

(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 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	4 B 06 4
C 12 N 15/12 (2006.01)	C 12 N 15/12	Z N A 4 B 06 5
C 12 N 15/35 (2006.01)	C 12 N 15/35	4 C 08 4
C 12 N 15/864 (2006.01)	C 12 N 15/864	1 O O Z
C 12 N 7/01 (2006.01)	C 12 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 リジェネックスバイオ インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成30年10月17日 (2018.10.17)		アメリカ合衆国 メリーランド州 20850, ロックビル, ブラックウェル ロード 9600, スイート 210
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月11日 (2020.6.11)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/056343	(74) 代理人	100103182 弁理士 日野 真美
(87) 國際公開番号	W02019/079494	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 國際公開日	平成31年4月25日 (2019.4.25)	(74) 代理人	100196966 弁理士 植田 渉
(31) 優先権主張番号	62/574, 038		
(32) 優先日	平成29年10月18日 (2017.10.18)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

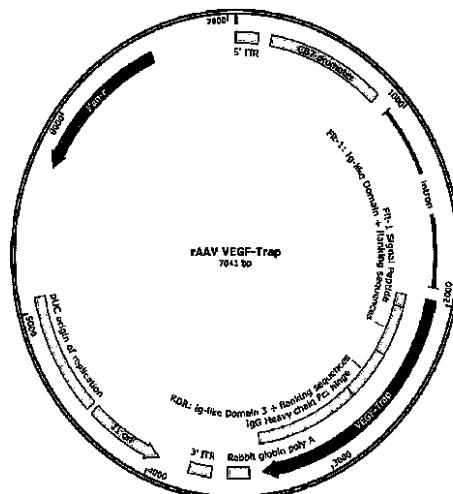
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト翻訳後修飾 V E G F - T R A P 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 (A M D) または新血管形成に関連した状態もしくはがん、例えば転移大腸がんと診断され、治療的m A bによる処置が適応となつたヒト対象への、完全ヒト翻訳後修飾 (H u P T M) 治療的V E G F - T r a p (V E G F - T r a p ^{H u P T M}) 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、V E G F - T r a p ^{H u P T M} 、すなわち、ヒトグリコシリ化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患者の組織または臓器に形成するために、V E G F - T r a p ^{H u P T M} をコードするウイルスベクター、好ましくはA A V 8 または変異体A A V . 7 m 8 、または他のD N A 発現構築物を、V E G F - T r a p 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V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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) が隣接する発現力セットを含む発現構築物であって、前記発現力セットは、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 ^H _u ^P _T ^M 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 ^H _u ^P _T ^M 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 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 が隣接する発現力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、前記発現力セットは、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 ^H _u ^P _T ^M 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 ^H _u ^P _T ^M 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 11) と少なくとも 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

I T R が隣接する発現力セットを含むウイルスゲノムであって、前記発現力セットは、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 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

A A V I T R が隣接する発現力セットを含むウイルスゲノムであって、前記発現力セットは、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 95 % 同一であるウイルスカプシド；および

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

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^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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 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有するVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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 23】

前記VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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、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、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^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} を単離することとを含む方法。

【請求項 29】

組換え A A V を生成する方法であって、

(a)

(i) A A V I T R 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、V E G F - T r a p をコードする導入遺伝子を含む、人工ゲノム；

10

(i i) 培養において宿主細胞における A A V r e p 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 A A V r e p およびカプシドタンパク質をコードし、トランスに前記 r e p および c a p タンパク質を供給する、A A V I T R を欠いているトランス発現カセット；

(i i i) 前記 A A V 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有する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 A A V を細胞培養から回収することとを含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出され、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 A S C I I コピーは、26115_105002_S L . t x t と名付けられ、サイズは 197,438 バイトである。

30

【0002】

本発明は、例えば滲出型加齢性黄斑変性症（「W A M D」）、加齢性黄斑変性症（「A M D」）、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮水腫（D M E）、網膜中心静脈閉塞（R V O）、病的近視およびポリー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（H u P T M）V E G F - T r a p (V E G F - T r a p ^{H u P T M}) 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} の送達のための組成物および方法も提供される。

【背景技術】

【0003】

加齢性黄斑変性症（A M D）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（V A）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の中の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（n A M D）としても知られる、A M D の「進出型」新生血管の形態（W A M D）は、A M D 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チ

50

ヤの歪みおよび破壊につながる。W A M D 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。W A M D 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、W A M D 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（「V E G F」）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（「I V T」）注射が含まれる。使用されるV E G F 阻害剤（「抗V E G F」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V E G F F a b タンパク質）；適応外ベバシズマブ（C H O 細胞で生成されるV E G F に対するヒト化モノクローナル抗体（m A b））；またはアフリベルセプト（ヒトI g G₁ のF c 部分に融合させたヒトV E G F 受容体の細胞外ドメインのV E G F 結合領域からなる組換え融合タンパク質；「V E G F - T r a p」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W A M D 患者において平均して最も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

30

【0006】

頻繁なI V T 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V E G F - t r a p、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。

40

【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」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^{H u P T M}) 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（導入遺伝子として）V E G F - T r a p タンパク質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^{H u P T M} 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

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 (E Y L E A (登録商標)) に応答するもの：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。

【 0 0 0 9 】

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 ^{H u P T M} 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 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。

10

【 0 0 1 0 】

導入遺伝子によってコードされる V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 とも呼ばれる) 、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 ^{H u P T M} 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 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 領域もしくは I g 様ドメインが I g G 1 F c ドメインを置換している。

20

【 0 0 1 1 】

ある特定の態様では、ヒト網膜細胞における 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 V E G F - T r a p 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 (「 r A A V 」) 、特に A A V 8 カプシドを有するものが含まれ得、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 ^{H u P T M} 導入遺伝子は、適切な発現制御エレメント、例えば、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

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T B G (チロキシン結合性グロブリン)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) プロモーターもしくはM I R 1 2 2 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、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、H I F 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 - W A S P 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Tsuchiya, 1993, J. Biochem. 113 :395を、およびN - W A S P プロモーターの開示のために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 / 1 8 3 1 7号パンフレット、国際公開第96 / 2 0 9 5 1号パンフレット、国際公開第96 / 4 1 8 6 5号パンフレット、国際公開第99 / 1 0 5 0 8号パンフレット、国際公開第99 / 1 0 5 1 0号パンフレット、国際公開第99 / 3 6 5 5 3号パンフレットおよび国際公開第99 / 4 1 2 5 8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)。

【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(M V M)イントロン、ヒト第I X 因子イントロン(例えば、F I X 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、S V 4 0 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 / I g G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(h G H)ポリAシグナル、S V 4 0 後期ポリAシグナル、合成ポリA(S P A)シグナルおよびウシ成長ホルモン(b G H)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(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ープ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

10

20

30

40

50

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^{HuPTM}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^{HuPTM}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

【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^{HuPTM}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^{HuPTM}は、目の中での安定性を維持しつつ、全身循環中のVEGF-Trap^{HuPTM}の半減期を低減してもよい、IgG1Fc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。IgG1Fcドメインを含まないVEGF-Trap^{HuPTM}（FcなしのまたはFc（-）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^{HuPTM}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）を含有してもよいか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^{HuPTM}はタンパク質のC末端のIgG1Fc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、KDKTHT（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KDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL（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。
20

【0016】

あるいは、他の実施形態では、VEGF-Trap^{HuPTM}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、IgG1Fc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^{HuPTM}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IgG1Fcドメインを含むVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}アミノ酸配列が、図3に提供される。
30

【0017】

代替的な実施形態では、VEGF-Trap^{HuPTM}は、それが全身循環に侵入するとVEGF-Trap^{HuPTM}の半減期を低減しつつ目におけるVEGF-Trap^{HuPTM}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、IgG1Fc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^{HuPTM}は、IgG1ドメインを図7AおよびBにそれぞれ示すIgG2FcまたはIgG4Fc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^{HuPTM}は、IgG1Fcドメインを、F1t-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F1t1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、F1t1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F1t1 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^{HuPTM}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、F1t-1のもの、すなわちMVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSG（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MQSKVLLAVALWLCVETRA（配列番号37）、あるいは、好ましい実施形態では、MYRMQLLLLIALSALVTNS（配列番号38）（図2）またはMRMQLLLIALSALVTNS（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^{HuPTM}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。

40

【0021】

具体的な実施形態では、リンカーとして、(GP)_n（配列番号40）もしくは(AP)_n（配列番号41）もしくは(EAAAK)₃（配列番号42）などの強固なリンカー、または(GGGGS)_n（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、F1t-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、IgG1Fcドメインなしの（しかし、IgG1Fc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)

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 1 t 1 Ig 様ドメイン2-KDR-Ig 様ドメイン3+リンカー+F 1 t - 1 Ig 様ドメイン2-KDR(Ig 様ドメイン3)。あるいは、構築物は、FcなしのVEGF-Trap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IRES配列を有するFcなしのVEGF-Trap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。

【0022】

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VEGF-Trap^{HuPTM}をコードするスクレオチド配列。

10

【0023】

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VEGF-Trap^{HuPTM}をコードするスクレオチド配列。

20

【0024】

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、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって生成されるVEGF-Trap^{HuPTM}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

【0025】

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VEGF-Trap^{HuPTM}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

【0026】

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^{HuPTM}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。

【0027】

本明細書に記載される方法のある特定の態様では、VEGF-Trap^{HuPTM}は、図1、図2、図3、図4、図7C、図7D、図7E、図7F、図7G、図7H、図8Cまたは図8D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

【0028】

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、前記ヒト対象の目にVEGF-Trap^{HuPTM}の治療有効量を送達することを含み、前記VEGF-Trap^{HuPTM}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。

【0029】

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

50

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、前記ヒト対象の目にグリコシル化 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 は Neu G c (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。

【 0 0 3 0 】

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、前記ヒト対象の目にグリコシル化 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 は - G a 1 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

【 0 0 3 1 】

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、前記ヒト対象の目にグリコシル化 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 は Neu G c も - G a 1 も含有しない、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 3 2 】

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中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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

【 0 0 3 3 】

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中の網膜下空間に、または硝子体内もしくは脈絡膜上に、 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 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、 Neu G c および / または - G a 1 を含有しない、方法が本明細書に記載される。

30

【 0 0 3 4 】

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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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。

