

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-545967

(P2022-545967A)

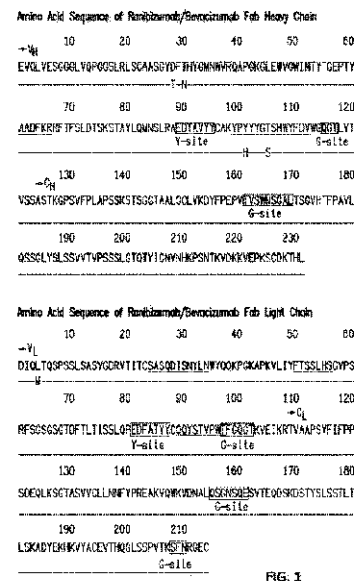
(43)公表日 令和4年11月1日(2022.11.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		4 B 0 6 4
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 7 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全133頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-513859(P2022-513859)	(71)出願人	520135611		
(86)(22)出願日	令和2年8月25日(2020.8.25)		リジェネックスバイオ インコーポレイ		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月22日(2022.4.22)		テッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/047733		アメリカ合衆国 メリーランド州 208		
(87)国際公開番号	WO2021/041373		50, ロックビル, メディカル センター		
(87)国際公開日	令和3年3月4日(2021.3.4)		ドライブ 9804		
(31)優先権主張番号	63/004,258	(74)代理人	100094569		
(32)優先日	令和2年4月2日(2020.4.2)		弁理士 田中 伸一郎		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100103610		
(31)優先権主張番号	62/902,352		弁理士 ▲吉▼田 和彦		
(32)優先日	令和1年9月18日(2019.9.18)	(74)代理人	100109070		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 須田 洋之		
(31)優先権主張番号	62/891,799	(74)代理人	100119013		
			弁理士 山崎 一夫		
		(74)代理人	100123777		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 完全ヒト翻訳後修飾抗VEGF Fabを用いる糖尿病性網膜症の処置

(57)【要約】

ヒト血管内皮増殖因子(「hVEGF」)に対する完全ヒト翻訳後修飾(HuPTM)モノクローナル抗体(「mAb」)またはmAbの抗原結合性断片、例えば、完全ヒトグリコシル化(HuGly)抗hVEGF抗原結合性断片などの糖尿病性網膜症を有すると診断されたヒト対象の眼中的網膜/硝子体液への送達のための組成物および方法が記載される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中の網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターは、 $6.2 \times 10^{11} \text{ GC/mL}$ の濃度で約 $1.6 \times 10^{11} \text{ GC/眼}$ または $1.0 \times 10^{12} \text{ GC/mL}$ の濃度で約 $2.5 \times 10^{11} \text{ GC/眼}$ の単回用量で網膜下送達によって投与され、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターは、AAV8ベクターである、方法。

【請求項 2】

投与することが、網膜下薬物送達デバイスを使用して発現ベクターを網膜下腔中に注入することによる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

投与することが、抗hVEGF抗体の治療上有効な量を前記ヒト対象の網膜に送達する、請求項1～2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 4】

抗hVEGF抗体の治療上有効な量が、前記ヒト対象のヒト網膜細胞によって産生される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

抗hVEGF抗体の治療上有効な量が、前記ヒト対象のヒト光受容体細胞、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

ヒト光受容体細胞が、錐体細胞および／または桿体細胞である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

網膜神経節細胞が、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリアである、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

発現ベクターが、CB7プロモーターを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

発現ベクターが構築物IIである、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

製剤化バッファー（ $\text{pH} = 7.4$ ）中に $6.2 \times 10^{11} \text{ GC/mL}$ の濃度で $1.6 \times 10^{11} \text{ GC}$ または $1.0 \times 10^{12} \text{ GC/mL}$ の濃度で $2.5 \times 10^{11} \text{ GC}$ の抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーは、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.001% Pluronic F68を含み、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターは、AAV8ベクターである、単回用量組成物。

【請求項 11】

発現ベクターが構築物IIである、請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

投与ステップ後に、赤外線サーマルカメラを使用して眼における注入された物質の眼注入後熱プロファイルをモニタリングするステップをさらに含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

