

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-500071

(P2021-500071A)

(43) 公表日 令和3年1月7日(2021.1.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 15/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 15/35 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/35	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 15/864 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
<b>C 1 2 N 7/01 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/01	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-542539 (P2020-542539)	(71) 出願人	520135611
(86) (22) 出願日	平成30年10月17日 (2018.10.17)		リジェネックスバイオ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月11日 (2020.6.11)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/056343		50, ロックビル, ブラックウェル ロード
(87) 国際公開番号	W02019/079494		9600, 스위트 210
(87) 国際公開日	平成31年4月25日 (2019.4.25)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	62/574,038		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成29年10月18日 (2017.10.18)	(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
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100196966
			弁理士 植田 涉

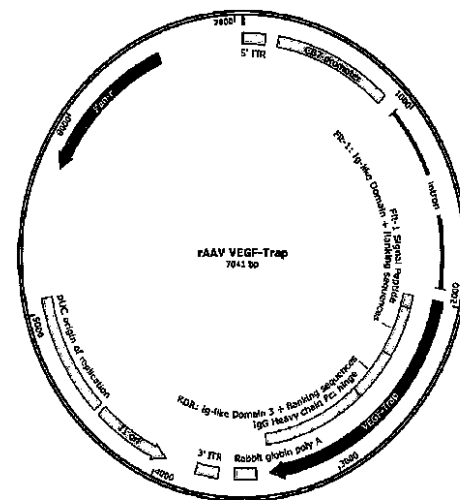
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト翻訳後修飾 VEGF-TRAPによる眼疾患および転移性大腸がんの処置

## (57) 【要約】

眼疾患、例えば加齢性黄斑変性症 (AMD) または新血管形成に関連した状態もしくはがん、例えば転移性大腸がんと診断され、治療的 mAb による処置が適応となったヒト対象への、完全ヒト翻訳後修飾 (HuPTM) 治療的 VEGF-Trap (VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>) の送達のための組成物および方法が記載される。送達は、遺伝子療法を通して、例えば、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>、すなわち、ヒトグリコシル化導入遺伝子生成物を連続的に供給する恒久的なデポを患者の組織または臓器に形成するために、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> をコードするウイルスベクター、好ましくは AAV8 または変異体 AAV.7m8、または他の DNA 発現構築物を、VEGF-Trap による処置に適応された眼の状態またはがんと診断された患者 (ヒト対象) に投与することによって、有利に達成することができる。あるいは、眼疾患またはがんの処置のために、例えば、培養されたヒト細胞培養、例えば不死化された網膜または肝臓細胞において生成される VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> を患者に投与することができる。

FIG 5A rAAV VEGF-Trap construct



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A A V 逆方向末端反復配列 ( I T R ) が隣接する発現カセットを含む発現構築物であって、前記発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする導入遺伝子を含む、発現構築物。

## 【請求項 2】

前記導入遺伝子が図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C ~ 7 H または図 8 C ~ 8 D に示すアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする、請求項 1 に記載の発現構築物。

10

## 【請求項 3】

A A V 8 カプシドのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 1 ) と少なくとも 9 5 % 同一であるウイルスカプシド ; および A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターであって、前記発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする導入遺伝子を含む、アデノ随伴ウイルスベクター。

## 【請求項 4】

前記導入遺伝子が図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C ~ 7 H または図 8 C ~ 8 D に示すアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする、請求項 3 に記載の A A V ベクター。

20

## 【請求項 5】

それを必要とするヒト対象における、加齢性黄斑変性症を含む眼障害を処置するための医薬組成物であって、

A A V 8 カプシドのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 1 ) と少なくとも 9 5 % 同一であるウイルスカプシド ; および

I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、前記発現カセットは、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、V E G F - T r a p をコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノムを含む A A V ベクターを含み、

30

前記 A A V ベクターは、前記対象の目に対する網膜下、硝子体内または脈絡膜上投与のために製剤化されている、医薬組成物。

## 【請求項 6】

それを必要とするヒト対象における、加齢性黄斑変性症を含む眼障害を処置するための医薬組成物であって、

A A V 7 m 8 カプシドのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一であるウイルスカプシド ; および

A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、前記発現カセットは、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、V E G F - T r a p をコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノム

40

を含む A A V ベクターを含み、

前記 A A V ベクターは、前記対象の目に対する網膜下、硝子体内または脈絡膜上投与のために製剤化されている、医薬組成物。

## 【請求項 7】

それを必要とするヒト対象における、転移性大腸がんを含むがんを処置するための医薬組成物であって、

A A V 8 カプシドのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 ) と少なくとも 9 5 % 同一であるウイルスカプシド ; および

A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、前記発現カセ

50

ットは、ヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する１つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trapをコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノム

を含むAAVベクターを含み、

前記AAVベクターは、前記対象への静脈内投与のために製剤化されている、医薬組成物。

【請求項 8】

前記VEGF-Trapが図１、図２、図３、図４、図７Ｃ～７Ｈまたは図８Ｃ～８Ｄに示すアミノ酸配列を有する、請求項６または７に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

新生血管加齢性黄斑変性症（nAMD）、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、網膜中心静脈閉塞（RVO）、病的近視またはボリーブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト光受容体細胞（錐体細胞、桿体細胞）；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞（小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア）；および網膜色素上皮細胞を含むヒト網膜細胞によって生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 10】

転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞または前記がん細胞の周囲の新血管形成組織に、ヒト肝臓細胞によって生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 11】

前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が配列番号１のアミノ酸配列を有する、請求項９または１０に記載の方法。

【請求項 12】

前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、図２、図３、図４、図７Ｃ～７Ｈまたは図８Ｃ～８Ｄの１つに示すアミノ酸配列を有する、請求項９または１０に記載の方法。

【請求項 13】

nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはボリーブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の網膜に、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 14】

nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはボリーブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の網膜に、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 15】

転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞または前記がん細胞の周囲の新血管形成組織に、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 16】

転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞または前記がん細胞の周囲の新血管形成組織に、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

【請求項 17】

前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が検出可能なNeuGcも-Galも含有しない、請求項１３から１６のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、図１、図２、図３、図４、図７Ｃ～７Ｈまたは

10

20

30

40

50

図 8 C ~ 8 D の 1 つに示すアミノ酸配列を有する、請求項 13 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはボリーブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、2, 6-シアリル化グリカンを含む VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の網膜下空間に、前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 20】

nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはボリーブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、チロシン硫酸化を含む VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の網膜下空間に、前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

10

【請求項 21】

転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、2, 6-シアリル化グリカンを含む VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 22】

転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、チロシン硫酸化を含む VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

20

【請求項 23】

前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> が NeuGc も -Gal も含有しない、請求項 19 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> が、図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C ~ 7 H または図 8 C ~ 8 D の 1 つに示すアミノ酸配列を有する、請求項 19 から 22 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 25】

前記組換えヌクレオチド発現ベクターが AAV8 ウイルスベクターである、請求項 19 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記組換えヌクレオチド発現ベクターが AAV.7m8 ウイルスベクターである、請求項 19 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

VEGF-Trap 導入遺伝子を含む AAV8 ウイルスベクターを製造する方法であって、AAV ITR が隣接する発現カセットを含む核酸ベクターで安定して形質転換された宿主細胞を、前記 AAV8 ウイルスベクターの生成に適切な条件下で培養することであって、前記発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において前記導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする導入遺伝子を含み、前記 AAV8 複製およびカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列も含む、こと；および前記宿主細胞によって生成される前記 AAV8 ウイルスベクターを回収することを含む方法。

40

【請求項 28】

VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> を製造する方法であって、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、前記 VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup> をコードするヌク

50

レオチド配列を含む発現ベクターで形質転換された不死化ヒト網膜細胞または不死化ヒト肝臓細胞を培養することと、前記ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞によって発現される前記 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> を単離することを含む方法。

【請求項 29】

組換え AAV を生成する方法であって、

(a)

(i) AAV ITR が隣接するシス発現カセットを含む人工ゲノムであって、前記シス発現カセットは、網膜細胞または肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する発現制御エレメントに作動可能に連結されている、VEGF - Trap をコードする導入遺伝子を含む、人工ゲノム；

(ii) 培養において宿主細胞における AAV rep およびカプシドタンパク質の発現を駆動する発現制御エレメントに作動可能に連結されている AAV rep およびカプシドタンパク質をコードし、トランスに前記 rep および cap タンパク質を供給する、AAV ITR を欠いているトランス発現カセット；

(iii) 前記 AAV カプシドタンパク質による前記人工ゲノムの複製およびパッケージングを可能にする十分なアデノウイルスヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することと、

(b) 前記人工ゲノムをカプシドに包んでいる組換え AAV を細胞培養から回収することを含む方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出され、本明細書に参照によりその全体が組み込まれる配列表を含む。2018年10月15日に作成された前記 ASCII コピーは、26115\_\_105002\_\_SL.txt と名付けられ、サイズは197,438 バイトである。

【0002】

本発明は、例えば滲出型加齢性黄斑変性症（「WAMD」）、加齢性黄斑変性症（「AMD」）、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、網膜中心静脈閉塞（RVO）、病的近視およびポリプ様脈絡膜脈管障害を含む、増加した血管化によって引き起こされる眼疾患と診断されたヒト対象の目の網膜/硝子体液への、完全ヒト翻訳後修飾（HuPTM）VEGF - Trap（VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>）の送達のための組成物および方法を含む。がん、特に転移性大腸がんの処置のための腫瘍への VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> の送達のための組成物および方法も提供される。

30

【背景技術】

【0003】

加齢性黄斑変性症（AMD）は、中心視覚の進行性の不可逆的で重度の喪失を引き起こす変性網膜眼病である。該疾患は、最高視力（VA）の領域である黄斑を害し、60才以上のアメリカ人の失明の主因である（Kolb et al., eds. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center 中の Hageman et al. Age-Related Macular Degeneration (AMD) 2008; 1995- (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27323/> から入手可能) )。

40

【0004】

新生血管加齢性黄斑変性症（nAMD）としても知られる、AMD の「進出型」新生血管の形態（WAMD）は、AMD 症例の 15 ~ 20 % を占め、様々な刺激に応答した神経網膜におけるおよびその下の異常な新血管形成によって特徴付けられる。この異常な血管増殖は、漏出性の血管の形成、およびしばしば大出血、ならびに正常な網膜アーキテク

50

ヤの歪みおよび破壊につながる。WAMDでは視覚機能が激しく損なわれ、最終的に、炎症および瘢痕化が罹患網膜において視覚機能の恒久的な喪失を引き起こす。究極的には、光受容体の死および瘢痕形成が中心視覚の重度の喪失、ならびに読む、書くおよび顔を認識するまたは運転する能力の喪失をもたらす。多くの患者は、もはや有給の仕事を維持すること、毎日の活動を実行することができず、その結果として生活の質の低下を報告する (Mitchell and Bradley, 2006, Health Qual Life Outcomes 4: 97)。

#### 【0005】

予防的療法は効果をほとんど示しておらず、治療的な戦略は主に新生血管病変および関連する液貯留を処置することに重点を置いている。WAMDのための処置には、レーザー光凝固およびベルテポルフィンによる光力学的療法が含まれてきたが、現在、WAMDのための医療標準処置には、血管新生の刺激と結びつけられ、介入のための標的にされているサイトカインである、血管内皮細胞増殖因子 (「VEGF」) に結合して中和することを目的とする薬剤による硝子体内 (「IVT」) 注射が含まれる。使用されるVEGF阻害剤 (「抗VEGF」剤) には、例えば、ラニビズマブ (親和性が改善された、原核生物の大腸菌 (E. coli) で作製された小さい抗VEGF Fabタンパク質) ; 適応外ベバシズマブ (CHO細胞で生成されるVEGFに対するヒト化モノクローナル抗体 (mAb)) ; またはアフリベルセプト (ヒトIgG<sub>1</sub>のFc部分に融合させたヒトVEGF受容体の細胞外ドメインのVEGF結合領域からなる組換え融合タンパク質 ; 「VEGF-Trap」として一般的に知られる分子のクラスに属する) が含まれる。これらの療法の各々は、ナイーブなWAMD患者において平均して最良に補正された視力を向上させた ; しかし、それらの効果は持続期間が制限されるようであり、患者は平均して4~6週毎に高頻度の投与を通常受ける。

10

20

#### 【0006】

頻繁なIVT注射は、患者および彼らの介護者にかなりの処置負担をもたらす。長期療法は失明の進行を鈍化させ、短期的に平均して視覚を向上させるが、これらの処置のいずれも新血管形成の再発を阻止しない (Brown, 2006, N Engl J Med 355: 1432-1444 ; Rosenfeld, 2006 N Engl J Med 355: 1419-1431 ; Schmidt-Erfurth, 2014, Ophthalmology 121(1): 193-201)。疾患の悪化を阻止するために、各々を再投与しなければならない。反復処置の必要性は、患者にさらなるリスクを招く可能性があり、患者と治療にあたる医師の両者にとって不都合である。

30

#### 【0007】

関連するVEGF-trap、ビズ-アフリベルセプト (目への投与に適切でない製剤にアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する) は転移性大腸がんの処置のために使用され、1時間の静脈内注入によって2週毎に投与される。半減期は4~7日の範囲内であり、反復投与が要求される。大出血、胃腸穿孔および損なわれた創傷治癒などの用量制限副作用が、治療効果を制限し得る。Bender et al., 2012, Clin. Cancer Res. 18:5081を参照されたい。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

増加した血管化によって引き起こされる眼疾患、例えば「滲出型」AMDとしても知られるnAMDと診断された患者 (ヒト対象) の目の網膜 / 硝子体液への、ヒト翻訳後修飾VEGF-Trap (VEGF-Trap<sup>HUP<sup>TM</sup></sup>) の送達のための組成物および方法が提供される。これは、遺伝子療法を通して、例えば、完全ヒト翻訳後修飾導入遺伝子生成物を連続的に供給する恒久的なデポーを目の中に形成するために、nAMDまたは血管化によって引き起こされる他の眼疾患と診断された患者 (ヒト対象) の目に (導入遺伝子として) VEGF-Trapタンパク質をコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を投与することによって達成することができる。そのようなDNAベクターは、患者に対して網膜下空間に、または脈絡膜上空間に、または硝子体内に投与することができる。VEGF-Trap<sup>HUP<sup>TM</sup></sup>は、(非ヒトCHO細胞と比較して) ヒト細胞における発現のために、完全ヒト翻訳後修飾を有することができる。本方法は、VEGF阻

40

50

害に応答する任意の眼の適応症、特にアフリベルセプト（EYLEA（登録商標））に応答するもの：例えば、少し例を挙げると、AMD、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、例えばDME患者における糖尿病性網膜症、網膜中心静脈閉塞（RVO）およびRVOの後の黄斑浮腫、病的近視、特に近視の脈絡膜新血管形成によって引き起こされるもの、ならびにポリブ様脈絡膜脈管障害を処置するために使用することができる。

#### 【0009】

他の実施形態では、がん、例えば転移性大腸がんと診断された患者における、がん細胞および周囲組織、特に血管化の増加を示している組織へのVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の送達のための組成物および方法が提供される。これは、遺伝子療法を通して、例えば、完全ヒト翻訳後修飾導入遺伝子生成物を連続的に供給する恒久的なデポを肝臓の中に形成するために、がん、特に転移性大腸がんと診断された患者（ヒト対象）の肝臓に、VEGF-Trapタンパク質を導入遺伝子としてコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を投与することによって達成することができる。そのようなDNAベクターは、患者に対して静脈内に、または肝臓血流を通して、例えば肝上静脈を通してもしくは肝臓動脈を通して肝臓に直接的に投与することができる。

#### 【0010】

導入遺伝子によってコードされるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、（アミノからカルボキシ末端にかけて）：（i）Flt-1のIg様ドメイン2（ヒト；VEGFR1とも呼ばれる）、（ii）KDRのIg様ドメイン3（ヒト；VEGFR2とも呼ばれる）、および（iii）ヒトIgGFc領域、特にIgG1Fc領域を含む融合タンパク質である。具体的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、アフリベルセプトのアミノ酸配列を有する（図1のアミノ酸位置の番号付けを提供する配列番号1および図1が本明細書で使用される；アフリベルセプトのアミノ酸配列およびアフリベルセプトをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列については下の表1も参照）。図1は、アフリベルセプト配列のN末端のFlt-1リーダー配列も提供し、下に開示されるように、導入遺伝子は図1のリーダー配列または他の代替リーダー配列をコードする配列を含むことができる。あるいは、導入遺伝子は、目における安定性および滞留を増加させるが、全身循環に侵入の後の導入遺伝子生成物の全身半減期を低減するように設計されたVEGF-Trapの変異体；トランケーションされたかまたは「Fcなし」のVEGF-Trap構築物、改変されたFcを有するVEGF-Trap導入遺伝子をコードすることができ、ここで、改変はFcRn結合部位を使用不能にし、および/または、別のFc領域もしくはIg様ドメインがIgG1Fcドメインを置換している。

#### 【0011】

ある特定の態様では、ヒト網膜細胞におけるVEGF-Trap導入遺伝子の発現のための構築物が本明細書で提供される。本構築物は、導入遺伝子および網膜細胞における発現のために適切な発現制御エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含むことができる。網膜細胞に導入遺伝子を送達するために使用される組換えベクターは、網膜細胞へのトロピズムを有するべきである。他の態様では、ヒト肝臓細胞におけるVEGF-Trap導入遺伝子の発現のための構築物が提供され、これらの構築物は、導入遺伝子およびヒト肝臓細胞における発現のために適切な発現制御エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含むことができる。肝臓に導入遺伝子を送達するために使用される組換えベクターは、肝臓細胞へのトロピズムを有するべきである。これらのベクターには、非複製組換えアデノ随伴ウイルスベクター（「rAAV」）、特にAAV8カプシドを有するものが含まれ得、または、AAV8カプシドの変異体が好ましい。しかし、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたは「裸のDNA」構築物と呼ばれる非ウイルス性の発現ベクターを非限定的に含む、他のウイルスベクターを使用することができる。好ましくは、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>導入遺伝子は、適切な発現制御エレメント、例えば、遍在性CB7プロモーター（ニワトリ - アクチンプロモーターおよびCMVエンハンサー）、または組織特異的プロモーター、例えばRPE特異的プロモーター、例えばRPE65プロモーター、または錐体特異的プロモーター

10

20

30

40

50

、例えばオプシンプロモーター、または肝臓特異的プロモーター、例えばTBG（チロキシン結合性グロブリン）プロモーター、APOA2プロモーター、SERPINA1（hAAT）プロモーターもしくはMIR122プロモーターによって制御されるべきである。ある特定の実施形態では、特にがん適応症のために、治療効能のために所望により導入遺伝子発現をオンオフすることができるように、誘導可能なプロモーターが好ましい可能性がある。そのようなプロモーターには、例えば、低酸素誘導プロモーターおよび薬物誘導性プロモーター、例えばラパマイシンおよび関連薬剤によって誘導されるプロモーターが含まれる。低酸素誘導性プロモーターには、HIF結合部位を有するプロモーターが含まれる、例えば、低酸素誘導性プロモーターの教示のために、その各々は、参照により組み込まれている、Schodel, et al., Blood, 2011, 117(23):e207-e217およびKenneth and Rocha, Biochem J., 2008, 414: 19-29を参照されたい。さらに、構築物において使用することができる低酸素誘導性プロモーターには、エリスロポイエチンプロモーターおよびN-WASPプロモーターが含まれる（エリスロポイエチンプロモーターの開示のためにはTsuchiya, 1993, J. Biochem. 113 :395を、およびN-WASPプロモーターの開示のためにはSalvi, 2017, Biochemistry and Biophysics Reports 9: 13-21を参照、その両方は低酸素誘導プロモーターの教示のために参照により組み込まれている）。あるいは、構築物は、薬物誘導性プロモーター、例えば、ラパマイシンおよび関連した類似体の投与によって誘導可能であるプロモーターを含有することができる（例えば、薬物誘導性プロモーターのそれらの開示のために本明細書に参照により組み込まれている、国際公開第94/18317号パンフレット、国際公開第96/20951号パンフレット、国際公開第96/41865号パンフレット、国際公開第99/10508号パンフレット、国際公開第99/10510号パンフレット、国際公開第99/36553号パンフレットおよび国際公開第99/41258号パンフレット、ならびに米国特許第7,067,526号明細書（ラパマイシン類似体を開示する）を参照されたい）。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

本構築物は、ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を強化する他の発現制御エレメントを含むことができる（例えば、ニワトリ - アクチンイントロン、マウスの微小ウイルス（MVV）イントロン、ヒト第IX因子イントロン（例えば、FIXがトランケーションされたイントロン1）、 - グロビンスプライスドナー/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプターイントロン、アデノウイルススプライスドナー/免疫グロブリンスプライスアクセプターイントロン、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）イントロン、および雑種アデノウイルススプライスドナー/IgGスプライスアクセプターイントロンなどのイントロン、ならびにポリAシグナル、例えば、ウサギ - グロビンポリAシグナル、ヒト成長ホルモン（hGH）ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、合成ポリA（SPA）シグナルおよびウシ成長ホルモン（bGH）ポリAシグナル）。例えば、Powell and Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57を参照されたい。

#### 【0013】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される核酸（例えば、ポリヌクレオチド）および核酸配列は、例えば当業者に公知である任意のコドン最適化技術を通してコドン最適化することができる（例えば、Quax et al., 2015, Mol Cell 59: 149-161によるレビューを参照されたい）。配列番号2として提供されているのは、配列番号1の導入遺伝子生成物に加えて図1に提供されるリーダー配列をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列である。配列番号3は、配列番号1の導入遺伝子生成物に加えて図1のリーダー配列をコードするコンセンサスコドン最適化ヌクレオチド配列である（配列番号2および3については下の表1を参照されたい）。

#### 【0014】

具体的な実施形態では、それを必要とするヒト対象において黄斑変性症（nAMD）、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、網膜中心静脈閉塞（RVO）、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害を含む眼の障害を処置するための遺伝子療法投与のため



の構築物であって、AAV8カプシドのアミノ酸配列（配列番号11）と少なくとも95%同一であるウイルスカプシド；およびAAV逆方向末端反復配列（ITR）が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムを含むAAVベクターを含み、発現カセットは、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする導入遺伝子を含む、構築物が提供される。具体的な実施形態では、それを必要とするヒト対象においてがん、特に転移性大腸がんを処置するための遺伝子療法投与のための構築物であって、AAV8カプシドのアミノ酸配列（配列番号11）と少なくとも95%同一であるウイルスカプシド；およびAAV逆方向末端反復配列（ITR）が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムを含むAAVベクターを含み、発現カセットは、ヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする導入遺伝子を含む、構築物が提供される。ある特定の実施形態では、コードされるAAV8カプシドは、配列番号11の配列を有し、それは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個のアミノ酸置換、特に、アミノ酸残基が、例えば、様々なAAVのカプシド配列のアミノ酸配列の比較を提供し、「SUBS」とラベルされた行のカプシド配列の中の異なる位置での置換に適切なアミノ酸を強調している図6に示すような他のAAVカプシドの対応する位置で見出される置換を有する。

10

20

#### 【0015】

ある特定の実施形態では、導入遺伝子によってコードされるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、アフリベルセプトのアミノ酸配列（配列番号1）を有する。ある特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、目の中での安定性を維持しつつ、全身循環の中のVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の半減期を低減してもよい、IgG1 Fcドメインにおける改変を有する配列番号1の変異体である。IgG1 Fcドメインを含まないVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>（FcなしのまたはFc（<sup>-</sup>）変異体）、例えば図4に示すものが本明細書で提供される。具体的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、カルボキシペプチダーゼ活性によってKDK配列の末端リジン（すなわち、図4のアミノ酸205）を含有してもよいまたは含有しなくてもよい。あるいは、図4で示すように、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>はタンパク質のC末端のIgG1 Fcのヒンジ領域の全部または一部を有することができ、C末端配列は、KDKTHH（配列番号31）もしくはKDKTHL（配列番号32）、KDKTHTCPPCPA（配列番号33）、KDKTHTCPPCPAPELLGG（配列番号34）またはKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL（配列番号35）であってもよい。ヒンジ領域のシステイン残基は鎖間ジスルフィド結合の形成を促進してもよいが、ヒンジ領域の全てまたはシステイン含有部分を含有しない融合タンパク質は、鎖間の結合を形成しなくてもよい鎖内部の結合のみを形成してもよい。

30

#### 【0016】

あるいは、他の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、FcRn結合を、およびそれによってタンパク質の全身半減期を低減する、IgG1 Fcドメインの突然変異を有する（Andersen, 2012, J Biol Chem 287: 22927-22937）。これらの突然変異には、IgG1重鎖における位置の通常の番号付けを使用して、I253、H310および/またはH435の突然変異が含まれ、より具体的にはI253A、H310Aおよび/またはH435QもしくはH435Aが含まれる。これらの位置は、配列番号1の（および、位置がピンク色で強調されている図1の）VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>のI238、H295およびH420に対応する。したがって、突然変異I238A、H295AおよびH420QまたはH420Aの1つ、2つまたは3つを有するIgG1 Fcドメインを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が提供される。420位のヒスチジンのアラニンまたはグルタミン置換を有するアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する融合タンパク質の例示的なVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>アミノ酸配列が、図3に提供される。

40

50

## 【0017】

代替的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、それが全身循環に侵入するとVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の半減期を低減しつつ目におけるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の安定性を向上または維持することができ、有害効果の可能性を低減する、IgG1 Fcドメインを置換するFcドメインまたは他のドメイン配列を有する。特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、IgG1ドメインを図7AおよびBにそれぞれ示すIgG2 FcまたはIgG4 Fcドメインを含む代替のFcドメインが置換しており、図で、ヒンジ配列はイタリック体で示されている。変異体は、ヒンジ領域の全部もしくは一部を含むか、またはヒンジ領域を全く含まない。ヒンジ領域を有するこれらの変異体では、鎖間ジスルフィド結合が形成されないように、ヒンジ領域配列はヒンジ領域のシステインの、セリンによる1つまたは2つの置換を有することもできる。例示的な導入遺伝子生成物のアミノ酸配列は、図7C~Hに提供する。

10

## 【0018】

他の代替的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、IgG1 Fcドメインを、Flt-1もしくはKDRのIg様ドメインの1つもしくは複数、またはその組合せが置換している。ヒトFlt1およびヒトKDRの細胞外ドメインのアミノ酸配列は図8Aおよび8Bにそれぞれ示し、Ig様ドメインはカラーテキストで示されている。C末端ドメインが、Flt1のIg様ドメインの1つ、2つ、3つもしくは4つ、特に少なくともIg様ドメイン2および3；または、KDRのIg様ドメインの1つ、2つ、3つもしくは4つ、特に少なくともドメイン3、4および/もしくは5からなるかそれを含む導入遺伝子生成物が提供される。具体的な実施形態では、導入遺伝子生成物は、KDR Ig様ドメイン3、4および5ならびにFlt1 Ig様ドメイン2によるC末端ドメインを有する。例示的な導入遺伝子生成物のアミノ酸配列は、図8CおよびDに提供する。

20

## 【0019】

VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>のための構築物は、形質導入された網膜細胞または肝臓細胞による適切な同時および翻訳後プロセッシング（グリコシル化およびタンパク質硫酸化）を確実にするシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むべきである。一部の実施形態では、シグナル配列は、Flt-1のもの、すなわちMVSYWDTGVLLCALLESCLLLTGSSSG（配列番号36）である（図1を参照されたい）。代替的な実施形態では、シグナル配列はKDRシグナル配列、すなわちMQSKVLLAVALLWLCVETRA（配列番号37）、あるいは、好ましい実施形態では、MYRMQLLLLIALLSLALLVTNS（配列番号38）（図2）またはMRMQLLLLIALLSLALLVTNS（配列番号39）である。ヒト網膜細胞における発現のために使用される他のシグナル配列には、限定されずに、下の表3のそれらを含めることができ、ヒト肝臓細胞における発現のために使用されるシグナル配列には、限定されずに、下の表4のそれらを含めることができる。

30

## 【0020】

具体的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、図1、図2、図3、図4、図7C~7Hまたは図8Cおよび8Dに示すアミノ酸配列を有する。

## 【0021】

具体的な実施形態では、リンカーとして、(GP)<sub>n</sub>（配列番号40）もしくは(A P)<sub>n</sub>（配列番号41）もしくは(EAAAK)<sub>3</sub>（配列番号42）などの強固なリンカー、または(GGGGS)<sub>n</sub>（配列番号43）などのフレキシブルリンカーを含む、フレキシブルまたは強固な短いペプチドによって配列の同一のコピーを連結することによって、Flt-1のIg様ドメイン2およびKDRのIg様ドメイン3のアミノ酸配列（すなわち、IgG1 Fcドメインなしの（しかし、IgG1 Fcドメインのヒンジ領域の全部または一部を含むことができる）アフリベルセプトのアミノ酸配列）を有する融合タンパク質の2つのコピーをコードする構築物が提供され（図4を参照されたい）、ここで、これらのうちのいずれに関しても、n = 1、2、3または4である（Chen, 2013, "Fusion protein linkers: property, design and functionality", Adv. Drug. Deliv. 65(10)

