATAAATACTCCTTTTCAAGAGA
AAAGCAAAACCATTTAGAAATTGTACTCAGCTCCTTCAAAC
TCAGGTTTGTAGCATACATGAGTCCATCCATCAGTCAAAG
AATGGTTCCATCTGGAGTCTTAATGTAGAAAGAAAAATGG
AGACTTGTAAATAATGAGCTAGTTACAAAGTGCTTGTTCAT
TAAAATAGCACTGAAAAATTGAAACATGAATTAACCTGATAA
TATTCCAATCATTTTGCCATTTATGACAAAAAATGGTTTGGCA
CTAACAAAGAACGAGCACTTCCTTTTCAGAGTTTCTGAGAT
AATGTACGTGGAACAGTCTGGGTGGGAATGGGGCTGAAACC
ATGTGCAAGTCTGTGTCTTGTTCAGTCCAAGAGAGTGACACC
GAGATGTTAATTTTAGGGACCCGTGCCCTTGTTCCTAGCC
CACAAGAATGCAAAACATCAAAACAGATACTCGCTAGCCTCA
TTTAAATTGATTAAAGGAGGAGTGCAATCTTTGGCCGACAG
TGGTGTAACCTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGGGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
AGGAAACTGGAATTTTAAAGTTACTTTTATACAAACCAAG
AATATATGCTACAGATATAAGACAGACATGGTTTGGTCTCT
ATATTTCTAGTCATGATGAATGTATTTTGTATACCATCTT
CATATAATAAACTTCCAAAAACACAGCACCTTCTGCAGCC
AGTCAGAAGCTGGAGAGGCAACAGTGGATTGCTGCTTCTT
GGGGAGAAAGAGTATGCTTCTCTTTTATCCATGTAAATTTAAC
TGTAGAACCTGAGCTCTAAGTAACCGAAGAAATGTATGCCT
CTGTTCTTATGTGCCACATCCTTGTTTAAAGGCTCTCTGT
ATGAAGAGATGGGACCGTCATCAGCACATTCCCTAGTGAG
CCTACTGGCTCCTGGCAGCGGCTTTTGTGGAAAGACTCACT
AGCCAGAAAGAGAGGAGTGGGACAGTCTCTCCACCAAGAT
CTAAATCCAAACAAAAGCAGGCTAGAGCCAGAAAGAGAGGA
CAAATCTTTGTTCTTCTCTCTTTTACATACGCAAAACCAC
CTGTGACAGCTGGCAATTTTATAAATCAGGTAACCTGGAAG
GAGGTTAAACACAGAAAAAAGAACCTCAGTCAATTCTC
TACTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAAATCAGATAATAGCCCAGCA
AATAGTGATAACAATAATAAACCTTAGCTATTTCATGTCTTG
ATTTCAATAATTAAATTCTTAATCATTAAGAGACCATAATA
AATACTCCTTTTCAAGAGAAAAAGCAAAACCATTAGAAATTG
TTACTCAGCTCCTTCAAACCTCAGGTTTGTAGCATACATGA
GTCCATCCATCAGTCAAAGAATGGTTCCATCTGGAGTCTT
AATGTAGAAAGAAAAAATGGAGACTTGTAATAATGAGCTAG
TTACAAAGTGCTTGTTCATTAAAAATAGCACTGAAAAATTGA
AACATGAATTAACTGATAATAATTCCAATCATTTGCCATTT
ATGACAAAAAATGGTTGGGCACTAACAAAGAACGAGCACTTC
CTTTCAGAGTTTCTGAGATAATGTACGTGGAAACAGTCTGG
GTGGAATGGGGCTGAAACCATGTGCAAGTCTGTGTCTTGT

10

20

30

40

50

CAGTCCAAGAAGTGACACCGAGATGTTAATTTTAGGGACC
 CGTGCCCTTGTTCCTAGCCCCACAAGAATGCAAACATCAAA
 CAGATACTCGCTAGCCTCATTTAAATTGATTAAAGGAGGA
 GTGCATCTTTGGCCGACAGTGGTGTAACTGTATGTGTGTG
 TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGTGTATGTGTG
 TTTTGTGCATAACTATTTAAGGAAACTGGAATTTTAAAGT
 TACTTTTATACAAACCAAGAATATATGCTACAGATATAAG
 ACAGACATGGTTTGGTCCTATATTTCTAGTCATGATGAAT
 GTATTTTGTATACCATCTTCATATAATAAACTTCCAAAA
 CACA

10

【0280】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム1前駆体アミノ酸配列（配列番号27）

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDP ELS LKGTQ
 HIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSA
 CGRNGKQFCSTLT LNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKET
 ESAIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMT EGRELVIPCRV
 TSPNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWD SRKGFII SNATYK
 EIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPV
 KLLRGHTLV L NCTATTP L NTRVQMTWSYPDEKNKRASVRR
 RIDQSN SHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFK
 SVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVK
 AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYS LI IKDVTEEDA
 GNYTILL SIKQSNVFKNL TATLIVNVKPKQIYEKAVSSFPD
 PALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHP CNH NHSEARC
 DFC SNNEESFILDADSNMGNRIESITQRM A IIEGKNKMAS
 TLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYITDVPNGFH
 VNLEKMPTEGED LKLSCTVNKFLYRDVTWILLRTVNNRTM
 HYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARN
 VYTGEEL LQKKEITIRDQEAPYLLRNLS DHTVAISSSTTL
 DCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQEPGIILGPGSSSTLFIER
 VTEEDEGVYHCKATNQKGSVES SAYLTVQGTSDKSNLELI
 TLTCTCVAATLFWLLTLFIRKMKRSSSEIKTDYLSIIMD
 PDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLKL GKSLGRGAFGK
 VVQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEGATASEYKALMTELK
 ILTHIGHHLNVVNL LGACTKQGGPLMVIVEYCKYGNLSNY
 LKSKRD LFFLNKDAALHMEPKKEKMEPGL EQGKKPRLDSV
 TSSES FASSGFQEDKSLSDVEEEEDSDG F YKEPITMEDLI
 SYSFQVARGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENNVVKICD
 FGLARDIYKNPDYVRKGDTRLPLKWMAPESIFDKIYSTKS
 DVWSYGVLLWEIFSLGGSPYPGVQMEDDFCSRLREGMRMR
 APEYSTPEIYQIMLDCWHRDPKERPRFAELVEKLGDL LQA
 NVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPAFSEDFFKESIS A
 PKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELLPNATSMFD
 DYQGDSSSTLLASPM LKRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKSK
 ESGLSDVSRPSFCHSSCGHVSEGKR RFTYDHAELERK IAC
 CSPPPDYNSVVLYSTPPI

20

30

40

【0281】

このバリエーション（2）は、sFlt1またはsVEGFR-1としても知られており、バリエーション1と比較して3'コード領域及び3'UTRが異なっている。コードされた可溶性タンパク質（アイソフォーム2）は、短く特有のC末端を持ち、アイソフォーム1の膜

50

貫通領域及び細胞質領域を欠く。

【0282】

例示的なヒト VEGFR-1 アイソフォーム 2 (s VEGFR-1 としても知られる)
cDNA 配列 (配列番号 28)

```
ATCGAGGTCCTCGCGGGAGGGCTCGGAGCGCGGCCAGGCGGGACAA
CTCCTCTCTCGGCTCCTCCCCCGGCAGCGGCGGGCTCGGGAG
CGGGCTCTCGGGGGCTCGGGGTGCAGCGGCCAGCGGGGCGCCTTG
GCGGCGAGGATTACCCGGGGGAAGTTGGTTGTCTCCTGGCTTG
GAGCCGCGAGAGACGGGGCGCTCAGGGGCGCGGGGGCCGGGCGGGCG
GCGAACGAGAGGACGGGACTCTGGCGGGCCGGGGTCTGTTTGGCC
GCGGGGGAGCGCGGGGCACCGGGGCGAGCAGGCCGCGGTCGCGGC
TCACCATGGTTCAGCTACTGGGACACCGGGGGTCTCTGCTGTG
CGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTTCA
GGTTCAAAATTAAAGATCCTGAACCTGAGTTTAAAGGGCA
CCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCA
ATGCAGGGGGGGAAGCAGCCCATAAATGGTCTTTGCCCTGAA
ATGGTGAGTAAGGAAGCGAAGGGCTGAGCATAACTAAAT
CTGCCCTGTGGAAGAAATGGGCAAAACAATTCTGCAGTACTTT
AACCTTGAACACAGCTCAAGCAAAACCACACTGGGCTTCTAC
AGCTGCAAAATATCTAGCTGTACCTACTTTCAAAGAAAGAAAGG
AAACAGAAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGG
TAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTT
ATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTTCATTCCTCTGCC
GGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTT
TCCACTTTGACACTTTTGATCCCTGATGGAAAAACGCATAATC
TGGGACAGTAGAAAGGGCTTTCATCATATCAAATGCAACGT
ACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAA
TGGGCAATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
ACCAATACAAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCC
CAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTG
TACTGCTACCACTCCCTTGAACACGAGAGTTCAAATGACC
TGGAGTTACCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAA
GGCGACGAATTGACCAAGCAATTCCCATGCCAAACATATT
CTACAGTGTTTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAAACAAAGAC
AAAGGACTTTTATACTTGTGCTGTAAGGAGTGGAACCATCAT
TCAAATCTGTTAAACACCTCAGTGCATATATATGATAAAGC
ATTCATCACTGTGAACATCGAAAAACAGCAGGTGCTTGAA
ACCGTAGCTGGCAAGCGGTCCTTACC GGCTCTCTATGAAAG
TGAAGGCATTTTCCCTCGCCGGGAAGTTGTATGGTTAAAAAG
TGGGTTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACT
CGTGCGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGTAACCTGAAGAGG
ATGCAGGGAATTATACAATCTTGTGCTGAGCATAAACAGTCA
AAATGTGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAAT
GTGAAACCCAGATTTACGAAAAAGGCCGTGTCTATCGTTTTC
CAGACCCGGCTCTCTTACCCACTGGGGCAGCAGACAAATCCT
GACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAG
TGGTTCTGGCACCCCTGTAAACCATAATCATTC CGAAGCAA
GGTGTGACTTTTGTTC CAATAATGAAGAGTCTTTTATCCT
GGATGCTGACAGCAACATGGGGAACAGAAATTGAGAGCATC
ACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAAGGAAGAAATAAGATGG
```

10

20

30

40

50

CTAGCACCTTGGTTGTGGCTGACTCTAGAAATTTCTGGAAAT
CTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGA
AGAAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGT
TTCATGTTAACTTTGGAAAAAATGCCGACGGGAAGGAGAGGA
CCTGAAACTGTCTTGCACAGTTTAAACAAGTTCTTTATACAGA
GACGTTACTTTGGATTTTACTGCGGACAGTTAATAACAGAA
CAATGCACCTACAGTATTAGCAAGCAAAAAAATGGCCATCAC
TAAGGAGCAGCTCCATCAGCTCTTAATCTTACCATCATGAAT
GTTTCCCTGCAAGATTTCAGGACACCTATGCCCTGCAGAGCCA
GGAATGTATACACAGGGGAAGAAATCCTCCAGAAAGAAAGA
AATTACAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGT
TTCTCTCGGATCTCCAATTTTAAAGCACAAGGAATGATT
GTACCACACAAAGTAATGTAAAACATTAAGGACTCATTA
AAAAGTAACAGTTGTCTCATATCATCTTGATTTATTGTCA
CTGTTGCTAACTTTTCAGGCTCGGGAGGAGATGCTCCTCCCA
AAATGAGTTCGGAGATGATAGCAGTAATAATGAGACCCCC
GGGCCCCAGCTCTGGGCCCCCCCATTCAGGCCGAGGGGGCT
GCTCCGGGGGGGCCGACTTTGGTGCACGTTTGGATTTGGAGG
ATCCCTGCACTGCCCTTCTCTGTGTTTGTGCTCTTGCTGT
TTTCTCCTGCTGATAAACAACAACCTTTGGGATGATCCTTT
CCTTCCATTTTGTATGCCAACCTCTTTTATTTTAAAGTGT
TGAAGCTGCACAAACTGAATAATTTAAACAATGCTGGTT
TCTGCCAAAGATGGACACGAATAAGTTAATTTTCCAGCTC
AGAAATGAGTACAGTTGAATTTGAGACTCTGTCTGGGACTTCT
GCCTGGTTTTTATTTGGGACTATTTTCATCTGCTCTTGATTT
GTAAATAGCACCTGGATAGCAAGTTATAATGCTTATTTAT
TTGAAAATGCTTTTTTTTTTTTTTTTACGTTAAGCACATTTAT
CTTGAACTGGAGCTTCTAAAAATGGGGCCCCAGGGGGTGCAAG
ATGTTGGTGTAATTCAGAGATAGTAAGGGTTTATCGCAGT
GTGAATTATAAGAGTCCATCCAAATCAACGTCCTCCTCCT
CCTCTCATGCGATCCAGGTAAATATGCAGTTAGTGCCACA
GTAGACTAGCCTAGCAAAGGGTTTGCTCCTTGCTGTCTCT
GACTGCACCACACAGCTATTGATGGCAGCTGAAAGAAAGT
GGATCATGCCCTTAATTTTAAATATTTCTCTGCTCTGGTTA
TTATTTTAAAGGAACCTTCATCATGTTAATAATGACAGCATTC
AAAGGTGTACCACAATCAATTTATCAAGGAAATAAAGGCT
ATTGTAACCAGAGATTTAATGCATTCCTTCTAAATGTAAAT
TTAAATTTTGCCCTTTAAAAAAGTCCACTTTCCCCATATG
CAAATGTTAATAGGATTTTTTATGGGGATTAAAGAAAGCGGCA
AAACTACAGAAAGCAGAAATTCAAAGTAATTTAAAAAATACA
CACCAGTTTTTAAATCAAGAGAAAGTTGTAATCTCTTGTTTT
AAGCTTGC GTTTGAGGGAAAAATGACTTTTTTCACCAAATTTA
ATATGCATTTGTTCTGTGTTTTTTATTTATGATTTGATCAT
ATATGTGACTTTGCATAAACTATTTAAAAAATAAATACTATA
ATGACCAAAATAGCCATGGCTGAGAAACACAGTGGCTGGG
CAGTTCAATAGGAGGTGACAATATGACAACCTTCTCAAGCT
TGGGAACCTCACAGACTGTTTCTCTCTTTAGGTAAACAGAT
TCTGTCCACGGCTAAACTTTGTCTTTTACGTTGGGAATTG
TTTTGTCAAACGTGAAAGAGTAACAATAAGCATTTTCCCCA
GAATGCCAGTTTTTATGGAGCCCCAAATGCTCTGAAAAACA

10

20

30

40

50

TTAGTAACCTGGAAGTTGTCTAGCCCAAAGGAAAGGAAAAAT
CAATTGTATCTTGAAATTTTACCTATGGCTCTTTGGCCTG
GCTTCTTTGTTTCAATTATAAGTTAGTGTGTTCTTTCAGGAA
ACAATGCCCTTAATAACCATAGAACATGGGGGGCCTTAATAGT
TGCTAACATTAAAAAAGCAAACAGAAATGATTGAGGGGATCC
TTATGAAAACAAAATGGTGAAATTGGACATGCAGAACCTAC
CATTTCTTCTCCCTGTGTTTGCAATTTTGTGGGGAGGGGGAG
GATGTTAGTATTTACAAAAGATGATTTTAAAGAACTTCCAA
GAGATGAGTTTAAAGAAATTCATAGAGTATTAGTTGTTCAC
TGTGTAATTAAATCCTTCCGGAGAGTCTTTTTTTTTTTTTT
TAAAGAAACTTTTTGGGTGGGTTTTTGTTTTTTTATTAGTTAC
CCTAGGGGTATGTTACCCCTGGGGGTATGAAGGGAGGGTGAAAG
ATAACGGAGGGGGGGAGAAAAAAGGAGAAAAAAGGAG
CCTAAAAATGGGGAATAATTGAAATGGAACAGGGGGGTGTGA
GGCTGGTTCTCTCAGTCCCCATTCCAAACGGAGGATAGAAAG
CTGTGTATTTATGTGACCTGGGCAGATCTCTGGGGGCCATAA
CACTGAAAAGTGAAAGAACCTGGTGGGCAGCTATCTTTGG
CTACTGATAACCAGCAGAAATGTCTGTTAATTCTGATTTTT
CTCAATTTGAAGGGGATCAGCTACACTGTTAAATTTTGGAA
AGCCACTACCTACTTCCATCAAGTAACCTTAGGGTTTCGAAA
TATGGGTTCAAACGCACCTCCCTTATTCAAAATGTCAAAAT
AGATTATTATAATGTATAAAGTAAGAAATTGACAAAAATATG
ATTCTTGGGTGTGATTGGTCATTTTAGAAACTAGCCAAAAGT
GAGACTTTTTAATGTAGAACATTTTTTCAGAAATGGGGTACAA
AGAAAAAATGCATATTACTGTATATTTTCAGAGTGTTTATGT
GAACCTTGTATTTAATTGAGAGTCCCATGTACGTTCTGCA
GCCTTTTTTGCTGCTTCTATCATCTGAAGTTTTGTGTAGTAC
AAATAAGGCCTTTGGGGATTCTTAATGACATTTATGTTAAA
ATGTTCTCTTCTCTTTTAAACACCGTTTTTCCAATCCACCTG
TCAGGGAGTCCAAATCGTGTCGTGTGTGATGATGCTATAC
TTTTGTAGCTAGAAAAACAATTTTAGTGTTGTGGGGCTCTGT
ATTCAGACTTCTCTTTTTTACAAGACCGATGGGCGAGTGATAG
A

10

20

30

TTATTTTTATCATATTTAATGCATGGGGAATAAGTGTGCTGA
GGAAGCTATTAAAAGTATAACTCAGTGAAATTGGGTCTGAG
TTTTAAATGAGATATTTCAAAATTTGGCTTGGCCACTGTAAA
AGCGACTAAATAATAATATGATACTGTTCTTTATGATCTT
GTCATGTTTCACTGATATGTTTGGGGTCTTCACTATGTAA
AAAAATGTCAAAATTTGTAATGAGCAAGCATGTACAAGTAGT
CGTAAATCAAAGGTTTTTAAACAGGACTGCATTTTCAATTA
GGAAAAGCTGTTTGGCAGATAGCATCCAATGCAAAAAACAG
AAATATCGTAACGTTCTGCTTAGTGCGCAAGATAAGATAG
GAAAGACATGCTCAAAGAGGCAAAAGAATCATTTGCTATCA
TTCATTTCTACACTAGTTTGAAGAAAGTTTTTGTACATCAGA
GCACCTTCTTCAAGCACACTTTTTTTGCTTTCAGATTTCTAT
TTTTTATAAAAATGAGAAAGACTAATGATAAACTGTAGAAATC
AAAAATTTATTGAGAAATCTGTTTTCTCCTAACAGATAGTAA
CCCTGCCATGATATACTACTTCAACAATGTTATAAAAATTT

40

50

A T G T G A T A A T A T A C A T T T T T A A C C T G G G A T T T C T A A A T T G C
T T T A A C A A A T G C T A A T C C T G A G A G T T G C C C T G C A G G A C T C
A A A A G G G A A A G G T T T T G G G A C G T G G C A G A A C C C T G C A G G G
A C A T G G A A T T A A G G C C A T T G C A A T G T A T C A T C T T T G T A G C
A T T G T C A T C A C T C C T A A G C T G C C T T C A C A G T T T T A G T A C A
C T A A G A T G A G G A A A T C G A A A A T G G G C A G A G A A A G C T C A T A
C T G T A T A A T T G A A G A C A G T G A C A G A G A A C G T G T C A G T T A T
G C C A A A A C T C T T T T G A T T T C T G T T C C A G G A T T T C C A A C A A
G A G G G G A A A G G A A T G A C T T G G G A G G G T G G G A A A G A C A T T A
G G A G T T G T T T T T A T T T T T T A C C T T G G A A G C T T T A G C T A C C
A A T C C A G T A C C C T C C T A A C T A G A A T G T A T A C A C A T C A G C A
G G A C T G A C T G A C T A C T T C A T T A G A G A T A T A C T G T A C T C A T
T G G G G G C C T T G G G G G T A C T G C T G T T C T T A T G T G G G A T T T T
A A T G T T G T A A T G T A T T G C A T C T T A A T G T A T T G A A T T C A T T
T T G T T G T A C T A T A T T G G T T G G C A T T T T A T T A A A A T A A A T T
G T A T T G T A T C A T A T T T G T A T G T T T T A A G A G A A A A T A A T A T
A A A A T A C A A T A T T T G T A C T A T T A T A T A G T G C A A A A A C T A C
A A A T C T G T G C C T C T G C C T C T T G A A T T A A T T C T T T G G T T G C
T T G C A T T T T G G G A A G G G A A T G G A G A A A G G A A A G A A C C A A T A
A A G C T T T T C A A A G T T C A A G A A A

10

20

【0283】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム2 (sVEGFR-1としても知られる)
前駆体アミノ酸配列 (配列番号29)

M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S S G S K L K D P E L S L K G T Q
H I M Q A G Q T L H L Q C R G E A A H K W S L P E M V S K E S E R L S I T K S A
C G R N G K Q F C S T L T L N T A Q A N H T G F Y S C K Y L A V P T S K K K E T
E S A I Y I F I S D T G R P F V E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V
T S 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 Q I S T P R P V
K L L R G H T L V L N C T A T T P L N T R V Q M T W S Y P D E K N K R A S V R R
R I D Q S N S H A N I F Y S V L T I D K M Q N K D K G L Y T C R V R S G P S F K
S V N T S V H I Y D K A F I T V K H R K Q Q V L E T V A G K R S Y R L S M K V K
A F P S P E V V W L K D G L P A T E K S A R Y L T R G Y S L I I K D V T E E D A
G N Y T I L L S I K Q S N V F K N L T A T L I V N V K P Q I Y E K A V S S F P D
P A L Y P L G S R Q I L T C T A Y G I P Q P T I K W F W H P C N H N H S E A R C
D F C S N N E E S F I L D A D S N M G N R I E S I T Q R M A I I E G K N K M A S
T L V V A D S R I S G I Y I C I A S N K V G T V G R N I S F Y I T D V P N G F H
V N L E K M P T E G E D L K L S C T V N K F L Y R D V T W I L L R T V N N R T M
H Y S I S K Q K M A I T K E H S I T L N L T I M N V S L Q D S G T Y A C R A R N
V Y T G E E I L Q K K E I T I R G E H C N K K A V F S R I S K F K S T R N D C T
T Q S N V K H

30

40

【0284】

このバリエーション (3) は、バリエーション1と比較して3'コード領域及び3'UTRが異なっている。コードされた可溶性タンパク質 (アイソフォーム3) は、短く特有のC末端を持ち、アイソフォーム1の膜貫通領域及び細胞質領域を欠く。

【0285】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム3 cDNA配列 (配列番号30)

A T C G A G G T C C G C G G G A G G C T C G G A G C G C G C C A G G C G G A C A
C T C C T C T C G G C T C C T C C C C G G C A G C G G C G G C G G C T C G G A G
C G G G C T C C G G G G C T C G G G T G C A G C G G C C A G C G G G C G C C T G

50

G C G G C G A G G A T T A C C C G G G G A A G T G G T T G T C T C C T G G C T G
G A G C C G C G A G A C G G G C G C T C A G G G C G C G G G G C C G G C G G C G
G C G A A C G A G A G G A C G G A C T C T G G C G G C C G G G T C G T T G G C C
G C G G G G A G C G C G G G C A C C G G G C G A G C A G G C C G C G T C G C G C
T C A C C A T G G T C A G C T A C T G G G A C A C C G G G G T C C T G C T G T G
C G C G C T G C T C A G C T G T C T G C T T C T C A C A G G A T C T A G T T C A
G G T T C A A A A T T A A A A G A T C C T G A A C T G A G T T T A A A A G G C A
C C C A G C A C A T C A T G C A A G C A G G C C A G A C A C T G C A T C T C C A
A T G C A G G G G G G A A G C A G C C C A T A A A T G G T C T T T G C C T G A A
A T G G T G A G T A A G G A A A G C G A A A G G C T G A G C A T A A C T A A A T
C T G C C T G T G G A A G A A A T G G C A A A C A A T T C T G C A G T A C T T T
A A C C T T G A A C A C A G C T C A A G C A A A C C A C A C T G G C T T C T A C
A G C T G C A A A T A T C T A G C T G T A C C T A C T T C A A A G A A G A A G G
A A A C A G A A T C T G C A A T C T A T A T A T T T A T T A G T G A T A C A G G
T A G A C C T T T C G T A G A G A T G T A C A G T G A A A T C C C C G A A A T T
A T A C A C A T G A C T G A A G G A A G G G A G C T C G T C A T T C C C T G C C
G G G T T A C G T C A C C T A A C A T C A C T G T T A C T T T A A A A A A G T T
T C C A C T T G A C A C T T T G A T C C C T G A T G G A A A A C G C A T A A T C
T G G G A C A G T A G A A A G G G C T T C A T C A T A T C A A A T G C A A C G T
A C A A A G A A A T A G G G C T T C T G A C C T G T G A A G C A A C A G T C A A
T G G G C A T T T G T A T A A G A C A A A C T A T C T C A C A C A T C G A C A A
A C C A A T A C A A T C A T A G A T G T C C A A A T A A G C A C A C C A C G C C
C A G T C A A A T T A C T T A G A G G C C A T A C T C T T G T C C T C A A T T G
T A C T G C T A C C A C T C C C T T G A A C A C G A G A G T T C A A A T G A C C
T G G A G T T A C C C T G A T G A A A A A A A T A A G A G A G C T T C C G T A A
G G C G A C G A A T T G A C C A A A G C A A T T C C C A T G C C A A C A T A T T
C T A C A G T G T T C T T A C T A T T G A C A A A A T G C A G A A C A A A G A C
A A A G G A C T T T A T A C T T G T C G T G T A A G G A G T G G A C C A T C A T
T C A A A T C T G T T A A C A C C T C A G T G C A T A T A T A T G A T A A A G C
A T T C A T C A C T G T G A A A C A T C G A A A A C A G C A G G T G C T T G A A
A C C G T A G C T G G C A A G C G G T C T T A C C G G C T C T C T A T G A A A G
T G A A G G C A T T T C C C T C G C C G G A A G T T G T A T G G T T A A A A G A
T G G G T T A C C T G C G A C T G A G A A A T C T G C T C G C T A T T T G A C T
C G T G G C T A C T C G T T A A T T A T C A A G G A C G T A A C T G A A G A G G
A T G C A G G G A A T T A T A C A A T C T T G C T G A G C A T A A A A C A G T C
A A A T G T G T T T A A A A A C C T C A C T G C C A C T C T A A T T G T C A A T
G T G A A A C C C C A G A T T T A C G A A A A G G C C G T G T C A T C G T T T C
C A G A C C C G G C T C T C T A C C C A C T G G G C A G C A G A C A A A T C C T
G A C T T G T A C C G C A T A T G G T A T C C C T C A A C C T A C A A T C A A G
T G G T T C T G G C A C C C C T G T A A C C A T A A T C A T T C C G A A G C A A
G G T G T G A C T T T T G T T C C A A T A A T G A A G A G T C C T T T A T C C T
G G A T G C T G A C A G C A A C A T G G G A A A C A G A A T T G A G A G C A T C
A C T C A G C G C A T G G C A A T A A T A G A A G G A A A G A A T A A G A T G G
C T A G C A C C T T G G T T G T G G C T G A C T C T A G A A T T T C T G G A A T
C T A C A T T T G C A T A G C T T C C A A T A A A G T T G G G A C T G T G G G A
A G A A A C A T A A G C T T T T A T A T C A C A G A T G T G C C A A A T G G G T
T T C A T G T T A A C T T G G A A A A A A T G C C G A C G G A A G G A G A G G A
C C T G A A A C T G T C T T G C A C A G T T A A C A A G T T C T T A T A C A G A
G A C G T T A C T T G G A T T T T A C T G C G G A C A G T T A A T A A C A G A A
C A A T G C A C T A C A G T A T T A G C A A G C A A A A A A T G G C C A T C A C

10

20

30

40

50

T A A G G A G C A C T C C A T C A C T C T T A A T C T T A C C A T C A T G A A T
 G T T T C C C T G C A A G A T T C A G G C A C C T A T G C C T G C A G A G C C A
 G G A A T G T A T A C A C A G G G G A A G A A A T C C T C C A G A A G A A A G A
 A A T T A C A A T C A G A G A T C A G G A A G C A C C A T A C C T C C T G C G A
 A A C C T C A G T G A T C A C A C A G T G G C C A T C A G C A G T T C C A C C A
 C T T T A G A C T G T C A T G C T A A T G G T G T C C C C G A G C C T C A G A T
 C A C T T G G T T T A A A A A C A A C C A C A A A A T A C A A C A A G A G C C T
 G A A C T G T A T A C A T C A A C G T C A C C A T C G T C A T C G T C A T C A T
 C A C C A T T G T C A T C A T C A T C A T C A T C G T C A T C A T C A T C A T C
 A T C A T A G C T A T C A T C A T T A T C A T C A T C A T C A T C A T C A T C A
 T C A T A G C T A C C A T T T A T T G A A A A C T A T T A T G T G T C A A C T T
 C A A A G A A C T T A T C C T T T A G T T G G A G A G C C A A G A C A A T C A T
 A A C A A T A A C A A A T G G C C G G G C A T G G T G G C T C A C G C C T G T A
 A T C C C A G C A C T T T G G G A G G C C A A G G C A G G T G G A T C A T T T G
 A G G T C A G G A G T T C A A G A C C A G C C T G A C C A A G A T G G T G A A A
 T G C T G T C T C T A T T A A A A A T A C A A A A T T A G C C A G G C A T G G T
 G G C T C A T G C C T G T A A T G C C A G C T A C T C G G G A G G C T G A G A C
 A G G A G A A T C A C T T G A A C C C A G G A G G C A G A G G T T G C A G G G A
 G C C G A G A T C G T G T A C T G C A C T C C A G C C T G G G C A A C A A G A G
 C G A A A C T C C G T C T C A A A A A A C A A A T A A A T A A A T A A A T A A A
 T A A A C A G A C A A A A T T C A C T T T T A T T C T A T T A A A C T T A A C
 A T A C A T G C A T T A A

【0286】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム3 cDNA配列（配列番号31）

M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S S G S K L K D P E L S L K G T Q
 H I M Q A G Q T L H L Q C R G E A A H K W S L P E M V S K E S E R L S I T K S A
 C G R N G K Q F C S T L T L N T A Q A N H T G F Y S C K Y L A V P T S K K K E T
 E S A I Y I F I S D T G R P F V E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V
 T S 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 Q I S T P R P V
 K L L R G H T L V L N C T A T T P L N T R V Q M T W S Y P D E K N K R A S V R R
 R I D Q S N S H A N I F Y S V L T I D K M Q N K D K G L Y T C R V R S G P S F K
 S V N T S V H I Y D K A F I T V K H R K Q Q V L E T V A G K R S Y R L S M K V K
 A F P S P E V V W L K D G L P A T E K S A R Y L T R G Y S L I I K D V T E E D A
 G N Y T I L L S I K Q S N V F K N L T A T L I V N V K P Q I Y E K A V S S F P D
 P A L Y P L G S R Q I L T C T A Y G I P Q P T I K W F W H P C N H N H S E A R C
 D F C S N N E E S F I L D A D S N M G N R I E S I T Q R M A I I E G K N K M A S
 T L V V A D S R I S G I Y I C I A S N K V G T V G R N I S F Y I T D V P N G F H
 V N L E K M P T E G E D L K L S C T V N K F L Y R D V T W I L L R T V N N R T M
 H Y S I S K Q K M A I T K E H S I T L N L T I M N V S L Q D S G T Y A C R A R N
 V Y T G E E I L Q K K E I T I R D Q E A P Y L L R N L S D H T V A I S S S T T L
 D C H A N G V P E P Q I T W F K N N H K I Q Q E P E L Y T S T S P S S S S S P
 L S S S S S S S S S S S S S

【0287】

このバリエーション（4）は、バリエーション1と比較して3'コード領域及び3'UTRが異なっている。コードされた可溶性タンパク質（アイソフォーム4）は、短く特有のC末端を持ち、アイソフォーム1の膜貫通領域及び細胞質領域を欠く。

【0288】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム4 cDNA配列（配列番号32）

A T C G A G G T C C G C G G G A G G C T C G G A G C G C G C C A G G C G G A C A

CTCCTCTCGGCTCCTCCCCCGGCAGCGGCGGCGGCTCGGAG
CGGGCTCCGGGGGCTCGGGGTGCAGCGGCCAGCGGGCGCCTG
GCGGCGAGGATTACCCGGGGGAAGTGGTTGTCTCCTGGCTG
GAGCCGCGAGACGGGCGCTCAGGGCGCGGGGGCCGGCGGGCG
GCGAACGAGAGGACGGGACTCTGGCGGCGGCGGGTCTGTTGGCC
GCGGGGAGCGCGGGGCACCGGGCGAGCAGGCCGCGTCTGCGCG
TCACCATGGTTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCTCTGCTGTG
CGCGCTGCTCAGCTGTCTGTCTTCTCACAGGATCTAGTTTCA
GGTTCAAATAAAGATCCTGAACCTGAGTTTAAAGGGCA
CCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCA
ATGCAGGGGGGAAGCAGCCCATAAATGGTCTTTGCTGAA
ATGGTGAGTAAGGAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAAT
CTGCCTGTGGAAGAAATGGCAAACAATTCTGCAGTACTTT
AACCTTGAAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTTCTAC
AGCTGCAAATATCTAGCTGTACCTACTTTCAAAGAAAGAGG
AAACAGAAATCTGCAATCTATATATTTATTAGTGATACAGG
TAGACCTTTCTGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATT
ATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAATCCCTGCC
GGGTTACGTCACTTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTT
TCCACTTGACACTTTTGATCCCTGATGGAAACGCAATAATC
TGGGACAGTAGAAAGGGCTTTCATCATATCAAATGCAACGT
ACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAA
TGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAA
ACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAAGCACACCACGCC
CAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCTCAATTG
TACTGCTACCACTCCCTTGAAACACGAGAGTTCAAATGACC
TGGAGTTACCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCGTAA
GGCGACGAATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAAACATATT
CTACAGTGTTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAAACAAAGAC
AAAGGACTTTATACTTGTCTGTGTAAGGAGTGGAACCATCAT
TCAAATCTGTTAAACACCTCAGTGCAATATATATGATAAAGC
ATTCATCACTGTGAACATCGAAAAACAGCAGGTGCTTGAA
ACCGTAGCTGGCAAGCGGTCTTACC GGCTCTCTATGAAAG
TGAAGGCATTTCCCTCGCCGGGAAGTTGTATGGTTAAAAAG
TGGGTTACCTGCGACTGAGAAATCTGCTCGCTATTTGACT
CGTGCGCTACTCGTTAATTATCAAGGACGTAACCTGAAGAGG
ATGCAGGGGAATTATACAATCTTGCTGAGCATAAACAGTC
AAATGTGTTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAAT
GTGAACCCAGATTTACGAAAGGGCCGTGTCTATCGTTTCT
CAGACCCGGCTCTCTACCCACTGGGGCAGCAGACAAATCCT
GACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAG
TGGTTCTGGCACCCCTGTAAACCATAAATCATTC CGAAGCAA
GGTGTGACTTTTGTTC CAATAATGAAGAGTCTTTATCCT
GGATGCTGACAGCAACATGGGGAACAGAAATTGAGAGCATC
ACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAGAATAAGCTTC
CACCAAGCTAACAGTTCTTTTCATGTTGCCACCTACAAGCTT
CTCTTCCAACCTACTTCCATTTCTCTTCCGTGA

【0289】

例示的なヒトVEGFR-1アイソフォーム4 cDNA配列（配列番号33）

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDP ELSLKGTQ

HIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSA
CGRNGKQFCSTLTNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKE
ESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTTEGRELVIPCRV
TSPNITVTLLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYK
EIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPRPV
KLLRGHTLVNLCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRR
RIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFK
SVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKV
AFPSPEVVWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLLIKDVTEEDA
GNYTILLSIKQSNVFKNLTATLIVNVKPKQIYEKAVSSFPD
PALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNHNHSEARC
DFCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRMALIEGKNKLPP
ANSSFMLPPTSFSFSSNYFHFLP

【0290】

ヒト染色体位置4q12に見出されるVEGFR-2遺伝子は、血管内皮増殖因子受容体ファミリー（VEGFR）のメンバーを含む30のエクソンをコードし、VEGFR-Aの受容体をコードする2つの遺伝子のうちの1つである。この受容体は、キナーゼ挿入ドメイン受容体として知られ、III型受容体型チロシンキナーゼである。これは、VEGFR-A誘導性内皮増殖、生存、移動、管の形態形成、及び出芽の主要メディエーターとして機能する。この受容体のシグナル伝達及びトラフィッキングは、RabGTPase、P2Yプリンヌクレオチド受容体、インテグリン α V β 3、T細胞タンパク質チロシンホスファターゼなどを含む、複数の因子によって調節されている。

【0291】

例示的なヒトVEGFR-2 cDNA配列（配列番号34）

ACTGAGTCCCGGGACCCCGGGAGAGCGGTC AATGTGTGGT
CGCTGCGTTTCTCTCTGCGCTGCGCCGGGCATCACTTGCGCG
CCGCAGAAAGTCCGTCTGGCAGCCTGGATATCCTCTCCTA
CCGGCACCCGCGACGCCCCCTGCAGCCGCGGGTCGGCGGCC
GGGCTCCCTAGCCCTGTGCGCTCAACTGTCTCTGCGCTGCG
GGGTGCGCGAGTTCCACCTCCGCGCGCTCTCTCTAGAC
AGGCGCTGGGAGAAAGAACCGGCTCCCGAGTTCTGGGCA
TTCGCGCCGGCTCGAGGTGCGAGGATGCGAGAGCAAGGTGCTG
CTGGCCGTCGCCCCCTGTGGCTCTGCGGTGGAGACCCGGGGCCG
CCTCTGTGGGTTTTCCTAGTGTCTCTTGTATCTGCCCAG
GCTCAGCATACAAAAAGACATACTTACAATTAAAGGCTAAT
ACAACCTCTTCAAAATTACTTTGCAGGGGGACAGAGGGGACTTGG
ACTGGCTTTTGGCCCAATAATCAGAGTGGCAGTGAGCAAAG
GGTGGAGGTGACTGAGTGCAGCGATGGCCCTCTTCTGTAAAG
ACAACCTACAATTCCAAAAAGTGATCGGGAATGACACTGGAG
CCTACAAGTGCTTCTACCGGGGAAACTGACTTGGCCCTCGGT
CATTTATGTCTATGTTCAAGATTACAGATCTCCATTTATT
GCTTCTGTTAGTGACCAACATGGAGTCTGTGTACATTACTG
AGAAACAAAAACA AAACTGTGGTGATTC CATGTCTCGGGT
CATTTCAAAATCTCAACGTGTCACTTTGTGCAAGATACCCA
GAAAAAGAGATTTGTTCCTGATGGTAACAGAAATTTCTCTGGG
ACAGCAAGAAAGGGCTTTACTATTCCAGCTACATGATCAG
CTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAAGCAAAAAATTAAATGAT
GAAAGTTACCAAGTCTATTATGTACATAGTTGTCTGTGTAG
GGTATAGGATTTATGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATGG
AATTGAACCTATCTGTGTGGAGAAAAAGCTTGTCTTAAATGT

ACAGCAAGAACTGAACCTAAATGTGGGGATTGACTTCAACT
GGGAATACCCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAAGAAACTTGT
AAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAG
AAATTTTTTGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAACCCCGGA
GTGACCAAGGATTGTACACCTGTGTCAGCATCCAGTGGGCT
GATGACCAAGAAAGAACAGCACATTTGTTCAGGGTCCATGAA
AAACCTTTTTGTTGCTTTTTGGAAGTGGCATGGAATCTCTGG
TGGAAGCCACGGGTGGGGGAGCGTGTTCAGAAATCCCTGCGAA
GTACCTTGGTTACCCACCCCCAGAAATAAAATGGGTATAAA
AATGGAATACCCCTTGTAGTCCAATCACACAATTAAGCGGG
GGCATGTACTGACGATTATGGAAGTGAGTGAAAGAGACAC
AGGA AATTACACTGTCTATCCTTACCAATCCCATTTTCAAAG
GAGAAAGCAGAGCCATGTGGTCTCTCTGGTTGTGTATGTCC
CACCC CAGATTGGTGAGAAATCTCTAATCTCTCTCTGTGGA
TTCCTAC CAGTACGGGCACCACTCAAACGCTGACATGTACG
GTCTATGCCATTCCCTCCCCCGCATCACATCCACTGGTATT
GGCAGTTTGGAGGAAGAGTGCGCCAACGAGCC CAGCCAAGC
TGTCTCAGTGACAAACCCATACCCCTTGTGAAGAAATGGAGA
AGTGTGGAGGACTTCCAGGGAGGGA AATAAAATTTGAAGTTA
ATAAAAATCAATTTGCTCTAATTTGAAGGAAAAAACA AAAAC
TGTAAGTACCCCTTGTATATCCAAGCGGCA AATGTGTTCAGCT
TTGTACAAATGTGAAGCGGTCAACA AAGTCTGGGAGAGGAG
AGAGGGTGATCTCCTTCCACGTGAC CAGGGGGTCCCTGAAAT
TACTTTTGCAACCTGACATGTCAGCCCACTGAGCAGGAGAGC
GTGTCTTTGTGGTGCACTGTCAGACAGATCTACGTTTGTAGA
ACCTCACATGGTACAAGCTTGGGCCCACAGCCCTCTGCCAAT
CCATGTGGGAGAGGTTGCCCACACCTGTTTTGCAAGAACTTG
GATACTCTTTGGAAATTTGAATGCCACCATGTTCCTCTAATA
GCACAAATGACATTTTGTATCATGGAGCTTAAAGAAATGCATC
CTTG CAGGACCAAGGAGAGCTATGTCTGCTTGTCTCAAGAC
AGGAAGACCAAGAAAGACATTTGCGTGGT CAGGGCAGCTCA
CAGTCCTAGAGCGTGTGGCACCCACGATCACAGGAAACCT
GGAGAAATCAGACGACAAGTATTTGGGGAAAGCATCGAAGTC
TCATG CACGGCATCTGGGAATCCCCCTCCACAGATCATGT
GGTTTAAAGATAATGAGACCCCTTGTAGAAAGACTCAGGGCAT
TGTATTGAAGGATGGGAACCGGAACCTCACTATCCGCGAGA
GTGAGGAAGGAGGACGAAGGCCTCTACACCTGCCAGGGCAT
GCAGTGTTCCTTGGCTGTGCAAAAGTGGAGGCA TTTTTCAT
AATAGAAAGGTGCC CAGGAAAAAGACGAACCTTGGAAATCAT
ATTCTAGTAGGCACGGCGGGTGATTGCCATGTTCCTTCTGGC
TACTTCTTGTCTATCATCTACGGGACCGTTAAGCGGGGCCAA
TGGAGGGGAACCTGAAGACAGGCTACTTGTCCATCGTCTATG
GATCCAGATGAACCTCCCATTTGGATGAACATTTGTGAACGAC
TGCCTTATGATGCCAGCA AATGGGAATTTCC CAGAGACCG
GCTGAAGCTAGGTAAGCCTCTTGGCCGTTGGTGCCCTTTGGC
CAAGTGATTGAAGCAGATGCCCTTTGGAATTTGACAAAGACAG
CAACTTGCAGGACAGTAGCAGTCAA AATGTTGAAAGAAAGG
AGCAACACACAGTGAGCATCGAGCTCTCATGTCTGAACCTC
AAGATCCTCATTCATATTGGTCCACCATCTCAATGTGGTCA
ACCTTCTAGGTGCCCTGTACCAAGCCAGGAGGGGCCACTCAT

10

20

30

40

50

GGTGATTGTGGAATTCTGCAAAATTTGGAAACCTGTCCACT
TACCTGAGGAGCAAGAGAAATGAATTTGTCCCCCTACAAGA
CCAAAGGGGCACGATTCCGTCAAGGGAAAGACTACGTTGG
AGCAATCCCTGTGGATCTGAAACGGCGCTTTGGACAGCATC
ACCAGTAGCCAGAGCTCAGCCAGCTCTGGATTTTGTGGAGG
AGAAGTCCCTCAGTGATGTAGAAGAAGAGGGAAGCTCCTGA
AGATCTGTATAAGGACTTCTCTGACCTTTGGAGCATCTCATC
TGTTACAGCTTCCAAGTGGCTAAGGGGCATGGAGTTCTTGG
CATCGCGAAAGTGATCCACAGGGACCTGGCGGGCACGAAA
TATCCTCTTATCGGAGAAAGAACGTGGTTAAAAATCTGTGAC
TTTGGCTTTGGCCCGGGATATTTATAAAGATCCAGATTATG
TCAGAAAAGGAGATGCTCGCCTCCCTTTGAAATGGATGGC
CCCAGAAACAATTTTTTGACAGAGTGTACACAATCCAGAGT
GACGTCTGGTCTTTTGGTGTTTTGTCTGTGGGAAATATTTT
CCTTAGGTGCTTCTCCATATCCTGGGGTAAGAGATTGATGA
AGAATTTTGTAGGCGGATTGAAAGAAGGAACCTAGAATGAGG
GCCCTGATTATACTACACCAGAAATGTACCAGACCATGC
TGGACTGCTGGCACGGGGAGCCAGTCAGAGACCCACGTT
TTCAGAGTTGGTGGAAACATTTGGGAAATCTCTTTGCAAGCT
AATGCTCAGCAGGATGGCAAAGACTACATTGTTCTTCCGA
TATCAGAGACTTTGAGCATGGAAGAGGATTCTGGACTCTC
TCTGCCTACCTCACCTGTTTCTCTGTATGGAGGAGGAGGAA
GTATGTGACCCCAAATTTCCATTATGACAAACACAGCAGGAA
TCAGTCAGTATCTGCAGAACAGTAAGCGAAAGAGCCGGCC
TGTGAGTGTA AAAAACATTTGAAGATATCCCGTTAGAAAGAA
CCAGAAAGTA AAAAGTAATCCCAGATGACAAACCAGACGGACA
GTGGTATGGTTCTTTGCCTCAGAAAGAGCTGAAAACTTTGGA
AGACAGAAACCAAATTTATCTCCATCTTTTGGTGGAAATGGTG
CCCAGCAAAGAGCAGGGAGTCTGTGGCATCTGAAGGCTCAA
ACCAGACAAAGCGGCTACCAGTCCGGGATATCACTCCGATGA
CACAGACACCACCGTGTA CTCCAGTGAGGAAAGCAGAACTT
TTAAAGCTGATAGAGATTGGAGTGCAAACCGGTAGCACAG
CCCAGATTCTCCAGCCTGACTCGGGGGACCACTGAGCTC
TCCTCCTGTTTAAAAAGGAAGCATCCACACCCCAACTCCT
GGACATCACATGAGAGGTGCTGCTCAGATTTTCAAGTGTT
GTTCTTTTCCACCAGCAGGAAAGTAGCCGCAATTTGATTTTCA
TTTCGACAAACAGAAAAAGGACCTCGGACTGCAGGGAGCCA
GTCCTTCTAGGCATATCCTGGAAGAGGCTTGTGACCCAAAGA
ATGTGTCTGTGTCTTCTCCCAGTGTTTGACCTGATCCTCTT
TTTCATTCAATTTAAAAAGCATTTATCATGCCCCCTGCTGC
GGGTCTCACCATGGGTTTGAACAAGACGTTCAAGAAAT
GGCCCCATCCTCAAAGAAGTAGCAGTACCTGGGGAGCTGA
CACTTCTGTAAAACTAGAAGATAAACCAAGGCAATGTAAGT
GTTTCGAGGTGTTGAAGATGGGAAGGATTTGCAAGGGCTGAG
TCTATCCAAGAGGCTTTGTTTAGGACGTGGGTCCCAAGCC
AAGCCTTAAGTGTTGGAATTCTGGATTGATAGAAAGGAAGAC
TAACGTTACCTTGTCTTTGGAGAGTACTGGAGCCTGCAAAAT
GCATTGTGTTTGTCTCTGGTGGAGGTGGGCGATGGGGTCTGT
TCTGAAATGTAAAGGGTTTCAGACGGGGTTTCTGGTTTTAG
AAGGTTGCGTGTTCTTCGAGTTGGGCTAAAGTAGAGTTTCG

10

20

30

40

50

TTGTGCTGTTTCTGACTCCTAATGAGAGTTTCCTTCCAGAC
CGTTACGTGTCCTGGCCAAGCCCCAGGAAGGAAATGAT
G

CAGCTCTGGCTCCTTGTCTCCCCAGGCTGATCCTTTATTCA
GAATACCACAAAGAAAGGACATTCAGCTCAAGGCTCCCTG
CCGTGTTGAAGAGTTCTGACTGCACAAACCAGCTTCTGGT
TTCTTCTGGAATGAATACCCTCATATCTGTCTGATGTGA
TATGTCTGAGACTGAATGCGGGAGGTTCAATGTGAAGCTG
TGTGTGGTGTCAAAGTTTTCAGGAAGGATTTTACCCTTTTG
TTCTTCCCCCTGTCCCCAACCCACTCTCACCCCGCAACCC
ATCAGTATTTTAGTTATTTGGGCCTCTACTCCAGTAAACCT
GATTGGGTTTGTTCACTCTCTGAATGATTATTAGCCAGAC
TTCAAAATTTATTTTATAGCCCAAATTTATAACATCTATTGT
ATTATTTAGACTTTTAAACATATAGAGCTATTTCTACTGAT
TTTTTGCCCTTGTCTGTCTTTTTCAAAAAAGAAAAATG
TGTTTTTTTGTTTGGTACCATAGTGTTGAAATGCTGGGGAACA
ATGACTATAAGACATGCTATGGCACATATATTTATAGTCT
GTTTATGTAGAAACAAATGTAAATATATTAAAGCCTTATAT
ATAATGAACCTTTGTACTATTTCACATTTTGTATCAGTATTA
TGTAGCATAACAAAGGTCATAATGCTTTTCAGCAATTGATG
TCATTTTATTAAAGAACATTGAAAAAACTTGAAAAA
AAAAAA

10

20

30

40

50

【0292】

例示的なヒトVEGFR-2前駆体アミノ酸配列（配列番号35）

MQSKVLLAVALLWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDI
LTIKANTTLQITCRGQQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECS
DGLFCKTLTIPKVI GNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQD
YRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKT VVIPCLGSISN LNVS
LCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGF TIPS YMISYAGMVFC
EAKINDESYQSIMYIVVVVG YRIYDVVLS PSHGIELSVGE
KLVLNCTARTELVNGIDFNWEY PSSKHQHKKLVNRDLKTQ
SGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNST
FVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYP PP
EIKWYKNGIPL ESNHTIKAGHVLT IMEVSERDTGN YTVIL
TNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIG EKSLISP VDSYQYGT
QTLTCTVYAI PPHHIHWYWQLEEE CANEPSQAVSV TNPY
PCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKT VSTLV IQ
AANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGP EITLQ PDMQ
PTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLG PQLPIHVGE LPT
PVCKNLDTLWKL NATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDY
VCLAQDRKTKKRHC VVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSI
GESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNR
NLTIRRVRKED EGLYTCQACSVLGC AKVEAFFIIEGAQEK
TNLEIIILVGTAVIAMFFWL LVIILRTVKRANGGELKTG
YLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKPL
GRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHR
ALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCK
FGNLSTYLRSKRNEFVPYKTKGARFRQGKDYVGAIPVDLK

10

10

10

10

10

20

30

40

50

CCAGATACATGAGAAAGGAGGCGCTCCTCCCCAGCATCTAC
TCGCGTCACAGCCGCCAGGCGCTCACCTGCAACGGCCCTACG
GGGTGCCCTGCTCTCAGCATCCAGTGGCACTGGCGGCC
CTGGACACCTGCAAGATGTTTGCCCAAGCGTAGTCTCCGG
CGGCGGCGAGCAGCAAGACCTCATGCCCACAGTGGCGTGACT
GGAGGGCGGTGACCACGCGAGGATGCCGTGAACCCCATCGA
GAGCCTGGACACCTGGACCGAGTTTGTTGGAGGGGAAAGAAAT
AAGACTGTGAGCAAGCTGGTGATCCAGAATGCCAACGTGT
CTGCCATGTACAAGTGTTGGTCTCCAACAAGGTGGGGCCA
GGATGAGCGGCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCC
GACGGCTTTCACCATCGAATCCAAGCCATCCGAGGGAGCTAC
TAGAGGGGCCAGCCGGTGCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAG
CTACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACCGCCCTCAACCTG
TCCACGCTGCAACGATGCGCACGGGGAACCCCGCTTCTGCTCG
ACTGCAAGAAACGTGCATCTGTTTCGCCACCCCTCTGGCCGC
CAGCCTGGAGGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACG
CTCAGCCTGAGTATCCCCCGCGTCCGCCCGAGCACGAGG
GCCACTATGTGTGCGAAGTGCAAGACCGGCGCAGCCATGA
CAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTGGGTGCAGGGCCCTG
GAAGCCCCCTCGGCTCACGCGAGAACTTGACCGACCTCCTGG
TGAACGTGAGCGACTCGCTGGAGATGCAGTGCTTGGTGGC
CGGAGCGCACGCGCCAGCATCGTGTTGGTACAAAGACGAG
AGGCTGCTGGAGGAAAGTCTGGAGTGCAGCTTGGCGGGACT
CCAACCAGAAAGCTGAGCATCCAGCGCGTGCGCGAGGGAGGA
TGCGGGACGCTATCTGTGCGAGCGTGTTGCAACGCCAAGGGC
TGCCTCAACTCCTCCGCCAGCGTGCGCGGTGGAAAGGCTCCG
AGGATAAGGGCAGCATGGAGATCGTGATCCTTGTCTGGGTAC
CGGCGTCATCGCTGTCTTCTTCTGGGTCTCTCTCTCTCTC
ATCTTCTGTAAACATGAGGGAGGCGCGGCCACGCGAGACATCA
AGACGGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGGAGGT
GCCTCTGGAGGAGCAATGCGAATACCTGTCTTACGATGCC
AGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGCTGCACCTGGGGGA
GAGTGCTCGGCTACGGCGGCCCTTCGGGGAAGGTGGTGGAAAGC
CTCCGCTTTTCGGCATCCACAAGGGGCAGCAGCTGTGTACACC
GTGGCCGTGAAAATGCTGAAAGAGGGCGGCCACGGGCCAGCG
AGCACCGCGCGCGCTGATGTCGGAGCTCAAGATCCTCATTTCA
CATCGGCCAACCCACCTCAACGTGGTCAACCTCTCTCGGGGGCG
TGCACCAAGCCGCGAGGGCCCCCTCATGGTGATCGTGAGGT
TCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTTCTCTGCGCGCCAA
GCGGGACGCGCTTTCAGCCCCCTGCGCGGAGAGAGTCTCCCGAG
CAGCGCGGACGCTTCCGCGGCCATGGTGAGGCTCGCCAGGC
TGGATCGGAGGCGGGCGGGGAGCAGCGACAGGGTCTCTCTT
CGCGCGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGGCGGGCT
TCTCCAGACCAAGAAAGCTGAGGACCTGTGGCTGAGCCCGC
TGACCATGGAAGATCTTGTCTGTCTACAGCTTCCAGGTGGC
CAGAGGGATGGAGTTCTCTGGCTTCCCGAAAGTGCAATCCAC
AGAGACCTGGCTGCTCGGGAACATTTCTGCTGTCTGGGAAAGCG
ACGTGGTGAAAGATCTGTGACTTTGGCCCTTGGCCCGGGACAT
CTACAAGACCCCGACTACGTCCGCAAGGGGCAGTGCCCGG
CTGCCCTGAAAGTGGAATGGCCCCCTGAAAGCATCTTCTGACA

10

20

30

40

50

A G G T G T A C A C C A C G C A G A G T G A C G T G T G G T C C T T T G G G G T
G C T T C T C T G G G A G A T C T T C T C T C T G G G G G C C T C C C C G T A C
C C T G G G G T G C A G A T C A A T G A G G A G T T C T G C C A G C G G C T G A
G A G A C G G C A C A A G G A T G A G G G C C C C G G A G C T G G C C A C T C C
C G C C A T A C G C C G C A T C A T G C T G A A C T G C T G G T C C G G A G A C
C C C A A G G C G A G A C C T G C A T T C T C G G A G C T G G T G G A G A T C C
T G G G G G A C C T G C T C C A G G G C A G G G G C C T G C A A G A G G A A G A
G G A G G T C T G C A T G G C C C G C G C A G C T C T C A G A G C T C A G A A
G A G G G C A G C T T C T C G C A G G T G T C C A C C A T G G C C C T A C A C A
T C G C C C A G G C T G A C G C T G A G G A C A G C C C G C C A A G C C T G C A
G C G C C A C A G C C T G G C C G C C A G G T A T T A C A A C T G G G T G T C C
T T T C C C G G G T G C C T G G C C A G A G G G G C T G A G A C C C G T G G T T
C C T C C A G G A T G A A G A C A T T T G A G G A A T T C C C C A T G A C C C C
A A C G A C C T A C A A A G G C T C T G T G G A C A A C C A G A C A G A C A G T
G G G A T G G T G C T G G C C T C G G A G G A G T T T G A G C A G A T A G A G A
G C A G G C A T A G A C A A G A A A G C G G C T T C A G C T G T A A A G G A C C
T G G C C A G A A T G T G G C T G T G A C C A G G G C A C A C C C T G A C T C C
C A A G G G A G G C G G C G G C G G C C T G A G C G G G G G G C C C G A G G A G
G C C A G G T G T T T T A C A A C A G C G A G T A T G G G G A G C T G T C G G A
G C C A A G C G A G G A G G A C C A C T G C T C C C C G T C T G C C C G C G T G
A C T T T C T T C A C A G A C A A C A G C T A C T A A G C A G C A T C G G A C A
A G A C C C C C A G C A C T T G G G G G T T C A G G C C C G G C A G G G C G G G
C A G A G G G C T G G A G G C C C A G G C T G G G A A C T C A T C T G G T T G A
A C T C T G G T G G C A C A G G A G T G T C C T C T T C C C T C T C T G C A G A
C T T C C C A G C T A G G A A G A G C A G G A C T C C A G G C C C A A G G C T C
C C G G A A T T C C G T C A C C A C G A C T G G C C A G G G C C A C G C T C C A
G C T G C C C C G G C C C C T C C C C C T G A G A T T C A G A T G T C A T T T A
G T T C A G C A T C C G C A G G T G C T G G T C C C G G G G C C A G C A C T T C
C A T G G G A A T G T C T C T T T G G C G A C C T C C T T T C A T C A C A C T G
G G T G G T G G C C T G G T C C C T G T T T T C C C A C G A G G A A T C T G T G
G G T C T G G G A G T C A C A C A G T G T T G G A G G T T A A G G C A T A C G A
G A G C A G A G G T C T C C C A A A C G C C C T T T C C T C C T C A G G C A C A
C A G C T A C T C T C C C C A C G A G G G C T G G C T G G C C T C A C C C A C C
C C T G C A C A G T T G A A G G G A G G G G C T G T G T T T C C A T C T C A A A
G A A G G C A T T T T G C A G G G T C C T C T T C T G G G C C T G A C C A A A C A
G C C A A C T A G C C C C T G G G G T G G C C A C C A G T A T G A C A G T A T T
A T A C G C T G G C A A C A C A G A G G C A G C C C G C A C A C C T G C G C C T
G G G T G T T G A G A G C C A T C C T G C A A G T C T T T T T C A A C A G A A C
T T C A C A G A C T G T T A G A G C T G C T G A G A A G A A T T T G C T T T C C
G A A T T C A G C C T G G A A G G C G C C C A G G G A C A G C T G T A C T G A G
T C T A G A T G A C T C T G A C C C C C G C C C C A G G T C A A G G C C A G C A
G A G C A G T C A G T G C C T C T G G A G A A G G C C C T T G C T C T C C C A C
C T G G C C C A G A C T C C G A G G A G C C T G G G T C T G G A G C T G C C G G
T C T G G T T C T T C C C T T T A G A G C C C G G A T C T G C C A C C T G C G G
C C C C T C C C A A G C C G T G A A C C A G C T C A T G A G A G A T G A A C A C
T

G T G G G A T C C A C T C A G G A A G G C T C G G G G C T G G C A C A A A G G A
C C A C C C A G C A T T G C C C T G T G C C A C C C A G C A C T C A G T G G A C

ATTCTGGGGACCTGCTTCAGCCTTTTTCCTGCCCTGTGCC
TGACATCAGCACCCCTGGCTGGTTCAGAAATGCCCGCCCTCCCA
GAGGAGCAGCCGAGAGATCCCCCTGAAGGCTGGAGGCATTTC
TGCTCAGGACCCCTATCCCAGCTCACAGTGCCCAACCATC
TCACCAGGAGAAAGAGGCCACATCCCCACGTTAGGACCACG
GAGACTGACCACCACCCTGACCCCCCAAACCCACGCACCA
GACGCTTGCAAGGACAGGCGCGCGCAGCGGGCAGGGGGCTT
GCCCGGCCGACCCTCCCCCTCCCCACCTCCCCCACTGCGCG
TTACTCCAGGATATGCCGAGTGCACGTATAAGGTTCATCTT
CGTCGTCGCCCGTGGACCTCCCCCTTCTCTCTGCACGTCTGTC
CAACGTGGGACTGGCGTGTTCAGGCTTCCCTGGGGAGGATCT
GGAGGTTTGTCTCTGTCAGAGAACCCAGCCTGGCTCCTGGCG
CGCACCTCTGCTCCCTTCTCTCTCACTACCCACCCACGCAT
GTACCGGGAAAAAAACTACTATGCCCTTCTAGACCATGT
CTGAGAAAAGATCGAAAAATATTTAAACAAGAGATAATAATA
AATCTGATGCCGGTCTTTGTGTGTGTGTGCGGA

10

20

30

40

50

【0295】

例示的なヒトVEGFR-3アイソフォーム1前駆体アミノ酸配列（配列番号37）

MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTPLNITEESHV
IDTGDLSLSISCRGQHPLIEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGV
VRDCEGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSYVCYKYIKARI
EGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDAMWVPCLV
SIPGLNVTLSRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHD
ALYLQCETTWGDQDFLSNPFVLVHITGNELYDIQLLPRKSL
ELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVP
ERRSQQTHTELS SILTIHNVSQHDLSYVCKANNNGIQRFR
ESTEVIVHENPFISVEWLKGPILEATAGDELVKLPVKLAA
YPPPEFQWKDGKALSGRHSPHALVLKEVTEASTGTYTTLA
LWNSAAGLRRNISLELVNVNPPQIHEKEASSPSIYSRHSR
QALTCTAYGVPLPLS IQWHWRPWT PCKMFAQRS LRRRQQQ
DLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKT VSK
LVIQNANVSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTI
ESKPS EELLE GQPVL LSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHD
AHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVA PGARHATLSLSI
PRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRL
TQNLTDLLVNVSDSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEE
KSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSS
ASVAVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNM
RRPAHADIKTGYLSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWEF
PRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKM
LKEGATASEHRA LMSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTKPKQ
GPLMVIVEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSP EQRGRF
RAMVELARLDRRRPGSSDRVL FARFSKTEGGARRASPDQE
AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKC IHRDLAA
RNILLSESDVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGSARLP LKW
MAPESI FDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVQI
NEEF CQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGDPKARP
AFSELVEILGDL LQGRGLQEEEEVCMA PRSSSQSSSEEGSFS
QVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNWVSFP GCL
ARGAETRGS SRMKT FEEFPMTPTTTYKGSVDNQTD SGMVLA

S E E F E Q I E S R H R Q E S G F S C K G P G Q N V A V T R A H P D S Q G R R R
R P E R G A R G G Q V F Y N S E Y G E L S E P S E E D H C S P S A R V T F F T D
N S Y

【0296】

このバリエーション（2）は、バリエーション1と比較して、選択的3'末端エクソンを含む。
その結果、アイソフォーム（2）はアイソフォーム1と比較してC末端が短くなっている。

【0297】

例示的なヒトVEGFR-3アイソフォーム2 cDNA配列（配列番号38）

A C T T T C A G C C C C G A G C C G C G G C C G C T C G G G T C G G A C C C A C
G C G C A G C G G C C G G A G A T G C A G C G G G G C G C C G C G C T G T G C C
T G C G A C T G T G G C T C T G C C T G G G A C T C C T G G A C G G C C T G G T
G A G T G G C T A C T C C A T G A C C C C C C G A C C T T G A A C A T C A C G
G A G G A G T C A C A C G T C A T C G A C A C C G G T G A C A G C C T G T C C A
T C T C C T G C A G G G G A C A G C A C C C C C T C G A G T G G G C T T G G C C
A G G A G C T C A G G A G G C G C C A G C C A C C G G A G A C A A G G A C A G C
G A G G A C A C G G G G G T G G T G C G A G A C T G C G A G G G C A C A G A C G
C C A G G C C C T A C T G C A A G G T G T T G C T G C T G C A C G A G G T A C A
T G C C A A C G A C A C A G G C A G C T A C G T C T G C T A C T A C A A G T A C
A T C A A G G C A C G C A T C G A G G G C A C C A C G G C C G C C A G C T C C T
A C G T G T T C G T G A G A G A C T T T G A G C A G C C A T T C A T C A A C A A
G C C T G A C A C G C T C T T G G T C A A C A G G A A G G A C G C C A T G T G G
G T G C C C T G T C T G G T G T C C A T C C C C G G C C T C A A T G T C A C G C
T G C G C T C G C A A A G C T C G G T G C T G T G G C C A G A C G G G C A G G A
G G T G G T G T G G G A T G A C C G G C G G G G C A T G C T C G T G T C C A C G
C C A C T G C T G C A C G A T G C C C T G T A C C T G C A G T G C G A G A C C A
C C T G G G G A G A C C A G G A C T T C C T T T C C A A C C C C T T C C T G G T
G C A C A T C A C A G G C A A C G A G C T C T A T G A C A T C C A G C T G T T G
C C C A G G A A G T C G C T G G A G C T G C T G G T A G G G G A G A A G C T G G
T C C T G A A C T G C A C C G T G T G G G C T G A G T T T A A C T C A G G T G T
C A C C T T T G A C T G G G A C T A C C C A G G G A A G C A G G C A G A G C G G
G G T A A G T G G G T G C C C G A G C G A C G C T C C C A G C A G A C C C A C A
C A G A A C T C T C C A G C A T C C T G A C C A T C C A C A A C G T C A G C C A
G C A C G A C C T G G G C T C G T A T G T G T G C A A G G C C A A C A A C G G C
A T C C A G C G A T T T C G G G A G A G C A C C G A G G T C A T T G T G C A T G
A A A A T C C C T T C A T C A G C G T C G A G T G G C T C A A A G G A C C C A T
C C T G G A G G C C A C G G C A G G A G A C G A G C T G G T G A A G C T G C C C
G T G A A G C T G G C A G C G T A C C C C C G C C C G A G T T C C A G T G G T
A C A A G G A T G G A A A G G C A C T G T C C G G G C G C C A C A G T C C A C A
T G C C C T G G T G C T C A A G G A G G T G A C A G A G G C C A G C A C A G G C
A C C T A C A C C C T C G C C C T G T G G A A C T C C G C T G C T G G C C T G A
G G C G C A A C A T C A G C C T G G A G C T G G T G G T G A A T G T G C C C C C
C C A G A T A C A T G A G A A G G A G G C C T C C T C C C C C A G C A T C T A C
T C G C G T C A C A G C C G C C A G G C C C T C A C C T G C A C G G C C T A C G
G G G T G C C C C T G C C T C T C A G C A T C C A G T G G C A C T G G C G G C C
C T G G A C A C C C T G C A A G A T G T T T G C C C A G C G T A G T C T C C G G
C G G C G G C A G C A G C A A G A C C T C A T G C C A C A G T G C C G T G A C T
G G A G G G C G G T G A C C A C G C A G G A T G C C G T G A A C C C C A T C G A
G A G C C T G G A C A C C T G G A C C G A G T T T G T G G A G G G A A A G A A T
A A G A C T G T G A G C A A G C T G G T G A T C C A G A A T G C C A A C G T G T

CTGCCATGTACAAGTGTGTGGTCTCCAACAAGGTGGGGCCA
GGATGAGCGGCTCATCTACTTCTATGTGACCACCATCCCC
GACGGCTTTCACCATCGAATCCAAGCCATCCGAGGAGCTAC
TAGAGGGGCCAGCCGGTGCTCCTGAGCTGCCAAGCCGACAG
CTACAAGTACGAGCATCTGCGCTGGTACC GG CCTCAACCTG
TCCACGCTGCAACGATGCGCACGGGAACCCGCTTCTGCTCG
ACTGCAAGAACAAGTGCATCTGTTCTGCCACCCCTCTGGCCGC
CAGCCTGGAGGAGGTGGCACCTGGGGCGCGCCACGCCACG
CTCAGCCTGAGTATCCCCCGCGTCTGCGCCCGAGCACGAGG
GCCACTATGTGTGCGAAGTGCAGAAGACCGGCGCAGCCATGA
CAAGCACTGCCACAAGAAGTACCTGTCTGGGTGCAGGCCCTG
GAAGCCCCCTCGGCTCACGCGAGAACTTGACCGACCTCCTGG
TGAAACGTGAGCGACTCGCTGGAGATGCAGTGCTTGGTGGC
CGGAGCGCACGCGGCCAGCATCGTGTGGTACAAAGACGAG
AGGCTGCTGGAGGAAAAGTCTGGAGTCTGACTTGGCGGACT
CCAACCAGAAAGCTGAGCATCCAGCGCGTGGCGGAGGAGGA
TGGGGGACGCTATCTGTGCGAGCGTGTGCAACGCCAAGGGC
TGGCTCAACTCCTCCGCCAGCGTGGCCGTGGAAAGGCTCCG
AGGATAAGGGGCAGCATGGAGATCGTGTATCCTTGTCTGGGTAC
CGGCGTTCATCGCTGTCTTCTTCTTCTGGGTCTCTCTCTCTC
ATCTTCTGTAAACATGAGGAGGGCCGGCCCAAGCAGACATCA
AGACGGGGCTACCTGTCCATCATCATGGACCCCGGGGAGGT
GCCTCTGGAGGAGCAATGCGAATACTGTCTCTACGATGCC
AGCCAGTGGGAATTCCCCCGAGAGCGGGCTGCACCTGGGGGA
GAGTGCTCGGCTACGGCGCGCTTCTGGGAAGGTGGTGGAAAGC
CTCCGCTTTCTGGCATCCACAAGGGGCAGCAGCTGTGACACC
GTGGCCGTGAAAATGCTGAAAGAGGGCGGCCACGGCCAGCG
AGCACCGCGCGCTGATGTCTGGAGCTCAAGATCCTCATTTCA
CATCGGGCAACCACCTCAACGTTGGTCAACCTCCTCGGGGGCG
TGCACCAAGCCGCGAGGGGCCCTCATGGTGTATCGTGGAGT
TCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAACCTTCTCTGGCGGCCAA
GCGGGACGCGCTTCTAGCCCCCTGCGCGGAGAAAGTCTCCCGAG
CAGCGCGGACGCTTCTCGCGGCCATGGTGGAGCTCGCCAGGC
TGGATCGGAGGGCGGCCGGGGAGCAGCGACAGGGTCTCTCT
CGCGCGGGTTCTCGAAGACCGAGGGCGGAGCGAGGGCGGGCT
TCTCCAGACCAAGAAGCTGAGGACCTGTGGCTGAGCCCGC
TGACCATGGAAGATCTTGTCTGTCTACAGCTTCCAGGTGGC
CAGAGGGATGGAGTTCTCTGGCTTCTCCGAAAGTGCATCCAC
AGAGACCTGGCTGCTCGGAACATTTCTGTCTGTGGAAAGCG
ACGTGGTGAAGATCTGTGACTTTGGCCCTTGCCCGGGGACAT
CTACAAGAAGACCCCGACTACGTCCGCAAGGGGCAGTGGCCGG
CTGCCCTGAAGTGGATGGCCCTGAAAGCATCTTCTGACA
AGGTGTACACCACGCGAGAGTGAAGTGTGGTCTCTTTGGGGT
GCTTCTCTGGGAGATCTTCTCTCTCTGGGGGGCTCTCCCGGTAC
CCTGGGGGTGCAGATCAATGAGGAGTTCTGCGCAGCGGCTGA
GAGACGGCACAAAGGATGAGGGCCCCGGAGCTGGCCACTCC
CGCCATACGCCGCGCATCATGTGTAAGTGTGGTCCGGAGAC
CCCAAGGCGAGACCTGCATTTCTCGGAGCTGGTGGAGATCC
TGGGGGACCTGTCTCCAGGGGCAGGGGGCTGCAAGAGGGAAGA
GGAGGTCTGCATGGCCCCCGCGCGAGCTCTCAGAGCTCAGAA

10

20

30

40

50

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

【 0 2 9 8 】

例示的なヒトVEGFR-3アイソフォーム1前駆体アミノ酸配列（配列番号39）

M Q R G A A L C L R L W L C L G L L D G L V S G Y S M T P P T L N I T E E S H V
I D T G D S L S I S C R G Q H P L E W A W P G A Q E A P A T G D K D S E D T G V
V R D C E G T D A R P Y C K V L L L H E V H A N D T G S Y V C Y Y K Y I K A R I
E G T T A A S S Y V F V R D F E Q P F I N K P D T L L V N R K D A M W V P C L V
S I P G L N V T L R S Q S S V L W P D G Q E V V W D D R R G M L V S T P L L H D
A L Y L Q C E T T W G D Q D F L S N P F L V H I T G N E L Y D I Q L L P R K S L 30
E L L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P G K Q A E R G K W V P
E R R S Q Q T H T E L S S I L T I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R
E S T E V I V H E N P F I S V E W L K G P I L E A T A G D E L V K L P V K L A A
Y P P P E F Q W Y K D G K A L S G R H S P H A L V L K E V T E A S T G T Y T L A
L W N S A A G L R R N I S L E L V V N V P P Q I H E K E A S S P S I Y S R H S R
Q A L T C T A Y G V P L P L S I Q W H W R P W T P C K M F A Q R S L R R R Q Q Q
D L M P Q C R D W R A V T T Q D A V N P I E S L D T W T E F V E G K N K T V S K
L V I Q N A N V S A M Y K C V V S N K V G Q D E R L I Y F Y V T T I P D G F T I
E S K P S E E L L E G Q P V L L S C Q A D S Y K Y E H L R W Y R L N L S T L H D
A H G N P L L L D C K N V H L F A T P L A A S L E E V A P G A R H A T L S L S I 40
P R V A P E H E G H Y V C E V Q D R R S H D K H C H K K Y L S V Q A L E A P R L
T Q N L T D L L V N V S D S L E M Q C L V A G A H A P S I V W Y K D E R L L E E
K S G V D L A D S N Q K L S I Q R V R E E D A G R Y L C S V C N A K G C V N S S
A S V A V E G S E D K G S M E I V I L V G T G V I A V F F W V L L L L I F C N M
R R P A H A D I K T G Y L S I I M D P G E V P L E E Q C E Y L S Y D A S Q W E F
P R E R L H L G R V L G Y G A F G K V V E A S A F G I H K G S S C D T V A V K M
L K E G A T A S E H R A L M S E L K I L I H I G N H L N V V N L L G A C T K P Q
G P L M V I V E F C K Y G N L S N F L R A K R D A F S P C A E K S P E Q R G R F
R A M V E L A R L D R R R P G S S D R V L F A R F S K T E G G A R R A S P D Q E
A E D L W L S P L T M E D L V C Y S F Q V A R G M E F L A S R K C I H R D L A A 50

R N I L L S E S D V V K I C D F G L A R D I Y K D P D Y V R K G S A R L P L K W
M A P E S I F D K V Y T T Q S D V W S F G V L L W E I F S L G A S P Y P G V Q I
N E E F C Q R L R D G T R M R A P E L A T P A I R R I M L N C W S G D P K A R P
A F S E L V E I L G D L L Q G R G L Q E E E E V C M A P R S S Q S S E E G S F S
Q V S T M A L H I A Q A D A E D S P P S L Q R H S L A A R Y Y N W V S F P G C L
A R G A E T R G S S R M K T F E E F P M T P T T Y K G S V D N Q T D S G M V L A
S E E F E Q I E S R H R Q E S G F R

【0299】

このバリエーション（3）は、バリエーション1と比較して、選択的3'末端エクソンを含む。
その結果、アイソフォーム（3）はアイソフォーム1と比較してC末端が短くなっている。