【 0 0 3 5 】

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 Neu G c および / または - G a 1 を含有しない V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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

【 0 0 3 6 】

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 ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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 3 7 】

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 ^H u P T M 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 ^H u P T M 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。

【0038】

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 ^H u P T M 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 ^H u P T M は - G a 1 を含有しない、方法が本明細書に記載される。

【0039】

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 ^H u P T M 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 ^H u P T M は N e u G c も - G a 1 も含有しない、方法が本明細書に記載される。

【0040】

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、前記ヒト対象の肝臓に V E G F - T r a p ^H u P T M 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 ^H u P T M 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。

【0041】

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、前記ヒト対象の肝臓に V E G F - T r a p ^H u P T M 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 ^H u P T M 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 や - G a 1 を含有しない、方法が本明細書に記載される。

【0042】

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 ^H u P T M 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）。

【0043】

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 ^H u P T M は、チロシン硫酸化をさらに含む。

【0044】

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有する前記 V E G F - T r a p ^H u P T M 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 ^H u P T M を発現させることによって確認される。

【0045】

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有する前記 V E G F - T r a p ^H u P T M 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。

【0046】

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 ^H u P T M 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。

【0047】

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

10

20

30

40

50

アリル化グリカンを含有する V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 P E R . C 6 または R P E 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有する前記 V E G F - T r a p ^{H u P T M} の生成をもたらす、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 4 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、V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} はグリコシル化されるが N e u G c を含有せず；前記組換えベクターは、培養において P E R . C 6 または R P E 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 N e u G c および / または - G a l を含有しない前記 V E G F - T r a p ^{H u P T M} の生成をもたらす、方法が本明細書に記載される。

【 0 0 4 9 】

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。

【 0 0 5 0 】

そのような遺伝子療法を投与する対象は、抗 V E G F 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、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ープ様脈絡膜脈管障害と診断され、V E G F - T r a p タンパク質または他の抗 V E G F 効果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含む。より具体的な実施形態では、患者は、V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p 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、ラニビズマブによって以前に処置されており、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、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。

【 0 0 5 1 】

そのようなウイルスベクターまたは他の D N A 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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} に応答性であるべきである。応答性を判定するために、V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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。

【 0 0 5 2 】

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 V E G F 効果、特に V E G F - T r a p 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含む。より具体的な実施形態では、患者は、V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 V E G F - T r a p 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、ラニビズマブによって以前

10

20

30

40

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^H H^{u P T M}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^H H^{u P T M}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F1t-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^H H^{u P T M}）。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NeuGc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、0.1mL～0.5mL、好ましくは0.1～0.25mL（100～250μl）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0.33μg/mL～約1.32μg/mL、または眼房水（前眼房）において約0.11μg/mL～約0.44μg/mLのC_{min}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6.60μg/mLの範囲内および最高約26.40μg/mLの導入遺伝子生成物の硝子体C_{min}濃度、ならびに/または約0.567～約2.20μg/mLの範囲内および最高8.80μg/mLの眼房水C_{min}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10pg/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4mg/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_{min}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

【0057】

本発明は、経時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。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「生物学的に優れたもの」である。

10

【0058】

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有する可能性が低い。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

【0059】

本発明は、以下の原理に一部基づく：

30

(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）。

(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.proteintlas.org/humanproteome/liver>；こ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）。VEGFAのみに結合するラニビ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^{HuPTM}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^{HuPTM}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GalNAc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Gal-1抗体と反応する免疫原性グリカン、Gal-1抗原を生成することもできる。例えば、Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 153-156を参照されたい。本発明のVEGF-Trap^{HuPTM}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、参考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でき。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

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 V E G F - T r a p タンパク質に別の利点を付与する。

(v i i i) V E G F - T r a p ^{H u p T M} 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 V E G F - T r a p 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 F c 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 F c R n 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、ラニビズマブ（F a b）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 V E G F 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 V E G F の全てのアイソフォームならびに P L G F に結合するので、F c R N 結合部位を無効にすることによって F c 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 F c 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。F c 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。

10

20

30

40

50

【0060】

前述の理由で、V E G F - T r a p ^{H u p T M} 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 Neu 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ープ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 V E G F - T r a p ^{H u p T M} 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ープ様脈絡膜脈管障害の処置のための「生物学的に優れた」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、V E G F - T r a p ^{H u p T M} 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 Neu 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 ^{H u p T M} 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、V E G F - T r a p ^{H u p T M} 糖タンパク質は、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、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ープ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^{HuPTM}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

【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^{HuPTM}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^{HuPTM}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。
20

【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。
30

【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。
40

【0066】

他の利用可能な処置の送達を伴う目/網膜へのVEGF-Trap^{HuPTM}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
50

、糖尿病性網膜症、D M E 、c R V O 、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V E G F 剤による硝子体内（I V T ）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（F O L F I R I ）もしくはフォリン酸（ロイコボリン、F A ）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（5 F U ）、および／またはオキサリップラチン（F O L F O X ）、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V E G F 剤による静脈内投与が、限定されずに含まれる。

10

(0 0 6 7)

VEGF-Trap導入遺伝子およびVEGF-Trap^{HuPTM}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。具体的な実施形態では、AAV逆方向末端反復配列(ITS)が隣接する発現力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導入遺伝子を含有するAAV8ウイルスベクターを作製するための方法であって、発現力セットは、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^{HuPTM}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

〔 0 0 6 8 〕

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^{HuPTM} 構築物を記載する、下の実施例において例示される。

[0 0 6 9]

3.1. 例示的在塞施形態

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-Traph^H uPTM 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V_E G_E - Trap^H U_P T^M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 V E G F - T r a p ^{H u P T M} をコードする配列番号 2 または 3 の又
クレオモド配列を含む 項 1 ~ 3 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

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 ~ 5 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

モーターである、項7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。

58

るウイルスカプシド；およびAAV-ITRが隣接する発現力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（AAV）ベクターであって、発現力セットは、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^{HuPTM}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7C～7Hまたは図8C～8Dに示すアミノ酸配列を有するVEGF-Trap^{HuPTM}をコードする、項11のAAV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AAVベクター。

14. VEGF-Trap^{HuPTM}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AAV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AAVベクター。

16. 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11～15のいずれかのAAV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AAV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バマイシン誘導性プロモーターである、項17のAAVベクター。

19. AAV-ITRがAAV2-ITRである、項11～18のいずれかのAAV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、

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-ITRが隣接する発現力セットを含むウイルスゲノムであって、発現力セットは、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、

ここで、前記AAV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、

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-ITRが隣接する発現力セットを含むウイルスゲノムであって、発現力セットは、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。

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、

AAV-7m8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

AAV-ITRが隣接する発現力セットを含むウイルスゲノムであって、発現力セット

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^{HuPTM}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バ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、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって生成されるVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}の治療有効量を送達することを含む方法。

34. VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}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F1t-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. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ の治療有効量を送達することを含む方法。 10

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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ の治療有効量を送達することを含む方法。

45. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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。 20

46. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ が2,6-シアリル化グリカンおよびチロシン硫酸化を含有し、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. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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。 30

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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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 $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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 $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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。 30

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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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 $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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有する $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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 $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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。 40

52. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ が2,6-シアリル化グリカンおよびチロシン硫酸化を含有し、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. $\text{VEGF-Trap}^{\text{HuPTM}}$ 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。 50

55. 組換えヌクレオチド発現ベクターが VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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。 10

59. チロシン硫酸化を含有する前記VEGF-Trap^{HuPTM}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； 20

(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^{HuPTM}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。 30

62. VEGF-Trap^{HuPTM}を製造する方法であって、ヒト網膜細胞においてVEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}を単離することを含む方法。 40

【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関するシステインは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）、IgG1Fc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関するシステインは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）、IgG1Fc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関するシステインは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）、IgG1Fc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関するシステインは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））、KDKTHTCPGPCPA（配列番号33）またはKDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFL（配列番号34）、またはKDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFL（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 420 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^{H u P T M} 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^{H u P T M} の 2 つのコピーの発現に関する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^{H u P T M} 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 10；A A V 8 は配列番号 11；h u 3 1 は配列番号 12；h u 3 2 は配列番号 13；および A A V 9 は配列番号 14 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 19）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 20）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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 21）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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 22）の図。C ~ D において、F 1 t 1 配列は 1 ~ 102 位のオレンジ色テキストであり、K D R 配列は 103 ~ 205 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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 23）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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 24）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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 25）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^{H u P T M} のアミノ酸配列（配列番号 26）の図。E ~ H において、F 1 t 1 配列は 1 ~ 102 位のオレンジ色テキストであり、K D R 配列は 103 ~ 205 位の青色テキストである。

【図 8 - 1】(A) ヒト F 1 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 27）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 Ig 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 F1t-1 Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap^{HuPTM} 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 KDR Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap^{HuPTM} 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、KDR 配列の Ig 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」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^{HuPTM}) 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 VEGF-Trap 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 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^{HuPTM} 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 VEGF-Trap^{HuPTM} 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、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。

【0074】

導入遺伝子によってコードされる VEGF-Trap^{HuPTM} は、（アミノからカルボキシ末端にかけて）：（i）F1t-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 IgG Fc 領域、特に IgG1 Fc 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^{HuPTM} 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 F1t-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 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

10

20

30

40

50

しくは Ig 様ドメインが IgG1 Fc 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隨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。

【 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）。

【 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）、病的近视またはポリープ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^{HuPTM} 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。

【 0078 】

VEGF-Trap^{HuPTM} 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、F1t-1 のもの、MVSYWDTGVLCLCALLSCCLLTGSSSG（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、MQSKVLLAVALWLCVETRA（配列番号 37）、あるいは、好ましい実施形態では、MYRMQLLLIALSLALVTNS（配列番号 38）または MRMQLLLIALS LALVTNS（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。

【 0079 】

具体的な実施形態では、VEGF-Trap^{HuPTM} 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）、病的近视またはポリープ様脈絡

10

20

30

40

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^{HuPTM}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^{HuPTM}は、VEGF-Trap^{HuPTM}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、患者の目に前記VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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^{HuPTM}は、VEGF-Trap^{HuPTM}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、がんと診断された患者に前記VEGF-Trap^{HuPTM}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、AMD、糖尿病性網膜症、DME、cRVO、病的近視もしくはポリー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】