40

50

: 1357-1369、表 3)。構築物は、以下のように配置することができる：リーダー - F l t 1 I g 様ドメイン 2 - K D R - I g 様ドメイン 3 + リンカー + F l t - 1 I g 様ドメイン 2 - K D R ( I g 様ドメイン 3)。あるいは、構築物は、F c なしの V E G F - T r a p タンパク質の第 2 のコピーの別個の発現を促進するために、2 つの間に I R E S 配列を有する F c なしの V E G F - T r a p 導入遺伝子の 2 つのコピーによりニシストロン性である。

#### 【 0 0 2 2 】

具体的な実施形態では、本明細書に記載される構築物は、以下の構成成分を含む：( 1 ) 発現カセットに隣接する A A V 2 逆方向末端反復配列；( 2 ) a ) C M V エンハンサー / ニワトリ - アクチンプロモーターを含む C B 7 プロモーター、b ) ニワトリ - アクチンイントロンおよび c ) ウサギ - グロビンポリ A シグナルを含む制御エレメント；ならびに ( 3 ) 上記の V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードするヌクレオチド配列。

10

#### 【 0 0 2 3 】

具体的な実施形態では、本明細書に記載される構築物は、以下の構成成分を含む：( 1 ) 発現カセットに隣接する A A V 2 逆方向末端反復配列；( 2 ) a ) 低酸素誘導性プロモーター、b ) ニワトリ - アクチンイントロンおよび c ) ウサギ - グロビンポリ A シグナルを含む制御エレメント；ならびに ( 3 ) 上記 V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードするヌクレオチド配列。

#### 【 0 0 2 4 】

ある特定の態様では、新生血管加齢性黄斑変性症 ( n A M D )、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫 ( D M E )、網膜中心静脈閉塞 ( R V O )、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって生成される V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含む方法が本明細書に記載される。

20

#### 【 0 0 2 5 】

ある特定の態様では、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、以下の網膜細胞型の 1 つまたは複数によって生成される V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含む方法が本明細書に記載される：ヒト光受容体細胞 ( 錐体細胞、桿体細胞 )；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞 ( 小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア )；および網膜色素上皮細胞。

30

#### 【 0 0 2 6 】

ある特定の態様では、がん、特に転移性大腸がんとして診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞または周囲組織 (例えば、がん細胞を囲んでいる血管化の増加を示している組織) にヒト肝臓細胞によって生成される V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含む方法が本明細書に記載される。

#### 【 0 0 2 7 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> は、図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C、図 7 D、図 7 E、図 7 F、図 7 G、図 7 H、図 8 C または図 8 D のアミノ酸配列を含むタンパク質である (提示される N 末端のリーダー配列を含むかまたは除く)。

40

#### 【 0 0 2 8 】

ある特定の態様では、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目に V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> は 2 , 6 - シアリル化グリカンを含有する、方法が本明細書に記載される。

#### 【 0 0 2 9 】

ある特定の態様では、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視または

50

ポリ-ブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目にグリコシル化 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 VEGF - Trap は NeuGc (すなわち、下記の標準アッセイによって検出可能なレベル) を含有しない、方法が本明細書に記載される。

【0030】

ある特定の態様では、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリ-ブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目にグリコシル化 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 VEGF - Trap は -Gal エピトープの検出可能なレベル (すなわち、下記の標準アッセイによって検出可能なレベル) を含有しない、方法が本明細書に記載される。

10

【0031】

ある特定の態様では、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリ-ブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目にグリコシル化 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 VEGF - Trap は NeuGc も -Gal も含有しない、方法が本明細書に記載される。

【0032】

ある特定の態様では、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリ-ブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする発現ベクターを投与することを含み、ここで、前記 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> は、ヒトの不死化された網膜由来の細胞において前記発現ベクターからの発現の後に 2, 6 - シアリル化される、方法が本明細書に記載される。

20

【0033】

ある特定の態様では、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリ-ブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする発現ベクターを投与することを含み、ここで、前記 VEGF - Trap は、ヒトの不死化された網膜由来の細胞において前記発現ベクターからの発現の後に 2, 6 - シアリル化されるが、NeuGc および / または -Gal を含有しない、方法が本明細書に記載される。

30

【0034】

ある特定の態様では、転移性大腸がん と診断されたヒト対象を処置する方法であって、2, 6 - シアリル化グリカン を含有する VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> を放出するデポ-が形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法が本明細書に記載される。

【0035】

ある特定の態様では、転移性大腸がん と診断されたヒト対象を処置する方法であって、グリコシル化されるが NeuGc および / または -Gal を含有しない VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> を放出するデポ-が形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法が本明細書に記載される。

40

【0036】

ある特定の態様では、転移性大腸がん と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞 および / または 前記がん細胞の周囲組織に VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup> は 2, 6 - シアリル化グリカン を含有する、方法が本明細書に記載される。

【0037】

ある特定の態様では、転移性大腸がん と診断されたヒト対象を処置する方法であって、

50

前記ヒト対象のがん細胞および／または前記がん細胞の周囲組織に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は N e u G c を含有しない、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 3 8 】

ある特定の態様では、転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞および／または前記がん細胞の周囲組織に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は - G a l を含有しない、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 3 9 】

ある特定の態様では、転移性大腸がんを診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞および／または前記がん細胞の周囲組織に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の治療有効量を送達することを含み、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は N e u G c も - G a l も含有しない、方法が本明細書に記載される。

10

【 0 0 4 0 】

ある特定の態様では、転移性大腸がんを診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の肝臓に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする発現ベクターを投与することを含み、ここで、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、ヒトの不死化された肝臓由来の細胞において前記発現ベクターからの発現の後に 2 , 6 - シアリル化される、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 4 1 】

ある特定の態様では、転移性大腸がんを診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の肝臓に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> をコードする発現ベクターを投与することを含み、ここで、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、ヒトの不死化された肝臓由来の細胞において前記発現ベクターからの発現の後に 2 , 6 - シアリル化されるが、検出可能な N e u G c および／または - G a l を含有しない、方法が本明細書に記載される。

20

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C、図 7 D、図 7 E、図 7 F、図 7 G、図 7 H、図 8 C または図 8 D のアミノ酸配列を含む（図に提示されるリーダー配列もしくは代替リーダー配列を含むかまたはリーダー配列を含まない）。

30

【 0 0 4 3 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、チロシン硫酸化をさらに含む。

【 0 0 4 4 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、2 , 6 - シアリル化グリカンを含む前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の生成は、細胞培養において P E R . C 6 または R P E 細胞株に前記組換えヌクレオチド発現ベクターを形質導入し、前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> を発現させることによって確認される。

40

【 0 0 4 5 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、チロシン硫酸化を含む前記 V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の生成は、細胞培養において P E R . C 6 または R P E 細胞株に前記組換えヌクレオチド発現ベクターを形質導入することによって確認される。

【 0 0 4 6 】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> 導入遺伝子は、リーダーペプチドをコードする。リーダーペプチドは、本明細書でシグナルペプチドまたはリーダー配列と呼ぶこともできる。

【 0 0 4 7 】

ある特定の態様では、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、2 , 6 - シ

50

アリル化グリカンを含む VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含み、前記組換えベクターは、培養において PER . C6 または RPE 細胞に形質導入するために使用される場合、前記細胞培養において 2 , 6 - シアリル化グリカンを含む前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> の生成をもたらす、方法が本明細書に記載される。

【0048】

ある特定の態様では、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含み、前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> はグリコシル化されるが Neugc を含有せず；前記組換えベクターは、培養において PER . C6 または RPE 細胞を形質導入するために使用される場合、前記細胞培養においてグリコシル化されるが検出可能な Neugc および / または - Gal を含有しない前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> の生成をもたらす、方法が本明細書に記載される。

10

【0049】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、目に送達することは、目の網膜、脈絡膜および / または硝子体液に送達することを含む。

20

【0050】

そのような遺伝子療法を投与する対象は、抗 VEGF 療法に応答性の者であるべきである。特定の実施形態では、本方法は、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断され、VEGF - Trap タンパク質または他の抗 VEGF 剤による処置に応答性であると同定された患者を処置することを包含する。より具体的な実施形態では、患者は、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> タンパク質による処置に応答性である。ある特定の実施形態では、患者は、遺伝子療法による処置の前に、硝子体内に注射される VEGF - Trap による処置に応答性であることが示されている。具体的な実施形態では、患者は、アフリベルセプトによって以前に処置されており、アフリベルセプトに応答性であることが見出されている。代替的な実施形態では、患者は、ラニズマブによって以前に処置されており、ラニズマブに応答性であることが見出されている。代替的な実施形態では、患者は、ベバシズマブによって以前に処置されており、ベバシズマブに応答性であることが見出されている。

30

【0051】

そのようなウイルスベクターまたは他の DNA 発現構築物を送達される対象は、ウイルスベクターまたは発現構築物の中の導入遺伝子によってコードされる VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> に応答性であるべきである。応答性を判定するために、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> 導入遺伝子生成物（例えば、細胞培養、バイオリアクターなどにおいて生成される）を対象に直接的に、例えば硝子体内注射によって投与することができる。

40

【0052】

特定の実施形態では、本方法は、転移性大腸がんと診断され、抗 VEGF 剤、特に VEGF - Trap タンパク質による処置に応答性であると同定された患者を処置することを包含する。より具体的な実施形態では、患者は、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> タンパク質による処置に応答性である。ある特定の実施形態では、患者は、遺伝子療法による処置の前に、静脈内投与される VEGF - Trap による処置に応答性であることが示されている。具体的な実施形態では、患者は、ジブ - アフリベルセプトによって以前に処置されており、ジブ - アフリベルセプトに応答性であることが見出されている。代替的な実施形態では、患者は、ベバシズマブによって以前に処置されており、ベバシズマブに応答性であることが見出されている。代替的な実施形態では、患者は、ラニズマブによって以前

50

に処置されており、ラニビズマブに応答性であることが見出されている。代替的な実施形態では、患者は、レゴラフェニブによって以前に処置されており、レゴラフェニブに応答性であることが見出されている。

#### 【0053】

そのようなウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を送達される対象は、ウイルスベクターまたは発現構築物の中の導入遺伝子によってコードされるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>に応答性であるべきである。応答性を判定するために、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>導入遺伝子生成物（例えば、細胞培養、バイオリクターなどにおいて生成される）を対象に直接的に、例えば静脈内注入によって投与することができる。

#### 【0054】

ある特定の態様では、ヒト翻訳後修飾を含有するVEGF-Trapタンパク質が本明細書で提供される。一態様では、本明細書に記載されるVEGF-Trapタンパク質は、2, 6-シアリル化グリカンのヒト翻訳後修飾を含有する。ある特定の実施形態では、VEGF-Trapタンパク質は、ヒト翻訳後修飾のみを含有する。一実施形態では、本明細書に記載されるVEGF-Trapタンパク質は、Neu5Gcおよび/または-Galの免疫原性非ヒト翻訳後修飾の検出可能なレベルを含有しない。別の態様では、VEGF-Trapタンパク質は、チロシン（「Y」）硫酸化部位を含有する。一実施形態では、チロシン部位は、アフリベルセプトのFlt-1 Ig様ドメイン、KDR Ig様ドメイン3および/またはFcドメインで硫酸化される（硫酸化部位については図1を参照されたい、赤色で強調されている）。別の態様では、VEGF-Trapタンパク質は、2, 6-シアリル化グリカン、および少なくとも1つの硫酸化チロシン部位を含有する。他の態様では、VEGF-Trapタンパク質は、完全ヒト翻訳後修飾を含有する（VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>）。ある特定の態様では、VEGF-Trapの翻訳後修飾は、培養においてPER.C6またはRPE細胞を導入遺伝子によって形質導入することによって評価することができ、それは、前記細胞培養においてグリコシル化されるがNeu5Gcを含有しない前記VEGF-Trapの生成をもたらすことができる。あるいは、またはさらに、チロシン硫酸化を含有する前記VEGF-Trapの生成は、PER.C6またはRPE細胞株を細胞培養において前記組換えヌクレオチド発現ベクターによって形質導入することによって確認することができる。

#### 【0055】

組換えベクターの治療有効用量は、目に、例えば網膜下空間に、または脈絡膜上の空間に、または硝子体内に、0.1 mL ~ 0.5 mL、好ましくは0.1 ~ 0.25 mL（100 ~ 250  $\mu$ l）の範囲内の注射容量で投与するべきである。硝子体液において少なくとも約0.33  $\mu$ g/mL ~ 約1.32  $\mu$ g/mL、または眼房水（前眼房）において約0.11  $\mu$ g/mL ~ 約0.44  $\mu$ g/mLのC<sub>min</sub>で検出可能である導入遺伝子生成物の濃度を維持する用量が望ましく；その後、約1.70 ~ 約6.60  $\mu$ g/mLの範囲内のおよび最高約26.40  $\mu$ g/mLの導入遺伝子生成物の硝子体C<sub>min</sub>濃度、ならびに/または約0.567 ~ 約2.20  $\mu$ g/mLの範囲内のおよび最高8.80  $\mu$ g/mLの眼房水C<sub>min</sub>濃度を維持するべきである。硝子体液濃度は、導入遺伝子生成物の患者の眼房水または血清の濃度を測定することによって推定および/またはモニタリングすることができる。あるいは、遊離VEGF血漿濃度の約10 pg/mLへの低減を達成するのに十分な用量を使用することができる。（例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、Avery et al., 2017, Retina, the Journal of Retinal and Vitreous Diseases 0: 1-12；およびAvery et al., 2014, Br J Ophthalmol 98: 1636-1641を参照）。

#### 【0056】

がん、特に転移性大腸がんの処置のために、2週毎に4 mg/kgの用量で投与した場合に、2週または4週後に、VEGF-Trap導入遺伝子生成物の血漿濃度がジブ-アフリベルセプトの少なくともC<sub>min</sub>血漿濃度のレベルで維持されるように、治療有効用量を患者に、好ましくは静脈内に投与するべきである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

本発明は、経時的に消散してピークおよびトラフのレベルをもたらす V E G F 阻害剤の高用量ボースの反復眼内注射を含む医療標準処置に対していくつかの利点を有する。V E G F - T r a p 生成物の反復注射と対比して、導入遺伝子生成物 V E G F - T r a p の持続的発現はより一貫したレベルの治療薬が作用部位に存在することを可能にし、より少ない注射しか必要でなく、より少ない医師診察で済むので、患者にとってより危険でなく、より便利である。さらに、導入遺伝子から発現される V E G F - T r a p は、翻訳の間および後に存在する異なる微小環境のために、直接的に注射されるものと異なる様式で翻訳後に改変される。いかなる特定の理論によっても束縛されることなく、これは、異なる拡散、生物活性、分布、親和性、薬物動態および免疫原性特徴を有する V E G F - T r a p 分子をもたらし、そのため、作用部位に送達される抗体は、直接的に注射される V E G F - T r a p と比較して「生物学的により優れたもの」である。

10

## 【 0 0 5 8 】

さらに、導入遺伝子から *i n v i v o* で発現される V E G F - T r a p は、タンパク質凝集およびタンパク質酸化などの組換え技術によって生成されるタンパク質に関連した分解産物を含む可能性がある。凝集は、高タンパク質濃度、製造装置および容器との表面相互作用ならびにある特定の緩衝系による精製に起因する、タンパク質の生成および貯蔵に関連した問題である。凝集を促進するこれらの条件は、遺伝子療法における導入遺伝子発現に存在しない。メチオニン、トリプトファンおよびヒスチジン酸化などの酸化もタンパク質の生成および貯蔵と関連し、ストレス下にある細胞培養条件、金属および空気との接触ならびに緩衝液および賦形剤の中の不純物によって引き起こされる。導入遺伝子から *i n v i v o* で発現されるタンパク質も、ストレス下の条件で酸化することがある。しかし、ヒトおよび多くの他の生物体は抗酸化防御システムを備えており、それは酸化ストレスを低減するだけでなく、時には酸化を修復および/または元通りにする。したがって、*i n v i v o* で生成されるタンパク質は、酸化型になる可能性が低い。凝集および酸化の両方は、効力、薬物動態（クリアランス）および免疫原性に影響を及ぼす可能性がある。

20

## 【 0 0 5 9 】

本発明は、以下の原理に一部基づく：

( i ) ヒト網膜細胞は、グリコシル化およびチロシン - O 硫酸化、網膜細胞における頑強なプロセスを含む、分泌タンパク質の翻訳後プロセシングのための細胞機構を有する分泌細胞である。（例えば、網膜細胞による糖タンパク質の生成を報告している、Wang et al., 2013, Analytical Biochem. 427: 20-28 および Adamis et al., 1993, BBRC 193 : 631-638 ; および、網膜細胞によって分泌されるチロシン硫酸化糖タンパク質の生成を報告している、Kanan et al., 2009, Exp. Eye Res. 89: 559-567 および Kanan & Al-Ubaidi, 2015, Exp. Eye Res. 133: 126-131 を参照、これらの各々は、ヒト網膜細胞によって行われる翻訳後修飾について、参照によりその全体が組み込まれる）。

30

( i i ) ヒト肝細胞は、グリコシル化およびチロシン - O 硫酸化を含む、分泌タンパク質の翻訳後プロセシングのための細胞機構を有する分泌細胞である。（例えば、ヒト肝臓によって分泌される血漿タンパク質のプロテオーム同定については <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/liver> ; それらの分泌タンパク質上のグリカンのスペクトルについては、Clerc et al., 2016, Glycoconj 33 :309-343 および Pompach et al. 2014 J Proteome Res. 13 :5561-5569 ; ならびに、T P S T - 2（チロシン - O 硫酸化を触媒する）は他の組織におけるより強く肝臓において発現されるが、T P S T - 1 は他の組織と同等の平均レベルで発現されることを報告している、E Mishiro, 2006, J Biochem 140:731-737 を参照、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）。

40

( i i i ) V E G F - T r a p、アフリベルセプトは、96.9 キロダルトン ( k D a ) のタンパク質分子量を有する C H O 細胞において作製される二量体糖タンパク質である。それは概ね 15 % のグリコシル化を含有し、115 k D a の総分子量を与える。一次配列によって予測される各ポリペプチド鎖の上の全ての 5 つの推定上の N - グリコシル化部

50



位は、炭水化物で占有することができ、末端シアル酸残基における不均一性を含む、ある程度の鎖不均一性を示す。Fcドメインは、比較的低いレベルで、例えば、細胞状態によって分子の5～20%がシアリル化される部位を含有する。これらのN-グリコシル化部位は、配列番号1のアミノ酸配列の36、68、123、196および282位に見出される(図1も参照、残基は黄色で強調されている)。VEGF Aのみに結合するラニズマブおよびベバシズマブと対照的に、アフリベルセプトはVEGFの全てのアイソフォームならびに胎盤増殖因子(「PLGF」)に結合する。

(iv) アフリベルセプトなどのCHO細胞生成物と異なり、ヒト網膜またはヒト肝臓細胞によるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>のグリコシル化は、安定性、半減期を向上させることができ、導入遺伝子生成物の望ましくない凝集を低減するグリカンの付加をもたらす。(例えば、抗体およびFabにおけるグリコシル化の明らかとなってきた重要性のレビューについては、Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196: 1435-1441を参照)。注目すべきことに、本発明のVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>に加えられるグリカンは、2, 6-シアル酸を含有する高度にプロセシングされた複合型のN-グリカンである。そのようなグリカンは、この翻訳後修飾を行うために要求される2, 6-シアリルトランスフェラーゼを有しないCHO細胞において作製されるアフリベルセプトに存在せず、CHO細胞は二分岐のGlcNAcも生成しないが、それらは免疫原性であるNeu5Gc(NGNA)は生成する。例えば、Dumont et al., 2015, Critical Rev in Biotech, 36(6): 1110-1122を参照されたい。さらに、CHO細胞は、高濃度でアナフィラキシーを誘発することができる、ほとんどの個体に存在する抗-Gal抗体と反応する免疫原性グリカン、-Gal抗原を生成することもできる。例えば、Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156を参照されたい。本発明のVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>のヒトグリコシル化パターンは、導入遺伝子生成物の免疫原性を低減し、安全性および効能を向上させるはずである。

(v) グリコシル化部位に加えて、アフリベルセプトなどのVEGF-Trapは、チロシン(「Y」)硫酸化部位を含有することができる;アフリベルセプトのF1t-1 Ig様ドメイン2、KDR Ig様ドメイン3およびFcドメインのチロシン-O硫酸化部位を赤で強調している、図1を参照されたい。(タンパク質チロシン硫酸化を受けるチロシン残基を囲んでいるアミノ酸の分析について、例えば、参照によりその全体が組み込まれる、Yang et al., 2015, Molecules 20:2138-2164、特にp. 2154を参照)。「規則」は、以下の通りに要約することができる: Yの+5~-5の位置にEまたはDを有するY残基、Yの-1の位置は中性または酸性の荷電アミノ酸であるが、硫酸化を無効にする塩基性アミノ酸、例えばR、KまたはHでない)。硫酸化部位は、配列番号1のVEGF trap配列の11、140、263および281位に見出すことができる。

(vi) ヒト網膜細胞における頑強な翻訳後プロセスであるチロシン硫酸化は、VEGFへの増加した結合力を有する導入遺伝子生成物をもたらすことができる。例えば、治療抗体のFabのチロシン硫酸化は、抗原結合力および活性を劇的に増加させることが示されている。(例えば、Loos et al., 2015, PNAS 112: 12675-12680およびChoe et al., 2003, Cell 114: 161-170を参照)。そのような翻訳後修飾は、CHO細胞生成物であるアフリベルセプトにおいて、良くても存在量が少ない。ヒト網膜細胞と異なり、CHO細胞は分泌細胞でなく、翻訳後チロシン硫酸化の能力が限られている。(例えば、Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537、特にp. 1537の考察を参照されたい)。

(vii) O-グリコシル化は、酵素によるセリンまたはトレオニン残基へのN-アセチルガラクトサミンの付加を含む。抗体のヒンジ領域に存在するアミノ酸残基は、O-グリコシル化することができることが実証されている。ある特定の実施形態では、VEGF-TrapはIgG Fcヒンジ領域の全部または一部を含み、したがって、ヒト網膜細胞または肝臓細胞で発現される場合にOグリコシル化することが可能である。O-グリコシル化の可能性は、大腸菌(E. coli)はヒトO-グリコシル化において使用されるものと同等の機構をやはり天然に含有しないので(代わりに、細菌が特異的O-グリコシル機構を含有するように改変される場合のみ、大腸菌(E. coli)におけるO-グリコシル

10

20

30

40

50

化が実証された。例えば、Farid-Moayer et al., 2007, J. Bacteriol. 189:8088-8098を参照されたい)、大腸菌(E. coli)において生成されるタンパク質と比較して、本明細書で提供されるVEGF-Trapタンパク質に別の利点を付与する。

(viii) VEGF-Trap<sup>HUP</sup>TMを網膜/硝子体液に送達するために、前述の翻訳後修飾に加えて、向上したVEGF-Trap構築物を工学的に操作し、使用することができる。例えば、アフリベルセプトはインタクトなFc領域を有するので、それはタンパク分解性異化作用からサルベージされ、内皮細胞におけるFcRnへの結合を通して再循環される可能性があり；したがって、目から全身循環への侵入の後にその全身半減期を延長する(例えば、アフリベルセプトは静脈内投与の後、概ね4~7日の血清半減期を有する)。3回の毎月の硝子体内注射を受けたヒト対象における比較研究は、アフリベルセプトおよびベバシズマブ(完全長抗体)が3回目の投与の後に全身貯留を示したが、ラニズマブ(Fab)は示さなかったことを実証した。(レビューについては、Avery et al., 2017, Retina, the Journal of Retinal and Vitreous Diseases 0: 1-12; およびAvery et al., 2014, Br J Ophthalmol 98: 1636-1641を参照されたい)。抗VEGF剤の延長された滞留は出血および血栓塞栓性合併症と関連し、アフリベルセプトはVEGFの全てのアイソフォームならびにPLGFに結合するので、FcRn結合部位を無効にするようにFcを改変することによって、または、全身循環に侵入後の導入遺伝子生成物の半減期を低減するが、目における安定性および滞留をなお維持するためにFcを排除することによって、向上したより安全なアフリベルセプトを工学的に操作することができる。Fc機能を排除するが目における安定性をなお維持し、滞留を向上させるように設計された例示的な構築物が本明細書に記載され、図3および4に例示される。

#### 【0060】

前述の理由で、VEGF-Trap<sup>HUP</sup>TMの生成は、遺伝子療法を通して、例えば、形質導入された網膜細胞によって生成される完全ヒト翻訳後修飾、例えばヒトのグリコシル化、硫酸化導入遺伝子生成物(検出可能なNeuGCもGalもない)を連続的に供給する恒久的なデポーを目の中に形成するために、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断された患者(ヒト対象)の目における網膜下空間、脈絡膜上空間または硝子体内にVEGF-Trap<sup>HUP</sup>TMをコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を投与することによって達成される、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害の処置のための「生物学的により優れた」分子をもたらすはずである。形質導入することができる網膜細胞には、限定されずに、網膜ニューロン；ヒト光受容体細胞(錐体細胞、桿体細胞)；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞(小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア)；および網膜色素上皮細胞が含まれる。

#### 【0061】

さらに、VEGF-Trap<sup>HUP</sup>TMの生成は、遺伝子療法を通して、例えば、形質導入された肝臓細胞によって生成される完全ヒト翻訳後修飾、例えばヒトのグリコシル化、硫酸化導入遺伝子生成物(検出可能なNeuGCもGalもない)を連続的に供給する恒久的なデポーを肝臓の中に形成するために、VEGF-Trap<sup>HUP</sup>TMをコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を、がん、特に転移性大腸がんを診断された患者(ヒト対象)の肝臓に、例えば静脈内投与によって、または肝臓の血流を通して、例えば肝上静脈または肝臓動脈によって投与することによって達成される、がん、特に転移性大腸がんの処置のための「生物学的により優れた」分子をもたらすべきである。

#### 【0062】

遺伝子療法への代替物として、またはさらなる処置として、VEGF-Trap<sup>HUP</sup>TM糖タンパク質は、組換えDNA技術によってヒト細胞株において生成することができ、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断された患者に対して硝子体内投与によって、またはがん、特に転移性大腸がん

と診断された患者に対して注入または他の非経口投与によって糖タンパク質を投与することができる。そのような組換え糖タンパク質生成のために使用することができるヒト細胞株には、少し例を挙げれば、ヒト胚性腎臓293細胞(HEK293)、線維肉腫HT-1080、HKB-11、CAP、HuH-7および網膜細胞株、PER.C6またはRPEが限定されずに含まれる(例えば、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>糖タンパク質の組換え生成のために使用することができるヒト細胞株のレビューについては、参照によりその全体が組み込まれる、Dumont et al., 2015, Critical Rev in Biotech, 36(6): 1110-1122 "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives"を参照)。完全なグリコシル化、特にシアリル化、およびチロシン硫酸化を確実にするために、生成のために使用する細胞株は、網膜細胞におけるチロシン-O硫酸化の役割を担う2,6-シアリルトランスフェラーゼ(または、2,3-および2,6-シアリルトランスフェラーゼの両方)ならびに/またはTPST-1およびTPST-2酵素を同時発現するように宿主細胞を工学的に操作することによって強化することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0063】

小分子薬と異なり、生物製剤は、異なる効力、薬物動態および安全性プロファイルを有する異なる改変または形態を有する多くの変異体の混合物を通常含む。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチで生成されるあらゆる分子が完全にグリコシル化および硫酸化されることは必須でない。むしろ、生成される糖タンパク質の集団は、効能を示すのに十分な、2,6-シアリル化および硫酸化を含むグリコシル化を有するべきである。ある特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の集団の0.5%~1%は、2,6-シアリル化および/または硫酸化を有する。他の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の集団の2%、2%~5%、または2%~10%は、2,6-シアリル化および/または硫酸化を有する。ある特定の実施形態では、2,6-シアリル化および/または硫酸化のレベルは有意により高く、そのため、分子の最大50%、60%、70%、80%、90%または100%でさえも2,6-シアリル化および/または硫酸化を含有する。本明細書で提供される遺伝子療法処置の目標は、網膜の新血管形成を処置すること、および最小限の介入/侵襲的手順によって視力を維持もしくは向上させること、または転移性大腸がんを処置する、改善する、もしくはその進行を鈍化させることである。