10

【0300】

例示的なヒトVEGFR-3アイソフォーム2 cDNA配列（配列番号40）

A C T T T C A G C C C C G A G C C G C G G C C G C T C G G G T C G G A C C C A C
G C G C A G C G G C C G G A G A T G C A G C G G G G C G C C G C G C T G T G C C
T G C G A C T G T G G C T C T G C C T G G G A C T C C T G G A C G G C C T G G T
G A G T G G C T A C T C C A T G A C C C C C C G A C C T T G A A C A T C A C G
G A G G A G T C A C A C G T C A T C G A C A C C G G T G A C A G C C T G T C C A
T C T C C T G C A G G G G A C A G C A C C C C C T C G A G T G G G C T T G G C C
A G G A G C T C A G G A G G C G C C A G C C A C C G G A G A C A A G G A C A G C
G A G G A C A C G G G G G T G G T G C G A G A C T G C G A G G G C A C A G A C G
C C A G G C C C T A C T G C A A G G T G T T G C T G C T G C A C G A G G T A C A
T G C C A A C G A C A C A G G C A G C T A C G T C T G C T A C T A C A A G T A C
A T C A A G G C A C G C A T C G A G G G C A C C A C G G C C G C C A G C T C C T
A C G T G T T C G T G A G A G A C T T T G A G C A G C C A T T C A T C A A C A A
G C C T G A C A C G C T C T T G G T C A A C A G G A A G G A C G C C A T G T G G
G T G C C C T G T C T G G T G T C C A T C C C C G G C C T C A A T G T C A C G C
T G C G C T C G C A A A G C T C G G T G C T G T G G C C A G A C G G G C A G G A
G G T G G T G T G G G A T G A C C G G C G G G G C A T G C T C G T G T C C A C G
C C A C T G C T G C A C G A T G C C C T G T A C C T G C A G T G C G A G A C C A
C C T G G G G A G A C C A G G A C T T C C T T T C C A A C C C C T T C C T G G T
G C A C A T C A C A G G C A A C G A G C T C T A T G A C A T C C A G C T G T T G
C C C A G G A A G T C G C T G G A G C T G C T G G T A G G G G A G A A G C T G G
T C C T G A A C T G C A C C G T G T G G G C T G A G T T T A A C T C A G G T G T
C A C C T T T G A C T G G G A C T A C C C A G G G A A G C A G G C A G A G C G G
G G T A A G T G G G T G C C C G A G C G A C G C T C C C A G C A G A C C C A C A
C A G A A C T C T C C A G C A T C C T G A C C A T C C A C A A C G T C A G C C A
G C A C G A C C T G G G C T C G T A T G T G T G C A A G G C C A A C A A C G G C
A T C C A G C G A T T T C G G G A G A G C A C C G A G G T C A T T G T G C A T G
A A A A T C C C T T C A T C A G C G T C G A G T G G C T C A A A G G A C C C A T
C C T G G A G G C C A C G G C A G G A G A C G A G C T G G T G A A G C T G C C C
G T G A A G C T G G C A G C G T A C C C C C C G C C C G A G T T C C A G T G G T
A C A A G G A T G G A A A G G C A C T G T C C G G G C G C C A C A G T C C A C A
T G C C C T G G T G C T C A A G G A G G T G A C A G A G G C C A G C A C A G G C
A C C T A C A C C C T C G C C C T G T G G A A C T C C G C T G C T G G C C T G A
G G C G C A A C A T C A G C C T G G A G C T G G T G G T G A A T G T G C C C C C
C C A G A T A C A T G A G A A G G A G G C C T C C T C C C C C A G C A T C T A C
T C G C G T C A C A G C C G C C A G G C C C T C A C C T G C A C G G C C T A C G
G G G T G C C C C T G C C T C T C A G C A T C C A G T G G C A C T G G C G G C C
C T G G A C A C C C T G C A A G A T G T T T G C C C A G C G T A G T C T C C G G

20

30

40

50

C G G C G G C A G C A G C A A G A C C T C A T G C C A C A G T G C C G T G A C T
G G A G G G C G G T G A C C A C G C A G G A T G C C G T G A A C C C C A T C G A
G A G C C T G G A C A C C T G G A C C G A G T T T G T G G A G G G A A A G A A T
A A G A C T G T G A G C A A G C T G G T G A T C C A G A A T G C C A A C G T G T
C T G C C A T G T A C A A G T G T G T G G T C T C C A A C A A G G T G G G C C A
G G A T G A G C G G C T C A T C T A C T T C T A T G T G A C C A C C A T C C C C
G A C G G C T T C A C C A T C G A A T C C A A G C C A T C C G A G G A G C T A C
T A G A G G G C C A G C C G G T G C T C C T G A G C T G C C A A G C C G A C A G
C T A C A A G T A C G A G C A T C T G C G C T G G T A C C G C C T C A A C C T G
T C C A C G C T G C A C G A T G C G C A C G G G A A C C C G C T T C T G C T C G
A C T G C A A G A A C G T G C A T C T G T T C G C C A C C C C T C T G G C C G C
C A G C C T G G A G G A G G T G G C A C C T G G G G C G C G C C A C G C C A C G
C T C A G C C T G A G T A T C C C C C G C G T C G C G C C C G A G C A C G A G G
G C C A C T A T G T G T G C G A A G T G C A A G A C C G G C G C A G C C A T G A
C A A G C A C T G C C A C A A G A A G T A C C T G T C G G T G C A G G C C C T G
G A A G C C C C T C G G C T C A C G C A G A A C T T G A C C G A C C T C C T G G
T G A A C G T G A G C G A C T C G C T G G A G A T G C A G T G C T T G G T G G C
C G G A G C G C A C G C G C C C A G C A T C G T G T G G T A C A A A G A C G A G
A G G C T G C T G G A G G A A A A G T C T G G A G T C G A C T T G G C G G A C T
C C A A C C A G A A G C T G A G C A T C C A G C G C G T G C G C G A G G A G G A
T G C G G G A C G C T A T C T G T G C A G C G T G T G C A A C G C C A A G G G C
T G C G T C A A C T C C T C C G C C A G C G T G G C C G T G G A A G G C T C C G
A G G A T A A G G G C A G C A T G G A G A T C G T G A T C C T T G T C G G T A C
C G G C G T C A T C G C T G T C T T C T T C T G G G T C C T C C T C C T C C T C
A T C T T C T G T A A C A T G A G G A G G C C G G C C C A C G C A G A C A T C A
A G A C G G G C T A C C T G T C C A T C A T C A T G G A C C C C G G G G A G G T
G C C T C T G G A G G A G C A A T G C G A A T A C C T G T C C T A C G A T G C C
A G C C A G T G G G A A T T C C C C C G A G A G C G G C T G C A C C T G G G G A
G A G T G C T C G G C T A C G G C G C C T T C G G G A A G G T G G T G G A A G C
C T C C G C T T T C G G C A T C C A C A A G G G C A G C A G C T G T G A C A C C
G T G G C C G T G A A A A T G C T G A A A G A G G G C G C C A C G G C C A G C G
A G C A C C G C G C G C T G A T G T C G G A G C T C A A G A T C C T C A T T C A
C A T C G G C A A C C A C C T C A A C G T G G T C A A C C T C C T C G G G G C G
T G C A C C A A G C C G C A G G G C C C C C T C A T G G T G A T C G T G G A G T
T C T G C A A G T A C G G C A A C C T C T C C A A C T T C C T G C G C G C C A A
G C G G G A C G C C T T C A G C C C C T G C G C G G A G A A G T C T C C C G A G
C A G C G C G G A C G C T T C C G C G C C A T G G T G G A G C T C G C C A G G C
T G G A T C G G A G G C G G C C G G G G A G C A G C G A C A G G G T C C T C T T
C G C G C G G T T C T C G A A G A C C G A G G G C G G A G C G A G G C G G G C T
T C T C C A G A C C A A G A A G C T G A G G A C C T G T G G C T G A G C C C G C
T G A C C A T G G A A G A T C T T G T C T G C T A C A G C T T C C A G G T G G C
C A G A G G G A T G G A G T T C C T G G C T T C C C G A A A G T G C A T C C A C
A G A G A C C T G G C T G C T C G G A A C A T T C T G C T G T C G G A A A G C G
A C G T G G T G A A G A T C T G T G A C T T T G G C C T T G C C C G G G A C A T
C T A C A A A G A C C C C G A C T A C G T C C G C A A G G G C A G T G C C C G G
C T G C C C C T G A A G T G G A T G G C C C C T G A A A G C A T C T T C G A C A
A G G T G T A C A C C A C G C A G A G T G A C G T G T G G T C C T T T G G G G T
G C T T C T C T G G G A G A T C T T C T C T C T G G G G G C C T C C C C G T A C
C C T G G G G T G C A G A T C A A T G A G G A G T T C T G C C A G C G G C T G A
G A G A C G G C A C A A G G A T G A G G G C C C C G G A G C T G G C C A C T C C

10

20

30

40

50

CGCCATACGCCGCATCATGCTGAACCTGCTGGTCCGGAGAC
 CCAAGGCGAGACCTGCATTCTCGGAGCTGGTGGAGATCC
 TGGGGGACCTGCTCCAGGGCAGGGGCTGCAAGAGGAAGA
 GGAGGTCTGCATGGCCCCGCGCAGCTCTCAGAGCTCAGAA
 GAGGGCAGCTTCTCAGGCTGTCCACCATGGCCCTACACA
 TCGCCCCAGGCTGACGCTGAGGACAGCCCCGCCAAGCCTGCA
 GCGCCACAGCCTGGCCGCGCAGGTATTACAACCTGGGTGTCC
 TTTCCCGGGTGCCTGGCCAGAGGGGCTGAGACCCGTGGTT
 CCTCCAGGATGAAGACATTTGAGGAATTCCCCATGACCCC
 AACGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCAGACAGACAGT
 GGGATGGTGTCTGGCCTCGGAGGAGTTTGTAGCAGATAGAGA
 GCAGGCATAGACAAGAAAGCGGGCTTCAGAGGAACCAGGAG
 GACAAGAGGAGCATGAAAGTTGGACAAGGAGTGTGACCACT
 GAAGCACCAACAGGGAGGGGTTAGGCCCTCCGGATGACTGCG
 GGCAGGCCTGGATAATATCCAGCCTCCCAACAAGAAAGCTGG
 TGGAGCAGAGTGTTCCTGACTCCTCCAAGGAAGGGGAGA
 CGCCCTTTTCATGGTCTGCTGAGTAACAGGTGCCCTTCCAG
 AACTGGCGTTACTGCTTGACCAAGAGCCCTCAAGCGGC
 CCTTATGCCAGCGTGACAGAGGGCTCACCTCTTGCCCTTCT
 AGGTCACCTTCTCACAAATGTCCCTTCAGCACCTGACCCCTGT
 GCCCACCAAGTTATTCTCTTGGTAATATGAGTAATACATCAA
 AGAGTAGTATTAAAAGCTAATTAATCATGTTTATACTAA
 【0301】

例示的なヒトVEGFR-3アイソフォーム1前駆体アミノ酸配列（配列番号41）

MQRGAALCLRLWLCGLLDGLVSGYSMTPTLNITEESHV
 IDTGDSLISICRGQHPLIEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGV
 VRDCEGTDARPYCKVLLHEVHANDTGSYVCYYKYIKARI
 EGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRK DAMWVPCLV
 SIPGLNVT LRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHD
 ALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPKSL
 ELLVGEKLV LNCTVWAEFNSGVTFDWDYPGKQAERGKWVP
 ERRSQQTHTELS SILTIHNVSQHDLGSYVCKANNNGIQRFR
 ESTEVI VHENPFISVEWLKGP ILEATAGDELVKLPVKLAA
 YPPPEFQWKDGKALSGRHS PHALVLKEVTEASTGTYT LA
 LWN SAAGLR RNISLELVVNVP PQIHEKEASSPSIYSRHSR
 QALTCTAYGVPLPLSIQWHWRPWPCKMFAQRS LRRRQQQ
 DLMPQCRDWRAVTTQDAVNPIESLDTWTEFVEGKNKTVSK
 LVIQ NANSAMYKCVVSNKVGQDERLIYFYVTTIPDGF TI
 ESKPSEELLEGQPVL LSCQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHD
 AHGNPLLLDCKNVHLFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSI
 PRVAPEHEGHYVCEVQDRRSHDKHCHKKYLSVQALEAPRL
 TQNLTDLLVNVSDSLEMQLVAGAHAPSIVWYKDERLLEE
 KSGVDLADSNQKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSS
 ASVAVEGSEDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNM
 RRP AHADIKTGYLSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWEF
 PRERLHLGRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKM
 LKEGATASEHRA LMSELKILIHIGNHLNVVNLLGACTK PQ
 GPLMVIVEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSP EQRGRF
 RAMVELARLDRRRPGSSDRVLFARFSKTEGGARRASPDQE
 AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDLAA

R N I L L S E S D V V K I C D F G L A R D I Y K D P D Y V R K G S A R L P L K W
M A P E S I F D K V Y T T Q S D V W S F G V L L W E I F S L G A S P Y P G V Q I
N E E F C Q R L R D G T R M R A P E L A T P A I R R I M L N C W S G D P K A R P
A F S E L V E I L G D L L Q G R G L Q E E E E V C M A P R S S Q S S E E G S F S
Q V S T M A L H I A Q A D A E D S P P S L Q R H S L A A R Y Y N W V S F P G C L
A R G A E T R G S S R M K T F E E F P M T P T T Y K G S V D N Q T D S G M V L A
S E E F E Q I E S R H R Q E S G F R G T R R T R G A

【0302】

融合タンパク質

融合タンパク質またはキメラタンパク質は、もともと別々のタンパク質をコードしていた2つ以上の遺伝子を連結することによって作製されたタンパク質である。融合遺伝子の翻訳により、元のタンパク質のそれぞれに由来する機能特性を持つ単一または複数のポリペプチドが作製される。組換え融合タンパク質は人工的に作製され、得られたタンパク質は、異なる機能及び／または物理化学的パターンを有する基礎的なポリペプチドを有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質組成物は、本明細書に記載の1つ以上のVEGF-Rタンパク質またはその特徴的部分の融合体を含む。

【0303】

例えば、抗体融合タンパク質は、特定の抗原を標的とする抗体と、免疫応答を改変し得る、またはがん細胞に直接的な損傷を誘発し得るタンパク質とを組み合わせることができる。例えば、細胞溶解性融合タンパク質は、抗体を毒素に結合させることで、がん細胞を排除する抗体の効力を高める。これらのいわゆる「免疫毒素」は、その効力を毒素に由来し、その特異性をそれらが結合している抗体または抗体断片に由来する。特定の実施形態では、そのような融合タンパク質は、「免疫サイトカイン」を生成するためのサイトカインと融合したポリペプチド（例えば、抗体及び／またはその特徴的部分）を含み得る。そのような融合タンパク質は、腫瘍標的化抗体（例えば、抗VEGF抗体）とサイトカイン（自然免疫応答メディエーター）とを組み合わせることができる。いくつかのそのような実施形態では、これは、腫瘍微小環境における免疫系の局所的活性化を増加させ、がん細胞及び／または腫瘍（例えば、VS）の排除を支援する可能性がある。

【0304】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の抗VEGFタンパク質（例えば、抗体、可溶性VEGF受容体、及び／またはその特徴的VEGF結合部分）は、Fc領域に1つ以上の（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、または10）アミノ酸置換を含み得、これは、哺乳動物における抗体及び／または可溶性VEGF受容体の半減期を、例えば、1つ以上のアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを含まないそれ以外は同一の抗体及び／または可溶性VEGF受容体の半減期と比較して、減少させる。哺乳動物における抗体及び／または可溶性VEGF受容体の半減期を決定する方法は、当該技術分野で周知である。抗体及び／または可溶性VEGF受容体の半減期を減少させることができるFc変異における点変異の非限定的な例は、Leabman et al., Mabs 5(6): 896-903, 2013（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0305】

アフリベルセプト

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質はアフリベルセプトである。アフリベルセプトは、ヒトIgG1のFc部分に融合したヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメインの部分からなる組換え融合タンパク質である。アフリベルセプトは、タンパク質分子量およそ97キロダルトン(kDa)の二量体糖タンパク質であり、総分子量のさらに15%を構成し得る翻訳後グリコシル化を含む場合があり、結果として総分子量は115kDaとなり得る。アフリベルセプトはFDAの承認を受けており、新生血管性（滲出型）加齢黄斑変性、網膜静脈閉塞症後の黄斑浮腫、糖尿病黄斑浮腫、転移性大腸癌、及び糖尿病網膜症の治療に適応されている。

【0306】

特定の実施形態では、アフリベルセプトはVEGF-TRAPとして機能する。本明細書に記載の特定の例示的な抗体ベースのVEGF結合戦略、例えば、ラニズマブ及び／またはベバシズマブを利用するものとは対照的に、いくつかの実施形態では、VEGF-TRAPは、VEGFR-1受容体の第2の結合ドメイン及びVEGFR-2受容体の第3のドメインを組み込む。これらの細胞外タンパク質配列をヒトIgG骨格のFcセグメントに融合させることにより、非常に高いVEGF結合親和性（Kd約1pM）を有するキメラタンパク質が生成される。ラニズマブ及びベバシズマブと同様に、アフリベルセプトなどのVEGF-TRAPは、VEGF-Aファミリーの全ての異性体と結合し、VEGF-B及び胎盤増殖因子とも結合する。特定の実施形態では、アフリベルセプトタンパク質は、IL2SS（以下に記載）などの適切な分泌シグナル配列にコンジュゲートされる。特定の実施形態では、VEGF-TRAPタンパク質産物は、配列番号43または44によって表される。

10

【0307】

例示的なアフリベルセプトヌクレオチドコード配列（配列番号42）

A T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T C T C
T G G C C C T G G T C A C C A A T T C T A G C G A T A C C G G C A G A C C C T T
C G T G G A A A T G T A C A G C G A G A T C C C C G A G A T C A T C C A C A T G
A C C 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 C G T G A C T 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 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 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 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 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 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 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 C 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 A

20

30

40

【0308】

50

例示的なアフリベルセプトアミノ酸配列（配列番号43）

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMT
TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDS
RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNT
IIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEY
PSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ
GLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTCPCPCAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

10

【0309】

例示的なアフリベルセプト細胞外（EC）ドメインアミノ酸配列（配列番号112）

MYRMQLLSICIALSLALVTNSSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMT
TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDS
RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNT
IIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNGIDFNWEY
PSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ
GLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

20

【0310】

例示的なアフリベルセプトアミノ酸配列（配列番号44）

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMT EGRELVIPCRVTSPNITVTL
LKKFPLDTLIPDGKRIIWDS RKGFIISNATYKEIGLLTCE
ATVNGHLYKTNYLTHRQTNT IIDVVLSPSHGIELSVGEKL
VLNCTARTELVNGIDFNWEY PSSKHQHKKLVNRDLKTQSG
SEMKKFLSTLTIDGVTRSDQ GLYTCAASSGLMTKKNSTFV
RVHEKDKHTCPCPCAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNV FSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

30

【0311】

例示的な断片、結晶化可能（Fc）ヌクレオチド配列（配列番号110）

GACAAGACCCACACCTGTCTCTCCATGTCTCTGCTCCAGAAC
TGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCTCTCCAAAGCC
TAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACC
TGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCCACGAGGATCCCGAAGTGAA
AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCAACAACGC
CAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTAC
AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCAACCAGGATTGGC
TGAACGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC
CCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCCAAG
GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACACTGCCTCCAA
GCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG
CCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAA
TGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAA
CCCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTTCTTCTCTGTA

40

50

C A G C A A G C T G A C A G T G G A C A A G T C C A G A T G G C A G C A G G G C
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 T C T G A G C C T G T C T C C T G G C
【 0 3 1 2 】

例示的な断片、結晶化可能 (Fc) アミノ酸配列 (配列番号 111)

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 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

10

【 0 3 1 3 】

構築物

とりわけ、本開示は、本明細書に記載のいくつかのポリヌクレオチドがポリヌクレオチド構築物であることを提供する。本開示によるポリヌクレオチド構築物は、抗 VEGF タンパク質、例えば、抗 VEGF 抗体及び／または可溶性 VEGF 受容体 (例えば、抗 VEGF-TRAP タンパク質 (例えば、アフリベルセプトなどの融合タンパク質)) を含むポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド (例えば、裸の、またはリポソームに含まれる)、及びウイルス構築物 (例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス構築物) を含む、当該技術分野で知られている全てのものを含む。当業者であれば、本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドを作製するために、適切な構築物及び細胞を選択することができるであろう。いくつかの実施形態では、構築物は、プラスミド (例えば、細胞の内部で自律的に複製することができる環状 DNA 分子) である。いくつかの実施形態では、構築物は、コスミド (例えば、pWE または sCos シリーズ) であり得る。

20

【 0 3 1 4 】

いくつかの実施形態では、構築物はウイルス構築物である。いくつかの実施形態では、ウイルス構築物は、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス構築物である。いくつかの実施形態では、構築物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 構築物である (例えば、Asokan et al., Mol. Ther. 20: 699-7080, 2012 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと)。WT AAV ゲノムの簡略化された例は、図 5 のパネル (A) に表され、一方、組換え AAV (rAAV) 構築物の簡略化された例は、図 5 のパネル (B) に表される。いくつかの実施形態では、ウイルス構築物はアデノウイルス構築物である。いくつかの実施形態では、ウイルス構築物はまた、アルファウイルスに基づくか、またはアルファウイルスに由来し得る。アルファウイルスとしては、シンドビス (及び VEEV) ウイルス、アウラウイルス、ババンキウイルス、バーマフォレストウイルス、ベバルウイルス、カバソウウイルス (Cabassou virus)、チクングニアウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エバーグレードウイルス (Everglades virus)、フォートモーガンウイルス (Fort Morgan virus)、ゲタウイルス、ハイランド J ウイルス (Highlands J virus)、キジラガチウイルス (Kyzylgach virus)、マヤロウイルス、メトリウイルス (Me Tri virus)、ミデルバーグウイルス (Middelburg virus)、モッソダスペドラスウイルス (Mosso das Pedras virus)、ムカンボウイルス、ヌドゥムウイルス、オニョンニョンウイルス、ピクスナウイルス (Pixuna virus)、リオネグロウイルス、ロスリバーウイルス、サケ腭臓病ウイルス (Salmon pancreas disease virus)、セムリキフォレストウイルス、ミナミゾウアザラシウイルス (Southern elephant seal virus)、トナテウイルス (Tonate virus)、トロカラウイルス (Trocara virus)、ウナウイルス (Una virus)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西

30

40

50

部ウマ脳炎ウイルス、及びワタロアウイルスが挙げられる。一般に、このようなウイルスのゲノムは、宿主細胞の細胞質で翻訳可能な非構造タンパク質（例えば、レプリコン）と構造タンパク質（例えば、カプシド及びエンベロープ）をコードする。ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、セムリキフォレストウイルス（SFV）、及びベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）は全て、コード配列送達用のウイルス構築物を作製するために使用されている。アルファウイルスのエンベロープ糖タンパク質及びレトロウイルスのカプシドを組み合わせるにより、シュードタイプウイルスを形成することができる。アルファウイルス構築物の例は、米国特許公開番号第20150050243号、同第20090305344号、及び同第20060177819号に見出すことができ、構築物及びその製造方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0315】

本明細書で提供される構築物は、異なるサイズであってもよい。いくつかの実施形態では、構築物はプラスミドであり、最大約1 kb、最大約2 kb、最大約3 kb、最大約4 kb、最大約5 kb、最大約6 kb、最大約7 kb、最大約8 kb、最大約9 kb、最大約10 kb、最大約11 kb、最大約12 kb、最大約13 kb、最大約14 kb、または最大約15 kbの全長を含み得る。いくつかの実施形態では、構築物はプラスミドであり、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約1 kb～約6 kb、約1 kb～約7 kb、約1 kb～約8 kb、約1 kb～約9 kb、約1 kb～約10 kb、約1 kb～約11 kb、約1 kb～約12 kb、約1 kb～約13 kb、約1 kb～約14 kb、または約1 kb～約15 kbの範囲の全長を有し得る。

20

【0316】

いくつかの実施形態では、構築物はウイルス構築物であり、最大10 kbの総ヌクレオチド数を有し得る。いくつかの実施形態では、ウイルス構築物は、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約1 kb～約6 kb、約1 kb～約7 kb、約1 kb～約8 kb、約1 kb～約9 kb、約1 kb～約10 kb、約2 kb～約3 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約5 kb、約2 kb～約6 kb、約2 kb～約7 kb、約2 kb～約8 kb、約2 kb～約9 kb、約2 kb～約10 kb、約3 kb～約4 kb、約3 kb～約5 kb、約3 kb～約6 kb、約3 kb～約7 kb、約3 kb～約8 kb、約3 kb～約9 kb、約3 kb～約10 kb、約4 kb～約5 kb、約4 kb～約6 kb、約4 kb～約7 kb、約4 kb～約8 kb、約4 kb～約9 kb、約4 kb～約10 kb、約5 kb～約6 kb、約5 kb～約7 kb、約5 kb～約8 kb、約5 kb～約9 kb、約5 kb～約10 kb、約6 kb～約7 kb、約6 kb～約8 kb、約6 kb～約9 kb、約6 kb～約10 kb、約7 kb～約8 kb、約7 kb～約9 kb、約7 kb～約10 kb、約8 kb～約9 kb、約8 kb～約10 kb、または約9 kb～約10 kbの範囲の総ヌクレオチド数を有し得る。

30

【0317】

いくつかの実施形態では、構築物はレンチウイルス構築物であり、最大8 kbの総ヌクレオチド数を有し得る。いくつかの例では、レンチウイルス構築物は、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約1 kb～約6 kb、約1 kb～約7 kb、約1 kb～約8 kb、約2 kb～約3 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約5 kb、約2 kb～約6 kb、約2 kb～約7 kb、約2 kb～約8 kb、約3 kb～約4 kb、約3 kb～約5 kb、約3 kb～約6 kb、約3 kb～約7 kb、約3 kb～約8 kb、約4 kb～約5 kb、約4 kb～約6 kb、約4 kb～約7 kb、約4 kb～約8 kb、約5 kb～約6 kb、約5 kb～約7 kb、約5 kb～約8 kb、約6 kb～約8 kb、約6 kb～約7 kb、または約7 kb～約8 kbの総ヌクレオチド数を有し得る。

40

【0318】

いくつかの実施形態では、構築物はアデノウイルス構築物であり、最大8 kbの総ヌクレオチド数を有し得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルス構築物は、約1 kb～

50

約 2 k b、約 1 k b～約 3 k b、約 1 k b～約 4 k b、約 1 k b～約 5 k b、約 1 k b～約 6 k b、約 1 k b～約 7 k b、約 1 k b～約 8 k b、約 2 k b～約 3 k b、約 2 k b～約 4 k b、約 2 k b～約 5 k b、約 2 k b～約 6 k b、約 2 k b～約 7 k b、約 2 k b～約 8 k b、約 3 k b～約 4 k b、約 3 k b～約 5 k b、約 3 k b～約 6 k b、約 3 k b～約 7 k b、約 3 k b～約 8 k b、約 4 k b～約 5 k b、約 4 k b～約 6 k b、約 4 k b～約 7 k b、約 4 k b～約 8 k b、約 5 k b～約 6 k b、約 5 k b～約 7 k b、約 5 k b～約 8 k b、約 6 k b～約 7 k b、約 6 k b～約 8 k b、または約 7 k b～約 8 k b の範囲の総ヌクレオチド数を有し得る。

【0319】

本明細書に記載される任意の構築物は、制御配列、例えば、転写開始配列、転写終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、RNA スプライシング配列、ポリアデニル化（ポリ（A））配列、コザックコンセンサス配列、及び／または転写前もしくは転写後の調節及び／または制御エレメントを収容し得る追加の非翻訳領域、の群から選択された制御配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ネイティブプロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、及び／または組織特異的プロモーターであり得る。制御配列の非限定的な例が本明細書に記載される。

【0320】

AAV 粒子

とりわけ、本開示は、抗 VEGF タンパク質、例えば抗 VEGF 抗体及び／または抗 VEGF-TRAP タンパク質をコードする組換え AAV (rAAV) 構築物を含む、本明細書に記載の AAV カプシドを含む AAV 粒子を提供する。いくつかの実施形態では、AAV 粒子は、構築物株及びカプシド株を説明する血清型を有するものとして記載され得る。例えば、いくつかの実施形態では、AAV 粒子は、AAV2 として記載され得、その場合、該粒子は、AAV2 カプシド、及び特徴的 AAV2 末端逆位反復 (ITR) を含む構築物を有する。いくつかの実施形態では、AAV 粒子は、カプシド及び構築物が異なる AAV 株に由来するシュードタイプとして記載され得、例えば、AAV2/9 は、AAV2 ITR 及び AAV9 カプシドを利用する構築物を含む AAV 粒子を指す。この同じ命名法は、rAAV カプシド、構築物、及び／または粒子にも使用することができる。

【0321】

特定の実施形態では、rAAV 粒子を使用する遺伝子治療は、次のいくつかの理由で内耳障害の有望な治療法である：（１）聴覚及び前庭感覚上皮を含む内耳が、中枢神経系におけるものと同様に免疫監視機構を改変していること（Fujioka 2014、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）；（２）蝸牛のコルチ器の感覚細胞及び支持細胞は有糸分裂後であり、これにより rAAV の単回投与後の長期発現が可能となり得ること；ならびに（３）成人及び小児の両方における複数の投与経路を介した rAAV 送達の総合的な臨床経験が、特に局所的送達及び／または低～中用量での投与において、送達ビヒクルとしての rAAV の強力な安全性プロファイルを示唆していること。

【0322】

rAAV 粒子を利用した臨床試験は 20 年以上前に始まり、rAAV 粒子は、全身投与で最大およそ 1E15 vg 以上の用量で数十の臨床試験で数百人の参加者に投与されてきた（Flotte 1996；Flotte 2013；Parente 2018；Wang 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。rAAV 粒子が in vivo 遺伝子導入に使用された試験の数は、着実に増加している。その安全性プロファイルは、幅広い標的組織への形質導入効率の高さとともに、rAAV 粒子を in vivo 遺伝子治療の最適なプラットフォームとして確立した（Wang 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。rAAV 技術は、共凝集障害、遺伝性失明、及び神経変性疾患を含む様々な状態に対して臨床応用に成功している（Collella 2018；Wang 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0323】

特定の実施形態では、抗VEGFタンパク質をコードする構築物を含むrAAV粒子を含む組成物は、rAAV-抗VEGFと称される。Anc80カプシドが利用される特定の組成物では、このような組成物は、rAAVAnc80-抗VEGFと称され得る。いくつかの実施形態では、これらの組成物は、AK-抗VEGFとも称され得る。いくつかの実施形態では、rAAVAnc80-抗VEGF粒子は、特定のrAAV構築物を含み、例えば、図6のパネル(A)によって表される構築物を含んでもよい。そのような構築物は、本明細書では、VH/VL構築物、及び/またはrAAVAnc80-VH/VLと呼ばれ；例示的なrAAVAnc80-VH/VL構築物はラニビズマブをコードする。いくつかの実施形態では、rAAVAnc80-抗VEGF粒子は、図6のパネル(B)によって表される構築物を含み、該構築物は、抗体GFP構築物(ABGFP)及び/またはrAAVAnc80-ABGFPと呼ばれ得；例示的なrAAVAnc80-ABGFP構築物は、GFPに転写的に連結したラニビズマブまたはベバシズマブをコードする。いくつかの実施形態では、rAAVAnc80-抗VEGF構築物は、図6のパネル(C)によって表される構築物を含み、該構築物は、抗体(AB)構築物、及び/またはrAAVAnc80-ABと称される得；例示的なrAAVAnc80-AB構築物は、ベバシズマブをコードする。いくつかの実施形態では、rAAVAnc80-抗VEGF構築物は、図6のパネル(D)によって表される構築物を含み、該構築物は、抗VEGF-TRAP(TRAP)、及び/またはrAAVAnc80-TRAPと称され得；例示的なrAAVAnc80-TRAP構築物はアフリベルセプトをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFは遺伝子治療組成物であり、VS患者の治療を目的とする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、アデノ随伴ウイルス(AAV)粒子の血清型1、2、8、及び9の共通祖先と推定されるAAVAnc80(Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を、眼内投与後のVEGFの阻害のためにこれまでに最適化された抗体断片(Fab)であるラニビズマブの配列をコードする導入遺伝子の送達ビヒクルとして含む(Genentech 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、直径およそ26ナノメートル(nm)の非エンベロープ型正二十面体ビリオンである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、合成AAVAnc80カプシド配列がベースとするアデノ随伴ウイルスは、Parvoviridae科の非病原性、一本鎖DNAゲノム含有、ヘルパーウイルス依存性メンバーである。

10

20

30

40

50

【0324】

組換えAAV(rAAV)粒子は、野生型アデノ随伴ウイルスに見られるのと同じ全体的なカプシド構造を保持しながら、ウイルスタンパク質コード配列を欠くゲノムをカプシド封入し、その場所に治療用遺伝子発現カセットが挿入されている。ウイルス由来の唯一の配列は逆位末端反復(ITR)配列であり、これは粒子生成時のゲノム複製及びパッケージングを導くために必要である。ウイルスコード配列の除去は、rAAV粒子のパッケージング能力を最大化し、in vivoで送達された場合の免疫原性及び細胞毒性の低減に寄与する(Wang 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0325】

AAVAnc80は、合理的に設計されたAAVカプシドであり、その配列は祖先配列再構築によって推定された(Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。哺乳動物の内耳におけるAAVAnc80の最初に報告された使用により、蝸牛及び前庭有毛細胞における高い形質導入効率と、ノックインマウスモデルにおける聴覚、蝸牛、及び前庭機能の回復の証拠が明らかとなった(Landegger 2017; Pan 2017、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。その後の研究により、AAVAnc80の蝸牛及び前庭細胞の形質導入効率が、他のAAV血清型よりも有意に高いことがマウスにおいて(Landegger 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Omichi 2020、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、そして非ヒト霊長類において(Anc

dres-Mateos 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) 確認されている。

【0326】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、次の2つの構成要素を含む：AAV Anc80 (Anc80 L65とも称される；Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) カプシドと、抗VEGFタンパク質をコードする一本鎖rAAV DNAゲノム、例えば、rAAV-VH/VL (例えば、ラニズマブ)、rAAV-AB (例えば、ベバシズマブ)、rAAV-ABGFP (例えば、GFPでタグ標識された抗体、例えば、GFPでタグ標識されたラニズマブまたはベバシズマブ)、及び/または該AAV Anc80 カプシドによりカプシド封入されたrAAV-TRAP (例えば、アフリベルセプト) である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、次の2つの構成要素を含む：AAV Anc80 (Anc80 L65とも称される；Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) カプシドと、該AAV Anc80 カプシドによりカプシド封入された、ITR配列を除く3000~5000ヌクレオチドの一本鎖DNAゲノム (例えば、図6のパネル(A)~(D)により示される) である。

10

【0327】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、組換え構築物DNAゲノムは、AAV2 ITR配列に隣接し、以下のプロモーター及び調節配列をコードする真核生物の発現カセットを含む：サイトメガロウイルス (CMV) 初期エンハンサーエレメント；5' 隣接領域と第2のエクソンの近位領域との間に位置するニフトリβアクチン (CβA) 遺伝子配列；及びウサギβグロビン (RβG) 遺伝子由来の3' スプライスアクセプター配列 (一般にCAGプロモーターと呼ばれる) (Miyazaki 1989；Niwa 1991；Orban 2009、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、このハイブリッド調節エレメントに続いて、ラニズマブ重鎖及び軽鎖をコードするバイシストロニックカセットが、フリン及びthosaeasignaウイルス由来のプロテアーゼ2A (T2A) 切断部位によって分離されている。いくつかの実施形態では、タンパク質の分泌を促進するために、20のアミノ酸のヒトインターロイキン-2 (IL-2) リーダー配列が、各Fab鎖の上流に位置する。本明細書に開示される組成物のいくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質コード配列の下流に、ウシ成長ホルモンポリアデニル化部位が存在する。

20

30

【0328】

VSの現在の標準治療は、画像診断技術が進歩し、腫瘍の成長を特定及び追跡する能力が向上したため、過去2~30年にわたり進化してきた。多くの腫瘍が低速または低成長を示し、低い成長速度が維持される限り聴力に影響を与えないであろうという認識の高まりとともに、保守的で観察的な「経過観察 (wait and rescan)」アプローチへ向かう傾向が進んでいる (MacKeith 2013；Reznitsky 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。くつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの重要な潜在的利点は、例えば、腫瘍の成長の停止、聴力の安定化、及び/または外科的切除及び/または放射線治療などのより侵襲的な治療アプローチの必要性の回避によって、この保守的な治療アプローチを強化する可能性である。理論に束縛されるものではないが、いくつかの実施形態では、VSの成長を停止させることは実質的な臨床的利益をもたらすと考えられるが、NF2患者のベバシズマブで治療したVS腫瘍の研究 (Huang 2018；Plotkin 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) で示されるように、本明細書に開示の組成物、例えばrAAV-抗VEGF治療は、腫瘍の停滞のみならず、腫瘍の収縮、語音理解の回復、及び/または語音理解の知覚された困難の軽減を促進する可能性もある。さらに、全身投与されたVEGF阻害剤を用いた研究では、NF2患者のVSに関連する症状を含む、NF2関連の生活の質の改善が示されて

40

50

いる（Plotkin 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、これらの臨床データは、rAAV-抗VEGF投与、及び腫瘍と拡散的に連続した抗VEGFタンパク質の持続的かつ局所的な発現が、VSの患者にこれらの追加の利点を提供する可能性を有することを示唆している。

【0329】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの蝸牛内投与は、基礎病因にかかわらず、将来的な治療の必要性を排除し、VS患者の生理的聴力を温存する可能性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、外科的切除及び／または放射線治療などの侵襲的な治療アプローチ、ならびに関連する生理的聴力の低下を遅延させ得る。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、方法は、標準治療の実施をさらに含む。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質治療は、腫瘍の感受性を高め、より低い放射線量を可能にすることによって放射線治療に対する対象の応答を改善し得るため、放射線治療をその後受ける対象にも潜在的な利点があり得る（Koutsimpelas 2012；Gao 2015、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0330】

AAV構築物

本開示は、抗VEGF抗体及び／または可溶性VEGF受容体（例えば、融合タンパク質アフリベルセプトなどの抗VEGF TRAPタンパク質）を含むポリヌクレオチド構築物を提供する。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、抗VEGF抗体及び／または可溶性VEGF受容体を含むポリヌクレオチドは構築物と称され、AAVカプシド内に包含されてrAAV粒子を作製し得る。特定の実施形態では、rAAV構築物はベクターとも称され得、ベクターゲノム（vg）として、例えば、ミリリットル（mL）あたりのvgとして定量化され得る。WT AAVゲノムの簡略化された概略図は、図5のパネル（A）に描写され、rAAV構築物の簡略化された概略図は、図5のパネル（B）に描写されている。

20

【0331】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、天然に存在するAAVゲノム構築物に由来する、またはそこから改変された1つ以上の構成要素を含む。いくつかの実施形態では、AAV構築物由来の配列は、AAV1構築物、AAV2構築物、AAV3構築物、AAV4構築物、AAV5構築物、AAV6構築物、AAV7構築物、AAV8構築物、AAV9構築物、AAV2.7m8構築物、AAV8BP2構築物、AAV293構築物、またはAAVAnc80構築物である。本明細書で使用する追加の例示的なAAV構築物は、当該技術分野で知られている。例えば、Kanaan et al., Mol. Ther. Nucleic Acids 8:184-197, 2017; Li et al., Mol. Ther. 16(7):1252-1260, 2008; Adachi et al., Nat. Commun. 5:3075, 2014; Isgrig et al., Nat. Commun. 10(1):427, 2019; 及び Gao et al., J. Virol. 78(12):6381-6388, 2004（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

30

40

【0332】

いくつかの実施形態では、提供される構築物は、コード配列、例えば、抗VEGF遺伝子またはその特徴的部分、1つ以上の調節配列及び／または制御配列、ならびに任意選択で5'及び3' AAV由来の逆位末端反復（ITR）を含む。5'及び3' AAV由来のITRが利用されるいくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、組換えAAV（rAAV）構築物と称され得る。いくつかの実施形態では、提供されたrAAV構築物は、AAVカプシドにパッケージングされてrAAV粒子を形成する。

【0333】

いくつかの実施形態では、AAV由来の配列（ポリヌクレオチド構築物に含まれる）は、典型的には、シス作用性5'及び3' ITR配列を含む（例えば、B. J. Carter 50

，“Handbook of Parvoviruses,” ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168, 1990 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。典型的なAAV2由来のITR配列は、約145ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、典型的なITR配列の少なくとも80% (例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%)が、本明細書に提供される構築物に組み込まれる。これらのITR配列を改変する能力は、当業者の技術範囲内である (例えば、Sambrook et al., “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; 及びK. Fisher et al., J Virol. 70:520 532, 1996 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)などのテキストを参照のこと)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意のコード配列及び／または構築物は、5'及び3' AAV ITR配列に隣接する。AAV ITR配列は、現在同定されているAAV型を含む、任意の既知のAAVから得ることができる。

10

【0334】

いくつかの実施形態では、本開示に従って記載され、当該技術分野で公知のパターンのポリヌクレオチド構築物 (例えば、Asokan et al, Mol. Ther. 20:699-7080, 2012 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと)は、典型的には、コード配列またはその一部、少なくとも1つの及び／または制御配列、ならびに任意選択で5'及び3' AAV逆位末端反復 (ITR) から構成される。いくつかの実施形態では、提供された構築物は、カプシドにパッケージングされてrAAV粒子を作製することができる。rAAV粒子は、選択された標的細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、提供された構築物は、構築物配列と異種である核酸配列 (例えば、阻害性核酸配列) である追加の任意選択のコード配列を含み、これは、目的のポリペプチド、タンパク質、機能性RNA分子 (例えば、miRNA、miRNA阻害剤) または他の遺伝子産物をコードする。いくつかの実施形態では、核酸コード配列は、標的組織の細胞におけるコード配列の転写、翻訳、及び／または発現を可能にする様式で、構成要素に作動可能に連結される、及び／またはこれを制御する。

20

【0335】

図5のパネル (A) に示すように、改変されていないAAV内因性ゲノムは、ITRに隣接した2つのオープンリーディングフレームである「cap」及び「rep」を含む。図5のパネル (B) に示すように、例示的なrAAV構築物は、同様に、コード領域、例えば、コード配列 (例えば、抗VEGF遺伝子) に隣接するITRを含む。いくつかの実施形態では、rAAV構築物はまた、プラスミド構築物をトランスフェクトされた細胞または本開示によって産生されたウイルスに感染した細胞においてその転写、翻訳、及び／または発現を可能にする様式で、コード配列に作動可能に連結された従来の制御エレメントを含む。いくつかの実施形態では、rAAV構築物は、任意選択で、プロモーター (図5のパネル (B) に示す)、エンハンサー、非翻訳領域 (例えば、5' UTR、3' UTR)、コザック配列、内部リボソーム進入部位 (IRES)、スプライシング部位 (例えば、アクセプター部位、ドナー部位)、ポリアデニル化部位 (図5のパネル (B) に示す)、またはその任意の組み合わせを含む。このような追加のエレメントは、本明細書でさらに説明される。

30

40

【0336】

いくつかの実施形態では、構築物はrAAV構築物である。いくつかの実施形態では、rAAV構築物は、少なくとも500bp、少なくとも1kb、少なくとも1.5kb、少なくとも2kb、少なくとも2.5kb、少なくとも3kb、少なくとも3.5kb、少なくとも4kb、または少なくとも4.5kbを含み得る。いくつかの実施形態では、rAAV構築物は、最大で7.5kb、最大で7kb、最大で6.5kb、最大で6kb、最大で5.5kb、最大で5kb、最大で4.5kb、最大で4kb、最大で3.5kb、最大で3kb、または最大で2.5kbを含み得る。いくつかの実施形態では、rA

50

AAV構築物は、約1 kb～約2 kb、約1 kb～約3 kb、約1 kb～約4 kb、約1 kb～約5 kb、約2 kb～約3 kb、約2 kb～約4 kb、約2 kb～約5 kb、約3 kb～約4 kb、約3 kb～約5 kb、または約4 kb～約5 kbを含み得る。

【0337】

本明細書に記載の任意の構築物は、調節配列及び／または制御配列、例えば、転写開始配列、転写終結配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、RNAスプライシング配列、ポリアデニル化（ポリ（A））配列、コザックコンセンサス配列、及び／またはそれらの任意の組み合わせの群から選択される制御配列をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ネイティブプロモーター、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、及び／または組織特異的プロモーターであり得る。制御配列の非限定的な例が本明細書に記載される。

10

【0338】

例示的な構築物構成要素

逆位末端反復配列（ITR）

構築物のAAV由来配列は、典型的には、シス作用性5'及び3' ITRを含む（例えば、B. J. Carter, "Handbook of Parvoviruses," ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990)（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。一般に、ITRはヘアピンを形成することができる。ヘアピンを形成する能力は、ITRの自己プライミング能力に寄与し得、第2のDNA鎖のプライマーゼ非依存性合成を可能にする。ITRはまた、rAAV粒子におけるrAAV構築物の効率的なカプシド形成を支援することができる。

20

【0339】

いくつかの実施形態では、本開示のrAAV粒子（例えば、AAV2／Anc80粒子）は、5'及び3' AAV ITR配列に隣接したコード配列（例えば、抗VEGF遺伝子）及び関連するエレメントを含むrAAV構築物を含み得る。いくつかの実施形態では、ITRは、約145個の核酸であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ITRをコードする配列の全てまたは実質的に全てが使用される。AAV ITR配列は、現在同定されている哺乳動物AAV型を含む、任意の既知のAAVから得ることができる。いくつかの実施形態では、ITRは、AAV2 ITRである。

【0340】

本開示で用いられる構築物分子の例は、導入遺伝子を含む「シス作用性」構築物であり、選択された導入遺伝子配列及び関連する調節エレメントは、5'側または「左」及び3'側または「右」のAAV ITR配列に隣接する。5'及び左という表記は、センス方向に左から右に読んだ、構築物全体に対するITR配列の位置を指す。例えば、いくつかの実施形態では、5'側または左のITRは、構築物がセンス方向で直線的に描写された場合に、所与の構築物のプロモーターに最も近い（ポリアデニル化配列とは対照的に）ITRである。同時に、3'及び右という表記は、センス方向に左から右に読んだ、構築物全体に対するITR配列の位置を指す。例えば、いくつかの実施形態では、3'側または右のITRは、構築物がセンス方向で直線的に描写された場合に、所与の構築物のポリアデニル化配列に最も近い（プロモーター配列とは対照的に）ITRである。本明細書で提供されるITRは、センス鎖に従って、5'から3'の順序で描写される。したがって、当業者であれば、センス方向からアンチセンス方向に変換する場合、5'側または「左」方向のITRは、3'側または「右」のITRとしても描写され得ることを理解するであろう。さらに、所与のセンスITR配列（例えば、5'側／左のAAV ITR）をアンチセンス配列（例えば、3'側／右のITR配列）に変換することは、十分に当業者の能力の範囲内である。当業者であれば、所与のITR配列を5'側／左もしくは3'側／右のITRのいずれか、またはそのアンチセンスバージョンとして使用するために改変する方法を理解するであろう。

30

40

【0341】

例えば、ITR（例えば、5' ITR）は、配列番号45に記載の配列を有することが

50

できる。いくつかの実施形態では、I T R（例えば、3' I T R）は、配列番号46に記載の配列を有することができる。いくつかの実施形態では、I T Rは、当該技術分野で知られているように1以上の改変、例えば切断、欠失、置換、または挿入を含む。いくつかの実施形態では、I T Rは、145未満のヌクレオチド、例えば、127、130、134、または141のヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、I T Rは、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、または145のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、I T R（例えば、5' I T R）は、配列番号47に記載の配列を有することができる。いくつかの実施形態では、I T R（例えば、3' I T R）は、配列番号48に記載の配列を有することができる。

10

【0342】

5' A A V I T R配列の非限定的な例は、配列番号45である。3' A A V I T R配列の非限定的な例は、配列番号46である。5' A A V I T R配列の非限定的な例は、配列番号47である。3' A A V I T R配列の非限定的な例は、配列番号48である。いくつかの実施形態では、本開示のr A A V構築物は、5' A A V I T R及び／または3' A A V I T Rを含む。いくつかの実施形態では、5' A A V I T R配列は、配列番号45である。いくつかの実施形態では、3' A A V I T R配列は、配列番号46である。いくつかの実施形態では、5' 及び3' A A V I T R（例えば、配列番号45及び46、または47及び48）は、コード配列の一部、例えば、抗V E G F遺伝子（例えば、配列番号13、14、15、19、22、42及び／または103）の全てまたは一部に隣接する。これらのI T R配列を改変する能力は、当業者の技術範囲内である（例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); 及びK. Fisher et al., J Virol. 70:520-532 (1996)（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）などのテキストを参照のこと）。いくつかの実施形態では、5' I T R配列は、配列番号45または47によって表される5' I T R配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、3' I T R配列は、配列番号46または48によって表される3' I T R配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。

20

30

【0343】

例示的な5' A A V I T R（配列番号45）

T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G
C C G C C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G
C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G
G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T

【0344】

例示的な3' A A V I T R（配列番号46）

A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G
C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C
C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C
G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A

40

【0345】

例示的な5' A A V I T R（配列番号47）

C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C C C G G G C G T C G G
G C G A C C T T T G G T C G C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C
G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T

【0346】

50

例示的な 3' A A V I T R (配列番号 48)

A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G
C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C
C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C
G A G C G C G C A G

【0347】

プロモーター

いくつかの実施形態では、構築物（例えば、r A A V 構築物）はプロモーターを含む。「プロモーター」という用語は、作動可能に連結された遺伝子（例えば、抗 V E G F 遺伝子）の転写を促進及び／または開始することができる酵素／タンパク質によって認識される DNA 配列を指す。例えば、プロモーターは、典型的には、例えば、RNA ポリメラーゼ及び／または任意の関連因子が結合し、そこから転写を開始することができるヌクレオチド配列を指す。したがって、いくつかの実施形態では、構築物（例えば、r A A V 構築物）は、本明細書に記載の非限定的な例のプロモーターの 1 つに作動可能に連結されたプロモーターを含む。

【0348】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、哺乳動物細胞プロモーター、ウイルスプロモーター、キメラプロモーター、操作されたプロモーター、組織特異的プロモーター、または当該技術分野で知られている任意の他の種類のプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物 RNA ポリメラーゼ II プロモーターなどの RNA ポリメラーゼ II プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは RNA ポリメラーゼ III プロモーターであり、これらに限定されないが、HI プロモーター、ヒト U6 プロモーター、マウス U6 プロモーター、またはブタ U6 プロモーターが挙げられる。概して、プロモーターは、内耳細胞内で転写を促進することができるものである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、蝸牛特異的プロモーターまたは蝸牛指向性プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、有毛細胞特異的プロモーター、または支持細胞特異的プロモーターである。

【0349】

本明細書で使用され得る様々なプロモーターが当該技術分野で知られている。本明細書で使用され得るプロモーターの非限定的な例としては、以下が挙げられる：ヒト E F 1 α 、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) (米国特許第 5, 168, 062 号、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ヒトユビキチン C (UBC)、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ 1、ポリオーマアデノウイルス、シミアンウイルス 40 (SV40)、 β -グロビン、 β -アクチン、 α -フェトプロテイン、 γ -グロビン、 β -インターフェロン、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ラウス肉腫ウイルス、ラットインスリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、メタロチオネイン II (MT II)、アミラーゼ、カテプシン、MI ムスカリン受容体、レトロウイルス LTR (例えば、ヒト T 細胞白血病ウイルス HTLV)、A A V I T R、インターロイキン 2、コラゲナーゼ、血小板由来増殖因子、アデノウイルス 5 E 2、ストロメライシン、マウス M X 遺伝子、グルコース調節タンパク質 (GRP 78 及び GRP 94)、 α -2-マクログロブリン、ビメンチン、MHC クラス I 遺伝子 H-2 κ b、HSP 70、プロリフェリン、腫瘍壊死因子、甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子、免疫グロブリン軽鎖、T 細胞受容体、HLA D Q α 及び D Q、インターロイキン 2 受容体、MHC クラス II、MHC クラス II HLA-DR α 、筋クレアチンキナーゼ、プレアルブミン (トランスサイレチン)、エラスターゼ I、アルブミン遺伝子、c-f o s、c-H A -r a s、神経細胞接着分子 (NCAM)、H 2 B (TH 2 B) ヒストン、ラット成長ホルモン、ヒト血清アミロイド (SAA)、トロポニン I (TN I)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ヒト免疫不全ウイルス、及びテナガザル白血病ウイルス (GALV) プロモーター。プロモーターのさらなる例は、当該技術分野で知られている。例え

ば、Lodish, Molecular Cell Biology, Freeman and Company, New York 2007 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CMV最初期プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CAGプロモーターまたはCAG/CBAプロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号49を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号50を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号51に例示されるCMV/CBAエンハンサー/プロモーター構築物を含む。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号52に例示されるCMV/CBAエンハンサー/プロモーター構築物を含む。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号53に例示されるCAGプロモーターまたはCMV/CBA/SV-40エンハンサー/プロモーター構築物を含む。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号54に例示されるCAGプロモーターまたはCMV/CBA/SV-40エンハンサー/プロモーター構築物を含む。いくつかの実施形態では、プロモーター配列は、配列番号49または50によって表されるプロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、エンハンサー-プロモーター配列は、配列番号51、52、53、または54によって表されるエンハンサー-プロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。

10

【0350】

「構成的」プロモーターという用語は、タンパク質 (例えば、抗VEGFタンパク質) をコードする核酸と作動可能に連結された際に、ほとんどまたは全ての生理的条件下で、細胞において核酸からRNAを転写させるヌクレオチド配列のことを指す。

20

【0351】

構成的プロモーターの例としては、限定されないが、以下が挙げられる：レトロウイルスラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (例えば、Boshart et al, Cell 41:521-530, 1985 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β アクトニンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター、及びEF α プロモーター (Invitrogen)。

30

【0352】

誘導性プロモーターは、遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境因子、または特定の生理学的状态、例えば急性期、細胞の特定の分化状態の存在によって、または複製中の細胞のみにおいて、調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導システムは、様々な市販の供給源 (限定されるものではないが、Invitrogen、Clontech、及びAriadを含む) から入手可能である。誘導性プロモーターのさらなる例が当該技術分野で知られている。

【0353】

外因的に供給される化合物によって調節される誘導性プロモーターの例としては、以下が挙げられる：亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン (MT) プロモーター、デキサメタゾン (Dex) 誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーターシステム (WO98/10088、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)；エクジソン昆虫プロモーター (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:3346-3351, 1996、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、テトラサイクリン抑制システム (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:5547-5551, 1992、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、テトラサイクリン誘導システム (Gossen et al, Science 268:1766-1769, 1995；また、Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518, 1998 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み

40

50

込まれる)を参照のこと)、RU486誘導システム(Wang et al., Nat. Biotech. 15:239-243, 1997及びWang et al., Gene Ther. 4:432-441, 1997、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、及びラパマイシン誘導システム(Magari et al., J Clin. Invest. 100:2865-2872, 1997、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0354】

「組織特異的」プロモーターという用語は、ある特定の特異的細胞タイプ及び／または組織内でのみ活性を有するプロモーターを指す(例えば、特異的遺伝子の転写は、組織特異的プロモーターに結合する転写調節及び／または制御タンパク質を発現する細胞内でのみ生じる)。いくつかの実施形態では、調節及び／または制御配列は組織特異的遺伝子発現能を付与する。いくつかの場合において、組織特異的調節及び／または制御配列は、組織特異的様式で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。

10

【0355】

いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは蝸牛特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは蝸牛有毛細胞特異的プロモーターである。蝸牛有毛細胞特異的プロモーターの非限定的な例としては、これらに限定されないが、ATOH1プロモーター、POU4F3プロモーター、LHX3プロモーター、MYO7Aプロモーター、MYO6プロモーター、α9ACHRプロモーター、及びα10ACHRプロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、PRES

20

【0356】

いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは、耳細胞特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、組織特異的プロモーターは、内耳細胞特異的プロモーターである。内耳非感覚細胞特異的プロモーターの非限定的な例としては、これらに限定されないが、GJB2、GJB6、SLC26A4、TECTA、DFNA5、COCH、NDP、SYN1、GFAP、PLP、TAK1、またはSOX21が挙げられる。いくつかの実施形態では、蝸牛非感覚細胞特異的プロモーターは、内耳支持細胞特異的プロモーターであり得る。内耳支持細胞特異的プロモーターの非限定的な例としては、これらに限定されないが、SOX2、FGFR3、PROX1、GLAST1、LGR5、HES1、HES5、NOTCH1、JAG1、CDKN1A、CDKN1B、SOX10、P75、CD44、HEY2、LFNG、またはS100bが挙げられる。

30

【0357】

いくつかの実施形態では、提供されるrAAV構築物は、CAG、CBA、CMV、またはCB7プロモーターから選択されるプロモーター配列を含む。本明細書に記載の任意の治療用組成物のいくつかの実施形態では、第1及び／または単独のrAAV構築物は、蝸牛及び／または内耳特異的プロモーターから選択される少なくとも1つのプロモーター配列をさらに含む。

40

【0358】

例示的なCBAプロモーター(配列番号49)

GTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCT
CCCCCCCCCTCCCCACCCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTT
TTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGCGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGG
GCGGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCGAGCCCAATCAGAG

50

C G G C G C G C T C C G A A A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G
C G G C G G C G G C C C T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G
【 0 3 5 9 】

例示的なCBAプロモーター（配列番号50）

G T C G A G G T G A G C C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T
C C C C C C C C T C C C C A C C C C C A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T
T T A A T T A T T T T G T G C A G C G A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G
G C G C G C G C C A G G C G G G G C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C
G G G G C G A G G C G G A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G
G C G C G C T C C G A A A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G
G C G G C G G C C C T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G
【 0 3 6 0 】

10

例示的なCMV／CBAエンハンサー／プロモーター（配列番号51）

G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C
G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T
A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A
A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C
C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G
G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C
A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A
T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G
A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T
T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C C C C A C G T
T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C C T C C C C A C C C C C
A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G T G C A G C G
A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A G G C G G G G
C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G A G A G G
T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A A G T T T
C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C T A T A A A A
A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G
【 0 3 6 1 】

20

30

例示的なCMV／CBAエンハンサー／プロモーター（配列番号52）

G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C
G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T
A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A
A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C
C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G
G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C
A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A
T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G
A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T
T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C C C C A C G T
T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C C T C C C C A C C C C C
A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G T G C A G C G
A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A G G C G G G G C G
G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G A G A G G T G
C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A A G T T T C C
T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C T A T A A A A A G
C G A A G C G C G C G G C G G G C G
【 0 3 6 2 】

40

50

例示的なCAGエンハンサー／プロモーター（配列番号53）

G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C
G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T
A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A
A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C
C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G
G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C
A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A
T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G
A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T 10
T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C C C C A C G T
T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C C T C C C C A C C C C C
A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G T G C A G C G
A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A G G C G G G G
C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G A G A G G
T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A A G T T T
C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C T A T A A A A
A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G G G A G T C G C T G C G T T G C C T T C
G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C G C C G C C C G C C C
C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A G G T G A G C G G G C 20
G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C G C T T G G T
T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C T G C G T G A A A G C
C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G C G G G G G G G A G C
G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G C G T G G G G A G C G
C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T G T G A G C G C T G C
G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G C G T G T G C G C G A
G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C G G T G C G G G G G G
G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G G G T G T G T G C G T
G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G C G G T C G G G C T G
T A A C C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G T T G C T G A G C A C 30
G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C G G G G C G T G G C G
C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C G G G G G G T G G C G G C A G G T G G G
G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C C G C C T C G G G C C G G G G A G G G C
T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G C C C C C G G A G C G C C G G C G G C T
G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C A G C C A T T G C C T T T T A T G G T A
A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G G A C T T C C T T T G T C C C A A A T C
T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G G A G G C G C C G C C G C A C C C C C T
C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G C G G T G C G G C G C C G G C A G G A A
G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C T T C G T G C G T C G C C G C G C C G C
C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A G C C T C G G G G C T G T C C G C G G G 40
G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G G G A C G G G G C A G G G C G G G G T T
C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G G C G G C T C T A G A G C C T C T G C T
A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T C T T T T C C T A C A G
【0363】

例示的なCAGエンハンサー／プロモーター（配列番号54）

G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C
G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T
A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A
A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C
C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G 50

GTGGACTATTTACGGTA AACTTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGATATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTA AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG
ACCTTATGGGACTTTCTCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT
TAGTCAATCGCTATTACCATGGGTGAGGGTGAGCCCCACGT
TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCC
AATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTAATTTTGTGAGCG
ATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGGCG
GGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGCGGAGAGGGTG
CGGCGGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCGCTCCGAAAGTTTCC
TTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAAAG
CGAAGCGCGCGGGCGGGCGGGGAGTGGCTGGCTTGCCCTTCGC
CCCCGTGCCCGCTCCGCGCGCGCTCGCGCGCGCCCCGCCCCG
GCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGGGCGG
GACGGGCCCTTCTCTCTCGGGCTGTAAATTAGCGCTTGGTTT
AATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGGCTGAAAGCCT
TAAAGGGCTCCGGGAGGGGCCCTTTGTGGGGGGGGGAGCGG
CTCGGGGGGGTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGGGAGCGCC
GCGTGGCGGCCCGCGCTGCCCGGGCGGGCTGTGAGCGCTGGG
GCGCGGGCGCGGGGGCTTTGTGGCTCCGCGTGTGGCGGAGG
GGAGCGCGGGCCGGGGGGCGGGTGGCCCCGCGGTGGGGGGGGG
TGCGAGGGGGAACAAGGCTGGCTGGGGGGTGTGTGGCTGG
GGGGGTGAGCAGGGGGGTGTGGGGCGCGGGCGGGTGGGGCTGTA
ACCCCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGG
CCCGGGCTTCGGGGTGGGGGGCTCCGTGGGGGGCGTGGCGCG
GGGCTCGCCGTGCCGGGGCGGGGGGGTGGCGGGCAGGTGGGGG
TGCCGGGGCGGGGGCGGGGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGGCTGT
CGAGGCGCGGGCGAGCCGCAAGCCATTGCTTTTATGGTAAT
CGTGGCAGAGGGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAAATCTG
TGCGGAGCCGA AATCTGGGAGGGCGCCGGCGCACCCCCCTCT
AGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGTGGCGGGCGCCGGCAGGAAGG
AAATGGGGCGGGGGAGGGGCCCTTCGTGGCTGGCCGGCGCCGG
TCCCCCTTCTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGGCTGTCCGGCGGGGG
GACGGCTGCCCTTCGGGGGGGGGACGGGGGAGGGGGGGTTCG
GCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAA
CCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTCTACAG

【0364】

特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号55に記載の内因性ヒトATO H1エンハンサー-プロモーターである。いくつかの実施形態では、エンハンサー-プロモーター配列は、配列番号55によって表されるエンハンサー-プロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。

【0365】

例示的なヒトATO H1エンハンサー-プロモーター（配列番号55）

CTATGGAGTTTGCATAACAACGTTTGGCAGCTCGCTCTCT
TTACACTCCATTAAACAAGCTGTAAACATATAGCTGCAGGTT
GCTATAATCTCATTTAATATTTTGGAAACTTGAATATTGAG
TATTTCTGAGTGGCTCATTTCCCCATATGCCAGCCACTTCTG
CCATGCTGACTGGTTTCTTTCTCTCCATTATTAGCAATTA
GCTTCTTACCTTCCA AAGTCAGATCCAAGGTATCCAAGAT

ACTAGCAAAGGAATCAACTATGTGTGCAAGTTAAAGCATGCT
TTAATATCACCCAAACAACAAAGAGGCGAGCATTTCTTAA
AGTAATGAAGATAGATAAATCGGGTTAGTCTTTTGCGACA
CTGCTGGTGCTTTCTAGAGTTTATATATTTTAAAGCAGCT
TGCTTTTATATTCTGTCTTTGCCCTCCCAACCCCAACAGCACT
TTTATTTGTGGAGGGTTTGTGGCTCGCCACACTTTGGGAAA
CTTATTTGATTTTACCGGAGAGGCTGAAGGAAGATCATTTTT
GGCAACAGACAAGTTTAAACACGATTTCTATGGGACATTG
CTAACTGGGGGCCCTAAGGAGAAAGGGGAAACTGAGCGGA
GAATGGGTTAAATCCTTGGAAGCAGGGGAGAGGGCAGGGGA
GGAGAGAAAGTCGGAGGAGTATAAAGAAAGGACAGGAACC
AAGAAAGCGTGGGGGTGTTTGCCTAATGTGAGTGTTTCT
TAATTAGAGAACGGTTGACAATAGAGGGTCTGGCAGAGGC
TCCTGGCCGCGGTGCGGAGCGTCTGGAGCGGAGCACGCGC
TGTCAGCTGGTGAGCGCACTCTCTTTTCAAGGCAGCTCCCC
GGGGAGCTGTGCGGCCACATTTAACACCATCATCACCCCT
CCCCGGCCCTCCTCAACCTCGGCCCTCCTCCTCGTCGACAGC
CTTCCTTGGGCCCCACAGCAGAGCTCACAGTAGCGAGCG
TCTCTCGCCGTCTCCCGCACTCGGGCCGGGGCCTCTCTCTCT
CCCCCAGCTGCGCAGCGGGAGCGCCCACTGCCCACTGCAC
CTCCCAGCAACCAGCCCCAGCACGCAAGAAGCTGCGCAAA
GTTAAAGCCCAAGCAATGCCAAGGGGAGGGGAAGCTGGAGG
CGGGCTTTGAGTGGCTTCTGGGGCGCCTGGCGGGGTCCAGAA
TCGCCCCAGAGCCCGCCCGCGGTCTGTGACACATCTGACCCGAG
TCAGCTTTGGGCACCCAGCCGAGAGCGCGGCTCCGCAACCGCTC
CCGCAACCCAGCCCGCGGGGTGGTGACACACACCGGAGTCT
GAATTACAGCCCTGCAATTAAACATATGAATCTGACGAATT
TAAAGAAAGGAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GAGTCCCTCTGCACACAAGAACTTTTCTCGGGGTGTAAAAA
CTCTTTGATTTGGCTGCTCGCACGCGCCTGCCCGCGGCCCTC
CATTGGCTGAGAAAGACACGCGACCGGGCGCGAGGAGGGGGT
TGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTGAGTGGCGCGGTGCCGCT
TTTTAAAGGGGCGCAGCGCCTTCAGCAACCAGGAGAAAGCAT
AGTTGCAACGCGACCTGGTGTTGTGATCTCCGAGTGGGTGGG
GGAGGGTCTGAGGAGGGGAAAAAATAAGACGTTGCAGAA
GAGACCCGGAAGAGGGCCTTTTTTTTGGTTGAGCTGGTGTC
CCAGTGCTGCCTCCGATCCTGAGCCTCCGAGCCTTTGCAG
TGCAA

【0366】

特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号56または57に記載の内因性ヒトSLC26A4即時(immediate)プロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号58、59、または60に記載の内因性ヒトSLC26A4エンハンサープロモーターである。いくつかの実施形態では、エンハンサープロモーター配列は、配列番号56、57、58、59、または60によって表されるプロモーターまたはエンハンサープロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号58、59、または60内に含まれるヒトSLC26A4内因性エンハンサープロモーター配列である。

【0367】

例示的なヒトSLC26A4即時プロモーター(配列番号56)

CTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAGGCAGCGGAAGGGTAGT
CCGCGGGGCAATTCCGGGCGG

【0368】

例示的なヒトSLC26A4即時プロモーター（配列番号57）

CTCTAGGCGGGGCTCTGCTCTTCTTTAAGGAGTCCCAACAGG
GCCTGGCCCGCCCCCTGACCT

【0369】

例示的なヒトSLC26A4エンハンサープロモーター（配列番号58）

TAAAGAGTTGTGAGTTGTGTAGGTTGAGTTGCCATGGAGCT
ACAAATATGAGTTGATATTCTGAAATCCTAGACAGCCATC
TCCAAGGTTAAGAAAAATCCTTATGCACTCACTTGCAAAAG
ATATCCACAGCATGCTCTTAATGGAGAAAAACAAGCCTT
AGATCAAATATGTAAAGTAATTTTTTAGTTTTTTGAAAAGG
TATGTTTTGGGCTATAGATAAATCTGTTCAAAAAACATGAG
AGAAGATAATAATGGTTTGAAAGGAGACACAGTGCTTGGCC
TCAAGAAGTTTTTTGTCTAGTGAGGGAGAGAGAAGCTTGTA
GTAAATAAAAATTTGTGTTACTAAGGTAGATAGTGAGAAAGTA
ACTTAAGAGAGGATCAGATAAGGTATTAAAGAGAATACAGA
AAAGGGTCTGGATTAAATTTCTGAACAGCATCAAAGAATGTT
CTTGCAAGAGATAGTGTTTTTCACCAGATCTTGAAAGGTATG
GATGAGGGTATACAGAGTGAGTATATTTCAGATTCTACTTT
AAAAACAATACTTTCTCTCTGTTGTAGTGAGTTTGAGCTAT
ACATCCAACAATAATGAAAAAATACACGCATATATACATA
TATGGAGAGAGATACATATTTTAGTACATGTAGCAATTGA
TTAATAAATGTACAGTTTTAAGTCGCATGCAAAACCTTGGA
GTGATAGCAAACTTCATTGTAGGATGTTTTAGCAGCATCTC
TGGTCTCTACTCACTAGATCCCAATAGCATCTCCCTAGGT
GTGACAAACCAAAAATGTCTCCAGGCATTGACCTCTGGAGG
CAAAAAAAGCCCTTTATTAAAGAACCCAGTGGTATACATAAG
TAAAACATACACAAGAGATTCTCTCCCTCTTCTCTGTATG
TGAATAAAAAATTTGCAAGGTTTCATGACCTGGATTTTCTTT
TAGGTTTTCTTCTTTAGTGTTCTTAACCTTCATTGGGTGAA
GTAAGCCTTTGAAGATCTGTTGAAAGCTGTTGACTCATTC
ACTTCTCAGGAACACGACATGCTGACTACCATTTTCAGAG
AATTTGCATCAGGGTTCTCTGGGGAGGAGTTCTGAGTTCT
GTTTTCCAGGAGCTCGTAGAATTGTGTCATGGTCTGCATATGC
AAGGCAGGTGGATTACGGAAGGTTGATGTACAGAGGTCTG
TATTTTGGAGCCTCTTCTGTATTTACTTCAGAACACTAAC
AATCAGGCGAGGAATGTTCTGGTTTATCAAACCCCTTCTTCT
TGCCTTTTCATCTTAACCATGCATTAGTTTTTAACAAAGTTCT
ATCCCAACAGAAAGACAAAAACACTGATGAGGTAGGATAGCT
CCAGCTCCTCCTCCTCCTCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGT
AGTCCAGTTTTATTCTTCTCCCTGATTGTCCAGGAGGAATGAG
AAAAAGAAAAAACAGAGTCTAGTGGGTAAGAAAGGGCCAC
CTGGACGGCTTGATTTGGATTGTGAAATAAAACACACACA
CATGCACACGTAGAATAAGTGGCTAAAAATCTGAGTAATC
GTGAACCTCTCTGTATCCTCCACCCATTGAATACTCCTAAA
AGACTTTCTAGAAATTCAAGGACTTATTATAATATAGAAACC
TGGCCATTGTTCTCTCTCTCTCCTCCCATGTGGGTATGAGAG
CACCTGTGGCAGGCTCCCAGAGACCACGGACCTCTTCTCTC

10

20

30

40

50

T A G G C G G G C T C T G C T C T T C T T T A A G G A G T C C C A C A G G G C C
T G G C C C G C C C C T G A C C T C G C A A C C C T T G A G A T T A G T A A C G
G G A T G A G T G A G G A T C C G G G T G G C C C C T G C G T G G C A G C C A G
T A A G A G T C T C A G C C T T C C C G G T T C G G G A A A G G G G A A G A A T
G C A G G A G G G G T A G G A T T T C T T T C C T G A T A G G A T C G G T T G G
G A A A G A C C G C A G C C T G T G T G T G T C T T T C C C T T C G A C C A A G
G T G T C T G T T G C T C C G T A A A T A A A A C G T C C C A C T G C C T T C T
G A G A G C G C T A T A A A G G C A G C G G A A G G G T A G T C C G C G G G G C
【0370】

例示的なヒトSLC26A4エンハンサープロモーター（配列番号59）

G G C T G C T C G G A A A A C A G G A C G A G G G G A G A G A C T T G C T C A A
T A A G C T G A A A G T T C T G C C C C C G A G A G G G C T G C G A C A G C T G
C T G G A A T G T G C C T G C A G C G T C C G C C T C T T G G G G A C C C G C G
G A G C G C G C C C T G A C G G T T C C A C G C C T G G C C C G G G G G T C T G
C A C C T C T C C T C C A G T G C G C A C C T G G A G C T G C G T C C C G G G T
C A G G T G C G G G G A G G G A G G G A A T C T C A G T G T C C C C T T C C A G
C C T T G C A A G C G C C T T T G G C C C C T G C C C C A G C C C C T C G G T T
T G G G G G A G A T T T C A G A A C G C G G A C A G C G C C C T G G C T G C G G
G C C A T A G G G G A C T G G G T G G A A C T C G G G A A G C C C C C A G A G C
A G G G G C T T A C T C G C T T C A A G T T T G G G G A A C C C C G G G C A G C
G G G T G C A G G C C A C G A G A C C C G A A G G T T C T C A G G T G C C C C C
C T G C A G G C T G G C C G T G C G C G C C G T G G G G C G C T T G T C G C G A
G C G C C G A G G G C T G C A G G A C G C G G A C C A G A C T C G C G G T G C A
G G G G G G C C T G G C T G C A G C T A A C A G G T G A T C C C G T T C T T T C
T G T T C C T C G C T C T T C C C C T C C G A T C G T C C T C G C T T A C C G C
G T G T C C T C C C T C C T C G C T G T C C T C T G G C T C G C A G G T C A T G
G C A G C G C C A G G C G G C A G G T C G G A G C C G C C G C A G C T C C C C G
A G T A C A G C T G C A G C T A C A T G G T G T C G C G G C C G G T C T A C A G
C G A G C T C G C T T T C C A G C A A C A G C A C G A G C G G C G C C T G C A G
G A G C G C A A G A C G C T G C G G G A G A G C C T G G C C A A G T G C T G C A
G G T A G C G G C C G C G C G G G C C T G C G T A G A G A G A A G C G G A G C G
G G G C G T C C A C G C C T T G G G G A G G G A A G G G C G T C C C C A G C G G
G C G A G A G T G G G G T G C G G G C G G C G G A G C C C C T G G G C G C C A G
C T G C T T C T C C C A G A G G C C C G A C T T T C G G T C T C C G G T C C T C
C A C G C C G C C C T T C T G G T G G G A G G G T G G C T C C A T C A G T C T C
G G G C C C G A A A T G A A C T T A C C T G G G A A A C T C G C C T T T G G G G
A G A G T G G G T T C T A G G A G C C C C G T C T C T C T T T T T C C T C T C T
G A A G G A A A C T T G G A G T G C C T C T T G G G G T A C A G T G G G T C C C
T G T T G C C T T C T T G G G A G C T T G T T T A A A T G A A A T G A A T A G G
G A A A C C C A G C T C T T G A C C A G G A G G A G T C C T T G A A A C A C T C
A A G C T A A G T A G G C G G G C T A C C A T T C A G T T A G A G A C C A G G A
T G C A A G C T A G A A C C C A G G G G A G C G C G G G G T G T G C C A A G T A
C T T C A T C A G C A G G C T G T G G G A C C C C T G G G G A A A G C C A C C C
T C A G T C T C T A A A C C C A A A C A T G C C G T A A C T A G A T G T C A C A
A A C A T A A A G A A A T T A G A G T T T C T A A A A C C T T T C A T T A T A G
【0371】

例示的なヒトSLC26A4エンハンサープロモーター（配列番号60）

C G G A A G G T T G A T G T A C A G A G G T C T G T A T T T T G G A G C C T C T
T C T G T A T T T A C T T C A G A A C A C T A A C A A T C A G G C G A G A A T G
T T C T G G T T T A T C A A A C C C T T C C T T C T G C C T T T C A T C T T A A

10

20

30

40

50

CCATGCATTAGTTTAAACAAGTTTCATCCCAACAGAAAGAC
AAAACACTGATGAGGTAGGATAGCTCCAGCTCCTCCTCCC
TCTCTTCTAGTCTTGATTTCCATGTAGTCCAGTTTATTCC
TTCCCTGATTGTCCAGGAGAAATGAGAAAAAGAAAAACAG
AGTCTAGTGGGTAAAGAAAGGGCCACCTGGACGGCTTGATT
TGGATTGTGAAATAAAACACACACACATGCACACGTAGAA
TAAGTGGCTAAAAATCTGAGTAAATCGTGAACCTCTCTGTAT
CCTCCACCCATTGAATACTCCTAAAAGACTTTCTAGAAAT
TCAAGGACTTATTAATAATAGAAACCTGGGCCATTGTTCCTC
TTCTCCTCCCCCATGTGGTATGAGAGCACCTGTGGCAGGCT
CCCAGAGACCACGGACCTCTTCTCTAGGCGGGGCTCTGCT
CTTCTTTAAAGGAGTCCCAACAGGGCCTGGCCCGCCCCCTGAC
CTCGCAACCCTTGAGATTAGTAACGGGATGAGTGAGGATC
CGGGTGGCCCCCTGCGTGGCAGCCAGTAAGAGTCTCAGCCT
TCCCGGTTTCGGGAAGGGGAAGAAATGCAGGAGGGGGTAGGA
TTTCTTTCTCTGATAGGATCGGGTTGGGAAGAGCCGCGAGCCT
GTGTGTGTCTTTCCCTTCGACCAAGGTGTCTGTGTGCTCCG
TAAATAAAACGTCCCACCTGCCTTCTGAGAGCGCTATAAAG
GCAGCGGAAGGGTAGTCCGCGGGGGCATTCGCGGGCGGGGCG
CGAGCAGAGACAGGTGAGTT