30

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F1t-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^{HuPTM}）。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。

40

【0084】

50

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阻害剤の高用量ボー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

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VEGF-Trap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VEGF-Trap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VEGF-Trapと比較して「生物学的に優れたもの」である。

【0085】

VEGF-Trap^{HuPTM}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ープ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VEGF-Trap^{HuPTM}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ープ様脈絡膜脈管障害の処置のための「生物学的に優れた」分子をもたらすべきである。さらに、VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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と診断された患者（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「生物学的に優れた」分子をもたらすべきである。

10

20

30

40

【0086】

遺伝子療法の代わりに、またはさらなる処置として、VEGF-Trap^{HuPTM}糖タンパク質を組換え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、糖タンパク質は、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投与することができる。

【0087】

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るべきである。ある特定の実施形態では、VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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。

【0088】

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VEGF-Trap^{HuPTM}による処置方法も提供される。

50

【0089】

VEGF - Trap導入遺伝子およびVEGF - Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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F1t-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^{HuPTM}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であってもよいか、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F1t-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FcRn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。

10

20

20

【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 Vitr 2:3)をコードすることができる。

30

40

【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F1t-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

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、EMBOSSのウェブベースのトランスレータ（http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/）、または、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スクレオチド配列（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/uでもない）；「n」はa、g、c、t/u、未知、または他である。

【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） 配列番号：1	<pre> SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI 50 PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT 100 IIDVVLSPSH GIELSVGEKL VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL 150 VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV 200 RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD 250 VSHEDEPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAQGPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL 350 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS 400 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP +/- G または GK </pre>
アフリベルセプトをコードするコドン最適化スクレオチド配列（リーダーはイタリック体） 配列番号：2	<pre> atgtacagaa tgcagctgct gctgctgatc gcccgtggc tggccctgg 50 gaccaacacg agcgacaccg gcagaccctt cgtggagatg tacagcgaga 100 tccccgagat catccacatg accgaggca gagagctggatccctgc 150 agagtgacca gccccacat caccgtgacc ctgaaagaatgttccctgg 200 caccctgatc cccgacggca agagaatcat ctgggacagc agaaagggt 250 tcatcatcg caacgcacc tacaaggaga tcggcctgt gacctgcgag 300 gccaccgtga acggccacccgtatacaagacc aactacatgt aaccacac 350 gaccaacacc atcatcgacg tgggtctgatcccgccac ggcacatcgac 400 tgagcgtggcgagaagctgtgtctgactgcaccgcac aaccgagctg 450 aacgtggca tcgacttcaa ctgggagatcccgacagca agcaccac 500 caagaagctgtgtacccatccatcgacg acctgaagac ccagagccgc agcgagatga 550 agaagttccctgaggccctgaccatcgacg gctgtgaccatg aacgaccac 600 ggcctgtaca cctgcggccgc cagcagccgc ctgatgacca agaagaac 650 caccttcgtg agagtgcacg agaaggacaa gaccacacc ttccccccct 700 gccccggccccc ctagctgtggccggccgc gctgttccctt gttcccccc 750 aagcccaagg acaccctgtat gatcagcaga acccccgagg tgacctgt 800 gggtgggtggac gtgagccacg aggacccca ggtgaagtt aactggatc 850 tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagccac agaggagcag 900 tacaacagca cctacagatgttggccggccgc gctgttccctt gttcccccc 950 ctggctgtacccatccatcgacg acaccctgtcccgccgc gacatcgcc 1000 ccggcccccgtatccatcgacg atcagcaagg ccaaggccac gcccagag 1050 ccccagggtgt acaccctgtcccgccgc gacatcgcc gcaagaac 1100 ggtgagccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccgac gacatcgcc 1150 tggagttggac gagcaacccgc cagcccgaga acaactacaa gaccac 1200 cccgctgtgg acagcgacgg cagtttccctt ctgtacagca agctgaccgt 1250 ggacaagac agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgtatc 1300 acgaggccctt gcacaaccac tacacccaga agagcctgag cctgagcccc 1350 +/- ggc または ggc aag </pre>

10

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)	<code>atgtaymgna tgcarytnyt nytnytnath gcnytnwsny tngcnytngt nacnaaywsn wsngayacng gnmgnccntt ygtngaratg taywsngara thccngarat hathcayatg acngarggnm gngarytnyt nathccntgy mnngtnacnw snccnaayat hacngtnacn ytnaaraart tyccnytna yacnytnath ccngaygna armgnathat htggaywsn mgnnaarggnt tyathathws naaygcacn tayaargara thggnytnyt nacntgygar gcnacngtna ayggncayyt ntayaarach aaytayytna cncaymgnca racnaayacn athathgayg tngtnytnws ncenwsncay ggnathgary tnwsngtng ngaraarytn gtnytnaayt gyacngcnmg nacngarytn aaygtnggna thgayttya ytggartay ccnwsnwsna arcaycarca yaaraarytn gtynaaymng ayytnaarac ncarwsnggn wsngaratga araarttyyt nwsnacnytn acnathgayg gngtnacnmg nwsngaycar ggnytnataya cntgygcngc nwsnwsnggn ytnatgacna araaraayws nacnttygtm mnngtnacng araaargayaa racnacayacn tgyccnccnt gycncngcncc ngarytnyt ggnngnccnw sngtnttyyt nttyccnccn aarcnacnacn araaargayaa gathwsnmgn acnccnmg tnacntgygt ngtngtngay gtnwsncayg argayccnga rgttnaartt aaytggayg tngayggngt ngargtnacn aaygcnara cnaarcnmg ngargarcar tayaaywsna cntaymngt ngtwsngtn ytnacngtn tncaycarga ytggtytnaay ggnnaargart ayaartgyaa rgtwsnaay aargcnytnc cngcnccnat hgaraarach athwsnaarg cnaarggnca rccnmngar cncnargntn araaargayaa nccnwsnmgn gaygarytna cnaaraayca rgtwsnaytn acntrggtng tnaarggntt ytayccnwsn gayathgcn tngartggg rwsnaayggn carccngara ayaaytaya racnacnccn ccngtnytnaaywsgaygg nwsnttyt ytnaywsna artnacngt ngayaarwsn mnntggcarc arggnaaygt nttywsntgy wsngtnatgc aygargchyt ncayaaycay tayacnacara arwsnaytnws nytnwsnccn +/- ggn または ggn aan</code>
---	---

10

20

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F1t-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、IgG1Fcドメインはアミノ酸206～431であり、IgG1Fcヒンジ領域はアミノ酸206～222である。図1は、N末端にF1t-1リーダー配列、MVSYWDTGVLCA LLSCLLTGSSSG(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、MQSKVLLAVALWLCVETRA(配列番号37)、あるいはMRMQLLLIALSLLALVNTS(配列番号39)、異種リーダー配列、またはMYRMQLLLIALSLLALVNTS(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^{HuPTM}の発現ならびに適切な翻訳後プロセ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^{HuPTM}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「F c なしの」またはF c (-) V E G F - T r a p 導入遺伝子は、2つの「F c なしの」 V E G F - T r a p 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F c、例えばC末端のリジン(- K)もしくはグリシン-リジン(- G K)欠失を有するトランケーションされたF c、またはF c R n 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 V E G F 効果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F c を有する V E G F - T r a p 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F c 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

【0098】
一実施形態では、V E G F - T r a p 変異体は、改変されたI g G 1 F c 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I g G 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I g G 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I g G 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、V E G F - T r a p のF c のC末端のリジン(- K)またはグリシン-リジン(- G K)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、F c 改変は、F c R n 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、I g G 1 重鎖における位置の通常の番号付けを使用して、I 2 5 3、H 3 1 0 および/またはH 4 3 5 の突然変異が含まれ、より具体的にはI 2 5 3 A、H 3 1 0 A および/またはH 4 3 5 QもしくはH 4 3 5 Aが含まれる。これらの位置は、図1のV E G F - T r a p^{H u P T} MにおけるI 2 3 8、H 2 9 5 およびH 4 2 0 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I g G 1 F c ドメインを含むV E G F - T r a p^{H u P T} M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V E G F - T r a p 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、V E G F - T r a p^{H u P T} Mは、突然変異I 2 3 8 A、H 2 9 5 A およびH 4 3 5 QまたはH 4 2 0 A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V E G F - T r a p^{H u P T} Mアミノ酸配列が、図3に提供される。

50

【0099】

ある特定の実施形態では、V E G F - T r a p^{H u P T} Mは、I g G 1 F c 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、V E G F - T r a p^{H u P T} Mは、I g G 1 F c ドメインを含まず、さらに、K D R 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、V E G F - T r a p^{H u P T} Mはタンパク質のC末端のI g G 1 F c 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、D K T H T (配列番号44)もしくはD K T H L (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V E G F - t r a p をもたらす；または、D K T H T C P P C P A（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V E G F - T r a p をもたらす；または、D K T H T C P P C P A P E L L G G（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V E G F - T r a p をもたらす；または、D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L（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V E G F - T r a p をもたらす（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有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F cなしのまたはF c（-）V E G F - T r a p 導入遺伝子は、V E G F - T r a p 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。F cなしの導入遺伝子は、例えばA A V 8 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。

10

【0100】

代替的な実施形態では、V E G F - T r a p ^{H u P T M}は、それが全身循環に侵入するとV E G F - T r a p ^{H u P T M}の半減期を低減しつつ、目におけるV E G F - T r a p ^{H u P T M}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、I g G 1 F cドメインを置換するF c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、V E G F - T r a p ^{H u P T M}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I g G 2 F cまたはI g G 4 F cドメインを含む代替のF c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F c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つまたは複数が、例えばI g G 4 F c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）。I g G 2またはI g G 4 F c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。

20

【0101】

他の代替的な実施形態では、V E G F - T r a p ^{H u P T M}は、I g G 1 F cドメインを、ヒトF 1 t - 1またはヒトK D RのI g様ドメインの、またはその組合せの1つもしくは複数が置換している。ヒトF 1 t - 1およびヒトK D R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、I g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F 1 t 1のI g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I g様ドメイン2および3；または、ヒトK D RのI g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。具体的な実施形態では、導入遺伝子生成物は、K D R I g様ドメイン3、4および5ならびにF 1 t 1 I g様ドメイン2を有するC末端ドメインを有する。