#### 【0064】

網膜の新血管形成と関連した疾患の処置の効能は、BCVA(最良矯正視力);目的の物体から反射される後方散乱光のエコー時間遅延および大きさを判定するために低コヒーレンス干渉計法を使用する三次元画像化技術であるSD-OCT(SD-光学式干渉断層撮影)での網膜の厚さ(Schuman, 2008, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 106:426-458);フルオレセイン血管造影(FA)での新血管形成の領域;および、さらなる抗VEGF療法の必要性を測定することによってモニタリングすることができる。網膜の機能は、例えば、ERGによって判定することができる。ERGは、ヒトで使用するためにFDAの承認を得た、網膜機能の非侵襲的電気生理学的試験であり、それは、目の光感受性細胞(桿体および錐体)およびそれらを接続する神経節細胞、特に閃光刺激へのそれらの応答を検査する。有害事象には、失明、眼の感染、炎症および網膜剥離を含む他の安全性事象を含めることができる。

#### 【0065】

がん、特に転移性大腸がんの処置の効能は、抗がん/抗転移剤の効能、例えば腫瘍サイズの低減、転移の数および/またはサイズの低減、全体生存率、無進行生存、奏効率、安定疾患の発生率等の増加を評価するための当技術分野で公知の任意の手段によってモニタリングすることができる。

#### 【0066】

他の利用可能な処置の送達を伴う目/網膜へのVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の送達の組合せが、本明細書に記載される。遺伝子療法処置の前、同時、または後に、さらなる処置を投与することができる。本発明の遺伝子療法と組み合わせることができる、nAMD

、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害のための利用可能な処置には、レーザー光凝固、ベルテポルフィンによる光力学療法、およびアフリベルセプト、ラニビズマブ、ベバシズマブまたはペガブタニブを限定されずに含む抗VEGF剤による硝子体内（IVT）注射、ならびに炎症を低減する硝子体内ステロイドによる処置が限定されずに含まれる。本発明の遺伝子療法と組み合わせることができる転移性大腸がんのための利用可能な処置には、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテカン（FOLFIRI）もしくはフォリン酸（ロイコボリン、FAもしくはフォリン酸カルシウムとも呼ばれる）、フルオロウラシル（5FU）、および/またはオキサリプラチン（FOLFOX）、ならびにジブ-アフリベルセプト、ラニビズマブ、ベバシズマブ、ペガブタニブもしくはレゴラフェニブを限定されずに含む抗VEGF剤による静脈内投与が、限定されずに含まれる。

10

#### 【0067】

VEGF-Trap導入遺伝子およびVEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>タンパク質生成物を含むAAV8ウイルスベクターを製造する方法も、提供される。具体的な実施形態では、AAV逆方向末端反復配列（ITR）が隣接する発現カセットを含む核酸ベクターで安定して形質転換された宿主細胞を培養すること、および宿主細胞によって生成されるAAV8ウイルスベクターを回収することによって、VEGF-Trap導入遺伝子を含むAAV8ウイルスベクターを作製するための方法であって、発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>をコードする導入遺伝子を含み、AAV8複製およびカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列も含む、方法が提供される。

20

#### 【0068】

本発明は、ヒト対象における網膜下注射または静脈内投与のためにAAV8カプシドにパッケージされるVEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>構築物を記載する、下の実施例において例示される。

#### 【0069】

##### 3. 1. 例示的な実施形態

1. AAV逆方向末端反復配列（ITR）が隣接する発現カセットを含む発現構築物であって、発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>をコードする導入遺伝子を含む、発現構築物。

30

2. 導入遺伝子が図1、図2、図3、図4、図7C~7Hまたは図8C~8Dに示すアミノ酸配列を有するVEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>をコードする、項1の発現構築物。

3. 導入遺伝子が表3または4のそのN末端にリーダー配列を含む、項1または2の発現構築物。

4. 導入遺伝子がVEGF-Trap<sup>HUP TM</sup>をコードする配列番号2または3のヌクレオチド配列を含む、項1~3のいずれかの発現構築物。

5. 調節配列の少なくとも1つが構成プロモーターである、項1~4のいずれかの発現構築物。

40

6. 1つまたは複数の調節配列がCB7プロモーター、ニワトリ-アクチンイントロンおよびウサギ-グロビンポリAシグナルである、項1~5のいずれかの発現構築物。

7. 調節配列の少なくとも1つが誘導可能なプロモーターである、項1~4のいずれかの発現構築物。

8. 誘導可能なプロモーターが低酸素誘導性プロモーターまたはラバマイシン誘導性プロモーターである、項7の発現構築物。

9. AAV ITRがAAV2 ITRである、項1~8のいずれかの発現構築物。

10. 図5A~5Eの1つの発現構築物である、項1~6または9のいずれかの発現構築物。

11. AAV8カプシドのアミノ酸配列（配列番号11）と少なくとも95%同一であ

50

るウイルスカプシド；および A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターであって、発現カセットは、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、 V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードする導入遺伝子を含む、アデノ随伴ウイルスベクター。

12．導入遺伝子が図 1、図 2、図 3、図 4、図 7 C ~ 7 H または図 8 C ~ 8 D に示すアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードする、項 11 の A A V ベクター。

13．導入遺伝子が表 3 または 4 のその N 末端にリーダー配列を含む、項 11 または 12 の A A V ベクター。

14． V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードする配列番号 2 または 3 のヌクレオチド配列を含む、項 11 ~ 13 のいずれかの A A V ベクター。

15．調節配列の少なくとも 1 つが構成プロモーターである、項 11 ~ 14 のいずれかの A A V ベクター。

16．1 つまたは複数の調節配列が C B 7 プロモーター、ニワトリ - アクチンイントロンおよびウサギ - グロビンポリ A シグナルである、項 11 ~ 15 のいずれかの A A V ベクター。

17．調節配列の少なくとも 1 つが誘導可能なプロモーターである、項 11 ~ 14 のいずれかの A A V ベクター。

18．誘導可能なプロモーターが低酸素誘導性プロモーターまたはラパマイシン誘導性プロモーターである、項 17 の A A V ベクター。

19． A A V I T R が A A V 2 I T R である、項 11 ~ 18 のいずれかの A A V ベクター。

20．それを必要とするヒト対象における、加齢性黄斑変性症を含む眼障害を処置するための医薬組成物であって、

A A V 8 カプシドのアミノ酸配列 ( 配列番号 11 ) と少なくとも 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、発現カセットは、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、 V E G F - T r a p をコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノムを含む A A V ベクターを含み、

ここで、前記 A A V ベクターは、前記対象の目に対する網膜下、硝子体内または脈絡膜上投与のために製剤化されている、医薬組成物。

21．それを必要とするヒト対象における、加齢性黄斑変性症を含む眼障害を処置するための医薬組成物であって、

A A V 8 カプシドのアミノ酸配列 ( 配列番号 11 ) と少なくとも 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、発現カセットは、ヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、 V E G F - T r a p をコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ベクターを含み、

ここで、前記 A A V ベクターは、前記対象への静脈内投与のために製剤化されている、医薬組成物。

22．それを必要とするヒト対象における、加齢性黄斑変性症を含む眼障害を処置するための医薬組成物であって、

A A V 7 m 8 カプシドのアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

A A V I T R が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、発現カセット

10

20

30

40

50

は、ヒト肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する１つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trapをコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノム

を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含み、

ここで、前記AAVベクターは、前記対象への静脈内投与のために製剤化されている、医薬組成物。

23. VEGF-Trapが図1、図2、図3、図4、図7C～7Hまたは図8C～8Dに示すアミノ酸配列を有する、項20～22の医薬組成物。

24. 導入遺伝子が表3または4のそのN末端にリーダー配列を含む、項20～23のいずれかの医薬組成物。

25. 導入遺伝子がVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする配列番号2または3のヌクレオチド配列を含む、項20～24のいずれかの医薬組成物。

26. 調節配列の少なくとも１つが構成プロモーターである、項20～25のいずれかの医薬組成物。

27. １つまたは複数の調節配列がCB7プロモーター、ニワトリ - アクチンイントロンおよびウサギ - グロビンポリAシグナルである、項20～26のいずれかの医薬組成物。

28. 調節配列の少なくとも１つが誘導可能なプロモーターである、項20～25のいずれかの医薬組成物。

29. 誘導可能なプロモーターが低酸素誘導性プロモーターまたはラパマイシン誘導性プロモーターである、項28の医薬組成物。

30. AAV ITRがAAV2 ITRである、項20～29のいずれかの医薬組成物。

31. 新生血管加齢性黄斑変性症(nAMD)、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜中心静脈閉塞(RVO)、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

32. nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜ニューロン、ヒト光受容体細胞、ヒト錐体細胞、ヒト桿体細胞、ヒト水平細胞、ヒト双極細胞、ヒトアマクリン細胞、ヒト網膜神経節細胞、ヒト小人細胞、ヒト日傘細胞、ヒト二層細胞、ヒト巨大網膜神経節細胞、ヒト光感受性神経節細胞、ヒトミュラーグリア、またはヒト網膜色素上皮細胞によって生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

33. 転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の大腸がん細胞および/または前記大腸がん細胞の周囲組織に、ヒト肝臓細胞によって生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

34. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が配列番号1のアミノ酸配列を有する、項31～33のいずれかの方法。

35. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、無効化されたFcRn結合部位を有する配列番号1のアミノ酸配列の変異体である、項31～34のいずれかの方法。

36. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が配列番号1の420位のヒスチジンの、アラニンまたはグルタミンによるアミノ酸置換を有する、項35の方法。

37. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>はIgG1 Fcドメインが配列番号1から欠失している、項35の方法。

38. 配列番号1のIgG1 FcドメインがIgG2 Fcドメイン、およびIgG4 Fcドメイン、ヒトFlt-1の１つもしくは複数のIgG様ドメイン、またはヒトKDRの１つもしくは複数のIgG様ドメイン、またはヒトFlt-1の１つもしくは複数のIgG様ドメインとヒトKDRのIgG様ドメインとの組合せによって置換される、項35の方法。

10

20

30

40

50

39. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、図2、図3、図4、図7C～7Hまたは図8C～8Dの1つに示すアミノ酸配列を有する、項35の方法。

40. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が表3または4のそのN末端にリーダー配列を含む、項31～39のいずれかの方法。

41. nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の網膜に、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

42. nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の目の網膜に、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

43. 転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の大腸がん細胞および/または前記大腸がん細胞の周囲組織に、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

44. 転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の大腸がん細胞および/または前記大腸がん細胞の周囲組織に、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の治療有効量を送達することを含む方法。

45. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が検出可能なNeuGcも-Galも含有しない、項41～44のいずれかの方法。

46. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が2,6-シアリル化グリカンおよびチロシン硫酸化を含むし、検出可能なNeuGcも-Galも含有しない、項41～45のいずれかの方法。

47. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、図1、図2、図3、図4、図7C～7Hまたは図8C～8Dの1つに示すアミノ酸配列を有する、項41～46のいずれかの方法。

48. nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の網膜下空間に、前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

49. nAMD、糖尿病性網膜症、DME、RVO、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の目の網膜下空間に、前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

50. 転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、2,6-シアリル化グリカンを含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

51. 転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、チロシン硫酸化を含むVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>を放出するデポーが形成されるように、前記ヒト対象の肝臓に、前記VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することを含む方法。

52. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が検出可能なNeuGcも-Galも含有しない、項48または51のいずれかの方法。

53. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が2,6-シアリル化グリカンおよびチロシン硫酸化を含むし、いかなる検出可能なNeuGcも-Galも含有しない、項48～52のいずれかの方法。

54. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>が、図1、図2、図3、図4、図7C～7Hまたは図8C～8Dの1つに示すアミノ酸配列を有する、項48～53のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

55. 組換えヌクレオチド発現ベクターが VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする配列番号 2 または 3 のヌクレオチド配列を含む、項 48 ~ 54 のいずれかの方法。

56. 組換えヌクレオチド発現ベクターが AAV8 ウイルスベクターである、項 48 ~ 55 のいずれかの方法。

57. 組換えヌクレオチド発現ベクターが AAV.7m8 ウイルスベクターである、項 48 ~ 55 のいずれかの方法。

58. 2, 6-シアリル化グリカンを含有する前記 VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> の生成が、PER.C6 または RPE 細胞株を細胞培養において前記組換えヌクレオチド発現ベクターによって形質導入することによって確認される、項 41、43、45 ~ 48、50 または 52 ~ 57 のいずれかの方法。

59. チロシン硫酸化を含有する前記 VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> の生成が、PER.C6 または RPE 細胞株を細胞培養において前記組換えヌクレオチド発現ベクターによって形質導入することによって確認される、項 42、44 ~ 47、49 または 51 ~ 57 のいずれかの方法。

60. 組換え AAV を生成する方法であって、

(a)

(i) AAV ITR が隣接するシス発現カセットを含む人工ゲノムであって、シス発現カセットは、網膜細胞または肝臓細胞において導入遺伝子の発現を制御する発現制御エレメントに作動可能に連結されている、VEGF-Trap をコードする導入遺伝子を含む、人工ゲノム；

(ii) 培養において宿主細胞における AAV rep およびカプシドタンパク質の発現を駆動する発現制御エレメントに作動可能に連結されている AAV rep およびカプシドタンパク質をコードし、トランスに rep および cap タンパク質を供給する、AAV ITR を欠いているトランス発現カセット；

(iii) AAV カプシドタンパク質による人工ゲノムの複製およびパッケージングを可能にする十分なアデノウイルスヘルパー機能を含有する宿主細胞を培養することと、

(b) 人工ゲノムをカプシドに包んでいる組換え AAV を細胞培養から回収することとを含む方法。

61. VEGF-Trap 導入遺伝子を含む AAV8 ウイルスベクターを製造する方法であって、AAV ITR が隣接する発現カセットを含む核酸ベクターで安定して形質転換された宿主細胞を、AAV8 ウイルスベクターの生成に適切な条件下で培養することであって、発現カセットは、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> をコードする導入遺伝子を含み、AAV8 複製およびカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列も含む、こと；および宿主細胞によって生成される AAV8 ウイルスベクターを回収することを含む方法。

62. VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> を製造する方法であって、ヒト網膜細胞において VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> の発現を制御する 1 つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターで形質転換された不死化ヒト網膜細胞を培養すること、およびヒト網膜細胞によって発現される VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup> を単離することを含む方法。

【0070】

特許または出願ファイルは、色刷りの少なくとも 1 つの図面を含有する。カラー図面を有するこの特許または特許出願公報のコピーは、請求および必要な手数料の支払いによって特許庁から提供される。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図 1】タンパク質の N 末端にあるリーダー配列を含むアフリベルセプトの融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 15）の図。リーダー配列は、番号付けされていない。N 連

10

20

30

40

50



結グリコシル化部位は、36、68、123、196および282位で黄色により強調され；チロシン - O 硫酸化部位は11、140、263および281位で赤色により強調され；ジスルフィド結合に關与するシステインは30、79、124、185、211、214、246、306、352および410位で緑色により強調され；FcRn結合を低減するために置換することができるFcドメイン位置は、238、295および420位でピンク色により強調される。Flt - 1配列は、1～102位のオレンジ色のテキストであり（Ig様ドメイン2は太字である）、KDR配列は、103～205位の青色のテキストであり（Ig様ドメイン3は太字である）、IgG1 Fcは206位から灰色であり、ヒンジ領域はイタリック体で示す。

【図2】異種シグナルペプチドを有するアフリベルセプトの融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号16）の図。N連結グリコシル化部位は、36、68、123、196および282位で黄色により強調され；チロシン - O 硫酸化部位は11、140、263および281位で赤色により強調され；ジスルフィド結合に關与するシステインは30、79、124、185、211、214、246、306、352および410位で緑色により強調され；FcRn結合を低減するために置換することができるFcドメイン位置は、238、295および420位でピンク色により強調される。Flt - 1配列は、1～102位のオレンジ色のテキストであり（Ig様ドメイン2は太字である）、KDR配列は、103～205位の青色のテキストであり（Ig様ドメイン3は太字である）、IgG1 Fcは206位から灰色であり、ヒンジ領域はイタリック体で示す。

【図3】異種シグナルペプチドを有するアフリベルセプトH420A/Q（無効化Fc）の融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号17）の図。N連結グリコシル化部位は、36、68、123、196および282位で黄色により強調され；チロシン - O 硫酸化部位は11、140、263および281位で赤色により強調され；ジスルフィド結合に關与するシステインは30、79、124、185、211、214、246、306、352および410位で緑色により強調される。Flt - 1配列は、1～102位のオレンジ色のテキストであり（Ig様ドメイン2は太字である）、KDR配列は、103～205位の青色のテキストであり（Ig様ドメイン3は太字である）、IgG1 Fcは206位から灰色であり、ヒンジ領域はイタリック体で示す。

【図4】異種シグナルペプチドを有するアフリベルセプト Fc（・）の融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号18）の図。N連結グリコシル化部位は、36、68、123および196位で黄色により強調され；チロシン - O 硫酸化部位は11および140位で赤色により強調され；ジスルフィド結合に關与するシステインは30、79、124および185位（任意選択で、211および214位）で緑色により強調される。Flt - 1配列は、1～102位のオレンジ色のテキストであり（Ig様ドメイン2は太字である）、KDR配列は、103～205位の青色のテキストである（Ig様ドメイン3は太字である）。Fcのない変異体は灰色で示され、K、KDKTHT（配列番号31）（またはKDKTHL（配列番号32））、KDKTHTCPPCPA（配列番号33）またはKDKTHTCPPCPAPPELLGG（配列番号34）、またはKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL（配列番号35）を含むことができる。

【図5 - 1】（A）VEGF - Trap構築物の図。図1に示す、アフリベルセプトのアミノ酸配列を有する融合タンパク質の発現のためのAAV8発現構築物である。

【図5 - 2】（B）VEGF - Trap構築物の図。図2に示す、代替リーダー配列を有するアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する融合タンパク質の発現のためのAAV8発現構築物である。

【図5 - 3】（C）VEGF - Trap構築物の図。図3に示す、H420A（「H435A」）置換および代替リーダー配列を有するアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する融合タンパク質の発現のためのAAV8発現構築物である（図3で番号付けされる420位での置換を有する）。

【図5 - 4】（D）VEGF - Trap構築物の図。図3に示す、H420Q（「H435Q」）置換および代替リーダー配列を有するアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する

10

20

30

40

50

融合タンパク質の発現のための A A V 8 発現構築物である ( 図 3 で番号付けされる 4 2 0 位での置換を有する )。

【図 5 - 5】( E ) V E G F - T r a p 構築物の図。 F c のない V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードするヌクレオチド配列の 2 つのコピーの間に I R E S を有する F c のない V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の 2 つのコピーの発現に関してニシストロン性である A A V 8 発現構築物である。

【図 5 - 6】( F ) V E G F - T r a p 構築物の図。切断可能なフューリン / フューリン 2 A リンカーおよび代替リーダー配列を有する F c のない V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の 2 つのコピーの発現のための A A V 8 発現構築物である。

【図 6 - 1】A A V カプシド 1 ~ 9 の集団多配列アラインメントの図。最後の行「 S U B S 」は、加えることができるアミノ酸置換 ( 最下部の行において太字で示す ) が、他の整列させた A A V カプシドの対応する位置からアミノ酸残基を「動員する」ことによって A A V 8 カプシドに加えることができることを示す。超可変領域は、赤色で示す。A A V カプシドのアミノ酸配列は、以下の配列番号を割り当てられる : A A V 1 は配列番号 4 ; A A V 2 は配列番号 5 ; A A V 3 - 3 は配列番号 6 ; A A V 4 - 4 は配列番号 7 ; A A V 5 は配列番号 8 ; A A V 6 は配列番号 9 ; A A V 7 は配列番号 1 0 ; A A V 8 は配列番号 1 1 ; h u 3 1 は配列番号 1 2 ; h u 3 2 は配列番号 1 3 ; および A A V 9 は配列番号 1 4 である。

【図 6 - 2】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 3】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 4】図 6 - 1 の続きである。

【図 6 - 5】図 6 - 1 の続きである。

【図 7 - 1】( A ) I g G 2 の F c ドメイン、ヒンジ領域はイタリック体で下線付きのアミノ酸配列 ( 配列番号 1 9 ) の図 ; ( B ) I g G 4 の F c ドメイン、ヒンジ領域はイタリック体で下線付きのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 0 ) の図 ; ( C ) C 末端ドメインとして部分的ヒンジ領域を有する I g G 2 F c ドメインを有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 1 ) の図 ; および ( D ) C 末端ドメインとして完全ヒンジ領域を有する I g G 2 F c を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 2 ) の図。C ~ D において、F l t 1 配列は 1 ~ 1 0 2 位のオレンジ色テキストであり、K D R 配列は 1 0 3 ~ 2 0 5 位の青色テキストである。 ;

【図 7 - 2】( E ) C 末端ドメインとして部分的ヒンジ領域を有する I g G 4 F c を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 3 ) の図 ; ( F ) 下線の位置で 2 つのシステイン残基がセリン残基によって置換される、C 末端ドメインとして部分的ヒンジ領域を有する I g G 4 F c を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 4 ) の図 ; ( G ) C 末端ドメインとして完全ヒンジ領域を有する I g G 4 F c を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 5 ) の図 ; および ( H ) 下線の位置で 2 つのシステイン残基がセリンによって置換される、C 末端ドメインとして完全ヒンジ領域を有する I g G 4 F c を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 6 ) の図。E ~ H において、F l t 1 配列は 1 ~ 1 0 2 位のオレンジ色テキストであり、K D R 配列は 1 0 3 ~ 2 0 5 位の青色テキストである。

【図 8 - 1】( A ) ヒト F l t - 1 ( U n i P r o t K B - P I 7 9 4 8 ( V G F R 1 \_\_ ヒト ) ) の細胞外ドメインおよびシグナル配列、シグナル配列はイタリック体であり、I g 様ドメイン 1 配列は青色、I g 様ドメイン配列は緑色、I g 様ドメイン 3 配列はオレンジ色、I g 様ドメイン 4 配列は赤色、I g 様ドメイン 5 配列は黄色、I g 様ドメイン 6 は紫色および I g 様ドメイン 7 は灰色のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 7 ) の図。

【図 8 - 2】( B ) ヒト K D R ( U n i P r o t K B P 3 5 9 6 8 ( V G F R 2 \_\_ ヒト ) ) の細胞外ドメインおよびシグナル配列、シグナル配列はイタリック体、I g 様ドメイン 1 配列は青色、I g 様ドメイン 2 配列は緑色、I g 様ドメイン 3 配列はオレンジ色、I g 様ドメインタイプ 4 配列は赤色、I g 様ドメイン 5 配列は黄色、I g 様ドメイン 6 は紫

10

20

30

40

50

色および I g 様ドメイン 7 は灰色のアミノ酸配列（配列番号 28）の図。

【図 8 - 3】（C）C 末端ドメインとして F l t - 1 I g 様ドメインを有する V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列（配列番号 29）の図；および（D）C 末端ドメインとして K D R I g 様ドメインを有する V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> のアミノ酸配列（配列番号 30）の図。C 及び D の両方において、K D R 配列の I g 様ドメイン 3 は 103 ~ 205 位の青色テキストである。

【発明を実施するための形態】

【0072】

増加した血管化によって引き起こされる眼疾患、例えば「滲出型」A M D としても知られる n A M D と診断された患者（ヒト対象）の目の網膜 / 硝子体液への、ヒト翻訳後修飾 V E G F - T r a p（V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup>）の送達のための組成物および方法が提供される。これは、遺伝子療法を通して、例えば、完全ヒト翻訳後修飾導入遺伝子生成物を連続的に供給する恒久的なデポーを目の中に形成するために、n A M D または血管化によって引き起こされる他の眼疾患と診断された患者（ヒト対象）の目に V E G F - T r a p タンパク質をコードする（導入遺伝子として）ウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物を投与することによって達成することができる。そのような D N A ベクターは、患者に対して網膜下空間に、または脈絡膜上空間に、または硝子体内に投与することができる。V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、（非ヒト C H O 細胞と比較して）ヒト細胞における発現のために、完全ヒト翻訳後修飾を有することができる。本方法は、V E G F 阻害に応答する任意の眼の適応症、特にアフリベルセプト（E Y L E A（登録商標））に 10 20 応答するもの：例えば、少し例を挙げると、A M D、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（D M E）、例えば D M E 患者における糖尿病性網膜症、網膜中心静脈閉塞（R V O）および R V O の後の黄斑浮腫、病的近視、特に近視の脈絡膜新血管形成によって引き起こされるもの、ならびにポリープ様脈絡膜脈管障害を処置するために使用することができる。

【0073】

他の実施形態では、がん、例えば転移性大腸がん と診断された患者における、がん細胞および周囲組織、特に血管化の増加を示している組織への V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> の送達のための組成物および方法が提供される。これは、遺伝子療法を通して、例えば、完全ヒト翻訳後修飾導入遺伝子生成物を連続的に供給する恒久的なデポーを肝臓の中に形成するために、がん、特に転移性大腸がん と診断された患者（ヒト対象）の肝臓に、V E 30 G F - T r a p タンパク質を導入遺伝子としてコードするウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物を投与することによって達成することができる。そのような D N A ベクターは、患者に対して静脈内に、または肝臓血流を通して、例えば肝上静脈を通してもしくは肝臓動脈を通して肝臓に直接的に投与することができる。

【0074】

導入遺伝子によってコードされる V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、（アミノからカルボキシ末端にかけて）：（i）F l t - 1 の I g 様ドメイン 2（ヒト；V E G F R 1 と 40 も呼ばれる）、（i i）K D R の I g 様ドメイン 3（ヒト；V E G F R 2 と呼ばれる）、および（i i i）ヒト I g G F c 領域、特に I g G 1 F c 領域を含む融合タンパク質である。具体的な実施形態では、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> は、アフリベルセプトの 40 アミノ酸配列を有する（図 1 のアミノ酸位置の番号付けを提供する配列番号 1 および図 1 が本明細書で使用される；アフリベルセプトのアミノ酸配列およびアフリベルセプトをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列については下の表 1 も参照）。図 1 は、アフリベルセプト配列の N 末端の F l t - 1 リーダー配列も提供し、下に開示されるように、導入遺伝子は図 1 のリーダー配列または他の代替リーダー配列をコードする配列を含むことができる。あるいは、導入遺伝子は、目における安定性および滞留を増加させるが、全身循環に侵入の後の導入遺伝子生成物の全身半減期をなお低減するように設計された V E G F - T r a p の変異体；トランケーションされたかまたは「F c なしの」V E G F - T r a p 構築物、改変された F c を有する V E G F T r a p 導入遺伝子をコードすることができ、ここで、改変は F c R n 結合部位を使用不能にし、および / または、別の F c 領域も 50

しくはIg様ドメインがIgG1Fcドメインを置換している。

#### 【0075】

ある特定の態様では、ヒト網膜または肝臓細胞におけるVEGF-Trap導入遺伝子の発現のための構築物が本明細書で提供される。本構築物は、導入遺伝子および網膜または肝臓細胞における発現のために適切な発現制御エレメントをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含むことができる。導入遺伝子を送達するために使用される組換えベクターは、網膜または肝臓細胞へのトロピズムを有するべきである。これらには、非複製組換えアデノ随伴ウイルスベクター(「rAAV」)、特にAAV8カプシドを有するものを含めることができ、または、AAV8カプシドの変異体が好ましい。しかし、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたは「裸のDNA」構築物と呼ばれる非ウイルス性の発現ベクターを非限定的に含む、他のウイルスベクターを使用することができる。

10

#### 【0076】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される核酸(例えば、ポリヌクレオチド)および核酸配列は、例えば当業者に公知である任意のコドン最適化技術を通してコドン最適化することができる(例えば、Quax et al., 2015, Mol Cell 59: 149-161によるレビューを参照)。配列番号2として提供されているのは、配列番号1の導入遺伝子生成物に加えて図1に提供されるリーダー配列をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列である。配列番号3は、配列番号1の導入遺伝子生成物に加えて図1のリーダー配列をコードするコンセンサスコドン最適化ヌクレオチド配列である(配列番号2および3については下の表1を参照されたい)。

20

#### 【0077】

具体的な実施形態では、それを必要とするヒト対象において、黄斑変性症(nAMD)、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜中心静脈閉塞(RVO)、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害を含む眼の障害を処置するための遺伝子療法投与のための構築物であって、AAV8カプシドのアミノ酸配列(配列番号11)と少なくとも95%同一であるウイルスカプシド;およびAAV逆方向末端反復配列(ITR)が隣接する発現カセットを含むウイルスゲノムであって、発現カセットが、ヒト網膜細胞において導入遺伝子の発現を制御する1つまたは複数の調節配列に作動可能に連結されている、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする導入遺伝子を含む、ウイルスゲノムを含む、AAVベクターを含む構築物が提供される。

30

#### 【0078】

VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>のための構築物は、形質導入された網膜細胞または肝臓細胞による適切な同時および翻訳後プロセッシング(グリコシル化およびタンパク質硫酸化)を確実にするシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むべきである。好ましい実施形態では、シグナル配列は、Flt-1のもの、MVS YWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG(配列番号36)である(図1を参照されたい)。代替的な実施形態では、シグナル配列はKDRシグナル配列、MQSKVLLAVALLWLCVETRA(配列番号37)、あるいは、好ましい実施形態では、MYRMQLLLLLIALSLALLVTNS(配列番号38)またはMRMQQLLLLLIALSLALLVTNS(配列番号39)である(図2を参照)。ヒト網膜細胞における発現のために使用される他のシグナル配列には、限定されずに、下の表3のものを含めることができ、ヒト肝臓細胞における発現のために使用されるシグナル配列には、限定されずに、下の表4のものを含めることができる。