10

20

【0372】

特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号61に記載のヒトLGR5エンハンサー-プロモーターである。いくつかの実施形態では、エンハンサー-プロモーター配列は、配列番号61によって表されるエンハンサー-プロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、プロモーターは配列番号61内に含まれるヒトLGR5内因性エンハンサー-プロモーター配列である。

【0373】

例示的なヒトLGR5エンハンサー-プロモーター（配列番号61）

AGGGCTATTTGTACCTCAACGAGGGGCTTCTCTCCAAAGAAA
GCCCTGAATCCTTTTCTCTCTTTTCTCTGCAGATTCACTA
TAGGACACTTTTGAAGCAAGAGCATGCATTTTCCCCCTG
GCGCTCTGCAGCGGTCTCAGAGCCAGTGTCCTCACTCACT
AGGTGGGACTGCTCTCAGTTTCAGAGAGCGCTGGGACACTT
AAGATGAAAAGTCCCTGGAAGTTAGCAAACAGCCATCTGT
CACTCTGGCATCGATTTACTAAAAGTGACTTCTAGGGGTAT
TCTAAACCACCTTTTAAAAAACAAATGAGTCACTTCGACTT
CCTCACCCCGCAAGAGATAGGAAGGCAGCAGTGGAAGTGCT
CGCTCAGGAGCTGTATTTGTTTAGCGATTAGCCTAGAGCT
TTGATTTTAGGGCAAAAGCGAGCCAGACAGTGCGGGCAGAC
GTAAGGATCAAAAAGGCCACCTATCATTCGCCGGGGGACGC
CTGCCCTCCTTACCCTGATAACGTAACTATTTCTCTGCATA
GGATTTTAGTTTTTTGTGTTTTTTGTTTTTATTCGT
TAATCACTTCAAGTATCTCATTCATTATTTGAAGCGGGCT
CGGAGGAACGTTGCCGCATCCTCCAGTCCCTTGTCGTCTG
TTTAGGTCTCTCCGAAGCAGGTCCCTCTCGACTCTTAGAT
CTGGGTCTCCAGCACGCATGAAGGGGGTAAGGGGTGGGGGGG
TCCCCATTTCCGGCGCGCGCGCGGTGAGCACTGAATCTTCC
AGGCGGAGGCTCAGTGAGGAGCGCCGAGAACTCGCCAGTAC
CGCGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCCCTCCAGCCAGGACT

30

40

50

T G G G A A A G G A G G G A G G G G A C A A G T G G A G G G A A A G T G G G G C
C G G G C G G G G G G T G C C T G G G A A G C C A G G C T G C G C T G A C G T C
A C T G G G C G C G C A A T T C G G G C T G G A G C G C T T T A A A A A A C G A
G C G T G C A A G C A G A G A T G C T G C T C C A C A C C G C T C A G G C C G C
G A G C A G C A G C A A G G C G C A C C G C C A C T G T C G C C G C T G C A G C
C A G G G C T G C T C C G A A G G C C G G C G T G G C G G C A A C C G G C A C C
T C T G T C C C C G C C G C G C T T C T C C T C G C C G C C C A C G C C G T G G
G G T C A G G A A C G C G G C G T C T G G C G C T G C A G A C G C C C G C T G A
G T T G C A G A A G C C C A C G G A G C G G C G C C C G G C G C G C C A C G G C
C C G T A G C A G T C C G G T G C T G C T C T C C G C C C G C G T C C G G C T C
G T G G C C C C C T A C T T C G G G C A C C G A C C G G T

10

【0374】

特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号62に記載のヒトSYN1エンハンサー-プロモーターである。いくつかの実施形態では、エンハンサー-プロモーター配列は、配列番号62によって表されるエンハンサー-プロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、プロモーターは配列番号62内に含まれるヒトSYN1内因性エンハンサー-プロモーター配列である。

【0375】

例示的なヒトSYN1エンハンサー-プロモーター（配列番号62）

20

T G C G T A T G A G T G C A A G T G G G T T T T A G G A C C A G G A T G A G G C
G G G G T G G G G G T G C C T A C C T G A C G A C C G A C C C C G A C C C A C T
G G A C A A G C A C C C A A C C C C C A T T C C C C A A A T T G C G C A T C C C
C T A T C A G A G A G G G G G A G G G G A A A C A G G A T G C G G C G A G G C G
C G T G C G C A C T G C C A G C T T C A G C A C C G C G G A C A G T G C C T T C
G C C C C C G C C T G G C G G C G C G C G C C A C C G C C G C C T C A G C A C T
G A A G G C G C G C T G A C G T C A C T C G C C G G T C C C C C G C A A A C T C
C C C T T C C C G G C C A C C T T G G T C G C G T C C G C G C C G C C G C C G G
C C C A G C C G G A C C G C A C C A C G C G A G G C G C G A G A T A G G G G G G
C A C G G G C G C G A C C A T C T G C G C T G C G G C G C C G G C G A C T C A G
C G C T G C C T C A G T C T G C G G T G G G C A G C G G A G G A G T C G T G T C
G T G C C T G A G A G C G C A G T C G A G A A

30

【0376】

特定の実施形態では、プロモーターは、配列番号63に記載のヒトGFAPエンハンサー-プロモーターである。いくつかの実施形態では、エンハンサー-プロモーター配列は、配列番号63によって表されるエンハンサー-プロモーター配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、プロモーターは配列番号63内に含まれるヒトGFAP内因性エンハンサー-プロモーター配列である。

【0377】

例示的なヒトGFAPエンハンサー-プロモーター（配列番号63）

40

C C C A C C T C C C T C T C T G T G C T G G G A C T C A C A G A G G G A G A C C
T C A G G A G G C A G T C T G T C C A T C A C A T G T C C A A A T G C A G A G C
A T A C C C T G G G C T G G G C G C A G T G G C G C A C A A C T G T A A T T C C
A G C A C T T T G G G A G G C T G A T G T G G A A G G A T C A C T T G A G C C C
A G A A G T T C T A G A C C A G C C T G G G C A A C A T G G C A A G A C C C T A
T C T C T A C A A A A A A A G T T A A A A A A T C A G C C A C G T G T G G T G A
C A C A C A C C T G T A G T C C C A G C T A T T C A G G A G G C T G A G G T G A
G G G G A T C A C T T A A G G C T G G G A G G T T G A G G C T G C A G T G A G T
C G T G G T T G C G C C A C T G C A C T C C A G C C T G G G C A A C A G T G A G

50

40

50

語は、目的のタンパク質（例えば、抗 V E G F タンパク質）をコードする核酸の転写レベルを増加させることができるヌクレオチド配列を指す。エンハンサー配列（一般的に 50 ～ 1500 塩基対長）は、概して、転写関連タンパク質（例えば、転写因子）にさらなる結合部位を提供することによって転写レベルを増加させる。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列はイントロン配列内に見出される。プロモーター配列とは異なり、エンハンサー配列は、（例えば、プロモーターと比較して）転写開始部位からはるかに遠く離れて作用することができる。エンハンサーの非限定的な例としては、R S V エンハンサー、C M V エンハンサー、及び／または S V 40 エンハンサーが挙げられる。いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 64 によって例示される C M V エンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、配列番号 64 によって表されるエンハンサー配列と少なくとも 85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 同一である。いくつかの実施形態では、S V - 40 由来のエンハンサーは、配列番号 65 によって例示される S V - 40 イントロン配列である。いくつかの実施形態では、エンハンサー配列は、配列番号 65 によって表されるエンハンサー配列と少なくとも 85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % 同一である。

10

20

30

40

50

【0379】

例示的な C M V エンハンサー（配列番号 64）

G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C
G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T
A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A
A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C
C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G
G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C
A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A
T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G
A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T
T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G

【0380】

例示的な S V - 40 合成イントロン（配列番号 65）

G G A G T C G C T G C G T T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G
C C G C C T C G C G C C G C C C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T
A C T C C C A C A G G T G A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G
G G C T G T A A T T A G C G C T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T
T T C T G T G G C T G C G T G A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G
C C C T T T G T G C G G G G G G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T
G T G T G T G T G C G T G G G G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C
C C G G C G G C T G T G A G C G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G
T G C G C T C C G C G T G T G C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G
G T G C C C C G C G G T G C G G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C
T G C G T G C G G G G T G T G T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G G G G T G
T G G G C G C G G C G G T C G G G C T G T A A C C C C C C C T G C A C C C C C
C T C C C C G A G T T G C T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G
G C T C C G T G C G G G G C G T G G C G C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C
G G G G G T G G C G G C A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C
C G C C T C G G G C C G G G G A G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G
C C C C C G G A G C G C C G G C G G C T G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C
A G C C A T T G C C T T T T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G
G A C T T C C T T T G T C C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G
G A G G C G C C G C C G C A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G
C G G T G C G G C G C C G G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C

T T C G T G C G T C G C C G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A
 G C C T C G G G G C T G T C C G C G G G G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G
 G G A C G G G G C A G G G C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G
 G C G G C T C T A G A G C C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T
 C T T T T T C C T A C A G

【0381】

非翻訳領域：5' UTRと3' UTR

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の構築物は、5' UTRまたは3' UTRなどの非翻訳領域（UTR）を含み得る。遺伝子のUTRは、転写されるが翻訳されない。5' UTRは、転写開始部位で始まり、開始コドンまで続くが、開始コドンは含まない。3' UTRは終止コドンの直後から始まり、転写終結シグナルまで続く。UTRの調節及び／または制御機能を、本明細書に記載の任意の構築物、組成物、キット、または方法に組み込み、抗VEGFタンパク質の発現を増強するか、さもなければ調節することができる。

10

【0382】

天然の5' UTRには、翻訳開始に関与する配列が含まれている。いくつかの実施形態では、5' UTRは、リボソームが多く、遺伝子の翻訳を開始するプロセスに関与することが一般に知られているコザック配列のような配列を含み得る。コザック配列は、コンセンサス配列CCR (A/G) CCAUGGを有し、ここでRは開始コドン(AUG)の3塩基上流のプリン(AまたはG)であり、開始コドンの後には別の「G」が続く。5' UTRはまた、伸長因子の結合に関与する二次構造を形成することが知られている。

20

【0383】

いくつかの実施形態では、5' UTRは、本明細書に記載の任意の構築物に含まれる。5' UTRの非限定的な例（以下の遺伝子からのものを含む：アルブミン、血清アミロイドA、アポリポタンパク質A/B/E、トランスフェリン、αフェトリン、エリスロポエチン、及び第VII因子）を使用して、核酸分子、例えば、mRNAの発現を強化することができる。

【0384】

いくつかの実施形態では、蝸牛内の細胞によって転写されるmRNAからの5' UTRが、本明細書に記載の任意の構築物、組成物、キット、及び方法に含まれ得る。いくつかの実施形態では、5' UTRは、内因性遺伝子座に由来し、内因性配列の全てまたは一部を含み得る。

30

【0385】

3' UTRは、目的の遺伝子の終止コドンのすぐ3'側に見出される。いくつかの実施形態では、蝸牛内の細胞によって転写されるmRNAからの3' UTRが、本明細書に記載の任意の構築物、組成物、キット、及び方法に含まれ得る。いくつかの実施形態では、3' UTRは、内因性遺伝子座に由来し、内因性配列の全てまたは一部を含み得る。

【0386】

3' UTRは、その中に組み込まれたアデノシンとウリジン（RNA形態の場合）またはチミジン（DNA形態の場合）のストレッチを有することが知られている。これらのAUリッチシグネチャーは、高い回転率を有する遺伝子内で特に広く見られる。これらの配列的特徴及び機能的特性に基づいて、AUリッチエレメント（ARE）は以下の3つのクラスに分離することができる（Chen et al., Mol. Cell. Biol. 15: 5777-5788, 1995; Chen et al., Mol. Cell. Biol. 15: 2010-2018, 1995、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。クラスI AREは、Uリッチ領域内にいくつかの分散したAUUAモチーフのコピーを含む。例えば、c-Myc及びMyoD mRNAは、クラスI AREを含む。クラスII AREは、2つ以上の重複するUUAUUA (U/A) (U/A) 九量体を有する。GM-CSF及びTNF-α mRNAは、クラスII AREを含む例である。クラスIII AREはそれほど十分に定義されていない。これ

40

50

らのUリッチ領域はA U U U Aモチーフを含まず、このクラスにおけるよく研究された2つの例としてc - J u n及びミオゲニンm R N Aがある。

【0387】

A R Eに結合するほとんどのタンパク質はメッセンジャーを不安定にすることが知られており、一方E L A Vファミリーのメンバー、とりわけH u Rはm R N Aの安定性を増加させることが実証されている。H u Rは、これら3つのクラス全てのA R Eに結合する。H u R特異的結合部位を核酸分子の3' U T Rに導入操作(e n g i n e e r i n g)することにより、H u R結合、ひいてはi n v i v oでのメッセージの安定化がもたらされ得る。

【0388】

いくつかの実施形態では、3' U T R A R Eの導入、除去、または修飾を用いて、抗V E G Fタンパク質をコードするm R N Aの安定性を調節することができる。他の実施形態では、A R Eを除去するか、または変異させて、抗V E G Fタンパク質の細胞内安定性を増加させ、ひいてはその翻訳及び産生を増加させることができる。

【0389】

他の実施形態では、非A R E配列が5' または3' U T Rに組み込まれてもよい。いくつかの実施形態では、イントロンまたはイントロン配列の部分は、本明細書で提供される任意の構築物、組成物、キット、及び方法において、ポリヌクレオチドの隣接領域に組み込まれ得る。イントロン配列の組み込みは、タンパク質産生及びm R N Aレベルを増加させ得る。

【0390】

内部リボソーム進入部位(I R E S)

いくつかの実施形態では、抗V E G Fタンパク質をコードする構築物は、内部リボソーム進入部位(I R E S)を含み得る。I R E Sは複合的な二次構造を形成しており、この構造により、I R E Sの位置からすぐ下流のm R N Aによって任意の位置から翻訳を開始させることができる(例えば、P e l l e t i e r a n d S o n e n b e r g , M a l . C e l l . B i o l . 8 (3) : 1 1 0 3 - 1 1 1 2 , 1 9 8 8 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

【0391】

当業者に知られているI R E S配列はいくつか存在し、例えば、口蹄疫ウイルス(F M D V)、脳心筋炎ウイルス(E M C V)、ヒトライノウイルス(H R V)、コオロギ麻痺ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)、A型肝炎ウイルス(H A V)、C型肝炎ウイルス(H C V)、及びポリオウイルス(P V)からのI R E S配列が挙げられる。例えば、A l b e r t s , M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e C e l l , G a r l a n d S c i e n c e , 2 0 0 2 ; 及びH e l l e n e t a l . , G e n e s D e v . 1 5 (1 3) : 1 5 9 3 - 6 1 2 , 2 0 0 1 (これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0392】

いくつかの実施形態では、抗V E G Fタンパク質、または抗V E G Fタンパク質の一部をコードする構築物に組み込まれるI R E S配列は、口蹄疫ウイルス(F M D V) 2 A配列である。口蹄疫ウイルス2 A配列は、ポリタンパク質の切断を媒介することが示されている小さなペプチド(およそ18アミノ酸長)である(R y a n , M D e t a l . , E M B O 4 : 9 2 8 - 9 3 3 , 1 9 9 4 ; M a t t i o n e t a l . , J V i r o l o g y 7 0 : 8 1 2 4 - 8 1 2 7 , 1 9 9 6 ; F u r l e r e t a l . , G e n e T h e r a p y 8 : 8 6 4 - 8 7 3 , 2 0 0 1 ; 及びH a l p i n e t a l . , P l a n t J o u r n a l 4 : 4 5 3 - 4 5 9 , 1 9 9 9、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。2 A配列の切断活性は、プラスミド及び遺伝子治療構築物(A A V及びレトロウイルス)を含む人工システムにおいてこれまでに実証されている(R y a n e t a l . , E M B O 4 : 9 2 8 - 9 3 3 , 1 9 9 4 ; M a t t i o n e t a l . , J V i r o l o g y 7 0 : 8 1 2 4 - 8 1 2 7 , 1 9

10

20

30

40

50

96; Furler et al., Gene Therapy 8: 864-873, 2001; 及び Halpin et al., Plant Journal 4: 453-459, 1999; de Felipe et al., Gene Therapy 6: 198-208, 1999; de Felipe et al., Human Gene Therapy I I: 1921-1931, 2000; 及び Klump et al., Gene Therapy 8: 811-817, 2001、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0393】

IRESはrAAV構築物で利用できる。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質のC末端部分をコードする構築物は、ポリヌクレオチド内部リボソーム進入部位(IRES)を含むことができる。いくつかの実施形態では、IRESは、2つ以上の構築物を含む組成物の一部であり得る。いくつかの実施形態では、IRESは、単一の遺伝子転写産物から2つ以上のポリペプチドを産生するために使用される。

【0394】

分泌及び切断シグナル

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される任意の構築物は、分泌シグナル、切断部位、及び／またはリンカー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、これらの部位は翻訳されたタンパク質において機能的であり、翻訳後修飾及び／またはプロセッシング事象をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物は、比較的長い前駆体ポリペプチドに翻訳され、そのような前駆体ポリペプチドは、次に、翻訳後修飾及び／またはプロセッシングを受け得、これには内因性の細胞酵素が関与する可能性がある。このようなプロセッシングステップは、複数のペプチドを生成し、このようなペプチドの生物学的機能は、1つのペプチドのみによって、または協調して作用する複数のペプチドの機能によって達成され得る。

【0395】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される構築物は、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、シグナル配列、標的化シグナル、局在化シグナル、局在化配列、輸送ペプチド、リーダー配列、またはリーダーペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、そのような配列は、一般に短い(例えば、およそ16~30アミノ酸長)。いくつかの実施形態では、そのようなシグナルペプチドは、目的のペプチドのN末端に存在する。いくつかの実施形態では、2つ以上のシグナルペプチドが翻訳産物中に存在し得る。いくつかの実施形態では、例示的なシグナルペプチドは、インターロイキン-2(IL2SS)からの分泌シグナルを含む。いくつかの実施形態では、例示的なシグナルペプチドは、配列番号66または67によって表されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、そのようなアミノ酸配列は、配列番号68によって表され、そのような配列と95%、90%、85%、80%、または75%同一であり得る。当業者であれば、別の分泌シグナル配列が存在し、本明細書に記載の構築物に組み込まれ得ることを認識するであろう。

【0396】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される構築物は、リンカーペプチドを含む。いくつかの実施形態では、リンカーペプチドは、翻訳産物において2つ以上の機能的ペプチドを連結するために利用される。いくつかの実施形態では、そのようなリンカーペプチドは、内因性ペプチダーゼの認識配列などの追加の機能的配列を含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなリンカー配列は、フリン切断シグナルを含む。いくつかの実施形態では、フリン切断シグナルを含む例示的なリンカー配列は、配列番号71によって表されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、そのようなリンカー配列はフリン切断シグナルを含み、配列番号72によって表すことができるか、またはそのような配列とおおよそ90%、80%、70%、または60%類似し得る。いくつかの実施形態では、リンカーペプチド配列は、1アミノ酸長、2アミノ酸長、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ

酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、または20アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーペプチド配列は、最大50アミノ酸長であり得る。当業者であれば、別のリンカー配列が存在し（機能的であってもなくても）、本明細書に記載の構築物に組み込まれ得ることを認識するだろう。

【0397】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される構築物は、翻訳中にポリペプチド切断及び／またはペプチド結合の形成の失敗を誘導するペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物は、いくつかの実施形態では2A自己切断ペプチドであり得る、自己切断ペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなペプチドは、およそ18～22アミノ酸長、例えば、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、または22アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、そのようなペプチドは、タンパク質の翻訳中にリボソームスキッピングを誘発し得る。いくつかの実施形態では、2A自己切断ペプチドは、DxE x NPGP（配列番号115）のコア配列モチーフによって表され、様々なウイルスファミリーにおいて内因的に存在する。いくつかの実施形態では、自己切断ペプチドは、リボソームがペプチド結合を作成できないようにすることによって、単一の転写産物からポリタンパク質を生成する。いくつかの実施形態では、自己切断及び／または切断シグナルは、配列番号69によって表されるヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、自己切断及び／または切断シグナルは、配列番号70、またはおよそ95%、90%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、もしくは50%の同一性を共有する配列によって表される。当業者であれば、別のペプチド切断配列が存在し（自己切断型または内因性細胞機構の助けを必要とするもの）、本明細書に記載の構築物に組み込まれ得ることを認識するだろう。

【0398】

例示的なシグナル分泌ヌクレオチド配列（配列番号66）

ATGTACCGGATGCAAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCT
TGGCCCTGGTCAACCAATTCT

【0399】

例示的なシグナル分泌ヌクレオチド配列（配列番号67）

ATGTATAGAATGCAAGCTCCTGTCCTGCATTGCCCCCTGAGCC
TGGCTCTCTCGTGACCAACAGC

【0400】

例示的なシグナル分泌アミノ酸配列（配列番号68）

MYRMQLLSICIALSLALVTNS

【0401】

例示的な切断シグナルヌクレオチド配列（配列番号69）

GGCTCTGGCGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGTGGCG
ACGTGGAAGAGAAACCCCGGACCT

【0402】

例示的な切断シグナルアミノ酸配列（配列番号70）

SGEGRGSLLTCGDVEENPGP

【0403】

例示的なリンカー／切断シグナルヌクレオチド配列（配列番号71）

GACAAGACCCACACCGGCAAGCGGAAGAGAGAGA

【0404】

例示的なリンカー／切断シグナルアミノ酸配列（配列番号72）

DKTHTGKRKR

【0405】

スプライス部位

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される任意の構築物は、転写中に生じるRNAプロセッシング中に機能する、スプライスドナー及び／またはスプライスアクセプター配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、スプライス部位はトランススプライシングに関与する。

【0406】

例示的なスプライスドナーイントロン（配列番号73）

G T A A G T A T C A A G G T T A C A A G A C A G G T T T A A G G A G A C C C A A T
A G A A A C T G G G C T T G T C G A G A C A G A G A A G A C T C T T G C G T T T
C T

10

【0407】

例示的なスプライスアクセプターイントロン（配列番号74）

G A T A G G C A C C T A T T G G T C T T A C T G A C A T C C A C T T T G C C T T
T C T C T C C A C A G

【0408】

ポリアデニル化配列

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される構築物は、ポリアデニル化（ポリ（A））シグナル配列を含み得る。真核生物のほとんどの新生mRNAは、その3'末端にポリ（A）テールを有し、これは、ポリ（A）シグナル配列によって駆動される一次転写産物の切断と、共役したポリアデニル化反応とを含む複合プロセス中に付加される（例えば、Proudfoot et al., Cell 108:501-512, 2002（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。ポリ（A）テールは、mRNAの安定性及び移行性をもたらす（Molecular Biology of the Cell, Third Edition, B. Alberts et al., Garland Publishing, 1994、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列は、コード配列に対して3'側に位置する。

20

【0409】

本明細書で使用される場合、「ポリアデニル化」は、ポリアデニル部分またその修飾バリエーションとメッセンジャーRNA分子との共有結合による連結を指す。真核生物では、ほとんどのメッセンジャーRNA（mRNA）分子は、3'末端でポリアデニル化される。3'ポリ（A）テールは、酵素であるポリアデニル酸ポリメラーゼの作用によってプレmRNAに付加されるアデニンヌクレオチドの長い配列（例えば、50、60、70、100、200、500、1000、2000、3000、4000、または5000）（配列番号117）である。いくつかの実施形態では、ポリ（A）テールは、特定の配列、例えば、ポリ（A）シグナルを含む転写産物上に付加される。ポリ（A）テール及び関連するタンパク質は、エキソヌクレアーゼによる分解からmRNAを保護するのに役立つ。ポリアデニル化はまた、転写終結、mRNAの核外への搬出、及び翻訳において役割を果たす。ポリアデニル化は、通常、DNAのRNAへの転写直後に核内で生じるが、より後で細胞質においても生じ得る。転写が終結した後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼに関連するエンドヌクレアーゼ複合体の作用によって切断される。切断部位は通常、切断部位の近くにある塩基配列AAUAAAの存在を特徴とする。mRNAが切断された後、アデノシン残基が切断部位の遊離3'末端に付加される。

30

40

【0410】

本明細書で使用される場合、「ポリ（A）シグナル配列」または「ポリアデニル化シグナル配列」は、エンドヌクレアーゼによるmRNAの切断、及び切断されたmRNAの3'末端への一連のアデノシンの付加を誘発する配列である。

【0411】

使用され得るいくつかのポリ（A）配列が存在し、これには、ウシ成長ホルモン（bGH）（Woychik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S

50

．A．81（13）：3944－3948，1984；米国特許第5，122，458号、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、マウス－β－グロビン、マウス－α－グロビン（Orkin et al.，EMBO J. 4（2）：453－456，1985；Thein et al.，Blood 71（2）：313－319，1988、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ヒトコラーゲン、ポリオーマウイルス（Batt et al.，Mol. Cell Biol. 15（9）：4783－4790，1995、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（HSV TK）、IgG重鎖遺伝子ポリアデニル化シグナル（US 2006／0040354、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ヒト成長ホルモン（hGH）（Szymanski et al.，Mol. Therapy 15（7）：1340－1347，2007、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、SV40後期及び初期ポリ（A）部位などのSV40ポリ（A）部位からなる群（Scheek et al.，Mol. Cell Biol. 12（12）：5386－5393，1992、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に由来するものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0412】

ポリ（A）シグナル配列は、AATAAAであり得る。AATAAA配列は、ポリアデニル化をシグナル伝達可能であるAATAAAに相同な他のヘキサヌクレオチド配列と置換されてもよく、このような配列には、ATTAAA、AGTAAA、CATAAA、TATAAA、GATAAA、ACTAAA、AATATA、AAGAAA、AATAAT、AAAAAA、AATGAA、AATCAA、AACAAA、AATCAA、AATAAC、AATAGA、AATTTAA、またはAATAAGが含まれる（例えば、WO06／12414（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

【0413】

いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列は、合成ポリアデニル化部位であり得る（例えば、Levitte et al.，Genes Dev. 3（7）：1019－1025，1989（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づくPromegaのpCleo発現構築物を参照のこと）。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列は、可溶性ニューロピリン－1（sNRP）（AAATAAATACGAAATG）（配列番号116）のポリアデニル化シグナルである（例えば、WO05／073384（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列は、SV40ポリ（A）部位を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナルは、配列番号76を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナル配列は、bGHpAを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ポリ（A）シグナルは、配列番号75を含むか、またはそれからなる。ポリ（A）シグナル配列のさらなる例は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、ポリ（A）配列は、配列番号75または76によって表されるポリ（A）配列と少なくとも85％、90％、95％、98％、または99％同一である。

【0414】

例示的なbGHポリ（A）シグナル配列（配列番号75）

CTGTGCCCTTCTAGTTTGCCAGCCATCTGTTTGTTTGCCCCCTC
CCCCGTGCCCTTCCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTCCTTTTCCTAATAAAATGAGGAATAATTGCATCGCATTTGTC
TGAGTAGGTGTCAATTCCTATTCTGGGGGGGTGGGGGTGGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAAATAGCAGGCAT
GCTGGGGATGCGGTGGGGCTCTATGG

【0415】

例示的なSV40ポリ（A）シグナル配列（配列番号76）

AAC TTGTTTATTG CAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCA

A T A G C A T C A C A A A T T T C A C A A A T A A A G C A T T T T T T T C A C T
G C A T T C T A G T T G T G G T T T G T C C A A A C T C A T C A A T G T A T C T
T A

【0416】

追加の配列

いくつかの実施形態では、本開示の構築物は、1つ以上のクローニング部位を含み得る。いくつかのそのような実施形態では、クローニング部位は、対象への投与のために製造される前に完全に除去されない場合がある。いくつかの実施形態では、クローニング部位は、リンカー配列として、ヌクレオチド及び／またはペプチド切断シグナルとして、及び／またはコザック部位の一部としてなどの機能的役割を有し得る。当業者には理解されるように、クローニング部位は、それらの所望の機能を保持しながら、一次配列が著しく異なっているてもよい。いくつかの実施形態では、構築物は、クローニング部位の任意の組み合わせを含み得、例示的なクローニング部位は、配列番号77～82によって表される。

10

【0417】

例示的なクローニング部位 A（配列番号77）

T T G T C G A C G C G G C C G C A C G C G T

【0418】

例示的なクローニング部位 B（配列番号78）

C T C C T G G G C A A C G T G C T G G T T A T T G T G A C C G G T G C C A C C
T A A G A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A

20

【0419】

例示的なクローニング部位 D（配列番号80）

A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C C T A G G

【0420】

例示的なクローニング部位 D（配列番号80）

A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C C T A G G

【0421】

例示的なクローニング部位 E（配列番号81）

G C G G C C G C A C G C G T

【0422】

例示的なクローニング部位 F（配列番号82）

A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C T

【0423】

不安定化ドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される任意の構築物は、任意選択で、タンパク質発現を時間的に制御するための不安定化ドメインをコードする配列（「不安定化配列」）を含み得る。不安定化配列の非限定的な例としては、FK506配列、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）配列をコードする配列、または他の例示的な不安定化配列が挙げられる。

30

【0424】

安定化リガンドの不在下では、不安定化配列に作動可能に連結したタンパク質配列はユビキチン化により分解される。これに対し、安定化リガンドの存在下ではタンパク質分解が阻害され、不安定化配列に作動可能に連結したタンパク質配列が活発に発現することが可能になる。タンパク質発現の安定化における陽性対照として、タンパク質発現は従来の手段によって検出することができ、このような手段には、酵素、放射線撮影、比色、蛍光、または他の分光撮影アッセイ；蛍光活性化細胞選別（FACS）アッセイ；免疫学的アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、及び免疫組織化学法）が含まれる。

40

【0425】

不安定化配列のさらなる例が当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、

50

不安定化配列は、FK506-及びラパマイシン結合タンパク質（FKBP12）配列であり、安定化リガンドはShield-1（Shld1）である（Banaszynski et al. (2012) Cell 126 (5) : 995-1004、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、不安定化配列はDHFR配列であり、安定化リガンドはトリメトプリム（TMP）である（Iwamoto et al. (2010) Chem Biol 17 : 981-988、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0426】

いくつかの実施形態では、不安定化配列はFKBP12配列であり、対象細胞（例えば、支持蝸牛外有毛細胞）内でFKBP12遺伝子を保持するrAAV構築物の存在が、ウェスタンブロット法によって検出される。いくつかの実施形態では、不安定化配列は、本明細書に記載の任意のrAAV構築物の時間特異的活性を検証するのに使用することができる。

10

【0427】

例示的なDHFR不安定化アミノ酸配列（配列番号83）

MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNL PADLAWFKRNTLNKPV
IMGRHTWESI GRPLPGRKNIILSSQPSTDDRVTWVKSVDE
AIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVE
GDTHFPDYE PDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

20

【0428】

例示的なDHFR不安定化ヌクレオチド配列（配列番号84）

GGTACCATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTTAGATTACG
TTATCGGCATGGAAAACGCCCATGCCGTGGAAACCTGCCCTGC
CGATCTCGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCC
GTGATTATGGGCCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGTC
CGTTGCCAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACC
GAGTACGGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTGGAT
GAAGCCATCGCGGGCGTGTGGTGAACGTACCAGAAATCATGG
TGATTGGCGGGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTTGCCAAA
AGCGCAAAAACCTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAAGTG
GAAGGCGACACCCATTTC CCGGATTACGAGCCGGATGACT
GGGAATCGGTATTTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCA
GAACTCTCACAGCTATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA
TAA

30

【0429】

例示的な不安定化ドメイン（配列番号85）

ATCAGTCTGATTGCGGCGTTAGCGGTTAGATTACGTTATCG
GCATGGAAAACGCCCATGCCGTGGAAACCTGCCCTGCCGATCT
CGCCTGGTTTAAACGCAACACCTTAAATAAACCCGTGATT
ATGGGGCCGCCATACCTGGGAATCAATCGGTCGTCCTCGTTGC
CAGGACGCAAAAATATTATCCTCAGCAGTCAACCCGAGTAC
GGACGATCGCGTAACGTGGGTGAAGTCGGTGGATGAAGCC
ATCGCGGGCGTGTGGTGAACGTACCAGAAATCATGGTGAATTG
GCGGGCGGTCGCGTTATTGAACAGTTCTTTGCCAAAAGCGCA
AAAACCTGTATCTGACGCATATCGACGCAGAAAGTGGAAAGGC
GACACCCATTTC CCGGATTACGAGCCGGATGACTGGGAAT
CGGTATTTCAGCGAATTCCACGATGCTGATGCGCAGAACTC
TCACAGCTATTGCTTTGAGATTCTGGAGCGGCGA

40

【0430】

例示的なFKBP12不安定化ペプチドアミノ酸配列（配列番号86）

50

M G V E K Q V I R P G N G P K P A P G Q T V T V H C T G F G K D G D L S Q K F W
S T K D E G Q K P F S F Q I G K G A V I K G W D E G V I G M Q I G E V A R L R C
S S D Y A Y G A G G F P A W G I Q P N S V L D F E I E V L S V Q

【0431】

レポーター配列またはエレメント

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される構築物は、任意選択で、レポーターポリペプチド及び／またはタンパク質をコードする配列（「レポーター配列」）を含み得る。レポーター配列の非限定的な例としては、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ（LacZ）、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質、mCherry 蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、及びルシフェラーゼをコードするDNA配列が挙げられる。レポーター配列のさらなる例は、当該技術分野で知られている。レポーター配列は、その発現を駆動する制御エレメントに結合した際、酵素、放射線撮影、比色、蛍光、または他の分光撮影アッセイ；蛍光活性化細胞選別（FACS）アッセイ；免疫学的アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）、及び免疫組織化学法）を含む、従来の手段によって検出可能なシグナルを提供することができる。

【0432】

いくつかの実施形態では、レポーター配列はLacZ遺伝子であり、哺乳動物細胞（例えば、蝸牛有毛細胞）におけるLacZ遺伝子を保持する構築物の存在が、 β -ガラクトシダーゼ活性についてのアッセイによって検出される。レポーターが蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質）またはルシフェラーゼである場合、哺乳動物細胞（例えば、蝸牛有毛細胞）における蛍光タンパク質またはルシフェラーゼを保持する構築物の存在は、蛍光技法（例えば、蛍光顕微鏡法またはFACS）により、またはルミノメーター（例えば、分光光度計またはIVIS撮像装置）において光生成により測定され得る。いくつかの実施形態では、レポーター配列を用いて、本明細書に記載の任意の構築物の組織特異的標的化能力及び組織特異的プロモーター調節及び／または制御活性を検証することができる。

【0433】

いくつかの実施形態では、レポーター配列はFLAGタグ（例えば、3xFLAGタグ）であり、哺乳動物細胞（例えば、内耳細胞、例えば、蝸牛有毛細胞または支持細胞）中のFLAGタグを保持する構築物の存在は、タンパク質結合または検出アッセイ（例えば、ウェスタンブロット法、免疫組織化学法、放射免疫測定法（RIA）、質量分析法）により検出される。例示的な3xFLAGタグ配列は、配列番号87として提供される。

【0434】

いくつかの実施形態では、レポーター配列は、高感度緑色蛍光タンパク質（eGFP）タグ（例えば、eGFPタグ）であり、哺乳動物細胞（例えば、内耳細胞、例えば、蝸牛有毛細胞または支持細胞）におけるeGFPタグを保持する構築物の存在は、蛍光、タンパク質結合、または検出アッセイ（例えば、ウェスタンブロット法、免疫組織化学法、放射免疫測定法（RIA）、質量分析法）により検出される。例示的なeGFPタグ配列は、配列番号104及び105として提供される。

【0435】

例示的な3xFLAGタグ配列（配列番号87）

G G A T C C C G G G C T G A C T A C A A A G A C C A T G A C G G T G A T T A T A
A A G A T C A T G A C A T C G A C T A C A A G G A T G A C G A T G A C A A G

【0436】

例示的な高感度緑色蛍光タンパク質（eGFP）ヌクレオチド配列（配列番号104）

M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

10

20

30

40

50

V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N
G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K
【 0 4 3 7 】

例示的な高感度緑色蛍光タンパク質（eGFP）アミノ酸配列（配列番号105）

A T G G T G A G C A A G G G C G A G G A G C T G T T C A C C G G G G T G G T G C
C C A T C C T G G T C G A G C T G G A C G G C G A C G T A A A C G G C C A C A A
G T T C A G C G T G T C C G G C G A G G G C G A G G G C G A T G C C A C C T A C
G G C A A G C T G A C C C T G A A G T T C A T C T G C A C C A C C G G C A A G C
T G C C C G T G C C C T G G C C C A C C C T C G T G A C C A C C C T G A C C T A
C G G C G T G C A G T G C T T C A G C C G C T A C C C C G A C C A C A T G A A G
C A G C A C G A C T T C T T C A A G T C C G C C A T G C C C G A A G G C T A C G
T C C A G G A G C G C A C C A T C T T C T T C A A G G A C G A C G G C A A C T A
C A A G A C C C G C G C C G A G G T G A A G T T C G A G G G C G A C A C C C T G
G T G A A C C G C A T C G A G C T G A A G G G C A T C G A C T T C A A G G A G G
A C G G C A A C A T C C T G G G G C A C A A G C T G G A G T A C A A C T A C A A
C A G C C A C A A C G T C T A T A T C A T G G C C G A C A A G C A G A A G A A C
G G C A T C A A G G T G A A C T T C A A G A T C C G C C A C A A C A T C G A G G
A C G G C A G C G T G C A G C T C G C C G A C C A C T A C C A G C A G A A C A C
C C C C A T C G G C G A C G G C C C C G T G C T G C T G C C C G A C A A C C A C
T A C C T G A G C A C C C A G T C C G C C C T G A G C A A A G A C C C C A A C G
A G A A G C G C G A T C A C A T G G T C C T G C T G G A G T T C G T G A C C G C
C G C C G G G A T C A C T C T C G G C A T G G A C G A G C T G T A C A A G

【 0 4 3 8 】

A A V カプシド

本開示は、A A V カプシドにパッケージングされた1つ以上のポリヌクレオチド構築物を提供する。いくつかの実施形態では、A A V カプシドは、A A V 2、3、4、5、6、7、8、9、10、rh8、rh10、rh39、rh43、もしくはAnc80血清型、またはその1つ以上のハイブリッドのA A V カプシドからであるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、A A V カプシドは、A A V 祖先血清型からのものである。いくつかの実施形態では、A A V カプシドは、祖先（Anc）A A V カプシドである。Ancカプシドは、確率の高い祖先配列を決定するために進化的確率及び進化的モデリングを使用して構築された構築物配列から作成される。したがって、Ancカプシド／構築物配列が自然界に存在していたかは不明である。例えば、いくつかの実施形態では、A A V カプシドはAnc80カプシド（例えば、Anc80L65カプシド）である。いくつかの実施形態では、A A V カプシドは、配列番号88を含むテンプレートヌクレオチドコード配列を使用して作成される。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号89によって表されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号89によって表されるポリペプチドに対して少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号113によって表されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号113によって表されるポリペプチドに対して少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号114によって表されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、カプシドは、配列番号114によって表されるポリペプチドに対して少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

【 0 4 3 9 】

本明細書で提供されるように、A A V カプシド及びr A A V 構築物（例えば、A A V I T Rを含む）の任意の組み合わせが、本開示の組換えA A V（r A A V）粒子において

使用され得る。例えば、野生型またはバリエーション AAV2 ITR 及び Anc80 カプシド、野生型またはバリエーション AAV2 ITR 及び AAV6 カプシドなどである。本開示のいくつかの実施形態では、AAV 粒子は、AAV2 構成要素（例えば、カプシド及び ITR は AAV2 血清型である）から構成される。いくつかの実施形態では、AAV 粒子は、AAV2/6、AAV2/8、または AAV2/9 粒子（例えば、AAV2 ITR を有する AAV 構築物を有する AAV6、AAV8、または AAV9 カプシド）である。本開示のいくつかの実施形態では、AAV 粒子は、AAV2/Anc80 粒子であり、コード配列の一部、例えば、抗 VEGF タンパク質をコードする配列（例えば、配列番号 13、14、15、19、22、42、及び/または 103）に隣接する AAV2 ITR（例えば、配列番号 45 及び 46、または 47 及び 48）を有する AAV 構築物をカプシド封入する Anc80 カプシド（例えば、配列番号 89、配列番号 113、または配列番号 114 のポリペプチドを含む）を含む。他の AAV 粒子は当該技術分野で知られており、例えば、Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81 (2-3): 273（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、カプシド配列は、配列番号 88 または 89 によってそれぞれ表されるカプシドヌクレオチドまたはアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、95%、98%、または 99% 同一である。

10

【0440】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるプラットフォーム送達アプローチは、現在の天然に存在するウイルスの進化システムを再構成する祖先 AAV (AAVAnc) カプシドとして知られる合成 AAV カプシドのライブラリを組み合わせる。いくつかの実施形態では、これらの AAV カプシドは、生成物候補を蝸牛に直接送達するための新規の低侵襲な投与処置と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、送達アプローチは、このライブラリからの AAVAnc80 カプシドバリエーション (Anc80L65 としても知られる) を利用する。いくつかの実施形態では、そのようなカプシドは、rAAV 粒子を作成するために利用され、そのような粒子は、本明細書に記載の構築物、例えば本明細書に記載の抗 VEGF タンパク質を含む構築物を加えることによって作成され、rAAVAnc80-抗 VEGF を作成する。いくつかの実施形態では、そのような粒子は、異常な血管成長を引き起こし得るタンパク質である VEGF の阻害剤のための cDNA を送達し得る。いくつかの実施形態では、そのような治療は、新生血管形成を特徴とする耳科障害のためのものであり、例えば、第 8 脳神経とも呼ばれる前庭蝸牛神経の腫瘍である VS の治療のためのものである。

20

30

【0441】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は AAVAnc80 カプシドを含み、これは合理的に設計された合成 AAV カプシドであり、その配列は祖先配列再構成によって推測されたものである。祖先配列再構築は、天然に存在するアデノ随伴ウイルスから入手可能な配列情報を使用し、系統学的及び統計的予測の結果として、様々な中間進化ノードでの配列の祖先状態を特定する（図 9）。AAVAnc80 の作成中に、9つのノードが再構成され、AAV 系統全体の in silico 由来配列が de novo で合成され、特性決定された。これにより、広く研究されている AAV 血清型 1、2、8、及び 9 の推定祖先である Anc80 ライブラリノード (Anc80Lib) が特定された。続いて、Anc80Lib タンパク質配列が逆翻訳され、遺伝子合成によって生成され、個々のクローンがパッケージング、感染性、及び生物学的特性について個別に評価された。いくつかの実施形態では、これらの結果に基づいて、65 番目の Anc80Lib クローンである AAVAnc80 (Anc80L65) を、さらなる特性決定のために選択した。AAVAnc80 カプシドバリエーションは独特な組成を有する；AAV8 及び AAV2 の配列は、AAVAnc80 からそれぞれおよそ 9% と 12% のみ異なるが、AAVAnc80 の構造モデリングにより、その粒子の外表面の約 20% が、カプシド表面全体に分散する様式で、既知の循環 AAV（図 9 及び図 10）から異なっていることが示された（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

40

50

【0442】

いくつかの実施形態では、*in vivo*での遺伝子治療粒子としてのAAV Anc80の性能が特性決定されており、AAV Anc80を含むrAAV粒子は、広く適用可能な遺伝子治療粒子として作用する可能性を示している。いくつかの実施形態では、マウス及び非ヒト霊長類（NHP）で実施された研究により、AAV Anc80が、静脈内注入後に肝臓を標的とした場合に、全身毒性の明らかな兆候なしに、AAV8と同様の形質導入効率を有することが示されている（Zinn 2015; Murillo 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、AAV Anc80は、マウス前眼部（Wang 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、マウス及びNHP網膜（Zinn 2015; Carvalho 2018、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、マウス骨格筋（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、全身及び実質内送達によるマウス中枢神経系（CNS）（Hudry 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、ならびにマウス腎臓（Ikeda 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）への指向性及び効率的な形質導入を示した。

【0443】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGFを含む）は、AAV Anc80カプシドを含む。いくつかの実施形態では、AAV Anc80カプシドは、蝸牛細胞及び前庭細胞への高い形質導入効率を示す。AAV Anc80は、合理的に設計されたAAVカプシドであり、その配列は祖先配列再構築によって推測されたものである（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。祖先配列再構築は、天然に存在するAAVから入手可能な配列情報を使用し、系統学的及び統計的予測の結果として、様々な中間進化ノードでの配列の祖先状態を特定する。文献に記載されているように、AAV系統全体にわたる*in silico*由来配列の*de novo*合成及び特性決定により、広く研究されているAAV血清型1、2、8、及び9の推定祖先であるAnc80ライブラリ（Anc80Lib）ノードが特定された。その後、Anc80Lib配列の評価により、65番目のAnc80LibクローンであるAAV Anc80（Anc80L65）がさらに特性決定された。これらの研究から、AAV Anc80カプシドバリエーションは、AAV8と同様の形質導入効率を有する安定かつ機能的なAAVバリエーションをもたらす、異なる外表面粒子分布を有する独特の組成を持つことが示された（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。哺乳動物の内耳におけるAAV Anc80の最初に報告された使用により、蝸牛及び前庭有毛細胞における高い形質導入効率が明らかとなった（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。複数のその後の独立した調査により、AAV Anc80の蝸牛及び前庭細胞の形質導入効率は、他のAAV血清型と比較して増加していることが、様々な年齢のマウスにおいて（Landegger 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Omichi 2020、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、そして非ヒト霊長類において（Andres-Mateos 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）確認されており、AAV Anc80は、他の多くのAAVカプシドと比較して、より高い形質導入効率と広い指向性を有する。

【0444】

AAV粒子を使用する遺伝子治療は、次のいくつかの理由で内耳障害の有望な治療法である：例えば、（1）聴覚及び前庭感覚上皮を含む内耳は、中枢神経系におけるものと同様に免疫監視機構を改変していること（Fujiooka 2014、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）；（2）蝸牛のコルチ器の感覚細胞及び支持細胞は有糸分裂後であり、これによりAAVの単回投与後の長期発現が可能となり得ること；ならびに（3）成人及び小児の両方における複数の投与経路を介したrAAV送達の総合的な臨床試験が、特に局所送達及び／または低～中用量での投与において、送達ビヒクルとしてのAAVの強力な安全性プロファイルを示唆していること。

10

20

30

40

50

【0445】

20年以上前の初期臨床試験から始まり、rAAV粒子は、全身投与で最大およそ1E15vg以上の用量で数十の臨床試験で数百人の参加者に投与されてきた（Flotte 1996；Flotte 2013；Parente 2018；Wang 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。AAV粒子がin vivo遺伝子導入に使用された試験の数は、着実に増加している。その安全性プロファイルは、幅広い標的組織への形質導入効率の高さとともに、rAAV粒子をin vivo遺伝子治療の最適なプラットフォームとして確立した（Wang 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。rAAV技術は、凝固障害、遺伝性失明、及び神経変性疾患を含む様々な状態に対して臨床応用に成功している（Colella 2018；Wang 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

10

【0446】

rAAV粒子製品（アリボジーンティパルボベク；Glybera（登録商標））は、2012年にリボ蛋白リパーゼ欠損症の治療に欧州医薬品庁（EMA）から初めて承認された。その後、確定診断された両アレル性RPE65変異による網膜ジストロフィーの治療用のボレチジーンネパルボベク-rzyL（Luxturna（登録商標））と、SMN1遺伝子の両アレル性変異を有する脊髄性筋萎縮症（SMA）の治療用のオナセムノゲンアベパルボベク-xioi（Zolgensma（登録商標））という2つのrAAV製品が、それぞれ2017年及び2019年に米国食品医薬品局（FDA）により承認された；ボレチジーンネパルボベク-rzyL（Luxturna（登録商標））はまた、遺伝性網膜ジストロフィーによる視力低下（RPE65遺伝子の変異が原因の場合）の治療用にもEMAにより承認された。

20

【0447】

いくつかの実施形態では、rAAV粒子を含む薬物及び生物学的製剤は、それらを外リンパに送達することによって、内耳の多くの標的細胞に到達することができる。外リンパは、脳脊髄液（CSF）と組成が非常に類似しており（Lysaght 2011、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、それと拡散的に連続している流体である。外リンパは、内耳の骨迷路に収容された蝸牛及び前庭系の感覚細胞、神経細胞、及び支持細胞のほとんどを浸している（図1及び図3）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示された組成物、例えばrAAV-抗VEGFが送達される蝸牛の外リンパ腔は、鼓室階と前庭階という2つの階または通路を含み、これらはヘリコトレマを介して蝸牛ラセンの頂点で互いに連続している。内耳の多くの細胞は、組織内の間質腔を通じて外リンパと流体連通している。

30

【0448】

いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に開示された組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを、アブミ骨底板に位置する通気部を伴って正円窓膜を通じて内耳の外リンパ液に送達する、蝸牛内投与用の無菌の使い捨て送達デバイスも開示する。いくつかの実施形態では、この蝸牛内投与アプローチにおいて、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、組成物が鼓室階を通過して、次にヘリコトレマでの接続を介して前庭階を通過して、流体経路を辿ってアブミ骨底板の通気部まで灌流するように、卵円窓内のアブミ骨底板に通気部を伴って正円窓膜を通じて鼓室階に投与される（図4）。いくつかの実施形態では、注入ポートとは異なる通気部の存在により、蝸牛の全長にわたって薬剤をより均一に分散させることができ、内耳内での追加の流体圧の有害な上昇が防止される。いくつかの実施形態では、この二重窓、注入、及び通気技術を用いた前庭細胞の形質導入によって証明されるように、この送達アプローチは、本明細書に開示される組成物、例えば、注入物の前庭系への拡散も可能にする。いくつかの実施形態では、プロセス全体は、外耳道を通じた比較的非外傷性のアプローチで対象において達成され得る；外科的投与処置に関する追加の情報については、図1及び実施例を参照のこと。

40

【0449】

50

マウスにおけるAAV Anc80形質導入に関する多くの研究が公開されている。異なるタイプのウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター）が、動物モデルでの内耳への遺伝子送達について検討されてきた（Chen 2001; Wenzel 2007; Husseman 2009、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）；しかしながら、rAAV粒子は、許容可能な安全性プロファイルと、ノックアウト及びノックインマウスモデルでの聴覚、蝸牛、及び前庭機能の回復を含む、長期にわたる導入遺伝子発現を考えると、蝸牛への直接遺伝子送達のための有望なツールと思われる（Akil 2012; Kim 2016; Pan 2017; Akil 2019; Al-Moyed 2019; Gyorgy 2019、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。新生児及び成体マウスの両方において、いくつかのAAV血清型が、異なる外科的アプローチ及び用量を使用して、内耳に送達されている（Akil 2012; Askew 2015; Chien 2016; Landegger 2017; Suzuki 2017; Tao 2018; Yoshimura 2018; Akil 2019; Al-Moyed 2019; Gyorgy 2019; Kim 2019; Omichi 2020、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。蝸牛及び前庭器官の異なる細胞タイプでのGFP発現によって評価される形質導入効率は、マウスの生後年齢、粒子を送達するために使用する方法、及び評価する血清型またはカプシドバリエーションによって異なる。

10

20

30

40

50

【0450】

いくつかの実施形態では、AAV Anc80バリエーションは、他のAAVカプシドと比較して、新生児及び成体マウスでの蝸牛及び前庭感覚細胞（有毛細胞）ならびに蝸牛及び前庭器官の補助細胞の高効率標的化を示した（Landegger 2017; Suzuki 2017; Omichi 2020、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。Anc80新生児の指向性及び遺伝子導入効率を、経正円窓投与により生後1日目（P1）に注入されたC57BL/6マウスにおいて*in vivo*で評価した（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。先行研究と一致して、AAV2、AAV6、及びAAV8は、IHCの低割合を標的とし、AAV1は、より高効率でIHCを形質導入できたが、OHCの形質導入は最小限であった；対照的に、AAV Anc80（1.7E9vg/蝸牛）は、蝸牛または聴力機能に悪影響を与えることなく、IHCの約100%及びOHCの約90%（図11）を形質導入することができた（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、前庭系において、AAV Anc80により、前庭機能に影響を与えることなく、卵形囊のI型及びII型有毛細胞、ならびに半規管稜の細胞が形質導入された（図12）（Landegger 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0451】

後半規管を介した異なる投与経路を使用して、成体（7週齢）CBA/CaJマウスにおいて、AAV Anc80の指向性及び遺伝子導入効率を評価した（Suzuki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。AAV Anc80（9.6E8vg/蝸牛）は、正常な蝸牛及び聴力機能を温存しながら、蝸牛の感覚細胞及び補助細胞（蝸牛の長さ全体にわたってIHCのおよそ100%、及びOHCのかなりの部分を含む）、ラセン板縁及びライスネル膜の細胞、ならびに蝸牛軸の細胞（例えば、ラセン神経節ニューロン及びサテライトグリア細胞）（図13）を標的とした（Suzuki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。前庭系の複数の細胞タイプもまた形質導入され（有毛細胞のサブセットならびに卵形囊及び半規管稜及び球形囊の支持細胞の実質的に100%を含む）（図14）、全て前庭機能に悪影響を及ぼさなかった（Suzuki 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0452】

より最近では、成体（4週齢）のC3H/FeJマウスにおけるAAV Anc80の*in vivo*形質導入が、本明細書で利用される送達経路（後半規管の開窓を伴った正円

窓膜送達を介する)を用いて評価され、天然に存在する血清型AAV1、AAV2、AAV8、及びAAV9による形質導入と直接比較された(Omichi 2020、参照によりその全体を本明細書に組み込まれる)。全ての粒子は、対照のような(未注入の)ABR閾値によって示されるように、聴力機能に悪影響を与えることなく、ある程度の形質導入を生じた。AAVanc80(5.5E9 vg/蝸牛)により、蝸牛の全長にわたってIHCを実質的に100%、蝸牛の位置に応じてOHCのおよそ27~66%が形質導入された(図15)。AAVanc80と比較してAAV2によるOHCの形質導入効率がわずかに高い(3.68E9 vg/蝸牛)にもかかわらず、AAVanc80は、球形嚢のeGFP陽性有毛細胞及び蝸牛のラセン神経節ニューロンによって証明されるようにAAV2よりも著しく広い指向性を維持し;これらの同じ細胞タイプにおいて、AAV2はほとんどまたは全く形質導入を生じなかった(図15)(Omichi 2020、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

10

【0453】

いくつかの実施形態では、新生児マウスから成体マウスにおいて、蝸牛IHC及びOHC、支持細胞、蝸牛ラセン神経節の細胞、卵形嚢、球形嚢、及び膨大部稜の前庭有毛細胞、ならびに蝸牛及び前庭支持/補助細胞を含む広範囲の内耳細胞タイプを標的とするAAVanc80の能力は、例えば、AAVanc80が内耳の障害に対する遺伝子治療アプローチの開発を促進し得ることを示唆している。

【0454】

特定の実施形態では、レポーター構築物を使用して非ヒト霊長類(NHP)においてプラットフォーム及び支持研究を実施して、内耳でのAAVanc80形質導入を評価する。いくつかの実施形態では、探索的プラットフォーム及び他の支持研究をNHPにおいて実施し、AAVanc80指向性及びAAVanc80粒子の送達の用量依存的効果を評価する。いくつかの実施形態では、NHPの内耳細胞タイプへのAAVanc80カプシド指向性の評価は、高感度GFP(eGFP)レポーター導入遺伝子をコードする構築物を含み、正円窓膜を通じた蝸牛内注入を介して送達されるrAAVanc80粒子を使用して促進される。いくつかの実施形態では、このような粒子は、本明細書に記載のように、蝸牛に直接効率的に送達するための新規デバイスの開発にも有用であり得る。

20

【0455】

いくつかの実施形態では、NHPの耳は、蝸牛有毛細胞の形質導入効率及び有毛細胞の形質導入の用量依存性について組織学的に評価された。いくつかの実施形態では、そのような耳は、蝸牛及び/または前庭器官における細胞タイプの形質導入の広さについても分析された。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のrAAV粒子(例えば、rAAVanc80-抗VEGFを含む)により形質導入された内耳細胞の集団を増やすことで、rAAVanc80-抗VEGFの場合、分泌型抗VEGFタンパク質の持続的なデポを内耳が維持できる可能性が支持されると考えられ;ひいては、このタンパク質が、隣接する内耳道における腫瘍の部位と近接的及び拡散的に連続してVSの成長を制御できる可能性を有する。いくつかの実施形態では、有毛細胞の生存に対する処置、既存の中和抗体(NAb)の存在下での形質導入、及び対側の(未注入の)耳の任意の潜在的な形質導入の耐性も、NHPにおいて評価した。結果は実施例に要約されている。

30

40

【0456】

いくつかの実施形態では、合理的に設計された合成AAVanc80L65カプシドバリエーション(AAVanc80)は、正円窓膜投与用に設計された送達デバイスを使用して、用量依存的に霊長類IHCを形質導入するのに非常に効率的である。いくつかの実施形態では、約 6.0×10^{10} vg/蝸牛以上の用量で、導入遺伝子をコードする構築物を含むAAVanc80粒子を使用して、注入された耳におけるIHCのおよそ75~100%の形質導入が達成される。

【0457】

いくつかの実施形態では、AAVanc80に対する既存の中和抗体は、血清中少なくとも中程度のレベルで、粒子が蝸牛内投与経路を介して送達される場合に、IHCを阻害

50

しない、または細胞の形質導入を支持しない。

【0458】

いくつかの実施形態では、注入された耳の定性評価は、複数の蝸牛及び前庭細胞タイプにわたる形質導入を実証し、それらの全ては、rAAV Anc80-抗VEGFによる形質導入後に抗VEGFタンパク質が外リンパ、または蝸牛神経の間質液に直接分泌されるように配置され、それにより前庭蝸牛神経間隙での拡散を通じてVSの成長を制御する可能性がある。

【0459】

例示的なAAV Anc80カプシドDNA配列（配列番号88）

```
ATGGCTGCGCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACA  
ACCTCTCTGAGGGGCATTCGCGAGTGGTGGGACTTGAAACC  
TGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCCAACCAGCAAAAGCAGGAC  
GACGGCCGGGGTCTGGTGCTTCTCTGGCTACAAGTACCTCG  
GACCTTCAACGGGACTCGACAAGGGGGAGCCCCGTCAACGC  
GGCGGACGCGAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCCTACGAC  
CAGCAGCTCAAAAGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATA  
ACCACGCCCGACGCCCGAGTTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGA  
TACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAG  
GCCAAGAAGCGGGTCTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGG  
AAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAGAGACCGGTAGA  
GCAATCACCCCAAGGAACCAGACTCCTCTTCGGGGCATCGGC  
AAGAAAGGCCAGCAGCCCGCGAAGAGAGACTCAACTTTG  
GGCAGACAGGCGACTCAGAGTCAGTGCCCGACCCCTCAACC  
ACTCGGAGAAACCCCCCGCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCT  
AATACAATGGCAGCAGCGGGTGGCGCTCCAATGGCAGACA  
ATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAACGCCCTCAGGAAA  
TTGGCATTTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATC  
ACCACCAGCACCCGAACCTGGGGCCCTCCCCACCTACAAACA  
ACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGCCAATCGGGAGCAAG  
CACCAACGACAAACACCTACTTCGGCTACAGCACCCCCCTGG  
GGGTATTTTGACTTTAAACAGATTCCACTGCCACTTCTCAC  
CACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATT  
CCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAG  
GTCAAGGAGGTCAACGACGAATGATGGCACCAACGACCATCG  
CCAATAACCTTTACCAGCACGGGTTCAAGGTCTTTACGGGACTC  
GGAATAACAGCTCCCGGTACGTCTCTGGCTCTGCGCACCAAG  
GGCTGCTGCTGCTCCTCGTTCCCGGGCGGACGTCTTCATGATTC  
CTCAGTACGGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAAGGC  
CGTGGGCGCGTTCTCTCTCTACTGCTGTGAGTACTTTCTCT  
TCTCAAATGCTGAGAAACGGGGCAACAACCTTTGAGTTTCAGCT  
ACACGTTTTGAGGACGTGCCCTTTTCAACAGCAGCTACGCGCA  
CAGCCAAAGCCTGGACCGGGCTGATGAACCCCCCTCATCGAC  
CAGTACCTGTACTACCTGTCTCGGACTCAGACCAACGAGTG  
GTACCGCAGGAATCGGACGTTTGCAATTTTCTCAGGCCCGG  
GCCTAGTAGCATGGCGAATCAGGCCCAAAAACCTGGCTACCC  
GGGCCCCGTACTACCGGCGAGCAACGCGTCTCCAAGACAGCGA  
ATCAAAAATAACAACAGCAACTTTGCCCTGGACCGGGTGCCAC  
CAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGTGTTAAATCCC  
GGTCCCGCTATGGCAACCCACAAAGGACGACGAAGACAAAT  
TTTTTCCGATGAGCGGAGTCTTAATAATTTGGGAAACAGGG
```

AGCTGGAAATAGCAACGTTGGACCTTGACAAACGTTATGATA
ACCAGTGAGGAAGAAATTAAACCAACCCAGTGGCCA
CAGAACAGTACGGCACGGTGGCCACTAACCTGCAATCGTC
AAACACCCGCTCCTGCTACAGGGACCGTCAACAGTCAAGGA
GCCTTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTTGTACC
TGCAGGGTCCCTATCTGGGGCCAAGATTCTCTCACACGGACGG
ACACTTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGGCTTTGGACTG
AAACACCCGCTCCTCAGATCCTGATTAAGAATACACCTG
TTCCCGCGAATCCTCCAACCTTACAGTCCAGCTAAGTT
TGCCTCGTTTCATCACGCAAGTACAGCACCGGACAGGTCAGC
GTGGAAATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAACAGCAAAC
GCTGGAAACCCAGAGATTCAATACACTTCCAACCTACAACAA
ATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTTGACACAAATGGCGTT
TATTCTGAGCCTCGCCCCATCGGCACCCGTTACCTCACCC
GTAATCTG

【0460】

例示的なAAV Anc80カプシドアミノ酸配列（配列番号89）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKKANQQQKQD
DGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG
KKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAPSGVGS
NTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASTNDNTYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQ
VKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
SQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSSQSLDRLMNP
LIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWL
PGPCYRQQRVSKTANQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL
VNP GPAMATHKDDDEDKFFPMSGVLI
FGKQGAGNSNVLDLNDVMI
TSEEEIKTTNPVATEQYGTVA
TNLQSSNTAPATGTVNSQG
ALPGMVWQNRDVYLQGP
IWKIPHTDGHFHPSP
LMGGFGLKHPPPPQILIKNT
PVPANPPPTTFS
PAKFASFITQYSTGQVS
VEIEWELQKENS
KRWNPEIQYTS
NYNKSTNVDF
AVDTNGVYSEPRPIGTRYL
TRNL

【0461】

例示的なAAV Anc80カプシドアミノ酸配列（配列番号113）

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKKANQQQKQD
DGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYD
QQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG
KKGQQPAX1KRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAPSGVGS
SNTMX2AGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRI
VITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGX3STNDNTYFGYS
TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKX4LNFKL
FNIQVKEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLG
SAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFX5FSYTFEDVPFHSSYAHSSQSLDRLM
NPLIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRX6LQFSQAGPSSMANQ

A K N W L P G P C Y R Q Q R V S K T X 7 N Q N N N S N F A W T G A T K Y H L N G
 R D S L V N P G P A M A T H K D D E D K F F P M S G V L I F G K Q G A G N S N V
 D L D N V M I T X 8 E E E I K T T N P V A T E X 9 Y G T V A T N L Q S X 1 0 N T
 A P A T G T V N S Q G A L P G M V W Q X 1 1 R D V Y L Q G P I W A K I P H T D G
 H F H P S P L M G G F G L K H P P P Q I L I K N T P V P A N P P T T F S P A K F
 A S F I T Q Y S T G Q V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y N K
 S T N V D F A V D T N G V Y S E P R P I G T R Y L T R N L

【表 2】

配列番号 1 1 3 の記号	対応するア ミノ酸
X ₁	K または R
X ₂	A または S
X ₃	A または G
X ₄	R または k
X ₅	E または Q
X ₆	T または E
X ₇	A または T
X ₈	S または N
X ₉	Q または E
X ₁₀	S または A
X ₁₁	N または D

10

20

【0 4 6 2】

例示的な A A V A n c 8 0 カプシドアミノ酸配列（配列番号 1 1 4）

30

M A A D G Y L P D W L E D N L S E G I R E W W D L K P G A P K P K A N Q Q K Q D
 D G R G L V L P G Y K Y L G P F N G L D K G E P V N A A D A A A L E H D K A Y D
 Q Q L K A G D N P Y L R Y N H A D A E F Q E R L Q E D T S F G G N L G R A V F Q
 A K K R V L E P L G L V E E G A K T A P G K K R P V E Q S P Q E P D S S S G I G
 K K G Q Q P A R K R L N F G Q T G D S E S V P D P Q P L G E P P A A P S G V G S
 N T M A A G G G A P M A D N N E G A D G V G N A S G N W H C D S T W L G D R V I
 T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S Q S G G S T N D N T Y F G Y S T P W
 G Y F D F N R F H C H F S P R D W Q R L I N N N W G F R P K K L N F K L F N I Q
 V K E V T T N D G T T T I A N N L T S T V Q V F T D S E Y Q L P Y V L G S A H Q
 G C L P P F P A D V F M I P Q Y G Y L T L N N G S Q A V G R S S F Y C L E Y F P
 S Q M L R T G N N F Q F S Y T F E D V P F H S S Y A H S Q S L D R L M N P L I D
 Q Y L Y Y L S R T Q T T S G T A G N R T L Q F S Q A G P S S M A N Q A K N W L P
 G P C Y R Q Q R V S K T T N Q N N N S N F A W T G A T K Y H L N G R D S L V N P
 G P A M A T H K D D E D K F F P M S G V L I F G K Q G A G N S N V D L D N V M I
 T N E E E I K T T N P V A T E E Y G T V A T N L Q S A N T A P A T G T V N S Q G
 A L P G M V W Q D R D V Y L Q G P I W A K I P H T D G H F H P S P L M G G F G L
 K H P P P Q I L I K N T P V P A N P P T T F S P A K F A S F I T Q Y S T G Q V S
 V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y N K S T N V D F A V D T N G V
 Y S E P R P I G T R Y L T R N L

40

【0 4 6 3】

50

例示的な A A V 粒子

特定の実施形態では、本開示は、 $rAAV2/Anc80L65-CAG$ 、ラニビズマブ、bGHを含む粒子を含む $rAAV$ -抗VEGF組成物に関する。特定の実施形態では、 $rAAV$ -抗VEGF組成物は、以下を含む：a) 合理的に設計された合成 AAVカプシドである $Anc80L65$ ；b) AAV2由来の逆位末端反復（上流及び下流）；c) サイトメガロウイルス（CMV）初期エンハンサーエレメント、5' 隣接領域と第2のエクソンの近位領域の間に位置するニワトリβアクチン（CβA）遺伝子配列及びウサギβグロビン（RβG）遺伝子由来の3' スプライシング配列（Miyazaki 1989；Niwa 1991；及びOrban 2009、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）（これらは合わせて一般にCAGプロモーターと称される）（上流）；d) i) フリン及びthose a a s i g n a ウイルス由来のプロテアーゼ2A（T2A）切断部位によって分離された、ラニビズマブ重鎖及び軽鎖可変領域をコードするバイシストロニックカセットと、ii) タンパク質分泌を促進するために各Fab鎖の上流にクローニングされた20アミノ酸のヒトインターロイキン2（IL-2）リーダー配列とを含む、ラニビズマブ（抗体断片[Fab]）コード配列；ならびにe) ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（pA）シグナル（下流）。

10

【0464】

特定の実施形態では、本開示は、 $rAAV2/Anc80L65-CAG$ 、ベバシズマブ、bGHを含む粒子を含む $rAAV$ -抗VEGF組成物に関する。特定の実施形態では、 $rAAV$ -抗VEGF組成物は、以下を含む：a) 合理的に設計された合成 AAVカプシドである $Anc80L65$ ；b) AAV2由来の逆位末端反復（上流及び下流）；c) サイトメガロウイルス（CMV）初期エンハンサーエレメント、5' 隣接領域と第2のエクソンの近位領域の間に位置するニワトリβアクチン（CβA）遺伝子配列及びウサギβグロビン（RβG）遺伝子由来の3' スプライシング配列（Miyazaki 1989；Niwa 1991；Orban 2009、これらの各々はその全体が本明細書に組み込まれる）（これらは合わせて一般にCAGプロモーターと称される）（上流）；d) i) フリン及びthose a a s i g n a ウイルス由来のプロテアーゼ2A（T2A）切断部位によって分離された、重鎖及び軽鎖可変及び定常領域をコードするバイシストロニックカセットと、ii) タンパク質分泌を促進するために各Fab鎖の上流にクローニングされた20アミノ酸のヒトインターロイキン2（IL-2）リーダー配列とを含む、ベバシズマブコード配列（Fab及びFc領域を含む抗体）；ならびにe) ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（pA）シグナル（下流）。

20

30

【0465】

特定の実施形態では、本開示は、 $rAAV2/Anc80L65-CAG$ 、アフリベルセプト、bGHを含む粒子を含む $rAAV$ -抗VEGF組成物に関する。特定の実施形態では、 $rAAV$ -抗VEGF組成物は、以下を含む：a) 合理的に設計された合成 AAVカプシドである $Anc80L65$ ；b) AAV2由来の逆位末端反復（上流及び下流）；c) サイトメガロウイルス（CMV）初期エンハンサーエレメント、5' 隣接領域と第2のエクソンの近位領域の間に位置するニワトリβアクチン（CβA）遺伝子配列及びウサギβグロビン（RβG）遺伝子由来の3' スプライシング配列（Miyazaki 1989；Niwa 1991；Orban 2009、これらの各々はその全体が本明細書に組み込まれる）（これらは合わせて一般にCAGプロモーターと称される）（上流）；d) i) 任意選択で20アミノ酸のヒトインターロイキン-2（IL-2）リーダー配列と、ii) ヒトIgG1のFc部分に融合したヒトVEGF受容体1及び2の細胞外ドメインの部分からなる組換え融合タンパク質とを含む、アフリベルセプトコード配列；ならびにe) ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化（pA）シグナル（下流）。

40

【0466】

組成物

とりわけ、本開示は組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書

50

に記載の構築物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載の1つ以上の構築物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載の複数の構築物を含む。いくつかの実施形態では、複数の構築物が組成物中に含まれる場合、構築物はそれぞれ異なる。

【0467】

いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載のrAAV粒子を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載の1つ以上のrAAV粒子を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、複数のrAAV粒子を含む。いくつかの実施形態では、複数のrAAV粒子が組成物中に含まれる場合、rAAV粒子はそれぞれ異なる。

【0468】

いくつかの実施形態では、組成物は、抗VEGFタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、細胞を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、医薬組成物であるか、またはそれを含む。

【0469】

いくつかの実施形態では、rAAV Anc80-抗VEGF粒子は、AAV Anc80 カプシドと、VEGFを阻害するために臨床的に使用される48キロダルトン(kDa)のヒト化モノクローナル抗体断片(Fab)であるラニビズマブをコードする一本鎖DNAゲノムとから構成される。特定の実施形態では、rAAV Anc80-抗VEGFは、CROまたは企業内運用GMP施設で製造される。

【0470】

いくつかの実施形態では、rAAV Anc80-抗VEGFは、ヒト胎児腎臓(HEK)293上皮細胞の一過性トランスフェクションによって産生される。いくつかの実施形態では、清澄化された細胞採取物は、アフィニティークロマトグラフィーによって精製され、その後、塩化セシウム等密度勾配分離によってさらに精製及び濃縮され、完全なrAAV Anc80粒子が得られる。いくつかの実施形態では、製剤緩衝液は、0.1~5mMの範囲のリン酸一カリウム(例えば、1.5mMのリン酸一カリウム)、1~20mMの範囲のリン酸二ナトリウム(例えば、8.1mMのリン酸二ナトリウム)、0.1~10mMの範囲の塩化カリウム(例えば、2.7mMの塩化カリウム)、100~1000mMの範囲の塩化ナトリウム(例えば、172mMの塩化ナトリウム)、及び0.0001~0.001%の範囲のポロキサマー(例えば、0.001%のポロキサマー188(体積/体積%))を含有する滅菌水から構成される。いくつかの実施形態では、一旦精製され、製剤化されると、構築物を含むrAAV Anc80粒子は、原薬と呼ばれる。いくつかの実施形態では、原薬は、その後、滅菌ろ過され(例えば、0.2ミクロン[μm]フィルターを使用)、滅菌バイアルに単回使用のために無菌充填されて栓をされる。いくつかの実施形態では、これらのバイアルに入れられたアリコートは製剤を構成し、投与日まで適切な温度で保存される(例えば、4℃~-100℃、例えば、-65℃以下)。

【0471】

いくつかの実施形態では、別個の希釈製剤を作製することができ(例えば、AAV Anc80希釈剤)、製剤緩衝液と同等またはそれに近い組成であり得る。いくつかの実施形態では、そのような希釈剤は、滅菌ろ過(0.2μmフィルター)され、滅菌バイアルに単回使用のために無菌充填され、投与日まで適切な温度で保存され得る(例えば、4℃~-100℃、例えば、-65℃以下)。いくつかの実施形態では、希釈製剤は、本明細書に記載の原薬の用量に必要な濃度を調製するために利用される。

【0472】

投薬及び投与量

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のAAVベクターは、単回投与または複数回投与される。

【0473】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、単回投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、複数回投与、例えば、2、3、4、5

10

20

30

40

50

、 6、 7、 8、 9 または 10 回投与される。

【0474】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、約 0.01 mL、約 0.02 mL、約 0.03 mL、約 0.04 mL、約 0.05 mL、約 0.06 mL、約 0.07 mL、約 0.08 mL、約 0.09 mL、約 1.00 mL、約 1.10 mL、約 1.20 mL、約 1.30 mL、約 1.40 mL、約 1.50 mL、約 1.60 mL、約 1.70 mL、約 1.80 mL、約 1.90 mL、または約 2.00 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.01 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.02 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.03 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.04 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.05 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.06 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.07 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.08 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 0.09 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.00 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.10 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.20 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.30 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.40 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.50 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.60 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.70 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.80 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 1.90 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約 2.00 mL の容量で投与される。

10

20

30

【0475】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、約 0.01~2.00 mL、約 0.02~1.90 mL、約 0.03~1.8 mL、約 0.04~1.70 mL、約 0.05~1.60 mL、約 0.06~1.50 mL、約 0.06~1.40 mL、約 0.07~1.30 mL、約 0.08~1.20 mL、または約 0.09~1.10 mL の容量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、約 0.01~2.00 mL、約 0.02~2.00 mL、約 0.03~2.00 mL、約 0.04~2.00 mL、約 0.05~2.00 mL、約 0.06~2.00 mL、約 0.07~2.00 mL、約 0.08~2.00 mL、約 0.09~2.00 mL、約 0.01~1.90 mL、約 0.01~1.80 mL、約 0.01~1.70 mL、約 0.01~1.60 mL、約 0.01~1.50 mL、約 0.01~1.40 mL、約 0.01~1.30 mL、約 0.01~1.20 mL、約 0.01~1.10 mL、約 0.01~1.00 mL、約 0.01~0.09 mL の容量で投与される。

40

【0476】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、約 0.01 mL~約 0.30 mL、約 0.01 mL~約 0.25 mL、約 0.01 mL~約 0.20 mL、約 0.01 mL~約 0.15 mL、約 0.01 mL~約 0.14 mL、約 0.01 mL~約 0.13 mL

50

、約0.01mL～約0.12mL、約0.01mL～約0.11mL、約0.01mL～約0.10mL、約0.01mL～約0.09mL、約0.01mL～約0.08mL、約0.01mL～約0.07mL、約0.01mL～約0.06mL、約0.01mL～約0.05mL、約0.01mL～約0.04mL、約0.01mL～約0.03mL、または約0.01mL～約0.02mLの容量で投与される。

【0477】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約0.02mL～約0.30mL、0.03mL～約0.30mL、0.04mL～約0.30mL、0.05mL～約0.30mL、0.06mL～約0.30mL、0.07mL～約0.30mL、0.08mL～約0.30mL、0.09mL～約0.30mL、0.10mL～約0.30mL、0.11mL～約0.30mL、0.12mL～約0.30mL、0.13mL～約0.30mL、0.14mL～約0.30mL、0.15mL～約0.30mL、0.16mL～約0.30mL、0.17mL～約0.30mL、0.18mL～約0.30mL、0.19mL～約0.30mL、0.20mL～約0.30mL、または0.25mL～約0.30mLの容量で投与される。

【0478】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約0.01mL～約0.03mL、約0.02mL～約0.25mL、約0.03mL～約0.20mL、約0.04mL～約0.18mL、約0.05mL～約0.16mL、約0.06mL～約0.14mL、約0.07mL～約0.12mL、または約0.08mL～約0.1mLの容量で投与される。