30

【0102】

配列番号1のI g G 1 F c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I g G 1 F cドメインを置換したF 1 t - 1および/またはK D R I g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。

40

【0103】

【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	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAPLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV <u>ER</u> 100 <u>KCCVECP</u> <u>PPCP</u> APPVAGPSVF LFPFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVVDVSHE <u>DP</u> 150 EVQFNWYV <u>DG</u> VEVHNAKTPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC 200 KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREFQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG 250 FYP <u>SDIS</u> VEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS 300 VFSCSVMHEA LHNHYTQ <u>KSL</u> SLS <u>P</u> +/- 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>PPCP</u> <u>PAPP</u> VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ 50 FNWYV <u>DG</u> VEV HNAKTPREEQFNSTFR VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS 100 NKGLPAPIEK TIS <u>TK</u> KGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP 150 SDISVEWESN GQPENNYKTT PPMLSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS 200 CSVMHEALHN HYTQ <u>KSL</u> SLS 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>ER</u> <u>KCCVECP</u> <u>PP</u> CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVV DVSHEDPEVQ 50 DPEVQFNWYV DGVEVHNAKTPREEQFNSTFR VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS 100 KCKVSNKGLP APIEK <u>TS</u> TKKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP 150 KGFY <u>PSDI</u> EW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS 200 GNVFSCSVMHEA EALHNHYTQ <u>K</u> SLS <u>LSP</u> +/- G または GK
IgG4 Fc 配列	20	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAPLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV <u>ES</u> 100 <u>KY</u> <u>GPPCP</u> <u>SCP</u> APEFLGGPSV LFPFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVVDVSQEDP 150 PEVQFNWYV <u>DG</u> VEVHNAKTPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 200 CKVSNKGLPS SIEKTISKAKG QPREFQVYTL PPSQEEEMTKN QVSLTCLVKG 250 GFY <u>PSDI</u> AVEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYSRL TVDKSRWQEG 300 NVFSCSVMHEA ALHNHYTQ <u>K</u> SLS <u>L</u> +/- G または GK
IgG4 Fc 領域 部分的ヒンジ	51	<u>Y</u> <u>GPPCP</u> <u>SCPA</u> PEFLGGPSV LFPFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVVDVSQEDP 50 EVQFNWYV <u>DG</u> VEVHNAKTPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 100 KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREFQVYTL PPSQEEEMTKN QVSLTCLVKG 150 FYP <u>PSDI</u> AVEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYSRLT VDKSRWQEG 200 VFSCSVMHEA LHNHYTQ <u>KSL</u> SLS +/- G または GK
置換を有する IgG4 Fc 部分的 ヒンジ領域	52	<u>Y</u> <u>GPPSPSSPA</u> PEFLGGPSV LFPFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVVDVSQEDP 50 EVQFNWYV <u>DG</u> VEVHNAKTPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC 100 KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREFQVYTL PPSQEEEMTKN QVSLTCLVKG 150 FYP <u>PSDI</u> AVEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYSRLT VDKSRWQEG 200 VFSCSVMHEA LHNHYTQ <u>KSL</u> SLS +/- G または GK
完全ヒンジ領域 を有する IgG4 Fc	53	<u>E</u> <u>SKY</u> <u>GPPCP</u> <u>PSA</u> CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVV DVSQ 50 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE 100 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEEM TKNQVSLTCL 150 VKGFY <u>PSDI</u> AVEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYS RLTVDKSRWQ 200 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSL <u>L</u> +/- 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>E</u> <u>SKY</u> <u>GPPSPS</u> <u>PSA</u> CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVV DVSQ 50 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE 100 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEEM TKNQVSLTCL 150 VKGFY <u>PSDI</u> AVEW ESNQOPENNY KTT <u>PPML</u> SDGSF FLYS RLTVDKSRWQ 200 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSL <u>L</u> +/- G または GK

IgG1 Fc ドメインの 代替物	配列 番号	アミノ酸配列
Flt-1 ドメイン (図 8A の Flt-1 のアミノ酸 134~347)	55	PFVEMYSEIP EIIHMTEGRE LVIPCRVTSP NITVTLKKFP LDTLIPDGKR 50 IIWDSRKGFI ISNATYKEIG LLTCEATVNG HLYKTNYLTH RQTNTIIDVQ 100 ISTPRPVKLL RGHTLVLNCT ATTPLNTRVQ MTWSYPDEKN KRASVRRRID 150 QSNISHANIFY SVLTIDKMQN KDKGLYTCRV RSGPSFKSVN TSVHIYDKAF 200 ITVK
KDR ドメイン (図 8A の アミノ酸 328~548)	56	PFVAFGSGME SLVEATVGER VRIPAKYLGY PPPEIKWYKN GIPLESNHT 50 IKAGHVLTIM EVSERDTGNY TVILTNPISK EKQSHVVSLV VYVPPQIGE 100 KSLISPVD SY QYGTTQTLTC TVYAI PPPHH IHWYWQLEEE CANEPSQAV 150 SVTNPYPCEE WRSVDFQGG NKIEVNKNQF ALIEGKNKTV STLVIQAA 200 VSALYKCEAV NKVGRGERVI SFHVT

10

20

30

40

50

【 0 1 0 4 】

5 . 2 V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 8 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 ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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 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）、 - 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。

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、リポソーム、他の脂質含有複合体、他の巨大分子複合体、合成改变mRNA、未改变の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^{HuPTM}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、オプシンプロモーター、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、SERPIN A1（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、ポックスウイルス、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、マウス白血病ウイルス（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8kb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 r e p 遺伝子（複製のために必要とされる）および／またはAAV c a p 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、r e p またはc a p 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、AAV r h 20またはAAV r h 10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、AAV r h 20またはAAV r h 10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、Annc80またはAnnc80L65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

8517号明細書；および同第9, 587, 282号明細書、ならびに米国特許出願公開第2016/0376323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：LGETTRP（配列番号57）またはLALGETTRP（配列番号58）。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AAV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, 193, 956号明細書；同第9, 458, 517号明細書；および同第9, 587, 282号明細書；米国特許出願公開第2016/0376323号明細書、および国際出願公開第2018/075798号パンフレットに記載される、AAV.7m8（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AAVは、米国特許第9, 585, 971号明細書に開示される任意のAAV、例えばAAV-PHP.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AAVは、AAV2/Rec2またはAAV2/Rec3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、AAV8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以下の特許および特許出願のいずれかに開示されるAAVである：米国特許第7, 906, 111号明細書；同第8, 524, 446号明細書；同第8, 999, 678号明細書；同第8, 628, 966号明細書；同第8, 927, 514号明細書；同第8, 734, 809号明細書；米国特許第9, 284, 357号明細書；同第9, 409, 953号明細書；同第9, 169, 299号明細書；同第9, 193, 956号明細書；同第9458517号明細書；および同第9, 587, 282号明細書、米国特許出願公開第2015/0374803号明細書；同第2015/0126588号明細書；同第2017/0067908号明細書；同第2013/0224836号明細書；同第2016/0215024号明細書；同第2017/0051257号明細書；および国際特許出願番号PCT/US2015/034799；PCT/EP2015/053335。

【0121】

AAV8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。AAVベースのウイルスベクターの核酸配列ならびに組換えAAVおよびAAV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PCT/EP2014/076466に教示される。一態様では、導入遺伝子（例えば、VEGF-Trap）をコードするAAV（例えば、AAV8）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、VEGF-TrapをコードするAAV8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AAV8ベースのウイルスベクターが本明細書で提供される。

【0122】

調節エレメントの制御下の、およびITR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、AAV8カプシドタンパク質のアミノ酸配列を有するか、または、AAV8カプシドタンパク質（配列番号11）のアミノ酸配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または99.9%同一であり、AAV8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AAV8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AAV8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、AAV8カプシドの生物学的機能を保持している配列番号11の配列を有する。図6は、SUBSとラベルされた行における比較に基づく、

10

20

30

40

50

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 AAV 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、AAV8ベクターは、天然のAAV8配列のその位置に存在しない、図6のSUBS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AAV8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AAV(ssAAV)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、scAAV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)。

10

【0124】

AAVベースのウイルスベクターの核酸配列ならびに組換えAAVおよびAAV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PCT/EP2014/076466に教示される。

20

【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rAAV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」DNA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、VEGF-Trap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、E1欠失のある、E3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、E2およびE4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36kbの野生型サイズの近くに保つために、スタッフア配列ありまたはなしでパッケージングシグナルと3'ITR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。

30

【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、VEGF-Trap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: Gag/pol配列含有プラスミド、Rev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、VSV-G)、ならびにパッケージングエレメントおよびVEGF-Trap遺伝子を有するCisプラスミド。

40

【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、HEK293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

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／実行するべきでない）。上清を濾過（0.45 μm）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的なプロトコールは、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 293T 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のグリコシリ化および／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^{HuPTM}は、本明細書に記載されるようにグリコシリ化および／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-2LTR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、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 Rocha, 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, Biochemistry 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. 113:395-400（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 / 41258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ス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

10

20

30

40

50

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、VEG F - 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、VEG F - 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、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F1t-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。

10

【0136】

アフリベルセプトはF1t-1リーダー配列で発現され、したがって、F1t-1リーダー配列：M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L T G S S S G（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、M Q S K V L L A V A L W L C V E T R A（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、M Y R M Q L L L I A L S L A L V T N S（配列番号38）またはM R M Q L L L I A L S L A L V T N S（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。

20

【0137】

30

【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	MNFLLSWVHWSLALLYLHHAKWSQA	59
フィビュリン-1 シグナルペプチド	MERAAPSRRVPLPLLLGGGLALLAAGVDA	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	MRLLAHKIICMLWAICVA	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	MYRMQLLSCIALILALVTNS	66
トリプシノーゲン-2 シグナルペプチド	MNLLLILTFVAAAVA	67