40

#### 【0079】

具体的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、図1、図2、図3、図4、図7C~7Hまたは図8Cおよび8Dに示すアミノ酸配列を有する。

#### 【0080】

ある特定の態様では、新生血管加齢性黄斑変性症(nAMD)、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫(DME)、網膜中心静脈閉塞(RVO)、病的近視またはポリブ様脈絡

50

膜脈管障害と診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト光受容体細胞（錐体細胞、桿体細胞）；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞（小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア）；および網膜色素上皮細胞を含むヒト網膜細胞によって生成される VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> の治療有効量を送達することを含む方法が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> は、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが網膜細胞の中に形成され、その後網膜に送達されるように、患者の目に前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を投与することによって送達される。

#### 【0081】

10

ある特定の態様では、がん、特に転移性大腸がんと診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象のがん細胞または周囲組織（例えば、がん細胞を囲んでいる血管化の増加を示している組織）にヒト肝臓細胞によって生成される VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> の治療有効量を送達することを含む方法が本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> は、VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> を放出するデポーが肝臓の中に形成され、その後がん細胞および／または周囲組織に送達されるように、がんと診断された患者に前記 VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup> をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療有効量を好ましくは静脈内に投与することによって送達される。

#### 【0082】

20

そのような遺伝子療法を投与する対象は、抗 VEGF 療法に応答性の者であるべきである。特定の実施形態では、本方法は、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視もしくはポリプ様脈絡膜脈管障害と診断されたかまたはがんと診断され、VEGF - Trap タンパク質または他の抗 VEGF 剤による処置に応答性であると同定された患者を処置することを包含する。

#### 【0083】

ある特定の態様では、ヒト翻訳後修飾を含有する VEGF - Trap タンパク質が本明細書で提供される。一態様では、本明細書に記載される VEGF - Trap タンパク質は、2, 6 - シアリル化グリカンのヒト翻訳後修飾を含有する。ある特定の実施形態では、VEGF - Trap タンパク質は、ヒト翻訳後修飾のみを含有するだけである。一実施形態では、本明細書に記載される VEGF - Trap タンパク質は、Neu5Gc および／または - Gal の免疫原性非ヒト翻訳後修飾を含有しない。別の態様では、VEGF - Trap タンパク質は、チロシン（「Y」）硫酸化部位を含有する。一実施形態では、チロシン部位は、アフリベルセプトの Flt - 1 Ig 様ドメイン 2、KDR Ig 様ドメイン 3 および／または Fc ドメインで硫酸化される（硫酸化部位については図 1 を参照、赤色で強調されている）。別の態様では、VEGF - Trap タンパク質は、2, 6 - シアリル化グリカン、および少なくとも 1 つの硫酸化チロシン部位を含有する。他の態様では、VEGF - Trap タンパク質は、完全ヒト翻訳後修飾を含有する（VEGF - Trap<sup>HUP TM</sup>）。ある特定の態様では、VEGF - Trap の翻訳後修飾は、培養において導入遺伝子によって PER . C6 または RPE 細胞を形質導入することによって評価することができ、これは細胞培養において、2, 6 - シアリル化を有するが検出可能な（例えば下記の標準アッセイによって判定される）NeuGc も - Gal も含有しない前記 VEGF - Trap の生成をもたらすことができる。あるいは、またはさらに、チロシン硫酸化を含有する前記 VEGF - Trap の生成は、細胞培養において PER . C6 または RPE 細胞株を前記組換えヌクレオチド発現ベクターによって形質導入することによって確認することができる。

#### 【0084】

本発明は、経時的に消散してピークおよびトラフのレベルをもたらす VEGF 阻害剤の高用量ボラスの反復眼内注射を含む医療標準処置に対していくつかの利点を有する。VEGF - Trap 生成物の反復注射と対比して、導入遺伝子生成物 VEGF - Trap の

50

持続的発現はより一貫したレベルの治療薬が作用部位に存在することを可能にし、より少ない注射しか必要でなく、より少ない医師診察で済むので、患者にとってより危険でなく、より便利である。さらに、導入遺伝子から発現される V E G F - T r a p は、翻訳の間および後に存在する異なる微小環境のために、直接的に注射されるものと異なる様式で翻訳後に改変される。いかなる特定の理論によっても束縛されることなく、これは、異なる拡散、生物活性、分布、親和性、薬物動態および免疫原性特徴を有する V E G F - T r a p 分子をもたらし、そのため、作用部位に送達される抗体は、直接的に注射される V E G F - T r a p と比較して「生物学的により優れたもの」である。

#### 【 0 0 8 5 】

V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の生成は、遺伝子療法を通して、例えば、形質導入された網膜細胞によって生成される完全ヒト翻訳後修飾、例えばヒト 2 , 6 - シアリル化、硫酸化導入遺伝子生成物（検出可能な N e u G C も - G a l もない）を連続的に供給する恒久的なデポーを目の中に形成するために、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断された患者（ヒト対象）の目の網膜下空間、脈絡膜上空間または硝子体内に V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードするウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物を投与することによって達成される、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害の処置のための「生物学的により優れた」分子をもたらすべきである。さらに、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の生成は、遺伝子療法を通して、例えば、形質導入された肝臓細胞によって生成される完全ヒト翻訳後修飾、例えばヒト 2 , 6 - シアリル化、硫酸化導入遺伝子生成物（検出可能な N e u G C も - G a l もない）を連続的に供給する恒久的なデポーを肝臓の中に形成するために、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードするウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物を、がん、特に転移性大腸がんとして診断された患者（ヒト対象）の肝臓に投与することによって達成される、がん、特に転移性大腸がんの処置のための「生物学的により優れた」分子をもたらすべきである。

#### 【 0 0 8 6 】

遺伝子療法の代わりに、またはさらなる処置として、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> 糖タンパク質を組換え D N A 技術によってヒト細胞株において生成することができ、糖タンパク質は、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、c R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害と診断された患者に対して硝子体内投与によって、またはがん、特に転移性大腸がんとして診断された患者に対して注入または他の非経口投与によって投与することができる。

#### 【 0 0 8 7 】

小分子薬と異なり、生物製剤は、異なる効力、薬物動態および安全性プロファイルを有する異なる改変または形態を有する多くの変異体の混合物を通常含む。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチで生成されるあらゆる分子が完全にグリコシル化および硫酸化されることは必須でない。むしろ、生成される糖タンパク質の集団は、効能を示すのに十分な、2 , 6 - シアリル化および硫酸化を含むグリコシル化を有するべきである。ある特定の実施形態では、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の集団の 0 . 5 % ~ 1 % は、2 , 6 - シアリル化および / または硫酸化を有する。他の実施形態では、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> の集団の 2 %、2 % ~ 5 %、または 2 % ~ 1 0 % は、2 , 6 - シアリル化および / または硫酸化を有する。ある特定の実施形態では、2 , 6 - シアリル化および / または硫酸化のレベルは有意により高く、そのため、分子の最大 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 1 0 0 % でさえも 2 , 6 - シアリル化および / または硫酸化を含有する。本明細書で提供される遺伝子療法処置の目標は、網膜の新血管形成を処置すること、および最小限の介入 / 侵襲的手順によって視力を維持もしくは向上させること、または転移性大腸がんを処置する、改善する、もしくはその進行を鈍化させることである。

#### 【 0 0 8 8 】

新血管形成に関連した目の疾患またはがんの処置のために有益である薬剤または処置と組み合わせた V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> による処置方法も提供される。

## 【0089】

VEGF - Trap 導入遺伝子および VEGF - Trap<sup>HUP T M</sup> タンパク質生成物を含有する AAV8 ウイルスベクターを製造する方法も、提供される。

## 【0090】

## 5.1. VEGF - Trap 導入遺伝子

ある特定の態様では、VEGF - Trap 導入遺伝子ならびに導入遺伝子をコードする構築物が提供される。導入遺伝子によってコードされる VEGF - Trap には、限定されずに、アフリベルセプトのアミノ酸配列を有する VEGF - Trap<sup>HUP T M</sup> および VEGF - Trap 変異体を含めることができる。アフリベルセプトは、(アミノからカルボキシ末端にかけて)：(i) ヒト Flt - 1 の Ig 様ドメイン 2 (VEGFR1 としても知られる)、(ii) ヒト KDR の Ig 様ドメイン 3 (VEGFR2 としても知られる)、および (iii) ヒト IgG Fc 領域、特に IgG1 の Fc、を含む融合タンパク質である。好ましくは、VEGF - Trap<sup>HUP T M</sup> は、図1のアミノ酸配列(配列番号1、リーダー配列を含まない)を有し、図1のリーダー配列または本明細書に記載される代替リーダー配列を含むことができる。VEGF - Trap の変異体には、限定されずに、目における安定性および滞留を増加させるが、全身循環に侵入の後の導入遺伝子生成物の全身半減期をなお低減するように設計された変異体を含めることができる。一実施形態では、変異体はトランケーションされているかまたは「Fcなしの」VEGF - Trap であってもよいが、1つまたは複数のアミノ酸置換を有することができるか、または異なる IgG Fc ドメイン、例えば IgG2 もしくは IgG4 の Fc、または Flt - 1、KDR などからの Ig 様ドメインを有することができる。別の実施形態では、トランケーションされるかまたは「Fcなしの」VEGF - Trap 導入遺伝子は、2つの「Fcなしの」VEGF - Trap 導入遺伝子を構築物に挿入することができる「二重用量」構築物を形成するように工学的に操作することができる。あるいは、変異体は、改変された Fc を有するアフリベルセプト導入遺伝子であってよく、ここで、改変は Fc Rn 結合部位を無効にする。そのような改変は、全身循環に侵入後の導入遺伝子生成物の全身半減期を低減するが、目における安定性および滞留をなお維持することができる。

## 【0091】

VEGF - Trap 導入遺伝子は、VEGF 受容体 1 および 2 の融合タンパク質をコードする導入遺伝子を指し、それらは血管新生に関連したいくつかの網膜疾患およびがんの処置のために開発された。一実施形態では、VEGF - Trap 導入遺伝子は、ヒト IgG1 の Fc 部分に融合させたヒト VEGF 受容体の細胞外ドメインの VEGF 結合領域からなる組換え融合タンパク質をコードすることができる。別の実施形態では、VEGF - Trap 導入遺伝子は、シグナル配列および VEGF 受容体 2 のドメイン 3 に付着した VEGF 受容体 1 のドメイン 2、ならびにヒト IgG Fc 領域をコードすることができる(例えば、Holash et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(17): 11393を参照されたい)。さらなる実施形態では、VEGF - Trap 導入遺伝子は、ジブ - アフリベルセプトのアミノ酸配列を有する VEGF - Trap をコードすることができる。別の実施形態では、VEGF - Trap 導入遺伝子は、Conbercept (de Oliveira Dias et al., 2016, Int J Retin Vitro 2:3) をコードすることができる。

## 【0092】

好ましい実施形態では、VEGF - Trap 導入遺伝子は、アフリベルセプトの融合タンパク質をコードすることができる。アフリベルセプトは、(アミノからカルボキシ末端にかけて)：(i) ヒト Flt - 1 の Ig 様ドメイン 2 (別名 VEGFR1)、(ii) ヒト KDR の Ig 様ドメイン 3 (別名 VEGFR2)、および (iii) ヒト IgG1 Fc 領域を含む融合タンパク質である。アフリベルセプトのアミノ酸配列(いかなるリーダー配列もない)は、表1に示す配列番号1である。

## 【0093】

本明細書に記載される VEGF - Trap 導入遺伝子生成物をコードするヌクレオチド配列が、提供される。好ましくは、コードヌクレオチド配列は、ヒト細胞における発現の

10

20

30

40

50

ためにコドン最適化される（例えば、Quax et al., 2015 Mol. Cell 59: 149-161を参照）。ヒト細胞における発現のためにコドン最適化された配列を作成するために、アルゴリズム、例えば、EMBOSのウェブベースのトランスレータ（[http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_backtranseq/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/)）、または、[http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_backtranslation.html](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html)が利用可能である。表1に示す通り、アフリベルセプトをコードするコドン最適化ヌクレオチド配列（リーダー配列を含む）は配列番号2であり（リーダーをコードする配列は図1における通りである、イタリック体で示される）、コンセンサス配列は配列番号3（リーダー配列をコードする配列は図1からである、イタリック体で示される）。配列番号3で、「r」はプリン（gまたはa）を示し；「y」はピリミジン（t/uまたはc）を示し；「m」はaまたはcであり；「k」はgまたはt/uであり；「s」はgまたはcであり；「w」はaまたはt/uであり；「b」はg、cまたはt/uであり（すなわち、aでない）；「d」はa、gまたはt/uであり（すなわち、cでない）；「h」はa、cまたはt/uであり（すなわち、gでない）；「v」はa、gまたはcであり（すなわち、tでもuでもない）；「n」はa、g、c、t/u、未知、または他である。

10

【0094】

【表1】

表1

説明	配列
アフリベルセプトの アミノ酸配列 (リーダーなし)	SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI 50 PDGKRIIWD S RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGLHYKT NYLTHRQTNT 100 IIDVVLSPSH GIELSVGEKL VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL 150 VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV 200 RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD 250 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL 350 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS 400 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP +/- GまたはGK
アフリベルセプトを コードする コドン最適化 ヌクレオチド配列 (リーダーは イタリック体)	atgtacagaa tgcagctgct gctgctgac gccctgagcc tggccctggt 50 gaccaacagc agcgacaccg gcagaccctt cgtggagatg tacagcgaga 100 tccccgagat catccacatg accgagggca gagagctggt gatccccctgc 150 agagtgacca gccccaacat caccgtgacc ctgaagaagt tccccctgga 200 caccctgac cccgacggca agagaatcat ctgggacagc agaaagggt 250 tcatcatcag caacgccacc tacaaggaga tcggcctgct gacctgcgag 300 gccaccgtga acggccacct gtacaagacc aactacctga cccacagaca 350 gaccaacacc atcatcgacg tgggtgctgag cccagccac gccatcgagc 400 tgagcgtggg cgagaagctg gtgctgaact gcaccgccag aaccgagctg 450 aacgtgggca tcgacttcaa ctgggagtag cccagcagca agcaccagca 500 caagaagctg gtgaacagag acctgaagac ccagagcggc agcgagatga 550 agaagttcct gagcaccctg accatcgacg gcgtgaccag aagcgaccag 600 ggcctgtaca cctgcgccgc cagcagcggc ctgatgacca agaagaacag 650 caccttcgtg agagtgcacg agaaggacaa gacccacacc tgccccccct 700 gccccgcccc cgagctgctg ggcggcccca gcgtgttctt gtcccccccc 750 aagcccaagg acaccctgat gatcagcaga acccccagag tgacctgcgt 800 ggtggtggac gtgagccacg aggaccccga ggtgaagttc aactggtacg 850 tggaacggcg ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900 tacaacagca cctacagagt ggtgagcgtg ctgaccgtgc tgcaccagga 950 ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgagcaac aaggccctgc 1000 ccgcccccat cgagaagacc atcagcaagg ccaagggcca gccagagag 1050 ccccaggtgt acaccctgcc cccagcaga gacgagctga ccaagaacca 1100 ggtgagcctg acctgcctgg tgaagggett ctaccccagc gacatgcgcc 1150 tgagtgagg gagcaacggc cagcccagaga acaactaca gaccaccccc 1200 cccgctgctg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgacctg 1250 ggacaagagc agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc 1300 acgagggcct gcacaaccac tacaccagaga agagcctgag cctgagcccc 1350 +/- ggcまたはggc aag

20

30

40

50



アフリベルセプトを コードする コドン最適化 コンセンサス配列 (リーダーは イタリック体)	atgtaymgna tgcarytnyt nytnytnath gcnynwnsny tngcnynngt 50
	nacnaaywsn wsn gayacng gnmgnccntt ygtngaratg taywsngara 100
	thccngarat hathcayatg acngarggngm gngarytngt nathccntgy 150
配列番号 : 3	mgngtnacnw snccnaayat hacngtnacn ytnaaraart tycenynga 200
	yacnytnath ccngayggna armgnathat htgggaywsn mgnaarggnt 250
	tyathathws naaygnaacn tayaargara thggnytnyt nactngygar 300
	gcnacngtna ayggncayyt ntayaaracn aaytayytna cncaymgna 350
	racnaayacn athathgayg tngtnytnws nccnwnsncay ggnathgary 400
	tnwsngtngg ngaraarytn gtnytnaayt gyaengcnmg nacngarytn 450
	aaygtnggna thgayttyaa ytgggartay ccnwnwsna arcaycarca 500
	yaaraarytn gtnaaymgng ayytnaarac ncarwsnggn wsnngaratga 550
	araarttyyt nwsnacnytn acnathgayg gngtnacnmg nwsngaycar 600
	ggnyntaya cntgygcngc nwsnwsnggn ytnatgacna araaraayws 650
	nactnttygt nmgngtncayg araargayaa racncayaacn tgyccnccnt 700
	gyccngcncc ngarytnytn ggnggncnccw sngtnttyyt nttyccnccn 750
	aarccnaarg ayacnytnat gathwsnmgn acnccngarg tnaentgygt 800
	ngtngtngay gtnwnsncayg argayccnga rgtnaartty aaytggtayg 850
	tngayggngt ngargtncay aaygcnaara cnaarccnmg ngargarcar 900
	tayaaywsna cntaymgngt ngtnwsngtn ytnacngtny tncaycarga 950
	ytggytnaay ggnaargart ayaartgyaa rgtwnsnaay aargcnytn 1000
	cngcncnat hgaraaracn athwsnaarg cnaarggna rccnmngnar 1050
	ccncargtnt ayacnytncc nccnwnsmgn gaygarytna cnaaraayca 1100
	rgtnwsnytn acntgyytn gtnaarggntt ytayccnwns gayathgeng 1150
	tngartggga rwsnaayggn carcngara ayaaytayaa racnacnccn 1200
	ccngtnytn gnywsngaygg nwsnttytty ytnaywsna arytnacngt 1250
	ngayaarwsn mgntggcarg arggnaaygt nttywsntgy wsnngtnatgc 1300
	aygargcnyt ncayaaycay tayaencara arwsnytnws nytnwnsccn 1350
	+/- ggn または ggn aan

10

20

30

40

50

## 【0095】

図1に示すように、アフリベルセプト配列中のヒトFlt-1配列は配列番号1のアミノ酸1～102であり、KDR配列はアミノ酸103～205であり、IgG1 Fcドメインはアミノ酸206～431であり、IgG1 Fcヒンジ領域はアミノ酸206～222である。図1は、N末端にFlt-1リーダー配列、MVSYWDTGVLLCALLLSCLLLTGSSSG（配列番号36）を有するアフリベルセプトの融合タンパク質のアミノ酸配列を提供する。別の実施形態では、VEGF-Trap導入遺伝子は、ヒトKDRシグナル配列、MQSKVLLAVALLWLCVETRA（配列番号37）、あるいはMRMQQLLLLIALLSLALVTNS（配列番号39）、異種リーダー配列、またはMYRMQLLLLIALLSLALVTNS（配列番号38）、代替の異種リーダー配列を伴うアフリベルセプトの融合タンパク質をコードすることができる（図2を参照されたい）。ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞におけるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の発現ならびに適切な翻訳後プロセッシングおよび改変のために有用であるリーダー配列も、下に開示される。それぞれ、表3および4を参照されたい。

## 【0096】

ある特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>導入遺伝子は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、アフリベルセプトなどのVEGF-trap融合タンパク質の生物活性を有する、VEGF-Trapをコードする。

## 【0097】

VEGF-Trapの変異体には、限定されずに、目における安定性および滞留を増加させるが、全身循環に侵入の後の導入遺伝子生成物の全身半減期をなお低減するように設計された変異体を含めることができる。一実施形態では、変異体は、トランケーションされているかまたは「Fcなしの」VEGF-Trap（Fcドメインのヒンジ領域を含有

しても含有していなくてもよい)であってもよい。別の実施形態では、トランケーションされるかまたは「Fcなしの」またはFc( ) VEGF - Trap 導入遺伝子は、2つの「Fcなしの」VEGF - Trap 導入遺伝子を下記構築物に挿入してそこから発現させることができる、「二重用量」構築物を形成するように工学的に操作することができる。あるいは、変異体は、改変されたFc、例えばC末端のリジン( - K)もしくはグリシン - リジン( - GK)欠失を有するトランケーションされたFc、またはFcRn結合部位を無効にする改変を有するアフリベルセプト導入遺伝子の融合タンパク質であってもよい。そのような改変は、全身循環に侵入後の導入遺伝子生成物の全身半減期を低減するが、目における安定性および滞留をなお維持することができる。全身循環における抗VEGF剤の長引く滞留は出血および血栓塞栓性合併症に関連するので、改変されたFcを有するVEGF - Trap 導入遺伝子はタンパク質をより安全にするべきである。一実施形態では、改変されたFcを有するアフリベルセプト導入遺伝子を投与された患者は、より少ない出血および/または血栓塞栓性合併症を経験する。(例えば、Ding et al., 2017, M Abs 9:269-284 ; Kim, 1999, Eur J Immunol 29:2819 ; Andersen, 2012, J Biol Chem 287 : 22927-22937 ; およびRegula, 2016, EMBO Mol Med 8: 1265-1288を参照されたい)。

10

20

30

40

50

#### 【0098】

一実施形態では、VEGF - Trap 変異体は、改変されたIgG Fcとアフリベルセプトの融合タンパク質であってもよい。例えば、全てのヒトIgGサブクラスの重鎖遺伝子において保存されるC末端のリジン( - K)は血清中のIgGに一般的になく、C末端のリジンは循環の中で切断され、循環IgGの不均一な集団をもたらす。(van den Bremer et al., 2015, mAbs 7:672-680)。in situでより均一な導入遺伝子生成物を生成するために、VEGF - TrapのFcのC末端のリジン( - K)またはグリシン - リジン( - GK)をコードするDNAを欠失させることができる(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Hu et al., 2017 Biotechnol. Prog. 33 : 786-794を参照)。別の実施形態では、Fc改変は、FcRn結合部位を無効にし、それによってタンパク質の全身半減期を低減する突然変異であってもよい。これらの突然変異には、IgG1重鎖における位置の通常の番号付けを使用して、I253、H310および/またはH435の突然変異が含まれ、より具体的にはI253A、H310Aおよび/またはH435QもしくはH435Aが含まれる。これらの位置は、図1のVEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>におけるI238、H295およびH420に対応する。したがって、配列番号1の238位のイソロイシンに対するアラニン置換、295位のヒスチジンに対するアラニン置換および/または420位のヒスチジンに対するグルタミンもしくはアラニン置換を有するIgG1 Fcドメインを含むVEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>が提供される(または、ルーチンの配列アラインメントによって判定される異なるVEGF trapタンパク質におけるそれに対応した位置)。ある特定の実施形態では、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>は、突然変異I238A、H295AおよびH435QまたはH420Aの1つ、2つまたは3つを有する。420位のアラニンまたはグルタミン置換を有するアフリベルセプトのアミノ酸配列を有する融合タンパク質の例示的なVEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>アミノ酸配列が、図3に提供される。

#### 【0099】

ある特定の実施形態では、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>は、IgG1 Fcドメイン(配列番号1のアミノ酸206~431)を含まず、配列番号1のアミノ酸1~205の融合タンパク質をもたらす、アフリベルセプトのアミノ酸配列の変異体である。具体的な実施形態では、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>は、IgG1 Fcドメインを含まず、さらに、KDR配列の末端リジン(すなわち、配列番号1のアミノ酸205)を有しても有さなくてもよく、配列番号1のアミノ酸1~204の融合タンパク質をもたらす。あるいは、図4に示すように、VEGF - Trap<sup>HuPTM</sup>はタンパク質のC末端のIgG1 Fcのヒンジ領域の全部または一部を有する。具体的な実施形態では、C末端の配列は、DKTHH(配列番号44)もしくはDKTHL(配列番号45)(210位のトレオニンを置換したロイシンを任意選択で有する、配列番号1のアミノ酸206~210)で

あってもよく、配列番号1の1～210位のアミノ酸配列を有するVEGF-trapをもたす；または、DKHTCPCPCA（配列番号46）（配列番号1のアミノ酸206～216）であってもよく、配列番号1の1～216位のアミノ酸配列を有するVEGF-Trapをもたす；または、DKHTCPCPCAPELLGG（配列番号47）（配列番号1のアミノ酸206～222）であってもよく、配列番号1の1～222位のアミノ酸配列を有するVEGF-Trapをもたす；または、DKHTCPCPCPAPELLGGPSVFL（配列番号48）（アミノ酸206～227）であってもよく、配列番号1の1～227位のアミノ酸配列を有するVEGF-Trapをもたす（およびN末端にリーダー配列を含むこともできる）。ヒンジ領域のシステイン残基は、鎖間ジスルフィド結合の形成を促進することができるが、ヒンジ領域の全てまたはシステイン含有部分を含むしない融合タンパク質は、鎖間の結合を形成することができないが鎖内部の結合のみを形成することができる。このFcなしのまたはFc（<sup>-</sup>）VEGF-Trap導入遺伝子は、VEGF-Trap導入遺伝子の2つのコピーを含み、それらを発現する発現構築物においてタンデムに並べて使用することができる。Fcなしの導入遺伝子は、例えばAAV8ウイルスベクターに導入遺伝子の第2のコピーを加えることによってサイズ制限に対処する。

#### 【0100】

代替的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、それが全身循環に侵入するとVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の半減期を低減しつつ、目におけるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の安定性を向上または維持することができ、有害効果の可能性を低減する、IgG1 Fcドメインを置換するFcドメインまたは他のドメイン配列を有する。特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、配列番号1のアミノ酸206～431を、図7AおよびBにそれぞれ示すIgG2 FcまたはIgG4 Fcドメインを含む代替のFcドメインが置換しており、ここで、ヒンジ配列はイタリック体で示される。配列は、下の表2に提示される。変異体は、ヒンジ領域の全部もしくは一部を有するか、またはヒンジ領域を全く有しないFcドメインを含む。鎖間ジスルフィド結合が望ましくないある特定の実施形態では、ヒンジ領域の中のシステイン残基の1つまたは複数、例えばIgG4 Fcヒンジの210および213位でセリンによって置換されてもよい（図7FおよびHを参照のこと、置換は下線付き）。IgG2またはIgG4 Fcドメインを有する例示的導入遺伝子生成物のアミノ酸配列は、図7C～Hに提示される。

#### 【0101】

他の代替的な実施形態では、VEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>は、IgG1 Fcドメインを、ヒトFlt-1またはヒトKDRのIg様ドメインの、またはその組合せの1つもしくは複数に置換している。ヒトFlt-1およびヒトKDRの細胞外ドメイン（およびシグナル配列）のアミノ酸配列は図8Aおよび8Bにそれぞれ提示し、Ig様ドメインはカラーテキストで示されている。C末端ドメインが、ヒトFlt-1のIg様ドメインの1つ、2つ、3つもしくは4つ、特に少なくともIg様ドメイン2および3；または、ヒトKDRのIg様ドメインの1つ、2つ、3つもしくは4つ、特に少なくともドメイン3、4および/もしくは5からなるかまたはそれを含む導入遺伝子生成物が提供される。具体的実施形態では、導入遺伝子生成物は、KDR Ig様ドメイン3、4および5ならびにFlt-1 Ig様ドメイン2を有するC末端ドメインを有する。

#### 【0102】

配列番号1のIgG1 Fcドメインを置換するのに使用することができる例示的な配列は、下の表2に提供される。配列番号1のIgG1 Fcドメインを置換したFlt-1および/またはKDR Ig様ドメインを有する例示的な導入遺伝子生成物のアミノ酸配列は、図8CおよびDに提供される。