【0479】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{15} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 9×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 8×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 7×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 6×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 5×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 4×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 3×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 2×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{14} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 9×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 8×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 7×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 6×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 5×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 4×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 3×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 2×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{13} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 9×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 8×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 7×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 6×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 5×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 4×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 3×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 2×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{12} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 9.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 9×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 8.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 8×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 7.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 7×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 6.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 6×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 5.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 4.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 4×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 3.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 3×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 2.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 2×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 1.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 1×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 0.5×10^{11} vg/mL、約 1×10^{11} vg/mL～約 0.1×10^{11} vg/mL、または約 1×10^{11} vg/mL～約 0.01×10^{11} vg/mLの容量で投与される。

10^{11} v g / mL ~ 約 5×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 4.5×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 4×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 3.5×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 3×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 2.5×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 2×10^{11} v g / mL、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 1.5×10^{11} v g / mL の量で投与される。

【0480】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の r A A V 構築物を含む組成物）は、約 1×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 2×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 3×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 4×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 5×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 6×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 7×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 8×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 9×10^{11} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 1×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 2×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 3×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 4×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 5×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 6×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 7×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 8×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 9×10^{12} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 1×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 2×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 3×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 4×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 5×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 6×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 7×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 8×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 9×10^{13} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 1×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 2×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 3×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 4×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 5×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 6×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 7×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、約 8×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL、または約 9×10^{14} v g / mL ~ 約 1×10^{15} v g / mL の量で投与される。

【0481】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の r A A V 構築物を含む組成物）は、少なくとも 1×10^{11} 、少なくとも 5×10^{11} 、少なくとも 1×10^{12} 、少なくとも 1×10^{12} 、少なくとも 2×10^{12} 、少なくとも 3×10^{12} 、少なくとも 4×10^{12} 、少なくとも 5×10^{12} 、少なくとも 6×10^{12} 、少なくとも 7×10^{12} 、少なくとも 8×10^{12} 、少なくとも 9×10^{12} 、少なくとも 1×10^{13} 、少なくとも 2×10^{13} 、少なくとも 3×10^{13} 、少なくとも 4×10^{13} 、少なくとも 5×10^{13} 、少なくとも 6×10^{13} 、少なくとも 7×10^{13} 、少なくとも 8×10^{13} 、少なくとも 9×10^{13} 、または少なくとも 1×10^{14} ベクターゲノム (v g) / ミリリットル (mL) (v g / mL) の量で投与される。

【0482】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の r A A V 構築物を含む組成物）は、最大 1×10^{15} 、最大 5×10^{14} 、最大 1×10^{14} 、最大 5×10^{13} 、最大 1×10^{13} 、最大 9×10^{12} 、最大 8×10^{12} 、最大 7×10^{12} 、最大 6×10^{12} 、最大 5×10^{12} 、最大 4×10^{12} 、最大 3×10^{12} 、最大 2×10^{12} 、または最大 1×10^{12} ベクターゲノム (v

g) /ミリリットル (mL) の量で投与される。

【0483】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、約 1×10^{12} vg/mL、約 1.1×10^{12} vg/mL、 1.2×10^{12} vg/mL、約 1.3×10^{12} vg/mL、約 1.4×10^{12} vg/mL、約 1.5×10^{12} vg/mL、約 1.6×10^{12} vg/mL、約 1.7×10^{12} vg/mL、約 1.8×10^{12} vg/mL、約 1.9×10^{12} vg/mL、約 2.0×10^{12} vg/mL、約 2.1×10^{12} vg/mL、約 2.2×10^{12} vg/mL、約 2.3×10^{12} vg/mL、約 2.4×10^{12} vg/mL、約 2.5×10^{12} vg/mL、約 2.6×10^{12} vg/mL、約 2.7×10^{12} vg/mL、約 2.8×10^{12} vg/mL、約 2.9×10^{12} vg/mL、約 3.0×10^{12} vg/mL、約 3.1×10^{12} vg/mL、約 3.2×10^{12} vg/mL、約 3.3×10^{12} vg/mL、約 3.4×10^{12} vg/mL、約 3.5×10^{12} vg/mL、約 3.6×10^{12} vg/mL、約 3.7×10^{12} vg/mL、約 3.8×10^{12} vg/mL、約 3.9×10^{12} vg/mL、約 4.0×10^{12} vg/mL、約 4.1×10^{12} vg/mL、約 4.2×10^{12} vg/mL、約 4.3×10^{12} vg/mL、約 4.4×10^{12} vg/mL、約 4.5×10^{12} vg/mL、約 4.6×10^{12} vg/mL、約 4.7×10^{12} vg/mL、約 4.8×10^{12} vg/mL、約 4.9×10^{12} vg/mL、約 5.0×10^{12} vg/mL、約 5.1×10^{12} vg/mL、約 5.2×10^{12} vg/mL、約 5.3×10^{12} vg/mL、約 5.4×10^{12} vg/mL、約 5.5×10^{12} vg/mL、約 5.6×10^{12} vg/mL、約 5.7×10^{12} vg/mL、約 5.8×10^{12} vg/mL、約 5.9×10^{12} vg/mL、約 6.0×10^{12} vg/mL、約 7.0×10^{12} vg/mL、約 8.0×10^{12} vg/mL、約 9.0×10^{12} vg/mL、約 9.1×10^{12} vg/mL、約 9.2×10^{12} vg/mL、約 9.3×10^{12} vg/mL、約 9.4×10^{12} vg/mL、約 9.5×10^{12} vg/mL、約 9.6×10^{12} vg/mL、約 9.7×10^{12} vg/mL、約 9.8×10^{12} vg/mL、約 9.9×10^{12} vg/mL、約 1×10^{13} vg/mL、 1.1×10^{13} vg/mL、 1.2×10^{13} vg/mL、 1.3×10^{13} vg/mL、 1.4×10^{13} vg/mL、 1.5×10^{13} vg/mL、 1.6×10^{13} vg/mL、 1.7×10^{13} vg/mL、 1.8×10^{13} vg/mL、 1.9×10^{13} vg/mL、 2×10^{13} vg/mL、 5×10^{13} vg/mL、または 1×10^{14} vg/mL の量で投与される。

【0484】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 2.5×10^{12} vg/mL + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 2.5×10^{12} vg/mL の量で投与される。

【0485】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 5×10^{12} vg/mL + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 5×10^{12} vg/mL の量で投与される。

【0486】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 1×10^{13} vg/mL + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 1×10^{13} vg/mL の量で投与される。

【0487】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 2×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 3×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 4×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 5×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 6×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 7×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 8×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 9×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 1×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 2×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 3×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 4×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 5×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 6×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 7×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 8×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 9×10^{11} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 1×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 2×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 3×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 4×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 5×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 6×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 7×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 8×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、または約 9×10^{12} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛の量で投与される。

10

【0488】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 9×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 8×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 7×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 6×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 5×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 4×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 3×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 2×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 1×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 9×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 8×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 7×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 6×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 5×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 4×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 3×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 2×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 1×10^{11} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 9×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 8×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 7×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 6×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 5×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 4×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 3×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{10} ～約 2×10^{10} vg／蝸牛の量で投与される。

20

30

【0489】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{13} vg／蝸牛、約 5×10^{10} ～約 5×10^{12} vg／蝸牛、約 8×10^{10} ～約 1×10^{12} vg／蝸牛、約 1×10^{11} ～約 9×10^{11} vg／蝸牛、約 2×10^{11} ～約 8×10^{11} vg／蝸牛、約 2.5×10^{11} ～約 5×10^{11} vg／蝸牛、約 3×10^{11} ～約 4.5×10^{11} vg／蝸牛の量で投与される。

40

【0490】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数のrAAV構築物を含む組成物）は、約 1×10^{10} vg／蝸牛、約 5×10^{10} vg／蝸牛、約 1×10^{11} vg／蝸牛、約 1.5×10^{11} vg／蝸牛、約 2×10^{11} vg／蝸牛、約 2.1×10^{11} vg／蝸牛、 2.2×10^{11} vg／蝸牛、 2.3×10^{11} vg／蝸牛、 2.4×10^{11} vg／蝸牛、約 2.5×10^{11} vg／蝸牛、 2.6×10^{11} vg／蝸牛、 2.7×10^{11} vg／蝸牛、 2.8×10^{11} vg／蝸牛、 2.9×10^{11} vg／蝸牛、約 3×10^{11} vg／蝸牛、 3.1×10^{11} vg／蝸牛、 3.2×10^{11} vg／蝸牛、 3.3×10^{11} vg／蝸牛、 3.4×1

50

0.11 vg / 蝸牛、約 $3.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $3.6 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $3.7 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $3.8 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $3.9 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 約 $4 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $4.1 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $4.2 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 $4.3 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $4.4 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $4.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 $4.6 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $4.7 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、 $4.8 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 $4.9 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $5.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 約 $6 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $6.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $7 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 約 $7.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $8 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $8.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 約 $9 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、約 $9.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛、
 約 $1 \times 10^{12} \text{ vg}$ / 蝸牛の量で投与される。

10

【0491】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $2.3 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛 + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $2.3 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛の量で投与される。

【0492】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $4.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛 + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $4.5 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛の量で投与される。

20

【0493】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $9 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛 + / - 10% の量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物（例えば、本明細書に開示される1つまたは複数の rAAV 構築物を含む組成物）は、 $9 \times 10^{11} \text{ vg}$ / 蝸牛の量で投与される。

【0494】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、単回投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、複数回投与、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 回投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10回用量を含む、複数回用量として投与される。

30

【0495】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、投与レジメンとして投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の用量を含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、第1投与、及び、1回以上の後続用量（例えば、第2用量、第3用量、第4用量など）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される投与レジメンは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10回用量を含む。

40

【0496】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、後続用量の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、後続用量は、第1用量の投与の、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも7ヶ月、少なくとも8ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも10ヶ月、少なくとも11ヶ月、または少なくとも12ヶ月後に投与される。

50

【0497】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）、または、 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$ ）、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

10

【0498】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）の量で投与され、第2用量は、第1用量よりも少ない量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%少ない。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、VS腫瘍部位において、生物学的に活性な濃度の抗VEGFタンパク質を達成することが予想される用量、例えば、約 $1.2 \times 10^{11} \text{ v g / 蝸牛}$ 、または、約 $1.3 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ である。

20

【0499】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）で投与され、第2用量は、第1用量よりも多い量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。いくつかの実施形態では、第2用量は、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ mg / mL}$ ）である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ mg / mL}$ ）である。

30

【0500】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）、または、 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$ ）、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

40

【0501】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ （例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$ ）の量で投与され、第2用量は、第1用量を下回る量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量を約5%下回る、約10%下回る、約20%下回る、約30%下回る、約40%下回る、約50%下回る、約60%下回る、約70%下回る、約80%下回る、または約90%下回る。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量であ

50

る。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ mg / mL}$) である。

【0502】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$) で投与され、第2用量は、第1用量よりも多くの量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ mg / mL}$) である。

【0503】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$) の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$)、または、 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL}$)、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

【0504】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$) の量で投与され、第2用量は、第1用量を下回る量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量を約5%下回る、約10%下回る、約20%下回る、約30%下回る、約40%下回る、約50%下回る、約60%下回る、約70%下回る、約80%下回る、または約90%下回る。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $5 \times 10^{12} \text{ mg / mL}$) である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $2.5 \times 10^{12} \text{ mg / mL}$) である。

【0505】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL} + / - 10\%$ (例えば、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$) で投与され、第2用量は、第1用量よりも多くの量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。

【0506】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 $2.3 \times 10^{11} \text{ v g / 蝸牛} + / - 10\%$ (例えば、約 $2.3 \times 10^{11} \text{ v g / 蝸牛}$) の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、約 $4.5 \times 10^{11} \text{ v g / 蝸牛} + / - 10\%$ (例えば、約 $4.5 \times 10^{11} \text{ v g / 蝸牛}$)

）、または、 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} v g / 蝸牛）、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

【0507】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛）の量で投与され、第2用量は、第1用量を下回る量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量を約5%下回る、約10%下回る、約20%下回る、約30%下回る、約40%下回る、約50%下回る、約60%下回る、約70%下回る、約80%下回る、または約90%下回る。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、VS腫瘍部位において、生物学的に活性な濃度の抗VEGFタンパク質を達成することが予想される用量、例えば、約 1.2×10^{11} v g / 蝸牛、または、約 1.3×10^{12} v g / mLである。

10

【0508】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛）で投与され、第2用量は、第1用量より多くの量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} mg / 蝸牛）である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} mg / 蝸牛）である。

20

【0509】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛）の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛）、または、 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} v g / 蝸牛）、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

30

【0510】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛）の量で投与され、第2用量は、第1用量を下回る量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量を約5%下回る、約10%下回る、約20%下回る、約30%下回る、約40%下回る、約50%下回る、約60%下回る、約70%下回る、約80%下回る、または約90%下回る。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} mg / 蝸牛）である。

40

【0511】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛）で投与され、第2用量は、第1用量より多くの量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。

50

いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} m g / 蝸牛）である。

【0512】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} v g / 蝸牛）の量で投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、1回以上の後続用量を含む。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と同様の量で投与される。いくつかの実施形態では、1回以上の後続用量は、第1用量と比較して異なる量で投与される。いくつかの実施形態では、後続用量の用量が、第1用量と比較して異なる場合、後続用量は、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛）、または、 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛）、または、上記用量の間の用量で投与することができる。

【0513】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} v g / 蝸牛）の量で投与され、第2用量は、第1用量を下回る量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量を約5%下回る、約10%下回る、約20%下回る、約30%下回る、約40%下回る、約50%下回る、約60%下回る、約70%下回る、約80%下回る、または約90%下回る。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 4.5×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 4.5×10^{11} m g / 蝸牛）である。いくつかの実施形態では、第2用量は、約 2.3×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 2.3×10^{11} m g / 蝸牛）である。いくつかの実施形態では、第2用量は、V S 腫瘍部位において、生物学的に活性な濃度の抗 V E G F タンパク質を達成することが予想される用量、例えば、約 1.2×10^{11} v g / 蝸牛、または、約 1.3×10^{12} v g / m L である。

【0514】

本明細書に記載の投与レジメンのいくつかの実施形態では、第1用量は、 9×10^{11} v g / 蝸牛、+ / - 10 %（例えば、約 9×10^{11} v g / 蝸牛）で投与され、第2用量は、第1用量より多くの量で投与される。いくつかの実施形態では、第2用量は、第1用量よりも約5%多い、約10%多い、約20%多い、約30%多い、約40%多い、約50%多い、約60%多い、約70%多い、約80%多い、または約90%多い。いくつかの実施形態では、第2用量は、例えば、本明細書に開示される安全性及び／または有効性パラメーターにより測定されるように、安全かつ許容範囲内の用量である。

【0515】

いくつかの実施形態では、投与レジメンは反復投与することができる。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、少なくとも1週間毎、少なくとも2週間毎、少なくとも3週間毎、少なくとも1ヶ月毎、少なくとも2ヶ月毎、少なくとも3ヶ月毎、少なくとも4ヶ月毎、少なくとも5ヶ月毎、少なくとも6ヶ月毎、少なくとも7ヶ月毎、少なくとも8ヶ月毎、少なくとも9ヶ月毎、少なくとも10ヶ月毎、少なくとも11ヶ月毎、または少なくとも12ヶ月毎に投与することができる。

【0516】

いくつかの実施形態では、投与レジメンは1週間毎、2週間毎、3週間毎、1ヶ月毎、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、7ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、10ヶ月毎、11ヶ月毎、または12ヶ月毎に投与することができる。

【0517】

単一の A A V 構築物組成物

いくつかの実施形態では、本開示は、単一の構築物から構成される r A A V 粒子を含む

組成物またはシステムを提供する。いくつかのそのような実施形態では、単一の構築物は、抗 V E G F 遺伝子の機能的（例えば、前述のように、及び／またはそれ以外の他の機能的、例えば、コドン最適化された）コピーをコードするポリヌクレオチドを送達し得る。いくつかの実施形態では、構築物は r A A V 構築物であるか、またはそれを含む。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、単一の r A A V 構築物は、標的細胞（例えば、内耳細胞）において全長抗 V E G F メッセンジャー R N A（m R N A）またはその特徴的タンパク質を発現することが可能である。いくつかの実施形態では、単一の構築物（例えば、本明細書に記載の任意の構築物）は、機能的抗 V E G F タンパク質（例えば、機能的抗 V E G F タンパク質を生成する任意の構築物）をコードする配列を含み得る。いくつかの実施形態では、単一の構築物（例えば、本明細書に記載の任意の構築物）は、機能的抗 V E G F タンパク質（例えば、機能的抗 V E G F タンパク質を生成する任意の構築物）をコードする配列と、任意選択で追加のポリペプチド配列（例えば、調節配列、及び／またはレポーター配列）とを含み得る。

10

【0518】

いくつかの実施形態では、単一の構築物組成物またはシステムは、本明細書に記載の例示的な構築物構成要素のいずれかまたは全てを含み得る。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 90 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 91 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 92 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 93 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 94 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 95 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 96 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 106 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 107 によって表される。いくつかの実施形態では、例示的な単一の構築物は、配列番号 90、91、92、93、94、95、96、106、または 107 によって表される配列と少なくとも 85%、90%、95%、98%、または 99% 同一である。当業者であれば、構築物が、コドン最適化、新規であるが機能的同等物（例えば、サイレント変異）の導入、レポーター配列の付加、及び／または他の日常的な改変を含む追加の改変を受け得ることを認識するであろう。

20

30

【0519】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 90 に記載の配列を有し、この構築物は、r A A V-ラニビズマブ-PC 構築物と称され得、図 6 のパネル (A) に示す概略図の例示的な実施形態であり、抗 V E G F タンパク質ラニビズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 47 によって例示される 5' I T R、任意選択で配列番号 81 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される C M V エンハンサー、配列番号 50 によって例示される C B A プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 103 によって例示される抗 V E G F コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 82 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 48 によって例示される 3' I T R。

40

【0520】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 91 に記載の配列を有し、この構築物は、r A A V-ラニビズマブ構築物と称され得、図 6 のパネル (A) に示す概略図の例示的な実施形態であり、抗 V E G F タンパク質ラニビズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 45 によって例示される 5' I T R、任意選択で配列番号 77 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される C M V エンハンサー、配列番号 49 によって例示される C B A プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示さ

50

れるクローニング部位、配列番号 103 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 80 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 46 によって例示される 3' ITR。

【0521】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 92 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-ラニビズマブ、2 構築物と称され得、図 6 のパネル (A) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質ラニビズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 45 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 77 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 50 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 103 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 80 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 46 によって例示される 3' ITR。

【0522】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 106 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-ラニビズマブ-GFP 構築物と称され得、図 6 のパネル (B) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質ラニビズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 47 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 81 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 50 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 103 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 104 によって例示されるレポーター配列、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 82 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 48 によって例示される 3' ITR。

【0523】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 93 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物と称され得、図 6 のパネル (C) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質ベバシズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 47 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 81 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 50 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 22 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 82 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 48 によって例示される 3' ITR。

【0524】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 94 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-ベバシズマブ構築物と称され得、図 6 のパネル (C) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質ベバシズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 45 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 77 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 49 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 22 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選

択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 80 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 46 によって例示される 3' ITR。

【0525】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 107 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-ベバシズマブ-GFP 構築物と称され得、図 6 のパネル (B) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質ベバシズマブをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 47 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 81 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 50 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 22 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 104 によって例示されるレポーター配列、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 82 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 48 によって例示される 3' ITR。

【0526】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 95 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-アフリベルセプト-PC 構築物と称され得、図 6 のパネル (D) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質アフリベルセプトをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 47 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 81 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 50 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 42 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 82 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 48 によって例示される 3' ITR。

【0527】

いくつかの実施形態では、構築物は、配列番号 96 に記載の配列を有し、この構築物は、rAAV-アフリベルセプト構築物と称され得、図 6 のパネル (D) に示す概略図の例示的实施形態であり、抗 VEGF タンパク質アフリベルセプトをコードする。いくつかの実施形態では、例示的な構築物は、以下を含む：配列番号 45 によって例示される 5' ITR、任意選択で配列番号 77 によって例示されるクローニング部位、配列番号 64 によって例示される CMV エンハンサー、配列番号 49 によって例示される CBA プロモーター、配列番号 65 によって例示されるキメライントロン、任意選択で配列番号 78 によって例示されるクローニング部位、配列番号 42 によって例示される抗 VEGF コード領域、任意選択で配列番号 79 によって例示されるクローニング部位、配列番号 75 によって例示されるポリ (A) 部位、任意選択で配列番号 80 によって例示されるクローニング部位、及び配列番号 46 によって例示される 3' ITR。

【0528】

特定の実施形態では、抗 VEGF タンパク質をコードする構築物を含む rAAV Anc80 粒子を生成し、これを使用して当該構築物の生物学的活性及び内耳耐性を、VS に対する局所的抗 VEGF 療法の生物学的妥当性及び合理的安全性を裏付けるために評価した。いくつかの実施形態では、そのような評価を、以下のアプローチ／モデルを用いた一連の試験を通じて行った：細胞株の形質導入及び／またはトランスフェクション、蝸牛外植片の形質導入及び／またはトランスフェクション；野生型マウス細胞の蝸牛内投与及び形質導入；及び／または NHP 細胞の蝸牛内投与及び形質導入。特定の抗 VEGF 粒子の概要を表 1 に示す。特定の抗 VEGF 粒子の概要を表 1 に示す。

【0529】

【表 3】

表 1－特定の試験で使用した、または使用が予定されている粒子の概要

カプシド	プロモーター	VEGF 阻害剤コード配列	pA シグナル
AAVAnc80	CAG	ベバシズマブ	bGH
AAVAnc80 AAVAnc80	CAG CAG	ラニズマブ アフリベルセプト	bGH bGH

略語：bGH＝ウシ成長ホルモン；CAG＝サイトメガロウイルス（CMV）初期エンハンサーエレメント、5' 隣接領域と第2のエクソンの近位領域との間に位置するニワトリベータアクチン（CβA）遺伝子配列、及びウサギベータグロビン（RβG）遺伝子由来の3' スプライス配列（Miyazaki 1989；Niwa 1991；Urban 2009、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）（これらは合わせて一般にCAGプロモーターと称される）；GLP＝優良試験所基準；pA＝ポリアデニル化。

10

【0530】

例示的な rAAV－ラニズマブ－PC 構築物配列（配列番号 90）

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCCGCCCGGGCGTCTGG
 GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
 GCAGAGAGGGAGTTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCTCTG
 CGGCCCGCACGCGTGTACATTTGATTTATTTGACTAGTTTATTAAT
 AGTAATCAATTACGGGGGTCATTTAGTTTCATAGCCCCATATAT
 GGAGTTTCCGCGTTTACATAAAGTTTACGGGTAAATGGCCCCGCCCT
 GGCTGACCGGCCCAACGACCCCCCGCCCCATTGACGTCAATAA
 TGACGTATGTTTCCCATAGTAACGCCCAATAGGGGACTTTTCCA
 TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTTACGGGTAAAGTTGCCCCAC
 TTGGGCAGTACATCAAGTGTTATCATATGCCCAAGTACGCCCCC
 CTATTTGACGTCAATGACGGGTAAATGGCCCCGCCCTGGGCATTA
 TGCCCCAGTACATGACCTTTATGGGACTTTTCTCTACTTTGGCAG
 TACATCTACGTATTTAGTTCATCGCTATTTACCATGGGGTCTGAG
 GTGAGCCCCACGTTTCTGCTTCACTCTCCCCCATCTCCCCCCC
 CCTCCCCACCCCCCAATTTTGTATTTTATTTTATTTTATTTTAAAT
 ATTTTGTGTCAGCGATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGGGGCG
 AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCGAGCCCAATCAGAGCGGGCGGGCG
 TCCGAAAGTTTCTCTTTTATGGCGAGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCG
 GCCCTATAAAGAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGGAGTCTGCT
 GCGTTTGCCTTTCGCCCGGTGCCCGCTCCGCGCGCGCTCTCGC
 GCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGGTTACTCCCAACA
 GGTGAGCGGGCGGGGACGGGCCCTTCTCTCTCGGGGCTGTAAAT
 TAGCGCTTTGGTTTAAATGACGGCTCTGTTTCTTTTCTGTGGC
 TCGGTGAAGCGCTTAAAGGGCTCCGGGGAGGGGCCCTTTGTG
 CGGGGGGGAGCGGGCTCGGGGGGGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGT
 CGTGGGGAGCGGCCGCGTGGGGCCCCGCGCTGCCCGGGCGGGCT
 GTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGGCTTTGTGCGCTCCG
 CGTGTGCGCGAGGGGGAGCGCGGGCCCCGGGGGGCGGTGCCCGCG
 GGTGCGGGGGGGGGCTGCGAGGGGGGAACAAGGGCTGCGGTGCGG

20

30

40

50

GGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGG
CGGTCGGGCTGTAAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAG
TTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC
GGGGCGTGGCGCGGGGGCTCGCCGCTGCCGGGGCGGGGGGGTGG
CGGCAGGTGGGGGTGCCGGGGCGGGGGCGGGGGCCGCCCTCGGG
CCGGGGAGGGGCTCGGGGGAGGGGGCGCGGGCGGGCCCCCGGAG
CGCCGGCGGGCTGTGAGGCGCGGGCGAGCCGCAAGCCATTGC
CTTTTATGGTAATCGTGCAGAGAGGGCGCAGGGGACTTTCCTT
TGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCG
CCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGTGCGGC
GCCGGCAGGAAGGAATAATGGGCGGGGGAGGGGCCTTCGTGCGT
CGCCGCGCGCCGCGCGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGG
CTGTCCGCGGGGGGGACGGCTTGCCCTTCGGGGGGGGACGGGGC
AGGGCGGGGGTTTCGGCTTCTTGCGCTGTGACCGGGCGGGCTCTA
GAGCCTCTGCTAAACCATGTTCATGCCTTCTTTCTTTTCTCT
ACAGCTCCTGGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCC
ACCATGTACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCCGTGT
CTCTGGCCCCGTGGTCAACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGGA
ATCTGGCGGGCGGACTTGTTCAAACCTGGCGGGCTCTCTGAGA
CTGAGCTGTGCGCGCTTCTTGCGTACGACTTCAACCCACTACG
GCATGAACCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAAGGCCCTTGA
ATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACCGGGCGAGCCAACA
TACGCCCGCCGACTTCAAGCGGGAGATTCAACCTTCAGCCTGG
ACACCAAGCAAGAGGACACCGCGCGTGTACTACTGCGCCAAGTAT
CCCTACTACTACGGGCAACAGCCACTGGTACTTTGACGTGT
GGGGACAGGGGCACACTGGTCAACAGTGTCTAGCGCCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAG
TCTACCAAGCGGAGGGAACAGCGCGCTCTGGGGCTGTCTGGTCA
AGGACTACTTTTCCCGAGCCTGTGTGACCGGTGTCTCTGGGAATTC
TGGCGCTCTGACAAGCGGGCGTGCACACCTTTTCCAGCTGTG
CTGCAAAGCAGCGGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCTGTGA
CAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGGCACCCAGACCTACATCTG
CAATGTGAACCAACAAGCCTAGCAACAACAAGGTGGACAAG
AAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGGCA
AGCGGAAGAGAAAGAGGGCTCTGGCGAAGGGCAGAGGGCAGCCT
GCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAAACCCCGGACCTATG
TATAGAATGCAGCTCCTGTCTCTGCATTGCCCCGTGAGCCTGG
CTCTCGTGAACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCC
CAGCAGCCTGTCTGCGCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC
ACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACCT
GGTATCAGCAAAAGCCCCGGCAAGGGCCCCCTAAGGTGCTGAT
CTACTTCAACAAGCAGCCTGCACTCCGGCGGTGCCCAAGCAGA
TTTTCTGGCTCTGGGACGCGGGCACCGACTTCAACCCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGGC
ACAAAGGTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCCGCTCCTAGCG
TGTTCACTCTTTCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGG
CACAGCCTCTGTGCTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCCC
AGAGAAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGC

10

20

30

40

50

A G A G C G G C A A C A G C C A A G A G A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C
C A A G G A T A G C A C C T A T A G C C T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G
A G C A A G G C C G A C T A C G A G A A G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G
A A G T G A C C C A C C A G G G C C T T T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G
C T T C A A C C G G G G C G A A T G T T A A G A G C T C G C T G A T C A G C C T
C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T C T G T T G T T T G C C C
C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A A G G T G C C A C T C C C
A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A T G A G G A A A T T G C A T C G C A T T
G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T C T G G G G G G T G G G G T G G G
G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T G G G A A G A C A A T A G C A G G
C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G C T C T A T G G A A G C T T G A A T T C
A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C T A G G A A C C C C T A G T G A T G G
A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A
G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C
C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G

【 0 5 3 1 】

例示的な r A A V - ラニビズマブ構築物配列（配列番号 9 1）

T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G
C C G C C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G
C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G
G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T T T G T C G A C G C G G C C G
C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T
C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T
C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A
C C G C C C A A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T
A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G
T C A A T G G G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A
G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G
A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A
G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C
T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C
C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C T C C C
C A C C C C C A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G
T G C A G C G A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A
G G C G G G G C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C
G G A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G
A A A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C
T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G G G A G T C G C T G C G T
T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C G C C G
C C C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A G G T G
A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C
G C T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C T G C G
T G A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G C G G G
G G G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G C G T G
G G G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T G T G A
G C G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G C G T G
T G C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C G G T G
C G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G G G T G
T G T G C G T G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G C G G T
C G G G C T G T A A C C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G T T G C

10

20

30

40

50

T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C G G G G
C G T G G C G C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C G G G G G T G G C G G C
A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C C G C C T C G G G C C G G
G G A G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G C C C C C G G A G C G C C
G G C G G C T G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C A G C C A T T G C C T T T
T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G G A C T T C C T T T G T C
C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G G A G G C G C C G C C G C
A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G C G G T G C G G C G C C G
G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C T T C G T G C G T C G C C
G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A G C C T C G G G G C T G T
C C G C G G G G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G G G A C G G G G C A G G G
C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G G C G G C T C T A G A G C
C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T C T T T T C C T A C A G
C T C C T G G G C A A C G T G C T G G T T A T T G T G A C C G G T G C C A C C A
T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T C T C T
G G C C C T G G T C A C C A A T T C T G A G G T G C A G C T G G T G G A A T C T
G G C G G C G G A C T T G T T C A A C C T G G C G G C T C T C T G A G A C T G A
G C T G T G C C G C T T C T G G C T A C G A C T T C A C C C A C T A C G G C A T
G A A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G C C T T G A A T G G
G T C G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C G A G C C A A C A T A C G
C C G C C G A C T T C A A G C G G A G A T T C A C C T T C A G C C T G G A C A C
C A G C A A G A G C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A
G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A A G T A T C C C T
A C T A C T A C G G C A C C A G C C A C T G G T A C T T T G A C G T G T G G G G
A C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A G
G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C T A G C A G C A A G T C T A
C C A G C G G A G G A A C A G C C G C T C T G G G C T G T C T G G T C A A G G A
C T A C T T T C C C G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A T T C T G G C
G C T C T G A C A A G C G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C T G T G C T G C
A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G T
G C C A A G C A G C T C T C T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A T
G T G A A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A A G G
T G G A A C C C A A G A G C T G C G A C A A G A C C C A C A C C G G C A A G C G
G A A G A G A A G A G G C T C T G G C G A A G G C A G A G G C A G C C T G C T T
A C A T G T G G C G A C G T G G A A G A G A A C C C C G G A C C T A T G T A T A
G A A T G C A G C T C C T G T C C T G C A T T G C C C T G A G C C T G G C T C T
C G T G A C C A A C A G C G A C A T C C A G C T G A C A C A G A G C C C C A G C
A G C C T G T C T G C C T C T G T G G G A G A C A G A G T G A C C A T C A C C T
G T A G C G C C A G C C A G G A C A T C T C C A A C T A C C T G A A C T G G T A
T C A G C A A A A G C C C G G C A A G G C C C C T A A G G T G C T G A T C T A C
T T C A C A A G C A G C C T G C A C T C C G G C G T G C C C A G C A G A T T T T
C T G G C T C T G G C A G C G G C A C C G A C T T C A C C C T G A C C A T A T C
T A G C C T G C A G C C T G A G G A C T T C G C C A C C T A C T A C T G C C A G
C A G T A C A G C A C C G T G C C T T G G A C A T T T G G C C A G G G C A C A A
A G G T G G A A A T C A A G C G G A C T G T G G C C G C T C C T A G C G T G T T
C A T C T T T C C A C C T A G C G A C G A G C A G C T G A A G T C T G G C A C A
G C C T C T G T C G T G T G C C T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G A G
A A G C C A A G G T G C A G T G G A A A G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G
C G G C A A C A G C C A A G A G A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C C A A G
G A T A G C A C C T A T A G C C T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G A G C A

10

20

30

40

50

A G G C C G A C T A C G A G A A G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G A A G T
G A C C C A C C A G G G C C T T T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G C T T C
A A C C G G G G C G A A T G T T A A G A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A C
T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T C T G T T G T T T G C C C C T C C
C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G
T C C T T T C C T A A T A A A A T G A G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T
G A G T A G G T G T C A T T C T A T T C T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G
G A C A G C A A G G G G G A G G A T T G G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G
C T G G G G A T G C G G T G G G C T C T A T G G A A G C T T G A A T T C A G C T
G A C G T G C C T C G G A C C G C C T A G G A G G A A C C C C T A G T G A T G G
A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A
G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C
C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G
T G G C C A A

10

【0532】

例示的な r A A V - ラニビズマブ、2 構築物配列（配列番号 92）

T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G
C C G C C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G
C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G
G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T T T G T C G A C G C G G C C G
C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T
C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T
C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A
C C G C C C A A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T
A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G
T C A A T G G G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A
G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G
A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A
G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C
T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C
C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C C T C C C
C A C C C C C A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G
T G C A G C G A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A G G
C G G G G C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G
A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A
A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C T A
T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G G G A G T C G C T G C G T T G
C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C G C C G C C
C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A G G T G A G
C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C G C
T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C T G C G T G
A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G C G G G G G
G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G C G T G G G
G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T G T G A G C
G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G C G T G T G
C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C G G T G C G
G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G G G T G T G
T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G C G G T C G
G G C T G T A A C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G T T G C T G
A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C G G G G C G

20

30

40

50

TGGCGCGGGGCTCGCCGCTGCCGGGGCGGGGGGGTGGCGGCGAG
GTGGGGGTGCCGGGGCGGGGGCGGGGGCGCCCTCGGGGCGGGGG
AGGGCTCGGGGGAGGGGGCGCGGGCGGGCCCCCGGAGCGCCGG
CGGCTGTGAGGCGCGGGCGAGCCGCGAGCCATTGCCCTTTTA
TGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGGACTTCTCTTTGTCCC
AAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCGCGCGCAC
CCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGGC
AGGAAGGAAATGGGCGGGGGAGGGGCCTTCGTGCGTCCCGC
GCCGCCGTCGCCCTTCTCCCTCTCCAGCCCTCGGGGGCTGTCC
GCGGGGGGACGGCTGCGCTTCCGGGGGGGACGGGGGCGAGGGCG
GGGTTCGGCTTCTGTGCGTGTGACCGGGCGGGCTCTAGAGCCT
CTGCTAACCATGTTTCATGCCCTTCTTCTTTTCTCTACAGCT
CCTGGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGACCGGTGCCACCATG
TACCGGATGCAGCTGCTGAGCTGTATCGCCCTGTCTCTGG
CCCTGGTCAACCAATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGG
CGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGGCTCTCTGAGACTGAGC
TGTGCCGCTTCTGGCTACGACTTCAACCCACTACGGCATGA
ACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGGCAAGGGCCTTGAATGGGT
CGGATGGATCAACACCTACACCGGGCGAGCCAAACATACGCC
GCCGACTTCAAGCGGAGATTCAACCTTCAGCCCTGGACACCA
GCAAGAGCACCCGCCCTACCTGCAGATGAACAGCCCTGAGAGC
CGAGGACACCGCCGCTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTAC
TACTACGGCACCCAGCCACTGGTACTTTGACGTGTGGGGGAC
AGGGCACACCTGGTCAACAGTGTCTAGCGCCCTCTACAAAGGG
CCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACC
AGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGGCTGTCTGGTCAAGGACT
ACTTTCCCGAGCCCTGTGACCGGTGTCTCTGGAAATCTGGCGC
TCTGACAAGCGGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGTGCTGCAA
AGCAGCGGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCTGTGACAGTGC
CAAGCAGCTCTCTGGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGT
GAACCAACAAGCCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGGTG
GAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCGGCAAGCGGA
AGAGAAGAGGCTCTGGCGAAGGCGAGAGGCGAGCCCTGCTTAC
ATGTGGCGACGTGGAAGAGAAACCCCGGACCTATGTATAGA
ATGCAGCTCCTGTCTCTGCATTGCCCCGTGAGCCCTGGCTCTCG
TGACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCCCAGCAG
CCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCACCTGT
AGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACCTGGGTATC
AGCAAAAGCCCCGGGCAAGGGCCCCCTAAGGTGCTGATCTACTT
CACAAAGCAGCCTGCACCTCCGGCGGTGCCCAGCAGATTTTCT
GGCTCTGGGACGCGGGCACCGACTTCAACCCCTGACCATATCTA
GCCTGCAGCCTGAGGACTTCCGCCACCTACTACTGCCAGCA
GTACAGCACCCGTGCCCTTGGACATTTGGCCAGGGGCACAAAG
GTGGAAATCAAGCGGACTGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCAC
TCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGGCACAGC
CTCTGTCTGTGTGCTGTGAACAACCTTCTACCCCAAGAGAA
GCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGAGCG
GCAACAGCCAAAGAGAGCGGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGA
TAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAG
GCCGACTACGAGAAAGCACAAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGA

10

20

30

40

50

CCCACCAAGGGCCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAA
CCGGGGCGAATGTTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTG
TGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC
CGTGCCCTTCCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCACTGT
CTTTCTCTAATAAAAATGAGGGAATTTGCATCGCATTTGTCTGA
GTAGGTGTTCATTTCTATTTCTGGGGGGGTGGGGGTGGGGGCAGGA
CAGCAAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGGCATGCT
GGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTGAATTCAGCTGA
CGTGCCCTCGGACCGCCCTAGGAGGGAACCCCTAGTGATGGAG
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG
CCGGGGCGACCAAAGGTGCGCCCGACGCGCCGGGGCTTTGCCCG
GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAA

【0533】

例示的なrAAV-ラニビズマブ-GFP構築物配列（配列番号106）

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGGCCGCCCGGGCGGTGG
GCGACCTTTGGTCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
GCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGGTTCTCTG
CGGCCCGCACGCGTGCATTGATTATTGACTAGTTATTAAT
AGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCATATAT
GGAGTTCCGCGGTTACATAACTTTACGGGTAAATGGCCCCGCC
GGCTGACCGGCCCAACGACCCCCCGCCCATTTGACGTCAATAA
TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCCAATAGGGGACTTTCCA
TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGGTAAACTGCCCCAC
TTGGCAGTACATCAAGTGATATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGGTAAATGGCCCCGCCCTGGCATTA
TGCCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTTACCATGGGGTCGAG
GTGAGCCCCACGTTTCTGCTTCACTCTCCCCCATCTCCCCC
CCTCCCCACCCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATT
ATTTTGTGCGAGCGATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCG
AGGCGGAGAGGTTGCGGGCGGCGAGCCAAATCAGAGCGGCG
TCCGAAGAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCG
GCCCTATAAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCT
GCGTTGCTTCCGCCCCCGTGCCCCCGCTCCGCGCGCCTCGC
GCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCAACA
GGTGAGCGGGCGGGGACGGGCCCTTCTCTCTCGGGCTGTAA
TAGCGCTTGGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGC
TGCGTGAAAGCCTTAAGGGGCTCCGGGGAGGGGCCCTTTGTG
CGGGGGGGAGCGCGCGGTGCGGGCCCGCGCTGCCCGGGCT
GTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCGCGGGGGCTTTGTGCGCTCG
CGTGTTGCGCGAGGGGGAGCGCGGGCGGGGGCGGGTGGCCCG
GGTGCGGGGGGGGGCTGCGAGGGGGAACAAAGGCTGCGGTGCG
GGTGTTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGGTGTGGGCGCGG
CGGTGCGGGCTGTAAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAG
TTGCTGAGCACGGGCCCGGCTTCCGGGTGCGGGGGCTCCGTG
GGGGCGTGCGCGGGGGCTCGCCGTGCGGGGGGGGGGGTGG
CGGCAGGTGGGGGGTGCCGGGGCGGGGGCGGGGGCGCCTCGGG

10

20

30

40

50

CCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGGCCCCCGGAGG
CGCCGGCGGGCTGTGAGGCGCGGGCGAGCCGCGAGCCATTGCG
CTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGGACTTTCCTT
TGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGGAGGGCGCCCG
CCGCAACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGGCGAAGCGGGTGCGGC
GCCGGGCAGGAAGGAATAATGGGGCGGGGGAGGGGCCCTTCGTGCGT
CGCCGCGCGCCGCGCGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCCTCGGGG
CTGTCCGCGGGGGGGACGGCTGCGCTTTCGGGGGGGGACGGGGGCG
AGGGCGGGGGTTTCGGGCTTCTGGGCGTGTGACCGGGCGGGCTCTA
GAGCCTCTGTCTAACCATGTTCATGCGCTTCTTTCTTTTCTCT
ACAGCTCCTGGGGCAACGTGTGCTGGTTATTGTGACCGGGTGCC
ACCATGTACCGGATGCGAGCTGTGTGAGCTGTATCGCCCTGT
CTCTGGGCCCTGGTCAACCAATTCTGAGGTGCGAGCTGGTGGA
ATCTGGCGGGCGGACTTGTTC AACCTGGCGGGCTCTCTGAGA
CTGAGCTGTGCGCGCTTCTGGCTACGACTTTCACCCCACTACG
GCATGAACCTGGGGTCCGACAGGCCCCCTGGGCAAGAGGCCCTTGA
ATGGGTTCGGATGGATCAACACCTACACCGGGCGAGCCAACA
TACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACACCTTCAGCCCTGG
ACACCAAGCAAGAGGCAACCGCCCTACCTGCAGATGAACAGCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCGCGTGTACTACTGCGCCAAGTAT
CCCTACTACTACGGGCACCAAGCCACTGGTACTTTGACGTGT
GGGGACAGGGGCACACTGGTCAACAGTGTCTAGCGCCCTCTAC
AAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGGCTCCTAGCGAGCAAG
TCTACCAAGCGGAGGGAACAGCGCGCTCTGGGGCTGTCTGGGTCA
AGGACTACTTTTCCCGAGCCTGTGTGACCGGTGTCTCTGGAATT
TGCGCGCTCTGACAAGCGGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTG
CTGCAAGAGCAGCGGCCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCTGTGA
CAGTGCCAAGCAGCTCTCTGGGGCACCCAGACCTACATCTG
CAATGTGAACCAACAAGCCTAGCAACAACAAGGTGGACAAG
AAGGTGGAACCCCAAGAGCTGCGACAAGAGCCCAACCGGCA
AGCGGAAGAGAAAGAGGGCTCTGGCGAAGGGCAGAGGGCAGCCT
GCTTACATGTGGCGACGTGGAAGAGAAACCCCGGACCTATG
TATAGAATGCAGCTCCTGTCTCTGCATTGCCCCGTGAGCCTGG
CTCTCGTGAACCAACAGCGACATCCAGCTGACACAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCGCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATC
ACCTGTAGCGCCAGGCCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACCT
GGTATCAGCAAAAAGCCCCGGCAAGGGCCCCCTAAGGTGCTGAT
CTACTTCAACAAGCAGCCTGCACCTCCGGCGGTGCCCAAGCAGA
TTTTCTGGGCTCTGGGCAGCGGGCACCGACTTTCACCCCTGACCA
TATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTACAGCACCGGTGCCCTTGGACATTTGGCCAGGGGCG
ACAAAGGTGGAAATCAAGCGGAGCTGTGGCCCGCTCCTAGCGG
TGTTTCATCTTTCCACCTAGCGAGCAGAGCTGAAGTCTGG
CACAGCCTCTGTGCTGTGCTGTGCTGAACAACCTTCTACCCC
AGAGAAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCG
AGAGCGGGCAACAGCCAAGAGAGCGTGAACAGAGCAGGACTC
CAAGGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTG
AGCAAGGGCCGACTACGAGAAAGCACAAAGTGTACGCCCTGCG
AAGTGACCCACCAAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGTGACCAAGAG
CTTCAACCGGGGGCGAATGTATGGTGAAGCAAGGGGCGAGGAG

10

20

30

40

50

CTGTTTCAACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCTGAGCTGGACGG
GCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGG
CGAGGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTTC
ATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGGCCCAACC
TCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTTCAAGCCG
CTACCCCGACCAACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC
GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT
TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCTGAGCTGAAG
GGCATCTGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTTGGGGCACA
AGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCCTATATCAT
GGCCGACAAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAG
ATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
ACCACTACCAAGCAGAAACACCCCCCATCTGGCGGACGGGCCCGT
GCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAAGCGCGATCACATGGTCC
TGCTGGAGTTCTGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCAT
GGACGAGCTGTACAAGTAAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA
CTGTGCCCTTCTAGTTTGCCAGCCATCTGTTTGTCTTGGCCCTC
CCCCGTGCCCTTCTTGTACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTCCTTTCTCTAATAAATGAGGAATTTGCATCGCATTTGTC
TGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAGCAGGCAT
GCTGGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAAGCTTTGAATTCAGC
TGACGTGCCCTCGGACCGCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGT
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC
CGGGCGACCAAAAGGTGCGCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCG
GCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

【0534】

例示的なrAAV-ベシズマブ-PC構築物配列（配列番号93）

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGGCCGCCCGGGCGGTCTGG
GCGACCTTTGGTCCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC
GCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGGTTCTCTG
CGGCCCGCACGCGTGCATTTGATTTACTAGTTATTTAAT
AGTAATCAATTAACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCCATATAT
GGAGTTTCCGCGTTACATAAATTTACGGGTAAATGGCCCCGCCCT
GGCTGACCGGCCCAACGACCCCGGCCCATTTGACGTCAATAA
TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCCAATAGGGGACTTTCCA
TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTTACGGGTAAACTGCCCCAC
TTGGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCC
CTATTTGACGTCAATGACGGGTAAATGGCCCCGCCCTGGCATTA
TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTCTACTTTGGCAG
TACATCTACGTATTTAGTCACTCGCTATTTACCATGGGGTCGAG
GTGAGCCCCACGTTTCTGCTTCACTCTCCCCCATCTCCCCC
CCTCCCCACCCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAAT
ATTTTGTGACGCGATGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GCCAGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGGCGGGGGCGGG
AGGCGGAGAGGTGCGGCGGGCAGCCAAATCAGAGCGGGCGGC
TCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGGG
GCCCTATAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCTGCT

G C G T T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C
G C C G C C C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A
G G T G A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T
T A G C G C T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C
T G C G T G A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G
C G G G G G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G
C G T G G G G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T
G T G A G C G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G
C G T G T G C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C
G G T G C G G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G
G G T G T G T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G
C G G T C G G G C T G T A A C C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G
T T G C T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C
G G G G C G T G G C G C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C G G G G G G T G G
C G G C A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C C G C C T C G G G
C C G G G G A G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G C C C C C G G A G
C G C C G G C G G C T G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C A G C C A T T G C
C T T T T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G G A C T T C C T T
T G T C C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G G A G G C G C C G
C C G C A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G C G G T G C G G C
G C C G G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C T T C G T G C G T
C G C C G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A G C C T C G G G G
C T G T C C G C G G G G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G G G A C G G G G C
A G G G C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G G C G G C T C T A
G A G C C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T C T T T T C C T
A C A G C T C C T G G G C A A C G T G C T G G T T A T T G T G A C C G G T G C C
A C C A T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T
C T C T G G C C C T G G T C A C C A A T T C T G A G G T G C A G C T G G T G G A
A T C T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C C T G G C G G C T C T C T G A G A
C T G A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A C A C C T T C A C C A A C T A C G
G C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G C C T T G A
A T G G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C G A G C C A A C A
T A C G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G A T T C A C C T T C A G C C T G G
A C A C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T
G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A A G T A T
C C C C A C T A C T A C G G C A G C A G C C A C T G G T A C T T T G A C G T G T
G G G G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C
A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C T A G C A G C A A G
T C T A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C T C T G G G C T G T C T G G T C A
A G G A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A T T C
T G G C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C T G T G
C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A
C A G T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G
C A A T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G
A A G G T G G A A C C C A A G A G C T G C 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

10

20

30

40

50

G A A C A G T A C A A C 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 A G 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 T C C A A G C C G G G A A G A G A T G A C C 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 C G T G 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 A 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 T C C A G A T G G C A G C A G G G C A A C G T G T T C A G C T G C A G C G 10
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
T C T G A G C C T G T C T C C T G G C A A G C G G A A G A G A A G A G G C T C T
G G C G A A G G C A G A G G C A G C C T G C T T A C A T G T G G C G A C G T G G
A A G A G A A C C C C G G A C C T A T G T A T A G A A T G C A G C T C C T G T C
C T G C A T T G C C C T G A G C C T G G C T C T C G T G A C C A A C A G C G A C
A T C C A G A T G A C A C A G A G C C C C A G C A G C C T G T C T G C C T C T G
T G G G A G A C A G A G T G A C C A T C A C C T G T A G C G C C A G C C A G G A
C A T C T C C A A C T A C C T G A A C T G G T A T C A G C A A A A G C C C G G C
A A G G C C C C T A A G G T G C T G A T C T A C T T C A C A A G C A G C C T G C 20
A C T C C G G C G T G C C C A G C A G A T T T T C T G G C T C T G G C A G C G G
C A C C G A C T T C A C C C T G A C C A T A T C T A G C C T G C A G C C T G A G
G A C T T C G C C A C C T A C T A C T G C C A G C A G T A C A G C A C C G T G C
C T T G G A C A T T T G G C C A G G G C A C A A A G G T G G A A A T C A A G C G
G A C T G T G G C C G C T C C T A G C G T G T T C A T C T T T C C A C C T A G C
G A C G A G C A G C T G A A G T C T G G C A C A G C C T C T G T C G T G T G C C
T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G A G A A G C C A A G G T G C A G T G
G A A A G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A A G A G
A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C C A A G G A T A G C A C C T A T A G C C
T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G A G C A A G G C C G A C T A C G A G A A 30
G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G A A G T G A C C C A C C A G G G C C T T
T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G C T T C A A C C G G G G C G A A T G T T
A A G A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C
C A G C C A T C T G T T G T T T G C C C C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A
C C C T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A
T G A G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T
A T T C T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G
A T T G G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G
C T C T A T G G A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G
C T A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G 40
C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G
C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A
G C G A G C G C G C A G

【 0 5 3 5 】

例示的な r A A V - ベバシズマブ構築物配列（配列番号 9 4）

T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G
C C G C C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G
C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G
G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T T T G T C G A C G C G G C C G
C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T
C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T 50

50

ACTACTACGGGCAGCAGCCACTTGGTACTTTTGACGTGTGGGG
ACAGGGGCACACTTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAG
GGCCCCAGCGTTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTA
CCAGCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGGCTGTCTGGGTCAAGGA
CTACTTTTCCCGAGCCCTGTGACCGTGTCTCTGGGAATTCTGGC
GCTCTGACAAGCGGCGGTGCACACCTTTTCCAGCTGTGCTGC
AAAGCAGCGGCCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCTGTGACAGT
GCCAAGCAGCTCTCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAT
GTGAACCAACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGG
TGGAAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTC
ATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTC
CTGTTTTCTCTCCAAGCCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCA
GAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCCA
CGAGGATCCCAGAGTGAAAGTTCAATTGGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCTAGAGAGGAAC
AGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCTCGTGTGCTGACCGT
GCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAAAGAGTACAAGTGC
AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCTCTCTCTATCGAGAAAA
CCATCAGCAAGGCCCAAGGGCCAGCCCTAGGGAACCCCAAGGT
TTACACACTGCTCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTGTCCCTGACCTGCTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTT
CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAA
GAACAACCTACAAGACAACCCCTCTCTGTGTGCTGGACAGCGAC
GGCTCATTTCTTCTCTGTACAGCAAGCTGTGACAGTGGACAAGT
CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTGAGCGTGTAT
GCACGAGGCCCTGTACAACAACCACTACACCCAGAAAGTCTCTG
AGCCTGTCTCTCTGGCAAGCGGAAGAGAAAGAGGCTCTGGCG
AAGGCAGAGGCCAGCCCTGCTTACATGTGGCGACGTGGAAAGA
GAACCCCGGACCTATGTATAGAAATGCAGCTCTCTGTCTGTG
ATTGCCCTGAGCCTGGCTCTCTCGTGAACCAACAGCGACATCC
AGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCCTGTCTGTCTGTGGG
AGACAGAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATC
TCCAACCTACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCCGGCAAGG
CCCCCTAAGGTGTGTATCTACTTTACAACAAGCAGCCCTGTCACTC
CGGCGTGTCCCAGCAGATTTTCTGGCTCTGGGCAGCGGGCACCC
GACTTCAACCCCTGACCATATCTAGCCTGTGAGCCCTGAGGACT
TCGCCACCTACTACTGTCCAGCAGTACAGCACCCGTGCCCTTG
GACATTTGGGCCAGGGCAACAAGGTGGAAATCAAGCGGACT
GTGGCCGCTCTCTAGCGTGTTCATCTTTTCCACCTAGCGACG
AGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCCTCTGTCTGTGTGCTGTGCT
GAACAACCTTCTACCCCAAGAGAAAGCCAAGGTGCAGTGGAAA
GTGGACAATGCCCTGTGAGAGCGGCAACAGCCCAAGAGAGCG
TGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACCTATAGCCTGTAG
CAGCACCCCTGACACTGTAGCAAGGCCGACTACGAGAAAGCAC
AAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGAACCCACCAAGGGCCCTTTCTA
GCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGTTAAGA
GCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTGTGTTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTCTTGACCCCT
GGAAGGTGCCACTCCCACCTGTCTCTTTCTCTAATAAAAATGAG
GAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCATTC

10

20

30

40

50

T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T G
G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G C T C T
A T G G A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C C T A
G G A G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G
C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G
C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A
G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A

【 0 5 3 6 】

例示的な r A A V - ベバシズマブ - G F P 構築物配列 (配列番号 1 0 7)

C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C C C G G G C G T C G G
G C G A C C T T T G G T C G C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C
G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T G
C G G C C G C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T
A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T
G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T
G G C T G A C C G C C C A A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A
T G A C G T A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A
T T G A C G T C A A T G G G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C
T T G G C A G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C
C T A T T G A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A
T G C C C A G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G
T A C A T C T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G
G T G A G C C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C
C C T C C C C A C C C C C A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T
A T T T T G T G C A G C G A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G C G C G C
G C C A G G C G G G G C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G
A G G C G G A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C
T C C G A A A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G
G C C C T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G G G A G T C G C T
G C G T T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C
G C C G C C C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A
G G T G A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T
T A G C G C T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C
T G C G T G A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G
C G G G G G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G
C G T G G G G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T
G T G A G C G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G
C G T G T G C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C
G G T G C G G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G
G G T G T G T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G
C G G T C G G G C T G T A A C C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G
T T G C T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C
G G G G C G T G G C G C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C G G G G G G T G G
C G G C A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C C G C C T C G G G
C C G G G G A G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G C C C C C G G A G
C G C C G G C G G C T G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C A G C C A T T G C
C T T T T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G G A C T T C C T T
T G T C C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G G A G G C G C C G
C C G C A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G C G G T G C G G C
G C C G G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C T T C G T G C G T

10

20

30

40

50

C G C C G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A G C C T C G G G G
C T G T C C G C G G G G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G G G A C G G G G C
A G G G C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G G C G G C T C T A
G A G C C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T C T T T T C C T
A C A G C T C C T G G G C A A C G T G C T G G T T A T T G T G A C C G G T G C C
A C C A T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T
C T C T G G C C C T G G T C A C C A A T T C T G A G G T G C A G C T G G T G G A
A T C T G G C G G C G G A C T T G T T C A A C C T G G C G G C T C T C T G A G A
C T G A G C T G T G C C G C T T C T G G C T A C A C C T T C A C C A A C T A C G
G C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G C C T T G A
A T G G G T C G G A T G G A T C A A C A C C T A C A C C G G C G A G C C A A C A
T A C G C C G C C G A C T T C A A G C G G A G A T T C A C C T T C A G C C T G G
A C A C C A G C A A G A G C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T
G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C A A G T A T
C C C C A C T A C T A C G G C A G C A G C C A C T G G T A C T T T G A C G T G T
G G G G A C A G G G C A C A C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C
A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C T A G C A G C A A G
T C T A C C A G C G G A G G A A C A G C C G C T C T G G G C T G T C T G G T C A
A G G A C T A C T T T C C C G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A T T C
T G G C G C T C T G A C A A G C G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C T G T G
C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A
C A G T G C C A A G C A G C T C T C T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G
C A A T G T G A A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G
A A G G T G G A A C C C A A G A G C T G C 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 C 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 A G 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 T C C A A G C C G G G A A G A G A T G A C C 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 C G T G 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 A 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 T C C A G A T G G C A G C A G G G C 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
T C T G A G C C T G T C T C C T G G C A A G C G G A A G A G A A G A G G C T C T
G G C G A A G G C A G A G G C A G C C T G C T T A C A T G T G G C G A C G T G G
A A G A G A A C C C C G G A C C T A T G T A T A G A A T G C A G C T C C T G T C
C T G C A T T G C C C T G A G C C T G G C T C T C G T G A C C A A C A G C G A C
A T C C A G A T G A C A C A G A G C C C C A G C A G C C T G T C T G C C T C T G
T G G G A G A C A G A G T G A C C A T C A C C T G T A G C G C C A G C C A G G A
C A T C T C C A A C T A C C T G A A C T G G T A T C A G C A A A A G C C C G G C
A A G G C C C C T A A G G T G C T G A T C T A C T T C A C A A G C A G C C T G C
A C T C C G G C G T G C C C A G C A G A T T T T C T G G C T C T G G C A G C G G
C A C C G A C T T C A C C C T G A C C A T A T C T A G C C T G C A G C C T G A G

10

20

30

40

50

G A C T T C G C C A C C T A C T A C T G C C A G C A G T A C A G C A C C G T G C
 C T T G G A C A T T T G G C C A G G G C A C A A A G G T G G A A A T C A A G C G
 G A C T G T G G C C G C T C C T A G C G T G T T C A T C T T T C C A C C T A G C
 G A C G A G C A G C T G A A G T C T G G C A C A G C C T C T G T C G T G T G C C
 T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G A G A A G C C A A G G T G C A G T G
 G A A A G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A A G A G
 A G C G T G A C A G A G C A G G A C T C C A A G G A T A G C A C C T A T A G C C
 T G A G C A G C A C C C T G A C A C T G A G C A A G G C C G A C T A C G A G A A
 G C A C A A A G T G T A C G C C T G C G A A G T G A C C C A C C A G G G C C T T
 T C T A G C C C T G T G A C C A A G A G C T T C A A C C G G G G C G A A T G T A
 T G G T G A G C A A G G G C G A G G A G C T G T T C A C C G G G G T G G T G C C
 C A T C C T G G T C G A G C T G G A C G G C G A C G T A A A C G G C C A C A A G
 T T C A G C G T G T C C G G C G A G G G C G A G G G C G A T G C C A C C T A C G
 G C A A G C T G A C C C T G A A G T T C A T C T G C A C C A C C G G C A A G C T
 G C C C G T G C C C T G G C C C A C C C T C G T G A C C A C C C T G A C C T A C
 G G C G T G C A G T G C T T C A G C C G C T A C C C C G A C C A C A T G A A G C
 A G C A C G A C T T C T T C A A G T C C G C C A T G C C C G A A G G C T A C G T
 C C A G G A G C G C A C C A T C T T C T T C A A G G A C G A C G G C A A C T A C
 A A G A C C C G C G C C G A G G T G A A G T T C G A G G G C G A C A C C C T G G
 T G A A C C G C A T C G A G C T G A A G G G C A T C G A C T T C A A G G A G G A
 C G G C A A C A T C C T G G G G C A C A A G C T G G A G T A C A A C T A C A A C
 A G C C A C A A C G T C T A T A T C A T G G C C G A C A A G C A G A A G A A C G
 G C A T C A A G G T G A A C T T C A A G A T C C G C C A C A A C A T C G A G G A
 C G G C A G C G T G C A G C T C G C C G A C C A C T A C C A G C A G A A C A C C
 C C C A T C G G C G A C G G C C C C G T G C T G C T G C C C G A C A A C C A C T
 A C C T G A G C A C C C A G T C C G C C C T G A G C A A A G A C C C C A A C G A
 G A A G C G C G A T C A C A T G G T C C T G C T G G A G T T C G T G A C C G C C
 G C C G G G A T C A C T C T C G G C A T G G A C G A G C T G T A C A A G T A A G
 A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G
 C C A T C T G T T G T T T G C C C C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C
 T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A T G A
 G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T
 C T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T
 G G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G C T C
 T A T G G A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C T A
 G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C
 G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C
 G

A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A
 G C G C G C A G

【0537】

例示的なrAAV-アフリベルセプト-PC構築物配列（配列番号95）

C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G C C C G G G C G T C G G
 G C G A C C T T T G G T C G C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C
 G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T G
 C G G C C G C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T
 A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T
 G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T

50

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 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 10
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 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 20
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 C 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 A T A A G
A G C T C G C T G A T C A G C C T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G
C C A T C T G T T G T T T G C C C C T C C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C
T G G A A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A T G A
G G A A A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T
C T G G G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T
G G G A A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G C T C 30
T A T G G A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C T A
G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C
G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C
G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G
A G C G C G C A G

【 0 5 3 8 】

例示的な r A A V - アフリベルセプト構築物配列 (配列番号 96)

T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G
C C G C C C G G G C A A A G C C C G G G C G T C G G G C G A C C T T T G G T C G
C C C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G 40
G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T T T G T C G A C G C G G C C G
C A C G C G T G A C A T T G A T T A T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T
C A A T T A C G G G G T C A T T A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T
C C G C G T T A C A T A A C T T A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A
C C G C C C A A C G A C C C C C G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T
A T G T T C C C A T A G T A A C G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G
T C A A T G G G T G G A C T A T T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A
G T A C A T C A A G T G T A T C A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G
A C G T C A A T G A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A
G T A C A T G A C C T T A T G G G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C 50

T A C G T A T T A G T C A T C G C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C
C C C A C G T T C T G C T T C A C T C T C C C C A T C T C C C C C C C T C C C
C A C C C C C A A T T T T G T A T T T A T T T A T T T T T A A T T A T T T T G
T G C A G C G A T G G G G G C G G G G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A
G G C G G G G C G G G G C G G G G C G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C
G G A G A G G T G C G G C G G C A G C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G
A A A G T T T C C T T T T A T G G C G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C
T A T A A A A A G C G A A G C G C G C G G C G G G C G G G A G T C G C T G C G T
T G C C T T C G C C C C G T G C C C C G C T C C G C G C C G C C T C G C G C C G
C C C G C C C C G G C T C T G A C T G A C C G C G T T A C T C C C A C A G G T G
A G C G G G C G G G A C G G C C C T T C T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C
G C T T G G T T T A A T G A C G G C T C G T T T C T T T T C T G T G G C T G C G
T G A A A G C C T T A A A G G G C T C C G G G A G G G C C C T T T G T G C G G G
G G G G A G C G G C T C G G G G G G T G C G T G C G T G T G T G T G T G C G T G
G G G A G C G C C G C G T G C G G C C C G C G C T G C C C G G C G G C T G T G A
G C G C T G C G G G C G C G G C G C G G G G C T T T G T G C G C T C C G C G T G
T G C G C G A G G G G A G C G C G G C C G G G G G C G G T G C C C C G C G G T G
C G G G G G G C T G C G A G G G G A A C A A A G G C T G C G T G C G G G G T G
T G T G C G T G G G G G G G T G A G C A G G G G G T G T G G G C G C G G C G G T
C G G G C T G T A A C C C C C C C C T G C A C C C C C C T C C C C G A G T T G C
T G A G C A C G G C C C G G C T T C G G G T G C G G G G C T C C G T G C G G G G
C G T G G C G C G G G G C T C G C C G T G C C G G G C G G G G G G T G G C G G C
A G G T G G G G G T G C C G G G C G G G G C G G G G C C G C C T C G G G C C G G
G G A G G G C T C G G G G G A G G G G C G C G G C G G C C C C C G G A G C G C C
G G C G G C T G T C G A G G C G C G G C G A G C C G C A G C C A T T G C C T T T
T A T G G T A A T C G T G C G A G A G G G C G C A G G G A C T T C C T T T G T C
C C A A A T C T G T G C G G A G C C G A A A T C T G G G A G G C G C C G C C G C
A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G G G C G A A G C G G T G C G G C G C C G
G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G A G G G C C T T C G T G C G T C G C C
G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C C T C T C C A G C C T C G G G G C T G T
C C G C G G G G G G A C G G C T G C C T T C G G G G G G G A C G G G G C A G G G
C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T G A C C G G C G G C T C T A G A G C
C T C T G C T A A C C A T G T T C A T G C C T T C T T C T T T T C C T A C A G
C T C C T G G G C A A C G T G C T G G T T A T T G T G A C C G G T G C C A C C A
T G T A C C G G A T G C A G C T G C T G A G C T G T A T C G C C C T G T C T C T
G G C C C T G G T C A C C A A T T C T A G C G A T A C C G G C A G A C C C T T C
G T G G A A A T G T A C A G C G A G A T C C C C G A G A T C A T C C A C A T G A
C C 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 C G T G A C T 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 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 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 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

10

20

30

40

50

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 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 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 C 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 A T A A G A G C T
C G C T G A T C A G C C T C G A C T G T G C C T T C T A G T T G C C A G C C A T
C T G T T G T T T G C C C C T C C C C G T G C C T T C C T T G A C C C T G G A
A G G T G C C A C T C C C A C T G T C C T T T C C T A A T A A A A T G A G G A A
A T T G C A T C G C A T T G T C T G A G T A G G T G T C A T T C T A T T C T G G
G G G G T G G G G T G G G G C A G G A C A G C A A G G G G G A G G A T T G G G A
A G A C A A T A G C A G G C A T G C T G G G G A T G C G G T G G G C T C T A T G
G A A G C T T G A A T T C A G C T G A C G T G C C T C G G A C C G C C T A G G A
G G A A C C C C T A G T G A T G G A G T T G G C C A C T C C C T C T C T G C G C
G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C
G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G
A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A

【 0 5 3 9 】

複数の A A V 構築物組成物

本開示は、タンパク質（例えば、抗 V E G F タンパク質）をコードするいくつかのコード配列が、コード配列を複数の部分（これらはそれぞれ異なる構築物に含まれる）に分割することによって送達され得ることを認識する。いくつかの実施形態では、本明細書では、少なくとも 2 つの異なる構築物（例えば、2、3、4、5、または 6）を含む組成物またはシステムが提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの異なる構築物のそれぞれは、コード領域（例えば、標的タンパク質、例えば、内耳標的タンパク質、例えば、抗 V E G F タンパク質をコードする）の異なる部分をコードするコード配列を含み、コードされた部分の各々は、少なくとも 10 アミノ酸（例えば、少なくとも約 10 アミノ酸、少なくとも約 20 アミノ酸、少なくとも約 30 アミノ酸、少なくとも約 60 アミノ酸、少なくとも約 70 アミノ酸、少なくとも約 80 アミノ酸、少なくとも約 90 アミノ酸、少なくとも約 100 アミノ酸、少なくとも約 110 アミノ酸、少なくとも約 120 アミノ酸、少なくとも約 130 アミノ酸、少なくとも約 140 アミノ酸、少なくとも約 150 アミノ酸、少なくとも約 160 アミノ酸、少なくとも約 170 アミノ酸、少なくとも約 180 アミノ酸、少なくとも約 190 アミノ酸、少なくとも約 200 アミノ酸、少なくとも約 210 アミノ酸、少なくとも約 220 アミノ酸、少なくとも約 230 アミノ酸、少なくとも約 240 アミノ酸、少なくとも約 250 アミノ酸、少なくとも約 260 アミノ酸、少なくとも約 270 アミノ酸、少なくとも約 280 アミノ酸、少なくとも約 290 アミノ酸、少なくとも約 300 アミノ酸、少なくとも約 310 アミノ酸、少なくとも約 320 アミノ酸、少なくとも約 330 アミノ酸、少なくとも約 340 アミノ酸、少なくとも約 350 ア

ミノ酸、少なくとも約360アミノ酸、少なくとも約370アミノ酸、少なくとも約380アミノ酸、少なくとも約390アミノ酸、少なくとも約400アミノ酸、少なくとも約410アミノ酸、少なくとも約420アミノ酸、少なくとも約430アミノ酸、少なくとも約440アミノ酸、少なくとも約450アミノ酸、少なくとも約460アミノ酸、少なくとも約470アミノ酸、少なくとも約480アミノ酸、少なくとも約490アミノ酸、少なくとも約500アミノ酸、少なくとも約510アミノ酸、少なくとも約520アミノ酸、少なくとも約530アミノ酸、少なくとも約540アミノ酸、少なくとも約550アミノ酸、少なくとも約560アミノ酸、少なくとも約570アミノ酸、少なくとも約580アミノ酸、少なくとも約590アミノ酸、少なくとも約600アミノ酸、少なくとも約610アミノ酸、少なくとも約620アミノ酸、少なくとも約630アミノ酸、少なくとも約640アミノ酸、少なくとも約650アミノ酸、少なくとも約660アミノ酸、少なくとも約670アミノ酸、少なくとも約680アミノ酸、少なくとも約690アミノ酸、少なくとも約700アミノ酸、少なくとも約710アミノ酸、少なくとも約720アミノ酸、少なくとも約730アミノ酸、少なくとも約740アミノ酸、少なくとも約750アミノ酸、少なくとも約760アミノ酸、少なくとも約770アミノ酸、少なくとも約780アミノ酸、少なくとも約790アミノ酸、少なくとも約800アミノ酸、少なくとも約810アミノ酸、または少なくとも約820アミノ酸)であり、該コードされた部分の各々のアミノ酸配列は、コードされた部分の異なる一方のアミノ酸配列と任意選択で部分的に重なり得；少なくとも2つの異なる構築物の単一の構築物は活性標的タンパク質をコードせず；対象細胞（例えば、動物細胞、例えば、霊長類細胞、例えば、ヒト細胞）に導入された場合に、少なくとも2つの異なるものは互いに相同組換えを起こし、ここで、組換えられた核酸が、活性標的タンパク質（例えば、抗VEGFタンパク質）をコードする。いくつかの実施形態では、核酸構築物の1つは、標的タンパク質（例えば、抗VEGFタンパク質）の一部をコードするコード配列を含むことができ、コードされた部分は、最大約820アミノ酸（例えば、最大約10アミノ酸、最大約20アミノ酸、最大約30アミノ酸、最大約60アミノ酸、最大約70アミノ酸、最大約80アミノ酸、最大約90アミノ酸、最大約100アミノ酸、最大約110アミノ酸、最大約120アミノ酸、最大約130アミノ酸、最大約140アミノ酸、最大約150アミノ酸、最大約160アミノ酸、最大約170アミノ酸、最大約180アミノ酸、最大約190アミノ酸、最大約200アミノ酸、最大約210アミノ酸、最大約220アミノ酸、最大約230アミノ酸、最大約240アミノ酸、最大約250アミノ酸、最大約260アミノ酸、最大約270アミノ酸、最大約280アミノ酸、最大約290アミノ酸、最大約300アミノ酸、最大約310アミノ酸、最大約320アミノ酸、最大約330アミノ酸、最大約340アミノ酸、最大約350アミノ酸、最大約360アミノ酸、最大約370アミノ酸、最大約380アミノ酸、最大約390アミノ酸、最大約400アミノ酸、最大約410アミノ酸、最大約420アミノ酸、最大約430アミノ酸、最大約440アミノ酸、最大約450アミノ酸、最大約460アミノ酸、最大約470アミノ酸、最大約480アミノ酸、最大約490アミノ酸、最大約500アミノ酸、最大約510アミノ酸、最大約520アミノ酸、最大約530アミノ酸、最大約540アミノ酸、最大約550アミノ酸、最大約560アミノ酸、最大約570アミノ酸、最大約580アミノ酸、最大約590アミノ酸、最大約600アミノ酸、最大約610アミノ酸、最大約620アミノ酸、最大約630アミノ酸、最大約640アミノ酸、最大約650アミノ酸、最大約660アミノ酸、最大約670アミノ酸、最大約680アミノ酸、最大約690アミノ酸、最大約700アミノ酸、最大約710アミノ酸、最大約720アミノ酸、最大約730アミノ酸、最大約740アミノ酸、最大約750アミノ酸、最大約760アミノ酸、最大約770アミノ酸、最大約780アミノ酸、最大約790アミノ酸、最大約800アミノ酸、最大約810アミノ酸、または最大約820アミノ酸)である。

【0540】

いくつかの実施形態では、構築物のそれぞれのコードされた部分のアミノ酸配列は、コードされた部分の異なる一方のアミノ酸配列と部分的にすら重複しない。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、構築物のコードされた部分のアミノ酸配列は、異なる構築物のコードされた部分のアミノ酸配列と部分的に重複する。いくつかの実施形態では、各構築物のコードされた部分のアミノ酸配列は、少なくとも1つの異なる構築物のコードされた部分のアミノ酸配列と部分的に重複する。いくつかの実施形態では、重複するアミノ酸配列は、約10アミノ酸残基～約820アミノ酸の間、またはこの範囲の任意の部分範囲である（例えば、約10アミノ酸、約20アミノ酸、約30アミノ酸、約60アミノ酸、約70アミノ酸、約80アミノ酸、約90アミノ酸、約100アミノ酸、約110アミノ酸、約120アミノ酸、約130アミノ酸、約140アミノ酸、約150アミノ酸、約160アミノ酸、約170アミノ酸、約180アミノ酸、約190アミノ酸、約200アミノ酸、約210アミノ酸、約220アミノ酸、約230アミノ酸、約240アミノ酸、約250アミノ酸、約260アミノ酸、約270アミノ酸、約280アミノ酸、約290アミノ酸、約300アミノ酸、約310アミノ酸、約320アミノ酸、約330アミノ酸、約340アミノ酸、約350アミノ酸、約360アミノ酸、約370アミノ酸、約380アミノ酸、約390アミノ酸、約400アミノ酸、約410アミノ酸、約420アミノ酸、約430アミノ酸、約440アミノ酸、約450アミノ酸、約460アミノ酸、約470アミノ酸、約480アミノ酸、約490アミノ酸、約500アミノ酸、約510アミノ酸、約520アミノ酸、約530アミノ酸、約540アミノ酸、約550アミノ酸、約560アミノ酸、約570アミノ酸、約580アミノ酸、約590アミノ酸、約600アミノ酸、約610アミノ酸、約620アミノ酸、約630アミノ酸、約640アミノ酸、約650アミノ酸、約660アミノ酸、約670アミノ酸、約680アミノ酸、約690アミノ酸、約700アミノ酸、約710アミノ酸、約720アミノ酸、約730アミノ酸、約740アミノ酸、約750アミノ酸、約760アミノ酸、約770アミノ酸、約780アミノ酸、約790アミノ酸、約800アミノ酸、約810アミノ酸、または約820アミノ酸長）。

10

20

【0541】

いくつかの例では、所望の遺伝子産物（例えば、治療用遺伝子産物）は、少なくとも2つの異なる構築物によってコードされる。いくつかの実施形態では、少なくとも2つの異なる構築物のそれぞれは、潜在的なコード領域の異なるセグメントを含み、該コード領域は、イントロン及び／または調節領域などの非コード配列を含んでも含まなくてもよい。いくつかの実施形態では、少なくとも2つの異なる構築物は、同じ細胞を形質導入する。いくつかの実施形態では、形質導入された細胞は、2つの異なる構築物を転写及び翻訳する。いくつかの実施形態では、翻訳されたポリペプチドは、次いで、三次及び／または四次構造レベルで組み合わせたり、機能的な抗VEGFタンパク質を作成し得る。例えば、いくつかの実施形態では、ラニビズマブ軽鎖及びラニビズマブ重鎖は、少なくとも2つの異なる構築物上にコードされ、翻訳後に組み合わせられて、本明細書に記載の様式及び当該技術分野で知られている様式でラニビズマブタンパク質を形成する。

30

【0542】

いくつかの実施形態では、抗VEGF遺伝子を含む本明細書に記載の組成物は、天然に存在する及び／または合成イントロン配列を含む。イントロンは、内因性ゲノムDNA配列（例えば、内耳細胞標的ゲノムDNA（例えば、VEGF及び／またはVEGF-RゲノムDNA配列））に存在するイントロンのヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、異なるイントロンセグメントは重複する。いくつかの実施形態では、異なるイントロンセグメントは、配列において最大約12,000ヌクレオチド長重複する（例えば、最大約100ヌクレオチド、最大約200ヌクレオチド、最大約300ヌクレオチド、最大約600ヌクレオチド、最大約700ヌクレオチド、最大約800ヌクレオチド、最大約900ヌクレオチド、最大約1,000ヌクレオチド、最大約1,100ヌクレオチド、最大約1,200ヌクレオチド、最大約1,300ヌクレオチド、最大約1,400ヌクレオチド、最大約1,500ヌクレオチド、最大約1,600ヌクレオチド、最大約1,700ヌクレオチド、最大約1,800ヌクレオチド、最大約1,900ヌクレオチド、最大約2,000ヌクレオチド、最大約2,100ヌクレオチド、最大約2,200ヌクレオチド、最大約2,300ヌクレオチド、最大約2,400ヌクレオチド、最