赤外線サーマルカメラが、FLIRT530赤外線サーマルカメラである、請求項12に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

DRを有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中的網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子(hVEGF)抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターの眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーは、二重上脈絡膜注入によって投与され、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターは、AAV8ベクターである、方法。

【請求項 15】

DRを有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中的網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子(hVEGF)抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターの眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーは、二重上脈絡膜注入によって投与され、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターは、AAV8ベクターである、方法。

【請求項 16】

投与することが、抗hVEGF抗体の治療上有効な量を前記ヒト対象の網膜に送達する、請求項14～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

抗hVEGF抗体の治療上有効な量が、前記ヒト対象のヒト網膜細胞によって産生される、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

抗hVEGF抗体の治療上有効な量が、前記ヒト対象のヒト光受容体細胞、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

ヒト光受容体細胞が、錐体細胞および／または桿体細胞である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

網膜神経節細胞が、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリアである、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

発現ベクターが、CB7プロモーターを含む、請求項14～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

発現ベクターが構築物IIである、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

投与ステップ後に、赤外線サーマルカメラを使用して眼における注入された物質の眼注入後熱プロファイルをモニタリングするステップをさらに含む、請求項14～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

赤外線サーマルカメラが、FLIRT530赤外線サーマルカメラである、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

製剤化バッファー(pH=7.4)中に眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピー、眼あたり 1.6×10^{11} ゲノムコピー、眼あたり 2.5×10^{11} ゲノムコピー、眼あたり 5.0×10^{11} ゲノムコピーまたは眼あたり 3.0×10^{12} ゲノムコピーの抗ヒト血管内皮増殖因子(hVEGF)抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーは、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.0001% Pluronic F68を含み、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含

10

20

30

40

50

み、発現ベクターは、A A V 8 ベクターである、単回用量組成物。

【請求項 26】

発現ベクターが構築物 I I である、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

発現ベクターの脱落をもたらさない、請求項 1～9 および 12～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

1000 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、500 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、100 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、50 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満または 10 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満が、投与後任意の時点で生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である、請求項 1～9 および 12～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 29】

210 発現ベクター遺伝子コピー／5 μl 以下が、投与後任意の時点で生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である、請求項 1～9 および 12～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

1000 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、500 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、100 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、50 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満または 10 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満が、投与後 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 週まで生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である、請求項 1～9 および 12～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 31】

ベクター遺伝子コピーが、ベクターの投与後 14 週まで生物学的流体において検出可能ではない、請求項 1～9 および 12～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

生物学的流体が、涙、血清または尿である、請求項 28～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 8 月 26 日に出願された米国仮出願第 62/891,799 号、2019 年 9 月 18 日に出願された米国仮出願第 62/902,352 号および 2020 年 4 月 2 日に出願された米国仮出願第 63/004,258 号の利益を主張し、それらの各々の開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された配列表への言及

本出願は、2020 年 8 月 12 日に作成され、97,447 バイトの大きさを有する「12656-127-228__Sequence__Listing.TXT」と題されたテキストファイルとして本出願とともに提出された配列表を参照により組み込む。

40

血管内皮増殖因子（「VEGF」）に対する完全ヒト翻訳後修飾（HuPTM）モノクローナル抗体（「mAb」）または mAb の抗原結合性断片、例えば、完全ヒトグリコシル化（HuGly）抗 VEGF 抗原結合性断片などの、眼疾患、特に、新血管新生の増大によって引き起こされる眼疾患、例えば、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象の眼中の網膜／硝子体液への送達のための組成物および方法が記載されている。

【背景技術】

【0003】

糖尿病性眼疾患は、米国における労働年齢の成人における視力障害の筆頭原因であり、

50

40歳以上の糖尿病を有する成人における罹病率は、およそ28.4%（420万人の成人）である（AAO PPP Retina/Vitreous Panel, Hoskins Center for Quality Eye Care, “Diabetic retinopathy PPP - Updated 2017”）。米国および他の先進国全体での糖尿病の増加率を考えると、糖尿病性網膜症（DR）の社会的影響および失明に対する影響は増大すると予測される。網膜の専門家は、糖尿病の他の全身性合併症に先行することがしばしばある糖尿病性眼疾患の予防、診断および管理において自身が重要な役割を果たすことを認識している。労働年齢集団において視力を脅かす糖尿病性合併症を制限する可能性は、公衆衛生に対して大きな影響を有する可能性がある。