40

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

50

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 α -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	MKLLAATVLLLTICSLEG	70
ヒトアポリポタンパク質 B-100	MDPPRPALLALLALPALLLLLLAGARA	71
ヒト凝固第 IX 因子	MQRVNIMIMAESPGLITICLLGYLLSAEC	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 α -鎖 (FGA)	MFSMRIVCLVLSVVGTAWT	76
ヒトフィブリノーゲン β -鎖 (FGB)	MKRMVWSFHKLKTMKHLLLLLKVFLVKS	77
ヒトフィブリノーゲン γ -鎖 (FGG)	MSWSLHPRNLILYFYALLFLSSTCVA	78
ヒト α -2-HS-糖タンパク質 (AHSG)	MKSLVLLCLACLWLGCHS	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)	MEHKEVVLLLLLFLKSGQG	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)	MYSNVIGTVTSGKRKVYLLSLLIGFWDCVTC	86
ヒトセロトランスフェリン (TF)	MRLAVGALLVCAVGLCLA	87

10

20

30

40

50

【0139】

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。

【0140】

5.2.6 ポリリストロン性伝令 - IRESおよびF2Aリンク

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、切断可能なリンクまたは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、ポリリストロン性(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ウイルスベースのベクター(例えば、AAV8ベースのベクター)内に含まれる。

【0141】

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)リンクなどの切断可能なリンク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リンク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-Trap-フューリン部位-F2A部位-リーダー-FcなしのVEGF-Trap-ポリA。

【0142】

アミノ酸配列LLNFDLLKLAGDVESNPGP(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クには、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)QCTNYALLKLAGDVESNPGP(配列番号91)

F2A: (GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(配列番号92)

【0143】

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in vivo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でよく、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、AAVウイルスベースのベクター（例えば、AAV8ベースのベクター）内に含まれる。

【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AAV、例えばAAV8またはAAV2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PCT/EP2014/076466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

10

20

30

40

50

。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, 2 8 2, 1 9 9 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力価は、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 1₂ 沈降によって回収することができる。

10

【 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。

20

【 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リ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。グリコシリ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 のグリコシリ化 / 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。

30

【 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。

40

【 0 1 5 2 】

5 . 3 翻訳後修飾：グリコシリ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

50

ン部位は、アフリペ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 1 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有する。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有する。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有する (V E G F - T r a p ^{H u P T M}) 。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有するように改変することができる、アフリペルセプトの 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有する V E G F - T r a p ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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 および G a 1 が含有しない前記 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有する前記 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ス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 ^{H u P T M} 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有する 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 ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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）にトランスクレクトされ、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HuH-7細胞が含まれるが、HEK293、線維肉腫HT-1080、HKB-11、CAPおよびPER.C6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 et al.を参照されたい）。

【0155】

本発明は、ヒト翻訳後修飾VEGF-Trap(VEGF-Trap^{HuPTM})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^{HuPTM}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^{HuPTM}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10%、もしくは10%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50%、60%、70%、80%、90%または100%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。

【0156】

好ましい実施形態では、VEGF-Trap^{HuPTM}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^{HuPTM}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、Gallili 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

10

20

30

40

50

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

【0157】

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 1 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. Che m. 86:5661-5666を参照されたい。

10

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

V E G F - T r a p 、アフリベルセプトは、9 6 . 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

【0161】

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 ^{H u P T M} 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 ^{H u P T M} 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

、C H O 細胞は二分岐のG 1 c N A cも生成しないが、それらは免疫原性であるN e u 5 G c (N G N A)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、C H O 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-G a 1 抗体と反応する免疫原性グリカン、-G a 1 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V E G F - T r a p^{H u P T M}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。

【0 1 6 2】

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V E G F - T r a pは、I g G F c 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V E G F - T r a p タンパク質に別の利点を付与する。

【0 1 6 3】

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V E G F - T r a p 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。

【0 1 6 4】

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、C H O 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V E G F - T r a p 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。

【0 1 6 5】

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できている。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。

【0 1 6 6】

グリコシル化部位に加えて、アフリベルセプトなどのV E G F - T r a p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

10

20

30

40

50

1の11位 (F 1 t - 1 Ig 様ドメイン) 、 140位 (K D R Ig 様ドメイン) 、 263および281位 (Ig G 1 F c ドメイン) のアフリベルセプトの F 1 t - 1 Ig 様ドメイン2、 K D R Ig 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）。

【0167】

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、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、VEGF-Trap^{HuPTM}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。

【0168】

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 VEGF-Trap^{HuPTM}を発現する細胞のデポーを形成するために、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 VEGF-Trap^{HuPTM}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。

【0169】

5.4.1 標的患者集団

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。

【0170】

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AMD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AMDと診断された患者への投与のためである。

【0171】

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AMD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AMDと診断された患者への投与のためである。

【0172】

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（DME）と関連した糖尿病性

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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^{HuPTM}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）（ラニビズマブ）、EYLEA（登録商標）（アフリベルセプト）および／またはASTIN（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。

30

【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診断された患者への投与のためである。

40

【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

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 ^{H u P T M} 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) (ベバシズマブ)、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と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 mL ~ 0 . 5 mL、好ましくは0 . 1 ~ 0 . 25 mL (100 ~ 250 μ L) の範囲内の注射容量で送達するべきである。硝子体液において少なくとも約0 . 33 μ g / mL ~ 約1 . 32 μ g / mL、または眼房水(目の前眼房)において約0 . 11 μ g / mL ~ 約0 . 44 μ g / mL のC_{min}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 . 70 ~ 約6 . 60 μ g / mL の範囲内および最高約26 . 40 μ g / mL の導入遺伝子生成物の硝子体C_{min}濃度、ならびに / または約0 . 56 ~ 約2 . 20 μ g / mL の範囲内および最高8 . 80 μ g / mL の眼房水C_{min}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V E G F 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 mg / kg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_{min}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るべきである。

【 0 1 8 8 】

5 . 5 バイオマーカー / サンプリング / 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 / 網膜への身体的变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 (SD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】

10

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。

20

【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 HuPTM（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、ラニビズマブ、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 HuPTM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。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（FOLETRI）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（FOXO））、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と共に投与される。

30

【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。

40

【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 HuPTM（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、ラニビズマブ、ベバシズマブ、ペガブタニブまたはレゴラフェニ

50

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

【0198】

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。

【0199】

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 VEGF - Trap^{HuPTM} または他の抗 VEGF 剤、例えばアフリベルセプト、ラニビズマブ、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】

10

【0200】

[実施例 1]

アフリベルセプト cDNA (およびコドン最適化)

F1t - 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 T G S S S G (配列番号 36) 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 cDNA 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、CB7 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 5A に提供される。

20

【0201】

[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 I A L S L A L V T N S (配列番号 38) 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 cDNA 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、CB7 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 5B に提供される。

30

【0202】

[実施例 3]

「無効化された Fc」 (H420A; H420Q) を有するアフリベルセプト

420 位 (Fc の通常の番号付けにおける 435 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 I A L S L A L V T N S (配列番号 38) 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 cDNA 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、CB7 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 5C (アラニン置換) および 5D (グルタミン置換) に提供する。

40

【0203】

[実施例 4]

Fc (-) 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 Fc 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 cDNA 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 ~ 204 位のアミノ酸配列を有する VEGF - trap (KDR 配列の末端リジンおよび IgG1 Fc ドメインが欠失)、または配列番号 1 の 1 ~ 205 位のアミノ酸配列を有する VEGF - trap (KDR 配列の末端リジンを有するが IgG1 Fc ドメインが欠失)、または 1 ~ 216 位のアミノ酸配列を有する VEGF -

50

trap (Ig G 1 Fc 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 VEGF - trap (Ig G 1 Fc 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 VEGF - trap をコードする (図 4 を参照)。構築物は、VEGF - trap の N 末端でリーダー配列 MY RMQLLLLIALSLALVTNS (配列番号 38) 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、CB7 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]

Fc (-) アフリベルセプトニ重構築物

配列番号 1 のアフリベルセプト配列の Fc 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 cDNA 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 VEGF - trap (KDR 配列の末端リジンおよび Ig G 1 Fc 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 VEGF - trap (KDR 配列の末端リジンを有するが Ig G 1 Fc 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 VEGF - trap (Ig G 1 Fc 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 VEGF - trap (Ig G 1 Fc 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 VEGF - Trap 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、VEGF - trap 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 VEGF - trap コード配列をコードするヌクレオチド配列は、IREs エレメントまたは 2A 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、CB7 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 5E および 5F 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。

10

20

30

40

【図1】

図1

アフリベルセプト配列:

Flt-1 リーダー配列:

```

MVSYWD TGVLILCALLS CLLLTGSSSG
SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPI C RVTSPNITVT LKKFPLDPLI PDGKRIIWDs 60
RKGFILISNAT YKEIGLILACE ATVNIGHLYKT NYLTHROTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHOHKKL VNRDLKQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
GLYTCAASSG LMTKRNSTFV RVHEKDRHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMSR 240
TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVUDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300
GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS 360
DIAVEWESNG QPENNYYKTTF PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH 420
YTQKSLSLSLSP +/- 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 位のチロシン〇硫酸化部位

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

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

```

MYRMQLLLLI ALSLALVNTS
SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPI C RVTSPNITVT LKKFPLDPLI PDGKRIIWDs 60
RKGFILISNAT YKEIGLILACE ATVNIGHLYKT NYLTHROTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHOHKKL VNRDLKQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
GLYTCAASSG LMTKRNSTFV RVHEKDRHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMSR 240
TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVUDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300
GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS 360
DIAVEWESNG QPENNYYKTTF PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH 420
YTQKSLSLSLSP +/- 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 位のチロシン〇硫酸化部位

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

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

Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

IgG1 Fc 206 位~

【図3】

図3

アフリベルセプト H⁴²⁰A/Q(無効化 Fc)および代替リーダー:

リーダー配列:

```

MYRMQLLLLI ALSLALVNTS
SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPI C RVTSPNITVT LKKFPLDPLI PDGKRIIWDs 60
RKGFILISNAT YKEIGLILACE ATVNIGHLYKT NYLTHROTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHOHKKL VNRDLKQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
GLYTCAASSG LMTKRNSTFV RVHEKDRHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMSR 240
TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVUDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300
GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS 360
DIAVEWESNG QPENNYYKTTF PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH 420
YTQKSLSLSLSP +/- 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 位のチロシン〇硫酸化部位

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

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^(c)および代替リーダー:

リーダー配列:

```

MYRMQLLLLI ALSLALVNTS
SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPI C RVTSPNITVT LKKFPLDPLI PDGKRIIWDs 60
RKGFILISNAT YKEIGLILACE ATVNIGHLYKT NYLTHROTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHOHKKL VNRDLKQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
GLYTCAASSG LMTKRNSTFV RVHEKDRHTT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMSR 240
TPEVTCVVD VSHEDPEVKE NWYVUDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN 300
GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS 360
DIAVEWESNG QPENNYYKTTF PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH 420
+/- PSVFL

```

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

11 および 140 位のチロシン〇硫酸化部位

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関与するシステイン

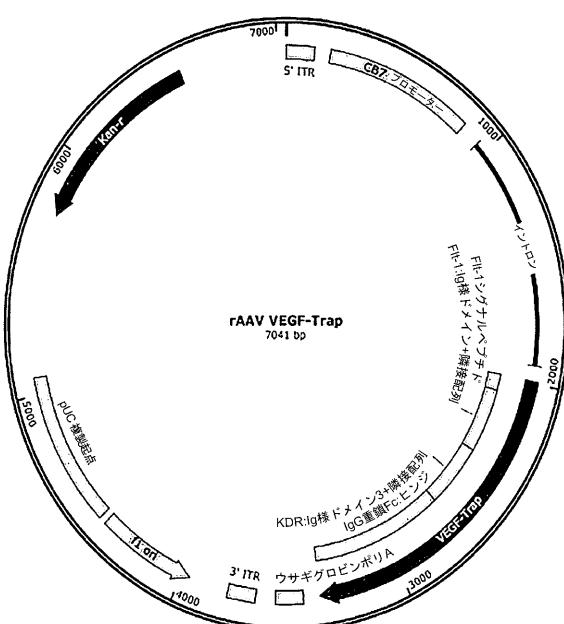
Flt-1 配列 1~102 位

KDR 配列 103~205 位

ヒンジ領域はイタリック体

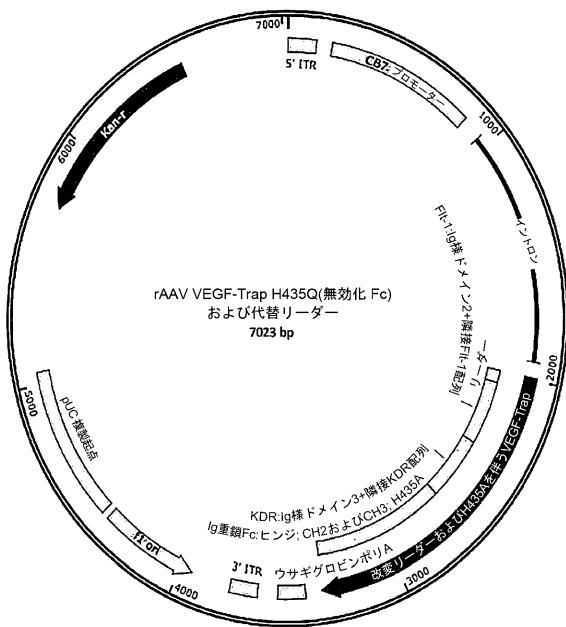
【図5-1】

図5A rAAV VEGF-Trap 構築物



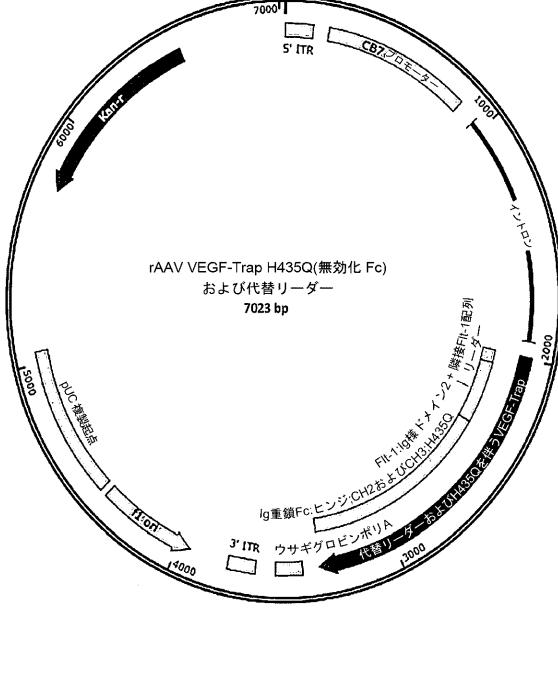
【図 5 - 3】

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 6 - 1】

VP1₁₋₇₃₆ →

AAV1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV2 MAADGYLPDWLEDLTLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV3-3 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV4-4 -NTDGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 59
 AAV5 MSFVDPHDPDWLEEE-VGEGLREFFLQEACPCKPKPNQQHODQARGLVLPGYKYLGPFGNGLD 59
 AAV6 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV7 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV8 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 hu31 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 hu32 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV9 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKGPAKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 SUBS -STWDHP-----ETVG-Y-QFLK-QA-P-K--PAERKK-DG-----N-----F-----
 MF L D E V P Q S
 G Q R
 DA E S ACPATA AG ST S LV
 I -- DT A
 TD S

AAV1 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV2 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV3-3 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV4-4 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 119
 AAV5 RGEPVNRDEDEVAREHHD1S1N1QLEAGDNP1LYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 119
 AAV6 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV7 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV8 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 hu31 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 hu32 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 AAV9 KGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSPFGNGLGRAVFO 120
 SUBS R-----E-EV-R-----IS-NZ-----DS-----R-----OK-QD-----K-----
 R E AG
 Q

VP2₁₋₃₈ → -HVR1--

AAV1 AKKRVLBPLGLVEEGAKTAPGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV2 AKKRVLBPLGLVEEWFVTKAPGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV3-3 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKGAIDQSPQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV4-4 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 178
 AAV5 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV6 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 180
 AAV7 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 180
 hu31 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 hu32 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV9 AKKRVLBPLGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTGQPAKRLNFGQGTGDS 179
 SUBS R-----V-----F-----QGE-----TG-GIDDFH-V-----S-----T-----KKQARTEKSVPEDEDTGA
 I PV A ALIP Q T V E B D K STSS S
 E A S
 R A

VP2₁₋₃₈ → -HVR2--

【図 6 - 2】

AAV1 ESVED-POLGEPPATPAVAGPTTMASCGGAPMADNNNEGADGVGVNAGSNWHDCTSWLGR 238
 AAV2 DSVED-POLGLQPAFSPGSLGLTNTMATSQGAPMADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 238
 AAV3-3 ESVED-POLGEPPATPAVAGPTTMASCGGAPMADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 238
 AAV4-4 GDPEP---PEGSTSGAMS---DDSMERAAGGAVEGGQGADGVGVNAGSNWHDCTSWLGR 232
 AAV5 EAEGFSGCQLQIAPQAPASLCAJDMSAGGGLQDNNQGADGVGVNAGSNWHDCTSWLGR 228
 AAV6 ESVED-POLGEPPATPAVAGPTTMASCGGAPMADNNNEGADGVGVNAGSNWHDCTSWLGR 238
 AAV7 ESVED-POLGEPPAAPSVGNSGTVAAOGGAPVADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 239
 AAV8 ESVED-POLGEPPAAPSVGNSGTVAAOGGAPVADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 239
 hu31 ESVED-POLGEPPAAPSVGNSGTVAAOGGAPVADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 238
 hu32 ESVED-POLGEPPAAPSVGNSGTVAAOGGAPVADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 238
 AAV9 ESVED-POLGEPPAAPSVGNSGTVAAOGGAPVADNNNEGADGVGNSGNNWHDCTSWLGR 238
 SUBS GDG-S-S-QLQISCTMSLSDPNEVRAA-GAMCEGQ---NA---D---I-MEGH
 DA E S ACPATA AG ST S LV
 I -- DT A
 TD S

HVR3

AAV1 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---SASTGASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 297
 AAV2 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 296
 AAV3-3 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 296
 AAV4-4 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---ESLQSNRNTYNSSTPFWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 287
 AAV5 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 287
 AAV6 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 297
 AAV7 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 298
 AAV8 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQIS---S02GASNDNNHNYFGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 299
 hu31 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQISNSTEGSSNDNNAFYGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 298
 hu32 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQISNSTEGSSNDNNAFYGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 298
 AAV9 VITSTRTRWALPTYNNHLYKQISNSTEGSSNDNNAFYGYSTPWGYPDFDNFRHCHFSPRDW 298
 SUBS -T-K-----V-----S-----Q-----R-----Q-----S-----G-----G-----S-----
 E K AATTEGL S H
 V G V
 E A

AAV1 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 357
 AAV2 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 356
 AAV3-3 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 356
 AAV4-4 QRLINNNWGMRCKAMRKFVQKKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 347
 AAV5 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 347
 AAV6 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 357
 AAV7 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 358
 AAV8 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 359
 hu31 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 359
 hu32 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 358
 AAV9 QRLINNNWGPRLPKRLNFKLNFQVKEVTTIANNLTSTVQFSDSEYQPVVLGS 358
 SUBS -----M-----RAMRV-1-----VODST-----I-----I-----S-----DE-----E-----MDA
 K S QSE E R S

【図 6 - 3】

図 6(続き)

HVR4

AAV1 AHQGCLPPPPADWVMP1QYGYLTNNG---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 414
 AAV2 AHQGCLPPPPADWVMP1QYGYLTNNG---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 413
 AAV3-3 AHQGCLPPPPADWVMP1QYGYLTNNG---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 413
 AAV4-4 AHQGCLPPPPADWVMP1QYGYLTNNG---KRGKARTEEDSKPSTSSA 168
 AAV5 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 178
 AAV6 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV7 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 180
 hu31 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 179
 hu32 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 179
 AAV9 AHQGCLPPFGLVEEAKATAPKGKRPVPEOVSQ---EPDSSGIGKGTQPAKRLNFGQGTGDS 179
 SUBS GQ-----S-----A-----B-----PQ-----T-----CG-----VND-----GNTPD-----NA-----F-----EIT-----
 T N V A T Q Q E T
 R E S

-----HVR5-----

AAV1 TFEPPVPHSSYAHQSLSRDLRMLNPLIDQYLYLNRNQ---MQGCSAQNSQKDLRNLSPGMSV 473
 AAV2 TFEPPVPHSSYAHQSLSRDLRMLNPLIDQYLYLNRNQ---MQGCSAQNSQKDLRNLSPGMSV 472
 AAV3-3 TFEPPVPHSSYAHQSLSRDLRMLNPLIDQYLYLNRNQ---GTTSGTTSNLSRLPSQAGPQ9MSL 473
 AAV4-4 TFEPPVPHSSYAHQSLSRDLRMLNPLIDQYLYLNRNQ---GTTSGTTSNLSRLPSQAGPQ9MSL 473
 AAV5 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 414