#### 【0103】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 IgG1 Fc 置換配列

IgG1 Fc ドメインの 代替物	配列 番号	アミノ酸配列							
IgG2 Fc 配列	19	ASTKGPSVF	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	50		
		HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDPHKPS	NTKVDKTV	100		
		<u>KCCVECP</u>	<u>APPVAGPSVF</u>	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	150		
		EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	200		
		KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	QVSLTCLVKG	250		
		FYPDISVEW	ESNGQPENNY	KTTTPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300		
		VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSL	+/- G または GK				
IgG2 Fc 配列 部分的ヒンジ (2 つのジ-S 結合)	49	<u>VECP</u>	<u>VAGPSVFLFP</u>	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVQ	50		
		FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QFNSTFRVVS	VLTVVHQDWL	NGKEYKCKVS	100		
		NKGLPAPIEK	TISKTKGQPR	EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	150		
		SDISVEWESN	GQPENNYKTT	PPMLDSDGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	200		
		CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	P	+/- G または GK				
IgG2 Fc 配列の 全体のヒンジ (4 つの ジ-S 結合)	50	<u>ERKCCVECP</u>	<u>CPAPPVAGPS</u>	VFLFPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	50		
		DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST	FRVSVLTVV	HQDWLNGKEY	100		
		KCKVSNKGLP	APIEKTISK	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	150		
		KGFYPSDISV	EWESNGQPEN	NYKTTTPMLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	200		
		GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSL	+/- G または GK				
IgG4 Fc 配列	20	ASTKGPSVF	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	50		
		HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDPHKPS	NTKVDKRV	100		
		<u>KYGPPCP</u>	<u>APEFLGGPSV</u>	FLFPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVDVSQED	150		
		PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	200		
		CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	250		
		GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTPPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300		
		NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSL	+/- G または GK				
IgG4 Fc 領域 部分的ヒンジ	51	<u>YGPPCP</u>	<u>PEFLGGPSVF</u>	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSQEDP	50		
		EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	100		
		KVSNKGLPSS	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSQEEMTKN	QVSLTCLVKG	150		
		FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDS	GSFFLYSRLT	VDKSRWQEGN	200		
		VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSL	+/- G または GK				
置換を有する IgG4 Fc 部分的 ヒンジ領域	52	<u>YGPPSP</u>	<u>PEFLGGPSVF</u>	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSQEDP	50		
		EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	100		
		KVSNKGLPSS	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSQEEMTKN	QVSLTCLVKG	150		
		FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTTPVLDS	GSFFLYSRLT	VDKSRWQEGN	200		
		VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSL	+/- G または GK				
完全ヒンジ領域 を有する IgG4 Fc	53	<u>ESKYGPPCP</u>	<u>CPAPEFLGGP</u>	SVFLFPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSQ	50		
		EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVSVLTV	LHQDWLNGKE	100		
		YKCKVSNKGL	PSSIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM	TKNQVSLTCL	150		
		VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSGSFFLYS	RLTVDKSRWQ	200		
		EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSL	+/- G または GK				
完全ヒンジ領域 および置換を 有する IgG4 Fc	54	<u>ESKYGPPSP</u>	<u>CPAPEFLGGP</u>	SVFLFPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSQ	50		
		EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVSVLTV	LHQDWLNGKE	100		
		YKCKVSNKGL	PSSIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM	TKNQVSLTCL	150		
		VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSGSFFLYS	RLTVDKSRWQ	200		
		EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSL	+/- G または GK				

10

20

30

40

lgG1 Fc ドメインの 代替物	配列 番号	アミノ酸配列
FIt-1 ドメイン (図 8A の FIt-1 のアミノ酸 134~347)	55	PFVEMYSEIP EIIHMTGRE LVIPCRVTSP NITVTLLKKFP LDTLIPDGKR 50 IIWDSRKGF IISNATYKEIG LLTCEATVNG HLYKTNLYTH RQTNTIIDVQ 100 ISTPRPVKLL RGHTTLVLNCT ATTPLNTRVQ MTWSYPDEKN KRASVRRRID 150 QSNSHANIFY SVLTIDKMQN KDKGLYTCRV RSGPSFKSVN TSVHIYDKAF 200 ITVK
KDR ドメイン (図 8A の アミノ酸 328~548)	56	PFVAFGSGME SLVEATVGER VRIPAKYLG Y PPPEIKWYKN GIPLESNHT 50 IKAGHVLTIM EVSERDTGNY TVILTNPISK EKQSHVVSLV VYVPPQIGE 100 KSLISPVDSY QYGTQTQTLTC TVYAIPPPHH IHWYWQLEEE CANEPSQAV 150 SVTNPYPCEE WRSVEDFQGG NKIEVNKNQF ALIEGKNKTV STLVIQAAN 200 VSALYKCEAV NKVGRGERVI SFHVT

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 4 】

5 . 2 V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> 構築物

ある特定の態様では、ヒト網膜細胞またはヒト肝臓細胞における V E G F - T r a p 導入遺伝子の発現のための構築物が本明細書で提供される。本構築物は、導入遺伝子、および網膜細胞または肝臓細胞における発現のために適切な発現制御エレメントを含むことができる。一態様では、ベクターは、V E G F - T r a p 導入遺伝子および発現制御エレメントを含むウイルスベクターである。具体的な態様では、ウイルスベクターは、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含む、V E G F - T r a p 導入遺伝子を含む A A V ベクターである。より具体的な実施形態では、V E G F - T r a p 導入遺伝子およびシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含む A A V ベクターが提供される。別の具体的な実施形態では、V E G F - T r a p タンパク質をコードする導入遺伝子およびシグナル配列を含む、A A V 8 ベクターが提供される。一実施形態では、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> をコードする導入遺伝子およびシグナル配列を含む、A A V 8 ベクターが提供される。具体的な実施形態では、A A V 8 ベクターは、網膜細胞または肝臓細胞における発現を可能にする、導入遺伝子に作動可能に連結されているプロモーターなどの調節配列をさらに含む。プロモーターは、構成的プロモーター、例えば C B 7 プロモーターであってよい。あるいは、および、特に、がんが処置されたかまたは副作用が生じる場合、導入遺伝子発現をオフにすることが望ましい場合の、がんの処置で使用するために、誘導可能なプロモーター、例えば、本明細書に記載される低酸素誘導性またはラパマイシン誘導性プロモーターを使用することができる。

## 【 0 1 0 5 】

導入遺伝子を送達するために使用される組換えベクターは、網膜細胞または肝臓細胞へのトロピズムを有するべきである。これらには、非複製組換えアデノ随伴ウイルスベクター(「r A A V」)、特に A A V 8 カプシドを有するものを含めることができる、または A A V 8 カプシドの変異体が好ましい。しかし、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、または「裸の D N A」構築物と呼ばれる非ウイルス性の発現ベクターを非限定的に含む他のウイルスベクターを使用することができる。好ましくは、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> 導入遺伝子は、適切な発現制御エレメント、例えば、少し例を挙げると、遍在性 C B 7 プロモーター(ニワトリ - アクチンプロモーターおよび C M V エンハンサー)、または組織特異的プロモーター、例えば R P E 特異的プロモーター、例えば R P E 6 5 プロモーター、または錐体特異的プロモーター、例えばオブシンプロモーター、または肝臓特異的プロモーター、例えば T B G (チロキシン結合グロブリン)プロモーター、A P O A 2 プロモーター、S E R P I N A 1 (h A A T)プロモーター、または m I R 1 2 2 プロモーター、または誘導可能なプロモーター、例えば低酸素誘導性プロモーターもしくはラパマイシン誘導性プロモーターによって制御するべきである。本構築物は、

ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を強化する他の発現制御エレメントを含むことができる（例えば、ニワトリ - アクチンイントロン、マウスの微小ウイルス（MVM）イントロン、ヒト第IX因子イントロン（例えば、FIXがトランケーションされたイントロン1）、 $\alpha$ -グロブリンスプライスドナー/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプターイントロン、アデノウイルススプライスドナー/免疫グロブリンスプライスアクセプターイントロン、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）イントロン、および雑種アデノウイルススプライスドナー/IgGスプライスアクセプターイントロンなどのイントロン、ならびにポリAシグナル、例えば、ウサギ - グロビンポリAシグナル、ヒト成長ホルモン（hGH）ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、合成ポリA（SPA）シグナルおよびウシ成長ホルモン（bGH）ポリAシグナル）。例えば、Powell and Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57を参照されたい。

10

#### 【0106】

VEGF-Trapをコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物が、本明細書で提供される方法で使用するためのものである。本明細書で提供されるウイルスベクターおよび他のDNA発現構築物は、標的細胞、例えば、ヒト光受容体細胞（錐体細胞、桿体細胞）を含む、ヒト網膜細胞；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞（小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア）；網膜色素上皮細胞；およびヒト肝臓細胞への導入遺伝子の送達のための任意の好適な方法を含む。導入遺伝子の送達手段には、ウイルスベクター、リボソーム、他の脂質含有複合体、他の巨大分子複合体、合成改変mRNA、未改変のmRNA、小分子、非生物学的活性分子（例えば、金粒子）、重合分子（例えば、デンドリマー）、裸のDNA、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミドまたはエピソームが含まれる。一部の実施形態では、ベクターは標的化ベクター、例えば、ヒト光受容体細胞（錐体細胞、桿体細胞）；水平細胞；双極細胞；アマクリン細胞；網膜神経節細胞（小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア）；網膜色素上皮細胞；およびヒト肝臓細胞を例えば標的にしたベクターである。

20

#### 【0107】

一部の態様では、本開示は使用のための核酸を提供し、ここで、核酸は、以下からなる群から選択されるプロモーターに作動可能に連結されているVEGF-TrapまたはVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>をコードする：CB7プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、MMTプロモーター、EF-1アルファプロモーター、UB6プロモーター、ニワトリベータ-アクチンプロモーター、CAGプロモーター、RPE65プロモーター、オブシンプロモーター、TBG（チロキシン結合グロブリン）プロモーター、APOA2プロモーター、SERPINA1（hAAT）プロモーター、MIR122プロモーター、低酸素誘導性プロモーターまたはラパマイシン誘導性プロモーター。

30

#### 【0108】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数の核酸（例えばポリヌクレオチド）を含む組換えベクターが本明細書で提供される。核酸は、DNA、RNAまたはDNAおよびRNAの組合せを含むことができる。ある特定の実施形態では、DNAは、プロモーター配列、目的の遺伝子（導入遺伝子、例えばVEGF-Trap導入遺伝子）の配列、非翻訳領域および終止配列からなる群から選択される配列の1つまたは複数を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、目的の遺伝子に作動可能に連結されているプロモーターを含む。

40

#### 【0109】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される核酸（例えば、ポリヌクレオチド）および核酸配列は、例えば当業者に公知である任意のコドン最適化技術を通してコドン最適化してもよい（例えば、Quax et al., 2015, Mol Cell 59: 149-161によるレビューを参照されたい）。

50

## 【0110】

具体的な実施形態では、本明細書に記載される構築物は、以下の構成成分を含む：（１）発現カセットに隣接するAAV2逆方向末端反復配列；（２）a）CMVエンハンサー／ニワトリ - アクチンプロモーターを含むCB7プロモーター、b）ニワトリ - アクチンイントロン、およびc）ウサギ - グロビンポリAシグナルを含む制御エレメント；ならびに（３）VEGF - Trapをコードする核酸配列。具体的な実施形態では、本明細書に記載される構築物は、以下の構成成分を含む：（１）発現カセットに隣接するAAV2逆方向末端反復配列；（２）a）低酸素誘導性プロモーター、b）ニワトリ - アクチンイントロン、およびc）ウサギ - グロビンポリAシグナルを含む制御エレメント；ならびに（３）VEGF - Trapをコードする核酸配列。

10

## 【0111】

## 5.2.1 mRNAベクター

ある特定の実施形態では、DNAベクターに代わるものとして、本明細書で提供されるベクターは、目的の遺伝子（例えば、導入遺伝子、例えばVEGF - Trap）をコードする改変されたmRNAである。網膜または肝臓細胞への導入遺伝子の送達のための改変されたおよび未改変のmRNAの合成は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるHansson et al., J. Biol. Chem., 2015, 290(9):5661-5672に教示されている。ある特定の実施形態では、VEGF - Trapをコードする改変されたmRNAが本明細書で提供される。

20

## 【0112】

## 5.2.2 ウイルスベクター

ウイルスベクターには、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV、例えばAAV8）、レンチウイルス、ヘルパー依存性アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ボックスウイルス、日本の血球凝集素ウイルス（HVJ）、アルファウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスベクターが含まれる。レトロウイルスベクターには、マウス白血球ウイルス（MLV）ベースのおよびヒト免疫不全ウイルス（HIV）ベースのベクターが含まれる。アルファウイルスベクターには、セムリキ森林ウイルス（SFV）およびシンドビスウイルス（SIN）が含まれる。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、組換えウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、それらがヒトにおいて複製欠損であるように改変される。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、雑種ベクター、例えば、「ヘルプレス」アデノウイルスベクターに入れられるAAVベクターである。ある特定の実施形態では、第1のウイルスからのウイルスカプシドおよび第2のウイルスからのウイルスエンベロープタンパク質を含むウイルスベクターが本明細書で提供される。具体的な実施形態では、第2のウイルスは、水疱性口内炎ウイルス（VSV）である。より具体的な実施形態では、エンベロープタンパク質はVSV - Gタンパク質である。

30

## 【0113】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、HIVベースのウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるHIVベースのベクターは少なくとも2つのポリヌクレオチドを含み、ここで、gagおよびpol遺伝子はHIVゲノムに由来し、env遺伝子は別のウイルスに由来する。

40

## 【0114】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルスベースのウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される単純ヘルペスウイルスベースのベクターは、それらが1つまたは複数の最初期（IE）遺伝子を含まないように改変され、それらを非細胞傷害性にする。

## 【0115】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、MLVベースのウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるMLVベースのベクターは、ウイルス遺伝子の代わりに最高8 kbの異種DNAを含む。

50

## 【0116】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、レンチウイルスベースのウイルスのベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるレンチウイルスベクターは、ヒトレンチウイルスに由来する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるレンチウイルスベクターは、非ヒトレンチウイルスに由来する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるレンチウイルスベクターは、レンチウイルスカプシドにパッケージングされる。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるレンチウイルスベクターは、以下のエレメントの1つまたは複数を含む：長い末端反復配列、プライマー結合部位、ポリプリントラクト、att部位およびカプシド形成部位。

## 【0117】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、アルファウイルスベースのウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるアルファウイルスベクターは、組換えの複製欠陥アルファウイルスである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるアルファウイルスベクターにおけるアルファウイルスレプリコンは、それらのビリオン表面で機能的異種リガンドを提示することによって、特異的細胞型に標的化される。

## 【0118】

導入遺伝子を送達するために使用する組換えベクターには、非複製組換えアデノ随伴ウイルスベクター（「rAAV」）が含まれる。以下のいくつかの理由のためにrAAVは特に魅力的なベクターである。それらは非複製細胞を形質導入することができ、したがって、細胞分裂が低レベルで起こる組織に導入遺伝子を送達するために使用することができる；それらは選択される特異的臓器を優先的に標的にするように改変することができる；ならびに、所望の組織特異性を得るために、および/または一部のAAVに対する既存の患者抗体による中和を回避するために選択する、数百のカプシド血清型がある。

## 【0119】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、AAVベースのウイルスベクターである。好ましい実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、AAV8ベースのウイルスベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAV8ベースのウイルスベクターは、網膜細胞へのトロピズムを保持する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAV8ベースのウイルスベクターは、肝臓細胞へのトロピズムを保持する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAV rep 遺伝子（複製のために必要とされる）および/またはAAV cap 遺伝子（カプシドタンパク質の合成のために必要とされる）をコードする。好ましい実施形態では、AAVベクターは非複製性であり、repまたはcapタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない（これらはrAAVベクターの製造においてパッケージング細胞によって供給される）。複数のAAV血清型が同定されている。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAVの1つまたは複数の血清型からの構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh20またはAAVrh10の1つまたは複数からのカプシド構成成分を含む。好ましい実施形態では、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh20またはAAVrh10血清型の1つまたは複数からの構成成分を含む。

## 【0120】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法で使用するAAVは、参照によりその全体が組み込まれる、Zinn et al., 2015, Cell Rep. 12(6): 1056-1068に記載される、Anc80またはAnc80L65である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法で使用するAAVは、その各々が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第9,193,956号明細書；同第945

10

20

30

40

50



8 5 1 7 号明細書；および同第 9 , 5 8 7 , 2 8 2 号明細書、ならびに米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 7 6 3 2 3 号明細書に記載される、以下のアミノ酸挿入の 1 つを含む：L G E T T R P ( 配列番号 5 7 ) または L A L G E T T R P ( 配列番号 5 8 ) 。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法で使用する A A V は、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 9 , 1 9 3 , 9 5 6 号明細書；同第 9 , 4 5 8 , 5 1 7 号明細書；および同第 9 , 5 8 7 , 2 8 2 号明細書；米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 7 6 3 2 3 号明細書、および国際出願公開第 2 0 1 8 / 0 7 5 7 9 8 号パンフレットに記載される、A A V . 7 m 8 ( その変異体を含む ) である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法で使用する A A V は、米国特許第 9 , 5 8 5 , 9 7 1 号明細書に開示される任意の A A V 、例えば A A V - P H P . B である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法で使用する A A V は、A A V 2 / R e c 2 または A A V 2 / R e c 3 ベクターであり、それらは、これらのベクターについて、参照により本明細書に組み込まれる、Charbel Issa et al. , 2013, PLoS One 8(4): e60361 に記載される、A A V 8 カプシドおよび血清型 c y 5 , r h 2 0 または r h 3 9 のカプシドに由来する雑種カプシド配列を有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法で使用する A A V は、その各々が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる以下の特許および特許出願のいずれかに開示される A A V である：米国特許第 7 , 9 0 6 , 1 1 1 号明細書；同第 8 , 5 2 4 , 4 4 6 号明細書；同第 8 , 9 9 9 , 6 7 8 号明細書；同第 8 , 6 2 8 , 9 6 6 号明細書；同第 8 , 9 2 7 , 5 1 4 号明細書；同第 8 , 7 3 4 , 8 0 9 号明細書；米国特許第 9 , 2 8 4 , 3 5 7 号明細書；同第 9 , 4 0 9 , 9 5 3 号明細書；同第 9 , 1 6 9 , 2 9 9 号明細書；同第 9 , 1 9 3 , 9 5 6 号明細書；同第 9 4 5 8 5 1 7 号明細書；および同第 9 , 5 8 7 , 2 8 2 号明細書、米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 7 4 8 0 3 号明細書；同第 2 0 1 5 / 0 1 2 6 5 8 8 号明細書；同第 2 0 1 7 / 0 0 6 7 9 0 8 号明細書；同第 2 0 1 3 / 0 2 2 4 8 3 6 号明細書；同第 2 0 1 6 / 0 2 1 5 0 2 4 号明細書；同第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 2 5 7 号明細書；および国際特許出願番号 P C T / U S 2 0 1 5 / 0 3 4 7 9 9 ; P C T / E P 2 0 1 5 / 0 5 3 3 3 5 。

#### 【 0 1 2 1 】

A A V 8 ベースのウイルスベクターは、本明細書に記載される組成物および方法のいくつかで使用される。A A V ベースのウイルスベクターの核酸配列ならびに組換え A A V および A A V カプシドを作製する方法が、例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 7 , 2 8 2 , 1 9 9 号明細書、米国特許第 7 , 7 9 0 , 4 4 9 号明細書、米国特許第 8 , 3 1 8 , 4 8 0 号明細書、米国特許第 8 , 9 6 2 , 3 3 2 号明細書および国際特許出願番号 P C T / E P 2 0 1 4 / 0 7 6 4 6 6 に教示される。一態様では、導入遺伝子 ( 例えば、V E G F - T r a p ) をコードする A A V ( 例えば、A A V 8 ) ベースのウイルスベクターが本明細書で提供される。具体的な実施形態では、V E G F - T r a p をコードする A A V 8 ベースのウイルスベクターが本明細書で提供される。より具体的な実施形態では、アフリベルセプトの融合タンパク質をコードする A A V 8 ベースのウイルスベクターが本明細書で提供される。

#### 【 0 1 2 2 】

調節エレメントの制御下の、および I T R に隣接している、導入遺伝子の発現のための発現カセットを含むウイルスゲノム、ならびに、A A V 8 カプシドタンパク質のアミノ酸配列を有するか、または、A A V 8 カプシドタンパク質 ( 配列番号 1 1 ) のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % または 9 9 . 9 % 同一であり、A A V 8 カプシドの生物学的機能を保持しているウイルスカプシドを含む A A V 8 ベクターが特定の実施形態で提供される。ある特定の実施形態では、コードされる A A V 8 カプシドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 個のアミノ酸置換を有し、A A V 8 カプシドの生物学的機能を保持している配列番号 1 1 の配列を有する。図 6 は、S U B S とラベルされた行における比較に基づく、

整列させた配列のある特定の位置で置換することができる潜在的アミノ酸を有する異なる A A V 血清型のカプシドタンパク質のアミノ酸配列の比較アラインメントを提供する。したがって、具体的な実施形態では、A A V 8 ベクターは、天然の A A V 8 配列のその位置に存在しない、図 6 の S U B S 行において同定された、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 個のアミノ酸置換を有する A A V 8 カプシド変異体を含む。

#### 【0123】

ある特定の実施形態では、一本鎖 A A V ( s s A A V ) を上で使用することができる。ある特定の実施形態では、自己相補的ベクター、例えば、s c A A V を使用することができる (例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18(2): 171-82; McCarty et al, 2001, Gene Therapy, Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254; および米国特許第 6, 596, 535 号明細書; 同第 7, 125, 717 号明細書; および同第 7, 456, 683 号明細書を参照)。

#### 【0124】

A A V ベースのウイルスベクターの核酸配列ならびに組換え A A V および A A V カプシドを作製する方法が、例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 7, 282, 199 号明細書、米国特許第 7, 790, 449 号明細書、米国特許第 8, 318, 480 号明細書、米国特許第 8, 962, 332 号明細書および国際特許出願番号 P C T / E P 2 0 1 4 / 0 7 6 4 6 6 に教示される。

#### 【0125】

本発明は、それに限定されることを意味しないが例示的な実施形態によって例示され、これらの実施形態は r A A V ベクターに関するが、異なる導入遺伝子送達系、例えばアデノウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルスおよび/または非ウイルス性の発現ベクター、例えば「裸の」D N A 構築物を使用することもできる。導入遺伝子の発現は、構成的または組織特異的発現制御エレメントによって制御することができる。

#### 【0126】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法で使用するウイルスベクターは、アデノウイルスベースのウイルスベクターである。組換えアデノウイルスベクターは、V E G F - T r a p を移入するために使用することができる。組換えアデノウイルスは、E 1 欠失のある、E 3 欠失があるかない、およびいずれかの欠失領域に挿入される発現カセットを有する、第一世代ベクターであってもよい。組換えアデノウイルスは、E 2 および E 4 領域の完全なまたは部分的な欠失を含有する、第二世代ベクターであってもよい。ヘルパー依存性アデノウイルスは、アデノウイルス逆方向末端反復配列およびパッケージングシグナル (ファイ) のみを保持する。導入遺伝子は、ゲノムを概ね 36 kb の野生型サイズの近くに保つために、スタッファー配列ありまたはなしでパッケージングシグナルと 3' I T R との間に挿入される。アデノウイルスベクターの生成のための例示的なプロトコールは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Alba et al., 2005, "Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy," Gene Therapy 12:S18-S27に見出すことができる。

#### 【0127】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法で使用するウイルスベクターは、レンチウイルスベースのウイルスベクターである。組換えレンチウイルスベクターは、V E G F - T r a p を移入するために使用することができる。構築物を作製するために 4 つのプラスミドが使用される: G a g / p o l 配列含有プラスミド、R e v 配列含有プラスミド、エンベロープタンパク質含有プラスミド (すなわち、V S V - G)、ならびにパッケージングエレメントおよび V E G F - T r a p 遺伝子を有する C i s プラスミド。

#### 【0128】

レンチウイルスベクターの生成のために、4 つのプラスミドは細胞 (すなわち、H E K 293 ベースの細胞) の中に同時トランスフェクトされ、それによって、とりわけ、ポリ

10

20

30

40

50

エチレンイミンまたはリン酸カルシウムをトランスフェクション剤として使用することができる。レンチウイルスは、その後上清において採取される（レンチウイルスが活性になるのに細胞から出芽する必要性があり、そのため、細胞採取は不要であり／実行すべきでない）。上清を濾過（ $0.45\ \mu\text{m}$ ）し、次に、塩化マグネシウムおよびベンゾナーゼを加えた。さらなる下流のプロセスは広く異なってもよく、TFFおよびカラムクロマトグラフィーの使用が最もGMP適合性のものである。他のものは、カラムクロマトグラフィーと一緒に／なしで超遠心を使用する。レンチウイルスベクターの生成のための例示的なプロトコルは、その両方とも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Lesch et al., 2011, "Production and purification of lentiviral vector generated in 293 T suspension cells with baculoviral vectors," Gene Therapy 18:531-538およびAusubel et al., 2012, "Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors," Bioprocess Int. 10(2):32-43に見出すことができる。

10

#### 【0129】

具体的な実施形態では、本明細書に記載される方法で使用するためのベクターは、関連する細胞（例えば、*in vivo*または*in vitro*の網膜細胞）へのベクターの導入の後にVEGF-Trapのグリコシル化および／またはチロシン硫酸化された変異体が細胞によって発現されるように、VEGF-Trapをコードするものである。具体的な実施形態では、発現されるVEGF-Trap<sup>HUP<sup>TM</sup></sup>は、本明細書に記載されるようにグリコシル化および／またはチロシン硫酸化パターンを含む。

20

#### 【0130】

##### 5.2.3 遺伝子発現のプロモーターおよび修飾因子

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、遺伝子送達または遺伝子発現をモジュレートする構成成分（例えば、「発現制御エレメント」）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、遺伝子発現をモジュレートする構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、細胞への結合または標的化に影響を及ぼす構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、取込みの後に細胞の中のポリヌクレオチド（例えば、導入遺伝子）の局在化に影響する構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、例えば、ポリヌクレオチドを取り込んだ細胞を検出または選択するための、検出可能または選択可能なマーカーとして使用することができる構成成分を含む。

30

#### 【0131】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、1つまたは複数のプロモーターを含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは構成的プロモーターである。ある特定の実施形態では、プロモーターはCB7プロモーターである（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Dinculescu et al., 2005, Hum Gene Ther 16: 649-663を参照）。一部の実施形態では、CB7プロモーターは、ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を強化する他の発現制御エレメントを含む。ある特定の実施形態では、他の発現制御エレメントには、ニワトリ - アクチンイントロンおよび／またはウサギ - グロビンpolaシグナルが含まれる。ある特定の実施形態では、プロモーターはTATAボックスを含む。ある特定の実施形態では、プロモーターは1つまたは複数のエレメントを含む。ある特定の実施形態では、1つまたは複数のプロモーターエレメントは、お互いに対して反転または移動されてもよい。ある特定の実施形態では、プロモーターのエレメントは、協働するように配置される。ある特定の実施形態では、プロモーターのエレメントは、独立して機能するように配置される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、ヒトCMV最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RS)長い末端反復配列およびラットインスリンプロモーターからなる群から選択される1つまたは複数のプロモーターを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、AAV、MLV、MMTV、SV40、RSV、HIV-1およびHIV-2 LTRからなる群から選択される1つまたは複数の長い末端反復配列(LTR)プロモーターを含む。ある特定の実施形態では、本明細書

40

50

で提供されるベクターは、1つまたは複数の組織特異的プロモーター（例えば、網膜色素上皮細胞特異的プロモーターまたは肝臓特異的プロモーター）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、R P E 6 5 プロモーターを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、T B G（チロキシン結合グロブリン）プロモーター、A P O A 2 プロモーター、S E R P I N A 1（h A A T）プロモーターまたはM I R 1 2 2 プロモーターを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、V M D 2 プロモーターを含む。

#### 【0132】

ある特定の実施形態では、プロモーターは誘導可能なプロモーターである。ある特定の  
実施形態では、プロモーターは低酸素誘導性プロモーターである。ある特定の実施形態では、  
プロモーターは、低酸素誘導因子（H I F）結合部位を含む。ある特定の実施形態では、  
プロモーターは、H I F - 1 結合部位を含む。ある特定の実施形態では、プロモ  
ーターは、H I F - 2 結合部位を含む。ある特定の実施形態では、H I F 結合部位は、R  
C G T G モチーフを含む。H I F 結合部位の場所および配列に関する詳細については、例  
えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Schodel, et al., Blood, 2011,  
117(23):e207-e217を参照。ある特定の実施形態では、プロモーターは、H I F 転写因子  
以外の低酸素誘導性転写因子のための結合部位を含む。ある特定の実施形態では、本明細  
書で提供されるウイルスベクターは、低酸素において優先的に翻訳される1つまたは複数  
のI R E S 部位を含む。低酸素誘導性遺伝子発現およびそれに関与する因子に関する教示  
については、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Kenneth and Roch  
a, Biochem J., 2008, 414: 19-29を参照。具体的な実施形態では、低酸素誘導性プロモ  
ーターは、ヒトN - W A S P プロモーターであるか（例えば、Salvi, 2017, Biochemistr  
y and Biophysics Reports 9: 13-21（N - W A S P プロモーターの教示について、参照  
により組み込まれる）を参照）、またはヒトE p o の低酸素誘導性プロモーターである（  
Tsuchiya et al., 1993, J. Biochem. 1 13 :395-400（E p o 低酸素誘導性プロモーター  
の開示について、参照により組み込まれる）を参照）。他の実施形態では、プロモーター  
は、薬物誘導性プロモーター、例えば、ラパマイシンまたはその類似体の投与によって誘  
導されるプロモーターである。例えば、薬物誘導性プロモーターの開示について、本明細  
書に参照によりその全体が組み込まれる、P C T 国際公開第94 / 18317号パンフレ  
ット、国際公開第96 / 20951号パンフレット、国際公開第96 / 41865号パン  
フレット、国際公開第99 / 10508号パンフレット、国際公開第99 / 10510号  
パンフレット、国際公開第99 / 36553号パンフレットおよび国際公開第99 / 41  
258号パンフレット、ならびに米国特許第7,067,526号明細書の中のラパマイ  
シン誘導性プロモーターの開示を参照。