糖尿病性網膜症は、糖尿病の眼の合併症であり、毛細血管瘤、硬性白斑、出血および非増殖形態の静脈異常および新血管新生、網膜前または硝子体出血および増殖形態の血管結合組織増殖を特徴とする。高血糖症は、微小血管網膜変化を誘発し、かすみ目、暗い点または点滅する光および突然の視力喪失につながる（Cai & McGinnis, 2016, Journal of Diabetes Research, Vol. 2016, Article ID 3789217）。

10

【0004】

糖尿病性網膜症は、軽度の非増殖性疾患から重症増殖性疾患に及ぶ。非増殖性糖尿病性網膜症（NPDR）の最も一般的な早期に臨床的に目に見える徴候として、毛細血管瘤形成および網膜内出血が挙げられる。微小血管損傷は、網膜毛細血管非灌流、綿花状白斑、出血数の増大、静脈異常および網膜内微小血管異常につながる。疾患の過程のどの段階でも、血管透過性の増大は、網膜肥厚（浮腫）および／または滲出液をもたらし、これは、中心視力（VA）の喪失につながる場合がある。増殖性糖尿病性網膜症（PDR）段階は、網膜、視神経乳頭または前眼部での新規血管の二次増殖に伴う細動脈および細静脈の閉鎖に起因する。患者の視力を危険にさらし、緊急の医学的または外科的介入のいずれかを必要とするDRの一般的な合併症として、中心窩を侵している（center involved）糖尿病性黄斑浮腫（CIEDME）、牽引性網膜剥離、網膜上膜および硝子体出血が挙げられる。DMEは、DRのいずれの段階でも存在し得るが、これらの合併症のリスクは、普通、DRの重症度が増大するにつれ増大する（Aiello et al., 1994, N Engl J Med. 331(22):1480-1487）。糖尿病性虚血と血管内皮増殖因子（VEGF）を含む血管新生因子のその後の増殖との間の関連が確立されている。

20

【0005】

1990年代からの画期的な早期処置糖尿病性網膜症研究（Early Treatment Diabetic Retinopathy Study）（ETDRS）研究では、ベースラインで重症NPDRを有する患者は、PDRへ進行するおよそ50%のリスクおよびハイリスクPDRを発症する15%のリスクを有していた。さらに、極めて重症のNPDRを有する患者については、ハイリスクPDRへと悪化するそのリスクは、1年以内に75%に増大する。糖尿病性眼研究における患者の平均年齢がおよそ50歳であることを考慮して、PDRおよびその関連する視力を脅かす合併症への変換を避けることは、患者の生活の質を数十年間改善する可能性がある。結果として、NPDRおよび非ハイリスクPDR（軽度～中程度PDR）の予防的処置についての決定に関しては、網膜コミュニティ内で議論が進行中である。

30

【発明の概要】

【0006】

VEGFに対する完全ヒト翻訳後修飾（HuPTM）抗体を、眼疾患、特に、新血管新生の増大によって引き起こされる眼疾患、例えば、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中の網膜／硝子体液への送達のための組成物および方法が記載されている。ある特定の態様では、VEGFに対する完全ヒト翻訳後修飾（HuPTM）抗体の、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中の網膜下腔への網膜下投与のための組成物および方法が本明細書に記載されている。抗体には、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え生成された抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、2つの重鎖および2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量