 AAV6 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 415
 AAV7 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 415
 hu31 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 415
 hu32 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 415
 AAV9 NFEPPVPHSSAFS0NLFKLNPLVQDQYLYLNRNQ---SQAVGRSSFYCLEYPSQMLRTGNNFTFSY 415
 SUBS T-----D-----MF-----A-----V-----NGFR-----QNTNS-----AGT-----K-----T-----CG-----VNS-----
 S E Q S NSTPT TQNSDWN KNRN QGRD
 N K V T Q G T A E L Y R L T R I L
 A RG G GS E
 ND

-----HVR5-----

AAV1 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV2 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV3-3 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV4-4 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV5 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV6 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV7 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV8 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 AAV9 -- HVR6-- HVR7-- HVR8--
 SUBS FAK-WL---CIXT---GWNLGSVG---TG-DLSLKYTHEST-D-ASYQVP-QTPGMPAG
 TP F MG F K AND RA NYTFPATINRME E D ALT VN NN
 K F L KA V P TAG KYN W II I
 Y LD S H E A
 S T E

【図 6 - 4】

図 6(続き)

-----HVR9-----

AAV1 DDEEKFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 585
 AAV2 DDEEKFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 584
 AAV3-3 DDEEKFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 585
 AAV4-4 PADSKS-N-S0LGPAGPKGPN---GNTATVHG-TLIPFSEEE1LAATNATD1DWWGNLPGGGD 583
 AAV5 LQGSNTYALENTMIFNBSQANPFCGTTATYLEGNL1LTISSESETQPVNVRVAYNVQGQMA1TNQ 574
 AAV6 DDKURFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 585
 AAV7 DDEDRFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 586
 AAV8 DDEDRFPMSGVMILIGKQSA---GASVTAFLD-NM1TDEEE1KA1NPVATEFCTVAVNFQ 587
 hu31 EGEDRFPMSGVMILIGKQSA---GRTDNVAD-KVMTNEEE1KT1NPVATESYQGVA1TNQ 585
 hu32 EGEDRFPMSGVMILIGKQSA---GRTDNVAD-KVMTNEEE1KT1NPVATESYQGVA1TNQ 585
 AAV9 EGEDRFPMSGVMILIGKQSA---GRTDNVAD-KVMTNEEE1KT1NPVATESYQGVA1TNQ 585
 SUBS LQGSNTYALENTMIFNBSQANPFCGTTATYLEGNL1LTISSESETQPVNVRVAYNVQGQMA1TNQ-----
 PADEK S QHQLI SEASA EASAKLA-NSNM D RA R NVP TMSL L
 DDK N N V TPS AK KTY L A QG I V N
 S I N EI E S S F
 N Y R D

-----HVR10-----

AAV1 SSSTDPATGVHAGALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 AAV2 RGKNAQATADUNTQGQVPGMVMWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 644
 AAV3-3 SSNTAQTPTGQVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 AAV4-4 SNSNLPPTVDRALTAGCQVNAQWQVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 643
 AAV5 SNTTAPATGQVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 634
 AAV6 SSSTDPATGQVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 AAV7 AANTAAQO7QVNNQGALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 646
 AAV8 QONATAPQGTVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 647
 hu31 SAQAO7QGTVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 hu32 SAQAO7QGTVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 AAV9 SAQAO7QGTVNGQCALPGMVWQDRDVYLQGPWIKAPIHTDGHFPHPSPLMGGFLKNPP 645
 SUBS RNSNLPPTVDRALTALEAV-S-MB-----I-----E-GAH-----AI-----L-N-----
 ASNTA AIAADYHTM V N
 QGTRD QT NH
 Q V L
 V S
 S
 -----HVR11-----
 AAV1 QILIKNTPVDPANP PAE/SATKFAFSITQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 AAV2 QILIKNTPVDPANP STT/SAAKFAFSITQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 704
 AAV3-3 QILIKNTPVDPANP PTT/SAAKFAFSITQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 AAV4-4 QIFILKNTPVDPANP ATTTSSZPNSFITYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 703
 AAV5 MMLIKNTPVDPVGN1-TS/SDVPUSSFTTQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 693
 AAV6 QILIKNTPVDPANP PAE/SATKFAFSITQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 AAV7 QILIKNTPVDPANP PEV/TPAKFAFSITQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 706
 AAV8 QILIKNTPVDPANP PTZ/NSKLNPSFTTQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 707
 hu31 QILIKNTPVDPANP PTA/NSKLNPSFTTQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 hu32 QILIKNTPVDPANP PTA/NSKLNPSFTTQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 AAV9 QILIKNTPVDPANP PTA/NSKLNPSFTTQYSTGQSVBIEWELQKENSKRWNPEIQTYSN 705
 SUBS MM-----G-----IAA-----SDVFS-----QMD-----IR-----R-----V-----

F SEF TAA FA
 S PT
 V QS
 S S

【図 6 - 5】

図 6(続き)

-----HVR12-----
 AAV1 AKSANVDE/TDNNGGYTERPRPIGTRYL/TPL 736
 AAV2 NGSVNUDE/TD/TNGVYSEPRPIGTRYL/TPL 735
 AAV3-3 NGSVNUDE/TD/TNGVYSEPRPIGTRYL/TPL 736
 AAV4-4 GQNSLILWADAAKGYTERPRAIGTRYL/TPL 734
 AAV5 NDFQVDFAPDSTGTRYRPRPIGTRYL/TPL 724
 AAV6 AKSANVDE/TDNNGGYTERPRPIGTRYL/TPL 736
 AAV7 EKQGVDE/AD/DSQGVYSEPRPIGTRYL/TPL 737
 AAV8 YKTSVDE/PAVNTEGVYSEPRPIGTRYL/TPL 738
 hu31 YKSNNUVEA/AVSTEGVYSEPRPIGTRYL/TPL 736
 hu32 YKSNNUVEA/AVTEGVVSEPRPIGTRYL/TPL 736
 AAV9 YKSNNUVEA/AVTEGVVSEPRPIGTRYL/TPL 736
 SUBS GQGQBLNWTDA-K-RTT-A-----H-
 NDQF D SNN E T H
 A TG NQ L
 E A T

【図 7 - 1】

図 7A-7D

図 7A IgG2 Fc 配列

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DPYPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVDHKPS NTWVDKTVER KCCVCECPCC APPVAGPSV 120
 LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWVYDVG VEVHNAKTKP REEFQNSTFR 180
 VVSPLTVVHQ DWMLNGKEYK CWSNKGLPAP IERKTIKSKG QPREPQVYTL PDSREEMTK 240
 QVSL/TCLVK GYPSDLSVW ESNQGPENNY KTPQMLD GSFFFLYSKLT VDKSRWQGN 300
 VPSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLSP +/- G または GK

図 7B IgG4 Fc

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DPYPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVDHKPS NTWVDKTVER KCCVCECPCC APPVAGPSV 120
 LFPPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWVYDVG VEVHNAKTKP REEFQNSTFR 180
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CWSNKGLPAP IERKTIKSKG QPREPQVYTL PDSREEMTK 240
 QVSL/TCLVK GYPSDLSVW ESNQGPENNY KTPQMLD GSFFFLYSKLT VDKSRWQGN 300
 NVFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLSP +/- G または GK

図 7C IgG2 Fc(部分的ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKYGPC PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 PEVITCVVWV SQEDPEVQPN WYWDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 300
 KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKWESNGQ 360
 PENNYKTPP VLSDGSFPL YSLRITVDSR QWEGNVFSCS VMHEALHNH TQKSLSLSL 419
 +/- G または GK

図 7D IgG2 Fc(完全ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKYGPC PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 PEVITCVVWV DVSHEDPEVQ FNWVYVGDGVEV HNAKTKPREEQF QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL 300
 NGKEYKCKVS NKGDPAPIKE TISKTKGQPR EPQVYTLPLPS REEMTKNQVS LTLCLVKGFP 360
 SDI5VEWESN QGPENNYKTT PPMLDSGDS FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMEALHN 420
 SLSLSP +/- 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 YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKYGPC PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 PEVITCVVWV SQEDPEVQPN WYWDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 300
 KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKWESNGQ 360
 PENNYKTPP VLSDGSFPL YSLRITVDSR QWEGNVFSCS VMHEALHNH 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 YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKYGPC PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 PEVITCVVWV SQEDPEVQPN WYWDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG 300
 KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKWESNGQ 360
 PENNYKTPP VLSDGSFPL YSLRITVDSR QWEGNVFSCS VMHEALHNH TQKSLSLSL 419
 +/- G または GK

図 7G IgG4 Fc(完全ヒンジ)を有する VEGF-Trap

SDTGRPFVEM YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKESKG PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 SRTEVITCVV DVSHEDPEVQ FNWVYVGDGVE HNAKTKPREEQF QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL 300
 LNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI KTISKAKQOP REPVYTLPLP SQEMTKNQV SLTCLVKGFPY 360
 PSDIAVEWES NGQPENNYKTT TPPVLDSGDS FFLYSLRITVDSR QWEGNVFSCS VMHEALHNH 420