#### 【0133】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、プロモーター以  
外の1つまたは複数の調節エレメントを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供  
されるウイルスベクターは、エンハンサーを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で  
提供されるウイルスベクターは、リプレッサーを含む。ある特定の実施形態では、本明細  
書で提供されるウイルスベクターは、イントロンまたはキメライントロンを含む。ある特  
定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、ポリアデニル化配列を含  
む。

#### 【0134】

##### 5.2.4 シグナルペプチド

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるベクターは、タンパク質送達をモジュ  
レートする構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベ  
クターは、発現の後にV E G F - t r a p 融合タンパク質に融合する1つまたは複数のシ  
グナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。シグナルペプチドは、「リーダー  
配列」または「リーダーペプチド」と本明細書で呼ぶこともできる。ある特定の実施形態  
では、シグナルペプチドは、導入遺伝子生成物（例えば、V E G F - T r a p）が、細胞

において適切なパッケージング（例えばグリコシル化）を達成することを可能にする。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、導入遺伝子生成物（例えば、VEGF-Trap）が、細胞において適切な局在化を達成することを可能にする。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、導入遺伝子生成物（例えば、VEGF-Trap）が、細胞からの分泌を達成することを可能にする。

#### 【0135】

シグナルペプチドを選択する以下の2つのアプローチがある：発現されるものと同種のタンパク質からのシグナルペプチドを選択すること、またはタンパク質が発現、プロセッシングおよび分泌される細胞型で発現されるタンパク質からのシグナルペプチドを選択すること。シグナルペプチドは、異なる種において発現される適切なタンパク質から選択することができる。豊富に発現されるタンパク質のシグナル配列が、好ましい可能性がある。しかし、シグナルペプチドは切断後に一部の生物学的機能、「標的化後」機能を有することができる、したがって、そのような標的化後機能を有することができるシグナルペプチドを回避するように注意するべきである。したがって、本明細書に記載される導入遺伝子は、ヒトFlt-1またはKDRまたは関連したタンパク質由来または網膜もしくは肝臓細胞において発現されるタンパク質由来のシグナルペプチドを有することができる。

#### 【0136】

アフリベルセプトはFlt-1リーダー配列で発現され、したがって、Flt-1リーダー配列：MVSYWDTGVLLCLLSCLLLTGSSSG（配列番号36）を有する導入遺伝子が本明細書で提供される（図1を参照）。代替的な実施形態では、シグナル配列は、KDRシグナル配列、MQSKVLLAVALLWLCVETRA（配列番号37）である。あるいは、および好ましい実施形態では、使用されるリーダー配列は、MYRMQLLLLIALLSLALVTNS（配列番号38）またはMRMQLLLLIALLSLALVTNS（配列番号39）であってもよい（図2、3および4を参照）。特に網膜細胞における発現のための、本明細書で提供されるベクターおよび導入遺伝子と共に使用されるシグナルペプチドの例は、例えば表3に見出すことができる。例えば、使用することができるシグナルペプチドについて、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Stern et al., 2007, Trends Cell. Mol. Biol., 2: 1-17およびDalton & Barton, 2014, Protein Sci, 23: 517-525も参照されたい。

#### 【0137】

#### 【表3】

表3: 網膜細胞分泌のためのシグナル配列

網膜細胞タンパク質 シグナルペプチド	配列	配列番号
VEGF-A シグナルペプチド	MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQA	59
フィブリノゲン-1シグナルペプチド	MERAAPSRVPLPLLLLGGLALLAAGVDA	60
ビトロネクチンシグナルペプチド	MAPLRPLLILALLAWVALA	61
相補体H因子 シグナルペプチド	MRLLAKIICMLWAICVA	62
Opticin シグナルペプチド	MRLLAFLSLLALVLQETGT	63
アルブミンシグナルペプチド	MKWVTFISLLFLFSSAYS	64
キモトリプシノーゲン シグナルペプチド	MAFLWLLSCWALLGTTFG	65
インターロイキン-2 シグナルペプチド	MYRMQLLSIALILALVTNS	66
トリプシノーゲン-2 シグナルペプチド	MNLLLILTFVAAAVA	67

あるいは、肝臓細胞から発現され、分泌される導入遺伝子生成物のために、表4のシグ

ナル配列の 1 つを使用することができる。

【 0 1 3 8 】

【 表 4 】

表 4: 肝臓細胞からの分泌のためのシグナル配列

肝臓細胞タンパク質 シグナルペプチド	配列	配列番号
ヒト血清アルブミン	MKWVTFISLLFLFSSAYS	97
ヒト $\alpha$ -1 抗トリプシン (SERPINA1)	MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLA	68
ヒトアポリポタンパク質 A-1	MKAAVLTLAVLFLTGSQA	69
ヒトアポリポタンパク質 A-2	MKLLAATVLLLITICSLEG	70
ヒトアポリポタンパク質 B-100	MDPPRPALLALLALPALLLLLLAGARA	71
ヒト凝固第 IX 因子	MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC	72
ヒト相補体 C2	MGPLMVLFCLLFLYPGLADS	73
ヒト相補体 H 因子関連 タンパク質 2 (CFHR2)	MWLLVSVILISRISSVGG	74
ヒト相補体 H 因子関連 タンパク質 5 (CFHR5)	MLLLFSVILISWVSTVGG	75
ヒトフィブリノーゲン $\alpha$ -鎖 (FGA)	MFSMRIVCLVLSVVGTAWT	76
ヒトフィブリノーゲン $\beta$ -鎖 (FGB)	MKRMVSWSFHKLKTMKHLLLLLLCVFLVKS	77
ヒトフィブリノーゲン $\gamma$ -鎖 (FGG)	MSWSLHPRNLILYFYALLFLSSTCVA	78
ヒト $\alpha$ -2-HS-糖タンパク質 (AHSG)	MKSLVLLCLLAQLWGCHS	79
ヒトヘモペキシン (HPX)	MARVLGAPVALGLWSLCWSLAIA	80
ヒトキニノーゲン-1	MKLITILFLCSRLLLSLT	81
ヒトマンノース結合性 タンパク質 C (MBL2)	MSLFPSLPLLLLSMVAASYS	82
ヒトプラスミノーゲン (PLMN)	MEHKEVVLLLLFLKSGQG	83
ヒトプロトロンビン (凝固第 II 因子)	MAHVRGLQLPGCLALAALCSLVHS	84
ヒト分泌リンタンパク質 24	MISRMEKMTMMMKILIMFALGMNYWSCSG	85

肝臓細胞タンパク質 シグナルペプチド	配列	配列番号
ヒト抗トロンビン-III (SERPINC1)	MYSNVIGTVTSGKRKVYLLSLLLIGFWDCVTC	86
ヒトセロトランスフェリン (TF)	MRLAVGALLVCAVLGLCLA	87

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 9 】

## 5 . 2 . 5 非翻訳領域

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、1つまたは複数の非翻訳領域（UTR）、例えば3'および/または5' UTRを含む。ある特定の実施形態では、UTRは、所望のレベルのタンパク質発現のために最適化される。ある特定の実施形態では、UTRは、導入遺伝子のmRNA半減期のために最適化される。ある特定の実施形態では、UTRは、導入遺伝子のmRNAの安定性のために最適化される。ある特定の実施形態では、UTRは、導入遺伝子のmRNAの二次構造のために最適化される。

## 【 0 1 4 0 】

## 5 . 2 . 6 ポリシストロン性伝令 - IRESおよびF2Aリンカー

1つのベクターの中の2つの別個の「Fcなしの」アフリベルセプト導入遺伝子が形質導入された細胞によって発現されるように、切断可能なリンカーまたはIRESによって分離されている2つの「Fcなしの」アフリベルセプト導入遺伝子を含有するように、単一の構築物を工学的に操作することができる。Fcなしの導入遺伝子はヒンジ領域を含有しても含有しなくてもよく、例えば、図4のFcなしの導入遺伝子である。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、ポリシストロン性（例えば、ニシストロン性）伝令を提供する。例えば、ウイルス構築物は、リボソーム内部進入部位（IRES）エレメントで分離されている2つの「Fcなしの」アフリベルセプト導入遺伝子をコードすることができる（ニシストロン性ベクターを作製するためのIRESエレメントの使用の例については、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Gurtu et al., 1996, Biochem. Biophys. Res. Comm. 229(1):295-8を参照されたい）。IRESエレメントはリボソーム走査モデルを回避し、内部部位で翻訳を開始する。AAVにおけるIRESの使用は、例えば参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Furling et al., 2001, Gene Ther 8(11): 854-73に記載される。ある特定の実施形態では、ニシストロン性伝令はウイルスベクター内に含まれ、ニシストロン性伝令内のポリヌクレオチドのサイズには制約がある。ある特定の実施形態では、ニシストロン性伝令は、AAVウイルススペースのベクター（例えば、AAV8ベースのベクター）内に含まれる。

## 【 0 1 4 1 】

他の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、自己切断性フューリン/F2A（F/F2A）リンカーなどの切断可能なリンカーによって分離されているFcなしの導入遺伝子の2つのコピーをコードする（その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Fang et al., 2005, Nature Biotechnology 23 : 584-590およびFang, 2007, Mol Ther 15: 1153-9）。例えば、2つのFcなしのVEGF-trapコード配列を分離するために、フューリン-F2Aリンカーを発現カセットに組み込み、以下の構造を有する構築物をもたらすことができる：

リーダー-FcなしのVEGF-Trip-fue-リン部位-F2A部位-リーダー-FcなしのVEGF-Trip-polyA。

## 【 0 1 4 2 】

アミノ酸配列LLNFDLLKL AGDVE SNPGP（配列番号88）を有するF2A部位は自己プロセシングし、最終GとPアミノ酸残基との間で「切断」をもたらす。使用することができるさらなるリンカーには、限定されずに以下のものが含まれる：

T2A：（GSG）EGRGSLLTCTGDVEENPGP（配列番号89）

P2A：（GSG）ATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号90）

E2A：（GSG）QCTNYALLKL AGDVE SNPGP（配列番号91）

F2A：（GSG）VKQTLNFDLLKL AGDVE SNPGP（配列番号92）

## 【 0 1 4 3 】

リボソームがオープンリーディングフレームのF2A配列に遭遇する場合、ペプチド結合はスキップされ、翻訳の終止または下流配列の翻訳の継続をもたらす。この自己プロセシング配列は、FcなしのVEGF-trapの第1コピーのC末端の端に一連のさらな

10

20

30

40

50

るアミノ酸をもたらす。しかし、そのようなさらなるアミノ酸は、次に宿主細胞のフューリンによって、F 2 A 部位の直前および第 1 の F c なしの V E G F - t r a p 配列の後に位置するフューリン部位で切断され、カルボキシペプチダーゼによってさらに切断される。生じた F c なしの V E G F - t r a p は、C 末端に含まれる 1 つ、2 つ、3 つまたはより多くのさらなるアミノ酸を有することができるか、または、使用されるフューリンリンカーの配列およびリンカーを i n v i v o で切断するカルボキシペプチダーゼによって、それはそのようなさらなるアミノ酸を有することができない（例えば、Fang et al., 17 April 2005, Nature Biotechnol. Advance Online Publication; Fang et al., 2007, Molecular Therapy 15(6): 1153-1159; Luke, 2012, Innovations in Biotechnology, Ch. 8, 161-186を参照）。使用することができるフューリンリンカーは、一連の 4 つの塩基性アミノ酸、例えば、（配列番号 93）、R R R R（配列番号 94）、R R K R（配列番号 95）または R K K R（配列番号 96）を含む。このリンカーがカルボキシペプチダーゼによって切断されると、さらなるアミノ酸はそのままよく、そのため、さらなる 0、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸、例えば、R、R R、R K、R K R、R R R、R R K、R K K、R K R R（配列番号 93）、R R R R（配列番号 94）、R R K R（配列番号 95）または R K K R（配列番号 96）は、重鎖の C 末端の上に残ることができる。ある特定の実施形態では、リンカーがカルボキシペプチダーゼによって切断されると、さらなるアミノ酸は残らない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される構築物によって生成される V E G F - T r a p 集団の 5 %、10 %、15 % または 20 % は、切断の後、C 末端の上に 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸が残されている。ある特定の実施形態では、フューリンリンカーは、配列 R - X - K / R - R を有し、そのため、V E G F - T r a p の C 末端の上のさらなるアミノ酸は、R、R X、R X K、R X R、R X K R または R X R R であり、ここで、X は任意のアミノ酸、例えば、アラニン（A）である。ある特定の実施形態では、さらなるアミノ酸が V E G F - T r a p の C 末端の上に残ることはできない。

#### 【0144】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される発現カセットはウイルスベクター内に含まれ、発現カセット内のポリヌクレオチドのサイズには制約がある。ある特定の実施形態では、発現カセットは、A A V ウイルスベクターのベクター（例えば、A A V 8 ベースのベクター）内に含まれる。

#### 【0145】

##### 5.2.7 逆方向末端反復配列

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるウイルスベクターは、1 つまたは複数の逆方向末端反復配列（I T R）を含む。ウイルスベクターのビリオンに組換え遺伝子発現カセットをパッケージするために、I T R 配列を使用することができる。ある特定の実施形態では、I T R は A A V、例えば A A V 8 または A A V 2 に由来する（例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Yan et al., 2005, J. Virol., 79(1):364-379、米国特許第 7,282,199 号明細書、米国特許第 7,790,449 号明細書、米国特許第 8,318,480 号明細書、米国特許第 8,962,332 号明細書および国際特許出願番号 P C T / E P 2 0 1 4 / 0 7 6 4 6 6 を参照）。

#### 【0146】

ある特定の実施形態では、自己相補的ベクター、例えば s c A A V を生成するために使用される改変された I T R を使用することができる（例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18(2): 171-82, McCarty et al, 2001, Gene Therapy, Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254 ならびに米国特許第 6,596,535 号明細書；同第 7,125,717 号明細書および同第 7,456,683 号明細書を参照。）

#### 【0147】

##### 5.2.8 ベクターの製造および試験

本明細書で提供されるウイルスベクターは、宿主細胞を使用して製造することができる



。本明細書で提供されるウイルスベクターは、哺乳動物の宿主細胞、例えば、A 5 4 9、W E H I、1 0 T 1 / 2、B H K、M D C K、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0、B M T 1 0、V E R O、W 1 3 8、H e L a、2 9 3、S a o s、C 2 C 1 2、L、H T 1 0 8 0、H e p G 2、一次線維芽細胞、肝細胞および筋芽細胞を使用して製造することができる。本明細書で提供されるウイルスベクターは、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギまたはハムスターからの宿主細胞を使用して製造することができる。

#### 【 0 1 4 8 】

宿主細胞は、導入遺伝子および関連するエレメントをコードする配列（すなわち、ベクターゲノム）ならびに宿主細胞の中でウイルスを生成する手段、例えば、複製およびカプシド遺伝子（例えば、A A Vのr e pおよびc a p遺伝子）により安定して形質転換される。A A V 8カプシドによって組換えA A Vベクターを生成する方法については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7, 282, 199号明細書の発明を実施するための形態のセクションI Vを参照されたい。前記ベクターのゲノムコピー価は、例えば、T A Q M A N（登録商標）分析によって決定することができる。ビリオンは、例えば、C s C l<sub>2</sub>沈降によって回収することができる。

#### 【 0 1 4 9 】

あるいは、A A Vベクターを生成するために、昆虫細胞の中のバキュロウイルス発現系を使用することができる。レビューについては、製造技術のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Aponte-Ubillus et al., 2018, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102: 1045-1054を参照。

#### 【 0 1 5 0 】

本明細書に記載されるベクターからの導入遺伝子発現を測定し、したがって、例えばベクターの効力を示すために、i n v i t r oアッセイ、例えば細胞培養アッセイを使用することができる。例えば、P E R . C 6（登録商標）細胞株（L o n z a）、ヒト胚性網膜細胞または網膜色素上皮細胞から誘導される細胞株、例えば、網膜色素上皮細胞株h T E R T R P E - 1（A T C C（登録商標）から入手可能）を、導入遺伝子発現を評価するために使用することができる。あるいは、肝臓または他の細胞型から誘導される細胞株、例えば、限定されずに、H u H - 7、H E K 2 9 3、線維肉腫H T - 1 0 8 0、H K B - 1 1およびC A P細胞を使用することができる。発現されると、V E G F - T r a pに関連したグリコシル化およびチロシン硫酸化パターンの判定を含む、発現生成物（すなわち、V E G F - T r a p）の特徴を判定することができる。グリコシル化パターンおよびそれを判定する方法が、本明細書で議論される。さらに、細胞から発現されるV E G F - T r a pのグリコシル化/硫酸化からもたらされる恩恵は、当技術分野で公知のアッセイを使用して判定することができる。

#### 【 0 1 5 1 】

##### 5 . 2 . 9 組成物

本明細書に記載される導入遺伝子をコードするベクターおよび好適な担体を含む組成物が記載される。好適な担体（例えば、網膜下および/または網膜内投与のためのまたは静脈内投与のための）は、当業者によって容易に選択され得る。

#### 【 0 1 5 2 】

##### 5 . 3 翻訳後修飾：グリコシル化およびチロシン硫酸化

ある特定の態様では、ヒト翻訳後修飾を含有するV E G F - T r a pタンパク質が本明細書で提供される。一態様では、本明細書に記載されるV E G F - T r a pタンパク質は、2, 6 - シアリル化グリカンのヒト翻訳後修飾を含有する。ある特定の実施形態では、V E G F - T r a pタンパク質は、ヒト翻訳後修飾のみを含有する。一実施形態では、本明細書に記載されるV E G F - T r a pタンパク質は、N - グリコリルノイラミン酸（N e u 5 G c）および/またはガラクトース - 1, 3 - ガラクトース（ - G a l）の免疫原性非ヒト翻訳後修飾を含有しない（または、当技術分野で標準のアッセイ、例えば下記のものによって検出可能なレベルを含有しない）。別の態様では、V E G F - T r a pタンパク質は、チロシン（「Y」）硫酸化部位を含有する。一実施形態では、チロシ

ン部位は、アフリベルセプトのアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p の融合タンパク質の F l t - 1 I g 様ドメイン 2、K D R I g 様ドメイン 3 および / または F c ドメインにおいて硫酸化される。他の態様では、V E G F - T r a p タンパク質は、2, 6 - シアリル化グリカンを含む。別の態様では、V E G F - T r a p タンパク質は、2, 6 - シアリル化グリカン、および少なくとも 1 つの硫酸化チロシン部位を含む。他の態様では、V E G F - T r a p タンパク質は、完全ヒト翻訳後修飾を含む ( V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> )。図 1 は、N グリコシル化することができ、したがって、2, 6 - シアリル化グリカンを含むように改変することができる、アフリベルセプトの V E G F - t r a p 配列のアミノ酸を黄色で強調する。したがって、配列番号 1 の 3 6、6 8、1 2 3、1 9 6 および 2 8 2 位のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つの全てにおいて 2, 6 - シアリル化グリカンを含む V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> が提供される ( 図 1 において黄色で強調される )。配列番号 1 の 1 1、1 4 0、2 6 3 および 2 8 1 位のチロシンの 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つの全てで硫酸化される、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> 分子も提供される ( 図 1 において赤色で強調される )。ある特定の態様では、V E G F - T r a p の翻訳後修飾は、導入遺伝子によって培養において適切な細胞株、例えば P E R . C 6 または R P E 細胞 ( または、非網膜細胞では、H E K 2 9 3、線維肉腫 H T - 1 0 8 0、H K B - 1 1、C A P もしくは H u H - 7 細胞株 ) を形質導入することによって評価することができ、それは、グリコシル化および / または硫酸化されるが、前記細胞培養において検出可能なレベルの N e u G c も - G a l も含有しない前記 V E G F - T r a p の生成をもたらすことができる。あるいは、またはさらに、チロシン硫酸化を含む前記 V E G F - T r a p の生成は、P E R . C 6、R P E または非網膜細胞株、例えば H E K 2 9 3、線維肉腫 H T - 1 0 8 0、H K B - 1 1、C A P もしくは H u H - 7 を細胞培養において前記組換えヌクレオチド発現ベクターによって形質導入することによって確認することができる。

#### 【 0 1 5 3 】

ある特定の態様では、ヒト網膜細胞および V E G F - T r a p 導入遺伝子を発現するヒト網膜細胞において V E G F - T r a p 導入遺伝子を生成する方法が本明細書で提供される。一実施形態では、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> などの V E G F - T r a p をコードする発現ベクターは、ヒト対象の目の中の網膜下空間に投与することができ、ここで、前記 V E G F - T r a p の発現は、前記発現ベクターからの発現の後に 2, 6 - シアリル化される。別の実施形態では、V E G F - T r a p をコードする発現ベクターは、ヒトの不死化された網膜由来の細胞にトランスフェクトされ、V E G F - T r a p 導入遺伝子は、ヒトの不死化された網膜由来の細胞において発現され、発現の後に 2, 6 - シアリル化される。2, 6 - シアリル化 V E G F - T r a p タンパク質を発現するヒトの不死化された網膜由来の細胞も、本明細書で提供される。さらに、またはあるいは、ヒト網膜細胞および / またはヒトの不死化された網膜由来の細胞は、少なくとも 1 つのチロシン硫酸化を含む V E G F - T r a p 導入遺伝子を発現することができる。そのような組換え糖タンパク質生成のために使用することができるヒト網膜細胞株には、少し例を挙げれば P E R . C 6 および R P E が含まれる ( 例えば、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> 糖タンパク質の組換え生成のために使用することができるヒト細胞株のレビューについては、参照によりその全体が組み込まれる、Dumont et al., 2015, Critical Rev in Biotech, 36(6): 1110-1122 "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives" を参照 )。

#### 【 0 1 5 4 】

ある特定の態様では、ヒト肝臓細胞ならびに V E G F - T r a p 導入遺伝子を発現するヒト肝臓細胞において V E G F - T r a p 導入遺伝子を生成する方法が本明細書で提供される。一実施形態では、V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> などの V E G F - T r a p をコードする発現ベクターは、ヒト対象に静脈内投与することができ、ここで、前記 V E G F - T r a p の発現は、前記ヒト対象の肝臓細胞における前記発現ベクターからの発現の後に 2, 6 - シアリル化される。別の実施形態では、V E G F - T r a p をコードする発現

ベクターは、ヒトの不死化された肝臓由来の細胞（または他の不死化ヒト細胞）にトランスフェクトされ、VEGF-Trap導入遺伝子は、ヒトの不死化された肝臓由来の（または他のヒト不死化）細胞において発現され、発現の後に 2, 6 - シアリル化される。

2, 6 - シアリル化 VEGF-Trap タンパク質を発現するヒトの不死化された肝臓由来の（または他のヒト不死化）細胞も、本明細書で提供される。さらに、またはあるいは、ヒト肝臓細胞および / またはヒトの不死化された肝臓由来の細胞は、少なくとも 1 つのチロシン硫酸化を含有する VEGF-Trap 導入遺伝子を発現することができる。そのような組換え糖タンパク質生成のために使用することができるヒト肝臓細胞株には H u H - 7 細胞が含まれるが、H E K 2 9 3、線維肉腫 H T - 1 0 8 0、H K B - 1 1、C A P および P E R . C 6 などの非肝臓由来細胞を含むこともできる（例えば、上の Dumont e t al. を参照されたい）。 10

#### 【 0 1 5 5 】

本発明は、ヒト翻訳後修飾 VEGF-Trap ( VEGF-Trap<sup>H u P T M</sup> ) タンパク質を送達するための遺伝子療法を提供する。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチで生成されるあらゆる分子が完全にグリコシル化および硫酸化されることは必須でない。むしろ、生成される糖タンパク質の集団は、効能を示すのに十分なグリコシル化（2, 6 - シアリル化を含む）および硫酸化を有するべきである。本発明の遺伝子療法処置の目標は、疾患の進行を鈍化または停止させることである。本発明の 1 つの特定の実施形態では、VEGF-Trap<sup>H u P T M</sup> タンパク質はヒト翻訳後修飾の全てを有し、したがって、これらのタンパク質は完全なヒトグリコシル化および硫酸化を有する。他の実施形態では、VEGF-Trap<sup>H u P T M</sup> タンパク質の集団の 0 . 5 ~ 1 % のみが翻訳後修飾されて治療的に有効であるか、または分子の概ね 2 % もしくは 1 % ~ 5 %、もしくは 1 %、もしくは 1 0 %、もしくは 1 0 % を超えて翻訳後修飾されて治療的に有効であってもよい。ある特定の実施形態では、2, 6 - シアリル化および / または硫酸化のレベルは有意により高く、そのため、分子の最大 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 1 0 0 % でさえもグリコシル化および / または硫酸化を含有し、治療的に有効である。本明細書で提供される遺伝子療法処置の目標は、網膜の新血管形成を処置すること、および最小限の介入 / 侵襲的技法によって視力を維持もしくは向上させること、または転移性大腸がんを処置する、改善する、もしくはその進行を鈍化させることである。2, 6 シアリル化の存在は、当技術分野で公知の方法によって試験することができる。例えば、Rohrer, J.S., 2000, "Analyzing Sialic Acids Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection." Anal. Biochem. 283; 3-9 を参照。 20 30

#### 【 0 1 5 6 】

好ましい実施形態では、VEGF-Trap<sup>H u P T M</sup> タンパク質はまた、検出可能な NeuGc および / または - Gal を含有しない。本明細書において、「検出可能な NeuGc」または「検出可能な - Gal」または「NeuGc も - Gal も含有しないか有しない」は、VEGF-Trap<sup>H u P T M</sup> が当技術分野で公知の標準のアッセイ方法によって検出可能な NeuGc も - Gal 部分も含有しないことを意味する。例えば、NeuGc は、NeuGc を検出する方法について、参照により本明細書に組み込まれる、Hara et al., 1989, "Highly Sensitive Determination of N-Acetyl- and N-Glycolylneuraminic Acids in Human Serum and Urine and Rat Serum by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." J. Chromatogr., B: Biomed. 377, 111-119 による、HPLC によって検出することができる。あるいは、NeuGc は質量分析によって検出することができる。 - Gal は、ELISA を使用して（例えば、Galili et al., 1998, "A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody." Transplantation. 65(8): 1129-32 を参照）、または質量分析によって（例えば、Ayoub et al., 2013, "Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques." Landes Bioscience. 5(5):699-710 を参照）検出することができる。Platts-M 40 50

ills et al., 2015, "Anaphylaxis to the Carbohydrate Side-Chain Alpha-gal" *Immunol Allergy Clin North Am.* 35(2): 247-260に引用される参考文献も参照。

#### 【 0 1 5 7 】

##### 5 . 3 . 1 グリコシル化

グリコシル化は、本明細書に記載される組成物および方法で使用される V E G F - T r a p 導入遺伝子に多数の恩恵を付与することができる。大腸菌 (E. coli) は N - グリコシル化のために必要とされる構成成分を天然に保有しないので、そのような恩恵は大腸菌 (E. coli) におけるタンパク質の生成によって達成不能である。さらに、一部の恩恵は、例えば C H O 細胞におけるタンパク質生成を通して達成不能であるが、その理由は、C H O 細胞はある特定のグリカン (例えば 2 , 6 シアル酸および二分岐の G l c N A c ) の付加のために必要とされる構成成分を欠いているからであり、および C H O 細胞はヒトに一般的でなく、および / またはヒトで免疫原性であるグリカン、例えば N e u 5 G c および - G a l を加えることができるからである。例えば、Song et al., 2014, *Anal. Chem.* 86:5661-5666を参照されたい。

10

#### 【 0 1 5 8 】

ヒト網膜細胞は、グリコシル化およびチロシン - O 硫酸化、網膜細胞における頑強なプロセスを含む、分泌タンパク質の翻訳後プロセシングのための細胞機構を有する分泌細胞である。(例えば、ヒト網膜細胞によって生成される翻訳後修飾について、その各々は、参照によりその全体が組み込まれる、網膜細胞による糖タンパク質の生成を報告する、Wang et al., 2013, *Analytical Biochem.* 427: 20-28およびAdamis et al., 1993, *BBRC* 193: 631-638 ; ならびに、網膜細胞によって分泌されるチロシン硫酸化糖タンパク質の生成を報告する、Kanan et al., 2009, *Exp. Eye Res.* 89: 559-567およびKanan & Al-Ubaidi, 2015, *Exp. Eye Res.* 133 : 126-131を参照する)。