40

50

大 約 2, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 2, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 2, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 2, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 2, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 3, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 4, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 5, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 6, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 7, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 8, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 9, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 0, 9 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 0 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 1 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 2 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 3 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 4 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 5 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 6 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 7 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 8 0 0 ヌクレオチド、最大 約 1 1, 9 0 0 ヌクレオチド、または最大 約 1 2, 0 0 0 ヌクレオチド)。いくつかの実施形態では、異なる構築物のいずれか 2 つにおける重複ヌクレオチド配列は、標的遺伝子（例えば、抗 V E G F 遺伝子）の 1 つ以上のエクソンの一部または全てを含み得る。

【 0 5 4 3 】

いくつかの実施形態では、組成物またはシステムは、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの異なる構築物であるか、またはそれを含む。組成物中の異なる構築物の数が 2 である組成物では、2 つの異なる構築物の第 1 のものは、タンパク質（例えば、抗 V E G F タンパク質）の N 末端部分をコードするコード配列を含み得、これはリード部分、第 1 の構築物、または 5' 部分と呼ばれ得る（例えば、少なくとも 2 つの抗体鎖、例えば、重鎖可変領域及び／または軽鎖可変領域をコードする配列のうちの 1 つ）。いくつかの例では、標的遺伝子の N 末端部分は、少なくとも約 1 0 アミノ酸長である（例えば、少なくとも約 1 0 アミノ酸、少なくとも約 2 0 アミノ酸、少なくとも約 3 0 アミノ酸、少なくとも約 6 0 アミノ酸、少なくとも約 7 0 アミノ酸、少なくとも約 8 0 アミノ酸、少なくとも約 9 0 アミノ酸、少なくとも約 1 0 0 アミノ酸、少なくとも約 1 1 0 アミノ酸、少なくとも約 1 2 0 ア

10

20

30

40

50

ミノ酸、少なくとも約130アミノ酸、少なくとも約140アミノ酸、少なくとも約150アミノ酸、少なくとも約160アミノ酸、少なくとも約170アミノ酸、少なくとも約180アミノ酸、少なくとも約190アミノ酸、少なくとも約200アミノ酸、少なくとも約210アミノ酸、少なくとも約220アミノ酸、少なくとも約230アミノ酸、少なくとも約240アミノ酸、少なくとも約250アミノ酸、少なくとも約260アミノ酸、少なくとも約270アミノ酸、少なくとも約280アミノ酸、少なくとも約290アミノ酸、少なくとも約300アミノ酸、少なくとも約310アミノ酸、少なくとも約320アミノ酸、少なくとも約330アミノ酸、少なくとも約340アミノ酸、少なくとも約350アミノ酸、少なくとも約360アミノ酸、少なくとも約370アミノ酸、少なくとも約380アミノ酸、少なくとも約390アミノ酸、少なくとも約400アミノ酸、少なくとも約410アミノ酸、少なくとも約420アミノ酸、少なくとも約430アミノ酸、少なくとも約440アミノ酸、少なくとも約450アミノ酸、少なくとも約460アミノ酸、少なくとも約470アミノ酸、少なくとも約480アミノ酸、少なくとも約490アミノ酸、少なくとも約500アミノ酸、少なくとも約510アミノ酸、少なくとも約520アミノ酸、少なくとも約530アミノ酸、少なくとも約540アミノ酸、少なくとも約550アミノ酸、少なくとも約560アミノ酸、少なくとも約570アミノ酸、少なくとも約580アミノ酸、少なくとも約590アミノ酸、少なくとも約600アミノ酸、少なくとも約610アミノ酸、少なくとも約620アミノ酸、少なくとも約630アミノ酸、少なくとも約640アミノ酸、少なくとも約650アミノ酸、少なくとも約660アミノ酸、少なくとも約670アミノ酸、少なくとも約680アミノ酸、少なくとも約690アミノ酸、少なくとも約700アミノ酸、少なくとも約710アミノ酸、少なくとも約720アミノ酸、少なくとも約730アミノ酸、少なくとも約740アミノ酸、少なくとも約750アミノ酸、少なくとも約760アミノ酸、少なくとも約770アミノ酸、少なくとも約780アミノ酸、少なくとも約790アミノ酸、少なくとも約800アミノ酸、少なくとも約810アミノ酸、または少なくとも約820アミノ酸)。いくつかの例では、第1の構築物は、プロモーター（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で知られている任意のプロモーター）及びコザック配列（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で知られている任意の例示的なコザック配列）の一方または両方を含む。いくつかの例では、第1の構築物は、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであるプロモーターを含む。いくつかの例では、2つの異なる構築物のうちの第2のものは、タンパク質のC末端部分をコードするコード配列を含み、これは末端部分、第2の構築物、または3'部分と呼ばれ得る（例えば、少なくとも2つの抗体鎖、例えば、重鎖可変領域及び／または軽鎖可変領域をコードする配列のうちの1つ）。いくつかの例では、標的タンパク質のC末端部分は、少なくとも約10アミノ酸長である（例えば、少なくとも約10アミノ酸、少なくとも約20アミノ酸、少なくとも約30アミノ酸、少なくとも約60アミノ酸、少なくとも約70アミノ酸、少なくとも約80アミノ酸、少なくとも約90アミノ酸、少なくとも約100アミノ酸、少なくとも約110アミノ酸、少なくとも約120アミノ酸、少なくとも約130アミノ酸、少なくとも約140アミノ酸、少なくとも約150アミノ酸、少なくとも約160アミノ酸、少なくとも約170アミノ酸、少なくとも約180アミノ酸、少なくとも約190アミノ酸、少なくとも約200アミノ酸、少なくとも約210アミノ酸、少なくとも約220アミノ酸、少なくとも約230アミノ酸、少なくとも約240アミノ酸、少なくとも約250アミノ酸、少なくとも約260アミノ酸、少なくとも約270アミノ酸、少なくとも約280アミノ酸、少なくとも約290アミノ酸、少なくとも約300アミノ酸、少なくとも約310アミノ酸、少なくとも約320アミノ酸、少なくとも約330アミノ酸、少なくとも約340アミノ酸、少なくとも約350アミノ酸、少なくとも約360アミノ酸、少なくとも約370アミノ酸、少なくとも約380アミノ酸、少なくとも約390アミノ酸、少なくとも約400アミノ酸、少なくとも約410アミノ酸、少なくとも約420アミノ酸、少なくとも約430アミノ酸、少なくとも約440アミノ酸、少なくとも約450アミノ酸、少なくとも約460アミノ酸、少なくとも約470アミノ酸、少なくとも約480アミノ酸、少なく

10

20

30

40

50

とも約490アミノ酸、少なくとも約500アミノ酸、少なくとも約510アミノ酸、少なくとも約520アミノ酸、少なくとも約530アミノ酸、少なくとも約540アミノ酸、少なくとも約550アミノ酸、少なくとも約560アミノ酸、少なくとも約570アミノ酸、少なくとも約580アミノ酸、少なくとも約590アミノ酸、少なくとも約600アミノ酸、少なくとも約610アミノ酸、少なくとも約620アミノ酸、少なくとも約630アミノ酸、少なくとも約640アミノ酸、少なくとも約650アミノ酸、少なくとも約660アミノ酸、少なくとも約670アミノ酸、少なくとも約680アミノ酸、少なくとも約690アミノ酸、少なくとも約700アミノ酸、少なくとも約710アミノ酸、少なくとも約720アミノ酸、少なくとも約730アミノ酸、少なくとも約740アミノ酸、少なくとも約750アミノ酸、少なくとも約760アミノ酸、少なくとも約770アミノ酸、少なくとも約780アミノ酸、少なくとも約790アミノ酸、少なくとも約800アミノ酸、少なくとも約810アミノ酸、または少なくとも約820アミノ酸)。いくつかの例では、第2の構築物はポリ(A)配列をさらに含む。

10

【0544】

組成物内の異なる構築物の数が2であるいくつかの例では、2つの構築物のうちの1つによってコードされるN末端部分は、抗VEGFタンパク質(例えば、配列番号16、17、18、20、21、23、及び/または43)のアミノ酸位置1位~アミノ酸位置820位付近、またはこの範囲の任意の部分範囲を含む部分を含むことができる(例えば、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸10、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸20、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸30、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸60、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸70、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸80、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸90、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸100、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸110、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸120、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸130、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸140、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸150、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸160、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸170、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸180、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸190、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸200、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸210、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸220、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸230、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸240、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸250、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸260、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸270、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸280、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸290、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸300、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸310、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸320、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸330、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸340、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸350、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸360、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸370、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸380、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸390、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸400、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸410、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸420、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸430、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸440、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸450、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸460、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸470、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸480、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸490、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸500、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸510、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸520、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸530、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸540、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸550、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸560、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸570、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸580、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸590、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸600、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸610、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸620、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸630、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸640、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸650、アミノ酸1~少なくとも約アミノ酸660、アミノ酸1~少

20

30

40

50

なくとも約アミノ酸 670、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 680、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 690、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 700、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 710、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 720、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 730、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 740、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 750、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 760、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 770、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 780、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 790、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 800、アミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 810、またはアミノ酸 1～少なくとも約アミノ酸 820)。組成物内の異なる構築物の数が 2 であるいくつかの例では、前駆体抗 VEGF タンパク質の N 末端部分は、抗 VEGF タンパク質（例えば、配列番号 16、17、18、20、21、23、及び／または 43）のアミノ酸位置 1 位～アミノ酸位置 820 位付近、またはこの範囲の任意の部分範囲を含む部分を含むことができる（例えば、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 10、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 20、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 30、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 60、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 70、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 80、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 90、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 100、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 110、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 120、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 130、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 140、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 150、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 160、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 170、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 180、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 190、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 200、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 210、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 220、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 230、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 240、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 250、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 260、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 270、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 280、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 290、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 300、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 310、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 320、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 330、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 340、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 350、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 360、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 370、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 380、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 390、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 400、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 410、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 420、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 430、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 440、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 450、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 460、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 470、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 480、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 490、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 500、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 510、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 520、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 530、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 540、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 550、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 560、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 570、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 580、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 590、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 600、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 610、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 620、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 630、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 640、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 650、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 660、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 670、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 680、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 690、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 700、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 710、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 720、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 730、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 740、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 750、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 760、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 770、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 780、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 790、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 800、アミノ酸 1～最大約アミノ酸 810、またはアミノ酸 1～最大約アミノ酸 820)。

【0545】

組成物内の異なる構築物の数が 2 であるいくつかの例では、2 つの構築物のうちの 1 つによってコードされる C 末端部分は、抗 VEGF タンパク質（例えば、配列番号 16、17、18、20、21、23、及び／または 43）の最終アミノ酸（例えば、アミノ酸位

10

20

30

40

50

置 8 2 0 位付近) からアミノ酸位置 1 位付近、またはこの範囲の任意の部分範囲を含む部分を含むことができる (例えば、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 1 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 2 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 3 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 4 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 5 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 6 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 1 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 2 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 3 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 4 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 5 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 6 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 7 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 8 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 7 9 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 8 0 0、アミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 8 1 0、またはアミノ酸 8 2 0 ~ 少なくとも約アミノ酸 8 2 0)。組成物内の異なる構築物の数が 2 であるいくつかの例では、前駆体抗 V E G F タンパク質の C 末端部分は、抗 V E G F タンパク質 (例えば、配列番号 1 6、1 7、1 8、2 0、2 1、2 3、及び/または 4 3) の最終アミノ酸 (例えば、アミノ酸位置 8 2 0 位付近) から最大アミノ酸位置 1 位付近、またはこの範囲の任意の部分範囲を含む部分を含むことができる (例えば、アミノ酸 8 2 0 ~ 最大約アミノ酸 1 0、アミ

10

20

30

40

50

ノ酸 820 ～最大約アミノ酸 20、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 30、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 60、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 70、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 80、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 90、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 100、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 110、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 120、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 130、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 140、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 150、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 160、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 170、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 180、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 190、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 200、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 210、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 220、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 230、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 240、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 250、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 260、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 270、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 280、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 290、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 300、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 310、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 320、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 330、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 340、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 350、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 360、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 370、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 380、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 390、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 400、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 410、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 420、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 430、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 440、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 450、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 460、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 470、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 480、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 490、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 500、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 510、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 520、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 530、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 540、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 550、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 560、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 570、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 580、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 590、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 600、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 610、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 620、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 630、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 640、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 650、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 660、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 670、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 680、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 690、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 700、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 710、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 720、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 730、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 740、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 750、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 760、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 770、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 780、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 790、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 800、アミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 810、またはアミノ酸 820 ～最大約アミノ酸 820、またはこれらの間の任意の長さの配列)。

10

20

30

40

50

【0546】

いくつかの実施形態では、スプライス部位はトランススプライシングに関与する。いくつかの実施形態では、スプライスドナー部位 (Trapani et al. EMO Mol. Med. 6 (2) : 194-211, 2014、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) は、N 末端構築物において、コード配列に続く。C 末端構築物において、スプライスアクセプター部位は、抗 VEGF 遺伝子の第 2 の部分に対するコード配列の直前にサブクロニングされ得る。いくつかの実施形態では、コード配列内に、サイレント変異を導入し、制限消化のための追加の部位を生成することができる。

【0547】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される任意の構築物は、新生血管形成を特徴とする耳科疾患 (例えば、VS) に関連する症状の軽快のために動物に投与するのに適した組成物に含まれることができる。

【0548】

医薬組成物

特定の実施形態では、本開示の組成物は、rAAV-抗VEGF製剤緩衝液と組成が同等またはほぼ同等の、別個の希釈製剤（AAV希釈製剤）に関する。特定の実施形態では、希釈製剤は、製造され、滅菌ろ過され（0.2 μmフィルター）、単回使用バイアルに無菌充填される。

【0549】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、リン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも1 mM、少なくとも2 mM、少なくとも3 mM、少なくとも4 mM、少なくとも5 mM、少なくとも6 mM、少なくとも7 mM、または少なくとも8 mMのリン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大15 mM、最大14 mM、最大13 mM、最大12 mM、最大11 mM、または、最大10 mMのリン酸二ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、5～12 mM、6～10 mM、または7～9 mMのリン酸二ナトリウムを含む。

【0550】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、リン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも0.1 mM、少なくとも0.2 mM、少なくとも0.3 mM、少なくとも0.4 mM、少なくとも0.5 mM、少なくとも0.6 mM、少なくとも0.7 mM、少なくとも0.8 mM、少なくとも0.9 mM、少なくとも1.0 mM、少なくとも1.1 mM、少なくとも1.2 mM、少なくとも1.3 mM、少なくとも1.4 mM、または少なくとも1.5 mMのリン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大2.0 mM、最大1.9 mM、最大1.8 mM、最大1.7 mM、最大1.6 mM、または最大1.5 mMのリン酸一カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、0.5～2.0 mM、または1.0～2.0 mMのリン酸一カリウムを含む。

【0551】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも1.5 mM、少なくとも1.6 mM、少なくとも1.7 mM、少なくとも1.8 mM、少なくとも1.9 mM、少なくとも2.0 mM、少なくとも2.1 mM、少なくとも2.2 mM、少なくとも2.3 mM、少なくとも2.4 mM、少なくとも2.5 mM、少なくとも2.6 mM、または少なくとも2.7 mMの塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大3.5 mM、最大3.4 mM、最大3.3 mM、最大3.2 mM、最大3.1 mM、最大3.0 mM、最大2.9 mM、または最大2.8 mMの塩化カリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、2.0～3.5 mM、または2.5～3.0 mMの塩化カリウムを含む。

【0552】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも50 mM、少なくとも75 mM、少なくとも100 mM、少なくとも110 mM、少なくとも120 mM、少なくとも130 mM、少なくとも140 mM、少なくとも150 mM、少なくとも160 mM、または少なくとも170 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大250 mM、最大240 mM、最大230 mM、最大220 mM、最大210 mM、最大200 mM、最大190 mM、または最大180 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、150～250 mM、または150～200 mMの塩化ナトリウムを含む。

【0553】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、ポロキサマー188を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、少なくとも0.0005%

、少なくとも0.0006%、少なくとも0.0007%、少なくとも0.0008%、少なくとも0.0009%、または少なくとも0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、最大0.002%、最大0.0019%、最大0.0018%、最大0.0017%、最大0.0016%、最大0.0015%、最大0.0014%、最大0.0013%、最大0.0012%、最大0.0011%、または最大0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、0.0005～0.002%、または0.0005～0.0015%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

【0554】

特定の実施形態では、製剤緩衝液は、1.5mMのリン酸一カリウム、8.1mMのリン酸二ナトリウム、2.7mMの塩化カリウム、172mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含有する滅菌水を含む。特定の実施形態では、希釈製剤は、目的の哺乳動物（例えば、それを必要とするヒト）での使用のために記載された用量に必要な濃度を調製するために利用される。

【0555】

とりわけ、本開示は医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に関連する症状の軽快のために、動物に投与するのに適している。

【0556】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、例えば、ポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載の1つ以上の構築物を含み得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上のAAV粒子、例えば、本明細書に記載のように、1つ以上のAAV血清型カプシドによりカプシド封入された1つ以上のrAAV構築物を含み得る。

【0557】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1つ以上の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む。本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される担体」という用語は、医薬品投与に適合する溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤などを含む。また、補助的な活性化合物も、本明細書に記載される任意の組成物に組み込むことができる。このような組成物は、1つ以上の緩衝液（例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水など）；1つ以上の炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロース、及びデキストラン）；マンニトール；1つ以上のタンパク質、ポリペプチド、もしくはアミノ酸（例えば、グリシン）；1つ以上の酸化防止剤；1つ以上のキレート剤（例えば、EDTAもしくはグルタチオン）；及び／または1つ以上の防腐剤を含み得る。いくつかの実施形態では、製剤は、注射液、注射用ゲル、薬物放出カプセルなどの剤形である。

【0558】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、静脈内投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、蝸牛内投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、治療用組成物は、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、ミニサークルDNA及び／またはCELID DNAを含むように製剤化される。

【0559】

いくつかの実施形態では、治療用組成物は合成外リンパ液を含むように製剤化される。例えば、いくつかの実施形態では、合成外リンパ液は、20～200mMのNaCl；1～5mMのKCl；0.1～10mMのCaCl₂；1～10mMのグルコース；及び2～50mMのHEPESを含み、pHは約6～約9である。いくつかの実施形態では、治療用組成物は生理学的に許容される溶液に適切な希釈で製剤化される（例えば、Chen et al., J Controlled Rel. 110:1-19, 2005、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるに記載されているように、NaCl 120mM；KCl 3.5mM；CaCl₂ 1.5mM；グルコース 5.5mM；HEPES

10

20

30

40

50

S 20 mMを含む人工外リンパ液が、NaOHでタイトレーションされ、そのpHが7.5になるように調整される（総Na⁺濃度130 mM）。いくつかの実施形態では、治療用組成物は、生理学的に好適な溶液を含むように製剤化される。例えば、いくつかの実施形態では、生理学的に好適な溶液は、以下の最終濃度になるように調製されたポロキサマー188を含む市販の1×PBSを含む：8.10 mMのリン酸二ナトリウム、1.5 mMのリン酸一カリウム、2.7 mMの塩化カリウム、172 mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）。当業者により理解されるように、ポロキサマー188は、プルロニック酸F68としてもまた知られている。いくつかの実施形態では、別のプルロニック酸が利用される。いくつかの実施形態では、別のイオン濃度が利用される。

10

【0560】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、約5～15 mMのリン酸二ナトリウム、約20～200 mMの塩化ナトリウム；約1～5 mMの塩化カリウム、約1～5 mMのリン酸一カリウム、及び、約0.0005%～0.005%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、8.10 mMのリン酸二ナトリウム、1.5 mMのリン酸一カリウム、2.7 mMの塩化カリウム、172 mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む。

【0561】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の医薬組成物は、本明細書に記載の核酸または任意の構築物の哺乳動物細胞中への進入を促進する1つ以上の作用物質（例えば、リボソームまたはカチオン性脂質）をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の構築物は、天然ポリマー及び／または合成ポリマーを用いて製剤化することができる。本明細書に記載の任意の組成物に含まれ得るポリマーの非限定的な例としては、これらに限定されないが、DYNAMIC POLYCONJUGATE（登録商標）（Arrowhead Research Corp., Pasadena, Calif.）、Mirus Bio（Madison, Wis.）及びRoche Madison（Madison, Wis.）による製剤、PhaseRXポリマー製剤（例えば、限定されるものではないが、SMARTT POLYMER TECHNOLOGY（登録商標）（PhaseRX, Seattle, Wash.））、DMRI/D OPE、ポロキサマー、Vical（San Diego, Calif.）によるVAX FECTIN（登録商標）アジュバント、キトサン、Calando Pharmaceuticals（Pasadena, Calif.）によるシクロデキストリン、デンドリマー及びポリ（乳酸-グリコール酸共重合体）（PLGA）ポリマー、RONDEL（商標）（RNAi／オリゴヌクレオチドナノ粒子送達）ポリマー（Arrowhead Research Corporation, Pasadena, Calif.）、ならびにpH反応性ブロック共重合体（例えば、限定されるものではないが、PhaseRX（Seattle, Wash.）により生産されるもの）が挙げられ得る。これらのポリマーのうちの多くは、哺乳動物細胞へのin vivoでのオリゴヌクレオチドの送達において有効性を実証した（例えば、deFougerolles, Human Gene Ther. 19:125-132, 2008; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:12982-12887, 2007; Rozema et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:12982-12887, 2007; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 65:8984-8982, 2005; Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:5715-5721, 2007（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

20

30

40

【0562】

いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体（例えば、リン酸緩衝生

50

理食塩水、生理食塩水、または静菌水）を含む。製剤化すると、いくつかの実施形態では、溶液は、投与剤形に適合した様式で、かつ治療上有効であるような量で投与され得る。いくつかの実施形態では、製剤は、注射液、注射用ゲル、薬物放出カプセルなどの様々な剤形で投与される。

【0563】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化することができる。意図される投与経路の非限定的な例としては、局所投与（例えば、蝸牛内投与）がある。

【0564】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、1つの核酸構築物を含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、2つ以上の異なる構築物を含む。いくつかの実施形態では、単一の核酸構築物を含む組成物は、抗VEGFタンパク質及び／またはその機能的特徴部分をコードするコード配列を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、抗VEGFタンパク質及び／またはその機能的特徴部分をコードするコード配列を含む単一の核酸構築物を含み、哺乳動物細胞に導入されると、そのコード配列は哺乳動物細胞のゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも2つの異なる構築物を含み（例えば、構築物は、抗VEGFタンパク質の異なる部分をコードするコード配列を含み、該構築物は、哺乳動物細胞において、活性抗VEGFタンパク質（例えば、全長のラニズマブ、ベバシズマブ、またはアフリベルセプトタンパク質）をコードする配列を生成するために組み合わせることができる）、それにより、関連するVS、及び／または新生血管形成を特徴とし、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質治療に適した他の耳科関連疾患を治療する。

【0565】

また、本明細書に記載される任意の組成物を含むキットも提供される。いくつかの実施形態では、キットは、固体組成物（例えば、本明細書に記載される少なくとも2つの異なる構築物を含む凍結乾燥組成物）と、凍結乾燥組成物を可溶化させるための液体とを含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される任意の組成物を含む充填済みシリンジを含み得る。

【0566】

いくつかの実施形態では、キットは、（例えば、水性組成物、例えば、水性医薬組成物として製剤化された）本明細書に記載される任意の組成物を含むバイアルを含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される任意の方法を実施するための説明書を含み得る。

【0567】

遺伝子改変細胞

本開示はまた、本明細書に記載の任意の核酸、構築物、または組成物を含む細胞（例えば動物細胞、例えば哺乳動物細胞、例えば霊長類細胞、例えばヒト細胞）も提供する。いくつかの実施形態では、動物細胞はヒト細胞（例えば、ヒト支持細胞またはヒト有毛細胞）である。他の実施形態では、動物細胞は非ヒト哺乳動物である（例えば、サル細胞、ネコ科細胞、イヌ科細胞など）。当業者は、本明細書に記載の核酸及び構築物を任意の動物細胞（例えば、獣医学的介入に好適である任意の動物の支持細胞または有毛細胞）に導入できることを理解するであろう。構築物の非限定的な例、及び構築物を動物細胞に導入するための方法が本明細書に記載される。

【0568】

いくつかの実施形態では、動物細胞は、有毛細胞及び／または支持細胞を含む、内耳の任意の細胞であり得る。このような細胞の非限定的な例としては、以下が挙げられる：ヘンゼン細胞、ダイテルス細胞、内リンパ嚢及び管の細胞、球形嚢、卵形嚢、及び膨大部の移行細胞、内有毛細胞及び外有毛細胞、ラセン靱帯細胞、ラセン神経節細胞、ラセン隆起細胞、外側球形嚢細胞、辺縁細胞、中間細胞、基底細胞、内柱細胞、外柱細胞、クラウドウス細胞、内側境界細胞、内指節細胞、または血管条の細胞。

10

20

30

40

50

【0569】

いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛の特殊化した細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は有毛細胞である。いくつかの実施形態では、動物は、蝸牛内有毛細胞または蝸牛外有毛細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛内有毛細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛外有毛細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛柱状細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛ヘンゼン細胞である。いくつかの実施形態では、動物細胞は、蝸牛クラウジウス細胞である。

【0570】

いくつかの実施形態では、動物細胞は *in vitro* に存在する。いくつかの実施形態では、動物細胞は、動物、例えば霊長類及び／またはヒトに内因的に存在する細胞タイプのものである。いくつかの実施形態では、動物細胞は、動物から得られ、*ex vivo* で培養した自家細胞である。

10

【0571】

方法

とりわけ、本開示は、脈管化に関連する耳科疾患、例えば *VS* を有する対象を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の組成物を対象の内耳（例えば、蝸牛）に導入することを含む。例えば、本明細書では、いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）の内耳（例えば、蝸牛）に、有効量、例えば、治療有効量の、本明細書に記載の任意の組成物を投与することを含む方法が提供される。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、欠損のある内耳細胞標的遺伝子（例えば、その遺伝子によってコードされる支持細胞及び／または聴覚細胞標的タンパク質の発現及び／または活性の低下をもたらす変異、例えば、*NF2* における変異を有する支持細胞及び／または聴覚細胞標的遺伝子）を有するとこれまでに同定されている。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態は、導入または投与ステップの前に、対象が欠損のある内耳細胞標的遺伝子を有することを判定することをさらに含む。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態は、対象において内耳細胞標的遺伝子の変異を検出することをさらに含み得る。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態は、対象が非症候性または症候性感音難聴を有すると同定または診断することをさらに含むことができる。

20

30

【0572】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、*VS* を有する対象、例えば哺乳動物、例えばヒト、例えば患者の治療のために、本明細書に開示される組成物、例えば *rAAV* - 抗 *VEGF* を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、外科的送達を介して、例えば、蝸牛に送達される。

【0573】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、*rAAV* - 抗 *VEGF* を投与された対象には、片側（例えば、発散性）進行性 *VS*（互いに24ヶ月以内（最低でも6ヶ月の間隔を空ける）に生じる、連続した *MRI* スキャンにおいて、体積が20%以上増えたことが文書化されている単独腫瘍として定義される）が存在する。いくつかの実施形態では、最も近い *MRI* は、本明細書に開示される組成物、例えば、*rAAV* - 抗 *VEGF* の投与前6ヶ月以内に入手される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、*rAAV* - 抗 *VEGF* を投与された対象には、最初の *MRI* において最大寸法が2mmを超える腫瘍が存在し、該腫瘍は、適格性を判定するために使用され、単一のシーケンス中の少なくとも3つのスライスにて目視できる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、*rAAV* - 抗 *VEGF* を投与された対象には、例えば、最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア (*WRS*)、または、影響を受けた耳での、 $>90\text{ dB HL}$ の純音聴力検査閾値（平均は250～8000 Hz）として定義される重度の難聴が存在する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、*rAAV* - 抗 *VEGF* を投与された対象は、*rAAV*

40

50

ー抗VEGFの投与時点で、少なくとも18歳である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、出産可能である場合、投与期間中に、効果的な避妊法を用いることに同意する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、インフォームドコンセントプロセスを上手く完了することにより明示される、臨床要件全てを遵守する意志がある。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、治験終了後に、別個の長期間追跡(LTFU)研究プロトコルに参加する意志がある。

【0574】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、以下の特徴のうちの1つ以上、または全てを有する：(i)片側(例えば、散在性)進行性VS(互いに24ヶ月以内(最低でも6ヶ月の間隔を空ける))に生じる、連続したMRIスキャンにおいて、体積が20%以上増えたことが文書化されている単独腫瘍として定義される)の存在であって、最も近いMRIは、本明細書に開示される組成物の投与前6ヶ月以内に入手される；(ii)最初のMRIにおいて最大寸法が2mmを超える腫瘍が存在し、該腫瘍は、適格性を判定するために使用され、単一のシーケンス中の少なくとも3つのスライスにて目視できる；(iii)最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア(WRS)、または、影響を受けた耳での、>90dB HLLの純音聴力検査閾値(250~8000Hzにまたがる)として定義される、重度の難聴；(iv)rAAV-抗VEGFの投与時点で、少なくとも18歳である；(v)出産可能である場合、投与期間中に、効果的な避妊法を用いることに同意している；(vi)rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、インフォームドコンセントプロセスを上手く完了することにより明示される、臨床要件全てを遵守する意志がある；及び、(vii)rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、治験終了後に、別個の長期間追跡(LTFU)研究プロトコルに参加する意志がある。

【0575】

いくつかの実施形態では、対象は、進行性腫瘍、例えば、連続スキャンにおいて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の成長率を有する腫瘍、例えば、進行の証拠を有する腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、対象は、進行性腫瘍、例えば、継続的スキャンにおいて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%の成長率を有する腫瘍、例えば、進行の証拠を有する腫瘍を有する。

【0576】

いくつかの実施形態では、対象は、安定した腫瘍、例えば、連続スキャンにおいて5%未満、10%未満、20%未満、または30%未満の成長率を有する腫瘍、例えば、実質的な進行の証拠を欠いている腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、対象は、安定した腫瘍、例えば、継続的スキャンにおいて5%未満、10%未満、20%未満、または30%未満の成長率を有する腫瘍、例えば、実質的な進行の証拠を欠いている腫瘍を有する。

【0577】

いくつかの実施形態では、対象は、最大寸法が約1.5cm以上の腫瘍(例えば、小脳橋角部に浸潤し、脳幹を圧迫する可能性がある腫瘍)を有していない。いくつかの実施形態では、対象は、外科的切除及び放射線治療の現在の標準治療で回避され得る、生命を脅かす可能性のある腫瘍関連発症のリスクが高くない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、外科的切除または放射線を施すことをさらに含む。

【0578】

いくつかの実施形態では、対象は、最大寸法が約1.5cm以上の腫瘍(例えば、小脳橋角部に浸潤し、脳幹を圧迫する可能性がある腫瘍)を有する。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、対象は、本明細書に記載の方法及び組成物の投与を通じて回避され得る、生命を脅かす可能性のある腫瘍関連続発症のリスクが高い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、現在の標準治療法との併用療法として利用され、例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、外科的切除または放射線を施すことをさらに含む。

【0579】

いくつかの実施形態では、対象は、対側の耳に重度の聾がない。いくつかの実施形態では、対象は、対側の耳に聴力機能を有する。いくつかの実施形態では、対象は、語音聴取及び環境認識などの重要な聴覚領域へのアクセスを維持することができる。いくつかの実施形態では、NF2を有する対象は、本明細書に開示される組成物を投与されない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物の安全性及び耐性は、片側（例えば、散発性）進行性VSで評価することができる。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、小さい（最大寸法2cm未満）及び／または片側（例えば、散発性）腫瘍の進行性の成長を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの安全性及び耐性は、本明細書に開示される対象において評価することができる。

10

【0580】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、（IAC成分を除く）小脳橋角における最大寸法が、1.5cm以上である腫瘍を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象において、1年間の、追加の観察期間によって、対象が、さらなる腫瘍関連後遺症（難聴を除く）に、高リスクで曝されることとなる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、脳幹と接触せず、小脳橋角まで1.5cm以上伸びない腫瘍を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、以前にNF2診断を受けていない、または、両側VSを有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、VSに対する手術または放射線療法を以前に受けていない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、若年性白内障、膠腫、脳室上衣腫、神経線維腫、または2つ以上の髄膜腫の診断を現在受けていない、または、病歴を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、影響を受けた耳において内リンパ水腫と一致する病歴（文書化された変動感音性難聴、及び／または、偶発性目眩）を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、影響を受けていない耳において、前庭機能低下を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、現行の手術もしくは全身麻酔、またはコルチコステロイドの使用に禁忌を示す、医学的または心理的状态を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、外科的アプローチを除く、耳の解剖学的異常、例えば、道閉鎖を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、対比（例えば、腎不全、深刻な閉所恐怖症、または、非MRI適合性移植を有する参加者）による日常的な高解像MRIを入手するために、何ら禁忌を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、影響を受けた耳において、中耳滲出の証拠を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、活性中耳炎（AOM）、外耳炎、または、外科的アプローチを一時的に除く、他の同様の感染症、または、このような病歴を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、r

20

30

40

50

AAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳において、中耳または内耳手術を以前に受けていない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、12ヶ月以内に、妊娠していない、泌乳していない、または、妊娠しようとしていない（男性または女性）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、投与前（0日目）6ヶ月以内に、長期的にコルチコステロイドを使用していない（全身または経口）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、周術期での使用が計画されているVEGF阻害剤または他の投薬に対して、既知の感度またはアレルギーを有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、脳血管疾患の病歴、または現在の診断を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、治験薬の臨床治験に、投与前（0日目）6ヶ月以内に参加していない、または、遺伝子療法臨床治験に以前に一度も参加していない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、rAAV-抗VEGFを投与する治験の過程において対象の追跡調査の完了を可能にしない任意の他の状態を有しない、及び／または、治験責任医師の意見で、参加者候補が治験に不適格となる任意の他の状態を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、rAAV-抗VEGFを投与する場合、治験中の要件全て及び追跡を遵守する意志がある、または、能力がある。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア（WRS）、または、影響を受けていない耳での、>90 dB HLの純音聴力検査閾値（250～8000 Hzにまたがる）として定義される、重度の難聴を有しない。

10

20

30

40

50

【0581】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFを投与された対象は、以下の特徴のうちの1つ以上、または全てを有しない：（i）（IAC成分を除く）小脳橋角における最大寸法が、1.5 cm以上である腫瘍；または、1年間の、追加の観察期間によって、対象が、さらなる腫瘍関連後遺症（難聴を除く）に、高リスクで曝されること；または、脳幹と接触せず、小脳橋角まで1.5 cm以上伸びない腫瘍；（ii）NF2の以前の診断、及び／または、両側VSを有する以前の診断；（iii）VSに対する手術または放射線療法；（iv）若年性白内障、膠腫、脳室上衣腫、神経線維腫、または2つ以上の髄膜腫の診断または病歴；（v）影響を受けた耳において内リンパ水腫と一致する病歴（文書化された変動感音性難聴、及び／または、偶発性目眩）；（vi）影響を受けていない耳における、前庭機能低下の病歴；（vii）現行の手術もしくは全身麻酔、またはコルチコステロイドの使用に禁忌を示す、医学的または心理的状态；（viii）外科的アプローチを除く、耳の解剖学的異常、例えば、道閉鎖；（ix）対比（例えば、腎不全、深刻な閉所恐怖症、または、非MRI適合性移植を有する参加者）による日常的な高解像MRIを入手するための、何らかの禁忌；（x）影響を受けた耳における、中耳滲出の証拠；（xi）rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、活性中耳炎（AOM）、外耳炎、または、外科的アプローチを一時的に除く、他の同様の感染症、または、このような病歴；（xii）rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、以前の中耳または内耳手術；（xiii）12ヶ月以内の、妊娠、泌乳、または、妊娠計画（男性または女性）；（xiv）投与前（0日目）6ヶ月以内の、長期的にコルチコステロイドの使用（全身または経口）；（xv）周術期での使用が計画されているVEGF阻害剤または他の投薬に対する、既知の感度またはアレルギー；（xvi）脳血管疾患の病歴、または現在の診断；（xvii）治験薬の臨床治験への、投与前（0日目）6ヶ月以内での参加、または、以前の、遺伝子療法臨床治験への参加；（xviii）rAAV-抗VEGFを投与する治験の過程において対象の追跡調査の完了を可能にしない、及び／

または、治験責任医師の意見で、参加者候補が治験に不適格となる任意の他の状態；（ xix ） $rAAV$ -抗 $VEGF$ を投与する治験に参加している場合、対象が、治験中の要件全て及び追跡を遵守する意志ないこと、または、能力がないこと；ならびに、（ xx ）最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア（ WRS ）、または、影響を受けていない耳での、 $>90\text{ dB HL}$ の純音聴力検査閾値（ $250\sim8000\text{ Hz}$ にまたがる）として定義される、重度の難聴を有しないこと。

【0582】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ を投与された対象は、1つ以上の望ましくない副作用（例えば、有害事象）を経験し得る。いくつかの実施形態では、望ましくない副作用は、耳感染症、前庭症状、耳鳴り、他の耳科学有害事象、外科的合併症、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ が投与された耳における、残存聴力の恒久的な喪失、経口コルチコステロイドレジメンと関連する有害事象、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ のカプシド及び／または導入遺伝子への免疫応答、またはこれらの組み合わせを含む。

【0583】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば $rAAV$ -抗 $VEGF$ は、蝸牛内投与のための滅菌懸濁液として製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を、少なくとも 1×10^{11} 、少なくとも 5×10^{11} 、少なくとも 1×10^{12} 、少なくとも 1×10^{12} 、少なくとも 2×10^{12} 、少なくとも 3×10^{12} 、少なくとも 4×10^{12} 、少なくとも 5×10^{12} 、少なくとも 6×10^{12} 、少なくとも 7×10^{12} 、少なくとも 8×10^{12} 、少なくとも 9×10^{12} 、少なくとも 1×10^{13} 、少なくとも 2×10^{13} 、少なくとも 3×10^{13} 、少なくとも 4×10^{13} 、少なくとも 5×10^{13} 、少なくとも 6×10^{13} 、少なくとも 7×10^{13} 、少なくとも 8×10^{13} 、少なくとも 9×10^{13} 、または少なくとも 1×10^{14} ベクターゲノム（ vg ）／ミリリットル（ mL ）（ vg/mL ）の量で含む。いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を、最大 1×10^{15} 、最大 5×10^{14} 、最大 1×10^{14} 、最大 5×10^{13} 、最大 1×10^{13} （13）、最大 9×10^{12} 、最大 8×10^{12} 、最大 7×10^{12} 、最大 6×10^{12} 、最大 5×10^{12} 、最大 4×10^{12} （12）、最大 3×10^{12} 、最大 2×10^{12} 、または最大 1×10^{12} ベクターゲノム（ vg ）／ミリリットル（ mL ）の量で含む。いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を、約 $1\times 10^{12} vg/mL$ ～ $1\times 10^{13} vg/mL$ 、約 $5\times 10^{12} vg/mL$ ～ $5\times 10^{13} vg/mL$ 、または約 $1\times 10^{13} vg/mL$ ～ $2\times 10^{13} vg/mL$ の量で含む。

【0584】

いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を、約 $1\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.1\times 10^{12} vg/mL$ 、 $1.2\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.3\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.4\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.5\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.6\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.7\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.8\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $1.9\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.0\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.1\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.2\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.3\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.4\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.5\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.6\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.7\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.8\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $2.9\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.0\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.1\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.2\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.3\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.4\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.5\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.6\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.7\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.8\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $3.9\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.0\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.1\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.2\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.3\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.4\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.5\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.6\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.7\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.8\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $4.9\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $5.0\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $5.1\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $5.2\times 10^{12} vg/mL$ 、約 $5.3\times 10^{12} vg/mL$ 、

約 5.4×10^{12} vg/mL、約 5.5×10^{12} vg/mL、約 5.6×10^{12} vg/mL、約 5.7×10^{12} vg/mL、約 5.8×10^{12} vg/mL、約 5.9×10^{12} vg/mL、約 6.0×10^{12} vg/mL、約 7.0×10^{12} vg/mL、約 8.0×10^{12} vg/mL、約 9.0×10^{12} vg/mL、約 9.1×10^{12} vg/mL、約 9.2×10^{12} vg/mL、約 9.3×10^{12} vg/mL、約 9.4×10^{12} vg/mL、約 9.5×10^{12} vg/mL、約 9.6×10^{12} vg/mL、約 9.7×10^{12} vg/mL、約 9.8×10^{12} vg/mL、約 9.9×10^{12} vg/mL、約 1×10^{13} vg/mL、 1.1×10^{13} vg/mL、 1.2×10^{13} vg/mL、 1.3×10^{13} vg/mL、 1.4×10^{13} vg/mL、 1.5×10^{13} vg/mL、 1.6×10^{13} vg/mL、 1.7×10^{13} vg/mL、 1.8×10^{13} vg/mL、 1.9×10^{13} vg/mL、 2×10^{13} vg/mL、 5×10^{13} vg/mL、または 1×10^{14} vg/mL の量で含む。

10

【0585】

いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を 2.5×10^{12} vg/mL + / - 10 % の量で含む。

【0586】

いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を 5×10^{12} vg/mL + / - 10 % の量で含む。

【0587】

いくつかの実施形態では、組成物は、構築物を 1×10^{13} vg/mL + / - 10 % の量で含む。

20

【0588】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、耳科手術の経験を積んだ専門医師会認定の外科医によって制御された無菌条件下で手術室で投与される。いくつかの実施形態では、投与処置は、顕微鏡または内視鏡支援下経外耳道的試験的鼓室開放術及びレーザー支援下微細アブミ骨底開窓術 (microstapedotomy) の後に、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGF粒子を含む溶液、例えば、約 0.09 mL を送達する正円窓注入を行う。経外耳道的試験的鼓室開放術は、中耳の構造を露出させるために用いられる一般的な処置であり、経外耳道的試験的鼓室開放術は、例えば、耳硬化症の患者に対して、レーザー支援下アブミ骨摘出術 (アブミ骨底板の除去) またはアブミ骨底開窓術 (アブミ骨底板に穴を開ける) を伴うことが多い。いくつかの実施形態では、アブミ骨底板のおよそ 0.25 mm の通気孔 (耳科用レーザーを用いて作製される) は、迷路内圧の有害な上昇の可能性を防止するのに役立つ。

30

【0589】

本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態では、対象は、免疫調節剤、周術過程の例えば、コルチコステロイドを受ける。いくつかの実施形態では、コルチコステロイドはプレドニゾンであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、コルチコステロイドは経口投与される。

【0590】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤、例えば、コルチコステロイドは、投与レジメンに従い投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤 (例えば、コルチコステロイド) の投与レジメンは、1 回以上の用量を含む。

40

【0591】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤 (例えば、コルチコステロイド) の投与レジメンは、約 14 日間投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤 (例えば、コルチコステロイド) の投与レジメンは、本明細書に開示される組成物 (例えば、rAAV-抗VEGF) の投与の 3 日前に投与が開始され、本明細書に開示される組成物 (例えば、rAAV-抗VEGF) の投与日に、投与され、及び、本明細書に開示される組成物 (例えば、rAAV-抗VEGF) の投与後最大 10 日目まで投与される。

50

【0592】

免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンのいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、約 $1\text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ の固定用量で投与される（例えば、本明細書に開示される組成物（例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ ）の投与の3日前（例えば、-3日目~-1日目）から始まる4日間、かつ、本明細書に開示される組成物（例えば、 $rAAV$ -抗 $VEGF$ ）の投与日（例えば、0日目）を含む）。

【0593】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、体重に関係なく、約 $60\text{ mg} / \text{日}$ の最大用量で投与される。

【0594】

免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンのいくつかの実施形態では、免疫調節剤の用量は、免疫調節剤の投与の4日後に減る。いくつかの実施形態では、より低用量の免疫調節剤が、投与レジメンの5~14日目に投与される。

【0595】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンの5及び6日目（例えば、術後1及び2日目）において、免疫調節剤は、最初の4日間に投与された用量を約 10 mg 下回る用量で投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、5及び6日目に、約 $50\text{ mg} / \text{日}$ の用量で投与される。

【0596】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンの7及び8日目（例えば、術後3及び4日目）において、免疫調節剤は、5及び6日目に投与された用量を約 10 mg 下回る用量で投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、7及び8日目に、約 $40\text{ mg} / \text{日}$ の用量で投与される。

【0597】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンの9及び10日目（例えば、術後5及び6日目）において、免疫調節剤は、7及び8日目に投与された用量を約 10 mg 下回る用量で投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、9及び10日目に、約 $30\text{ mg} / \text{日}$ の用量で投与される。

【0598】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンの11及び12日目（例えば、術後7及び8日目）において、免疫調節剤は、9及び10日目に投与された用量を約 10 mg 下回る用量で投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、11及び12日目に、約 $20\text{ mg} / \text{日}$ の用量で投与される。

【0599】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）の投与レジメンの13及び14日目（例えば、術後9及び10日目）において、免疫調節剤は、11及び12日目に投与された用量を約 10 mg 下回る用量で投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤（例えば、コルチコステロイド）は、13及び14日目に、約 $10\text{ mg} / \text{日}$ の用量で投与される。

【0600】

いくつかの実施形態では、免疫調節レジメン（例えば、全身経口コルチコステロイド）は、手術投与手順に関連する炎症を軽減する。いくつかの実施形態では、免疫調節剤レジメンはまた、カプシド（例えば、 AAV $\Delta 80$ ）または根底にある構築物（例えば、導入遺伝子生成物、例えば、抗 $VEGF$ タンパク質）のいずれかに対する免疫反応の可能性をさらに軽減することができる。

【0601】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に開示される組成物を、アブミ骨底板に位置する通気部を伴って正円窓膜を通じて内耳の外リンパ液に投与する、無菌の使い捨て送達デバイスを開示する。いくつかの実施形態では、このカスタムデバイスは、蝸牛内投与経路用に特別に設計されているため、例えば、治療薬の安全性及び有効性の可能性の両方に関して、入手可能な物質よりも利点をもたらす。いくつかの実施形態では、送達デバイスの設計要素には、以下が含まれる：注入された流体の無菌性の維持；内耳に導入される気泡の最小化；制御された流速で少量を正確に送達する能力（標準ポンプの使用と合わせて）；正円窓膜を明視化し、外科医による外耳道を通じた送達を可能にすること；正円窓膜、もしくは正円窓膜から先の蝸牛構造への損傷の最小化；及び／または正円窓膜を通じた逆流の最小化。

10

【0602】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、対象、例えば哺乳動物、例えばヒト、例えば患者、例えば片側（例えば、進行性）散発性V Sを有する対象における安全性及び耐性を評価するための用量漸増試験を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、r A A V - 抗V E G Fは、本明細書に開示される投与レジメンで投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、本明細書に開示される組成物、例えば、r A A V - 抗V E G Fの、例えば、本明細書に記載の用量の片側または両側蝸牛内投与を含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、少なくとも0.01 mL、少なくとも0.02 mL、少なくとも0.03 mL、少なくとも0.04 mL、少なくとも0.05 mL、少なくとも0.06 mL、少なくとも0.07 mL、少なくとも0.08 mL、少なくとも0.09 mL、少なくとも0.10 mL、少なくとも0.11 mL、少なくとも0.12 mL、少なくとも0.13 mL、少なくとも0.14 mL、少なくとも0.15 mL、少なくとも0.16 mL、少なくとも0.17 mL、少なくとも0.18 mL、少なくとも0.19 mL、または少なくとも0.20 mL／蝸牛の容量で送達することを含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、最大0.30 mL、最大0.25 mL、最大0.20 mL、最大0.15 mL、最大0.14 mL、最大0.13 mL、最大0.12 mL、最大0.11 mL、最大0.10 mL、最大0.09 mL、最大0.08 mL、最大0.07 mL、最大0.06 mL、または最大0.05 mL／蝸牛の容量で送達することを含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、例えば、集団に応じて、約0.05 mL、約0.06 mL、約0.07 mL、約0.08 mL、約0.09 mL、約0.10 mL、約0.11 mL、約0.12 mL、約0.13 mL、約0.14 mL、または約0.15 mL／蝸牛の容量で送達することを含む。

20

30

【0603】

いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約0.01 mL～約0.30 mL、約0.01 mL～約0.25 mL、約0.01 mL～約0.20 mL、約0.01 mL～約0.15 mL、約0.01 mL～約0.14 mL、約0.01 mL～約0.13 mL、約0.01 mL～約0.12 mL、約0.01 mL～約0.11 mL、約0.01 mL～約0.10 mL、約0.01 mL～約0.09 mL、約0.01 mL～約0.08 mL、約0.01 mL～約0.07 mL、約0.01 mL～約0.06 mL、約0.01 mL～約0.05 mL、約0.01 mL～約0.04 mL、約0.01 mL～約0.03 mL、または約0.01 mL～約0.02 mLの容量で送達することを含む。

40

【0604】

いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約0.02 mL～約0.30 mL、0.03 mL～約0.30 mL、0.04 mL～約0.30 mL、0.05 mL～約0.30 mL、0.06 mL～約0.30 mL、0.07 mL～約0.30 mL、0.08 mL～約0.30 mL、0.09 mL～約0.30 mL、0.10 mL～約0.30 mL、0.11 mL～約0.30 mL、0.12 mL～約0.30 mL、0.13 mL～約0.30 mL、0.14 mL～約0.30 mL、0.15 mL～約0.30 mL、0.16 mL～約0.30 mL、0.17 mL～約0.30 mL、0.18 mL～約0.30 mL、0.19 mL～約0.30 mL、0.20 mL～約0.30 mL、または0.25 mL～約0.

50

30 mL の容量で送達することを含む。

【0605】

いくつかの実施形態では、投与レジメンは、約0.01mL～約0.03mL、約0.02mL～約0.25mL、約0.03mL～約0.20mL、約0.04mL～約0.18mL、約0.05mL～約0.16mL、約0.06mL～約0.14mL、約0.07mL～約0.12mL、または約0.08mL～約0.1mLの容量で送達することを含む。

【0606】

いくつかの実施形態では、（例えば、散発性）進行性VSを有する対象は、通常、片側で発症する。いくつかの実施形態では、片側性（例えば、散発性）進行性VSを有する対象に、本明細書に開示される組成物の片側投与が行われる。いくつかの実施形態では、NF2を有する対象は、通常、両側性VSを示す。いくつかの実施形態では、NF2を有する対象は、本明細書に開示される組成物の片側または両側投与のいずれかで投与される。

【0607】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、片側散発性進行性VSを有する対象（例えば、18～80歳）に片側蝸牛内注入を介して投与される本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFの漸増用量の安全性及び耐性を評価する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、腫瘍の成長を阻害する。

【0608】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの安全性及び耐性の評価を含む。いくつかの実施形態では、（例えば、散発性）進行性VSを治療するための本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFの有効性の評価は、無作為化された制御された設定（同時の非介入観察群を使用する）で実施される。

【0609】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV抗VEGFの最適用量の決定を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、より広いVS集団における、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの有効性の評価を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、例えば、両側性VS腫瘍（NF2の状況における）を含む、最適な投与レジメンの決定を含む。

【0610】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、該方法は、現在の標準治療、例えば、腫瘍の外科的切除及び／または放射線治療の実施をさらに含む。

【0611】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、血清中で検出される既存の中和抗体（NAb）は、蝸牛内投与経路によって送達されるrAAV粒子の形質導入に実質的に影響を及ぼさない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物を投与された対象は、例えば本明細書に記載される、既存の中和抗体（NAb）を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物を投与された対象は、例えば本明細書に記載される、既存の中和抗体（NAb）を有しない。

【0612】

いくつかの実施形態では、本明細書では、対象、例えば動物、例えば哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトの内耳で抗VEGFタンパク質（例えば、ラニビズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプトタンパク質）を発現することによって新生血管形成を特徴とする疾患（例えば、VS）を軽快、及び／または治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の任意の組成物の有効量、例えば、治療有効量を対象の内耳に投与することを含み、該投与は、抗VEGFタンパク質の発現により新生血管形成を特徴とする疾患を軽快及び／または治療する。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

抗 V E G F タンパク質を産生する内耳標的細胞は、感覚細胞、例えば有毛細胞、及び／または非感覚細胞、例えば支持細胞、及び／または内耳細胞の全てまたは任意のサブセットであり得る。

【0613】

本明細書ではまた、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）の内耳細胞の任意のサブセットにおける抗 V E G F タンパク質の発現レベルを増加させる方法であって、対象の内耳に、有効量、例えば、治療有効量の本明細書に記載の任意の組成物を投与することを含み、該投与が、対象の内耳の任意の細胞サブセットにおける抗 V E G F タンパク質（例えば、ラニビズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプト）の発現レベルの上昇をもたらす、方法も提供される。いくつかの実施形態では、内耳標的細胞は、感覚細胞、例えば有毛細胞、及び／または非感覚細胞、例えば支持細胞、及び／または内耳細胞の全てまたは任意のサブセットであり得る。

10

【0614】

本明細書ではまた、新生血管形成を特徴とする耳科関連疾患を有すると同定された対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒト）において、V S 関連症状（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面の感覚異常、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）を治療する方法であって、該対象の内耳に、有効量、例えば、治療有効量の本明細書に記載の任意の組成物を投与することを含む、方法も提供される。本明細書ではまた、対象の内耳に、有効量、例えば、治療有効量の本明細書に記載の任意の組成物を投与することを含む、方法も提供される。

20

【0615】

本明細書ではまた、V S の治療のための外科的方法も提供される。いくつかの実施形態では、該方法は、対象の蝸牛に切開部、例えば、第 1 の切開部を第 1 の切開点に導入するステップと、有効量、例えば、治療有効量の本明細書で提供される任意の組成物を蝸牛内に投与するステップとを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、切開点、例えば、第 1 の切開点で対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、第 1 の切開部内に、または第 1 の切開部を通じて対象に投与される。

【0616】

本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の組成物は、蝸牛の卵円窓膜内に、またはそれを通じて対象に投与される。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の組成物は、蝸牛の正円窓膜内に、またはそれを通じて対象に投与される。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、組成物は、正円窓膜に複数の切開部を作出することができる医療デバイスを用いて投与される。いくつかの実施形態では、医療デバイスは複数のマイクロニードルを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、略円形の第 1 の面を含む複数のマイクロニードルを含み、各マイクロニードルは少なくとも約 10 ミクロンの直径を有する。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、組成物を保持することができる基部及び／またはリザーバーを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、組成物を移送可能な内腔を個々に含む複数の中空マイクロニードルを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、少なくとも部分真空を生成するための手段を含む。

30

40

【0617】

いくつかの実施形態では、本開示の技術を使用して、難聴を有するか、または難聴のリスクがある対象を治療する。いくつかの実施形態では、本開示の技術を使用して、耳鳴りを有するか、または耳鳴りのリスクがある対象を治療する。いくつかの実施形態では、本開示の技術を使用して、回転性めまいを有するか、または回転性めまいのリスクがある対象を治療する。いくつかの実施形態では、本開示の技術を使用して、V S 腫瘍の成長を有するか、または V S 腫瘍の成長のリスクがある対象を治療する。いくつかの実施形態では、本開示の技術を使用して、V S に関連する無数の症状及び／または標準治療の V S 治療選択肢を有するか、またはそのリスクがある対象を治療する。例えば、いくつかの実施形

50

態では、対象は、NF2の少なくとも1つの病原性バリエーションに起因する症状を有する。当業者であれば、NF2の多くの異なる変異が、病原性バリエーションをもたらす得ることを理解するであろう。いくつかのそのような実施形態では、病原性バリエーションは、新生血管形成を特徴とする疾患の可能性を高めることによって、難聴、耳鳴り、回転性めまい、腫瘍の成長などを引き起こす、または引き起こすリスクがある。

【0618】

いくつかの実施形態では、VS関連症状（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面麻痺、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）を経験している対象を、該VS関連症状を引き起こしている可能性がある1以上の変異が存在するかどうか、及びその場所を決定するために評価する。いくつかのそのような実施形態では、特定の遺伝子産物または機能の状態が（例えば、タンパク質または配列決定分析を介して）評価される。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、対象または動物は哺乳動物であり、いくつかの実施形態では、哺乳動物は、家畜、農場動物、動物園動物、非ヒト霊長類、またはヒトである。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、動物、対象、または哺乳動物は、成体、ティーンエイジャー、若齢個体、幼齢個体、幼児期個体、乳児期個体、または新生児期個体である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、動物、対象、または哺乳動物は、1～5、1～10、1～20、1～30、1～40、1～50、1～60、1～70、1～80、1～90、1～100、1～110、2～5、2～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～110、10～30、10～40、10～50、10～60、10～70、10～80、10～90、10～100、10～110、20～40、20～50、20～60、20～70、20～80、20～90、20～100、20～110、30～50、30～60、30～70、30～80、30～90、30～100、40～60、40～70、40～80、40～90、40～100、50～70、50～80、50～90、50～100、60～80、60～90、60～100、70～90、70～100、70～110、80～100、80～110、または90～110歳である。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、対象または哺乳動物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11ヶ月齢である。

【0619】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の方法及び／または組成物は、VS関連症状（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面の感覚異常、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）の改善（複数可）をもたらす得る。いくつかの実施形態では、そのような症状は、少なくとも10日間、少なくとも15日間、少なくとも20日間、少なくとも25日間、少なくとも30日間、少なくとも35日間、少なくとも40日間、少なくとも45日間、少なくとも50日間、少なくとも55日間、少なくとも60日間、少なくとも65日間、少なくとも70日間、少なくとも75日間、少なくとも80日、少なくとも85日間、少なくとも100日間、少なくとも105日間、少なくとも110日間、少なくとも115日間、少なくとも120日間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも7ヶ月間、少なくとも8ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも10ヶ月間、少なくとも11ヶ月間、または少なくとも12ヶ月間、それを必要とする対象において、測定され、決定される（例えば、本明細書に記載のまたは当該技術分野で知られている、そのような症状の改善を判定するための任意の測定基準を用いて）。

【0620】

いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）は、VS関連症状（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面の感覚異常、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）を有するか、または発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）は、NF2遺伝子に変異を有するとこれまでに同定されている。

いくつかの実施形態では、対象（例えば動物、例えば哺乳動物、例えばヒト）は、新生血管形成を特徴とする疾患、例えばVSに関連することが当該技術分野で知られているNF2遺伝子の任意の変異を有する。いくつかのそのような実施形態では、対象（例えば、動物、例えば哺乳動物、例えばヒト）は、これまでに同定されていなかったVSに関連する遺伝子の変異の保因者であると同定されている（例えば、遺伝子検査によって）。いくつかのそのような実施形態では、同定された変異は新規である可能性があり（例えば、過去に文献に記載されていない）、VSに罹患している、またはVSに罹患しやすい対象の治療方法は、特定の患者の変異（複数可）に合わせて個別化される。

【0621】

いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）は、NF2遺伝子の変異の保因者であると同定されている（例えば、遺伝子検査によって）。いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）は、NF2遺伝子に変異を有すると同定されており、VS関連症状（複数可）（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面の感覚異常、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）と診断されている。いくつかの実施形態では、対象（例えば、動物、例えば哺乳動物、例えばヒト）は、新生血管形成を特徴とする疾患に関連する症状を有すると同定されている。

【0622】

いくつかの実施形態では、VS及びVS関連症状（複数可）（例えば、難聴、耳鳴り、回転性めまい、めまい、耳閉塞感、顔のしびれ、顔面の感覚異常、頭痛、ぎこちない歩行、及び／または精神錯乱など）の治療の成功は、これらに限定されないが、聴力検査、耳鳴り検査、歩行検査、認知機能検査、画像診断技術、及び／または診断バイオマーカーの採取を含む、当該技術分野で知られている従来の方法のいずれかを使用して、対象において判定することができる。例えば、機能的聴力検査の非限定的な例は、様々な種類の聴力測定アッセイ（例えば、純音検査、語音検査、中耳の検査、聴性脳幹反応、及び耳音響放射）である。

【0623】

本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の組成物の2回以上の用量が、対象の蝸牛内に導入または投与される。これらの方法のいずれかのいくつかの実施形態は、組成物の第1の用量を対象の蝸牛内に導入または投与することと、第1の用量の導入または投与後に対象の聴力機能を評価することと、組成物の追加の用量を、正常範囲内の聴力機能を有していないことが判明した（例えば、当該技術分野で知られている任意の聴力検査を用いて判定して）対象の蝸牛内に投与することと、を含み得る。

【0624】

本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、組成物は、蝸牛内投与用に製剤化することができる。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物は、蝸牛内投与または局所投与を介して投与することができる。本明細書に記載の任意の方法のいくつかの実施形態では、組成物は、医療デバイス（例えば、本明細書に記載される任意の例示的な医療デバイス）の使用によって投与される。

【0625】

いくつかの実施形態では、蝸牛内投与は、本明細書に記載されるまたは当該技術分野で知られている任意の方法を用いて実施することができる。例えば、いくつかの実施形態では、組成物は、以下の外科的技法を用いて、蝸牛内に投与または導入することができる。まず、0度、2.5mm硬性内視鏡での明視化を用いて、外耳道を洗浄し、ラウンドナイフを用いておよそ5mmの鼓膜外耳道皮弁に沿って細い切開線を入れる。次いで、鼓膜外耳道皮弁を挙上し、中耳後方に進入する。鼓索神経を特定して分割し、キュレットを使用して上鼓室側壁骨（scutal bone）を取り除き、正円窓膜を露出させる。投与または導入された組成物の頂部への分散を強化するために、手術用レーザーを用いて、卵円窓に小さな2mmの開窓部を作出して、組成物の経正円窓膜注入中の外リンパ移動を可

10

20

30

40

50

能とすることができる。次いで、微量注入デバイスをプライミングし、術野に入れる。デバイスを正円窓へと動かし、先端部を正円窓の骨突出部内に設置して、マイクロニードル（複数可）による膜の穿通を可能にする。フットペダルを連動させて、組成物を測定された一定量で注入できるようにする。次いで、デバイスを取り出し、正円窓及びアブリム骨底板をゲルフォームパッチで封止する。

【0626】

本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、V S 及び／または V S 関連症状を有するか、または発症するリスクがある。本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、V S 発生に関与する遺伝子に変異を有することがこれまでに同定されており、そのような遺伝子は、支持細胞及び／または有毛細胞で発現され得る。

10

【0627】

いくつかの実施形態では、対象細胞は *in vitro* に存在する。いくつかの実施形態では、対象細胞は、初めに対象から得られ、*ex vivo* で培養される。いくつかの実施形態では、対象細胞は、それ以外は健康であると考えられ、*ex vivo* で培養及び増殖される。いくつかの実施形態では、対象細胞は、内耳細胞標的遺伝子に欠損があるとこれまでに判定されている。いくつかの実施形態では、対象細胞は、有毛細胞標的遺伝子に欠損があるとこれまでに判定されている。いくつかの実施形態では、対象細胞は、支持細胞標的遺伝子に欠損があるとこれまでに判定されている。

【0628】

20

デバイス、投与、及び手術方法

本明細書では、難聴（例えば、非症候性感音性難聴または症候性感音性難聴）を治療するための治療用送達システムが提供される。いくつかの実施形態では、治療用送達システムは、i) それを必要とする対象の内耳の正円窓膜に1つまたは複数の切開部を作出することができる医療デバイスと、ii) 有効用量の組成物（例えば、本明細書に記載される任意の組成物）と、を含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは複数のマイクロニードルを含む。

【0629】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、本明細書に開示される組成物、例えば rAAV-抗VEGF の投与を含む治療を受ける。いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に開示される組成物の投与を含む、少なくとも1つの追加の治療を受けることができる。いくつかの実施形態では、対象は、各被験物質組成物（例えば、rAAV 粒子を含む溶液）の投与の間に少なくとも30日間モニターされる。

30

【0630】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、追加の積極的介入を伴わないMRIによる継続的観察、定位放射線治療（SR S）、分割放射線治療（FR T）、及び／またはマイクロサージャリー（MS）などの特定の現在の治療選択肢との併用療法として利用される。

【0631】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、MRIを使用した継続的観察を伴う併用療法として利用される。特定の実施形態では、MRI測定は、腫瘍の成長、腫瘍の停滞、または腫瘍の退縮を特定し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法を追加介入を伴わない継続的観察と組み合わせると、継続的MRIベースの観察のみを利用する方法と比較して、聴力温存率が向上する。

40

【0632】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、当該技術分野で知られている放射線治療（例えば、ガンマナイフ手術）との併用療法として利用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法による治療の前または後に、単回有効量の放射線が腫瘍に送達される（例えば、5～10 Gy の放射線、7～12 Gy の放射線、9～14 Gy の放射線、11～16 Gy の放射線、13～18 Gy の放射線、または

50

12～17 Gyの放射線)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物を利用する併用療法は、必要な放射線量プロファイルを低減し、放射線プロファイルが腫瘍に隣接する構造と重なる可能性を低減する。いくつかの実施形態では、この併用療法アプローチは、脳神経または脳幹構造の放射線手術誘発性機能障害の可能性を低減する。いくつかの実施形態では、併用療法アプローチは、蝸牛または関連する脳幹核への放射線量の増加に関連する術後難聴を低減する。いくつかの実施形態では、併用療法アプローチは、術後水頭症の可能性を低減する。いくつかの実施形態では、併用療法アプローチは、術後二次性悪性腫瘍の可能性を低減する。いくつかの実施形態では、併用療法アプローチは、腫瘍の成長を遅延させ、腫瘍の成長を阻止し、及び／または腫瘍サイズを縮小させる。いくつかの実施形態では、併用療法アプローチは、放射線手術の有効性を高め、例えば、腫瘍の成長を停止する可能性を高め、追加の治療の必要性を低減し、聴力温存の可能性を高め、永続的な顔面神経障害の可能性を低減し、三叉神経障害の可能性を低減し、及び／または水頭症の可能性を低減する。

10

20

30

40

50

【0633】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、当該技術分野で知られている分割放射線治療との併用療法として利用される。いくつかの実施形態では、有効量の放射線を、数週間にわたって（例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、または12週間以上）、複数回の微量投与（例えば、約5回の微量投与、約10回の微量投与、約15回の微量投与、約20回の微量投与、約25回の微量投与、または約30回の微量投与）を通じて腫瘍に照射することで、合わせると腫瘍に1回の大量の放射線（例えば、約30 Gy、約40 Gy、約50 Gy、約60 Gy、または約70 Gyの放射線）が照射されることとなり、これは、本明細書に記載の組成物及び方法による治療の前、間、または後に実施される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用療法アプローチは、新生血管形成の阻害を伴う腫瘍の継続的な損傷をもたらす一方で、周囲の組織が投与の間に治癒することを可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の併用療法アプローチは、分割放射線療法の有効性を高め、例えば、平均腫瘍停止率を高め、5年のアクチュアリーレートを高め、追加の治療が必要となる可能性を低減し、聴力温存を向上し、顔面神経障害を発症する可能性を低減し、三叉神経障害を発症する可能性を低減し、及び／または水頭症の可能性を低減する。

【0634】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び組成物は、当該技術分野で知られている外科的介入との併用療法として利用される。いくつかの実施形態では、そのような併用療法アプローチは、脳神経の損傷、脳脊髄液（CSF）の漏出、及び／または術後感染症などのさらなる外科的合併症の可能性を低減しながら、外科的介入の有効性を高める。いくつかの実施形態では、そのような組み合わせアプローチは、追加の治療が必要となる可能性を低減し、聴力温存の可能性を高め、永続的な顔面神経障害の可能性を低減し、CSF患者に関連する急性の病的状態の可能性を低減し、及び／または死亡の可能性を低減する。

【0635】

本明細書ではまた、難聴（例えば、非症候性感音性難聴または症候性感音性難聴）を治療するための外科的方法も提供される。いくつかの実施形態では、方法は、対象の蝸牛に第1の切開部を第1の切開点に導入するステップと、治療有効量の本明細書で提供される任意の組成物を蝸牛内に投与するステップとを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、第1の切開点で対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、第1の切開部内に、または第1の切開部を通じて対象に投与される。

【0636】

いくつかの実施形態では、VEGF阻害剤の全身投与を、NF2患者でのVSの治療について評価しており、これらの試験の結果は、VSを治療するためのVEGF阻害剤の使用に関する予備的な臨床的証拠を提供する。いくつかの実施形態では、NF2患者は、一

般に両耳の聴力の低下をもたらす両側神経鞘腫を呈するため、本明細書に開示される組成物の投与に大きなリスクを伴う。いくつかの実施形態では、NF2を有する対象は、本明細書に開示される組成物を投与されない。いくつかの実施形態では、NF2を有する対象は、例えば、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFの安全性及び有効性に基づいて、本明細書に開示される組成物を投与される（片側または両側の蝸牛内投与を介して送達される）。

【0637】

いくつかの実施形態では、散発性VS腫瘍はVEGFを発現し（Saito 2003；Cayee-Thomasen 2003、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、VEGF発現のレベルは、例えば、腫瘍の成長率と相関する（Cayee-Thomasen 2003；Cayee-Thomasen 2005、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、進行性の散発性VS（例えば、連続するスキャンにわたって少なくとも20%の成長率を有する単一の腫瘍として定義される）を有するが、その腫瘍は、1年間の追加の観察期間が経過しても、さらなる腫瘍関連発症（難聴を除く）のリスクが高くない程度に依然として小さい。いくつかの実施形態では、対象は、侵襲的外科的切除及び／または放射線治療を受けている、または受けることになる成人である。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、該方法は、安全な用量、例えば開始用量（期待されるNOAELの8倍未満）を評価することを含む。いくつかの実施形態では、開始用量は、腫瘍位置に近接した組織及び流体においてVEGF阻害剤曝露レベルをもたらす。

【0638】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物（例えば、rAAV-抗VEGF）は、外リンパへの送達を通じて内耳の多くの標的細胞に到達し得る。外リンパは、脳脊髄液（CSF）と組成が非常に類似しており、それと拡散的に連続している流体である（Lysaght 2011、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。外リンパは、内耳の骨迷路に収容された蝸牛及び前庭系の感覚細胞、神経細胞、及び支持細胞のほとんどを浸している。いくつかの実施形態では、本明細書に開示された組成物（例えばrAAV-抗VEGFを含む）が送達される蝸牛の外リンパ腔は、鼓室階と前庭階という2つの階または通路を含み、これらはヘリコトレマを介して蝸牛ラセンの頂点で互いに連続している。内耳の多くの細胞は、組織内の間質腔を通じて外リンパと流体連通している。

【0639】

本明細書に記載の送達デバイスによるrAAV-抗VEGF組成物の蝸牛内投与は、典型的には正円窓膜を通じて行われる（図1を参照）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、蝸牛内投与用の無菌の使い捨て送達デバイスを使用して、個体（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）に送達される。特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、アブミ骨底板に位置する通気部を伴って正円窓膜を通じて内耳の外リンパ液に送達される。特定の実施形態では、蝸牛内投与アプローチは、rAAV粒子が鼓室階を通過して、次にヘリコトレマでの接続を介して前庭階を通過して、流体経路を辿ってアブミ骨底板の通気部まで灌流するように、卵円窓内のアブミ骨底板の通気部を伴って正円窓膜を通じて鼓室階内に本明細書に記載の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、注入ポートとは異なる通気部の存在により、蝸牛の全長にわたって薬剤をより均一に及び／または制御して分散させることができ、及び／または内耳内での追加の流体圧の有害な上昇が防止される。いくつかの実施形態では、この送達アプローチはまた、注入物の前庭系への拡散を可能にする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるようなプロセスは、外耳道を通じた比較的非外傷性のアプローチで患者において達成することができる。

【0640】

本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される任意の組成物は、蝸牛の卵円窓膜内に、またはそれを通じて対象に投与される。本明細書で

提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される任意の組成物は、蝸牛の正円窓膜内に、またはそれを通じて対象に投与される。本明細書で提供される任意の方法のいくつかの実施形態では、組成物は、正円窓膜に複数の切開部を作出することができる医療デバイスを用いて投与される。いくつかの実施形態では、医療デバイスは複数のマイクロニードルを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、略円形の第1の面を含む複数のマイクロニードルを含み、各マイクロニードルは少なくとも約10ミクロンの直径を有する。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、組成物を保持することができる基部及び／またはリザーバーを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、組成物を移送可能な内腔を個々に含む複数の中空マイクロニードルを含む。いくつかの実施形態では、医療デバイスは、少なくとも部分真空を生成するための手段を含む。

10

【0641】

いくつかの実施形態では、本明細書では、本明細書に開示される組成物を、アブミ骨底板に位置する通気部を伴って正円窓膜を通じて内耳の外リンパ液に投与する、無菌の使い捨て送達デバイスを開示する。いくつかの実施形態では、このカスタムデバイスは、蝸牛内投与経路用に特別に設計されているため、治療薬の安全性及び有効性の可能性の両方に関して、入手可能な物質及び汎用手術器具よりも利点をもたらす。送達デバイスの設計要素には、以下が含まれる：注入された流体の無菌性の維持；内耳に導入される気泡の最小化；制御された流速で少量を正確に送達する能力（標準ポンプの使用と合わせて）；正円窓膜を明視化し、外科医による外耳道を通じた送達を可能にすること；正円窓膜、もしくは正円窓膜から先の蝸牛構造への損傷の最小化；及び正円窓膜を通じた逆流の最小化。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば rAAV-抗VEGF を約 0.09 mL、蝸牛の外リンパに送達した後、カスタムの専用デバイスを耳から取り除く。

20

【0642】

内耳への送達は、感覚細胞及び非感覚支持細胞／構造が弱く、アクセスが不可能であるために困難であり、意図しない損傷を伴わない外科的アプローチの種類が制限される。いくつかの実施形態では、流体で満たされた蝸牛腔の適切な通気により、流体量の増加による内耳の損傷が防止される。

【0643】

哺乳動物の内耳の構造及び機能は、霊長類と他の哺乳動物間での妊娠及び出生を比較して蝸牛の発達タイミングに違いがあるにもかかわらず、哺乳動物全体で高度に保存されている（Manley 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。マウスの蝸牛の発達は出生時にまだ進行中であり、生後12日目頃に聴力が始まる（P12；Blankina 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。対照的に、ヒトでは、子宮内で完全な蝸牛の発達を経て、妊娠25週から28週までに聴力の開始を経験する（Litovskiy 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。潜在的な治療法の開発及び耳でのその送達において考慮しなければならない成熟した内耳の2つの重要な構造的側面は以下の通りである：1）種間での内耳サイズの違い；ならびに2）蝸牛の外リンパと脳脊髄液（CSF）との間を走る蝸牛水管の開存性。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、蝸牛容積は、例えば、動物からヒトへの用量の外挿に使用される。

30

40

【0644】

いくつかの実施形態では、対象が齧歯類、例えばマウスである場合、注入時の動物の年齢に依存せず、ロバストで信頼性の高い形質導入を実証した、後半規管の開窓を伴った正円窓膜を通じた送達を含む、Yoshimura et al., 2018に記載の外科的アプローチが用いられる（Yoshimura 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。側頭骨にアクセスするために耳介後部が切開される。胸鎖乳突筋の一部を切離して、耳胞（otic bulla）を露出させる。直径0.5～0.6 mmの耳科用ドリルを使用して、該耳胞に小さな穴を開け、次に、その穴を広げて、アブミ骨動脈と正円窓膜を明視下に置いた。耳科用ドリル（直径0.5～0.6 mm）で後半規

50

管の開窓を行い、蝸牛投与中の内耳の通気部として機能させた。ホウケイ酸キャピラリーピペットと10 μ Lハミルトンシリンジからなるマウス送達デバイスで正円窓膜を貫通させ、ウイルス粒子を含む溶液1 μ L（総内耳容積のおよそ40～50%）を正円窓膜を通じて鼓室階に300 nL／分の速度で送達する。

【0645】

いくつかの実施形態では、対象がNHPである場合、耳介後部を切開し、軟部組織を骨膜のレベルまで切開した。いくつかの実施形態では、骨膜を切開し、持ち上げて乳様突起骨を露出させる。経皮質乳様突起開窓術は、高速切削とダイヤモンドドリルバーを組み合わせて行われる。その後、顔面神経窩が開放され、適切に正円窓と卵円窓（OW）を明視下に置けるようにした。OWのアブミ骨底板の開窓は、ローゼン針を使用して行われる。他のモデルと同様に、開窓により内耳に損傷を与えることなく、より大量の注入が可能となり、さらに、通気により、rAAV粒子を含む溶液が蝸牛の頂点に向かって流れることが可能になる。rAAV粒子を含む30 μ Lの溶液（総内耳容積のおよそ40～50%）が、正円窓膜を通じて30 μ L／分の速度で送達される。