40

50

体、抗体軽鎖－重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、一価抗体、全長抗体の抗原結合性断片および上記のものの融合タンパク質が含まれる。このような抗原結合性断片には、それだけには限らないが、単ドメイン抗体（重鎖抗体の可変ドメイン（V H H）またはナノボディ）、全長抗 V E G F 抗体（好ましくは、全長抗 V E G F モノクローナル抗体（m A b）の F a b、F（a b'）₂および s c F v（単鎖可変断片）（まとめて本明細書において「抗原結合性断片」と呼ばれる）が含まれる。好ましい実施形態では、V E G F に対する完全ヒト翻訳後修飾抗体は、V E G F に対するモノクローナル抗体（m A b）の完全ヒト翻訳後修飾抗原結合性断片（「H u P T M F a b V E G F i」）である。さらに好ましい実施形態では、H u P T M F a b V E G F i は、抗 V E G F m A b の完全ヒトグリコシル化抗原結合性断片（「H u G l y F a b V E G F i」）である。代替実施形態では、全長 m A b を使用できる。好ましい実施形態では、送達は、遺伝子療法を介して、例えば、抗 V E G F 抗原結合性断片または m A b（または高度グリコシル化誘導体（例えば、図 3 を参照されたい））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、糖尿病性網膜症（D R）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中的の上脈絡膜腔、網膜下腔（経硝子体アプローチから、または上脈絡膜腔を通るカテーテルを用いて）、網膜内腔、硝子体腔および／または強膜の外表面（すなわち、強膜近傍投与）へ投与して、ヒト P T M、例えば、ヒトグリコシル化、導入遺伝子産物を持続的に供給する眼中的持続的なデポを作成することによって達成される。好ましい実施形態では、導入遺伝子を送達するために使用されるウイルスベクターは、ヒト網膜細胞または光受容体細胞に対する指向性を有するべきである。このようなベクターとして、非複製性組換えアデノ随伴ウイルスベクター（「r A A V」）を挙げることができ、特に、A A V 8 カプシドを保有するものが好ましい。特定の実施形態では、本明細書において記載されるウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物は構築物 I であり、構築物 I は、以下の構成成分：（１）発現カセットに隣接する A A V 8 逆方向末端反復配列、（２）a）C M V エンハンサー／ニワトリβ－アクチンプロモーターを含む C B 7 プロモーター、b）ニワトリβ－アクチンイントロンおよび c）ウサギβ－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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 A リンカーによってわけられた抗 V E G F 抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。別の特定の実施形態では、本明細書において記載されるウイルスベクターまたは他の D N A 発現構築物は構築物 I I であり、構築物 I I は、以下の構成成分：（１）発現カセットに隣接する A A V 2 逆方向末端反復配列、（２）a）C M V エンハンサー／ニワトリβ－アクチンプロモーターを含む C B 7 プロモーター、b）ニワトリβ－アクチンイントロンおよび c）ウサギβ－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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 A リンカーによってわけられた抗 V E G F 抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。

【 0 0 0 7 】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（D R）を有する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産生される抗 h V E G F 抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（D R）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗 h V E G F 抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中的の上脈絡膜腔、網膜下腔（硝子体切除術を用いて、または硝子体切除術を用いずに）、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポ手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によ

10

20

30

40

50

って)、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症(DR)を処置する方法であって、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、微量注入器の使用によって、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

【0008】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(DR)を有する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(例えば、錐体細胞および／または桿体細胞)、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞(例えば、ミジェット細胞(midget cells)、パラソル細胞(parasol cells)、重層状細胞(bistratified cell)、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア)および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症(DR)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面へ投与することによって(例えば、上脈絡膜注入(例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による)、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与(例えば、上脈絡膜腔を通過して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技)または後強膜近傍デポー手順(例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる)によって)、前記ヒト対象の網膜に、ヒト光受容体細胞(例えば、錐体細胞および／または桿体細胞)、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞(例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア)および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

【0009】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(DR)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症(DR)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面へ投与することによって(例えば、上脈絡膜注入(例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による)、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与(例えば、上脈絡膜腔を通過して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技)または後強膜近傍デポー手順(例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる)によって)、前記ヒト対象の眼に、ヒト網膜細胞によって産生され

10

20

30

40

50

る抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、微量注入器の使用によって、前記ヒト対象の眼に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

【0010】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、ヒト光受容体細胞（例えば、錐体細胞および／または桿体細胞）、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア）および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポー手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によって）、前記ヒト対象の眼に、ヒト光受容体細胞（例えば、錐体細胞および／または桿体細胞）、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア）および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

【0011】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポー手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によって）、前記ヒト対象の眼に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

【0012】

ある特定の態様では、網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、ヒト光受容体細胞（例えば、錐体細胞および／または桿体細胞）、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア）および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポー手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によって、前記ヒト対象の眼に、ヒト光受容体細胞（例えば、錐体細胞および／または桿体細胞）、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア）および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