20

#### 【 0 1 5 9 】

ヒト肝細胞は、グリコシル化およびチロシン - O 硫酸化を含む、分泌タンパク質の翻訳後プロセシングのための細胞機構を有する分泌細胞である。例えば、ヒト肝臓によって分泌される血漿タンパク質のプロテオーム同定については、<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/liver>を ; それらの分泌タンパク質のグリカンのスペクトルについては、Clerc et al., 2016, *Glycoconj* 33 :309-343およびPompach et al., 2014, *J Proteome Res.* 13 :5561-5569を ; および T P S T - 2 (チロシン - O 硫酸化を触媒する) は他の組織におけるより強く肝臓において発現されるが、T P S T - 1 は他の組織と同等の平均レベルで発現されることを報告している、E Mishiro, 2006, *J Biochem* 140:731-737を参照、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

#### 【 0 1 6 0 】

V E G F - T r a p、アフリベルセプトは、96 . 9 キロダルトン (k D a) のタンパク質分子量を有する C H O 細胞において作製される二量体糖タンパク質である。それは概ね 15 % のグリコシル化を有し、115 k D a の総分子量を与える。一次配列によって予測される各ポリペプチド鎖の上の全ての 5 つの推定上の N - グリコシル化部位は、炭水化物で占有することができ、末端シアル酸残基における不均一性を含む、ある程度の鎖不均一性を示す。

40

#### 【 0 1 6 1 】

アフリベルセプトなどの C H O 細胞生成物と異なり、ヒト網膜もしくは肝臓細胞、または他のヒト細胞による V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> のグリコシル化は、安定性、半減期を向上させることができ、導入遺伝子生成物の望ましくない凝集を低減するグリカンの付加をもたらす。(抗体および F a b におけるグリコシル化の明らかとなってきた重要性のレビューについては、例えば、Bovenkamp et al., 2016, *J. Immunol.* 196: 1435-1441を参照)。注目すべきことに、本発明の V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> に加えられるグリカンは、2 , 6 - シアル酸を含有する高度にプロセシングされた複合型の N - グリカンである。そのようなグリカンは、この翻訳後修飾を行うために要求される 2 , 6 - シアリルトランスフェラーゼを有しない C H O 細胞において作製されるアフリベルセプトに存在せず

50

、CHO細胞は二分岐のGlcNAcも生成しないが、それらは免疫原性であるNeu5Gc (NGNA)は生成する。例えば、Dumont et al., 2015, Critical Rev in Biotech, 36(6): 1110-1122を参照されたい。さらに、CHO細胞は、高濃度でアナフィラキシーを誘発することができる、ほとんどの個体に存在する抗- Gal 抗体と反応する免疫原性グリカン、- Gal 抗原を生成することもできる。例えば、Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156を参照されたい。本発明のVEGF-Trap<sup>HUP™</sup>のヒトグリコシル化パターンは、導入遺伝子生成物の免疫原性を低減し、安全性および効能を向上させるはずである。

#### 【0162】

O-グリコシル化は、酵素によるセリンまたはトレオニン残基へのN-アセチルガラクトサミンの付加を含む。抗体のヒンジ領域に存在するアミノ酸残基は、O-グリコシル化することができることが実証されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される組成物および方法で使用されるVEGF-Trapは、IgG Fcヒンジ領域の全部または一部を含み、したがって、ヒト網膜細胞または肝臓細胞で発現される場合にOグリコシル化することが可能である。O-グリコシル化の可能性は、大腸菌(E. coli)がヒトO-グリコシル化において使用されるものと同等の機構をやはり天然に含有しないので(代わりに、細菌が特異的O-グリコシル化機構を含有するように改変される場合のみ、大腸菌(E. coli)におけるO-グリコシル化が実証された。例えば、Farid-Moayer et al., 2007, J. Bacteriol. 189:8088-8098を参照)、大腸菌(E. coli)において生成されるタンパク質と比較して、本明細書で提供されるVEGF-Trapタンパク質に別の利点を付与する。

#### 【0163】

##### 5.3.2 チロシン硫酸化

チロシン硫酸化は、Yの+5~-5の位置にグルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)があるチロシン(Y)残基において、Yの-1の位置は中性または酸性の荷電アミノ酸であるが、硫酸化を無効にする塩基性アミノ酸、例えばアルギニン(R)、リジン(K)またはヒスチジン(H)でない場合に生じる。したがって、本明細書に記載される組成物および方法は、少なくとも1つのチロシン硫酸化部位を含むVEGF-Trapタンパク質の使用を含み、それは、ヒト網膜細胞または肝臓細胞または他のヒト細胞において発現される場合、チロシン硫酸化されてもよい。

#### 【0164】

重要なことに、チロシン硫酸化タンパク質は、チロシン硫酸化のために必要とされる酵素を天然に保有しない大腸菌(E. coli)において生成することができない。さらに、CHO細胞は、チロシン硫酸化の欠陥があり、それらは分泌細胞でなく、翻訳後チロシン硫酸化の能力が限られている。例えば、Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537を参照されたい。有利には、本明細書で提供される方法は、分泌性であり、チロシン硫酸化の能力を有する網膜細胞または肝臓細胞におけるVEGF-Trap導入遺伝子の発現を要求する。網膜細胞によって分泌されるチロシン硫酸化糖タンパク質の生成を報告する、Kanan et al., 2009, Exp. Eye Res. 89: 559-567およびKanan & Al-Ubaidi, 2015, Exp. Eye Res. 133: 126-131を参照されたい。

#### 【0165】

チロシン硫酸化は、いくつかの理由のために有利である。例えば、標的に対する治療抗体の抗原結合断片のチロシン硫酸化は、抗原結合力および活性を劇的に増加させることが示されている。例えば、Loos et al., 2015, PNAS 112: 12675-12680およびChoe et al., 2003, Cell 114: 161-170を参照されたい。チロシン硫酸化の検出アッセイは、当技術分野で公知である。例えば、Yang et al., 2015, Molecules 20:2138-2164を参照されたい。

#### 【0166】

グリコシル化部位に加えて、アフリベルセプトなどのVEGF-Trapは、チロシン(「Y」)硫酸化部位を含有することができる；硫酸化部位は赤色で強調され、配列番号

1 の 1 1 位 ( F l t - 1 I g 様ドメイン )、1 4 0 位 ( K D R I g 様ドメイン )、2 6 3 および 2 8 1 位 ( I g G 1 F c ドメイン ) のアフリベルセプトの F l t - 1 I g 様ドメイン 2、K D R I g 様ドメイン 3 および F c ドメインにおけるチロシン - O 硫酸化部位を同定する、図 1 を参照。(例えば、タンパク質チロシン硫酸化を受けるチロシン残基を囲んでいるアミノ酸の分析については、参照によりその全体が組み込まれる、Yang et al., 2015, Molecules 20:2138-2164、特に p. 2154 を参照)。

#### 【 0 1 6 7 】

##### 5 . 4 . 遺伝子療法プロトコール

新血管形成の増加によって引き起こされる眼疾患を有するヒト対象への、導入遺伝子構築物の治療有効量の投与のための方法が記載される。より詳細には、n A M D、糖尿病性網膜症、D M E、R V O、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害を有する患者への、導入遺伝子構築物の治療有効量の投与のための方法が記載される。具体的な実施形態では、ベクターは、網膜下 (局所麻酔下の対象での部分的硝子体切除および網膜への遺伝子療法の注射を含む、訓練された網膜外科医によって実行される外科的処置；例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Campochiaro et al., 2016, Hum Gen Ther Sep 26 epub:doi: 10.1089/hum.2016.117 を参照)、または硝子体内、または脈絡膜上に、例えばマイクロインジェクションまたはマイクロカニューレーションによって投与される。(例えば、その各々は、参照によりその全体が組み込まれる、Patel et al., 2012, Invest Ophth & Vis Sci 53 :4433-4441 ; Patel et al., 2011, Pharm Res 28: 166-176 ; Olsen, 2006, Am J Ophth 142:777-787 を参照)。特定の実施形態では、導入遺伝子構築物の治療有効量の網膜下および / または網膜内投与のためのそのような方法は、V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> を網膜に送達するために、ヒト光受容体細胞 (錐体細胞、桿体細胞) ; 水平細胞 ; 双極細胞 ; アマクリン細胞 ; 網膜神経節細胞 (小人細胞、日傘細胞、二層細胞、巨大網膜神経節細胞、光感受性神経節細胞およびミュラーグリア) ; および網膜色素上皮細胞の 1 つまたは複数における導入遺伝子の発現をもたらす。

#### 【 0 1 6 8 】

大腸がん細胞および / または大腸がん細胞を囲んでいる組織への送達のために、ヒト対象の肝臓に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> を発現する細胞のデポを形成するために、がん、特に転移性大腸がんを有するヒト対象への、導入遺伝子構築物の治療有効量の投与のための方法が記載される。詳細には、方法は、肝臓の血流を通した、例えば肝上静脈または肝臓動脈を介した、肝臓への静脈内投与または直接投与を提供する。そのような方法は、がん細胞および / またはがん細胞を囲んでいる新血管形成組織に V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> を送達するために、肝臓細胞において導入遺伝子の発現をもたらす。

#### 【 0 1 6 9 】

##### 5 . 4 . 1 標的 patient 集団

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、新血管形成の増加によって引き起こされる眼疾患と診断された患者への投与のためである。

#### 【 0 1 7 0 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、重度の A M D と診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、減弱した A M D と診断された患者への投与のためである。

#### 【 0 1 7 1 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、重度の滲出型 A M D と診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、減弱した滲出型 A M D と診断された患者への投与のためである。

#### 【 0 1 7 2 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、重度の糖尿病性網膜症と診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、減弱した糖尿病性網膜症と診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、糖尿病性黄斑浮腫 (D M E) と関連した糖尿病性

網膜症と診断された患者への投与のためである。

【0173】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、重度の糖尿病性網膜症と診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、減弱した糖尿病性網膜症と診断された患者への投与のためである。

【0174】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、網膜中心静脈閉塞（RVO）、RVO後の黄斑浮腫、病的近視またはポリープ様脈絡膜脈管障害と診断された患者への投与のためである。

【0175】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、VEGF - Trap 融合タンパク質による処置に応答性であると同定された、AMDと診断された患者への投与のためである。

【0176】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、アフリベルセプトによる処置に応答性であると同定された、AMDと診断された患者への投与のためである。

【0177】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、遺伝子療法による処置の前に硝子体内に注射される、アフリベルセプトなどのVEGF - Trap 融合タンパク質による処置に応答性であると同定された、AMDと診断された患者への投与のためである。

【0178】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、遺伝子療法による処置の前に硝子体内に注射される、不死化されたヒト網膜細胞における発現によって生成されるVEGF - Trap<sup>HUP TM</sup>による処置に応答性であると同定された、AMDと診断された患者への投与のためである。

【0179】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、LUCENTIS（登録商標）（ラニズマブ）、EYLEA（登録商標）（アフリベルセプト）および/またはAVASTIN（登録商標）（ベバシズマブ）による処置に応答性であると同定された、AMD、糖尿病性網膜症、DME、網膜中心静脈閉塞（RVO）、病的近視、ポリープ様脈絡膜脈管障害と診断された患者への投与のためである。

【0180】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、がん、特に転移がんとして診断された患者への投与のためである。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、転移性大腸がんとして診断された患者への投与のためである。

【0181】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、VEGF - Trap 融合タンパク質による処置に応答性であると同定された、転移がん、特に転移性大腸がんとして診断された患者への投与のためである。

【0182】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、ジブ - アフリベルセプトによる処置に応答性であると同定された、転移がん、特に転移性大腸がんとして診断された患者への投与のためである。

【0183】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、遺伝子療法による処置の前に静脈内注入される、ジブ - アフリベルセプトなどのVEGF - Trap 融合タンパク質による処置に応答性であると同定された、転移がん、特に転移性大腸がんとして診断された患者への投与のためである。

【0184】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、遺伝子療法による処置の前に

10

20

30

40

50

静脈内注入される、不死化されたヒト細胞における発現によって生成される V E G F - T r a p<sup>H u P T M</sup> による処置に応答性であると同定された、転移がん、特に転移性大腸がんと診断された患者への投与のためである。

【 0 1 8 5 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法は、Z A L T R A P（登録商標）（ジブ - アフリベルセプト）、および / または A V A S T I N（登録商標）（ペバシズマブ）、および / または S T I V A R G A（登録商標）（レゴラフェニブ）による処置に応答性であると同定された、転移がん、特に転移性大腸がんを診断された患者への投与のためである。

【 0 1 8 6 】

5 . 4 . 2 投薬量および投与様式

組換えベクターの治療有効用量は、目に、例えば網膜下空間に、または脈絡膜上の空間に、または硝子体内に、0 . 1 m L ~ 0 . 5 m L、好ましくは 0 . 1 ~ 0 . 2 5 m L（1 0 0 ~ 2 5 0  $\mu$  l）の範囲内の注射容量で送達すべきである。硝子体液において少なくとも約 0 . 3 3  $\mu$  g / m L ~ 約 1 . 3 2  $\mu$  g / m L、または眼房水（目の前眼房）において約 0 . 1 1  $\mu$  g / m L ~ 約 0 . 4 4  $\mu$  g / m L の C<sub>m i n</sub> で検出可能である導入遺伝子生成物の濃度を 3 カ月間維持する用量が望まれ；その後、約 1 . 7 0 ~ 約 6 . 6 0  $\mu$  g / m L の範囲内のおよび最高約 2 6 . 4 0  $\mu$  g / m L の導入遺伝子生成物の硝子体 C<sub>m i n</sub> 濃度、ならびに / または約 0 . 5 6 ~ 約 2 . 2 0  $\mu$  g / m L の範囲内のおよび最高 8 . 8 0  $\mu$  g / m L の眼房水 C<sub>m i n</sub> 濃度を維持すべきである。硝子体液濃度は、導入遺伝子生成物の患者の眼房水または血清の濃度を測定することによって推定および / またはモニタリングすることができる。あるいは、遊離 V E G F 血漿濃度の約 1 0 p g / m L への低減を達成するのに十分な用量を使用することができる。（例えば、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Avery et al., 2017, Retina, the Journal of Retinal and Vitreous Diseases 0: 1-12 および Avery et al., 2014, Br J Ophthalmol 98: 1636-1641 を参照されたい）。

【 0 1 8 7 】

がん、特に転移性大腸がんの処置のために、治療有効用量は、2 週毎に 4 m g / k g の用量で投与した場合に、2 週または 4 週後に、導入遺伝子の血漿濃度がジブ - アフリベルセプトの少なくとも C<sub>m i n</sub> 血漿濃度のレベルで維持されるように、患者に好ましくは静脈内投与すべきである。

【 0 1 8 8 】

5 . 5 バイオマーカー / サンプルング / 効能モニタリング

視覚的欠陥に対する本明細書で提供される処置方法の効果は、B C V A（最良矯正視力）、眼圧、スリットランプ生体鏡検査法および / または間接検眼によって測定することができる。

【 0 1 8 9 】

目 / 網膜への身体的変化に対する本明細書で提供される処置方法の効果は、S D - O C T（S D 光学式干渉断層撮影）によって測定することができる。

【 0 1 9 0 】

効能は、網膜電図検査（E R G）によって測定されるように、モニタリングすることができる。

【 0 1 9 1 】

本明細書で提供される処置方法の効果は、視力喪失、感染、炎症および網膜剥離を含む他の安全性事象の徴候を測定することによってモニタリングすることができる。

【 0 1 9 2 】

本明細書で提供される処置の効能を判定するために、網膜の厚さをモニタリングすることができる。いかなる特定の理論によっても縛られないが、網膜の厚さは、臨床情報として使用することができ、ここで、網膜の厚さの低減がより大きいほど、または網膜の肥厚までの時間がより長いほど、その処置はより有効である。網膜の機能は、例えば、E R G

10

20

30

40

50



によって判定することができる。ERGは、ヒトで使用するためにFDAの承認を得た、網膜機能の非侵襲的電気生理学的試験であり、それは、目の光感受性細胞（桿体および錐体）およびそれらを接続する神経節細胞、特に閃光刺激へのそれらの応答を検査する。網膜の厚さは、例えば、SD-OCTによって判定することができる。SD-OCTは、目的の物体から反射される後方散乱光のエコー時間遅延および大きさを判定するために低コヒーレンス干渉計法を使用する、三次元画像化技術である。OCTは組織試料（例えば、網膜）の層を3～15 μmの軸分解能によって走査するために使用することができ、SD-OCTは以前の形態の技術に対して軸分解能および走査速度が向上している（Schuman, 2008, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 106:426-458）。

#### 【0193】

がん、特に転移性大腸がんの処置の効能は、抗がん/抗転移剤の効能、例えば腫瘍サイズの低減、転移の数および/またはサイズの低減、全体生存率、無進行生存、奏効率、安定疾患の発生率の増加を評価するための当技術分野で公知の任意の手段によってモニタリングすることができる。

#### 【0194】

##### 5.6 併用療法

本明細書で提供される処置方法は、1つまたは複数のさらなる療法と組み合わせることができる。一態様では、本明細書で提供される処置方法は、レーザー光凝固と共に投与される。一態様では、本明細書で提供される処置方法は、ベルテポルフィンまたは眼内ステロイドによる光力学療法と共に投与される。

#### 【0195】

一態様では、本明細書で提供される処置方法は、ヒト細胞株において生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>（Dumont et al., 2015、上記）、または他の抗VEGF剤、例えばアフリベルセプト、ラニズマブ、ベバシズマブもしくはペガブタニブを非限定的に含む、抗VEGF剤による硝子体内（IVT）注射と共に投与される。他の利用可能な処置の送達を伴う目/網膜へのVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>の送達の組合せが、本明細書に記載される。遺伝子療法処置の前、同時、または後に、さらなる処置を投与することができる。本発明の遺伝子療法と組み合わせることができる、nAMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視またはポリブ様脈絡膜脈管障害のための利用可能な処置には、レーザー光凝固、ベルテポルフィンによる光力学療法、およびアフリベルセプト、ラニズマブ、ベバシズマブまたはペガブタニブを限定されずに含む抗VEGF剤による硝子体内（IVT）注射、ならびに炎症を低減する硝子体内ステロイドによる処置が限定されずに含まれる。遺伝子療法と組み合わせることができる転移性大腸がんのための利用可能な処置には、がん、特に転移性大腸がんの処置に有用な手術および/または化学療法剤が限定されずに含まれる。特定の実施形態では、遺伝子療法は、転移性大腸がんの処置のために使用されるレジメン、具体的には、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテカン（FOLFIRI）もしくはフォリン酸（ロイコボリン、FAまたはフォリン酸カルシウムとも呼ばれる）、5-フルオロウラシル、および/またはオキサリプラチン（FOLFOX）、ならびにジブ-アフリベルセプト、ラニズマブ、ベバシズマブ、ペガブタニブもしくはレゴラフェニブを限定されずに含む抗VEGF剤による静脈内投与と共に投与される。

#### 【0196】

本明細書で提供される処置方法は、1つまたは複数のさらなる療法と組み合わせることができる。一態様では、本明細書で提供される眼疾患のための処置方法は、レーザー光凝固と共に投与される。一態様では、本明細書で提供される眼疾患のための処置方法は、ベルテポルフィンまたは眼内ステロイドによる光力学療法と共に投与される。

#### 【0197】

一態様では、本明細書で提供される処置方法は、ヒト細胞株において生成されるVEGF-Trap<sup>HuPTM</sup>（Dumont et al., 2015、上記）、または他の抗VEGF剤、例えばアフリベルセプト、ラニズマブ、ベバシズマブ、ペガブタニブまたはレゴラフェニ

10

20

30

40

50

ブを非限定的に含む、抗 V E G F 剤による硝子体内 ( I V T ) 注射または静脈内投与と共に投与される。

【 0 1 9 8 】

遺伝子療法処置の前、同時、または後に、さらなる処置を投与することができる。

【 0 1 9 9 】

遺伝子療法処置の効能は、医療標準を使用するレスキュー処置、例えば、ヒト細胞株において生成される V E G F - T r a p <sup>H u P T M</sup> または他の抗 V E G F 剤、例えばアフリベルセプト、ラニズマブ、ベバシズマブもしくはペガブタニブを非限定的に含む、抗 V E G F 剤による硝子体内注射の削除またはその回数の低減によって示すことができる。

【実施例】

【 0 2 0 0 】

[実施例 1]

アフリベルセプト c D N A ( およびコドン最適化 )

F 1 t - 1 シグナル配列 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 ( 配列番号 3 6 ) を有する配列番号 1 のアフリベルセプト配列をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、アフリベルセプト c D N A ベースのベクターを構築する ( 図 1 を参照 )。導入遺伝子配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される ( 例えば、配列番号 2 または配列番号 3 のヌクレオチド配列 )。ベクターは、C B 7 などの遍在的に活性である構成的プロモーター、または任意選択で、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。ベクターの地図は、図 5 A に提供される。

【 0 2 0 1 】

[実施例 2]

代替リーダーを有するアフリベルセプト

リーダー配列 M Y R M Q L L L L I A L S L A L V T N S ( 配列番号 3 8 ) を有する配列番号 1 のアフリベルセプト配列をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、アフリベルセプト c D N A ベースのベクターを構築する ( 図 2 に提供されたアミノ酸配列 )。導入遺伝子配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される ( 例えば、配列番号 2 または配列番号 3 のリーダー配列がないアフリベルセプトのアミノ酸配列 )。ベクターは、C B 7 などの遍在的に活性である構成的プロモーター、または任意選択で、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。ベクターの地図は、図 5 B に提供される。

【 0 2 0 2 】

[実施例 3]

「無効化された F c」( H 4 2 0 A ; H 4 2 0 Q ) を有するアフリベルセプト

4 2 0 位 ( F c の通常の番号付けにおける 4 3 5 位に対応する ) のヒスチジンがアラニン ( A ) またはグルタミン ( Q ) で置き換えられていること以外は配列番号 1 のアフリベルセプト配列をコードし、N 末端リーダー配列 M Y R M Q L L L L I A L S L A L V T N S ( 配列番号 3 8 ) をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、アフリベルセプト c D N A ベースのベクターを構築する ( 図 3 に示す )。導入遺伝子配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。ベクターは、C B 7 などの遍在的に活性である構成的プロモーター、または任意選択で、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。ベクターの地図は、図 5 C ( アラニン置換 ) および 5 D ( グルタミン置換 ) に提供する。

【 0 2 0 3 】

[実施例 4]

F c ( ・ ) アフリベルセプト

配列番号 1 のアフリベルセプト配列の F c なしの形態をコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、アフリベルセプト c D N A ベースのベクターが構築され、導入遺伝子は、配列番号 1 の 1 ~ 2 0 4 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( K D R 配列の末端リジンおよび I g G 1 F c ドメインが欠失 )、または配列番号 1 の 1 ~ 2 0 5 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( K D R 配列の末端リジンを有するが I g G 1 F c ドメインが欠失 )、または 1 ~ 2 1 6 位のアミノ酸配列を有する V E G F -

10

20

30

40

50

t r a p ( I g G 1 F c ドメインのヒンジ領域の一部を有する)、または配列番号 1 の 1 ~ 2 2 2 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( I g G 1 F c ドメインのヒンジ領域を有する)、または 1 ~ 2 2 7 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p をコードする(図 4 を参照)。構築物は、V E G F - t r a p の N 末端でリーダー配列 M Y R M Q L L L L I A L S L A L V T N S (配列番号 3 8) もコードする(図 2 に提供されたアミノ酸配列)。導入遺伝子配列は、ヒト細胞における発現のためにコドン最適化される。ベクターは、C B 7 などの遍在的に活性である構成的プロモーター、または任意選択で、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。

【0204】

[実施例 5]

F c ( - ) アフリベルセプト二重構築物

配列番号 1 のアフリベルセプト配列の F c なしの形態をコードする 2 つヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を含む、タンデム型のアフリベルセプト c D N A ベースのベクターが構築され、導入遺伝子は、配列番号 1 の 1 ~ 2 0 4 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( K D R 配列の末端リジンおよび I g G 1 F c ドメインが欠失)、または配列番号 1 の 1 ~ 2 0 5 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( K D R 配列の末端リジンを有するが I g G 1 F c ドメインが欠失)、または 1 ~ 2 1 6 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( I g G 1 F c ドメインのヒンジ領域の一部を有する)、または配列番号 1 の 1 ~ 2 2 2 位のアミノ酸配列を有する V E G F - t r a p ( I g G 1 F c ドメインのヒンジ領域を有する)、または配列番号 1 の 1 ~ 2 2 7 位のアミノ酸配列を有する V E G F - T r a p を各々コードする 2 つの(好ましくは同一の)ヌクレオチド配列を含む。構築物は、V E G F - t r a p 配列の各々の N 末端で、網膜細胞発現のためには表 3 のまたは肝臓細胞発現のためには表 4 のリーダー配列もコードする。2 つの V E G F - t r a p コード配列をコードするヌクレオチド配列は、I R E S エlementまたは 2 A 切断部位によって分離されてニシストロン性ベクターを作製する。ベクターは、C B 7 などの遍在的に活性である構成的プロモーター、または任意選択で、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。例示的なベクターを、図 5 E および 5 F に示す。

【0205】

均等物

本発明はその具体的な実施形態を参照して詳述されているが、機能的に同等である変形形態が本発明の範囲内であることが理解されよう。実際、本明細書に示され、記載されるものに加えて、本発明の様々な改変形が、前述の記載および添付図から当業者に明らかになる。そのような改変形は、添付の請求項の範囲内にあるものとする。当業者は、単にルーチンの実験操作を使用して、本明細書に記載される発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識するかまたは確認することができる。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものである。

【0206】

この明細書で指摘される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が参照によりその全体が本明細書に組み込まれることが具体的および個々に示されるのと同じ程度に、ここに参照により本明細書に組み込まれる。

## 【図 1】

図 1

アフリベルセプト配列:

**Flt-1 リーダー配列:**

<i>MTSYND TGVLLCALLS CLLLTGSSSG</i>	
<i>SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPTNITVT LKKFFLDTLI PDGKRIIWD</i>	60
<i>RGFTIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL</i>	120
<i>VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKLL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTSDQ</i>	180
<i>GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSTVLEFP KPKDTLMISR</i>	240
<i>TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN</i>	300
<i>GKEYCKVSN KALPAPIERT ISKAGQPRE PQVTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFPYS</i>	360
<i>DIAVWESNG QPENNYKTTP PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFS</i>	420
<i>VMHEALHNNH</i>	

*YTQKSLSLSP +/- GまたはGK*

36, 68, 123, 196 および 282 位の N 連結グリコシル化部位

11, 140, 263 および 281 位のチロシン O 硫酸化部位

30, 79, 124, 185, 211, 214, 246, 306, 352 および 410 位のジスルフィド結合に關するシステイン

238, 295 および 420 位の FeRn 結合を低減するために置換することができる Fe 残基

Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

IgG1 Fc 206 位~

## 【図 2】

図 2

アフリベルセプト配列/異種リーダー:

**リーダー配列**

<i>MYRMQLLLLI ALSALVNTS</i>	
<i>SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPTNITVT LKKFFLDTLI PDGKRIIWD</i>	60
<i>RGFTIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL</i>	120
<i>VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKLL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTSDQ</i>	180
<i>GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSTVLEFP KPKDTLMISR</i>	240
<i>TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN</i>	300
<i>GKEYCKVSN KALPAPIERT ISKAGQPRE PQVTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFPYS</i>	360
<i>DIAVWESNG QPENNYKTTP PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFS</i>	420
<i>VMHEALHNNH</i>	

*YTQKSLSLSP +/- GまたはGK*

36, 68, 123, 196 および 282 位の N 連結グリコシル化部位

11, 140, 263 および 281 位のチロシン O 硫酸化部位

30, 79, 124, 185, 211, 214, 246, 306, 352 および 410 位のジスルフィド結合に關するシステイン

238, 295 および 420 位の FeRn 結合を低減するために置換することができる Fe 残基

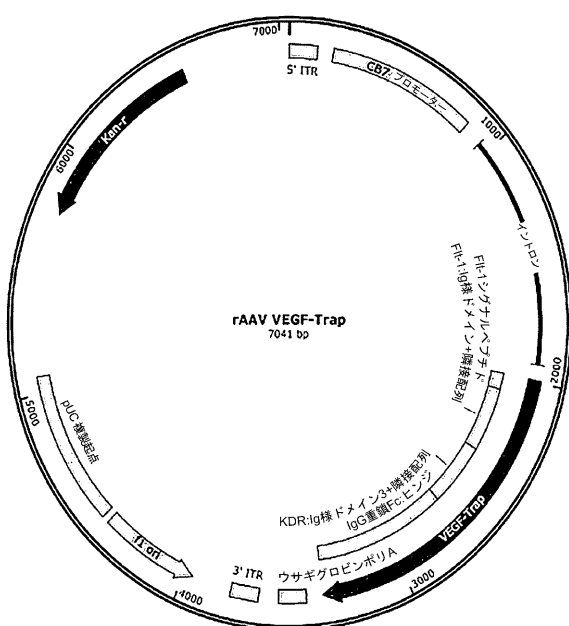
Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