【0646】

いくつかの実施形態では、対象が哺乳動物、例えばヒトである場合、例えば出生時であっても関連する構造が比較的大きいため、外耳道を通じた侵襲性の低いアプローチが使用される。いくつかの実施形態では、臨床投与処置は、経外耳道的試験的鼓室開放術及びレーザー支援下微細アブミ骨底開窓術（リン酸チタニルカリウム[KTP]またはCO₂耳科用レーザーを使用してアブミ骨底板に小さな通気孔[およそ0.25 mm]を開ける）の後に、正円窓注入を行い、3分以内に正円窓膜を通じて、本明細書に開示する組成物、例えば、rAAV-抗VEGF粒子を含む約0.09 mL（または90 μ L、総内耳容積のおよそ40～50%）の溶液を送達する。いくつかの実施形態では、通気は、迷路内圧の潜在的な有害な上昇を防止するのに役立つ。経外耳道的試験的鼓室開放術は、中耳の構造を露出させるために用いられる一般的な処置であり、経外耳道的試験的鼓室開放術は、例えば、耳硬化症の患者に対して、レーザー支援下アブミ骨摘出術（アブミ骨底板の除去）またはアブミ骨底開窓術（アブミ骨底板に穴を開ける）を伴うことが多い。

【0647】

いくつかの実施形態では、本開示は、外耳道を通じて中耳及び／または内耳にアクセスするための、低侵襲で十分に認められた外科的手法を利用する送達アプローチについて説明する。この処置は、中耳と内耳との間の物理的障壁の1つを卵円窓で開窓することと、その後、本明細書に開示されるデバイス、例えば、図33～36に示されるようなデバイス（またはマイクロカテーテル）を使用して、本明細書に開示される組成物を、制御された流速で、一定の体積で、正円窓膜を介して送達することを含む。

【0648】

いくつかの実施形態では、哺乳動物（例えば、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、またはウサギ）、霊長類（例えば、NHP（例えば、マカク、チンパンジー、サル、または類人猿））またはヒト）に対する外科的処置は、蝸牛の全長にわたってAAVベクター形質導入率を高めるために通気を含み得る。いくつかの実施形態では、手術中に通気部がない場合、通気部を伴った手術後のAAVベクター蝸牛細胞形質導入率と比較して、AAVベクター蝸牛細胞形質導入率が低い可能性がある。いくつかの実施形態では、通気部は、蝸牛全体でIHCの約75～100%の形質導入率を促進する。いくつかの実施形態では、通気により、蝸牛の基底部で約50～70%、約60～80%、約70～90%、または約80～100%のIHC形質導入率が可能になる（図28参照）。いくつかの実施形態では、通気により、蝸牛の頂部で約50～70%、約60～80%、約70～90%、または約80～100%のIHC形質導入率が可能になる（図28参照）。

【0649】

明細書に記載の送達デバイスは、手術室の無菌領域に置かれ、チューブの端が無菌領域から取り出され、本明細書に開示の組成物（例えば、1つ以上のAAVベクター）を充填したシリンジに接続され、ポンプに取り付けられ得る。空気を除去するためにシステムを

10

20

30

40

50

適切にプライミングした後、明視化下で（外科用顕微鏡、内視鏡、及び／または遠位端カメラ）針を中耳に通すことができる。RWMを貫通させるために針（またはマイクロニードル）を使用してもよい。針は、ストッパーがRWMに接触するまで挿入することができる。次いで、本明細書に開示される組成物が、選択された持続時間、制御された流速で内耳に送達される間、デバイスはその位置に保持され得る。いくつかの実施形態では、流速（または注入速度）は、約30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約25 $\mu\text{L}/\text{分}$ ～約35 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約20 $\mu\text{L}/\text{分}$ ～約40 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約20 $\mu\text{L}/\text{分}$ ～約70 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約20 $\mu\text{L}/\text{分}$ ～約90 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約20 $\mu\text{L}/\text{分}$ ～約100 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速を含み得る。いくつかの実施形態では、流速は、約20 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約40 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約50 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約60 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約70 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約80 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、約90 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、または約100 $\mu\text{L}/\text{分}$ である。いくつかの実施形態では、流速（または、注入速度）は、約90 $\mu\text{L}/\text{分}$ ＋／－10%の速度を含み得る。いくつかの実施形態では、流速（または、注入速度）は、約90 $\mu\text{L}/\text{分}$ の速度を含み得る。いくつかの実施形態では、選択された持続時間（すなわち、本明細書に開示される組成物が流れている時間）は、約3分、または約2.5分～約3.5分、または約2分～約4分、または約1.5分～約4.5分、または約1分～約5分であり得る。いくつかの実施形態では、内耳に流れる本明細書に開示される組成物の総量は、約0.09 mL、または約0.08 mL～約0.10 mL、または約0.07 mL～約0.11 mLであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物の総量は、内耳の容積の約40%～約50%に相当する。

10

20

【0650】

送達が完了すると、デバイスは取り外すことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデバイスは、単回使用の使い捨て製品として構成され得る。他の実施形態では、本明細書に記載のデバイスは、例えば、交換可能及び／または滅菌可能な針サブアセンブリを有する、複数回使用の滅菌可能な製品として構成され得る。単回使用デバイスは、投与が完了した後、適切に廃棄することができる（例えば、バイオハザード鋭利器材容器に入れる）。

【0651】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、1つまたは複数のrAAV構築物を含む。いくつかの実施形態では、複数のrAAV構築物が組成物中に含まれる場合、rAAV構築物はそれぞれ異なる。いくつかの実施形態では、rAAV構築物は、例えば本明細書に記載の抗VEGFコード領域を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に記載のAAV構築物を含むrAAV粒子を含む。いくつかの実施形態では、rAAV粒子は、Anc80カプシドによりカプシド封入される。いくつかの実施形態では、Anc80カプシドは、配列番号89のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、Anc80カプシドは、配列番号113のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、Anc80カプシドは、配列番号114のポリペプチドを含む。

30

【0652】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、外科的処置によって対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、投与、例えば外科的処置を介した投与は、本明細書に記載の送達デバイスを介して本明細書に開示の組成物を内耳に注入することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される外科的処置は、経外耳道的鼓室開放術を行うことと、レーザー支援下微細アブミ骨底開窓術を行うことと、本明細書に記載の送達デバイスを介して本明細書に開示される組成物を内耳に注入することと、を含む。

40

【0653】

いくつかの実施形態では、外科的処置は、経外耳道的鼓室開放術を行うことと、レーザー支援下微細アブミ骨底開窓術を行うことと、本明細書に記載の送達デバイスを介して本明細書に開示される組成物を内耳に注入することと、対象の正円窓及び／または卵円窓の周りにシーラントを適用することと、対象の鼓膜外耳道皮弁を解剖学的位置まで下げることを含む。

50

【0654】

いくつかの実施形態では、外科的処置は、経外耳道的鼓室開放術を行うことと、対象の正円窓を準備することと、レーザー支援下微細アブミ骨底開窓術を行うことと、内耳への送達のために本明細書に記載の送達デバイスと本明細書に開示される組成物の両方を準備することと、送達デバイスを介して本明細書に開示される組成物を内耳に注入することと、対象の正円窓及び／または卵円窓の周りにシーラントを適用することと、対象の鼓膜外耳道皮弁を解剖学的位置まで下げることを含む。

【0655】

いくつかの実施形態では、レーザー支援下微細アブミ骨底開窓術の実施は、K T P 耳科用レーザー及び／またはC O 2 耳科用レーザーを使用することを含む。

【0656】

別の例として、本明細書に開示される組成物は、蝸牛内投与経路のために特別に設計されたデバイス及び／またはシステムを使用して投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のデバイスの設計要素には、以下が含まれ得る：注入された流体の無菌性の維持；内耳に導入される気泡の最小化；制御された速度で少量を正確に送達する能力；外科医による外耳道を通じた送達；正円窓膜（RWM）、もしくは内耳、例えば、RWMから先の蝸牛構造への損傷の最小化；及び／またはRWMを通じた注入流体の逆流の最小化。

【0657】

本明細書で提供されるデバイス、システム、及び方法はまた、本明細書で開示される組成物の内耳への送達から恩恵を受けるであろう状態及び障害（例えば本明細書に記載の聴覚障害を含むがこれらに限定されない）を治療するために、組成物を安全かつ効率的に内耳に送達する可能性についても説明する。別の例として、アブミ骨底板に通気部を配置し、RWMを通じて注入することにより、本明細書に開示される組成物は、作用部位での希釈を最小限に抑えて蝸牛全体に分散される。記載されたデバイスの開発により、外科的投与処置をヒトの外耳道を通じて実施することができる。記載されたデバイスは、ある量の流体を蝸牛の外リンパ内に注入した後、耳から取り外すことができる。対象において、デバイスは、外科用顕微鏡制御下で、または内視鏡と共に、外耳道を通じて進めることができる。

【0658】

本明細書に開示される方法のいずれかで使用するための例示的なデバイスが、図29～32に記載される。図29は、流体を内耳に送達するための例示的なデバイス10を示す。デバイス10は、刻み付きハンドル12、及び伸縮式ハイポチューブ針支持体24に結合した遠位ハンドル接着剤14（例えば、Loc tite 4014などのエポキシ）を含む。刻み付きハンドル12（またはハンドル部分）は、グリップを強化するために、刻み模様及び／または溝を含むことができる。刻み付きハンドル12（またはハンドル部分）は、約5mm～約15mm厚、または約5mm～約12mm厚、または約6mm～約10mm厚、または約6mm～約9mm厚、または約7mm～約8mm厚であり得る。刻み付きハンドル12（またはハンドル部分）は、使用中に流体がデバイス10を通過できるように中空であってもよい。デバイス10は、刻み付きハンドル12の近位端18にある近位ハンドル接着剤16と、デバイス10の遠位端20にあるストッパー28（図30に示す）を有する針サブアセンブリ26（図30に示す）と、張力緩和機構22とを含み得る。張力緩和機構22は、Santoprene材料、Pebax材料、ポリウレタン材料、シリコン材料、ナイロン材料、及び／または熱可塑性エラストマーから構成され得る。伸縮式ハイポチューブ針支持体24は、その中に配置された曲針38（図30に示される）を取り囲んで支持する。

【0659】

さらに図29を参照すると、ストッパー28は、熱可塑性材料またはプラスチックポリマー（UV硬化ポリマーなど）及び他の適切な材料から構成され得、曲針38が外耳道の奥まで挿入されすぎのを防止するため（例えば、曲針38が側壁または他の内耳構造に

10

20

30

40

50

挿入されるのを防止するため)に使用され得る。デバイス10はまた、刻み付きハンドル12と、伸縮式ハイポチューブ針支持体24に結合した遠位ハンドル接着剤14との間に配置されたテーパ部分23を含み得る。刻み付きハンドル12(またはハンドル部分)は、ハンドル部分12の遠位端にテーパ部分23を含み得る。デバイス10はまた、デバイス10の近位端16に流体的に接続されたチューブ36を含み得、デバイスを上流の構成要素(例えば、ポンプ、シリンジ、及び/またはいくつかの実施形態では制御システム及び/または電源(図示せず)に結合され得る上流の構成要素)に接続する流体入口ラインとして機能する。いくつかの実施形態では、曲針38(図30に示す)は、遠位端20から、伸縮式ハイポチューブ針支持体24を通り、テーパ部23を通り、刻み付きハンドル12を通り、張力緩和機構22を通過して延び、チューブ36に直接流体接続する。他の実施形態では、曲針38は、刻み付きハンドルの中空内部と流体接続し(例えば、伸縮式ハイポチューブ針支持体24を介して)、近位端16においてチューブ36と流体接続する。曲針38がデバイス10の内部を貫通していない実施形態では、治療用流体がデバイス10(比較的低い圧力(例えば、約1パスカル~約50Pa、または約2Pa~約20Pa、または約3Pa~約10Pa)で動作する)から漏出するのを防ぐために、接触面積(例えば、重なり合った入れ子式ハイポチューブ42の間)、公差、及び/または接続する構成要素間の密閉性が十分に必要である。

10

【0660】

図30は、本開示の実施形態の態様による、曲針サブアセンブリ26の側面図を示す。曲針サブアセンブリ26は、曲げ部32を有する針38を含む。曲針サブアセンブリ26はまた、曲げ部32に結合したストッパー28を含み得る。曲げ部32は、耳の膜(例えば、RWM)を穿刺するために、デバイス10の遠位端20に傾斜先端34を含む。針38、曲げ部32、及び傾斜先端34は、流体がそこを流れることができるように中空である。曲げ部32の角度46(図33に示す)は変化し得る。ストッパー28の形状は、円筒形、ディスク形、環形、ドーム形、及び/または他の適切な形状であってもよい。ストッパー28は、曲げ部32上の適所に成形され得る。例えば、ストッパー28は、接着剤または圧縮嵌合を使用して、曲げ部32を中心として同心状に配置され得る。接着剤の例としては、UV硬化接着剤(Dymax203A-CTH-F-Tなど)、エラストマー接着剤、熱硬化性接着剤(エポキシまたはポリウレタンなど)、またはエマルジョン接着剤(ポリ酢酸ビニルなど)が挙げられる。ストッパー28は、傾斜先端34が所望の挿入深さで耳に挿入されるように、曲げ部32を中心として同心状に嵌合する。曲針38は、インクリメンタルフォーミング及び他の適切な技術を使用して、直針から形成され得る。

20

30

【0661】

図31は、流体を内耳に送達するための例示的なデバイス10の斜視図を示す。チューブ36は、長さ(図31の寸法11)が約1300mm~約1600mm、または約1400mm~約1500mm、または約1430mm~約1450mmであり得る。張力緩和機構22は、長さ(図31の寸法15)が約25mm~約30mm、または長さが約20mm~約35mmであり得る。ハンドル12は、長さ(図31の寸法13)が約155.4mm、または約150mm~約160mm、または約140mm~約170mmであり得る。伸縮式ハイポチューブ針支持体24は、2つ以上の入れ子式ハイポチューブ、例えば、3つの入れ子式ハイポチューブ42A、42B、及び42C、または4つの入れ子式ハイポチューブ42A、42B、42C、及び42Dを有し得る。ハイポチューブ42A、42B、42C、及び先端アセンブリ26の全長(図31の寸法17)は、約25mm~約45mm、または約30mm~約40mm、または約35mmであり得る。さらに、伸縮式ハイポチューブ針支持体24は、約36mm、または約25mm~約45mm、または約30mm~約40mmの長さを有し得る。3つの入れ子式ハイポチューブ42A、42B、及び42Cは各々、長さがそれぞれ3.5mm、8.0mm、及び19.8mm、±約20%であり得る。伸縮式ハイポチューブ針支持体24の最も内側の入れ子になったハイポチューブ(または最も狭い部分)は、針38を中心として同心状に配置され得

40

50

る。

【0662】

図32は、本開示の実施形態の態様による、デバイス10の遠位端20に結合された曲針サブアセンブリ26の斜視図を示す。図32に示すように、曲針サブアセンブリ26は、曲げ部32に結合された針38を含み得る。他の実施形態では、曲針38は、単一の針（例えば、所望の角度46を含むようにその後曲げられる直針）であり得る。針38は、33ゲージの針であってもよく、または約32～約34まで、または約31～35までのゲージを含んでもよい。より細かいゲージでは、チューブ36がよじれたり損傷したりしないように注意する必要がある。針38をハンドル12に取り付けて、針38を内耳に安全かつ正確に配置することができる。図32に示すように、曲針サブアセンブリ26は、曲げ部32を中心として配置されたストッパー28を含み得る。図32はまた、曲げ部32が、耳の膜（例えば、RWM）を穿刺するための傾斜先端34を含み得ることを示す。ストッパー28は、約0.5mm、または約0.4mm～約0.6mm、または約0.3mm～約0.7mmの高さ48を有し得る。曲げ部32は、約1.45mm、または約1.35mm～約1.55mm、または約1.2mm～約1.7mmの長さ52を有し得る。他の実施形態では、曲げ部32は、ストッパー28の遠位端と傾斜先端34の遠位端との間の距離が約0.5mm～約1.7mm、または約0.6mm～約1.5mm、または約0.7mm～約1.3mm、または約0.8mm～約1.2mmとなるように、2.0mmを超える長さを有し得る。図32は、ストッパー28が、円筒形、ディスク形、及び／またはドーム形の形状を有し得ることを示す。当業者であれば、他の形状を使用できることを理解するであろう。

【0663】

対象を治療する方法

本開示は、とりわけ、本明細書に記載の技術を使用して、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象の基礎疾患及び／または症状を治療することができることを提供する。

【0664】

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の構築物（例えば、rAAV構築物）、粒子（例えば、rAAV粒子）、または本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は治療方法である。いくつかの実施形態では、対象は、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象である。

【0665】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物（例えば、rAAV構築物）、粒子（例えば、rAAV粒子）、または本明細書に記載の組成物を対象に投与することは、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に関連する1つ以上の症状を緩和及び／または軽快し得る。症状としては、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、及び／または死亡が挙げられ得る。

【0666】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）は、遺伝子変異（例えば、欠失変異、フレームシフト変異、ナンセンス変異、低形質変異、高形質変異、新形質変異、異常な過剰発現、異常な過小発現など）に関連する。いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、耳科腫瘍の進行に関連する遺伝子に変異を有する可能性があり、この変異は、本明細書に記載のように特徴付けられ得る。

【0667】

いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に記載の技術（例えば、リアルタイムPCR、定量的リアルタイムPCR、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫組織化学法、

10

20

30

40

50

質量分析法、または免疫蛍光法、遺伝子及び／またはタンパク質の発現の間接的な表現型決定（例えば、機能性聴力検査、A B R、D P O A E などを通じて）など）による治療の前、間、及び／または後に遺伝的及び／または症状的に特徴付けられる。いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、V S）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、組織サンプリング（例えば、1つ以上の内耳細胞を含む、例えば、1つ以上の有毛細胞及び／または1つ以上の支持細胞を含む）を通じて特徴付けられたそれらの関連疾患状態を有し得る。いくつかの実施形態では、組織は、本明細書に記載の任意の技術（例えば、方法論、例えば、組成物、例えば、構築物を含む組成物、及び／または粒子など）の実施前、実施中、及び／または実施後に、有毛細胞及び／または支持細胞の形態を決定するために形態学的分析を通して評価される。いくつかのそのような実施形態では、標準的な免疫組織化学的または組織学的分析を行うことができる。いくつかの実施形態では、細胞が *in vitro* または *ex vivo* で使用される場合、追加の免疫細胞化学的または免疫組織化学的分析を行うことができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のタンパク質または転写産物の1つ以上のアッセイ（例えば、ウェスタンブロット法、E L I S A、ポリメラーゼ連鎖反応）を、対象または *in vitro* 細胞集団からの1つ以上の試料に対して実施することができる。

10

【0668】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の構築物（例えば、r A A V 構築物）、粒子（例えば、r A A V 粒子）、または本明細書に記載の組成物を対象に投与することにより、本明細書に記載の技術による治療前に行われた免疫組織化学的検査と比較して、または対照集団と比較して、対象の免疫組織化学的評価（例えば、上記に記載の検査）が改善する。

20

【0669】

難聴、耳鳴り、めまい、及び／または語音の症状を改善するための対象の治療

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、V S）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、聴力機能によって特徴付けられる治療レジメンを受けることができる。いくつかの実施形態では、治療レジメンの機能性は聴力機能によって特徴付けられ、このような聴力機能は、本明細書に記載の組成物及び方法による治療前、治療後、及び／または治療中に聴性脳幹反応測定（A B R）を使用して個体において判定される。いくつかの実施形態では、治療レジメンの機能性は聴力機能によって特徴付けられ、このような聴力機能は、本明細書に記載の組成物及び方法による治療前、治療後、及び／または治療中に歪成分耳音響放射（D P O A E）を測定することによって個体において判定される。いくつかのそのような実施形態では、聴力測定値は、対象の片耳または両耳から取得される。いくつかのそのような実施形態では、記録は、同じ対象の以前の記録、及び／または例えば、正常な聴力として定義される許容聴力範囲と比較して難聴を定義するために使用される、そのような応答測定値における既知の閾値と比較される。いくつかの実施形態では、対象は、任意の治療を受ける前にA B R及び／またはD P O A E 測定値が記録される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の技術により治療された対象は、治療前と比較して、治療後にA B R及び／またはD P O A E 測定値で改善を有することになる。いくつかの実施形態では、A B R及び／またはD P O A E 測定値は、治療が行われた後、及び治療後の定期的なフォローアップ時に取得される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象の検査評価（例えば、上記の検査）が改善する。

30

40

【0670】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、V S）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、語音、語音理解、及び／または音認識の機能としての聴力機能によって特徴付けられる治療レジメンを有し得る。いくつかの実施形態では、治療レジメンの機能性は、語音パターン認識の判定を通じて特徴付けられ、及び／または言語療法士によって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技

50

術を用いた治療薬の治療レジメンの機能性は、純音検査によって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術を用いた治療薬の治療レジメンの機能性は、骨導検査によって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術を用いた治療薬の治療レジメンの機能性は、音響反射検査によって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術を用いた治療薬の治療レジメンの機能性は、ティンパノメトリーによって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療薬の治療レジメンの機能性は、当該技術分野で知られている聴力分析の任意の組み合わせによって判定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術を用いた治療薬の治療レジメンの機能性は、全体的に、及び／または対象の片耳もしくは両耳から測定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療薬の治療レジメンの機能性は、レジメン後に取得された記録及び／または専門的な分析を、同じ対象の以前の記録及び／または分析、及び／または例えば、正常な聴力として定義される許容聴力範囲と比較して難聴を定義するために使用されるそのような応答測定値における既知の閾値と比較して利用する。いくつかの実施形態では、治療対象には、任意の治療を受ける前に、語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定及び／または分析が実施される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の技術により治療された対象は、治療前と比較して、治療後に語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定で改善を有することになる。いくつかの実施形態では、語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定は、治療が行われた後、及び治療後の定期的なフォローアップ時に取得される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象の検査評価（例えば、上記の検査）が改善する。

10

20

30

40

50

【0671】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、聴性行動反応評価を含む方法を通じて治療の機能評価を受け得る。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、適切なマスキングを伴った気導曲線及び骨導曲線を有する純音聴力検査、語音聴力検査、静寂下での語音（Words in quiet）、または騒音分析での語音（words in noise analysis）を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、聴性脳幹反応検査による電気生理学的聴力検査を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、標準化された質問票を含む：HHIA：成人用の難聴障害度質問票、DHI：めまい障害度質問票、THI：耳鳴障害度質問票、PANQOL：Penn聴神経腫瘍QOL質問票（QoL）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象の検査評価（例えば、上記の検査）が改善する。

【0672】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、耳、前庭、及び／または全身の有害事象の評価、ならびに血液学、臨床化学、及び／または尿検査パラメーターの評価によってモニターされ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療を受けている対象は、血液中の抗VEGFタンパク質レベル、ならびに耳スワブ、鼻スワブ、唾液、及び血液中の構築物DNAについて評価され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療を受けている対象は、カプシド及び／または分泌された導入遺伝子産物に対する潜在的な体液性免疫応答の評価のために採血され得る。

【0673】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、ABR検査を通じてその治療機能を分析され得る。いくつかの実施形態では、ABR検査は、対象の蝸牛、蝸牛神経、及び脳幹が各音刺激に応答するかどうかを測定し、そのような検査は、多くの場合、耳の健康状態の尺

度として使用される。いくつかの実施形態では、対象の脳幹が確実に処理できる各刺激周波数の最低強度（閾値）を測定することに加えて、閾値上刺激に応答する波Ⅰの振幅を測定して、蝸牛有毛細胞から聴覚神経への求心性の情報の流れの整合性を評価することができる。いくつかの実施形態では、ABR閾値は、対象の耳を通過し、脳幹によって処理される最低レベルの音に関する重要な情報を提供することができ、ABR波Ⅰの振幅における閾値上応答は、内有毛細胞の基底部と聴神経の樹状突起との間のリボンシナプス接続の整合性を反映するもの（proxy）として使用が増えている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象のABR評価が改善する。

【0674】

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、DPOAEベース検査を通じてその治療機能を分析され得る。いくつかの実施形態では、DPOAEは、蝸牛の外有毛細胞の動きによって生成される音であり、変換器及びマイクロホンの組み合わせを用いて外耳道で非侵襲的に測定される。いくつかの実施形態では、誘発されたDPOAEの大きさは、外有毛細胞機能の有用な尺度である。いくつかの実施形態では、2つの原音（ f_1 及び f_2 ）が耳に与えられ、刺激周波数及び歪み周波数において蝸牛流体に圧力変化を引き起こす機械的振動が生成される。いくつかの実施形態では、これらの圧力変化は、耳を逆方向に駆動し、中耳、次いで鼓膜を活性化して、外耳道内で音を生成する。いくつかの実施形態では、DPOAEは、ABRで使用されるのと同じ検査周波数（8、16、32 kHz）で収集され、対象がABRの麻酔下にある間に実行され得る。いくつかの実施形態では、 f_2 は8、16、及び32 kHzを中心とし、 $f_1 = f_2 \times 0.8 + 10 \text{ dB}$ である。いくつかの実施形態では、各周波数において、音は、5 dBずつ上昇させた10～80 dB SPLから与えられる。いくつかの実施形態では、DPOAEは外有毛細胞機能を評価し、したがって、典型的には、歪成分放射応答の振幅として測定される応答の強度の閾値上評価として使用される。いくつかの実施形態では、3つ全ての検査周波数が使用される。いくつかの実施形態では、検査された周波数ごとに信頼できる歪成分応答が得られない場合があり、そのような場合、適宜分析を行ってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象のBPOAE評価が改善する。

【0675】

腫瘍サイズ及び／または血管系を縮小するための対象の治療

いくつかの実施形態では、新生血管形成を特徴とする耳科疾患（例えば、VS）に罹患しているか、またはそのリスクがある対象は、画像診断ベース技術を通じてその治療機能を分析され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法による個体の治療の有効性は、放射線撮影法を使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、そのような放射線撮影法は、これらに限定されないが、コンピュータ断層撮影法（CT）（コンピュータ体軸断層撮影（CAT）スキャンとしても知られる）、X線、磁気共鳴画像法（MRI）、三次元流体減衰反転回復（3D-FLAIR）MRI、陽電子放出断層撮影法（PET）、及び／またはPET-CTスキャンを含むことができる。適切であり得る追加の放射線撮影技術及び方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による治療により、本明細書に記載の技術による治療前に行われた検査と比較して、または対照集団と比較して、対象の画像ベースの評価が改善する。

【0676】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの縮小に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの停滞に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの成長の減速に

関連する。

【0677】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、三次元流体減衰反転回復（3D-FLAIR）MRIにおける流体のシグナル強度の低下と関連する。特定の実施形態では、3D-FLAIR画像上での高い蝸牛シグナルとVS患者の難聴との間には相関関係がある。特定の実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、VSを有する対象におけるFLAIR画像上の蝸牛シグナルの増強に関連する外リンパ腔内のタンパク質の濃度を低下させる。

【0678】

神経機能を改善するための対象の治療

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、神経機能の改善に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、腫瘍浮腫を緩和する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、個体の腫瘍脈管系を一過性に及び／または安定的に正常化する。

【0679】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、語音理解の改善及び／または回復に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、患者が知覚する語音理解の困難の減少に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術による対象の治療（複数可）は、個体の報告された生活の質の改善及び／または回復に関連する。

【0680】

疾患状態の特性決定方法

とりわけ、本開示は、対象、例えば、VSに罹患しているか、またはそのリスクがある対象の疾患状態の特性決定方法を提供する。いくつかの実施形態では、疾患状態は、遺伝子における変異の存在（または非存在）を測定することによって特性決定することができる。「遺伝子における変異」という用語は、既知のコンセンサス機能性遺伝子における改変を指し、コンセンサス機能性タンパク質と比較して、1つ以上のアミノ酸の欠失、1つ以上のアミノ酸置換、及び1つ以上のアミノ酸挿入、のうちの1つ以上を有するタンパク質の産生をもたらす、及び／または変異を有しない哺乳動物細胞におけるコードされたタンパク質の発現されたレベルと比較して、哺乳動物細胞におけるコードされたタンパク質の発現されたレベルの減少をもたらす。いくつかの実施形態では、変異は、1つ以上のアミノ酸（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のアミノ酸）の欠失を有するタンパク質の産生をもたらし得る。いくつかの実施形態では、変異は、遺伝子におけるフレームシフトをもたらし得る。「フレームシフト」という用語は、当該技術分野において、コード配列のリーディングフレームのシフトをもたらすコード配列の任意の変異を包含することが知られている。いくつかの実施形態では、フレームシフトは、非機能性タンパク質をもたらし得る。いくつかの実施形態では、点変異は、ナンセンス変異（例えば、遺伝子のエクソンにおいて未成熟終止コドンをもたらす）であり得る。ナンセンス変異は、機能的である場合も、そうでない場合もある短縮型タンパク質（対応するコンセンサス機能性タンパク質と比較して）の産生をもたらし得る。いくつかの実施形態では、変異は、mRNAもしくはタンパク質、またはmRNA及びタンパク質の両方の発現の喪失（またはレベルの減少）をもたらし得る。いくつかの実施形態では、変異は、コンセンサス機能性タンパク質と比較して1つ以上の生物活性（機能）の喪失または減少を有する、変化したタンパク質の産生をもたらし得る。

【0681】

いくつかの実施形態では、変異は、遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの挿入である。いくつかの実施形態では、変異は、遺伝子の調節配列及び／または制御配列、すなわち、コード配列ではない遺伝子の一部分にある。いくつかの実施形態では、調節配列及び／ま

10

20

30

40

50

たは制御配列における変異は、プロモーターまたはエンハンサー領域にあり得、遺伝子の適切な転写を阻止または低減し得る。いくつかの実施形態では、変異は、タンパク質と相互作用することが知られている既知の異種遺伝子にある。

【0682】

遺伝子mRNA及び／またはタンパク質の遺伝子型決定方法及び／または発現もしくは活性を検出する方法は、当該技術分野で知られている（例えば、Ito et al., World J Otorhinolaryngol. 2013 May 28; 3(2): 26-34、及びRoesch et al., Int J Mol Sci. 2018 Jan; 19(1): 209（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。いくつかの実施形態では、mRNAまたはタンパク質の発現レベルを、直接的に検出することができる（例えば、タンパク質の検出、mRNAの検出など）。遺伝子の発現及び／または活性を直接検出するために使用され得る技法の非限定的な例としては、例えば、リアルタイムPCR、定量的リアルタイムPCR、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫組織化学法、質量分析法、または免疫蛍光法が挙げられる。いくつかの実施形態では、遺伝子及び／またはタンパク質の発現を、間接的に検出することができる（例えば、機能的聴力検査、ABR、DPOAEなどを通じて）。

10

【0683】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の任意の作用物質（例えば、組成物、例えば、構築物を含む組成物、及び／または粒子など）の投与前及び投与後に、組織試料（例えば、1つ以上の内耳細胞を含む、例えば、1つ以上の有毛細胞及び／または1つ以上の支持細胞を含む）を形態学的分析によって評価して、有毛細胞及び／または支持細胞の形態を決定することができる。いくつかのそのような実施形態では、標準的な免疫組織化学的または組織学的分析を行うことができる。いくつかの実施形態では、細胞がin vitroまたはex vivoで使用される場合、追加の免疫細胞化学的または免疫組織化学的分析を行うことができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のタンパク質または転写産物の1つ以上のアッセイ（例えば、ウェスタンブロット法、ELISA、ポリメラーゼ連鎖反応）を、対象またはin vitro細胞集団からの1つ以上の試料に対して実施することができる。

20

【0684】

難聴、耳鳴り、めまい、及び症状の回復の評価

30

いくつかの実施形態では、聴力機能は、本明細書に記載の組成物及び方法による治療前、治療後、及び／または治療中に聴性脳幹反応測定（ABR）を使用して個体において判定される。いくつかの実施形態では、聴力機能は、本明細書に記載の組成物及び方法による治療前、治療後、及び／または治療中に歪成分耳音響放射（DPOAE）を測定することによって個体において判定される。いくつかのそのような実施形態では、測定値は、対象の片耳または両耳から取得される。いくつかのそのような実施形態では、記録は、同じ対象の以前の記録、及び／または例えば、正常な聴力として定義される許容聴力範囲と比較して難聴を定義するために使用される、そのような応答測定値における既知の閾値と比較される。いくつかの実施形態では、対象は、任意の治療を受ける前にABR及び／またはDPOAE測定値が記録される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の技術により治療された対象は、治療前と比較して、治療後にABR及び／またはDPOAE測定値で改善を有することになる。いくつかの実施形態では、ABR及び／またはDPOAE測定値は、治療が行われた後、及び治療後の定期的なフォローアップ時に取得される。

40

【0685】

いくつかの実施形態では、聴力機能は、語音パターン認識を使用して判定されるか、または言語療法士によって判定される。いくつかの実施形態では、聴力機能は、純音検査によって判定される。いくつかの実施形態では、聴力機能は、骨伝導検査によって判定される。いくつかの実施形態では、聴力機能は、音響反射検査によって判定される。いくつかの実施形態では、聴力機能はティンパノメトリーによって判定される。いくつかの実施形

50

態では、聴力機能は、当該技術分野で知られている聴力分析の任意の組み合わせによって判定される。いくつかのそのような実施形態では、測定は全体的に、及び／または対象の片耳もしくは両耳から測定される。いくつかのそのような実施形態では、記録及び／または専門的な分析は、同じ対象の以前の記録及び／または分析、及び／または例えば、正常な聴力として定義される許容聴力範囲と比較して難聴を定義するために使用される、そのような応答測定値における既知の閾値と比較される。いくつかの実施形態では、対象には、任意の治療を受ける前に、語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定及び／または分析が実施される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の技術により治療された対象は、治療前と比較して、治療後に語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定で改善を有することになる。いくつかの実施形態では、語音パターン認識、純音検査、骨導検査、音響反射検査、及び／またはティンパノメトリー測定は、治療が行われた後、及び治療後の定期的なフォローアップ時に取得される。

10

【0686】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、聴性行動反応評価を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、適切なマスキングを伴った気導曲線及び骨導曲線を有する純音聴力検査、語音聴力検査、静寂下での語音、または騒音下での語音を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、聴性脳幹反応検査による電気生理学的聴力検査を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、聴性脳幹反応検査による電気生理学的聴力検査を含む。いくつかの実施形態では、聴性行動反応評価は、標準化された質問票を含む：HHIA：成人用の難聴障害度質問票、DHI：めまい障害度質問票、THI：耳鳴障害度質問票、PANQOL：Penn聴神経腫瘍QOL質問票（QoL）。

20

【0687】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、安全性及び有効性は、耳、前庭、及び全身の有害事象、ならびに血液学、臨床化学、及び／または尿検査パラメーターの評価によってモニターされ得る。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、評価される追加のパラメーターには、血液中の抗VEGFタンパク質レベル、ならびに耳スワブ、鼻スワブ、唾液、及び血液中の構築物DNAが含まれる。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、カプシド及び分泌された導入遺伝子産物に対する潜在的な体液性免疫応答の評価のために、血液を採取することもできる。

30

【0688】

ABR検査は、動物の蝸牛、蝸牛神経、及び脳幹が各音刺激に応答するかどうかを測定し、多くの場合、耳の健康状態の尺度として使用される。これと同じ標準的な検査は、病院で新生児の聴力を検査するために一般的に使用されており、実験動物で使用される標準的な聴力検査である。いくつかの実施形態では、ABR検査は、マウスにケタミン／キシラジン麻酔薬のIP投与量を注入して、動き及び筋肉アーチファクトを最小限に抑え、測定電極の配置を補助することを含む。いくつかの実施形態では、ABR検査（DPOAEと同時に両方の耳で行う場合）が完了するまでにおよそ45分かかるため、麻酔薬の追加投与が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、麻酔薬の初回投与は、ケタミン（100mg/kg）及びキシラジン（10mg/kg）IPからなり、必要に応じて、元のケタミン用量の1/4～1/2からなるケタミンのみが追加投与される。いくつかの実施形態では、獣医師の推奨に基づいて、キシラジンの再投与は行われない。いくつかの実施形態では、皮膚表面を通る経皮記録電極は、3つの標準的な場所（耳の間で等距離にある頭蓋骨の頂点、検査耳の耳介の後ろの乳様突起上、及び接地電極用に反対側の耳の耳介の後ろの乳様突起上）に配置される。いくつかの実施形態では、刺激は、5dBずつ上昇させた10～80dB SPLで、低（8kHz）、中（16kHz）、及び高（32kHz）周波数の純音ピップ刺激（0.1msの立上がり立下がり、1.5msの持続時間）からなる。いくつかの実施形態では、刺激は30/秒の速度で与えられ、512のアーチファクトのない平均が各刺激レベルで取得される。いくつかの実施形態では、ABR

40

50

を、群に応じて2～3の別の時点；ベースライン及び最終4～6週で収集した。一部の動物は、手術後3週目にも検査した。いくつかの実施形態では、動物の脳幹が確実に処理できる各刺激周波数の最低強度（閾値）を測定することに加えて、閾値上刺激に応答する波Iの振幅を測定して、蝸牛有毛細胞から聴覚神経への求心性の情報の流れの整合性を評価することができる。いくつかの実施形態では、ABR閾値は、動物の耳を通過し、脳幹によって処理される最低レベルの音に関する重要な情報を提供することができ、ABR波Iの振幅における閾値上応答は、内有毛細胞の基底部と聴神経の樹状突起との間のリボンシナプス接続の整合性を反映するものとして使用が増えている。

【0689】

DPOAEは、蝸牛の外有毛細胞の動きによって生成される音であり、変換器及びマイククロホンの組み合わせを用いて外耳道で非侵襲的に測定される。いくつかの実施形態では、誘発されたDPOAEの大きさは、外有毛細胞機能の有用な尺度である。これと同じ標準的な検査もまた、病院で新生児の聴力を検査するために一般的に使用されており、実験動物で使用する標準的な聴力検査である。いくつかの実施形態では、2つの原音（ f_1 及び f_2 ）が耳に与えられ、刺激周波数及び歪み周波数において蝸牛流体に圧力変化を引き起こす機械的振動が生成される。いくつかの実施形態では、これらの圧力変化は、耳を逆方向に駆動し、中耳、次いで鼓膜を活性化して、外耳道内で音を生成する。いくつかの実施形態では、DPOAEは、ABRで使用されるのと同じ検査周波数（8、16、32 kHz）で、ABRの麻酔下にある間に収集される。いくつかの実施形態では、 f_2 は8、16、及び32 kHzを中心とし、 $f_1 = f_2 \times 0.8 + 10 \text{ dB}$ である。いくつかの実施形態では、各周波数において、音は、5 dBずつ上昇させた10～80 dB SPLから与えられる。いくつかの実施形態では、DPOAEは外有毛細胞機能を評価し、したがって、典型的には、歪成分放射応答の振幅として測定される応答の強度の閾値上評価として使用される。いくつかの実施形態では、3つ全ての検査周波数が使用される。いくつかの実施形態では、検査された周波数ごとに信頼できる歪成分応答が得られない場合があり、そのような場合、適宜分析を行ってもよい。

【0690】

腫瘍サイズ及び血管系の評価

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法による個体の治療の有効性は、放射線撮影法を使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、そのような放射線撮影法は、コンピュータ断層撮影法（CT）（コンピュータ体軸断層撮影（CAT）スキャンとしても知られる）、X線、磁気共鳴画像法（MRI）、三次元流体減衰反転回復（3D-FLAIR）MRI、陽電子放出断層撮影法（PET）、及び／またはPET-CTスキャンを含み得る。好適であり得るさらなる放射線撮影技術及び方法は、当該技術分野で知られている。適切であり得る追加の放射線撮影技術及び方法は、当該技術分野で知られている。

【0691】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの縮小に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの停滞に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、放射線撮影技術によって測定されるVSサイズの成長の減速に関連する。

【0692】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、三次元流体減衰反転回復（3D-FLAIR）MRIにおける流体のシグナル強度の低下に関連する。特定の実施形態では、3D-FLAIR画像上での高い蝸牛シグナルとVS患者の難聴との間には相関関係がある。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物は、VSを有する対象におけるFLAIR画像上の蝸牛シグナルの増強に関連する外リンパ腔内のタンパク質の濃度を低下させる。

【0693】

神経機能の評価

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、神経機能の改善に関連する。いくつかの実施形態では、方法及び／または組成物による個体の治療は、腫瘍浮腫を軽減する。いくつかの実施形態では、方法及び／または組成物による個体の治療は、個体の腫瘍脈管系を一過性に及び／または安定的に正常化する。

【0694】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、語音理解の改善及び／または回復に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、患者が知覚する語音理解の困難の減少に関連する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法及び／または組成物による個体の治療は、個体の報告された生活の質の改善及び／または回復に関連する。

10

【0695】

生体試料中の抗VEGFタンパク質濃度の評価

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の組成物による治療前、治療中、及び／または治療後に、個体からの1つ以上の生体試料中の抗VEGFタンパク質濃度を評価することを含む。

【0696】

これらの方法のいくつかの実施形態では、治療、例えば、本明細書に記載の組成物の1回または2回以上の投与の後に、抗VEGFタンパク質の発現が増加する。いくつかの実施形態では、対照レベルと比較して、例えば、本明細書に記載の任意の構築物（複数可）を含む組成物の導入前の抗VEGFタンパク質の発現レベルと比較して、本明細書に記載の活性抗VEGFタンパク質の発現が増加する。

20

【0697】

標的RNA及び／またはタンパク質の発現及び／または活性を検出する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態では、内耳細胞標的タンパク質の発現レベルを、直接検出することができる（例えば、内耳細胞標的タンパク質または標的mRNAの検出）。標的RNAまたはタンパク質の発現及び／または活性を直接検出するために使用され得る技法の非限定的な例としては、リアルタイムPCR、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫組織化学法、質量分析法、または免疫蛍光法が挙げられる。いくつかの実施形態では、内耳細胞標的タンパク質の発現を、間接的に検出することができる（例えば、機能的聴力検査により）。

30

【0698】

いくつかの実施形態では、rAAV粒子の体内分布及び／または排出分析が実施される。いくつかの実施形態では、例えば抗VEGFタンパク質を発現するために、cDNAを送達するためのrAAV-抗VEGF複製欠損型rAAV粒子を含む組成物が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のrAAV粒子を使用して、VSを有するか、またはVSを発症するリスクがある対象、例えばヒト、例えば患者を治療する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、蝸牛内経路を介して投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、本明細書に記載のrAAV粒子の用量で投与される（例えば、ベクターゲノムqPCR分析によって測定される）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、身体の局所領域に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、身体の局所領域、例えば、蝸牛及び／または外リンパにおいて、構築物配列の検出可能な発現をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、血管の拡張及び全身曝露を制限することが予想される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、蝸牛においてより高いレベルの構築物配列をもたらすが、非蝸牛組織または流体区画、例えば、肝臓、脾臓、リンパ節、脳幹、聴覚皮質、血清、及び／またはCSFではもたらさない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、採取された非蝸牛組織及び流体において、低い検出可能なレベルの構築物配列をもたらす。いくつかの実施形態で

40

50

は、非蝸牛組織における構築物配列の発現は、治療上関連しないレベルである。いくつかの実施形態では、構築物配列のレベルは、概して、6ヶ月までに全体的に低下した。いくつかの実施形態では、構築物配列のレベルは、血液試料中で経時的に、例えば、本明細書に開示される組成物の蝸牛内投与後1ヶ月で、減少する。

【0699】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物またはAAV粒子は、対象に（例えば、蝸牛内経路を介して）投与される際に、抗VEGFタンパク質が、対象の局限された範囲にて、例えば、対象の外リンパ内で検出可能なレベルで発現することの特徴とする。いくつかの実施形態において、抗VEGFタンパク質は対象の外リンパで発現する。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質は、約20 ng/mL～約1000 ng/mL、約40 ng/mL～約1000 ng/mL、60 ng/mL～約1000 ng/mL、80 ng/mL～約1000 ng/mL、100 ng/mL～約1000 ng/mL、200 ng/mL～約1000 ng/mL、300 ng/mL～約1000 ng/mL、400 ng/mL～約1000 ng/mL、500 ng/mL～約1000 ng/mL、600 ng/mL～約1000 ng/mL、700 ng/mL～約1000 ng/mL、800 ng/mL～約1000 ng/mL、900 ng/mL～約1000 ng/mL、約20 ng/mL～約900 ng/mL、ng/mL、約20 ng/mL～約800 ng/mL、約20 ng/mL～約700 ng/mL、約20 ng/mL～約600 ng/mL、約20 ng/mL～約500 ng/mL、約20 ng/mL～約400 ng/mL、約20 ng/mL～約300 ng/mL、約20 ng/mL～約200 ng/mL、約20 ng/mL～約100 ng/mL、約20 ng/mL～約80 ng/mL、約20 ng/mL～約60 ng/mL、約20 ng/mL～約40 ng/mLの範囲で発現する。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質は、約20 ng/mL、約30 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約300 ng/mL、約400 ng/mL、約500 ng/mL、約600 ng/mL、約700 ng/mL、約800 ng/mL、約900 ng/mL、または約1000 ng/mLで発現する。

【0700】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、構築物またはAAV粒子は、対象に（例えば、蝸牛内経路を介して）投与される際に、抗VEGFタンパク質が、血清、CSF、もしくは非蝸牛組織、またはこれらの組み合わせにおいて、検出可能なレベルで存在しないことを特徴とする。いくつかの実施形態では、非蝸牛組織は、肝臓、脳神経、脾臓、下顎リンパ節、腋窩リンパ節、及び鼠経リンパ節の1つ以上から選択される。

【0701】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、構築物またはAAV粒子は、対象に（例えば、蝸牛内経路を介して）投与される際に、抗VEGFタンパク質の、用量依存的な発現が観察されることを特徴とする。いくつかの実施形態では、構築物またはAAV粒子の用量が増加することで、例えば、対象の局限された範囲にて、例えば、対象の外リンパ内で、より高レベルの抗VEGFタンパク質がもたらされる。

【0702】

本明細書に開示される任意の方法または使用のいくつかの実施形態では、構築物またはAAV粒子は、対象に（例えば、蝸牛内経路を介して）投与される際に、抗VEGFタンパク質が、VSが発見される耳部の1つ以上の位置に、または、その付近に存在することを特徴とする。いくつかの実施形態では、VSは、早期VSまたは後期VSを含む。いくつかの実施形態では、VSはグレードI、グレードII、グレードIII、またはグレードIV VSを含む。いくつかの実施形態では、VS位置は、内耳道（IAC）底からの距離を特徴とする。いくつかの実施形態では、位置は、IAC底から約1～5 mmである。いくつかの実施形態では、位置は、IAC底から約1、1.5、2、2.5、3、3.

5、4、4.5、または5 mmである。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質は、例えば、本明細書に記載の生物学的に活性な閾値で、または、これを上回って存在する。

【0703】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、体内分布及び排出に関連する流体（例えば、血液、血清、尿、唾液、鼻及び耳のスワブ、ならびにCSF液）が採取及び／または評価される。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、非標的組織が採取及び／または評価される。いくつかの実施形態では、カプシドバリアントは向性を決定すると予想される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、カプシドバリアント、例えばAAVanc80カプシドバリアントを含む。いくつかの実施形態では、カプシドバリアントを含む本明細書に開示される組成物を、例えば、同一の投与経路を介して、同一の粒子製剤で、及び／または同等もしくはより低い粒子用量で送達することは、体内分布及び排出パターンに違いをもたらすことはないとは予想される。

10

【0704】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、約 5×10^{12} 総vg／蝸牛未満のレベルで投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFは、約 5×10^{13} vg／mL未満のレベルで投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物の用量は、例えば、量の限界及びrAAV粒子濃度の関数である。

20

【0705】

対照的に、rAAV粒子を使用した臨床試験では、全身投与経路を介して 1×10^{14} vg／kgを超える量が送達され、いくつかのケースでは、生後6ヶ月未満の参加者に送達された(AveXis 2019、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0706】

比較的低用量のrAAV粒子を用いた他の局所送達では、標的領域を超えた広範な体内分布（例えば全身にわたる）、または広範なrAAV粒子の排出（排泄／分泌；一般にqPCRなどの方法により基礎となる構築物DNA濃度が測定される）は報告されていない。例えば、 7.5×10^{11} vg／眼の用量で両側に送達されたLuxturna（登録商標）について、眼の標的領域を超えた低レベルの分散（特に、試験動物の粒子注入眼の視神経、視交叉、脾臓及び肝臓、ならびに散発的にリンパ節で）が報告されている。同様に、第3相臨床試験では、参加者の45%の涙にrAAV粒子が一過性かつ低レベルで排出され、また、 1.5×10^{11} vg／眼の用量で両側に送達されたLuxturna（登録商標）の網膜下投与直後の数日間、参加者の10%の血清（全血ではない）試料でも低レベルで検出された(Russell 2017; Spark Therapeutics 2017、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

30

【0707】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、例えば、検証されたqPCR法を使用して、蝸牛への片側投与後に、経時的に血液（例えば、血清及び全血）中のrAAV粒子配列の分散を評価することを含む。いくつかの実施形態では、対象からの排出を評価するために、追加の検体（例えば、外耳道スワブ、鼻スワブ、唾液、及び尿）が採取される。いくつかの実施形態では、少なくとも3つの連続した陰性検体が得られるまで、検体が対象から収集される。

40

【0708】

いくつかの実施形態では、VS関連難聴と相関するタンパク質は、本明細書に記載の組成物及び／または方法による治療前、治療中、及び／または治療後に測定される。特定の実施形態では、そのようなVS関連難聴関連タンパク質には、 μ -クリスタリン(CRYM)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質2(LRP2)、免疫グロブリン(Ig) γ -4鎖C領域、Ig κ 鎖C領域、補体C3、免疫グロブリン重定常 γ 3、及び／またはケモカイン受容体-4(CXCR4)が挙げられる。

50

【0709】

いくつかの実施形態では、AAVカプシド及び／または粒子に対する免疫原性が測定される。全身適用と比較して比較的低用量で局所領域に送達されたAAVカプシド及び／または粒子に対する免疫原性では、一般に免疫応答の特定のパターンは得られなかった；重要なことに、体液性及び細胞媒介性免疫学的モニタリングの両方により観察された応答（例えば、それぞれ酵素結合免疫吸着アッセイ [ELISA] / 中和抗体 [NAb] 及び酵素結合免疫吸着スポット [ELISPOT] アッセイによる）は、若干の免疫学的保護を提供する投与経路 (ROA) (複数可) (例えば、脳への直接投与) に関して、大部分は臨床的相関がなかった。

【0710】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、蝸牛内ROAは、例えば、非開存蝸牛水管を有する種（例えば、NHP及びヒト）において、同様のレベルの保護を提供すると予想される。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの投与の3日前からおよそ17日間、短い周術期の免疫調節レジメン（例えば全身性経口コルチコステロイド）を受ける。いくつかの実施形態では、免疫調節レジメンは、外科的投与処置に関連する炎症を軽減する。いくつかの実施形態では、免疫調節レジメンはまた、カプシド（例えば、AAV Anc80）または基礎となる構築物（例えば、導入遺伝子産物、例えば、抗VEGFタンパク質）のいずれかに対する免疫反応の可能性をさらに低減し得る。

【0711】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、本明細書に開示される組成物の投与に応答した体液性免疫（例えば、抗体応答）を評価することをさらに含む。いくつかの実施形態では、蝸牛内ROAを介して送達される場合の本明細書に開示される組成物の形質導入に対する、既存の免疫の効果（例えば血清NAbレベルによって測定される）が評価される。いくつかの実施形態では、既存のNAbレベルは、蝸牛内投与経路によって送達されるAAV粒子の形質導入を阻害しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、AAVカプシド及び／または導入遺伝子産物（例えば、分泌型タンパク質）の両方に対する潜在的な全身の体液性応答について血清を評価することをさらに含む。いくつかの実施形態では、全身の体液性応答の評価に対応して、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの両側蝸牛内投与のための治療間隔を定めることができる。

【0712】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される任意の方法は、例えば、局所投与経路 (ROA)、例えば、蝸牛内投与を介して送達されるrAAV粒子からのAAV粒子、カプシド、及び／または構築物（例えば、基礎となる導入遺伝子）産物のいずれかに対して、細胞傷害性T細胞応答をもたらさない。例えば、Luxturna（登録商標）のラベルには、臨床的に有意な細胞傷害性T細胞応答を有する対象がいなかったことが記載されており（Spark Therapeutics 2017、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、臨床開発プログラム中に単離された陽性インターフェロンガンマ (IFN- γ) ELISPOTアッセイの結果が得られたが（Bennett 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、臨床プログラムにおいて、臨床的な炎症反応は観察されず用量制限毒性が見られなかったことから、これらの単離結果の重要性は不明である。

【0713】

特定の実施形態では、本明細書に記載の任意の組成物または組成物の産物の薬物動態が測定され、収集される。特定の実施形態では、抗VEGFタンパク質が分泌され、先行技術では、高用量の全身性抗VEGFタンパク質を、高用量で経時的に全身に送達した場合（2～3週間ごとに5～15mg/kg）、高血圧、タンパク尿、肝酵素の上昇、動脈血栓塞栓事象、静脈血栓塞栓事象、出血、ならびに手術及び創傷治癒合併症を伴うと説明されている。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に開示

10

20

30

40

50

される組成物は局所的に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物の局所送達は、任意の1つ以上の有害なオフターゲット効果の可能性を低下させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物の局所送達は、いかなる有害なオフターゲット効果ももたらさない。本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、対象は、血清中の抗VEGFタンパク質（例えば、電気化学発光アッセイを使用して）、バイタルサイン、尿検査、及び／または臨床化学をモニターすることによってフォローアップされる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物を投与された対象のモニタリングは、早期の介入及び／または任意のオフターゲット効果の最小化を可能にする。

【0714】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物の投与後、抗VEGFタンパク質を測定するために血清を採取して分析することができる。いくつかの実施形態では、そのような測定は、組成物投与前（ベースライン）、投与後2週目、及び適切な期間（例えば、3ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年、4年、または5年超）毎月行われ得る。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質は、ビヒクルまたは本明細書に記載のrAAV-抗VEGF粒子の用量のいずれかを蝸牛内送達された個体において、ベースライン時または投与後の任意の時点で、個体の血清中に検出されない。

【0715】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、方法は、使用する抗VEGFタンパク質の存在について血清を採取及び／または評価することを含む（例えば、本明細書に記載の電気化学発光アッセイ）。

20

【0716】

製造方法

AAVシステムは、一般に当該技術分野で周知である（例えば、Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-17(1994); Cotten et al., *P.N.A.S.U.S.A.*, 89(13):6094-98(1992); Curriel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64(1994); Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129(1992); 及びAsokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4):699-708(2012)（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。AAV構築物を生成及び使用するための方法は、例えば、米国特許第5,139,941号、同第4,797,368号、及びPCT出願US2019/060328に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0717】

ウイルス構築物を得るための方法は、当該技術分野で知られている。例えば、AAV構築物を産生するために、この方法は典型的には、AAVカプシドタンパク質またはその断片をコードする核酸配列；機能的なrep遺伝子；AAV逆位末端反復（ITR）及びコード配列で構成される組換えAAV構築物；及び／または組換えAAV構築物のAAVカプシドタンパク質へのパッケージングを可能にするのに十分なヘルパー機能、を含む宿主細胞を培養することを含む。

40

【0718】

いくつかの実施形態では、AAVカプシド内にAAV構築物をパッケージングするために宿主細胞内で培養される構成要素は、トランスで宿主細胞に提供され得る。あるいは、任意の1つ以上の構成要素（例えば、組換えAAV構築物、rep配列、cap配列、及び／またはヘルパー機能）は、当業者に既知の方法を使用して、1つ以上のそのような構成要素を含むように操作された安定した宿主細胞によって提供され得る。いくつかの実施形態では、そのような安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下にあるそのような構成要素（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、そのような構成要素（複数可）は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。いくつかの実施形態では、選択された安

50

定な宿主細胞は、構成的プロモーターの制御下にある選択された構成要素（複数可）及び1つ以上の誘導性プロモーターの制御下にある他の選択された構成要素（複数可）を含み得る。例えば、HEK293細胞（構成的プロモーターの制御下でE1ヘルパー機能を含む）に由来するが、誘導性プロモーターの制御下でrep及び／またはcapタンパク質を含む安定な宿主細胞を生成することができる。他の安定な宿主細胞は、当業者によって常法を使用して生成され得る。

【0719】

本開示のAAVを産生するために必要な組換えAAV構築物、rep配列、cap配列、及びヘルパー機能は、任意の適切な遺伝子エレメント（例えば、構築物）を使用して、パッケージング宿主細胞に送達され得る。選択された遺伝子エレメントは、例えば、核酸操作の当該技術分野で、例えば当業者に知られている、遺伝子工学、組換え工学、及び合成技術を含む任意の好適な方法によって送達され得る（例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。同様に、AAV粒子を生成する方法は周知であり、任意の好適な方法を本開示で使うことができる（例えば、K. Fisher et al, J. Virol., 70:520-532（1993）及び米国特許第5,478,745号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

【0720】

いくつかの実施形態では、組換えAAVは、三重トランスフェクション法を用いて産生され得る（例えば、米国特許第6,001,650号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される）。いくつかの実施形態では、組換えAAVは、AAV粒子、AAVヘルパー機能構築物、及び補助機能構築物にパッケージングされる組換えAAV構築物（コード配列を含む）を宿主細胞にトランスフェクトすることによって産生される。AAVヘルパー機能構築物は、生産的なAAV複製及びカプシド封入のためにトランスで機能する「AAVヘルパー機能」配列（例えば、rep及びcap）をコードする。いくつかの実施形態では、AAVヘルパー機能構築物は、検出可能な野生型AAV粒子（例えば、機能的rep及びcap遺伝子を含むAAV粒子）を生成することなく効率的なAAV構築物産生を支援する。本開示での使用に好適な構築物の非限定的な例には、pHLP19（例えば、米国特許第6,001,650号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）及びpRep6cap6構築物（例えば、米国特許第6,156,303号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）が挙げられる。補助機能構築物は、AAVが複製を依存する非AAV由来ウイルス及び／または細胞機能（例えば、「補助機能」）のヌクレオチド配列をコードする。補助機能は、AAV遺伝子転写の活性化、ステージ特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の合成、及びAAVカプシドアセンブリに関与する部分を含むがこれらに限定されない、AAV複製に必要な機能が含まれ得る。ウイルスベースの補助機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外）、及びワクシニアウイルスなどの任意の既知のヘルパーウイルスに由来し得る。

【0721】

対象への送達に好適であるAAVウイルス構築物を生成及び単離するためのさらなる方法は、例えば、米国特許第7,790,449号；米国特許第7,282,199号；WO2003/042397；WO2005/033321、WO2006/110689；及び米国特許第7,588,772号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。あるシステムでは、産生細胞株に、ITRに隣接したコード配列をコードする構築物と、rep及びcapをコードする構築物（複数可）を一過性にトランスフェクトする。別のシステムでは、rep及びcapを安定して供給するパッケージング細胞株に、ITRに隣接したコード配列をコードする構築物を一過性にトランスフェクトする。これらのシステムのそれぞれで、AAV粒子はヘルパーアデノウイ

10

20

30

40

50

ルスまたはヘルペスウイルスの感染に応答して産生され、AAVは混入ウイルスから分離される。他のシステムでは、AAVを回収するためにヘルパーウイルスに感染する必要はなく、ヘルパー機能（例えば、アデノウイルスE1、E2a、VA、及びE4、またはヘルペスウイルスUL5、UL8、UL52、及びUL29、ならびにヘルペスウイルスポリメラーゼ）も、システムによりトランスで供給される。このようなシステムでは、ヘルパー機能をコードする構築物を細胞に一過性にトランスフェクションすることによってヘルパー機能を供給することができ、またはヘルパー機能をコードする遺伝子を安定的に含むように細胞を操作することができ、その発現は転写レベルもしくは転写後レベルで制御することができる。

【0722】

10

いくつかの実施形態では、精製後のウイルス構築物力価が測定される。いくつかの実施形態では、力価は、定量的PCRを使用して測定される。特定の実施形態では、構築物に特異的なTaqManプローブを利用して、構築物レベルを測定する。特定の実施形態では、TaqManプローブは、配列番号97によって表され、フォワード及びリバース増幅プライマーは、それぞれ配列番号98及び99によって例示される。

【0723】

構築物の定量化のための例示的なTaqManプローブ（配列番号97）

／56－FAM／TAATTCCAA／ZEN／CCAGCAGAGTCAAGGGC／3
IABkFQ／

【0724】

20

構築物の定量化のための例示的なフォワードqPCRプライマー（配列番号98）

GATACAGCTAGAGTCTCTGATTGC

【0725】

構築物の定量化のための例示的なリバースqPCRプライマー（配列番号99）

GATCTGCCAAGTACCTCACTATG

【0726】

本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、本開示のウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス（AAV）構築物である。AAV1、AAV2、AAV3（例えば、AAV3B）、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、及びAAV Anc80、ならびにそれらのバリエーションを含む、いくつかのAAV血清型が特性決定されている。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、AAV2／6、AAV2／8、AAV2／9、またはAAV2／Anc80粒子である（例えば、AAV6、AAV8、AAV9、またはAnc80カプシドを有し、AAV2 ITRを有する構築物を有する）。他のAAV粒子及び構築物は、例えば、Sharma et al., Brain Res Bull. 2010 Feb 15; 81(2-3): 273（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一般に、任意のAAV粒子を使用して、本明細書に記載のコード配列を送達することができる。しかしながら、血清型は異なる向性を有し、例えば、それらは異なる組織に優先的に感染する。いくつかの実施形態では、AAV構築物は自己相補型AAV構築物である。

30

【0727】

40

本開示は、とりわけ、AAVベースの構築物を作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、そのような方法は、宿主細胞の使用を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。宿主細胞は、AAVヘルパー構築物、AAVミニ遺伝子プラスミド、補助機能構築物、及び／または組換えAAVの産生に関連する他のトランスファーDNA、のレシピエントとして使用され得る。この用語には、トランスフェクトされた元の細胞の子孫が含まれる。したがって、本明細書で使用される「宿主細胞」は、外因性DNA配列がトランスフェクトされた細胞を指す場合がある。単一の親細胞の子孫は、自然、偶発的、または意図的な変異により、必ずしも元の親と、形態において、またはゲノム若しくは全DNAの相補性において、完全に同一であるとは限らないことが理解される。

50

【0728】

対象への送達に好適であるAAV粒子を生成及び単離するためのさらなる方法は、例えば、米国特許第7,790,449号；米国特許第7,282,199号；WO2003/042397；WO2005/033321、WO2006/110689；及び米国特許第7,588,772号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。あるシステムでは、産生細胞株に、ITRに隣接したコード配列をコードする構築物と、rep及びcapをコードする構築物（複数可）を一過性にトランスフェクトする。別のシステムでは、rep及びcapを安定して供給するパッケージング細胞株に、ITRに隣接したコード配列をコードする構築物を一過性にトランスフェクトする。これらのシステムのそれぞれで、AAV粒子はヘルパーアデノウイルスまたはヘルペスウイルスの感染に応答して生成され、AAV粒子は混入ウイルスから分離される。他のシステムでは、AAV粒子を回収するためにヘルパーウイルスに感染する必要はなく、ヘルパー機能（例えば、アデノウイルスE1、E2a、VA、及びE4、またはヘルペスウイルスUL5、UL8、UL52、及びUL29、ならびにヘルペスウイルスポリメラーゼ）も、システムによりトランスで供給される。このようなシステムでは、ヘルパー機能をコードする構築物を細胞に一過性にトランスフェクションすることによってヘルパー機能を供給することができ、またはヘルパー機能をコードする遺伝子を安定的に含むように細胞を操作することができ、その発現は転写レベルもしくは転写後レベルで制御することができる。

10

【0729】

さらに別のシステムでは、ITRに隣接したコード配列及びrep/cap遺伝子を、バキュロウイルスベクターの構築物による感染によって昆虫宿主細胞に導入する。このような産生システムは、当該技術分野で知られている（例えば、一般に、Zhang et al., 2009, Human Gene Therapy 20:922-929（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。これら及び他のAAV産生システムの作製及び使用法はまた、米国特許第5,139,941号、同第5,741,683号、同第6,057,152号、同第6,204,059号、同第6,268,213号、同第6,491,907号、同第6,660,514号、同第6,951,753号、同第7,094,604号、同第7,172,893号、同第7,201,898号、同第7,229,823号、及び同第7,439,065号（これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）にも記載されている。

20

30

【0730】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、分析試験のフォーカスしたセット及びより短い安定性試験プロトコルが、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGF、例えば、AAV-抗VEGF原薬（DS）に使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFのDS及び医薬品（DP）は非常に類似しており、例えば、DSからのDP製造を構成するのは、追加のろ過工程とバイアル化のみである。いくつかの実施形態では、DPは、より包括的な分析試験及びより長い安定性試験プロトコルを受ける。いくつかの実施形態では、DSは長期間保管されず、例えば、DSはDSからDP製造に迅速に移される。いくつかの実施形態では、DSは、充填／仕上げプロセス前に保管、例えば-65℃以下で保持される。

40

【0731】

本明細書に開示される任意の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFのDS及びDPの安定性は、例えば、外観、ベクターゲノム力価（ddPCR）、効力、及び／またはバイオバーデン（DS）または無菌性（DP）を含む生成物の安定性を示すアッセイを使用して評価される。いくつかの実施形態では、効力アッセイは、規格の確立を支持するのに十分なデータが生成されると規格を含む。いくつかの実施形態では、DS及びDPは、約6週間、2～8℃の安定状態に置かれる。いくつかの実施形態では、DSは、2～8℃で長期間保管されない。いくつかの実

50

施形態では、DPは、目標保管温度（－65℃以下）で60ヶ月間保管される。いくつかの実施形態では、DSは、約12ヶ月間、保管される（例えば安定状態に置かれる）。

【0732】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えばrAAV-抗VEGFの効力及び強度は、アッセイ、例えば本明細書に記載されるアッセイのマトリックスを用いて評価される。いくつかの実施形態では、アッセイは、複数の製品特性を評価することを含み、製品の機能的活性、一貫性、安定性を評価するため、及び／または何らかの変更が製造プロセスに導入された後に同等性の証拠を提供するために使用される。いくつかの実施形態では、ddPCR力価アッセイは、本明細書に開示される組成物を対象に投与する前に、適合性について適格性確認される。いくつかの実施形態では、抗VEGFタンパク質の発現は、哺乳動物細胞株において*in vitro*で評価される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現は、いくつかの感染多重度（MOI）にわたって評価され、参照標準と比較される。いくつかの実施形態では、機能的バイオアッセイは、例えば、抗VEGF活性を測定するための市販のキット及び公表された方法を含む、本明細書に開示される方法において使用される。いくつかの実施形態では、効力を評価する機能的バイオアッセイが使用され、例えば、発現された抗VEGFタンパク質の生物活性の高感度で定量的な尺度が使用される。

10

【0733】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される製造方法が利用される。いくつかの実施形態では、製造方法は、rAAV粒子の品質特性に影響を与えたり、または関連研究の解釈に影響を与えたりすることはないと予想される。

20

【0734】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、2つの構成要素、例えばAAV Anc80カプシド（Zinn 2015、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）と、AAV Anc80カプシドによってカプシド封入された、逆位末端反復（ITR）配列を除く3555個のヌクレオチドの一本鎖DNAゲノム（一例として図6のパネル（A）により表され、配列番号92により表される構築物）とを含む組換え粒子、例えば、rAAV-抗VEGFを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGF粒子は、例えば、VEGFを阻害するために臨床的に使用される48kDaのヒト化モノクローナルFab（全長マウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体A.4.6.1に由来）であるラニビズマブを発現する。

30

【実施例】

【0735】

本開示は、以下の実施例を参照することによりさらに詳述される。これらの実施例は、例示の目的で提供されるに過ぎず、別段の明記がない限り、限定することを意図するものではない。したがって、本開示は、決して以下の実施例に限定されるものとして解釈されるべきでなく、むしろ、本明細書に提供される教示の結果として明白となる、ありとあらゆる変形形態を包含するように解釈されるべきである。

【0736】

当業者であれば、前述の説明及び以下の実施例、ならびに当該技術分野で知られていることを使用して、本開示の技術を作製及び利用することができると考えられる。

40

【0737】

実施例1：ウイルス構築物の構築

この実施例では、本明細書に記載される抗VEGFタンパク質をコードする例示的なウイルス構築物の生成についての説明を提供する。当業者であれば、本実施例に従って同様の構築物を作製できることを容易に理解するであろう。例えば、哺乳動物、霊長類、またはヒト由来の抗VEGFタンパク質を、単一、二重、または多重構築物戦略の下で発現するrAAV構築物を生成することができる。AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、rh8、rh10、rh39、rh43、及びAnc80はそれぞれ、抗VEGFタンパク質構築物を封入し、rAAV粒子を形成するために調製され得る。とりわけ、

50

rAAV粒子は、Pryadkina et al., Meth. Clin. Devel. 2:15009, 2015 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) により概説される (i) コンカテマー化ートランスプライシング戦略、(ii) ハイブリッドイントロンー相同組換えートランスプライシング戦略、(iii) エクソン相同組換え戦略、及び/または (iv) 単一構築物戦略を試験するために利用され得る。

【0738】

実施例 1. 1: rAAV-ラニビズマブ、rAAV-ラニビズマブ-PC、及び rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物の構築

この実施例では、本明細書に記載される、rAAV-ラニビズマブ、rAAV-ラニビズマブ-GFP、及び rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物の生成についての説明を提供する。第1の組換え生成構築物は、配列番号90に記載の配列を有した。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ラニビズマブ-PC 構築物」と呼ばれる。rAAV-ラニビズマブ-PC 構築物は、図6のパネル(A)に示される概略図によって表される rAAV-V_H/V_L 構築物の例示的な実施形態であり、ラニビズマブをコードする配列を含む。第2の組換え生成構築物は、配列番号91に記載の配列を有した。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ラニビズマブ構築物」と呼ばれる。rAAV-ラニビズマブ構築物は、図6のパネル(A)に示される概略図によって表される rAAV-V_H/V_L 構築物の例示的な実施形態であり、ラニビズマブをコードする配列を含む。第3の組換え生成構築物は、配列番号106に記載の配列を有した。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ラニビズマブ-GFP 構築物」と呼ばれる。rAAV-ラニビズマブ-GFP 構築物は、図6のパネル(B)に示される概略図によって表される rAAV-ABGFP 構築物の例示的な実施形態であり、ラニビズマブをコードする配列を含む。第4の組換え生成構築物は、配列番号93に記載の配列を有した。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物」と呼ばれる。rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物は、図6のパネル(C)に示される概略図によって表される rAAV-AB 構築物の例示的な実施形態であり、抗VEGFタンパク質ベバシズマブをコードする配列を含む。

【0739】

上記の特定の構築物、AAV Rep及びCap遺伝子を有するトランスプラスミド、ならびにアデノウイルスゲノム由来の必須領域を有するヘルパープラスミドを、HEK293細胞中で共トランスフェクトした。次いで、AAVAnc80カプシドを上記の rAAV 構築物と共に生成し、rAAVAnc80-ラニビズマブ、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC、及び rAAVAnc80-ベバシズマブ-PC 粒子のいずれかを形成した。

【0740】

実施例 1. 2: rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、及び rAAV-アフリベルセプト構築物の構築

この実施例では、本明細書に記載される、rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、及び rAAV-アフリベルセプト構築物の生成についての説明を提供する。1つの構築物は、配列番号94に記載の配列を有する。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ベバシズマブ構築物」と呼ばれる。rAAV-ベバシズマブ構築物は、図6のパネル(C)に示される概略図によって表される rAAV-AB 構築物の例示的な実施形態であり、抗VEGFタンパク質ベバシズマブをコードする配列を含む。別の構築物は、配列番号107に記載の配列を有する。この構築物は、実施例を通して「rAAV-ベバシズマブ-GFP 構築物」と呼ばれる。rAAV-ベバシズマブ-GFP 構築物は、図6のパネル(B)に示される概略図によって表される rAAV-ABGFP 構築物の例示的な実施形態であり、抗VEGFタンパク質ベバシズマブをコードする配列を含む。別の構築物は、配列番号95に記載の配列を有する。この構築物は、実施例を通して「rAAV-アフリベルセプト-PC 構築物」と呼ばれる。rAAV-アフリベルセプト-PC 構築物は、図6のパネル(D)に示される概略図によって表される rAAV-TRAP 構築物の例示的な実施形態であり、抗VEGFタンパ

ク質アフリベルセプトをコードする配列を含む。別の構築物は、配列番号 96 に記載の配列を有する。この構築物は、実施例を通して「rAAV-アフリベルセプト構築物」と呼ばれる。rAAV-アフリベルセプト構築物は、図 6 のパネル (D) に示される概略図によって表される rAAV-TRAP 構築物の例示的な実施形態であり、抗 VEGF タンパク質アフリベルセプトをコードする配列を含む。rAAV 粒子は、Xiao et al., J. Virol. 73 (5) : 3994-4003, 1999 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されるアデノウイルスフリーの方法によるトランスフェクションによって生成される。上記の個々の rAAV-ベバシズマブ-PC、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、または rAAV-アフリベルセプト構築物、AAV Rep 及び Cap 遺伝子を有するトランスプラスミド、ならびにアデノウイルスゲノム由来の必須領域を有するヘルパープラスミドを、HEK293 細胞中で共トランスフェクトした。次いで、AAV Anc80 カプシドを上記の rAAV 構築物と共に生成し、rAAV Anc80-ベバシズマブ、rAAV Anc80-ベバシズマブ-PC、rAAV-Anc80-ラニビズマブ-GFP、rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC、及び rAAV Anc80-アフリベルセプト粒子のいずれかを形成した。

10

【0741】

実施例 2 : ウイルス粒子の精製

この実施例では、本明細書に記載される抗 VEGF タンパク質をコードする構築物を精製するために使用できる方法についての説明を提供する。

20

【0742】

実施例 2.1 : rAAV Anc80-ラニビズマブ、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC、及び rAAV Anc80-ベバシズマブ-PC 粒子の精製

この実施例は、抗 VEGF タンパク質をコードする rAAV 粒子、例えば実施例 1 で形成されたもの、を精製するために使用できる方法についての説明を提供する。実施例 1.1 で産生された rAAV Anc80-ラニビズマブ、rAAV Anc80-ラニビズマブ、及び rAAV Anc80-ベバシズマブ-PC 粒子を、Pryadkina et al., Mol. Ther. 2 : 15009, 2015 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載のように、2 回の連続的な塩化セシウム (CsCl) 密度勾配によってそれぞれ独立して精製した。2 回目の CsCl 密度勾配遠心分離工程の後、CsCl 密度勾配管から 11 個の 500 µL 画分を回収し、1 × PBS 中での透析により精製した。画分をドットプロットによって分析して、rAAV ゲノムを含有する粒子を判定した。各調製物のウイルスゲノム数 (vg) を、AAV 構築物ゲノムの ITR 領域に対応するプライマー及びプローブを用いて、定量的リアルタイム PCR ベースの力価測定法によって測定した (例えば、Bartoli et al., Gene Ther. 13 : 20-28, 2006 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照のこと)。

30

【0743】

実施例 2.2 : rAAV Anc80-ラニビズマブ-GFP、rAAV Anc80-ベバシズマブ、rAAV Anc80-ベバシズマブ-GFP、rAAV Anc80-アフリベルセプト、及び rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC 粒子の精製

40

この実施例は、抗 VEGF タンパク質をコードする rAAV 粒子、例えば実施例 1 で形成されたもの、を精製するために使用できる方法についての説明を提供する。実施例 1.1 で産生された rAAV Anc80-ラニビズマブ粒子、ならびに実施例 1.2 で産生された rAAV Anc80-ベバシズマブ、rAAV Anc80-ベバシズマブ-GFP、rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC、及び rAAV Anc80-アフリベルセプト粒子を、Pryadkina et al., Mol. Ther. 2 : 15009, 2015 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載のように、2 回の連続的な塩化セシウム (CsCl) 密度勾配によってそれぞれ独立して精製した。2 回目の CsCl 密度勾配遠心分離工程の後、CsCl 密度勾配管から 11 個の 500 µL 画分を回収し、1 × PBS 中での透析により精製した。画分をドットプロットによって分析して、

50

rAAVゲノムを含有する画分を判定した。各調製物のウイルスゲノム数 (vg) を、AAV構築物ゲノムのITR領域に対応するプライマー及びプローブを用いて、定量的リアルタイムPCRベースの力価測定法によって測定した (例えば、Bartoli et al. Gene Ther. 13:20-28, 2006 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)) を参照のこと)。

【0744】

実施例2.3: rAAVAnc80粒子の精製

この実施例はまた、抗VEGFタンパク質をコードするrAAV粒子、例えば実施例1で形成されたものを精製するために使用できるさらなる方法の説明を提供する。rAAV-抗VEGF粒子を、トランスフェクションの72時間後に以下の方法で精製した。10%のTritonを溶液に添加し (最終濃度2%)、細胞培養物をセルシェーカー上で37℃で1時間インキュベートした。続いて、100U/mLのベンゾナーゼ及び2uMのMgCl₂を添加し、細胞をセルシェーカー上で37℃で2時間インキュベートした。次に、NaCl (150uM)を添加し、細胞をセルシェーカー上で37℃で20分間インキュベートした。試料を2000×gで10分間遠心分離した。上清を清潔な容器に移し、-80℃で保管するか、または直ちにタンジェンシャルフローろ過 (TFF) にかけた。ろ過された上清を、次にAVBカラムに充填し、AVBカラムクロマトグラフィー及びrAAVろ過に供した。ろ過された溶出液を、次にCsCl密度勾配遠心分離 (RI=1.3905-1.3915, スピン速度=65,000RPM, 15℃で16h以上) にかけた。次に、精製された全粒子試料を最終ラウンドのTFFにかけ、製剤を後の使用のためにバイアルに入れた。