 NYHTQKSLSL 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 YSEIPEIHHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWD 60
 RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQNTN IIDVVLSPSH GIELSVGEKL 120
 VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VRDLKQTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ 180
 GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKESKG PSCPAPEFLG GSVFVFLPPK PKDPLMSRT 240
 SRTEVITCVV DVSHEDPEVQ FNWVYVGDGVE HNAKTKPREEQF QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL 300
 LNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI KTISKAKQOP REPVYTLPLP SQEMTKNQV SLTCLVKGFPY 360
 PSDIAVEWES NGQPENNYKTT TPPVLDSGDS FFLYSLRITVDSR QWEGNVFSCS VMHEALHNH 420
 NYHTQKSLSL SL +/- G または GK

【図 8 - 1】

図 8A

ヒト Fit1 細胞外ドメイン配列

MVSYWDTGVL LCALLSCLL TGSSSGSCLKL DPPLSLKGQ HMQAGQTLH 50
 LQCRGEAAHK WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRRNGQFCFS TLTLNQTAQAN 100
 HTGFGSKYLV AVPTSKKKT ESAIYIFISD TGRPFVEMYS EIPEIHHMTE 150
 GRELVTPCRV TSPNITVTLL KFPLDPLIPD GKRRIWDSR KFIIISNATYK 200
 EIGLITCEAT VNGHLYKTTN LTHRQNTTII DVQIISTPRPV KLLRCHTLV 250
 NCTATTPLN RVQMTWSPYD EKKNKRASVR RIDQNSNSHAI IFYSVLTIDK 300
 MQNDKGLYLT CRVRSGPFSK SVNTSVHYYD KAPITVKKHRA QQVLETVAGK 350
 RSYRLSMVKV AFPSPEVWVL KDGLPATEKS ARYLTGRGSL IIKDVTTEEDA 400
 GNYTLLSISI QSNVFKNLTA TLIVNVKPOI YEKAVSSSPD PALYPLGSRQ 450
 ILTCTAYGIP QPTKWHWRF CNHNHSEARC DFCSNNEEST ILDADSNMGN 500
 RLESITQRM AIEGKKNM ASLUVADSRIS GIYICIASNK VGTGVRNISF 550
 YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKLSCITV KFLYRDVW LLRTVNNRTM 600
 HYSISKQKMA ITKEHESITLN LTMNINVSLQD SGTYACARARN VYTGEELQK 650
 KETITRDQEA PYLLRNLSDH TVAISSLSTL DCHANGVPEP QITWPKNNNHK 700
 IQQEPGIIILG PGSSTLFIER VTEEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVOQ 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

<u>MQSKVLLAVA</u>	<u>LWLCVETRAA</u>	<u>SVGLPSVSLD</u>	<u>LPRLSIQKDI</u>	<u>LTIKANTTLO</u>	50
<u>ITCRGQRDID</u>	<u>WLWPNNQSGS</u>	<u>EQRVEVTECS</u>	<u>DGLFCKTLTI</u>	<u>PKVIGNDTGA</u>	100
<u>YKCFYRETDL</u>	<u>ASVIVVVVQD</u>	<u>YRSPPIASVS</u>	<u>DQHGVVYITE</u>	<u>NKNKTVVIPC</u>	150
<u>LGSTSNLNVS</u>	<u>LCARYPEKRF</u>	<u>VPDGNRISWD</u>	<u>SKKGFTIPSY</u>	<u>MSYAGMVFC</u>	200
<u>BAKINDESYQ</u>	<u>SIMYIVVVV</u>	<u>YRIYDVLSP</u>	<u>SHGIELSVGE</u>	<u>KLVLNCTART</u>	250
<u>ELNVGIDFW</u>	<u>EYPSSKHQHK</u>	<u>KLVNRDLKTO</u>	<u>SGSEMKKFLS</u>	<u>TLTIDGVTRS</u>	300
<u>DQGLYTCAS</u>	<u>SGLMTKKNST</u>	<u>FVRVHEKPFV</u>	<u>AFGSGMESLV</u>	<u>EATVGERVRI</u>	350
<u>PAKYLYPPP</u>	<u>EIKWYKNGIP</u>	<u>LESNHTIKAC</u>	<u>HVLVIMEVSE</u>	<u>RDTCNYTVIL</u>	400
<u>TNPISKEQ</u>	<u>HVVSLVYV</u>	<u>PQIGEKSLIS</u>	<u>PVDSYQYGIT</u>	<u>QTLTCTVYAI</u>	450
<u>PPPHIHWY</u>	<u>QLEEECANEP</u>	<u>SQAVSVTNPY</u>	<u>PCEEWRRSVED</u>	<u>FQGGNKIEVN</u>	500
<u>KNQFALIEGK</u>	<u>NKTVSTLVIQ</u>	<u>AANVSALYKC</u>	<u>BAVNKGVRGE</u>	<u>RVLSFHVTRG</u>	550
<u>PEITLQDQM</u>	<u>PTQESVSLW</u>	<u>CTADRSITFEN</u>	<u>LTWVKLCPQP</u>	<u>LPIHVGELPT</u>	600
<u>PVCKNLDITLW</u>	<u>KLNATMFSNS</u>	<u>TNDILIMELK</u>	<u>NASLQDQGDY</u>	<u>VCLAQDRKTK</u>	650
<u>KRHCVVRQLT</u>	<u>VLERVAPIT</u>	<u>GNLENQTTSI</u>	<u>GESIEVSCTA</u>	<u>SGNPPQTMW</u>	700
<u>FKDNETLVED</u>	<u>SGIVLKDGNR</u>	<u>NLTIRVRKE</u>	<u>DEGLYTCQAC</u>	<u>SVLGCAKVEA</u>	750

1-19 シグナル配列

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

【図 8 - 3】

図 8C-8D

図 8C Flt1 Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap

<u>SDTGRPFVEM</u>	<u>YSEIPEIIHM</u>	<u>TEGRELVIPC</u>	<u>RVTSNPNTVVT</u>	<u>LKKFPLDTLI</u>	<u>PDGKRRIWDS</u>	60
<u>RKGFIISNAT</u>	<u>YKEIGLLTCE</u>	<u>ATVNGHLYKT</u>	<u>NYLTHRQINT</u>	<u>IIDVVLSPSH</u>	<u>GIELSVGEKL</u>	120
<u>VLNCTARTEL</u>	<u>NVGIDFNWEY</u>	<u>PSSKHQHKKL</u>	<u>VNRDLKTQSG</u>	<u>SEMKKFLSTL</u>	<u>TIDGVTRSDQ</u>	180
<u>GLYTCAASSG</u>	<u>LMTKKNSTFV</u>	<u>RVHEKPFVEM</u>	<u>YSEIPEIIHM</u>	<u>TEGRELVIPC</u>	<u>RVTSNPNTVVT</u>	240
<u>LKKFPLDTLI</u>	<u>EDGKRRIWDS</u>	<u>RKGFIISNAT</u>	<u>YKEIGLLTCE</u>	<u>ATVNGHLYKT</u>	<u>NYLTHRQINT</u>	300
<u>IIDVQ1STPR</u>	<u>PVKLLRQHTL</u>	<u>VLNCTATTPL</u>	<u>NTRVQMTWSY</u>	<u>PDEKNKRASV</u>	<u>RRRIDQSNH</u>	360
<u>ANIFYSVLTI</u>	<u>DKMQNKDKGK</u>	<u>YTCRVRSGPS</u>	<u>FKSVNTSVHI</u>	<u>YDKAFTITVK</u>		

図 8D KDR Ig 様ドメインを有する VEGF-Trap

<u>SDTGRPFVEM</u>	<u>YSEIPEIIHM</u>	<u>TEGRELVIPC</u>	<u>RVTSNPNTVVT</u>	<u>LKKFPLDTLI</u>	<u>PDGKRRIWDS</u>	60
<u>RKGFIISNAT</u>	<u>YKEIGLLTCE</u>	<u>ATVNGHLYKT</u>	<u>NYLTHRQINT</u>	<u>IIDVVLSPSH</u>	<u>GIELSVGEKL</u>	120
<u>VLNCTARTEL</u>	<u>NVGIDFNWEY</u>	<u>PSSKHQHKKL</u>	<u>VNRDLKTQSG</u>	<u>SEMKKFLSTL</u>	<u>TIDGVTRSDQ</u>	180
<u>GLYTCAASSG</u>	<u>LMTKKNSTFV</u>	<u>RVHEKPFVAF</u>	<u>GSGMESLVEA</u>	<u>TVGERVRLPA</u>	<u>KYLGYPPEI</u>	240
<u>KWYKNGNIPLE</u>	<u>SNHTIKAGHV</u>	<u>LTMMEVSE</u>	<u>TGNYFVILTA</u>	<u>PISKEKOSHV</u>	<u>VSLVVVVPQ</u>	300
<u>IGEKSLISPV</u>	<u>DSYQYGTQ</u>	<u>LTCTVVAIPP</u>	<u>PHIIHWYQ</u>	<u>EEECANEPSQ</u>	<u>AVSVTNPYPC</u>	360
<u>EEWRSEVED</u>	<u>FQGGNKIEVNKN</u>	<u>QFALIEGK</u>	<u>NVSLYKCEA</u>	<u>VNKVGRGERV</u>		420
<u>ISPHV</u>						

【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 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">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.yjmthe.2006.02.004 page 957, right-hand column, lines 7-10; figure 1</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-4,27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">----- -/-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">7,8, 21-26,29</td> </tr> </tbody> </table>					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.yjmthe.2006.02.004 page 957, right-hand column, lines 7-10; figure 1	1-4,27	Y	----- -/-	7,8, 21-26,29
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.yjmthe.2006.02.004 page 957, right-hand column, lines 7-10; figure 1	1-4,27											
Y	----- -/-	7,8, 21-26,29											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.													
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed													
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 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.O. 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	<p>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</p> <p>-----</p>	5,6,19, 20,23
X	<p>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</p> <p>-----</p>	9-18,28
A	<p>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</p> <p>-----</p>	1-28
Y	<p>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</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	7,8, 21-26
3		

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	<p>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</p> <p>-----</p>	29
A	<p>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:http://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/5/189/189ra76.full.pdf [retrieved on 2018-12-12] page 2</p> <p>-----</p>	6
A	<p>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</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1
3		

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	<p>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</p> <p>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]</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> <p>CN 103 304 668 A (JIANGSU JIANDE BIOLOG PHARMACEUTICAL CO LTD) 18 September 2013 (2013-09-18) example 3</p> <p>-----</p> <p>WO 2018/160686 A1 (ADVERUM BIOTECHNOLOGIES INC [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) paragraphs [0009], [0182]; claims 1,17</p> <p>-----</p>	5,6,23
A		28
X,P		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,R0,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 10128, ニューヨーク, レキシントン アベニュー 13 49, アパートメント 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 20878, ノース ポトマック, ソフト ウィンド ドライブ 14716
(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 21773, マイヤーズビル, ブレザリン チャーチ ロード 3546
(72)発明者	ヴァン エベレン, シエリ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94025, メンロー パーク, ポールソン サークル 8 23
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