IgG1 Fc 206 位~

## 【図 5 - 1】

図 5A rAAV VEGF-Trap 構築物



## 【図 3】

図 3

アフリベルセプト H<sup>420</sup>A/Q(無効化 Fc)および代替リーダー:

**リーダー配列:**

<i>MYRMQLLLLI ALSALVNTS</i>	
<i>SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPTNITVT LKKFFLDTLI PDGKRIIWD</i>	60
<i>RGFTIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL</i>	120
<i>VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKLL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTSDQ</i>	180
<i>GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSTVLEFP KPKDTLMISR</i>	240
<i>TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN</i>	300
<i>GKEYCKVSN KALPAPIERT ISKAGQPRE PQVTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFPYS</i>	360
<i>DIAVWESNG QPENNYKTTP PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFS</i>	420
<i>VMHEALHNNH</i>	

*YTQKSLSLSP +/- GまたはGK*

36, 68, 123, 196 および 282 位の N 連結グリコシル化部位

11, 140, 263 および 281 位のチロシン O 硫酸化部位

30, 79, 124, 185, 211, 214, 246, 306, 352 および 410 位のジスルフィド結合に關するシステイン

Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

IgG1 Fc 206 位~

## 【図 4】

図 4

アフリベルセプト Fc<sup>(-)</sup>および代替リーダー:

**リーダー配列:**

<i>MYRMQLLLLI ALSALVNTS</i>	
<i>SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPTNITVT LKKFFLDTLI PDGKRIIWD</i>	60
<i>RGFTIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL</i>	120
<i>VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKLL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTSDQ</i>	180
<i>GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT (または DKTHL) +/- CPPCPA +/- PELLGG</i>	

*+/- PSEVL*

36, 68, 123 および 196 位の N 連結グリコシル化部位

11 および 140 位のチロシン O 硫酸化部位

30, 79, 124 および 185 位(任意選択で、211 および 214 位)のジスルフィド結合に關するシステイン

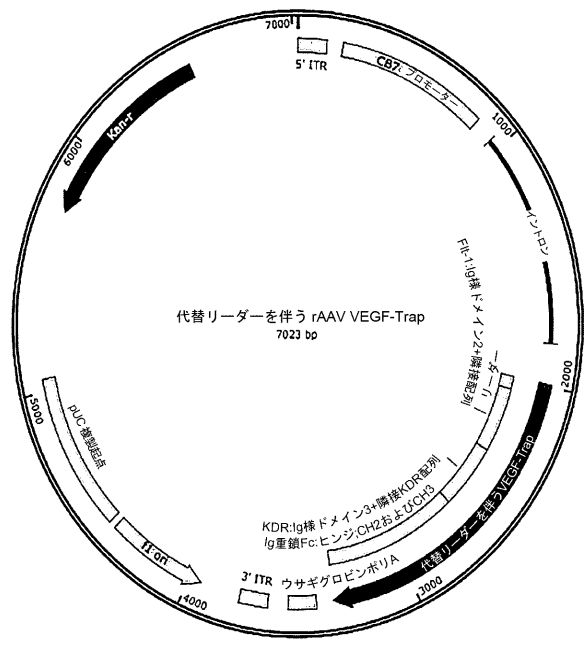
Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

ヒンジ領域はイタリック体

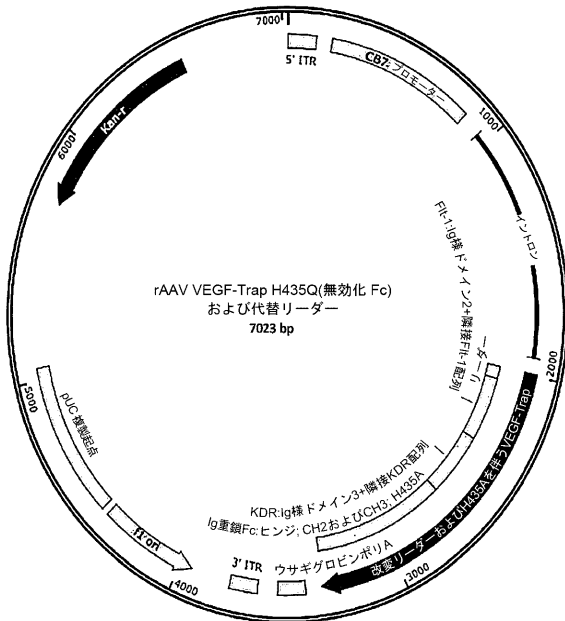
## 【図 5 - 2】

図 5B 代替リーダーを伴う rAAV VEGF-Trap



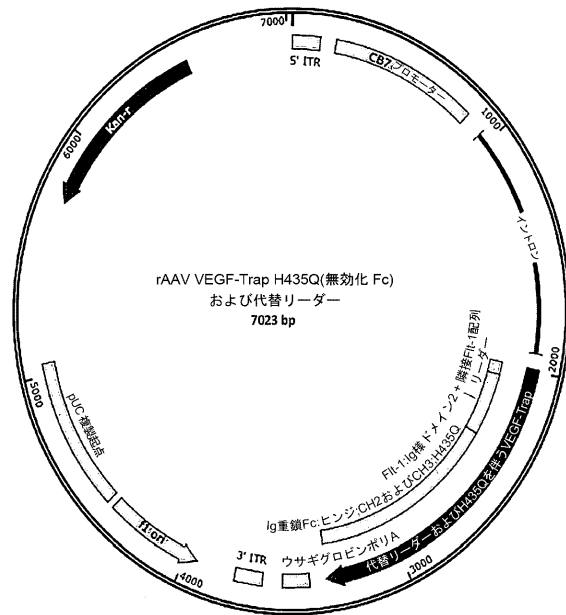
【図 5 - 3】

図 5C rAAV VEGF-Trap H420A(別名 H435A)(無効化 Fc)および代替リーダー



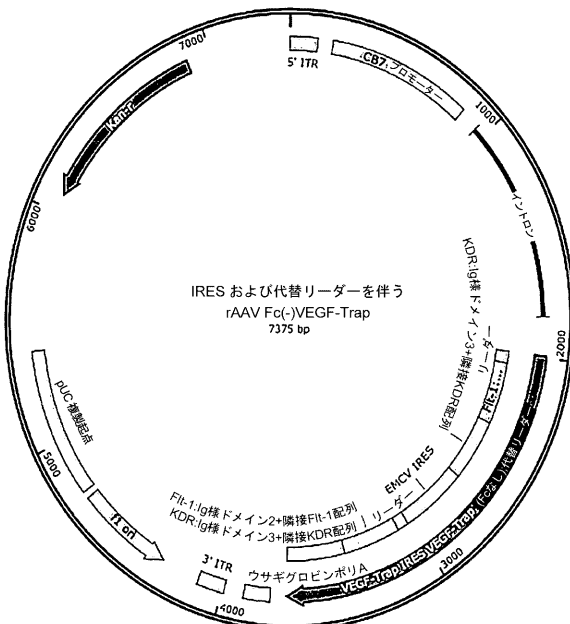
【図 5 - 4】

図 5D rAAV VEGF-Trap H420A(別名 H435Q)(無効化 Fc)および代替リーダー



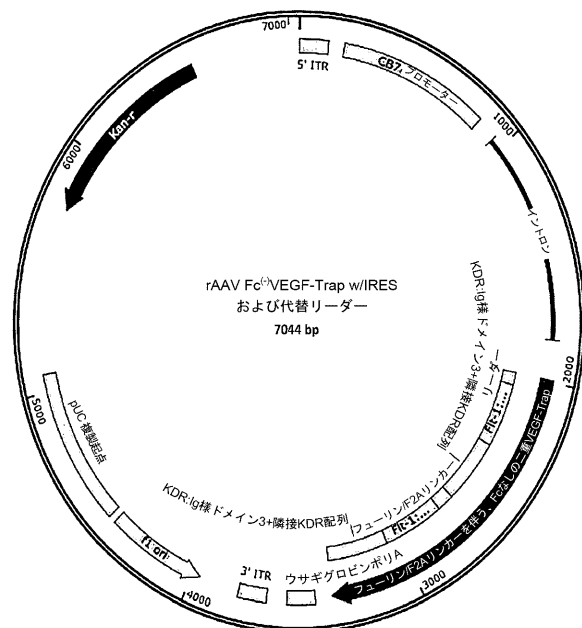
【図 5 - 5】

図 5E IRES および代替リーダーを伴う rAAV Fc(-)VEGF-Trap



【図 5 - 6】

図 5F フューリン 2A および代替リーダーを伴う rAAV Fc(-)VEGF-Trap



## 【図 6 - 1】

図 6

VP1<sub>1-734</sub>→

AAV1 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV2 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV3-3 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV4-4 ~~MTDGYL~~PDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 59

AV5 ~~MSFVDPHP~~WLEEE-VSGIGAREFLGLKAGCPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 59

AAV6 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV7 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV8 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

hu31 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

hu32 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

AAV9 MAADGYPDWLEENLSGIREWMDLPGAPKPKANQKQDDGRGLVPGYKYLGPFGNLD 60

SUBS ~~STVDHP~~-----~~ETVG~~-V-QFLK-QA-P-K-PAERK-DS-----N-----F----

MF L D E V P QS

G R

AAV1 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV2 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV3-3 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV4-4 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 119

AV5 RGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 119

AAV6 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV7 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV8 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

hu31 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

hu32 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV9 KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNFLRYNHADAEPQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

SUBS R-----E-EV-R-----IS-NE--DS-----R-----QK-QD-----K-----

R R E AG

Q

VP2<sub>139</sub>→ --HVR1--

AAV1 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

AAV2 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

AAV3-3 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

AAV4-4 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 178

AV5 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 168

AAV6 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

AAV7 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 180

AAV8 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 180

hu31 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

hu32 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

AAV9 AKKRVLEPLGLVEBGAATPKKKRPVEBQSPQ-EPDSSSGIGKTCQQPAKKRIAFGQGTDS 179

SUBS ---V--F--QGGG---TG-GIDDF-V-S---S-T--KQARTREKSVPEZETGA

I FV A ALIP Q T V T K E D K STSS S

E A S

R A

## 【図 6 - 3】

図 6(続き)

HVR4

AAV1 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 414

AAV2 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 413

AAV3-3 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 413

AAV4-4 QGGSLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 407

AV5 QGGSLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 406

AAV6 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 414

AAV7 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 415

AAV8 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 416

hu31 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 415

hu32 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 415

AAV9 AHQGCPLPPFPADVFMPIDQYGYLTLNDG---SQAVERSSFYCYLBYPPSQMLRTGNNTFSY 415

SUBS GQQ-S-A--FQ--TL--CG-VND--GNPDT-NA-F-----EIT-

T N V A T R Q E S

-----HVR5-----

AAV1 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

AAV2 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 472

AAV3-3 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

AAV4-4 SFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 469

AV5 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 467

AAV6 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

AAV7 SFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 475

AAV8 TFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 475

hu31 SFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

hu32 SFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

AAV9 SFEVFPFHSSYHAHQSLDRMLNPLIDQYLYLNRITQ-NQSSAQNKDLFSRGSFAGMSV 473

SUBS T--D--MF-----A--V--WGFR-QTNTS--AGTKRTQ-TQSSAATFSN

S E QS NSTPT TQNSDVN NKML QGTRD

N K V TG Q T AE L YRLR TRI L

A R G G GS E

ND

--HVR6-- --HVR7-- --HVR8--

AAV1 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

AAV2 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 527

AAV3-3 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

AAV4-4 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 527

AV5 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 524

AAV6 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

AAV7 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 530

AAV8 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 530

hu31 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

hu32 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

AAV9 QKRWLPGPCYRQQRVS~~KTIDN~~-----NNSNFTWTCASKYNLNGRESLINPGTAMASHK 528

SUBS FAK-WL-----CIKI-GWNLGSGV-----TG-DSLIKETHST-D-AISYQVP-QTPGMTAG

TP F M G K AND RA NYTTAKTNRME E D AIT V NN

K F F L KA V P TAG KYN W I I I

LD S H E A

Y T

S

## 【図 6 - 2】

図 6(続き)

--HVR2-- VP3<sub>205</sub>→

AAV1 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV2 DSUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV3-3 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV4-4 GDEG-~~PEGSSTGAMS~~----DSEHRAAGAAAGVGGGQAGDGVGNASGNWHCDSTWLGDR 232

AV5 EAGPSSGQ~~QI~~Q~~PA~~Q~~AS~~SL~~AD~~TSAGGGG~~PL~~GD~~NI~~QCAGDGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV6 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV7 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 239

AAV8 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 239

hu31 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

hu32 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

AAV9 ESUVD-~~PQPLGEPPAPPA~~AVGPTTMAAGGGA~~PMADN~~NEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR 238

SUBS GDS-S-S-Q~~LTQSTGMA~~SLDENEVRALLA-GAMGEGGQ-----NA--D-----T-MEGH

DA E S AQPATA AG ST S LV A

I -- DT

TD

S

HVR3

AAV1 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 297

AAV2 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 296

AAV3-3 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 296

AAV4-4 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 287

AV5 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 287

AAV6 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 297

AAV7 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 298

AAV8 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 298

hu31 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 298

hu32 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 298

AAV9 VITTSRTT~~WAL~~PTYNHLYKQIS-SASTGASNDNHYFGYSTPWGVD~~FN~~R~~PH~~CHFS~~SP~~RDW 298

SUBS -T-K-----V-S---Q-RRLSGSGSDATQA-T-----S-W-----

V E K AATTEGL S H

G V

E A

QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 357

AAV2 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 356

AAV3-3 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 356

AAV4-4 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 357

AV5 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 347

AAV6 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 357

AAV7 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 358

AAV8 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 359

hu31 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 358

hu32 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 358

AAV9 QRLINNNGWGRPKRLNPKLFNIQKVEVTNDGVTIANNL~~TS~~TVQV~~FD~~SN~~Y~~QLP~~TV~~VLGS 358

SUBS -----M--RAMRV-I-----VQDST-----I-I-S-DE-E--MDA

K S QSE H A S

S

## 【図 6 - 4】

図 6(続き)

--HVR9--

AAV1 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

AAV2 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 584

AAV3-3 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

AAV4-4 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 583

AV5 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

AAV6 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

AAV7 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 586

AAV8 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 587

hu31 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

hu32 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

AAV9 DDEERF~~FP~~SGV~~LM~~IFGKESA--GASNTALD-NVMITDEEIKATNPVATERFQTVAVNQ 585

SUBS LQGSNTYALENTMIFNSQANPGTATYLEGNMLTSESETPQVNRVAVNGGMA~~TNNQ~~

PADEK S QHQLI SESA BASKAAL-NNLM D R NVF TMSN L

DDK NN V TFS AK KTY L A R QG I V N

S I N EI E S S F

N Y R D

--HVR10--

AAV1 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 645

AAV2 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 644

AAV3-3 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 645

AAV4-4 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 643

AV5 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 634

AAV6 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 646

AAV7 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 646

AAV8 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 647

hu31 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 645

hu32 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 645

AAV9 SSSDTPATG~~HA~~MAGALPGMVQDRDYLQGP~~I~~WAKI~~PH~~TDG~~HF~~SP~~LM~~GGFGLK~~HP~~PP 645

SUBS RNSNLTPTVDRITALEAV--S--ME--I-----E-GAH-----AI--L-N--

ASNTA AIADYTHM V N

QGTRD QT NH

Q V L

V

S

--HVR11--

AAV1 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

AAV2 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 704

AAV3-3 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

AAV4-4 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 703

AV5 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 706

AAV6 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

AAV7 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 706

AAV8 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 707

hu31 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

hu32 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

AAV9 QILIKNTPPVPANP~~PAE~~FSAT~~FA~~ST~~IT~~QYSTGQVSVEI~~EW~~ELQKENS~~SK~~RWN~~PE~~QYTSNY 705

SUBS HMM-----G-IAAE-SDVTF-----QMD-~~IK~~-R-----V-----

F SET TAA FA

S PT

V QS

S

## 【図 6 - 5】

図 6(続き)

-----HVR12-----  
AAV1 AKSANUDFTUDHNGLYTEFRPIGTRYLTRPL 736  
AAV2 MKSVNUDEFUTDNGYVSEFRPIGTRYLTRNL 735  
AAV3-3 MKSVNUDEFUTDNGYVSEFRPIGTRYLTRNL 736  
AAV4-4 GQNELNLWFDPAAGKYTEFRPIGTRYLTRNL 734  
AV5 NDQPFUDFAPDSTGEVTEFRPIGTRYLTRNL 724  
AAV6 AKSANUDFTUDHNGLYTEFRPIGTRYLTRNL 736  
AAV7 EKQTGUDFADVDSGCVYSEFRPIGTRYLTRNL 737  
AAV8 YKSTGUDFADVTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL 738  
hu31 YKSNVVEFADVTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL 736  
hu32 YKSNVVEFADVTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL 736  
AAV9 YKSNVVEFADVTEGVYSEFRPIGTRYLTRNL 736  
SUBS GQQVSLNLWTFDAA-K-RIT-A-----HF-  
NDQPF D SSN E T H  
A TG NQ L  
E A T

## 【図 7 - 1】

図 7A-7D

図 7A IgG2 Fc 配列

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAAAGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTPFAVLQSS 60  
GLYSLSSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVBCPPCP APPVAGPSVP 120  
LFPFKPKDIT LMISRTPEVT CVVDVDSQED EVQFNMYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR 180  
VVSVLTVVHQ DMLNGKEYKC KVSNGKLPAE IERTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN 240  
QVSLTCLVKG FYPDSISVEW ESNNGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN 300  
VPSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSP +/- G または GK

図 7B IgG4 Fc

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAAAGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTPFAVLQSS 60  
GLYSLSSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APFLLGGPSV 120  
FLFPFKPKDIT LMISRTPEVT CVVDVDSQED EVQFNMYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 180  
RVSVLTVLH QDMLNGKEYC KVSNGKLPS SIEKTSKAK GQPREPQVYT LPSPQEEMTK 240  
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENNY YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 300  
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSL +/- G または GK

図 7C IgG2 Fc(部分的ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKVECP CAPPVAGPS VFLFPFKPKD TLMISRTPEV 240  
TCVVVDVSH E DPEVQFNWYV DGEVHNAKT KPREBQFNST FRVSVLTVV HQDMLNGKEY 300  
KCKVSNKGLP APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPSPREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDVS 360  
EWESNGQFEM NYKTTTPMLD SDGSPFLYSK LTVDKSRWQK GNVFSCSVMHEA LHNHYTQK 420  
SLSLSP +/- G または GK

図 7D IgG2 Fc(完全ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKVECP CAPPVAGPS VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS 240  
RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPRE QFNSTFRVVS VLVVHQDML 300  
NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCVLKGFYP 360  
SDISVEMESN GQPENNYKTT PMLDSDGSP FLYSLIIVDK SRWQQGNVPS CSVMHEALHN 420  
HYTQKSLSL P +/- G または GK

## 【図 7 - 2】

図 7E-7H

図 7E IgG4 Fc(部分的ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKYGPFC PSCPAPEFLG GPSVFLFPK PKDTLMISRT 240  
PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDMLNG 300  
KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKWESNGQ 360  
PENNYKTTTP VLDSDGSFPL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSL 419  
+/- G または GK

図 7F IgG4 Fc(部分的ヒンジ セリン置換は下線付き)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKESKYG PPSCPAPE FLGGPSVFLF PFKPKDTLMI 240  
SRTPEVTCVV VDVSDQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW 300  
LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 360  
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCVSVMHEALH 420  
NHYTQKSLSL SL +/- G または GK

図 7G IgG4 Fc(完全ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKESKYG PPSPPAPE FLGGPSVFLF PFKPKDTLMI 240  
SRTPEVTCVV VDVSDQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW 300  
LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 360  
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCVSVMHEALH 420  
NHYTQKSLSL SL +/- G または GK

図 7H IgG4 Fc(セリン置換を有する完全ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVI PC RVTSNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKESKYG PPSPPAPE FLGGPSVFLF PFKPKDTLMI 240  
SRTPEVTCVV VDVSDQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW 300  
LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY 360  
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCVSVMHEALH 420  
NHYTQKSLSL SL +/- G または GK

## 【図 8 - 1】

図 8A

ヒト Fit1 細胞外ドメイン配列

MVSYMDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPESLKGQTQ HIMQAGQTLH 50  
LQCRGEAAHK WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTANTAAQN 100  
HTGFYSCKYL AVPTSKKKET ESAIYIFISD TGRPFVEMYS EIEPIIHMT 150  
GRELVIPCRV TSPNITVTLK KFPLDTLIPD GKRIIWSRK GFIIISNATYK 200  
EIGLLTCEAT VNGHLYKTNY LTHRQTNTII DVQLSTPRPV KLRGHTLVLI 250  
NCTATTPLNT RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQNSHAN IFYSVLTIDK 300  
MQNKDKGLYT CRVRSQSPFK SVNTSVHIYD KAPITVKKRK QVLETVAGK 350  
RSYRLSMKV AFPSPEVVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSI IIKDVTEEDA 400  
GNYTLLLSIK QSNVFNKLT TLIVNVKQI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ 450  
LLTCTAYGIP OPTIKWFHP CNHNSSEAR DFCSSNNEEF ILDADSNMGN 500  
RIESITQMA IIEGKNKMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK VGTVGRNISE 550  
YITDVENGPH VNLEKMPTEG EDLKLCTV NKFYLRDVTWI LLRTVNNRTM 600  
HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVLSQD SGTYACRARN VYTGEILQK 650  
KEITIRDQEA FYLLRNLSDH TVAISSTYL DCHANGVPEP QITWPKNNHK 700  
IQQEPGIIIG PGSSSTLFIER VTEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG 750  
TSDKSNLE

1-26 シグナル配列ペプチド

32-123 Ig 様ドメイン 1

151-214 Ig 様ドメイン 2

230-327 Ig 様ドメイン 3

335-421 Ig 様ドメイン 4

428-553 Ig 様ドメイン 5

556-654 Ig 様ドメイン 6

661-747 Ig 様ドメイン 7

## 【 図 8 - 2 】

図 8B

ヒト KDR 細胞外ドメイン配列

MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ 50  
ITCRGQRDLD WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA 100  
YKCFYRETDL ASVIYVYVQD YRSPFIASVS DQHGUVYITE NKNKTWVIPC 150  
LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRLSWD SKKGFTIPSY MISYAGMVFC 200  
BAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSP SHGIELSVGE KLVLNCTART 250  
ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVRDLKTQ SGSEMCKFLS TLTIDGVTRS 300  
DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFSGMESLV EATVGERVRI 350  
PAKYLGYPPP EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL 400  
TNPISKEKQS HVVSLVVYVP PQIGEKSLIS PVDSYQYGTT QTLTCTVYAI 450  
PPPHIHWWY QLEEBECANEP SQAVSVTNPY PCEEWRSVED FQGGNKIEVN 500  
KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC BAVNKVGRGE RVISFHVTRG 550  
PEITLQPDMQ PTEQBSVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGPQP LPIHVGELPT 600  
PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK 650  
KRHCVVRQLT VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPQIMW 700  
FKDNETLVED SGIVLKDGNR NLTIRRVRKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA 750  
FFIEGAQEK TNLE

1-19 シグナル配列

46-110 Ig 様ドメイン 1  
141-207 Ig 様ドメイン 2  
224-320 Ig 様ドメイン 3  
328-414 Ig 様ドメイン 4  
421-548 Ig 様ドメイン 5  
551-660 Ig 様ドメイン 6  
667-753 Ig 様ドメイン 7

## 【 図 8 - 3 】

図 8C-8D

図 8C Flt1 Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT 240  
LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT 300  
IIDVQISTPR PVKLLRGHTL VLNCTATTPL NTRVQMTWSY PDEKNKRASV RRRIDQSNSH 360  
ANIFYSVLTI DKMQNKDKGL YTCRVRSQPS FKSVNTSVHI YDKAFITVK

図 8D KDR Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS 60  
RKGFIIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120  
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180  
GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKPFVAF GSGMESLVEA TVGERVRIPA KYLGYPPEI 240  
KWYKNGIPLE SNHTIKAGHV LTIMEVSERD TGNYTVILTN PISKEKQSHV VSLVYVPPQ 300  
IGEKSLISPV DSYQYGTTQT LTCTVYAIPP PHIIHWYQL EBECANEPSQ AVSVTNPPYC 360  
EEWRSVED FQGGNKIEVNKN QFALIEGKNK TVSTLVIQAA NVSALYKCEA VNKVGRGERV 420  
ISFHVT

## 【 配 列 表 】

2021500071000001.app



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/056343

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K48/00 C12N15/85 C12N15/864 A61K38/17 C07K14/475  
 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)

A61K C12N C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARDING ET AL: "AAV Serotype 8-Mediated Gene Delivery of a Soluble VEGF Receptor to the CNS for the Treatment of Glioblastoma", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, ACADEMIC PRESS ; NATURE PUBLISHING GROUP, US, vol. 13, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 956-966, XP005416312, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2006.02.004	1-4,27
Y	page 957, right-hand column, lines 7-10; figure 1 ----- -/--	7,8, 21-26,29

☒ 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 December 2018

Date of mailing of the international search report

14/01/2019

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

Knudsen, Henrik

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/056343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICHOLAS A. MOORE ET AL: "Gene therapy for age-related macular degeneration", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 17, no. 10, 20 July 2017 (2017-07-20), pages 1235-1244, XP055404429, ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1080/14712598.2017.1356817 page 1239, left-hand column, paragraph 3 page 1239, right-hand column, paragraph 2 -----	5,6,19, 20,23
X	JENNIFER DUMONT ET AL: "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives", CRC CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 36, no. 6, 18 September 2015 (2015-09-18), pages 1110-1122, XP055532666, US ISSN: 0738-8551, DOI: 10.3109/07388551.2015.1084266 abstract -----	9-18,28
A	JEFFREY S. HEIER ET AL: "Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration", OPHTHALMOLOGY, vol. 119, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 2537-2548, XP055138976, ISSN: 0161-6420, DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.09.006 abstract -----	1-28
Y	TZU-FEI WANG ET AL: "Aflibercept in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer", CLINICAL MEDICINE INSIGHTS: ONCOLOGY, vol. 6, 1 January 2012 (2012-01-01), XP055533035, NZL ISSN: 1179-5549, DOI: 10.4137/CMO.S7432 abstract ----- -/--	7,8, 21-26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/056343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTIN LOCK ET AL: "Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale", HUMAN GENE THERAPY, vol. 21, no. 10, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 1259-1271, XP055533316, US ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2010.055 page 1260, right-hand column, last paragraph - page 1261, left-hand column, paragraph 1 -----	29
A	Deniz Dalkara ET AL: "In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous", Science translational medicine, 12 June 2013 (2013-06-12), pages 189ra76-189ra76, XP055533378, United States DOI: 10.1126/scitranslmed.3005708 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/5/189/189ra76.full.pdf">http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/5/189/189ra76.full.pdf</a> [retrieved on 2018-12-12] page 2 -----	6
A	MINH NGUYEN ET AL: "Rapamycin-regulated Control of Antiangiogenic Tumor Therapy Following rAAV-mediated Gene Transfer", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 15, no. 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 912-920, XP055233214, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.sj.6300079 abstract ----- -/--	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/056343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IGARASHI TSUTOMO ET AL: "Adeno-Associated Vector (Type 8) Mediated Expression of Flt-1 Efficiently Inhibits Neovascularization in a Murine Choroidal Neovascularization Model", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, ACADEMIC PRESS ; NATURE PUBLISHING GROUP, US Molecular Therapy, vol. 17, no. Supplement 1, 751, 1 May 2009 (2009-05-01), page S287, XP008183816, ISSN: 1525-0016 Retrieved from the Internet: URL:http://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/pdf/S1525-0016%2816%2939111-0.pdf [retrieved on 2018-12-12] abstract	5,6,23
A	----- CN 103 304 668 A (JIANGSU JIANDE BIOLOG PHARMACEUTICAL CO LTD) 18 September 2013 (2013-09-18) example 3	28
X,P	----- WO 2018/160686 A1 (ADVERUM BIOTECHNOLOGIES INC [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) paragraphs [0009], [0182]; claims 1,17 -----	1-8, 19-26

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/056343

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 103304668	A	18-09-2013	NONE	
-----				
WO 2018160686	A1	07-09-2018	NONE	
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 7/02 (2006.01)	C 1 2 N 7/02	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	

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

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ダノス, オリビエ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 2 8, ニューヨーク, レキシントン アベニュー 1 3 4 9, アpartment 4 ジー

(72)発明者 ウー, チューチュン

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 8, ノース ボトムマック, ソフト ウィンド ドライブ 1 4 7 1 6

(72)発明者 ゲルナー, フランツ

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 7 7 3, マイヤーズビル, プレザリン チャーチ ロード 3 5 4 6

(72)発明者 ヴァン エベレン, シェリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 2 5, メンロー パーク, ポールソン サークル 8 2 3

F ターム(参考) 4B064 AG13 AG20 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01

DA05

4B065 AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24

CA25 CA44

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 DB52 NA14 ZA331 ZB261

【要約の続き】

【選択図】図 5 - 1