【0745】

実施例3: rAAVAnc80-抗VEGF粒子の製剤化

この実施例は、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質をコードする構築物を含むウイルス粒子を含む組成物の調製に関する。

【0746】

本実施例3.1: rAAVAnc80-ラニビズマブ、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC、及びrAAVAnc80-ベバシズマブ-PC粒子の製剤化

本明細書に記載の抗VEGFタンパク質をそれぞれコードする構築物rAAV-ラニビズマブ、rAAV-ラニビズマブ-PC、またはrAAV-ベバシズマブ-PCを含むrAAVAnc80粒子を、定量デジタル液滴 (dd) PCRで測定された適切な力価 (例えば、およそ 1.39×10^3 vg/mL) まで、上記の実施例に記載のように、産生及び精製した。次に、精製粒子を生理学的に許容される溶液に既知の希釈度 (例えば、 6×10^4 、 1.3×10^5 、 1.8×10^5 、 4.5×10^9 、及び 1.3×10^{10} vg/mL) で準備した。使用された生理学的に許容される溶液は、以下の最終濃度になるように調製されたポロキサマー188を含む市販の1×PBSを含んだ: 8.10mMのリン酸二ナトリウム、1.5mMのリン酸一カリウム、2.7mMの塩化カリウム、172mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188 (体積/体積%)。rAAVAnc80-ラニビズマブ粒子、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC粒子、またはrAAVAnc80-ベバシズマブ-PC粒子の力価定量を、フォワードプライマー配列: CCGATTTCGGCCTATTGGTTA (配列番号100)、リバースプライマー配列CTGTGGAGAGAAAGGCAGAGT (配列番号101)、及び適切な蛍光体 (FAM) を有するプローブ配列GGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC (配列番号102) を用いて行った。

【0747】

実施例3.2: rAAVAnc80-ラニビズマブ、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC、及びrAAVAnc80-ベバシズマブ-PC粒子の製剤化

本明細書に記載の抗VEGFタンパク質をそれぞれコードする構築物rAAV-ラニビズマブ-GFP、rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト、またはrAAV-アフリベルセプト-PCを含むrAAVAnc8

0 粒子を、定量デジタル液滴 (dd) PCRで測定された適切な力価 (例えば、およそ 1.39×10^3 vg/mL) まで、上記の実施例に記載のように、産生及び精製した。次に、精製粒子を生理学的に許容される溶液に既知の希釈度 (例えば、 6×10^4 、 1.3×10^5 、 1.8×10^5 、 4.5×10^9 、及び 1.3×10^{10} vg/mL) で準備した。生理学的に許容される溶液は、ポロキサマー188を含む市販の $1 \times \text{PBS}$ を含むことができ、以下の最終濃度になるように調製することができる： 8.10 mM のリン酸二ナトリウム、 1.5 mM のリン酸一カリウム、 2.7 mM の塩化カリウム、 172 mM の塩化ナトリウム、及び 0.001% のポロキサマー188 (体積/体積%)。rAAV Anc80-ラニビズマブ-GFP 粒子、rAAV Anc80-ベバシズマブ粒子、rAAV Anc80-ベバシズマブ-GFP 粒子、rAAV Anc80-アフリベルセプト粒子、または rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC 粒子の力価定量を、フォワードプライマー配列：CCGATTTTCGGCCTATTGGTTA (配列番号100)、リバースプライマー配列CTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGT (配列番号101)、及び適切な蛍光体 (例えば、FAM) を有するプローブ配列GGCACCTATTGGTCTTACTGACATCC (配列番号102) を用いて行った。

10

20

30

40

50

【0748】

実施例4：デバイスの説明

この実施例は、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質をコードする構築物を含む rAAV 粒子を含む rAAV 粒子の内耳への送達に適したデバイスに関する。正円窓膜を一貫して安全に穿通するように設計された特殊なマイクロカテーテルを使用して、本明細書で提供される組成物を対象の蝸牛に送達することができる (例えば、図4に示すように)。マイクロカテーテルは、送達処置を実施する外科医が、外耳道を介して中耳腔に進入させ、マイクロカテーテルの末端を正円窓膜に接触させることができるような形状となっている。マイクロカテーテルの遠位端は、約 10 ミクロン ~ 約 1000 ミクロン の直径を有する少なくとも1つのマイクロニードルを含むことができ、これにより、本明細書に記載の構築物を含む rAAV 粒子 (例えば、抗VEGFタンパク質のコード配列を含む) が内耳を損傷しない速度 (例えば、生理学的に許容される速度、例えば、およそ $30 \mu\text{L}/\text{分}$ ~ およそ $90 \mu\text{L}/\text{分}$ の速度) で鼓室階の蝸牛外リンパに進入するのに十分であるが、外科的修復を行わずに治療できるほど小さい穿孔が正円窓膜に作出される。マイクロニードル (複数可) に近位のマイクロカテーテルの残りの部分には、所定の力価 (例えば、およそ 1×10^{12} ~ 5×10^{13} vg/mL) の rAAV/人工外リンパ製剤を充填した。マイクロカテーテルの近位端は、およそ $30 \mu\text{L}$ ~ およそ $100 \mu\text{L}$ の正確で少量の注入を可能にするマイクロマニピュレーターに接続される。

【0749】

実施例5：細胞株から産生された抗VEGFタンパク質の発現及び分泌

この実施例は、例示的な構築物の形質導入及び/またはトランスフェクション、ならびに本明細書に記載の例示的なタンパク質の発現及び分泌に関する。

【0750】

実施例5.1：rAAV-ラニビズマブ-PC、rAAV-ラニビズマブ-GFP、及び rAAV-ベバシズマブ-PC 構築物からのタンパク質の発現及び分泌

細胞株 (例えば、HEK293FT) は、本明細書に記載される、例示的な rAAV-抗VEGF 構築物によりトランスフェクトするか、または例示的な rAAV Anc80-抗VEGF 粒子により形質導入した。トランスフェクション事象のために、HEK293FT細胞を、培養容量 $400 \mu\text{L}$ を有する24ウェルプレートフォーマットにおいて 7×10^4 細胞/ウェルで一晩播種した。およそ 800 ng の抗VEGF構築物 rAAV-ラニビズマブ-PC、rAAV-ベバシズマブ-PC、または rAAV-ラニビズマブ-GFP (実施例1に記載) を、jetprime トランスフェクション試薬 (Polyplus-transfection (登録商標) SA) を使用して細胞にトランスフェクトした。形質導入事象のために、HEK293FT細胞を、培養容量 $50 \mu\text{L}$ を有する96ウェルプレートフォーマットにおいて 4×10^4 細胞/ウェルで、 $2 \mu\text{M}$ のエトポシド (

Fisher Scientific 34120525MG)の存在下で6時間播種し、例示的なrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子(実施例1に記載)を、それぞれ 7.5×10^4 、 2.2×10^5 、及び 5.5×10^5 のMOIで培地に添加した。トランスフェクトまたは形質導入された細胞の場合、各試料の処理後72時間で上清を回収した。タンパク質発現分析のために、30 μ Lの試料を4~12%のBis-Trisタンパク質ゲルの個々のウェルにロードし、当該技術分野で知られている標準的なウェスタンブロッティング手順を実施した。バンディングパターンを、一次検出プローブとして試験抗ラニビズマブ抗体(Fabエピトープを標的とする; Abcam、ab168684-25UGから供給)を、二次検出プローブとして抗ヒトIgGを用いて、蛍光リーダーを使用して測定した(図7参照)。

10

【0751】

実施例5.2:rAAV-ラニビズマブ、及びrAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト、及びrAAV-アフリベルセプト-PC構築物からのタンパク質の発現及び分泌

細胞株(例えば、HEK239FT)は、本明細書に記載される、例示的な抗VEGF構築物によりトランスフェクトするか、または例示的なrAAV Anc80-抗VEGF粒子により形質導入した。トランスフェクション事象のために、HEK293FT細胞を、培養容量400 μ Lを有する24ウェルプレートフォーマットにおいて、およそ 7×10^4 細胞/ウェルで一晩播種した。およそ800ngのrAAV-ラニビズマブ、rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、またはrAAV-アフリベルセプト構築物(例えば、実施例1に記載)を、jetprimeトランスフェクション試薬(Polyplus-transfection(登録商標)SA)を使用して細胞にトランスフェクトした。形質導入事象のために、HEK293FT細胞を、培養容量50 μ Lを有する96ウェルプレートフォーマットにおいて 4×10^4 細胞/ウェルで、2 μ Mのエトポシド(Fisher Scientific 34120525MG)の存在下で6時間播種した。rAAV Anc80-ラニビズマブ、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC、rAAV Anc80-ラニビズマブ-GFP、rAAV Anc80-ベバシズマブ、rAAV Anc80-ベバシズマブ-GFP、rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC、またはrAAV Anc80-アフリベルセプト(例えば、実施例1に記載)を、 7.5×10^4 、 2.2×10^5 、及び/または 5.5×10^5 のMOIで細胞培地に添加した。トランスフェクトまたは形質導入された細胞の場合、各試料の処理後およそ72時間で上清を回収した。タンパク質発現分析のために、30 μ Lの試料を4~12%のBis-Trisタンパク質ゲルの個々のウェルにロードし、当該技術分野で知られている標準的なウェスタンブロッティング手順を実施した。バンディングパターンを、一次検出プローブとして試験抗ラニビズマブ(Fabエピトープを標的とする; Abcam、ab168684-25UGから供給)及び試験抗アフリベルセプト抗体を、二次検出プローブとして抗ヒトIgGを用いて、蛍光リーダーを使用して測定した。

20

30

【0752】

実施例6:細胞株から産生された抗VEGFタンパク質の結合活性

40

この実施例は、上記の実施例5に記載のように産生された例示的な抗VEGFタンパク質の結合活性を測定する方法を記載する。

【0753】

実施例6.1:抗VEGFタンパク質ラニビズマブ及びベバシズマブの結合活性

上記の実施例5に記載のトランスフェクションにより産生された例示的な抗VEGFタンパク質ラニビズマブまたはベバシズマブの結合活性を、Octet(登録商標)HTXバイオセンサー装置を使用して分析した。第1セットの対照実験を、プラズモン表面共鳴装置を較正するために、例えば、結合剤として組換えヒトVEGFを用いて対照細胞馴化培地に添加したマウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体(抗hVEGF MmAb; R&D Systems、MAB293-100)を用いて行った(図8のパネル(A))

50

。第2セットの実験を、実施例1に記載の例示的な構築物 rAAV-ラニビズマブ-PC、または rAAV-ベバシズマブ-PC のトランスフェクション後の HEK293TF 細胞からの馴化培地、または対照の非トランスフェクション細胞馴化培地に含まれる粒子の VEGF 結合活性を測定するために行った。試験材料のグラフ結果を図8のパネル(B) またはパネル(C)に示し、対照培地は図8のパネル(D)に示される。

【0754】

試験試料は、実施例1に記載される、構築物 rAAV-ラニビズマブ-PC、または rAAV-ベバシズマブ-PC をトランスフェクトした HEK293TF 細胞から分泌され、培地中に存在する可溶性ラニビズマブ及びベバシズマブを含んだ。試料は、細胞馴化培地を1×キネティクス緩衝液 (Fortebio、18-1105) で1:10に希釈し、384ウェル試料プレートに分注することにより調製した。陽性対照として、抗 hVEGF MmAb (R&D Systems, MAB293-100) を $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で希釈した。捕捉剤である組換えヒト VEGF (R&D Systems, 293-VE-010) を 200nM ~ 3.125nM まで連続した1:2の希釈比で希釈した。

【0755】

馴化培地試料及びマウス抗ヒト VEGF 抗体 (R&D Systems) 試料の結合親和性は、Octet (登録商標) HTX バイオセンサー装置において1×キネティクス緩衝液で測定した。結合の特徴及び値は Octet (登録商標) 解析ソフトウェア、Data Analysis HT10.0 により作成した。収集されたデータは表2に表され、それぞれの KD、平衡会合定数 (k_a)、及び解離 (k_{dis}) が記載されている。

【0756】

抗 hVEGF マウス抗体 (R&D Systems) は高い結合親和性を示した。同様に、ラニビズマブまたはベバシズマブをコードする rAAV 構築物は、ヒト VEGF に対して高い結合親和性を示した。対照馴化培地試料の結合データからは、KD 値を推定することはできなかった。とめると、これらのデータは、本明細書で提供される構築物が、抗 VEGF タンパク質ラニビズマブまたはベバシズマブの発現及び分泌をもたらし得ること、ならびに本明細書で提供される構築物が、哺乳動物の内耳において抗 VEGF タンパク質を発現するために使用され得ることを示す。

【0757】

【表4】

表2：組換え抗 VEGF タンパク質の結合キネティクス

試料 ID	KD(M)*	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_{dis}(1/\text{s})$	Full R^2
ベバシズマブ	3.30E-10	8.49E+04	2.80E-05	0.9998
ラニビズマブ	1.68E-10	2.45E+05	4.11E-05	0.9991
MmAb-R&D	2.29E-10	3.40E+05	7.77E-05	0.9993

【0758】

分泌されたラニビズマブはビオチン化組換えヒト VEGF (Acro Biosystems, VE5-H8210) と 168pM の KD で結合することができ、分泌されたベバシズマブは 330pM の KD で結合することができた (陽性対照マウス抗ヒト VEGF 組換え抗体 [R&D Systems, MAB293-100] の場合 $KD = 229\text{pM}$)。ラニビズマブ及びベバシズマブの VEGF-A165 に対する結合親和性が、それぞれ 20.6 及び 35.1pM であったことと比較して (Papadopoulos 2012、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、これらのデータは、抗 VEGF タンパク質コード配列を含むプラスミド形態の rAAV 構築物が、許容できる結合親和性でタンパク質を *in vitro* で産生できることを示唆している。

【0759】

実施例6.2：抗VEGFタンパク質ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びアフリベルセプトの結合活性

本明細書に記載された例示的な抗VEGF結合剤の結合活性を、Octet（登録商標）HTXバイオセンサー装置を使用して分析した。抗VEGFタンパク質は、実施例1に記載された、例示的な構築物rAAV-ラニビズマブ、rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ラニビズマブ-GFP、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、もしくはrAAV-アフリベルセプトのトランスフェクション、またはAAV Anc80カプシド内に含まれ、rAAV粒子、例えば、rAAV Anc80-ラニビズマブ粒子、rAAV Anc80-ベバシズマブ粒子、rAAV Anc80-ラニビズマブ-GFP粒子、rAAV Anc80-ベバシズマブ-GFP粒子、rAAV Anc80-アフリベルセプト-PC粒子、もしくはrAAV Anc80-アフリベルセプト粒子を形成する同じ構築物の形質導入後に、細胞株（例えば、HEK293FT細胞）で産生される。第1セットの対照実験を、プラズモン表面共鳴装置を校正するために、例えば、結合剤として組換えヒトVEGFを用いた対照馴化培地中のマウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体（抗hVEGF MmAb；R&D Systems、MAB293-100）を用いて行った。第2セットの実験を、本明細書に記載の例示的な構築物またはrAAV粒子のトランスフェクションまたは形質導入後のHEK293TF細胞からの馴化培地、または対照馴化培地のヒトVEGF結合活性を測定するために行った。グラフの結果は、トランスジェニック抗VEGFタンパク質の例示的な結合活性を表す。

10

20

【0760】

試験試料は、本明細書に記載（例えば、実施例1に記載）の構築物により形質導入またはトランスフェクトされたHEK293TF細胞から分泌され、培地中に存在する可溶性ラニビズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプトを含む。試料は、細胞馴化培地を1×キネティクス緩衝液（Fortebio、18-1105）で1：10に希釈し、384ウェル試料プレートに分注することにより調製した。陽性対照として、抗hVEGF MmAb（R&D Systems、MAB293-100）を10µg/mLの濃度で希釈した。捕捉剤である組換えヒトVEGF（R&D Systems、293-VE-010）を200nM～3.125nMまで連続した1：2の希釈比で希釈した。

30

【0761】

馴化培地試料及びマウス抗ヒトVEGF抗体（R&D Systems）試料の結合親和性は、Octet（登録商標）HTXバイオセンサー装置において1×キネティクス緩衝液で測定した。結合の特徴及び値はOctet（登録商標）解析ソフトウェア、Data Analysis HT10.0により作成した。収集されたデータを、KD、平衡会合定数（ k_a ）、及び解離速度（ k_{dis} ）として表した。

【0762】

実施例7：抗VEGFタンパク質産生のex vivo実証

この実施例は、in vitroまたはex vivoで増殖した哺乳動物の蝸牛外植片での抗VEGFタンパク質を発現するrAAV構築物の導入及び発現解析に関するものである。蝸牛外植片の培養モデルは、in vivoで見られる固有の細胞環境内でのrAAV粒子の形質導入及び発現を試験するために、蝸牛の感覚有毛細胞及び非感覚支持細胞の形態及び分子特性を模倣する信頼できる実験システムを提供できる。

40

【0763】

実施例7.1：抗VEGFタンパク質ラニビズマブ及びベバシズマブのex vivo産生

本明細書では、rAAV-ラニビズマブ-PCまたはrAAV-ベバシズマブ-PC（実施例1に記載）によって例示される構築物rAAV- V_H/V_L またはrAAV-ABを含むrAAV（例えば、rAAV Anc80）粒子によって形質導入された新生児（P2）野生型（WT）マウスの蝸牛外植片からの抗VEGFタンパク質発現及び分泌のex

50

v i v o 評価について記載する。これらの実験では、コルチ器を切開し、カバーガラスに載せ、ビヒクルまたは様々な用量の *r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ－*P C* 粒子もしくは *r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ－*P C* 粒子のいずれかと共に 3～4 日間インキュベートした。*r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ－*P C* 粒子を 1.2×10^6 、 2.4×10^6 、及び 3.5×10^6 *vg*／外植片で形質導入し、*r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ－*P C* 粒子を 1.4×10^6 、 2.8×10^6 、及び 4.2×10^6 *vg*／外植片で形質導入した。

【0764】

外植片を取り囲む培地を採取し、従来の *E L I S A* 分析よりも高感度かつ広いダイナミックレンジで分析物を定量するための電気化学発光検出技術を採用したプラットフォームである *M S D* イムノアッセイを使用して分析した。試料とインキュベートする前に、ストレプトアビジンでコートされた *M S D* アッセイプレートブロッキングし、ビオチン化 *V E G F* リガンドでコートした。次いで、アッセイプレートに結合した抗 *V E G F* タンパク質を、タグ付きヤギポリクローナル抗 κ 軽鎖 (*p A b*) 抗体で検出した (図 16 のパネル (B))。 *G A P D H* (ハウスキーピング対照) 及び抗 *V E G F* タンパク質をコードするヌクレオチド (ベバシズマブまたはラニビズマブをコードする *m R N A* 産物) についての *T a q m a n* プライマープローブを用いた定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (*q R T - P C R*) を使用したリボ核酸 (*R N A*) 発現分析のために外植片を溶解した (図 16 のパネル (A))。

【0765】

抗 *V E G F* *R N A* は、*r A A V A n c 8 0*－抗 *V E G F* 粒子を与えられた外植片で検出されたが、ビヒクルを与えられた外植片では検出されず (図 16 のパネル (A))、分泌型抗 *V E G F* タンパク質は、*r A A V A n c 8 0*－抗 *V E G F* 粒子を与えられた外植片の培地で検出されたが、ビヒクルを与えられた外植片の培地では検出されなかった (図 16 のパネル (B))。これらのデータは、抗 *V E G F* タンパク質をコードする構築物を含む *r A A V A n c 8 0*－抗 *V E G F* 粒子を *W T* マウス蝸牛に *ex v i v o* で投与すると、形質導入された細胞から標的タンパク質の発現及び分泌が得られることを示唆している。蝸牛外植片の結果は、少なくとも *in v i v o* での耐性を判定し、抗 *V E G F* タンパク質の *in v i v o* 分泌レベルを評価するための、*W T* マウスに *r A A V A n c 8 0*－抗 *V E G F* 粒子を蝸牛内注入する *in v i v o* 試験を支持する。

【0766】

実施例 7. 2：抗 *V E G F* タンパク質ラニビズマブ、ベバシズマブ、及びアフリベルセプトの *ex v i v o* 産生

モック *r A A V* 粒子または *r A A V* 粒子 *r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ、*r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ－*G F P*、*r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ、*r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ－*G F P*、*r A A V A n c 8 0*－アフリベルセプト－*P C*、または *r A A V A n c 8 0*－アフリベルセプト (例えば、実施例 1 に記載) を調製し、新生児 (*P 2*) 野生型 (*W T*) マウスの蝸牛外植片に、好適な *M O I* (例えば、 1.2×10^6 、 1.4×10^6 、 2.4×10^6 、 2.8×10^6 、 3.5×10^6 、及び／または 4.2×10^6 *vg*／外植片など) で形質導入した。これらの実験では、コルチ器を切開し、カバーガラスに載せ、ビヒクルまたは様々な用量の *r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ粒子、*r A A V A n c 8 0*－ラニビズマブ－*G F P* 粒子、*r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ粒子、*r A A V A n c 8 0*－ベバシズマブ－*G F P* 粒子、*r A A V A n c 8 0*－アフリベルセプト－*P C* 粒子、または *r A A V A n c 8 0*－アフリベルセプト粒子 (実施例 1 に記載される) のいずれかと共に 3～4 日間インキュベートした。外植片を取り囲む培地を採取し、*M S D* イムノアッセイを使用して分析した。試料とインキュベートする前に、ストレプトアビジンでコートされた *M S D* アッセイプレートブロッキングし、ビオチン化 *V E G F* リガンドでコートした。次いで、アッセイプレートに結合した抗 *V E G F* タンパク質 (例えば、ラニビズマブ、ベバシズマブ、及び／またはアフリベルセプト) を、タグ付きヤギポリクローナル抗 κ 軽鎖 (*p A b*) 抗体で検出した。

【0767】

任意選択で、野生型外植片に形質導入された (ex vivo) rAAV-抗VEGF構築物からのmRNA発現レベルを測定するための実験が行われる。モックrAAV粒子、またはAnc80カプシドによってカプシド封入されたrAAV構築物を含むrAAV粒子 (例えば、実施例1に記載のもの) を調製し、好適なMOI (例えば、上記のもの、及び／またはおよそ 4.5×10^9 vg / 蝸牛または 1.5×10^{10} vg / 蝸牛のMOI) で外植片に形質導入した。上清を回収し、350 μ LのRLT Plus RNA溶解緩衝液 (Qiagen) を用いて形質導入後72時間で細胞を採取し、RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いてRNA試料を調製した。相対的mRNA発現レベルを、抗VEGFタンパク質をコードするヌクレオチド特異的増幅プライマー (例えば、ベバシズマブ、ラニビズマブ、及び／またはアフリベルセプトをコードするヌクレオチドに特異的なプライマー) 及びTaqManプローブを用いた定量リアルタイムPCRを使用して測定し、適切な対照 (例えば、対照としてのマウスGAPDHプローブ (Life Technologies)) と比較した。強力かつ用量依存的な抗VEGFタンパク質をコードするmRNAの産生が観察された。可溶性及び分泌型抗VEGFタンパク質レベルを、上記のように測定した。

10

【0768】

実施例8：モデル動物における外科的方法及びrAAV粒子分析

本実施例は、老齢マウスの内耳への本明細書に記載の技術 (例えば、構築物、粒子、及び／または組成物) の導入に関する。抗VEGFタンパク質をコードする構築物を含むrAAV粒子を、製剤緩衝液 (例えば、人工外リンパ、またはボロキサマー188を含む1xPBS) 中で調製し、次いで、Shuet al. (Human Gene Therapy, doi:10.1089/hum.2016.053, June 2016、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) によって記載されるようにマウスの鼓室階に投与した。P15より老齢の雄及び雌のマウスに、キシラジン (およそ5~10mg/kg) 及びケタミン (およそ90~120mg/kg) の腹腔内注射を使用して麻酔をかけた。電気温熱パッドを用いて体温を37℃に維持した。右耳介後部から切開し、鼓室胞及び後半規管を露出させた。該鼓室胞を外科用針で穿孔し、小さい穴を広げて、蝸牛へアクセスできるようにした。鼓室階の蝸牛側壁の骨を、膜性側壁を無傷なままで残すように、歯科用ドリルで薄くした。次に、後半規管にドリルで小さな穴をあけた。カナロストミーの開存性を、ゆっくりとした外リンパの漏れを明視化することで確認した。ガラス製マイクロピペットと組み合わせたナノリットルマイクロインジェクションシステムを使用して、構築物含有緩衝液 (例えば、人工外リンパ、またはボロキサマー188を含む1xPBS中の蝸牛あたりおよそ 4.5×10^9 ~ 5×10^{10} vg の本明細書に記載のrAAV構築物) を合計およそ1 μ L、2 nL / 秒の速度で鼓室階に送達させた。ガラス製マイクロピペットは、注入後5分間留置した。蝸牛開窓術及び注入後、鼓室胞及び後半規管の開口部を脂肪の小片で封止し、筋肉及び皮膚を縫合した。マウスを麻酔から覚醒させ、マウスの疼痛を0.15mg/kgのブプレノルフィン塩酸塩で3日間管理した。

20

30

【0769】

本実施例に記載されているような試験は、片側性の進行性 (例えば、散発性) VSを有する成人参加者におけるファースト・イン・ヒューマン安全性及び用量漸増試験の準備のために実施される。rAAVの蝸牛内送達 (例えば、AAVAnc80、例えば、AAVAnc80-抗VEGF) を使用して、内耳の蝸牛細胞及び前庭細胞を形質導入することができ、それらは、その後、抗VEGFタンパク質を外リンパに、または蝸牛神経の間質液に直接分泌すると予想される。内耳道に沿った拡散に対する障壁がないことにより、蝸牛神経は、その外側端 (VS腫瘍の大部分が発生する蝸牛に最も近い部分 (図1及び図3)) に外リンパ、その内側端にCSFを有する流体の連続体に浸されており、したがって、外リンパから神経間質への拡散は、外リンパで発現した治療用抗VEGFタンパク質が、意図するVS標的に到達するための経路を提供する。

40

【0770】

50

マウスでは、外科的アプローチ、例えば、Yoshimura et al., 2018に記載されている外科的アプローチを、本明細書に記載のrAAV粒子の送達に利用することができる(Yoshimura 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。具体的には、後半規管の開窓による正円窓膜を通じた送達であり、これは、注入時の動物の年齢に依存せず、ロバストで信頼性の高い形質導入を実証している(Yoshimura 2018、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。側頭骨にアクセスするために耳介後部が切開される。胸鎖乳突筋の一部を切離して、耳胞(otic bulla)を露出させる。直径0.5~0.6mmの耳科用ドリルを使用して、該耳胞に小さな穴を開け、次に、その穴を広げて、アブミ骨動脈と正円窓膜を明視下に置いた。耳科用ドリル(直径0.5~0.6mm)で後半規管の開窓を行い、蝸牛投与中の内耳の通気部として機能させた。ハウケイ酸キャピラリーピペットと10 μ Lハミルトンシリリングを含むマウス送達デバイスで正円窓膜を貫通させ、ウイルス粒子を含む溶液1 μ L(総内耳容積のおよそ40~50%)を正円窓膜を通じて鼓室階に300nL/分の速度で送達した。抗VEGFタンパク質をコードする構築物を含むAAV Anc80粒子の試験は、成熟した蝸牛を持つマウスで行った。

10

【0771】

実施例9：マウスにおける抗VEGFタンパク質のトランスジェニック発現、分析、及び画像診断

この実施例は、マウスにおける抗VEGFタンパク質のトランスジェニック発現、ならびにその後の該動物の画像診断及び表現型分析に関する。

20

【0772】

実施例9.1：マウスにおける抗VEGFタンパク質ラニビズマブ及びベバシズマブのin vivo発現及び画像診断

抗VEGFをコードする構築物を含む本明細書に記載のrAAV粒子の蝸牛内送達後に、本明細書に記載の抗VEGFタンパク質を含む組成物に対する生物学的耐性及び/または曝露を評価した(CSF及び血清中の抗VEGFレベルの測定を含む)。rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子またはrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子(実施例1に記載)をP30 WT CBA/Jマウスに注入した。試験1の群の概要は表3に見出すことができる。本明細書に記載の追加の試験(本明細書では「試験2」と呼ぶ)も実施し、その結果は以下に記載し、試験群の概要は表4に見出すことができる。これらの試験により、外科的導入、rAAV粒子の形質導入、及びその後の分泌型抗VEGFタンパク質の発現及びそれへの曝露に関連するデータを取得した。これらの結果を以下に要約し、その詳細は図17~26に見出すことができる。これらの試験では、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子またはrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子(実施例1に記載)を、後半規管の開窓(本明細書に記載のように)を伴った正円窓膜を通じた片側蝸牛内注入によって投与した。ビヒクル対照動物には製剤緩衝液を注入した。

30

【0773】

CAB/J野生型マウスに麻酔をかけ、本明細書に記載の組成物の導入に備えた。ビヒクル対照、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子、またはrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子(実施例1に記載)を調製し、正円窓膜を通じてマウス内耳に導入した。rAAV粒子の導入は以下の手順で行った：A) 耳介前部を切開して蝸牛胞を露出させ、B) マイクロピペットブラー(cat#P87-Sutter instruments)で最終外径約10 μ mになるように引いたガラス製マイクロピペット(cat#4878-WPI)を用いて、rAAV粒子を含む組成物を鼓室階に手動で送達し(マイクロピペットはNanoliter 2000マイクロマニピュレーター-WPIによって保持される)、内耳細胞へのアクセスを可能にし、C) 適切な緩衝液中に適切な濃度で本明細書に記載の組成物1 μ L(実施例1に記載、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子をおよそ1.4 $\times 10^{10}$ vg/蝸牛、またはrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子をおよそ1.2 $\times 10^{10}$ vg/蝸牛；それぞれポロキサマー188

40

50

を含む1×PBSで希釈)を、0.3μL/分の放出速度(MICRO4マイクロ注入コントローラー-WPIにより制御)で各試験蝸牛に注入した。陰性対照としてビヒクルを用いて偽手術を上記のように行った。追加の介入なしに、マウスを手術から回復させた。注入後5週間で、動物を安楽死させ、脳脊髄液(CSF)試料、血清試料、及び免疫蛍光分析用の内耳切片を採取した。

【表5】

表3：試験1の群の割り当て

群	動物数 *	被験物質	濃度 (ベクターゲノム[vg]/mL)	用量 (vg/蝸牛)	生存 期間
1	10	rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC粒子	1.4E13	1.4E10	4~5週間
2	10	rAAVAnc80-ベバシズマブ-PC粒子	1.2E13	1.2E10	4~5週間
3**	10	ビヒクル	n/a	n/a	4~5週間

*雄と雌の合算(1群当たり4~6匹の雄)。**ビヒクル対照群の未注入の反対側の耳を組織学的対象として使用。略語。n/a=該当なし。

【0774】

本明細書に記載のrAAV粒子(rAAVAnc80-抗VEGF粒子)による内耳形質導入の結果としての抗VEGFタンパク質曝露を評価するために、蝸牛内送達後4~5週目の終了時に血液及びCSFを採取し、CSF及び血清中の抗VEGFタンパク質レベルをMSDイムノアッセイを用いて測定した(例えば、実施例7に記載のように)。CSF内の可溶性抗VEGFタンパク質(ラニビズマブまたはベバシズマブ)のレベルを測定し、2.71~19.29ng/mLの範囲であった。これらの流体を採取した後、マウスを経心灌流し、蝸牛を採取して組織学的評価のために浸漬固定した。蝸牛試料を脱灰し、顕微鏡下切開した。切開したコルチ器のホールマウント及び横断切片を、抗ラニビズマブ(Abcam、ab168684-25UG、mAb)で染色し、本明細書に記載の構築物のトランスジェニック発現を測定し、抗ファロイジン(ThermoFisher A12381)染色を用いて、異なる内耳細胞タイプを特徴付け(図17)、抗ミオシンVii染色を用いて、有毛細胞を標識した(図18に図示され、図20で定量化される)。また、試料の半分を支持細胞を標識するために抗Sox2で染色し、残りの半分を神経細胞突起を標識するために抗ニューロフィラメント200で染色した(図19)。免疫染色組織の共焦点分析を用いて、形質導入効率/抗VEGF発現、及び細胞生存を特定した(図20及び図21)。

【0775】

抗VEGFタンパク質の発現は、強度ではなくシグナルの出現に基づいて評価した。特定の理論に拘束されることを望むものではないが、この理由の1つは、ポリクローナル二次抗体が、マウスモノクローナル一次抗ラニビズマブ抗体(上記のMmAb)にコンジュゲートした場合に、対応する小さいサイズのヒト化マウス抗体ラニビズマブをモノクローナル一次抗ラニビズマブ抗体にコンジュゲートさせた場合と比較して、ヒト化マウス抗体ベバシズマブ上の多くのエピトープに結合する可能性があるためであり得る。内有毛細胞は、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC粒子またはrAAVAnc80-ベバシズマブ-PC粒子(実施例1に記載のもの、結果は図17に図示され、図21で定量化される)を与えられた蝸牛の大部分(19耳のうち17耳)において導入遺伝子を強固に発現

した。これらの17の蝸牛のうち、14はまた、OHC及び／または非有毛細胞のサブセットでの発現も示した。rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子を与えられた耳と、rAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子を与えられた耳との間で、細胞のアイデンティティ及び発現パターンに実質的な差は検出されなかった。

【0776】

蝸牛組織におけるこの発現が、抗VEGFタンパク質（ラニビズマブまたはベバシズマブ）の産生及び分泌につながったことを確認した。動物からCSF（大槽からサンプリング）及び血清試料を採取し、分析した（図23及び24）。外リンパ中の抗VEGFタンパク質濃度もまた、外リンパとCSFとの間の抗VEGFタンパク質曝露の比率をよりよく理解するために測定することができる。マウスの外リンパ試料の採取は、技術的に困難な場合がある。本実施例では、1つの外リンパ試料を採取した。抗VEGFタンパク質（ラニビズマブまたはベバシズマブ）は、rAAV粒子を注入した動物のCSFで検出されたが、ビヒクルを注入した対照では検出されなかった（図24）。MSDアッセイによる分泌型抗VEGFタンパク質の検出は、ラニビズマブとベバシズマブの間の定性的比較に限定されたが、これは、蝸牛組織での発現の検出に使用されたのと同様のポリクローナル二次抗体の使用によるものである（上述の通り）（エピトープの利用性が高いためにrAAV Anc80-ベバシズマブ-PC粒子を与えられた耳の試料についてより強いシグナルが観測される）。特定の理論に縛られることを望むものではないが、CSFにおける抗VEGFタンパク質の明確な検出は、開存している蝸牛水管を介したこの種における外リンパ液とCSF間のコミュニケーションによるものであり得る。

【0777】

マウス血清を、ラニビズマブを検出する抗κ軽鎖（pAb）抗体を用いたMSDアッセイ（上記及び実施例7に記載）を介して抗VEGFタンパク質（ラニビズマブ）を評価した。ビヒクルを注入した動物と比較して、rAAV-ラニビズマブ-PC粒子を蝸牛内送達されたマウスは、送達後4～5週間で血清中で高いレベルの抗VEGFタンパク質（ラニビズマブ）を示した（図23）。

【0778】

rAAV-ラニビズマブ、rAAV-ラニビズマブ-GFP、rAAV-ベバシズマブ-PC、rAAV-ベバシズマブ、rAAV-ベバシズマブ-GFP、rAAV-アフリベルセプト-PC、またはrAAV-アフリベルセプト粒子（例えば、ラニビズマブ、ベバシズマブ、またはアフリベルセプトを含む）を蝸牛内送達されたマウス由来の血清を評価することができる。

【0779】

試験2もまた、可能性のある外科的課題を示す新たなデータに対処するために、同じパラメーター、例えば、マウス系統、年齢、rAAVカプシド、ラニビズマブをコードする構築物、及び蝸牛内投与処置を使用して実施した。。本試験は、特定の実施形態では、ラニビズマブがベバシズマブと比較した場合に、以下の異なる特徴を有し得るため、rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子（実施例1に記載）を利用した：例えば、より高い結合能及びより高い結合親和性、Fcドメインがないこと、ならびに分子量が小さいこと。rAAV Anc80-ラニビズマブ-PC粒子（実施例1に記載）を、後半規管の開窓（本明細書に記載のように）を伴った正円窓膜を通じた片側蝸牛内注入によって1.4E10vg／蝸牛で投与した。ビヒクルを注入したマウスの未注入の耳を対照として使用した。試験終了後、動物を経心灌流し、蝸牛を採取し、脱灰し、以下の標識を使用して共焦点顕微鏡画像診断のために顕微鏡下切開した：導入遺伝子発現を検出する抗ラニビズマブ（mAb）；有毛細胞を標識する抗ミオシンVIIa；及び蝸牛神経線維（例えば、橈骨神経線維）の突起を標識する抗Tuj1。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 4：試験 2 の群の割り当て

群	動物数*	被験物質	濃度 (ベクターゲノム [vg]/mL)	用量 (vg/蝸牛)	生存 期間
1	3	rAAVAnc80-ラニビズ マブ-PC 粒子	1.4E13	1.4E10	4 週間
2	2	未注入	n/a	n/a	4 週間*

*マウスの年齢に基づいてプレースホルダー手術日から（偽手術なし）。略語。n/a＝該当なし。

【0780】

本試験における感覚上皮の蝸牛組織構造は、内有毛細胞及び外有毛細胞、外側支持細胞、ならびにラセン板縁の歯間細胞を含む複数の細胞タイプにおいて、蝸牛の長さ全体にわたって抗 VEGF タンパク質（ラニビズマブ）発現の広範な発現分布を示した（図 22）。概して、有毛細胞は、マウス 1 の蝸牛の最頂部領域でいくつかの IHC 損失が観察されたことを除いて、蝸牛の分析領域に存在していた。

【0781】

実施例 9. 2：マウスにおける *in vivo* でのラニビズマブ及びベバシズマブの送達及び産生の表現型分析

本明細書に記載の rAAVAnc80-抗 VEGF 粒子を、マウスにおける蝸牛耐性について評価した。例示的な rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC 粒子または rAAVAnc80-ベバシズマブ-PC 粒子（実施例 1 に記載）の蝸牛内送達後のマウスにおける形質導入及びその後のタンパク質分泌を評価するために実施された試験の一部として、全体的な耐性、聴力機能、及び蝸牛有毛細胞の生存率も評価し、外科的投与及び導入遺伝子発現の蝸牛耐性を評価した。蝸牛内送達後 4～5 週間を通して、体重またはボディコンディショニングスコアの有害な変化は、原因不明で送達後 1 週間で死亡した 1 匹を除いて検出されなかった（外科的合併症または健康観察での異常所見は見られなかった）。旋回運動またはヘッドボビングによって証明される、前庭系の損傷の兆候は検出されなかった。

【0782】

ABR による聴力機能の評価は、手術前と手術後 4～5 週間（安楽死の直前）に実施した。rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC 粒子または rAAVAnc80-ベバシズマブ-PC 粒子を投与した群と、ビヒクルを投与した群で、閾値シフトが観察された。閾値シフトは群間で同様の程度であり、導入遺伝子発現によるものではなく、外科的処置による蝸牛への損傷の可能性が示唆された（図 25）。

【0783】

機能評価（ABR；図 25）と一致して、rAAVAnc80-ラニビズマブ-PC 粒子または rAAVAnc80-ベバシズマブ-PC 粒子を投与した群と、ビヒクルを投与した群で有毛細胞の損傷が検出されたが、未注入（対側）対照の耳では検出されなかった。蝸牛の基底部の基底膜の損傷は、rAAVAnc80-抗 VEGF 粒子を投与した 19 耳中 16 耳、ビヒクルを投与した 10 耳中 9 耳で検出され、これらの損傷領域での外有毛細胞のその後の損失は、16 kHz 及び 32 kHz で顕著であった（図 18）。全体としては IHC 損失は顕著ではなく、散発的な IHC 損失が、rAAVAnc80-抗 VEGF 粒子を投与した 19 耳中 2 耳の 8 kHz 周波数領域においてのみ検出された（図 18）。この特定の試験（本明細書では「試験 1」と呼ぶ）では、投与経路で有毛細胞の損傷が生じたが、機能評価と耳全体の細胞生存との間の一貫性から、rAAVAnc80-抗 V

10

20

30

40

50

E G F 粒子またはビヒクルのいずれを投与されたかにかかわらず、細胞損失は r A A V カプシド毒性、導入遺伝子発現、またはその後のタンパク質分泌ではなく、外科的処置によるものであり得ることが示唆された。

【0784】

外科的処置が細胞の損失をもたらし得るという知見を踏まえ、試験2を実施した。この試験では、r A A V A n c 8 0-ラニビズマブ-PC粒子（実施例1に記載）の蝸牛内送達後4週間で、基底膜の系統的損傷及びその後のOHCの損失はなく、極頂部及び基底部での散発的損失のみが示された（図22）。対応する領域での全体的な有毛細胞生存率の定性的評価と一致して、蝸牛機能（DPOAE）及び聴力機能（ABR）の評価は、投与後4週間で、未注入対照と比較して正常な閾値を示した（図26のパネル（A）及び（B））。

【0785】

組み合わせられたデータから、r A A V A n c 8 0-抗VEGF粒子（r A A V A n c 8 0-ラニビズマブ-PC粒子またはr A A V A n c 8 0-ベバシズマブ-PC粒子（実施例1に記載のもの）など）の送達が、マウスに導入されると、有毛細胞及び種々の支持細胞の両方を含む複数の細胞タイプでの導入遺伝子発現と、CSFでの分泌型抗VEGFタンパク質（ラニビズマブまたはベバシズマブ）の検出をもたらしたことが明らかとなった。マウスでは、抗VEGFタンパク質がCSF中に存在したが、特定の理論に縛られることを望むものではないが、これは、この種の動物では開存している蝸牛水管を介した外リンパとCSFの活発な流体交換を通じて生じる可能性がある。これらの結果は、1）蝸牛細胞における強固な抗VEGFタンパク質の発現と、2）CSFにおける分泌型抗VEGFタンパク質の検出を示し、非ヒト霊長類などの解剖学的に関連性が高く応用可能な種にプログラムを進めることを支持するものである。

【0786】

実施例10：前庭神経鞘腫（VS）のマウスモデルにおける抗VEGFタンパク質をコードするmRNA及びタンパク質発現のトランスジェニック発現の表現型解析

本実施例は、マウスモデル（例えば、Chen et al., Nature Protocols 2019（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載のモデル）におけるVSに関連する表現型の分析に関する。モデルマウスを、Chen et al.に記載のように準備し、マウスを適切な期間（例えば、約1週間）手術から回復させた後、麻酔をかけ、本明細書に記載の組成物の導入に備えた。Anc80カプシドによってカプシド封入されたモックrAAV粒子またはrAAV構築物（例えば、実施例1に記載のものなど）を調製し、正円窓膜を通じてマウス内耳に導入した。rAAV-抗VEGF粒子の導入は、以下の工程で行った：A）耳介前部を切開して蝸牛胞を露出させ、B）マイクロピペットブラー（例えば、cat#P87-Sutter instruments）で最終外径約10µmになるように吸引したガラス製マイクロピペット（例えば、cat#4878-WPI）を用いて、rAAV粒子を含む組成物を鼓室階に手動で送達し（例えば、マイクロピペットはNanoliter 2000マイクロマニピュレーター-WPIによって保持される）、内耳細胞へのアクセスを可能にし、C）本明細書に記載の組成物1µL（例えば、本明細書に記載のrAAV構築物を、ポロキサマー188を含む1×PBS中、およそ $4.5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ vg/蝸牛）を、0.3µL/分の放出速度（例えば、MICRO4マイクロ注入コントローラー-WPIにより制御）で各試験蝸牛に注入した。陰性対照としてビヒクルを用いて偽手術を上記のように行った。追加の介入なしに、マウスを手術から回復させた。追加の介入なしに、マウスを手術から回復させた。

【0787】

術後適当な間隔（例えば、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、及び8週間）で、片側または両側に組成物または偽注射を与えられたVSマウスモデルに、腹腔内に送達されたペントバルビタールナトリウム（例えば、35mg/kg）で麻酔をかけた。その後、接地され、音響的及び電氣的に絶縁された試験室内のヘッドホルダーにマウ

スを配置し、維持した。誘発電位検出システム（例えば、Smart EP 3.90, Intelligent Hearing Systems, Miami, FL, USA）を使用して、マウスの聴性脳幹反応（ABR）の閾値を測定した。クリック音、ならびに様々な強度（例えば、10～130 dB SPL）での8、16、及び32 kHzのトーンバーストを使用して、試験マウスのABRを誘発した。応答シグナルは、マウスの耳に腹外側方向に挿入された皮下針電極で記録した。この実施例は、本明細書に記載の例示的な構築物（例えば、実施例1に記載のもの）の導入により、VS誘発症状を軽減及び／または予防できることを確認するものであり、さらなる分析は、正確な投与時間枠と、抗VEGFタンパク質発現がVS誘発症状を抑制するためにどのように作用するかを測定する助けとなり得る。結果はABRトレースとして表され、試験動物及び／または耳は、対照（非注入動物または非注入耳を含み得る）と比較した。ABRパフォーマンスの改善は、対照の耳との比較の場合は試験耳で、対照の動物との比較の場合は試験動物で観察した。刺激に対する応答の改善は、注入耳から非注入耳へのクロスオーバーにより、非注入耳でも観察される場合がある。

10

【0788】

術後適当な間隔（例えば、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、及び8週間）で、片側または両側に組成物または偽注射を与えられたVSマウスモデルに麻酔をかけた（例えば、腹腔内に送達されたペントバルビタールナトリウム（35 mg/kg）で）。その後、マウスを安楽死させ、VS腫瘍を採取した。腫瘍体積、転写パターン、タンパク質組成、及び／または組織構造を比較した。本明細書に記載の例示的な組成物を注入した試験マウスは、対照の非注入VSモデルマウスと比較して、腫瘍体積の減少、転写パターンの変化、タンパク質組成の変化、及び／または組織構造の変化を示した。

20

【0789】

内耳毒性の可能性を評価するために、肉眼検査後、蝸牛を処理、切開、及び染色することができ、cytococholeogram解析を実施して、IHC及び／またはOHCの損失を評価することができる。反対側の蝸牛／耳を、中耳及び内耳の組織病理学的及び顕微鏡的評価（例えば、認定病理医による）のために処理し、任意の肉眼的及び顕微鏡的病変を評価することができる。

【0790】

実施例11：非ヒト霊長類動物モデルにおける抗VEGF mRNA及びタンパク質発現のトランスジェニック発現の解析

30

本実施例は、非ヒト霊長類（NHP）におけるrAAV Anc80-抗VEGF粒子のin vivo試験を提供する。これらの試験は、とりわけ、本明細書に記載の方法及び／または組成物の投与後の耐性、毒性、及び表現型反応を測定し得る。NHPとヒトとの間の内耳の生理学的類似性は、マウスモデルで見られるものよりも顕著であるため、適切なNHPモデル（例えば、カニクイザル（Cynomolgus macaque）、別名Macaca fascicularis）が、この目的のために利用される。NHP動物モデルであるマカクは、霊長類の内耳の形態をほぼ代表する内耳の形態を有しており、蝸牛水管が開存していないため、外リンパに投与された注入物の量を予測可能かつ定量的に評価することが容易になる。ヒトと比較してNHPの外耳道の直径は比較的狭いため、この動物モデルに必要な外科的アプローチはより侵襲的である（外耳道を通じてではなく、乳様突起／顔面神経窩を通じて進入する）。特定の理論に束縛されることを望まないが、前述の理由から、このアプローチは予想される伝音損失、外科的外傷、またはその両方を過大評価する可能性がある。総内耳容積がヒトの約3分の1であるにもかかわらず、マカクの蝸牛は解剖学的に類似しており、提示の薬物送達プロセス（例えば、正円窓膜注入）自体は、先に概説した様式で実施した。本明細書に記載のrAAV-抗VEGF粒子の蝸牛内投与を分析及び調査するために、マカクは、安全性及び耐性の両方、ならびにVS及び／または関連腫瘍に近接して有効な抗VEGFタンパク質曝露レベルをもたらすのに必要なrAAV粒子の用量を評価するための最も実用的な解剖学的に正しい動物モデルを代表する。

40

50

【0791】

実施例11.1：NHPでの抗VEGFタンパク質ラニビズマブの*in vivo*発現及び分析

NHPにおいて、本明細書に記載のrAAV-抗VEGF粒子（例えば、rAAV Anc80-抗VEGF）を以下のように送達した：耳介後部を切開し、軟部組織を骨膜のレベルまで切開した。骨膜を切開し、持ち上げて乳様突起骨を露出させた。経皮質乳様突起削開術を、高速切削とダイヤモンドドリルバーを組み合わせで行った。その後、顔面神経窩が開放され、適切に正円窓と卵円窓（OW）を明視下に置けるようにした。OWのアブリ骨底板の開窓を、ローゼン針を使用して行った。他のモデルと同様に、開窓により内耳に損傷を与えることなく、より大量の注入が可能となり、さらに、通気により、rAAV-抗VEGF粒子を含む溶液が蝸牛の頂点に向かって流れることが可能になる。ウイルス粒子を含む30 μ Lの溶液（総内耳容積のおよそ40～50%）を、正円窓膜を通じて30 μ L／分の速度で送達した。

10

【0792】

本明細書に記載の組成物及び方法を、NHP（カニクイザル）においてrAAV Anc80-ラニビズマブ粒子（実施例1に記載）の同時両側蝸牛内投与を使用して、その後2ヶ月または6ヶ月の回復期間を経て、局所及び全身の耐性について評価した。とりわけ、この評価により、1）局所的及び全身的耐性が実証され、2）rAAV Anc80-抗VEGF粒子の蝸牛内投与後の外リンパ、CSF、血清、及び他の組織における抗VEGFタンパク質の発現レベルの評価が可能となった。低用量群と高用量群の両方を使用した。低用量群及び高用量群は、NHPでのこれまでのプラットフォーム及び支持研究に基づいており、高用量に対応する濃度付近の用量（3.0E11vg／蝸牛に相当する1.0E13vg／mL；ヒト換算で9.0E11vg／蝸牛）は、NHPの有毛細胞における病変と関連しなかったが、より高濃度（1.1E12vg／蝸牛に相当する3.7E13vg／mL；ヒト換算で3.3E12vg／蝸牛）では、一部の動物の有毛細胞において潜在的なカプシド関連の病変と関連していた。ここで実施された試験には、抗VEGFタンパク質レベルを測定する（例えば、MSDにより）ための試料を確実に得るために、外リンパ液を採取することを主目的とした追加の高用量群及びビヒクル群が含まれた。これらの別群は、外リンパの採取がほぼ常に周囲の蝸牛に損傷を与えるために必要であった。

20

【0793】

これらの実験から得られた結果は、抗VEGFタンパク質（ラニビズマブ）がNHPの外リンパで検出されたことを示している。ビヒクルを注入した対照NHPの外リンパでは抗VEGFタンパク質は検出されず、投与後期間（2ヶ月または6ヶ月）にかかわらず、どのNHPの末端CSFでも抗VEGFタンパク質は検出されなかった。

30

【0794】

図27は、内耳から典型的なVS部位への拡散特性を推定するために外リンパ曝露レベルを組み込んだ計算モデルを示す。内耳道を通る抗VEGFタンパク質の拡散の計算モデリング（図27に図示されている）から、外リンパ中の抗VEGFレベルが、報告された初期VS部位の範囲内で生物学的に活性な閾値濃度（ラニビズマブのIC50）を超えることが予測された。*in vitro*細胞増殖アッセイにおいてVEGF-Aの生物学的活性を50%阻害するのに必要な濃度は、Genentech 2017（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように11～27ng／mLである。

40

【0795】

実施例12及び14でさらに詳細に記載するとおり、血清の抗VEGFタンパク質レベルをNHPで評価したところ、血清で検出された抗VEGFタンパク質のレベルは、全てのNHPで最小～検出不可能であった。抗VEGFタンパク質は、どのNHPのどの非蝸牛組織ライセート（肝臓、脾臓、脳幹、左右の聴覚皮質、及び左右の下顎リンパ節を含む）でも検出されなかった。抗VEGFタンパク質は、抗VEGFを含むAAVが投与されたNHPの外リンパで検出された（以下の実施例12及び14を参照されたい）。

50

【0796】

S腫瘍の成長を制御し、VS腫瘍の症状を緩和する全身性抗VEGFタンパク質の有効性を示す臨床データと併せて考えると、これらの実験は、抗VEGFタンパク質への局所曝露により腫瘍サイズを縮小し、及び／または腫瘍の成長及びその続発症を制御し、それにより抗VEGFタンパク質の反復全身投与に関連する副作用を抑制するために、抗VEGFタンパク質の内耳デポを生成することの実現可能性を明らかにした。

【0797】

実施例12：NHPでの抗VEGFの忍容性及び曝露の評価

上述のように、rAAVANC80-抗VEGF（実施例1に記載）を用いてNHP（カニクイザル）での曝露及び耐性試験を実施した。試験では、粒子を両側に蝸牛内に送達し、NHPでのrAAVANC80-抗VEGF粒子の局所及び全身への影響を評価した。とりわけ、この試験は、蝸牛耐性（投与後6ヶ月までの連続的なABR測定；投与後2ヶ月及び6ヶ月目のcytococholeogram；ならびに投与後2ヶ月及び6ヶ月目の耳の組織病変）、加えて、臨床病状及び抗VEGFタンパク質調査の両方に対する、連続採血により評価される全身の忍容性を知るためのデータを提供した。

【0798】

2つの例示的な用量（用量1及び用量2）のrAAVANC80-抗VEGF粒子（実施例1に記載）またはビヒクルの両側蝸牛内投与を、経乳様突起／顔面神経窩外科的アプローチを使用して実施し、上記のように正円窓及び卵円窓にアクセスした。用量1は、用量2よりも少なかった。

【0799】

用いた研究設計を図33に示す。両側の聴性脳幹反応（ABR）評価を、投与前2週間以内、ならびに、投与の1、2、3、及び6ヶ月後（寿命に従う）に群1～5の動物で実施した。ABRを、持ち運び可能な、音が減衰可能な、電子的に遮蔽された囲みの内で、4つの異なる周波数（1.1、2.8、8.0、及び22.6kHz）で測定した。組織学的分析のために蝸牛を準備し、外科的アプローチの潜在的な中毒性難聴、及び／または、rAAVANC80-抗VEGF粒子の蝸牛内投与を調査した。脳組織（聴覚領域に焦点を当てた）もまた、組織病理学的調査のために採取した。血清を動物全てから採取した一方で、外リンパ及びCSFを、抗VEGFタンパク質レベルのMSDアッセイ測定のために、群6及び7の動物から採取した。

【0800】

本明細書に記載するrAAVANC80-抗VEGF粒子を蝸牛内投与する前に、試験周波数に応じた、約30～50dBの音圧レベル（SPL）の範囲の各投与群（ビヒクル、用量1のrAAVANC80-ラニビズマブ、及び、用量2のrAAVANC80-ラニビズマブ）に対する、ベースラインABR閾値は、試験設備歴史的対照データと一致した。蝸牛内投与の後、ベースラインに対するABR閾値のシフトを、各試験間隔で、各耳に対して計算した（図34A～34C）。ベースラインに対するABR閾値のシフトは、試験した両方の用量における、ビヒクルまたはrAAVANC80-ラニビズマブのいずれかの投与の1、2、3、及び6ヶ月後において、類似していた。観察された、最低のABR閾値シフトは、用いた外科的アプローチに起因していた可能性が高い。平均ABR閾値は、高用量及び低用量の両方における、rAAVANC80-ラニビズマブの投与後の、周波数全てにまたがるベースライン閾値に類似していたことを、本データは示す。

【0801】

サイトコクレオグラム分析によって、rAAVANC80-ラニビズマブに関連する中毒性難聴の徴候は存在しないことが明らかとなった。rAAVANC80-ラニビズマブに起因した組織病理学的知見もまた、存在しなかった。

【0802】

まとめると投与後、蝸牛内投与及び／または試験rAAVANC80-抗VEGF粒子に関連する有意な臨床観察は記録されなかった。軽度の神経学的徴候は、前庭系に影響を与える可能性のある外科的手技に関連すると考えられ、NHPは医学的介入なしに回復し

10

20

30

40

50

た。全体として、2ヶ月及び6ヶ月の回復を含む全てのNHPの臨床観察結果は、主に、内耳手術後の一時的な所見として予想されたものであった。

【0803】

抗VEGFタンパク質発現は、ビヒクルまたはrAAV Anc80-ラニズマブを投与したNHPにおいてもまた評価された。外リンパでは、高用量のrAAV Anc80-ラニズマブを投与した2ヶ月後に、抗VEGFレベルは、67.0~694.9 ng/mLの範囲で検出され、平均レベルは406.8 ng/mLであった。ビヒクル注射した対照NHPの外リンパでは、抗VEGFタンパク質は検出されなかった。

【0804】

血清試料に関して、試料の82%は、両方の用量において、検出下限を下回る抗VEGFレベルを有した。抗VEGFタンパク質は、CSF、及び、投与の2ヶ月または6ヶ月後のいずれかにおいて、rAAV Anc80-ラニズマブが投与されたNHPの非蝸牛組織では検出されなかった。評価した非蝸牛組織としては、肝臓、脾臓、脳幹、聴覚皮質、または、下顎リンパ節が挙げられる。

【0805】

これらの実験から得られた結果は、抗VEGFタンパク質（ラニズマブ）がNHPの外リンパで検出されたことを速やかに示している。投与後の期間（2または6ヶ月）に関係なく、末端CSF、または、あらゆるNHPの非蝸牛組織において、抗VEGFタンパク質は検出されなかった。このデータは、局部における慢性的な抗VEGFタンパク質発現の忍容性を予備的に裏付ける。

【0806】

実施例13：ヒト投与

本実施例は、難聴及び／または偶発的もしくは症候群（例えば、神経線維腫症-2）に関連して生じるVSに関連する追加の症状を有する対象の治療を開示する。

【0807】

ヒトでは、上記のモデル生物で利用されるアプローチと比較して、本明細書に記載の作用物質の送達のための侵襲性の低いアプローチを、例えば、外耳道を通じて利用することができる；いくつかの実施形態のように、ヒトでは、出生時でさえ関連構造が比較的大きいため、より実用的である。簡単に言うと、本明細書に記載の臨床投与方法は、経外耳道的試験的鼓室開放術及びレーザー支援下微細アブミ骨底開窓術（リン酸チタニルカリウム [KTP] またはCO₂ 耳科用レーザーを使用してアブミ骨底板に小さな通気孔 [およそ0.25 mm] を開ける）の後に、正円窓注入を行い、3分以内に正円窓膜を通じて、本明細書に記載のrAAV-抗VEGF粒子を含む約0.09 mL（または90 µL、総内耳容積のおよそ40~50%）の溶液を送達することを含むことができる。非臨床及び死体モデルと同様に、通気は、迷路内圧の潜在的な有害な上昇を防止するのに役立つ。臨床投与処置及び送達デバイスに関する追加情報は、本開示全体を通して見出すことができる。

【0808】

患者は、片側性または両側性VSを有すると診断され得る（例えば、MRIによる判定）。臨床投与処置は、経外耳道的試験的鼓室開放術及びレーザー支援下微細アブミ骨底開窓術後に、正円窓注入を行い、短時間で正円窓膜を通じて、適切な力価で本明細書に記載のrAAV-抗VEGF粒子を含む適切な量の溶液を送達することであり得る。手術の前に、手術される耳を識別し、機関の要件に沿って確認するために耳の上に消えないマーカーで印を付けてもよい。本明細書に記載のrAAV粒子の利用可能性は、麻酔が投与される前に確認することができる。全身麻酔の導入後、対象は仰臥位に置かれ、頭は横に向けられ、手術耳は上に向けられた。耳は、ベタジンで準備され、通常の方法でドレープをかけられ得る。手術用顕微鏡または内視鏡を使用して、外耳道の四象限ブロックに麻酔（例えば、エピネフリンを含む1%リドカイン）をかけた。後部鼓膜外耳道皮弁を展開し、中耳に進入して卵円窓と正円窓の両方を露出させた。この際、マイクロキュレットまたはドリルを使用して、骨性管及び鼓膜の接合部にある少量の骨を除去する必要がある場合があ

る。適切なレーザー（例えば、KTPまたはCO₂耳科レーザー）を使用して、アブミ骨底板に小さな穴（例えば、およそ0.25mm）を作出した。このような穴は、注入中に通気部として機能し、迷路内圧の潜在的な有害な上昇を防止することができる。次に、注入カテーテルを、注入デバイスの先端近くのストッパーによって決定される適切な深さ（例えば、1mmを超えない）まで、正円窓膜を通過させることができる。正円窓を露出させるには、偽膜または突出した骨の除去が必要な場合がある。適切な量の溶液が注入されている間、送達デバイスは所定の位置に保持することができる。カテーテルを抜去すると、血液／組織パッチ及び／またはシーラント液滴（例えば、ヒアルロン酸ナトリウム、例えば、Healon（登録商標））を正円窓膜及びアブミ骨底板上に置き、24～48時間かけて生体治癒が起こる間に両窓の機能的密閉を行った。その後、鼓膜外耳道皮弁を解剖学的位置に戻し、抗生物質を含浸させた吸収性ゼラチンスポンジで所定の位置に保持した。

10

【0809】

適切な間隔で、対象はフォローアップ画像分析（例えば、MRI分析）を受けて、腫瘍体積及び／または腫瘍の成長速度を測定され得る。本明細書に記載の例示的な方法及び／または組成物で治療された対象は、本明細書に記載の例示的な方法及び／または組成物で治療されていない対象と比較して、腫瘍体積の減少及び／または腫瘍の成長速度の低下を示し得る。

【0810】

送達には、無菌の使い捨て送達デバイスが使用される。そのようなデバイスは、本明細書に記載の生成物候補rAAV-抗VEGF粒子を正円窓膜を通じて蝸牛内に安全かつ効果的に送達できるように設計されている。送達デバイスは、本明細書に記載の遺伝子治療用生成物候補の送達に使用することが意図されており、多くの場合、蝸牛内投与経路と組み合わせて使用される。使い捨てデバイスは、アブミ骨底板に位置する通気部を伴って正円窓膜を通じて内耳の外リンパ液に被験物質を送達するために開発することができ；デバイスのフォームファクターは、外耳道を通じた正円窓膜へのアプローチを最適化する。カスタムデバイスは、このような蝸牛内投与経路のために特別に設計されているため、治療薬の安全性と有効性の可能性の両方に関して、市販の材料よりも有利である（図4）。デバイスの特定の設計要素には、これらに限定されないが、以下が含まれる：注入された流体の無菌性の維持；内耳に導入される気泡の最小化；制御された流速で少量を正確に送達する能力（標準ポンプの使用と合わせて）；正円窓膜を明視化し、外科医による外耳道を通じた送達を可能にすること；正円窓膜、もしくは正円窓膜から先の蝸牛構造への損傷の最小化；及び／または正円窓膜を通じた逆流の最小化。

20

30

【0811】

実施例14：非ヒト霊長類（NHP）におけるrAAVanc80-ラニビズマブの、用量依存的曝露の評価

本実施例は、（実施例1で記載した）rAAVanc80-抗VEGF粒子を用いる、NHP（カニクイザル）での曝露研究について開示し、粒子は両側の蝸牛に送達された。本研究の目的は、臨床開発のための抗VEGFタンパク質レベルの用量依存を調査することであった。

40

【0812】

5つの群の動物を本研究で使用し、4つの異なる用量を試験した。1つの群の動物は、対照としての役割を果たした。研究の終了時に、末端流体及び組織を、分析のために回収した。抗VEGFタンパク質レベルを調査するために、血清、CSF、及び外リンパを採取した。研究設計を図35に示す。

【0813】

外リンパにおける抗VEGFレベルの用量反応は、投与の2ヶ月後に観察されたことを、本研究から入手したデータは示す（図36）。抗VEGFタンパク質は、ビヒクル対照では観察されなかった。rAAVanc80-抗VEGF粒子が投与されたNHPに関しては、0.65倍の用量が投与された動物に対して、平均4,170ng/mLの抗VE

50

G Fタンパク質が検出された。1. 25倍の用量が投与された動物は、平均4,490 ng/mLの抗VEGFタンパク質を示した。2. 5倍の用量が投与された動物は、7,560 ng/mLの平均抗VEGFタンパク質を有し、5倍の用量が投与された動物は、7,670 ng/mLの平均抗VEGFタンパク質を有した。

【0814】

実施例12に記載の研究と同様に、NHPのいずれかの血清において、生物学的に活性なレベルの抗VEGFタンパク質は検出されなかった（ビヒクル、または、rAAVanc80-抗VEGF粒子）。加えて、NHPのいずれかにおけるCSFまたは非蝸牛組織において、定量可能な抗VEGFタンパク質は検出されなかった。調査された非蝸牛組織としては、肝臓、脳神経、脾臓、下顎リンパ節、腋窩リンパ節、及び鼠経リンパ節が挙げられる。

10

【0815】

実施例11.1及び図27に記載のとおり、NHPの外リンパにおける抗VEGFタンパク質の検出に基づく演算モデルは、前庭神経鞘種が通常発見される部位に、生物学的に活性なレベルの抗VEGFタンパク質が存在することを裏付けた。本実施例における外リンパで測定した抗VEGFタンパク質のレベルに基づき、さらなる演算モデルを使用して、報告された前庭神経鞘腫の場所におけるおよその抗VEGFを調査した（Koene et al., (2020) Otolaryngol Head Neck Surg. 162(2):211-214、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。NHPの外リンパにおける、経験的に測定された抗VEGFレベル、及び、保存的モデルの推定を用いて、抗VEGFレベルが、前庭神経鞘腫が通常発見される位置またはその付近において、生物学的に活性な閾値を上回ると推定した（図37）。

20

【0816】

まとめると、本データは、NHPの外リンパにおける抗VEGFレベルの、用量依存的な関係を示す。抗VEGFを含むAAV粒子を蝸牛内送達することによって、前庭神経鞘腫が通常発見される位置において、生物学的に活性な閾値で、または、それを上回って、抗VEGFタンパク質レベルを産生することが期待されることを、本データはさらに示唆している。この情報を、局所送達のために、抗VEGF、例えば、rAAVanc80-抗VEGFを含むAAV粒子の臨床開発において使用することができる。

【0817】

実施例15：rAAVanc80-ラニビズマブを投与した非ヒト霊長類（NHP）における、耐久力のある、及び、許容される抗VEGFタンパク質に対する可能性の評価

30

本実施例は、（実施例1に記載した）rAAVanc80-antiveGF粒子を用いる、NHP（例えば、カニクイザル）での研究について開示し、粒子は両側の蝸牛に送達された。本研究の目的は、NHPの内耳における抗VEGFタンパク質レベルの耐久性及び忍容性を調査することであった。

【0818】

3つの異なる用量：1倍用量、2倍用量、及び4倍用量を、本研究で試験した。対照動物はビヒクルで処置した。研究終了時に、有毛細胞の生存及び抗VEGFタンパク質の検出のために、左蝸牛の切断及び免疫染色を行った。研究設計を図38に示す。蝸牛顕微鏡写真における抗VEGFタンパク質発現を定量するために、有毛細胞の生存及び抗VEGFタンパク質の検出のために、3つの周波数位置において蝸牛を評価した。図39A~39Cに示すように、各ボクセルにおける蛍光強度を、3つの周波数位置でまとめた後、単独の代表値にまとめた。

40

【0819】

内有毛細胞、柱状細胞、外有毛細胞、ヘンゼン細胞、及びクラウジウス細胞を含む、NHPの内耳における複数の細胞型において抗VEGFタンパク質が検出されたことを、本研究から得られたデータは示す（図40A~40D）。加えて、比較的高い抗VEGFタンパク質発現レベルが、試験した全ての用量、及び、全ての生存期間にまたがって、NHPの蝸牛で観察された（図41）。ビヒクル対照と比較して、本研究において試験した3

50

つ全ての用量において、rAAVANC80-抗VEGF粒子を投与したNHPは、全ての時点：投与後1ヶ月、3ヶ月、及び6ヶ月において、蝸牛において約100倍～10,000倍増加した抗VEGFタンパク質レベルを示した。さらに、図42A～42Bに示すように、内有毛細胞の全体生存及び外有毛細胞の全体生存は、研究群全てにまたがって、NHP蝸牛でロバストであった。

【0820】

まとめると、本データは、rAAVANC80-抗VEGF粒子が投与されたNHPの蝸牛における抗VEGFタンパク質レベルの耐久性、及び、NHP蝸牛における抗VEGFタンパク質レベルの忍容性を示す。本データは、蝸牛内送達のための、抗VEGF、例えば、rAAVANC80-抗VEGFを含むAAV粒子の臨床開発を裏付ける。

10

【0821】

例示的な実施形態

実施形態1．プロモーターに作動可能に連結されたコード配列を含む構築物であって、前記コード配列が血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部をコードする、前記構築物。

【0822】

実施形態2．前記プロモーターが、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターである、実施形態1に記載の構築物。

【0823】

実施形態3．前記プロモーターが、CAGプロモーター、CBAプロモーター、CMVプロモーター、またはCB7プロモーターである、実施形態1または2に記載の構築物。

20

【0824】

実施形態4．前記プロモーターが、配列番号64、配列番号49、及び／または配列番号65に記載の核酸配列を含む、実施形態1～3のいずれか1つに記載の構築物。

【0825】

実施形態5．前記コード配列が、霊長類コード配列であるか、またはそれを含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の構築物。

【0826】

実施形態6．前記VEGF結合剤またはその一部が、霊長類VEGF結合剤である、実施形態1～5のいずれか1つに記載の構築物。

30

【0827】

実施形態7．前記コード配列が、ヒトコード配列であるか、またはそれを含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の構築物。

【0828】

実施形態8．前記VEGF結合剤が、ヒトVEGF結合剤であるか、またはそれを含む、実施形態1～4または6のいずれか1つに記載の構築物。

【0829】

実施形態9．前記コード配列が、操作されたコード配列であるか、またはそれを含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の構築物。

【0830】

実施形態10．前記VEGF結合剤が、ヒト化VEGF結合剤であるか、またはそれを含む、実施形態1～4または9のいずれか1つに記載の構築物。

40

【0831】

実施形態11．前記VEGF結合剤が、少なくとも1つのVEGFタンパク質またはその断片に結合することができる、実施形態1～10のいずれか1つに記載の構築物。

【0832】

実施形態12．前記少なくとも1つのVEGFタンパク質が、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはそれらの組み合わせである、実施形態11に記載の構築物。

【0833】

50

実施形態 13. 前記少なくとも 1 つの V E G F タンパク質が、V E G F - A であるか、またはそれを含む、実施形態 11 に記載の構築物。

【0834】

実施形態 14. 前記 V E G F 結合剤が、少なくとも 1 つのポリペプチドを含む、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0835】

実施形態 15. 前記 V E G F 結合剤が、抗体もしくはその断片であるか、またはそれを含む、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0836】

実施形態 16. 前記抗体断片が、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ') 2 断片、F d 10 断片、F d ' 断片、相補性決定領域 (C D R)、単鎖 F v、または F c ドメインである、実施形態 15 に記載の構築物。

【0837】

実施形態 17. 前記 V E G F 結合剤が、免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン軽鎖、もしくはそれらの組み合わせであるか、またはそれを含む、実施形態 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0838】

実施形態 18. 前記 V E G F 結合剤が、

(i) 配列番号 16 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、

(i i) 配列番号 20 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、または

(i i i) それらの組み合わせ、

を含む、実施形態 1 ~ 15 または 17 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0839】

実施形態 19. 前記 V E G F 結合剤が、ラニビズマブであるか、またはそれを含む、実施形態 18 に記載の構築物。

【0840】

実施形態 20. 前記コード配列が、

(i) 配列番号 13 を含む核酸配列、

(i i) 配列番号 19 を含む核酸配列、または

(i i i) それらの組み合わせ、

を含む、実施形態 1 ~ 15 または 17 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0841】

実施形態 21. 前記コード配列が、それぞれがシグナルペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0842】

実施形態 22. 少なくとも 1 つの核酸配列が、インターロイキン 2 (I L 2) シグナルペプチドをコードする、実施形態 21 に記載の構築物。

【0843】

実施形態 23. 前記コード配列が、自己切断ペプチドをコードする 1 つ以上の配列を含む、実施形態 1 ~ 22 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0844】

実施形態 24. 前記自己切断ペプチドが、t h o s e a a s i g n a ウイルス 2 A (T 2 A) ペプチドである、実施形態 23 に記載の構築物。

【0845】

実施形態 25. 前記コード配列が、配列番号 21 に記載の核酸配列であるか、またはそれを含む、実施形態 1 ~ 15 または 17 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【0846】

実施形態 26. 前記 V E G F 結合剤が、

(i) 配列番号 24 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、

(i i) 配列番号 25 に記載のアミノ配列を含むポリペプチド、または

20

30

40

50

(i i i) それらの組み合わせ、
を含む、実施形態 1 ～ 15 または 17 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 4 7 】

実施形態 27 . 前記 V E G F 結合剤が、ペバシズマブであるか、またはそれを含む、実施形態 26 に記載の構築物。

【 0 8 4 8 】

実施形態 28 . 前記コード配列が、

(i) 配列番号 108 を含む核酸配列、

(i i) 配列番号 109 を含む核酸配列、または

(i i i) それらの組み合わせ、

を含む、実施形態 1 ～ 15、17、26、または 27 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 4 9 】

実施形態 29 . 前記コード配列が、それぞれがシグナルペプチドをコードする 1 つ以上の配列を含む、実施形態 26 ～ 28 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 0 】

実施形態 30 . 少なくとも 1 つの核酸配列が、I L 2 シグナルペプチドをコードする、実施形態 29 に記載の構築物。

【 0 8 5 1 】

実施形態 31 . 前記コード配列が、自己切断ペプチドをコードする 1 つ以上の配列を含む、実施形態 26 ～ 30 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 2 】

実施形態 32 . 前記自己切断ペプチドが、T 2 A ペプチドである、実施形態 31 に記載の構築物。

【 0 8 5 3 】

実施形態 33 . 前記コード配列が、配列番号 22 に記載の核酸配列であるか、またはそれを含む、実施形態 1 ～ 15、17、または 26 ～ 32 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 4 】

実施形態 34 . 前記 V E G F 結合剤が、F c ドメインを含む、実施形態 1 ～ 15 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 5 】

実施形態 35 . 前記 F c ドメインが配列番号 111 に記載のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ～ 15 または 34 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 6 】

実施形態 36 . 前記コード配列が、配列番号 110 に記載の核酸配列を含む、実施形態 1 ～ 15、34、または 35 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 7 】

実施形態 37 . 前記 V E G F 結合剤が V E G F 受容体の 1 つ以上の細胞外ドメインを含む、実施形態 1 ～ 15、または 34 ～ 36 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 5 8 】

実施形態 38 . 前記 V E G F 受容体の 1 つ以上の細胞外ドメインが、配列番号 112 に記載のアミノ配列を含む、実施形態 37 に記載の構築物。

【 0 8 5 9 】

実施形態 39 . 前記 V E G F 結合剤が V E G F 受容体の 2 つの細胞外ドメインを含む、実施形態 1 ～ 15、または 34 ～ 38 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 6 0 】

実施形態 40 . 前記コード配列が、それぞれがシグナルペプチドをコードする 1 つ以上の核酸配列を含む、実施形態 34 ～ 39 のいずれか 1 つに記載の構築物。

【 0 8 6 1 】

実施形態 41 . 少なくとも 1 つの核酸配列が、I L 2 シグナルペプチドをコードする、実施形態 40 に記載の構築物。

10

20

30

40

50

【0862】

実施形態42．前記コード配列及びプロモーターに隣接する、2つのAAV逆位末端反復（ITR）をさらに含む、実施形態1～41のいずれか1つに記載の構築物。

【0863】

実施形態43．前記2つのAAV ITRが、AAV2 ITRであるか、またはそれに由来する、実施形態42に記載の構築物。

【0864】

実施形態44．前記2つのAAV ITRが、配列番号45または47に記載の核酸配列を含む5' ITRと、配列番号46または48に記載の核酸配列を含む3' ITRと、を含む、実施形態42または43に記載の構築物。

10

【0865】

実施形態45．配列番号90、91、92、93、94、106、または107のいずれかに記載の核酸配列を含む、実施形態1に記載の構築物。

【0866】

実施形態46．配列番号95または96のいずれかに記載の核酸配列を含む、実施形態1に記載の構築物。

【0867】

実施形態47．実施形態1～46のいずれか1つに記載の構築物を含むAAV粒子。

【0868】

実施形態48．AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43、もしくはAAV Anc80カプシドであるか、またはそれに由来するAAVカプシドをさらに含む、実施形態47に記載のAAV粒子。

20

【0869】

実施形態49．前記AAVカプシドがAAV Anc80カプシドである、実施形態48に記載のAAV粒子。

【0870】

実施形態50．実施形態1～46のいずれか1つに記載の構築物を含む組成物。

【0871】

実施形態51．実施形態47～50のいずれか1つに記載のAAV粒子を含む組成物。

30

【0872】

実施形態52．前記AAV粒子が、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh39、AAV-rh43、もしくはAAV Anc80カプシドであるか、またはそれに由来するAAVカプシドを含む、実施形態51に記載の組成物。

【0873】

実施形態53．前記AAV粒子のAAVカプシドがAAV Anc80カプシドである、実施形態52に記載の組成物。

【0874】

実施形態54．前記AAV Anc80カプシドがAAV Anc80L65カプシドである、実施形態53に記載の組成物。

40

【0875】

実施形態55．前記組成物が医薬組成物であり、任意選択で前記医薬組成物が、8.10mMのリン酸二ナトリウム、1.5mMのリン酸一カリウム、2.7mMの塩化カリウム、172mMの塩化ナトリウム、及び0.001%のポロキサマー188（体積／体積%）を含む、実施形態50～54のいずれか1つに記載の組成物。

【0876】

実施形態56．薬学的に許容される担体をさらに含む、実施形態55に記載の組成物。

【0877】

実施形態57．約 1×10^{11} v g / mL ～ 約 1×10^{15} v g / mL の用量で製剤化

50

される、実施形態 55 または 56 に記載の組成物。

【0878】

実施形態 58 . 約 1×10^{10} ~ 約 1×10^{13} v g / 蝸牛の用量で製剤化される、実施形態 55 ~ 57 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0879】

実施形態 59 . 約 0.01 mL ~ 0.1 mL の容量で投与される、実施形態 55 ~ 58 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0880】

実施形態 60 . 実施形態 50 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の組成物を含む細胞。

【0881】

実施形態 61 . *in vivo*、*ex vivo*、または *in vitro* に存在する、実施形態 60 に記載の細胞。

【0882】

実施形態 62 . 哺乳動物細胞である、実施形態 60 または 61 に記載の細胞。

【0883】

実施形態 63 . 前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、実施形態 62 に記載の細胞。

【0884】

実施形態 64 . 細胞が不死化され、安定な細胞株を生成する、実施形態 60 に記載の細胞。

【0885】

実施形態 65 . 前記ヒト細胞が対象の耳の中に存在する、実施形態 63 に記載の細胞。

【0886】

実施形態 66 . 前記ヒト細胞が内耳細胞である、実施形態 63 に記載の細胞。

【0887】

実施形態 67 . 前記内耳細胞が、内有毛細胞、外有毛細胞、またはその両方である、実施形態 66 に記載の細胞。

【0888】

実施形態 68 . 実施形態 50 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の組成物を含むシステム。

【0889】

実施形態 69 . 内耳細胞を、実施形態 1 ~ 46 のいずれか 1 つに記載の構築物と接触させることを含む方法。

【0890】

実施形態 70 . 内耳細胞を、実施形態 47 ~ 49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子と接触させることを含む方法。

【0891】

実施形態 71 . 内耳細胞を、実施形態 50 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の組成物と接触させることを含む方法。

【0892】

実施形態 72 . 前記内耳細胞が外有毛細胞である、実施形態 69 ~ 71 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0893】

実施形態 73 . 前記内耳細胞が内有毛細胞である、実施形態 69 ~ 71 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0894】

実施形態 74 . 前記内耳細胞が対象の耳の中に存在する、実施形態 69 ~ 73 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0895】

実施形態 75 . 前記内耳細胞が *in vitro* または *ex vivo* に存在する、実施形態 69 ~ 73 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0896】

10

20

30

40

50

実施形態 76. 細胞を、

(i) 実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、ならびに

(ii) AAV Rep 遺伝子、AAV Cap 遺伝子、AAV VA 遺伝子、AAV E2a 遺伝子、及び AAV E4 遺伝子を含む 1 つ以上の構築物と接触させることを含む、方法。

【0897】

実施形態 77. 前記細胞が内耳細胞である、実施形態 76 に記載の方法。

【0898】

実施形態 78. 前記内耳細胞が外有毛細胞である、実施形態 77 に記載の方法。

【0899】

実施形態 79. 前記内耳細胞が内有毛細胞である、実施形態 77 に記載の方法。

【0900】

実施形態 80. 前記内耳細胞が *in vitro* または *ex vivo* に存在する、実施形態 77～79 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0901】

実施形態 81. 実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物を対象の内耳に導入することを含む方法。

【0902】

実施形態 82. 実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子を対象の内耳に導入することを含む方法。

【0903】

実施形態 83. 実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を対象の内耳に導入することを含む方法。

【0904】

実施形態 84. 前記構築物、AAV 粒子、または組成物が前記対象の蝸牛に導入される、実施形態 81～83 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0905】

実施形態 85. 前記構築物、AAV 粒子、または組成物が正円窓膜注入によって導入される、実施形態 81～84 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0906】

実施形態 86. 前記対象の聴力レベルを測定することをさらに含む、実施形態 69～75 及び 81～85 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0907】

実施形態 87. 聴力レベルが、聴性脳幹反応 (ABR) 検査を実施することによって測定される、実施形態 86 に記載の方法。

【0908】

実施形態 88. 前記対象の聴力レベルを基準聴力レベルと比較することをさらに含む、実施形態 86 または 87 に記載の方法。

【0909】

実施形態 89. 前記基準聴力レベルが、公表されたまたは過去の基準聴力レベルである、実施形態 88 に記載の方法。

【0910】

実施形態 90. 前記対象の聴力レベルが、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入した後に測定され、前記基準聴力レベルが、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入する前に測定された前記対象の聴力レベルである、実施形態 89 に記載の方法。

【0911】

実施形態 91. 対象における血管内皮増殖因子 (VEGF) 結合剤またはその一部のレ

10

20

30

40

50

ベルを測定することをさらに含む、実施形態 69～75 及び 81～90 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0912】

実施形態 92．前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部のレベルが前記対象の内耳で測定される、実施形態 91 に記載の方法。

【0913】

実施形態 93．前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部のレベルが前記対象の蝸牛で測定される、実施形態 91 または 92 に記載の方法。

【0914】

実施形態 94．前記対象における血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部のレベルを、血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部の基準レベルと比較することをさらに含む、実施形態 69～75 及び 81～93 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0915】

実施形態 95．前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部の基準レベルが、血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部の公表されたまたは過去の基準レベルである、実施形態 94 に記載の方法。

【0916】

実施形態 96．前記対象における前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部のレベルが、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入した後に測定され、前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部の基準レベルが、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入する前に測定された前記対象の前記血管内皮増殖因子（VEGF）結合剤またはその一部のレベルである、実施形態 91～95 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0917】

実施形態 97．対象の腫瘍の体積を測定することをさらに含む、実施形態 69～75 及び 81～96 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0918】

実施形態 98．前記対象の腫瘍の体積を基準腫瘍体積と比較することをさらに含む、実施形態 97 に記載の方法。

【0919】

実施形態 99．前記基準腫瘍体積が、公表されたまたは過去の基準腫瘍体積である、実施形態 98 に記載の方法。

【0920】

実施形態 100．前記対象の腫瘍の体積が、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入した後に測定され、前記基準腫瘍体積が、実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を導入する前に測定された前記対象の腫瘍の体積である、実施形態 97～99 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0921】

実施形態 101．実施形態 1～46 のいずれか 1 つに記載の構築物、実施形態 47～49 のいずれか 1 つに記載の AAV 粒子、または実施形態 50～59 のいずれか 1 つに記載の組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、難聴を治療する、または内耳障害を治療する方法。

【0922】

実施形態 102．前記対象が、新生血管形成を特徴とする耳科疾患に罹患しているか、またはそのリスクがある、実施形態 74 及び 81～101 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0923】

実施形態103．前記耳科疾患が、前庭神経鞘腫であるか、またはそれを含む、実施形態102に記載の方法。

【0924】

実施形態104．前記前庭神経鞘腫が、片側進行性前庭神経鞘腫である、実施形態103に記載の方法。

実施形態105．前記前庭神経鞘腫を有する対象が、神経線維腫症2型（NF2）を有する、実施形態104に記載の方法。

【0925】

実施形態106．前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状が緩和または軽快される、実施形態102～105のいずれか1つに記載の方法。 10

【0926】

実施形態107．前記1つ以上の症状が、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、死亡、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態106に記載の方法。

【0927】

実施形態108．前庭神経鞘腫を治療する方法である、実施形態69～75、81～102、及び104～107のいずれか1つに記載の方法。 20

【0928】

実施形態109．VEGFのレベルを調節する方法である、実施形態69～75及び81～107のいずれか1つに記載の方法。

【0929】

実施形態110．活性VEGFのレベルを調節する方法である、実施形態69～75及び81～107のいずれか1つに記載の方法。

【0930】

実施形態111．VEGFの活性を低下する方法である、実施形態69～75及び81～107のいずれか1つに記載の方法。

【0931】

実施形態112．新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする前記耳科疾患の治療に使用するための、実施形態1～46のいずれか1つに記載の構築物。 30

【0932】

実施形態113．新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする前記耳科疾患の治療に使用するための、実施形態47～49のいずれか1つに記載のAAV粒子。

【0933】

実施形態114．新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状を特徴とする前記耳科疾患の治療に使用するための、実施形態50～59のいずれか1つに記載の組成物。 40

【0934】

実施形態115．前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状が、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、死亡、もしくはそれらの組み合わせを含む、実施形態112に記載の構築物、実施形態113に記載のAAV粒子、または実施形態114に記載の組成物。

【0935】

実施形態116．新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する1つ以上の症状を 50

特徴とする前記耳科疾患を治療するための医薬を製造するための、実施形態 1 ～ 46 のいずれか 1 つに記載の構築物の使用。

【0936】

実施形態 117. 新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する 1 つ以上の症状を特徴とする前記耳科疾患を治療するための医薬を製造するための、実施形態 47 ～ 49 のいずれか 1 つに記載の粒子の使用。

【0937】

実施形態 118. 新生血管形成及び／または前記耳科疾患に関連する 1 つ以上の症状を特徴とする前記耳科疾患を治療するための医薬を製造するための、実施形態 50 ～ 59 のいずれか 1 つに記載の組成物の使用。

【0938】

実施形態 119. 前記耳科疾患に関連する 1 つ以上の症状が、難聴、有毛細胞の変性、内耳液の生化学的環境の変化、迷路内タンパク質の上昇、内リンパ水腫、蝸牛開口部閉塞、迷路内出血、蝸牛血管供給の途絶、耳鳴り、めまい、難治性頭痛、顔面神経障害、三叉神経障害、顔面麻痺、顔面の感覚異常、水頭症、小脳ヘルニア、死亡、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態 116 ～ 118 のいずれか 1 つに記載の使用。

【0939】

実施形態 120. 安定な細胞株であるか、またはそれを含む、実施形態 60 ～ 67 のいずれか 1 つに記載の 1 つ以上の細胞を含む細胞の集団。

【0940】

実施形態 121. 実施形態 50 ～ 59 のいずれか 1 つに記載の組成物を含むキット。

【0941】

実施形態 122. 前記組成物がデバイスに予め充填されている、実施形態 121 に記載のキット。

【0942】

実施形態 123. 前記デバイスがマイクロカテーテルである、実施形態 122 に記載のキット。

【0943】

実施形態 124. 前記マイクロカテーテルが、外耳道を介して中耳腔に進入し、前記マイクロカテーテルの末端を RWM に接触させることができるような形状となっている、実施形態 123 に記載のキット。

【0944】

実施形態 125. 前記マイクロカテーテルの遠位端が、10 ～ 1000 ミクロンの間の直径を有する少なくとも 1 つのマイクロニードルから構成される、実施形態 123 または 124 に記載のキット。

【0945】

実施形態 126. デバイスをさらに含む、実施形態 121 ～ 125 のいずれか 1 つに記載のキット。

【0946】

実施形態 127. 前記デバイスが、図 29 ～ 32 のいずれか 1 つに記載のデバイスである、実施形態 126 に記載のキット。

【0947】

実施形態 128. 前記デバイスが、曲げ部及び傾斜先端を含む針を含む、実施形態 122 ～ 127 のいずれか 1 つに記載のキット。

【0948】

実施形態 129. 前記構築物または AAV 粒子が、対象に投与されたときに、抗 VEGF タンパク質が、前記対象の外リンパで検出可能なレベルで発現することを特徴とする、実施形態 81 ～ 111 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0949】

実施形態 130. 前記抗 VEGF タンパク質が、約 20 ng/mL ～ 約 1000 ng/mL

10

20

30

40

50

m L の範囲で発現する、実施形態 1 2 9 に記載の方法。

【0950】

実施形態 1 3 1：前記構築物または A A V 粒子が、対象に投与される際に、抗 V E G F タンパク質が、血清、C S F、もしくは非蝸牛組織、またはこれらの組み合わせにおいて、検出可能なレベルで存在しないことを特徴とする、実施形態 8 1～1 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0951】

実施形態 1 3 2：前記非蝸牛組織が、肝臓、脳神経、脾臓、下顎リンパ節、腋窩リンパ節、及び鼠経リンパ節の 1 つ以上から選択される、実施形態 1 3 1 に記載の方法。

【0952】

実施形態 1 3 3：前記構築物または A A V 粒子が、対象に投与される際に、抗 V E G F タンパク質の、用量依存的な発現が観察されることを特徴とする、実施形態 8 1～1 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0953】

実施形態 1 3 4：前記構築物または A A V 粒子が、対象に投与される際に、抗 V E G F タンパク質が、V S が発見される耳部の 1 つ以上の位置に、または、その付近に存在することを特徴とする、実施形態 8 1～1 1 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0954】

実施形態 1 3 5：前記 V S が、早期 V S または後期 V S を含む、実施形態 1 3 4 に記載の方法。

【0955】

実施形態 1 3 6：前記 V S がグレード I、グレード II、グレード III、またはグレード IV V S を含む、実施形態 1 3 4 に記載の方法。

【0956】

実施形態 1 3 7：前記 V S 位置が、内耳道（I A C）底からの距離を特徴とする、実施形態 1 3 4 に記載の方法。

【0957】

実施形態 1 3 8：前記位置が、I A C 底から約 1～5 mm である、実施形態 1 3 7 に記載の方法。

【0958】

実施形態 1 3 9：前記位置が、I A C 底から約 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、または 5 mm である、実施形態 1 3 8 に記載の方法。

【0959】

実施形態 1 4 0：前記抗 V E G F タンパク質が、生物学的に活性な閾値で、または、これを上回って存在する、実施形態 1 3 4～1 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0960】

実施形態 1 4 1：前記 A A V 粒子または構築物が対象に投与される、実施形態 1 1 2～1 1 9 のいずれか 1 つに記載の使用。

【0961】

実施形態 1 4 2：前記構築物または A A V 粒子が、対象に投与されたときに、抗 V E G F タンパク質が、前記対象の外リンパで検出可能なレベルで発現することを特徴とする、実施形態 1 4 1 に記載の使用。

【0962】

実施形態 1 4 3：前記抗 V E G F タンパク質が、約 20 ng / m L～約 1000 ng / m L の範囲で発現する、実施形態 1 4 2 に記載の使用。

【0963】

実施形態 1 4 4：前記構築物または A A V 粒子が、対象に投与される際に、抗 V E G F タンパク質が、血清、C S F、もしくは非蝸牛組織、またはこれらの組み合わせにおいて、検出可能なレベルで存在しないことを特徴とする、実施形態 1 4 1 に記載の使用。

【0964】

10

20

30

40

50

実施形態 145：非蝸牛組織が、肝臓、脳神経、脾臓、下顎リンパ節、腋窩リンパ節、及び鼠経リンパ節の 1 つ以上から選択される、実施形態 144 に記載の使用。

【0965】

実施形態 146：前記構築物または AAV 粒子が、対象に投与される際に、抗 VEGF タンパク質の、用量依存的な発現が観察されることを特徴とする、実施形態 141 に記載の使用。

【0966】

実施形態 147：前記構築物または AAV 粒子が、対象に投与される際に、抗 VEGF タンパク質が、VS が発見される耳部の 1 つ以上の位置に、または、その付近に存在することを特徴とする、実施形態 141 に記載の使用。

【0967】

実施形態 148：前記 VS が、早期 VS または後期 VS を含む、実施形態 147 に記載の使用。

【0968】

実施形態 149：前記 VS がグレード I、グレード II、グレード III、またはグレード IV VS を含む、実施形態 148 に記載の使用。

【0969】

実施形態 150：前記 VS 位置が、内耳道（IAC）底からの距離を特徴とする、実施形態 147 に記載の使用。

【0970】

実施形態 151：前記位置が、IAC 底から約 1～5 mm である、実施形態 147 に記載の使用。

【0971】

実施形態 152：前記位置が、IAC 底から約 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、または 5 mm である、実施形態 151 に記載の使用。

【0972】

実施形態 153：前記抗 VEGF タンパク質が、生物学的に活性な閾値で、または、これを上回って存在する、実施形態 147～152 のいずれか 1 つに記載の使用。

【0973】

実施形態 154：前記対象が、以下の特徴：(i) 片側（例えば、散在性）進行性 VS（互いに 24 ヶ月以内（最低でも 6 ヶ月の間隔を空ける）に生じる、連続した MRI スキャンにおいて、体積が 20% 以上増えたことが文書化されている単独腫瘍として定義される）の存在であって、最も近い MRI は、本明細書に開示される組成物の投与前 6 ヶ月以内に入手される；(ii) 最初の MRI において最大寸法が 2 mm を超える腫瘍が存在し、該腫瘍は、適格性を判定するために使用され、単一のシーケンス中の少なくとも 3 つのスライスにて目視できる；(iii) 最大の補助を受けた条件下での、40% 以下の言葉認識スコア（WRS）、または、影響を受けた耳での、>90 dB HL の純音聴力検査閾値（250～8000 Hz にまたがる）として定義される、重度の難聴；(iv) rAAV-抗 VEGF の投与時点で、少なくとも 18 歳である；(v) 出産可能である場合、投与期間中に、効果的な避妊法を用いることに同意している；(vi) rAAV-抗 VEGF が投与される臨床試験に参加する場合、インフォームドコンセントプロセスを上手く完了することにより明示される、臨床要件全てを遵守する意志がある；及び、(vii) rAAV-抗 VEGF が投与される臨床試験に参加する場合、試験終了後に、別個の長期間追跡（LTFU）研究プロトコルに参加する意志があるのうちの 1 つ以上、または全てを有する、請求項 81～111、または 129～140 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0974】

実施形態 155：本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗 VEGF が投与される対象は、以下の特徴：(i)（IAC 成分を除く）小脳橋角における最大寸法が、1.5 cm 以上である腫瘍；または、1 年間の、追加の観察期間によって、対象が、さらなる腫瘍関連後遺症（難聴を除く）に、高リスクで曝されること；または、脳幹と接触せ

10

20

30

40

50

ず、小脳橋角まで1.5cm以上伸びない腫瘍；(ii) NF2の以前の診断、及び／または、両側VSを有する以前の診断；(iii) VSに対する手術または放射線療法；(iv) 若年性白内障、膠腫、脳室上衣腫、神経線維腫、または2つ以上の髄膜腫の診断または病歴；(v) 影響を受けた耳において内リンパ水腫と一致する病歴（文書化された変動感音性難聴、及び／または、偶発性目眩）；(vi) 影響を受けていない耳における、前庭機能低下の病歴；(vii) 現行の手術もしくは全身麻酔、またはコルチコステロイドの使用に禁忌を示す、医学的または心理的状态；(viii) 外科的アプローチを除く、耳の解剖学的異常、例えば、道閉鎖；(ix) 対比（例えば、腎不全、深刻な閉所恐怖症、または、非MRI適合性移植を有する参加者）による日常的な高解像MRIを入手するための、何らかの禁忌；(x) 影響を受けた耳における、中耳滲出の証拠；(xi) rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、活性中耳炎（AOM）、外耳炎、または、外科的アプローチを一時的に除く、他の同様の感染症、または、このような病歴；(xii) rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、以前の中耳または内耳手術；(xiii) 12ヶ月以内の、妊娠、泌乳、または、妊娠計画（男性または女性）；(xiv) 投与前（0日目）6ヶ月以内の、長期的にコルチコステロイドの使用（全身または経口）；(xv) 周術期での使用が計画されているVEGF阻害剤または他の投薬に対する、既知の感度またはアレルギー；(xvi) 脳血管疾患の病歴、または現在の診断；(xvii) 治験薬の臨床治験への、投与前（0日目）6ヶ月以内での参加、または、以前の、遺伝子療法臨床治験への参加；(xviii) rAAV-抗VEGFを投与する治験の過程において追跡調査の完了を可能にしない、及び／または、治験責任医師の意見で、参加者候補が治験に不適格となる任意の他の状態；(xix) rAAV-抗VEGFを投与する治験に参加している場合、対象が、治験中の要件全て及び追跡を遵守する意志ないこと、または、能力がないこと；ならびに、(xx) 最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア（WRS）、または、影響を受けていない耳での、>90dB HLの純音聴力検査閾値（250～8000Hzにまたがる）として定義される、重度の難聴の1つ以上もしくは全て、または、任意の組み合わせを有しない、請求項81～111、または129～140のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

【0975】

実施形態156：前記対象が、以下の特徴：(i) 片側（例えば、散在性）進行性VS（互いに24ヶ月以内（最低でも6ヶ月の間隔を空ける）に生じる、連続したMRIスキャンにおいて、体積が20%以上増えたことが文書化されている単独腫瘍として定義される）の存在であって、最も近いMRIは、本明細書に開示される組成物の投与前6ヶ月以内に入手される；(ii) 最初のMRIにおいて最大寸法が2mmを超える腫瘍が存在し、該腫瘍は、適格性を判定するために使用され、単一のシーケンス中の少なくとも3つのスライスにて目視できる；(iii) 最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア（WRS）、または、影響を受けた耳での、>90dB HLの純音聴力検査閾値（250～8000Hzにまたがる）として定義される、重度の難聴；(iv) rAAV抗VEGFの投与時点で、少なくとも18歳である；(v) 出産可能である場合、投与期間中に、効果的な避妊法を用いることに同意している；(vi) rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、インフォームドコンセントプロセスを上手く完了することにより明示される、臨床要件全てを遵守する意志がある；及び、(vii) rAAV-抗VEGFが投与される臨床治験に参加する場合、治験終了後に、別個の長期間追跡（LTFU）研究プロトコルに参加する意志があるうちの1つ以上、もしくは全て、または、任意の組み合わせを有する、請求項112～119、または141～153のいずれか1項に記載の使用。

【0976】

実施形態157：本明細書に開示される組成物、例えば、rAAV-抗VEGFが投与される対象は、以下の特徴：(i) (IAC成分を除く) 小脳橋角における最大寸法が、1.5cm以上である腫瘍；または、1年間の、追加の観察期間によって、対象が、さら

50

なる腫瘍関連後遺症（難聴を除く）に、高リスクで曝されること；または、脳幹と接触せず、小脳橋角まで1.5 cm以上伸びない腫瘍；（i i）NF 2の以前の診断、及び／または、両側VSを有する以前の診断；（i i i）VSに対する手術または放射線療法；（i v）若年性白内障、膠腫、脳室上衣腫、神経線維腫、または2つ以上の髄膜腫の診断または病歴；（v）影響を受けた耳において内リンパ水腫と一致する病歴（文書化された変動感音性難聴、及び／または、偶発性目眩）；（v i）影響を受けていない耳における、前庭機能低下の病歴；（v i i）現行の手術もしくは全身麻酔、またはコルチコステロイドの使用に禁忌を示す、医学的または心理的状态；（v i i i）外科的アプローチを除く、耳の解剖学的異常、例えば、道閉鎖；（i x）対比（例えば、腎不全、深刻な閉所恐怖症、または、非MRI適合性移植を有する参加者）による日常的な高解像MRIを入手するための、何らかの禁忌；（x）影響を受けた耳における、中耳滲出の証拠；（x i）rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、活性中耳炎（AOM）、外耳炎、または、外科的アプローチを一時的に除く、他の同様の感染症、または、このような病歴；（x i i）rAAV-抗VEGFの投与前（0日目）6週間以内に、影響を受けた耳における、以前の中耳または内耳手術；（x i i i）12ヶ月以内の、妊娠、泌乳、または、妊娠計画（男性または女性）；（x i v）投与前（0日目）6ヶ月以内の、長期的にコルチコステロイドの使用（全身または経口）；（x v）周術期での使用が計画されているVEGF阻害剤または他の投薬に対する、既知の感度またはアレルギー；（x v i）脳血管疾患の病歴、または現在の診断；（x v i i）治験薬の臨床治験への、投与前（0日目）6ヶ月以内での参加、または、以前の、遺伝子療法臨床治験への参加；（x v i i i）rAAV-抗VEGFを投与する治験の過程において追跡調査の完了を可能にしない、及び／または、治験責任医師の意見で、参加者候補が治験に不適格となる任意の他の状態。（x i x）rAAV-抗VEGFを投与する治験に参加している場合、対象が、治験中の要件全て及び追跡を遵守する意志ないこと、または、能力がないこと；ならびに、（x x）最大の補助を受けた条件下での、40%以下の言葉認識スコア（WRS）、または、影響を受けていない耳での、>90 dB HLの純音聴力検査閾値（250～8000 Hzにまたがる）として定義される、重度の難聴の1つ以上もしくは全て、または、任意の組み合わせを有しない、請求項112～119、または141～153のいずれか1項に記載の方法。

10

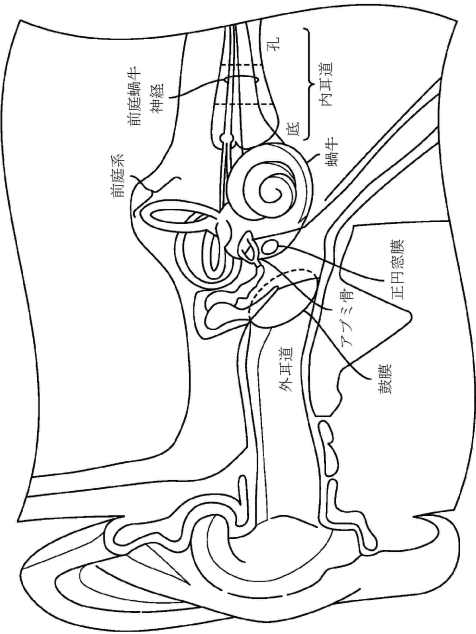
20

30

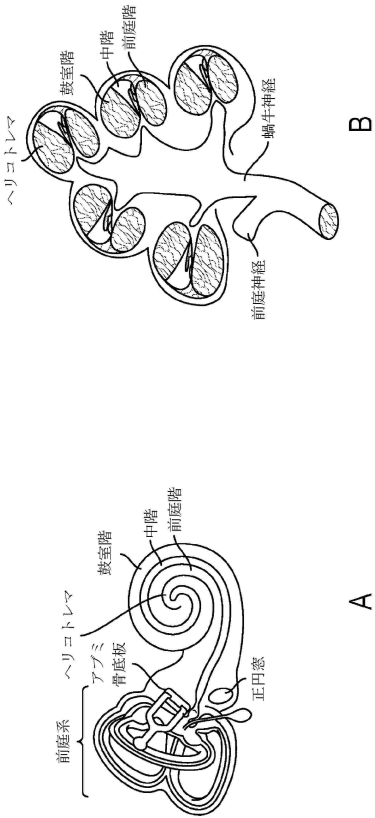
40

50

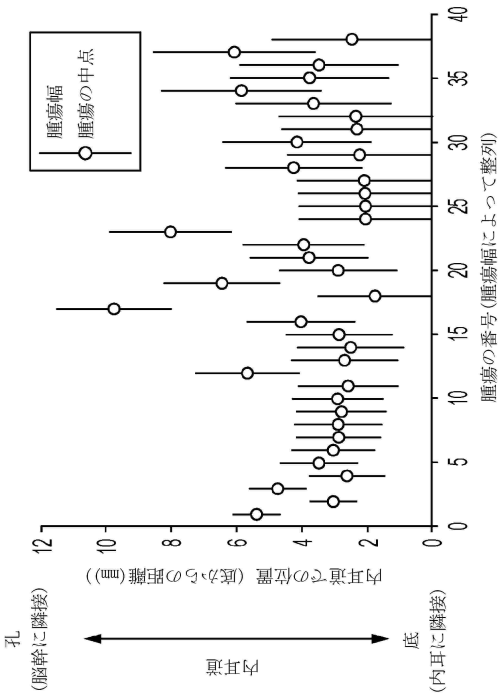
【図面】
【図 1】



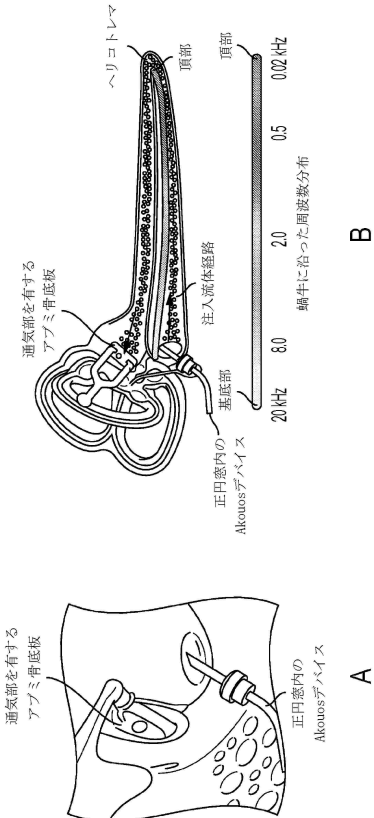
【図 3】



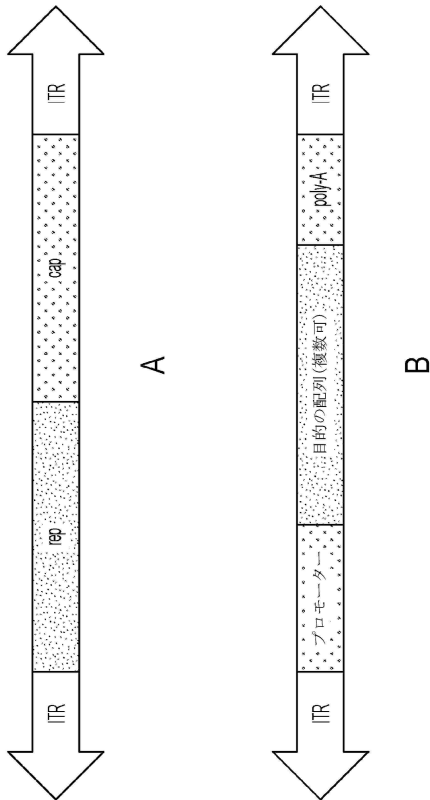
【図 2】



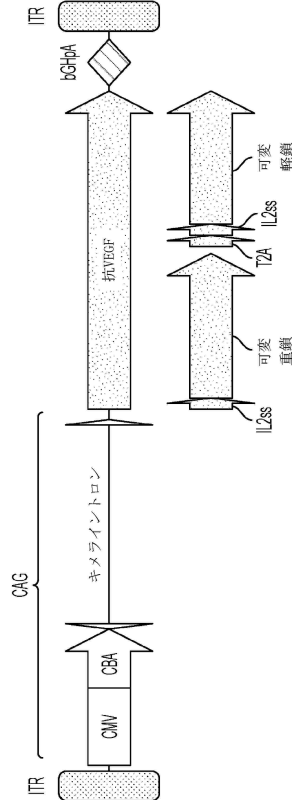
【図 4】



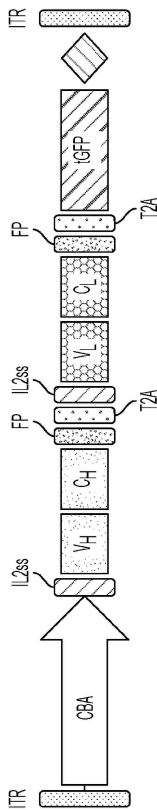
【図 5】



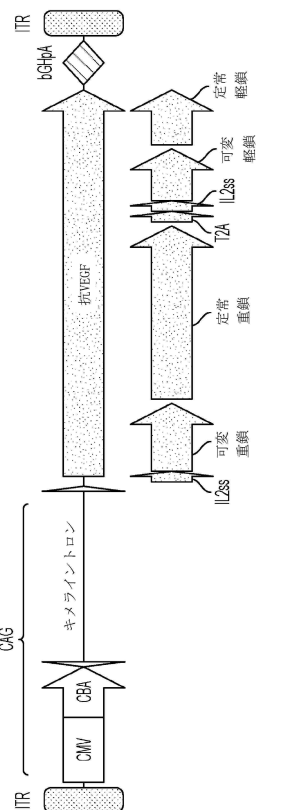
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

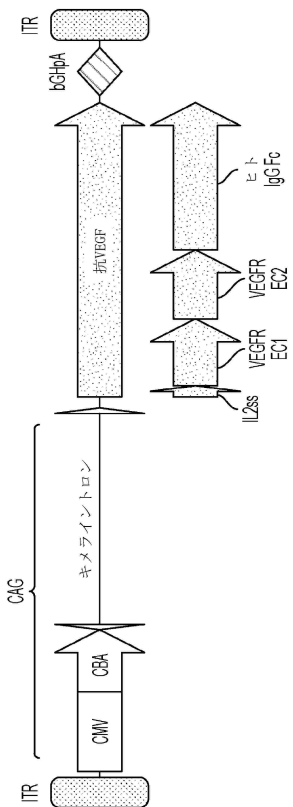
20

30

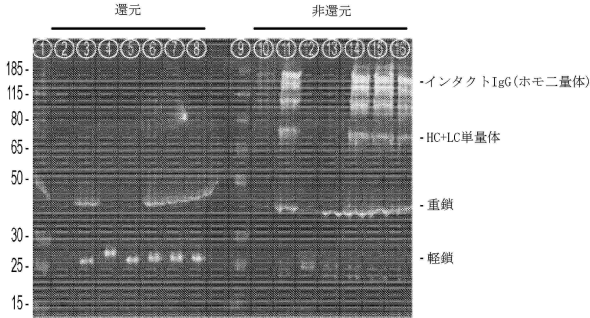
40

50

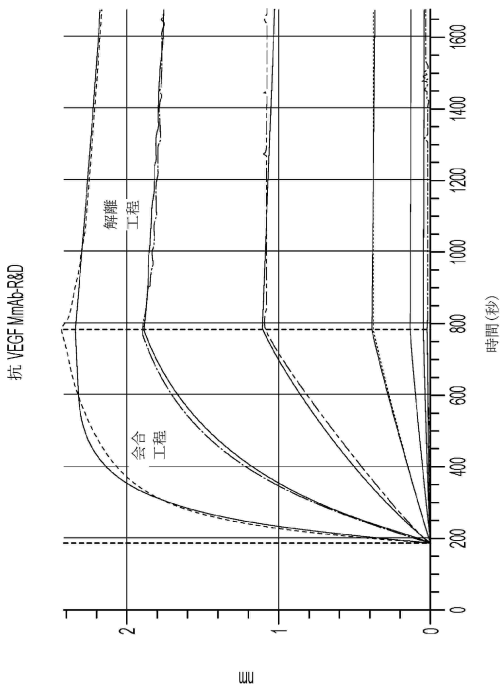
【図 6 D】



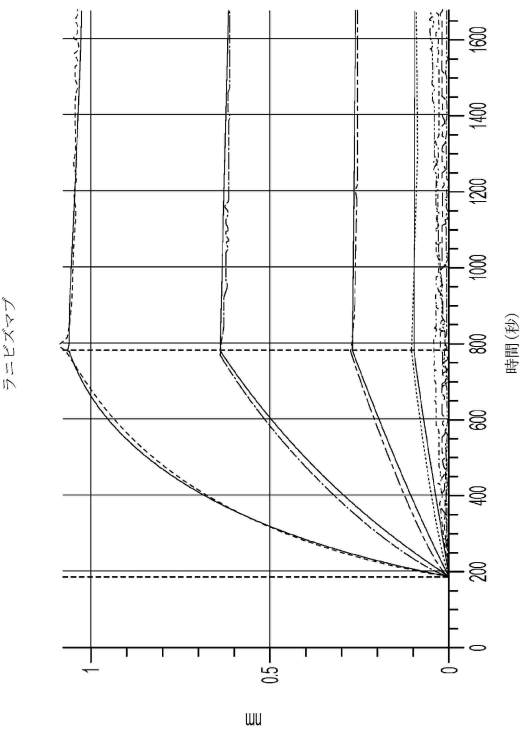
【図 7】



【図 8 A】



【図 8 B】



10

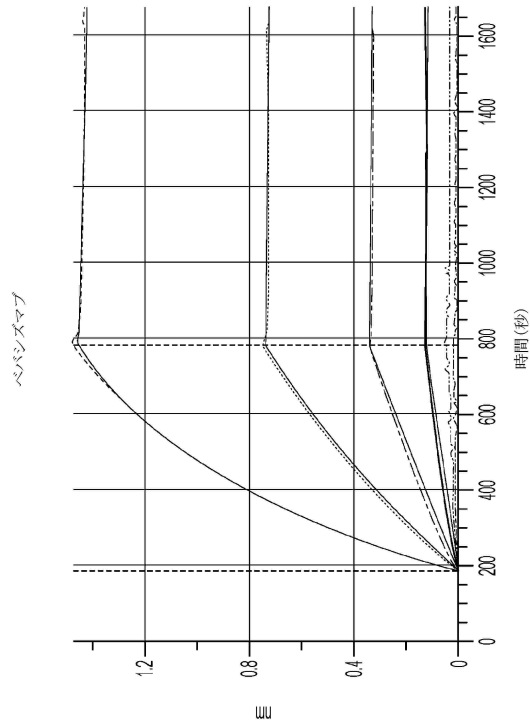
20

30

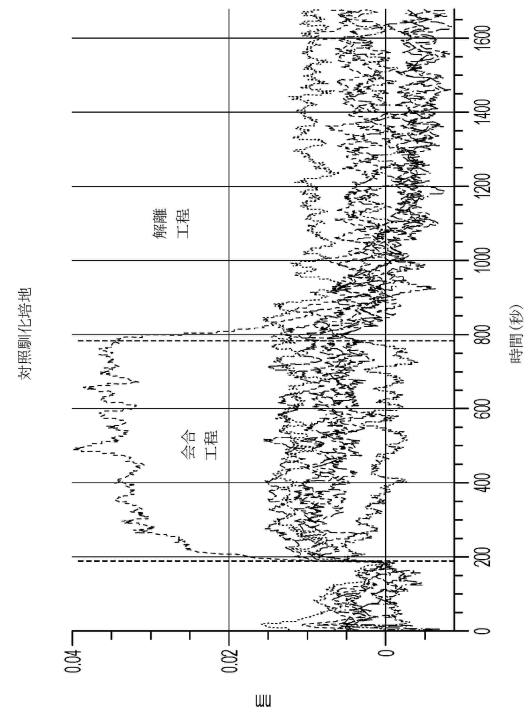
40

50

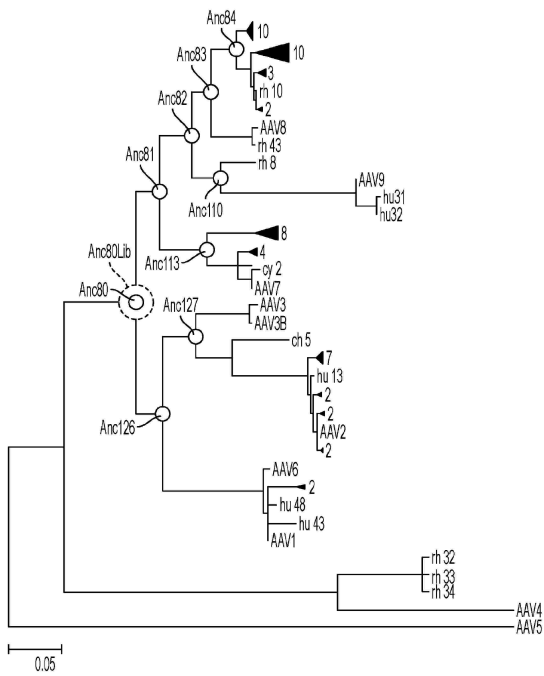
【図 8 C】



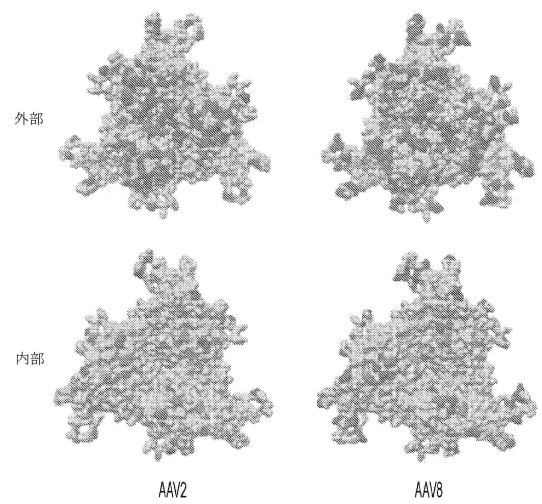
【図 8 D】



【図 9】



【図 10】



10

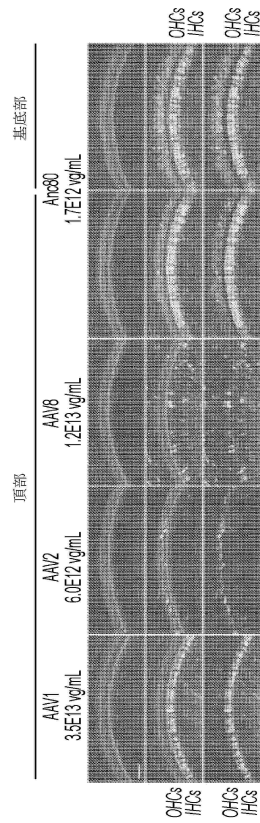
20

30

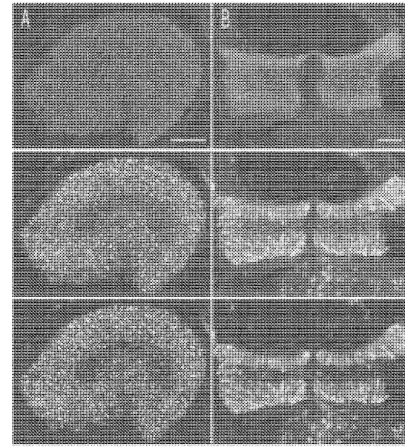
40

50

【図 1 1】



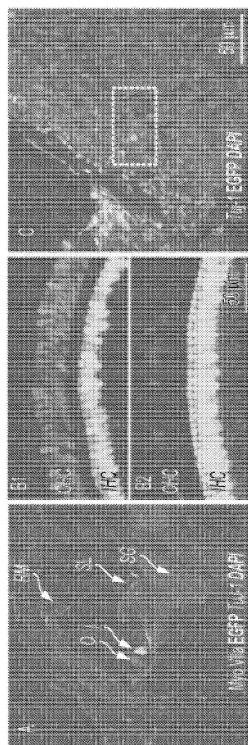
【図 1 2】



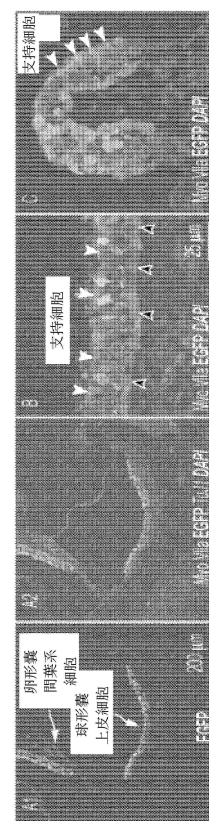
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

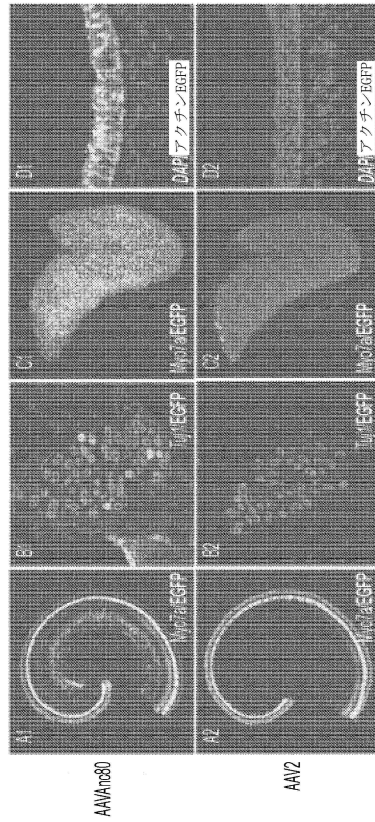


30

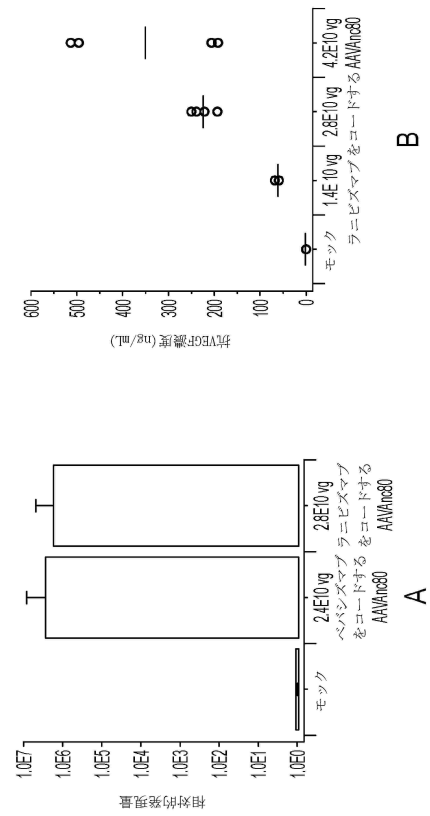
40

50

【図 1 5】



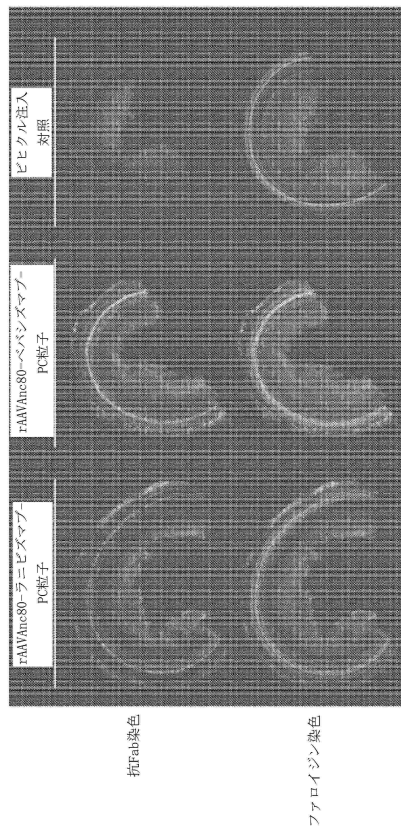
【図 1 6】



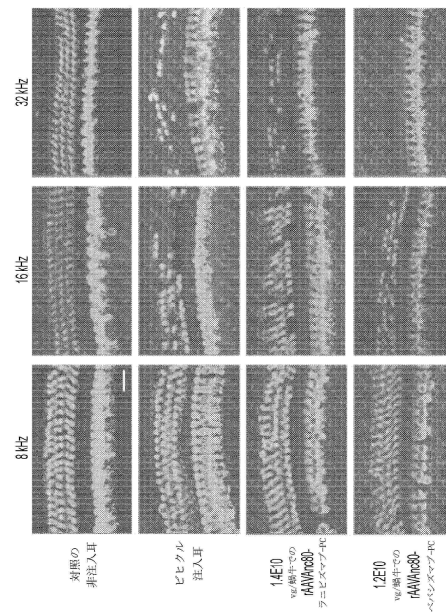
10

20

【図 1 7】



【図 1 8】

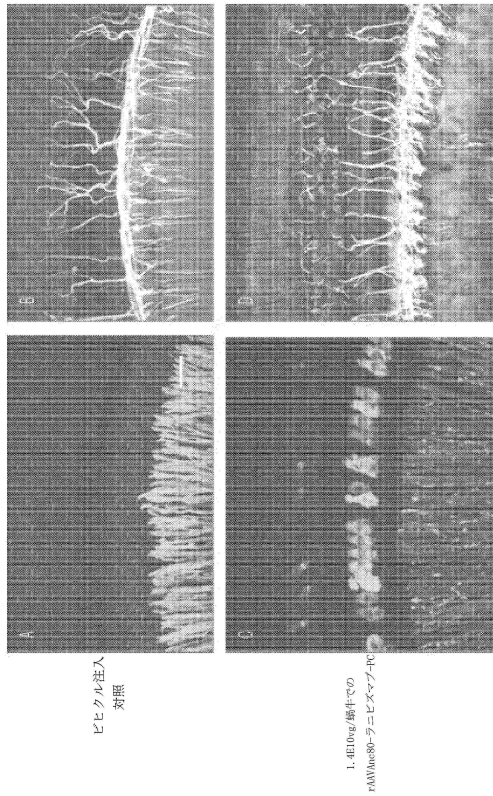


30

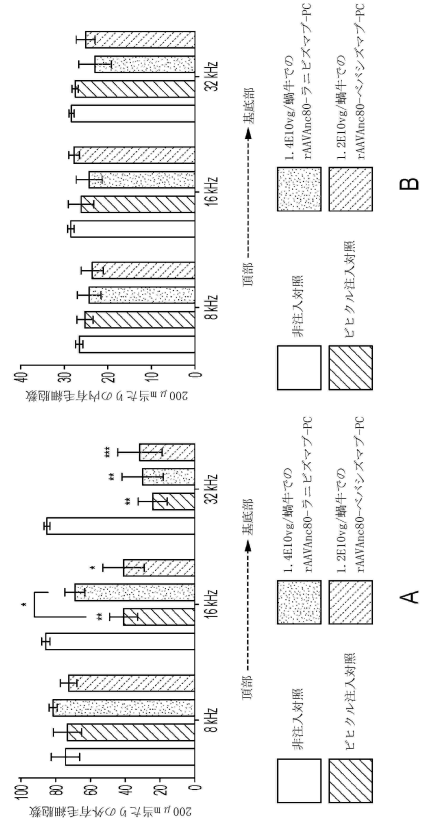
40

50

【図 19】



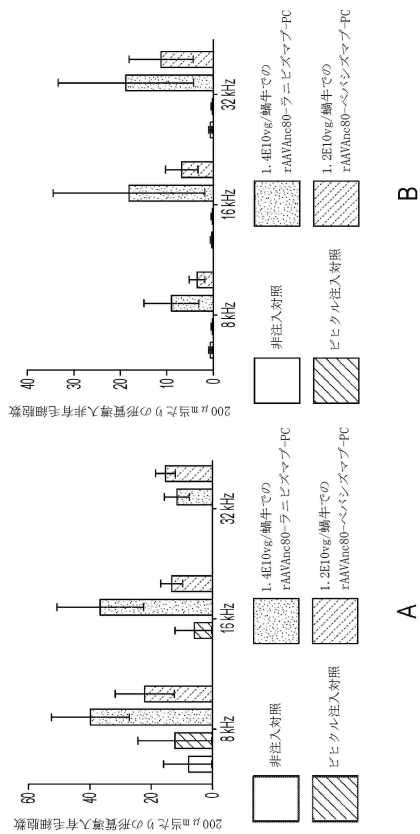
【図 20】



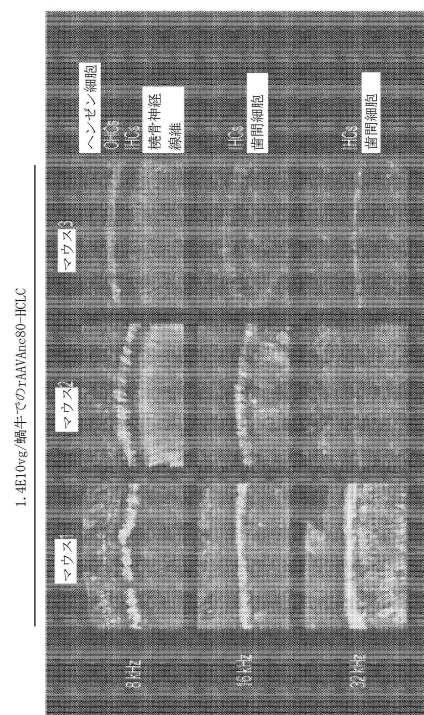
10

20

【図 21】



【図 22】

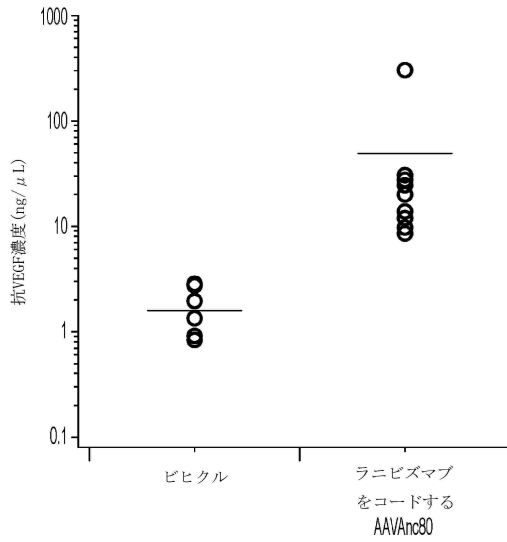


30

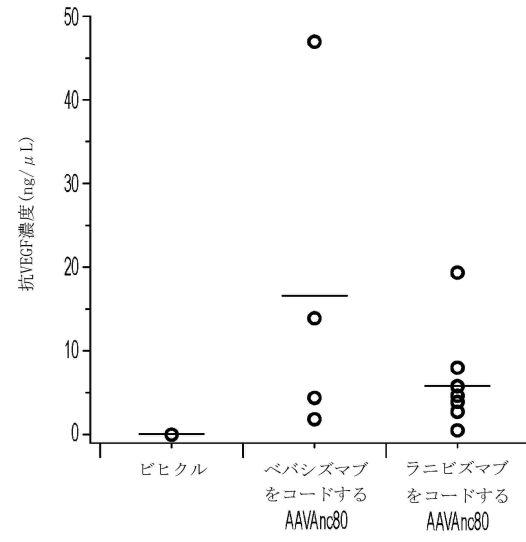
40

50

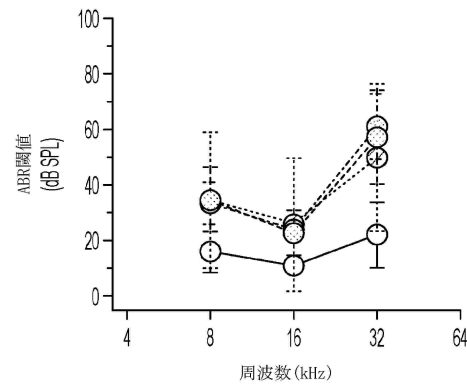
【図 2 3】



【図 2 4】

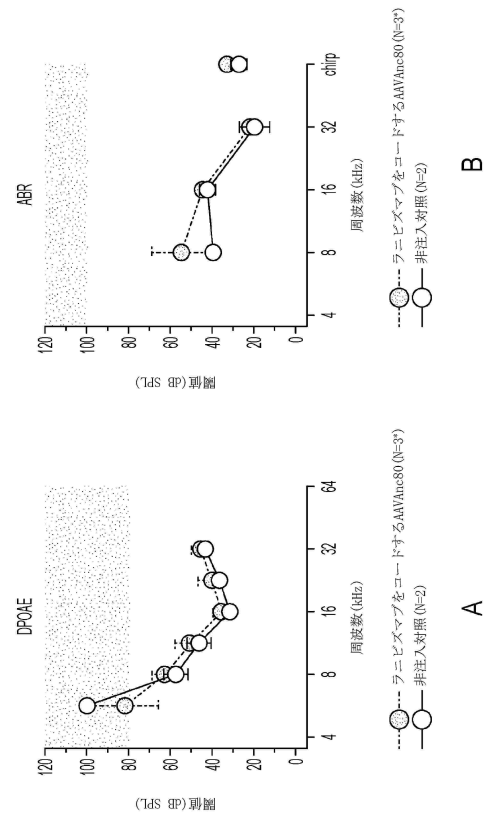


【図 2 5】



- ラニビズマブをコードする AAVAnc80 (N=10)
- ペパシズマブをコードする AAVAnc80 (N=10)
- · - · - ○ - · - · - ビヒクル対照 (N=10)
- ベースライン (N=30)

【図 2 6】



10

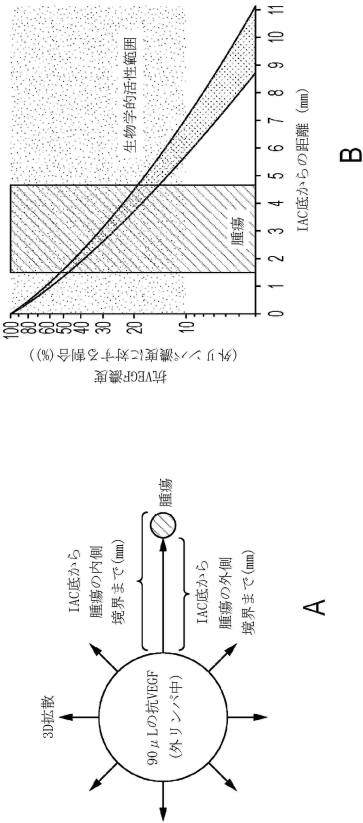
20

30

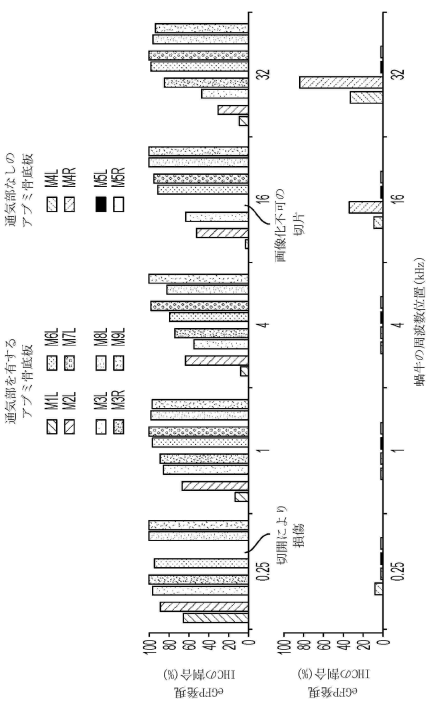
40

50

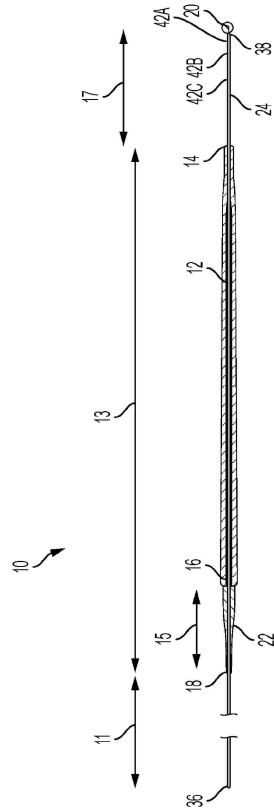
【図 2 7】



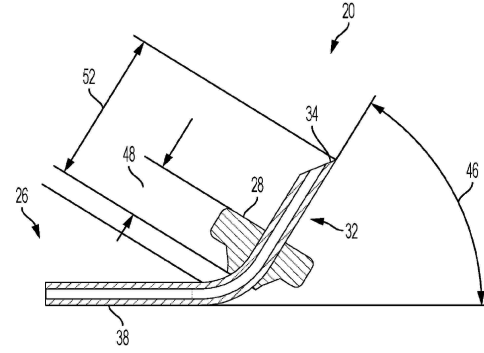
【図 2 8】



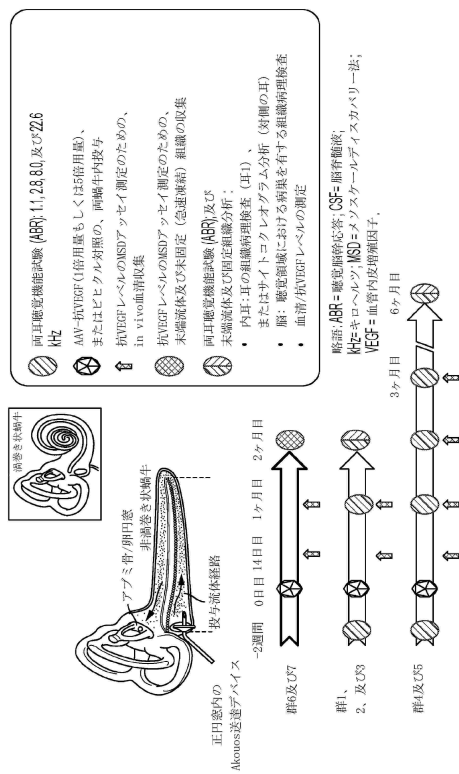
【図 3 1】



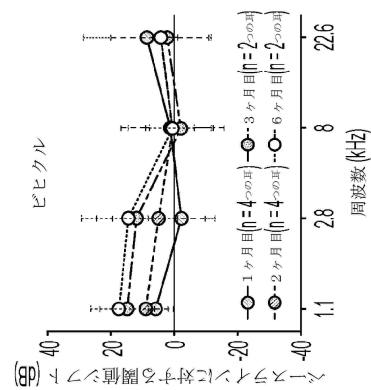
【図 3 2】



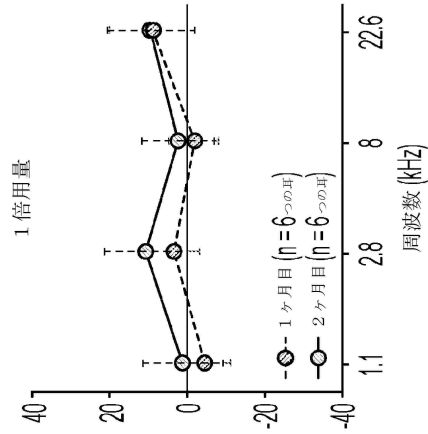
【図 3 3】



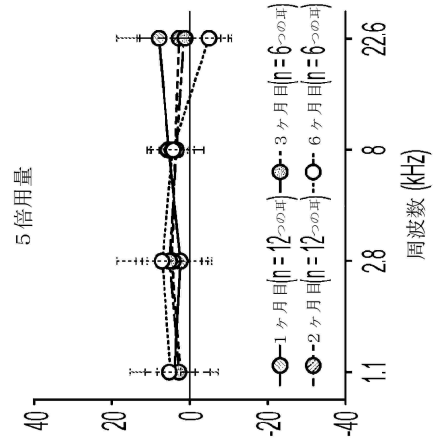
【図 3 4 A】



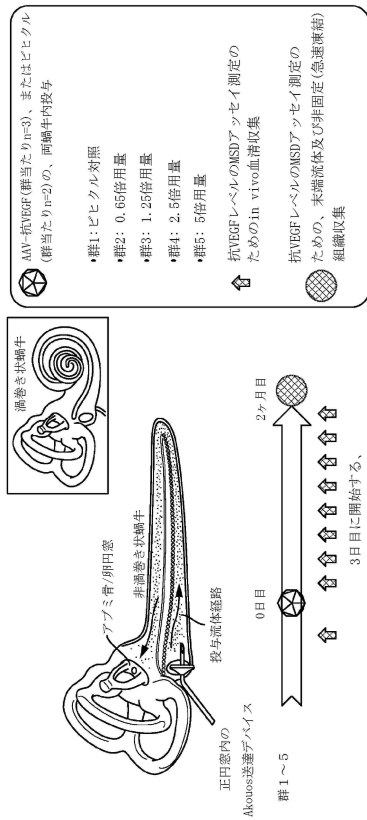
【図 3 4 B】



【図 3 4 C】

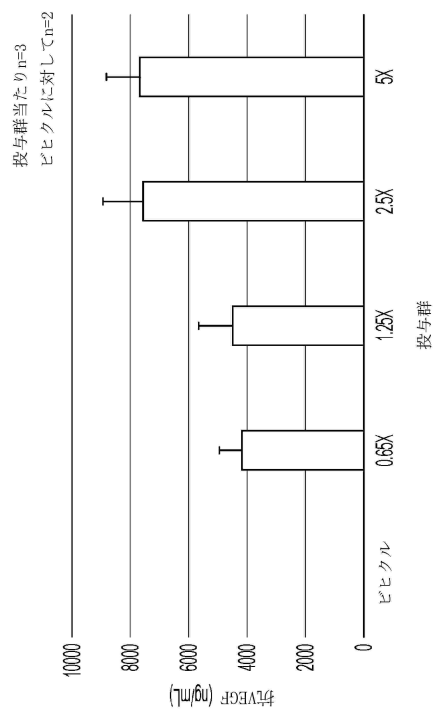


【図 3 5】

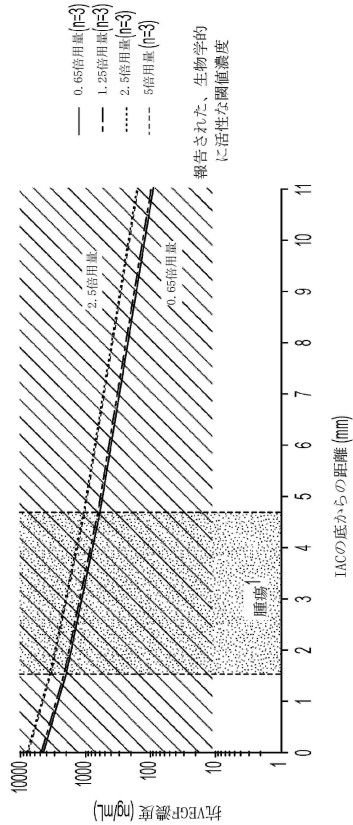


略語: CSF=脳脊髄液; NHP=非ヒト霊長類 (複数可); MSD=メソスケールディスプレイ法; VEGF=血管内皮増殖因子;

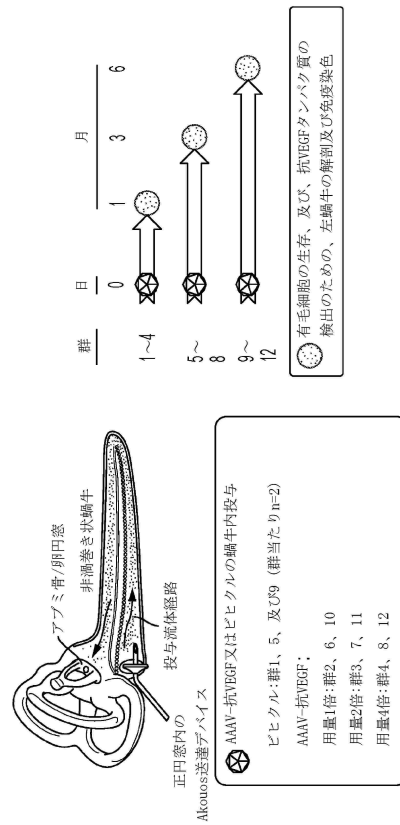
【図 3 6】



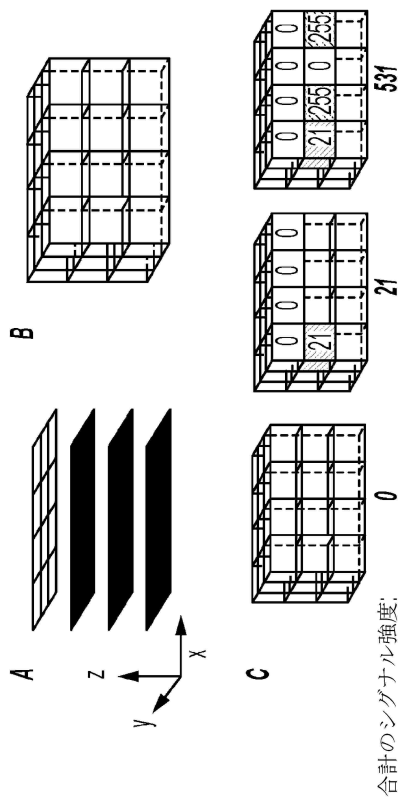
【図 3 7】



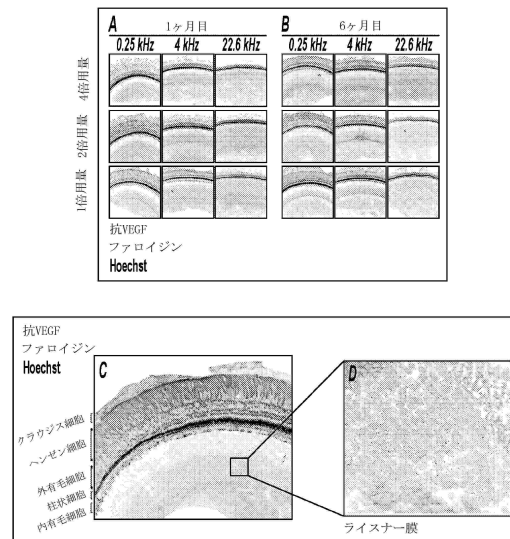
【図 3 8】



【図 3 9】



【図 4 0】



10

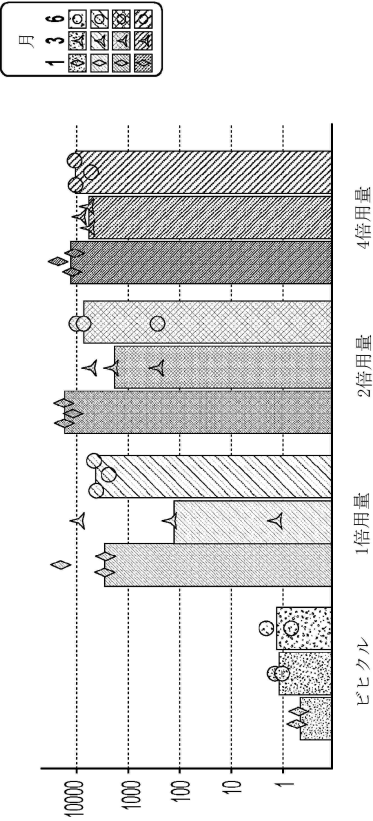
20

30

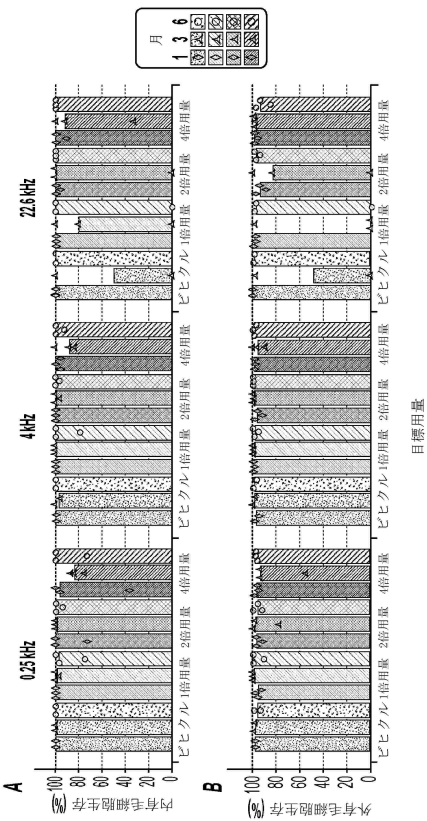
40

50

【図 4 1】



【図 4 2】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/012083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **C07K16/22 A61P27/16 A61K9/00 A61K48/00 C07K14/71**
C12N15/86

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61P 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)

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/126329 A1 (AKOUOS LLC [US]) 27 June 2019 (2019-06-27) whole document, especially p. 1 l. 17 - p. 11 l. 4, p. 43 l. 13-33, p. 46 l. 5 - p. 49 l. 5, p. 62, l. 12 - p. 63 l. 15, p. 69 l. 20 - p. 72 l. 25, p. 75 l. 33 - p. 76 l. 4; Figure 1; SEQ ID NOs 7, 51, 52, 54, 56 -----	1-50
X	WO 2020/097372 A1 (AKOUOS INC [US]) 14 May 2020 (2020-05-14) p. 461 2nd paragraph - p. 464 1st paragraph; Example 1 p. 564-565; SEQ ID NO: 95 ----- -/-	1-50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"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

7 July 2023

Date of mailing of the international search report

18/07/2023

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

Authorized officer

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/012083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/164854 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; REGENXBIO INC [US]) 29 August 2019 (2019-08-29) p. 2 l. 27 - p. 5 l. 20; p. 53 1st paragraph; Figure 1 -----	1-50
X	WO 2017/180936 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 19 October 2017 (2017-10-19) whole document, especially Figure 1; the Examples; the claims -----	1-50
X	REID CHRISTOPHER A. ET AL: "Development of an inducible anti-VEGF rAAV gene therapy strategy for the treatment of wet AMD", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 8, no. 1, 1 December 2018 (2018-12-01), page 11763, XP055799103, DOI: 10.1038/s41598-018-29726-7 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41598- 018-29726-7.pdf> whole document, especially the Abstract -----	1-25, 28, 45-50
X	LIU YUANYUAN ET AL: "AAV8-antiVEGFfab Ocular Gene Transfer for Neovascular Age-Related Macular Degeneration", MOLECULAR THERAPY, vol. 26, no. 2, 8 December 2017 (2017-12-08), pages 542-549, XP055803027, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.12.002 the Abstract; p. 543 right-hand col. 3rd paragraph, Figure 1 A -----	1-25, 28, 45-50
A	JUN SUZUKI ET AL: "Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 1 April 2017 (2017-04-01), XP055675065, DOI: 10.1038/srep45524 cited in the application whole document, especially the Abstract; Figures 1-6 ----- -/--	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/012083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUKAS D LANDEGGER ET AL: "A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 35, no. 3, 6 February 2017 (2017-02-06), pages 280-284, XP055675069, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3781 cited in the application whole document, especially the Abstract; Figures 1-3	1-50
X,P	WO 2022/119839 A1 (AKOUOS INC [US]) 9 June 2022 (2022-06-09) the whole document	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/012083

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.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/012083

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019126329 A1	27-06-2019	AU 2018392480 A1	02-07-2020
		BR 112020012336 A2	30-03-2021
		CA 3086045 A1	27-06-2019
		CL 2020001682 A1	18-12-2020
		CL 2021001272 A1	24-12-2021
		CN 111936171 A	13-11-2020
		EA 202091509 A1	22-09-2020
		EP 3727468 A1	28-10-2020
		IL 275458 A	31-08-2020
		JP 2021506861 A	22-02-2021
		KR 20200090927 A	29-07-2020
		SG 11202005618W A	29-07-2020
		US 2021071149 A1	11-03-2021
		US 2021363499 A1	25-11-2021
		US 2022267739 A1	25-08-2022
		WO 2019126329 A1	27-06-2019
WO 2020097372 A1	14-05-2020	AU 2019377115 A1	20-05-2021
		CA 3119065 A1	14-05-2020
		CN 113853437 A	28-12-2021
		EP 3880826 A1	22-09-2021
		EP 4063510 A1	28-09-2022
		JP 2022506613 A	17-01-2022
		US 2023056182 A1	23-02-2023
		WO 2020097372 A1	14-05-2020
WO 2019164854 A1	29-08-2019	AU 2019223963 A1	13-08-2020
		CA 3090293 A1	29-08-2019
		EP 3755804 A1	30-12-2020
		IL 276777 A	29-10-2020
		JP 2021516671 A	08-07-2021
		KR 20210022524 A	03-03-2021
		MA 51916 A	26-05-2021
		SG 11202007252V A	29-09-2020
		US 2021093734 A1	01-04-2021
		WO 2019164854 A1	29-08-2019
WO 2017180936 A1	19-10-2017	AU 2017248731 A1	18-10-2018
		CA 3019426 A1	19-10-2017
		EP 3452103 A1	13-03-2019
		IL 262207 A	29-11-2018
		JP 7046828 B2	04-04-2022
		JP 7111924 B2	02-08-2022
		JP 2019518427 A	04-07-2019
		JP 2022084809 A	07-06-2022
		JP 2022141856 A	29-09-2022
		KR 20190031196 A	25-03-2019
		MA 44873 A	13-03-2019
		SG 10201913159U A	27-02-2020
		SG 11201808426X A	30-10-2018
		US 2019381194 A1	19-12-2019
		US 2022288238 A1	15-09-2022
		WO 2017180936 A1	19-10-2017
WO 2022119839 A1	09-06-2022	AU 2021391433 A1	22-06-2023
		CA 3197936 A1	09-06-2022
		CO 2023007191 A2	20-06-2023
		TW 202237644 A	01-10-2022

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/012083

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2022119839 A1	09-06-2022

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

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)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 P 27/16 (2006.01)
 A 6 1 K 9/08 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 Y
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 P 27/16
 A 6 1 K 9/08
 A 6 1 K 48/00

4 C 0 8 7

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

2. T R I T O N

2 4 4 6 , ブルックリン, ステツォン ストリート 7

(72)発明者 エヌジー, ロバート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 5 8 , ニュートン, ユニット 1 , リンコルン ロード
4 7

(72)発明者 マッケナ, マイケル ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 9 3 8 , イプスウィッチ ユニット ナンバー 1 0 , ポ
タンウッド レーン 1 0

F ターム (参考)

4B065 AA95X AB01 BA02 CA25 CA44
 4C076 AA11 AA12 BB13 CC10 CC27 FF11
 4C084 AA13 AA17 MA17 MA65 MA66 NA14 ZA34 ZB26
 4C085 AA13 AA14 EE01 GG02
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA17 MA65 MA66 NA14 ZA34
 ZB26
 4C087 AA01 AA02 CA12 CA20 MA17 MA65 MA66 NA14 ZA34 ZB26