10

20

【0013】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有する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産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポー手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によって）、前記ヒト対象の網膜に、ヒト網膜細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

30

【0014】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有する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（例えば、錐体細胞および／または桿体細胞）、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞（例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリア）および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗hVEGF抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網

40

50

膜下薬物送達デバイスによる外科手技) または後強膜近傍デポ手順 (例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる) によって)、前記ヒト対象の網膜に、ヒト光受容体細胞 (例えば、錐体細胞および/または桿体細胞)、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞 (例えば、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および/またはミュラーグリア) および/または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される抗hVEGF抗体の治療上有効量を送達することを含む方法が、本明細書において記載される。

特定の態様では、方法は、前記ヒト患者の眼で硝子体切除術を実施することを含む。特定の態様では、硝子体切除術は、部分硝子体切除術である。

特定の態様では、投与ステップは、硝子体内薬物送達デバイスを使用して組換えウイルスベクターを硝子体腔中に注入することによる。特定の態様では、硝子体内薬物送達デバイスは、微量注入器である。

【0015】

ヒト網膜細胞によって産生される抗ヒト血管内皮増殖因子(hVEGF)抗体、例えば、抗hVEGF抗原結合性断片が、本明細書において記載される。ヒトVEGF(hVEGF)は、VEGF(VEGFA、VEGFB、VEGFCまたはVEGFD)遺伝子によってコードされるヒトタンパク質である。hVEGFの例示的アミノ酸配列は、GenBank受託番号AAA35789.1で見出すことができる。hVEGFの例示的核酸配列は、GenBank受託番号M32977.1で見出すことができる。

【0016】

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片は、配列番号14~16の軽鎖CDR1~3ならびに配列番号17~19または配列番号20、18および21の重鎖CDR1~3を含む。

【0017】

本明細書において記載される方法の特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14~16の軽鎖CDR1~3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1~3を含み、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基(すなわち、QQYSTVPWTF(配列番号16)中の第2のQ)は、以下の化学修飾: 酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化(ピロGlu)のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14~16の軽鎖CDR1~3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1~3を含み、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基(すなわち、SASQDISNYLN(配列番号14)中の2つのNは各々、以下の化学修飾: 酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化(ピロGlu)のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基(すなわち、QQYSTVPWTF(配列番号16)中の第2のQ)は、以下の化学修飾: 酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化(ピロGlu)のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14~16の軽鎖CDR1~3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1~3を含み、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基(すなわち、SASQDISNYLN(配列番号14)中の2つのNは各々、以下の化学修飾: 酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化(ピロGlu)のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基(すなわち、QQYSTVPWTF(配列番号16)中の第2のQ)は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14~16の軽鎖CDR1~3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1~3を含み、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基(すなわち、SASQDISNYLN(配列番号14)中の2つのNは各々、以下の化学修飾: 酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化(ピロGlu)のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基(すなわち、QQYSTVPWTF(配列番号16)中の第2のQ)は、アセチル化されていない。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学

10

20

30

40

50

修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0018】

本明細書において記載される方法の特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわちWINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわちGYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）はアセチル化されていない。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0019】

本明細書において記載される方法の特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない、ならびに（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミ

ノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない、ならびに（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

10

20

【0020】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含み、前記抗原結合性断片が、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカン含有する方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技）または後強膜近傍デポー手順（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる）によって）、前記ヒト対象の眼に、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含み、前記抗原結合性断片が、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカン含有する方法が、本明細書において記載される。

30

【0021】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼に、hVEGFに対するmAbのグリコシル化抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含み、前記抗原結合性断片が、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない（すなわち、本明細書において、「検出可能な」とは、以下に記載される標準アッセイによって検出可能なレベルを意味する）方法が、本明細書において記載される。特定の実施形態では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbのグリコシル化抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与することによって（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた

40

50

微量注入器による)、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与(例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによる外科手技)または後強膜近傍デポ手順(例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニユーレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによる)によって)、前記ヒト対象の眼に、h V E G F に対する m A b のグリコシル化抗原結合性断片の治療上有効量を送達することを含み、前記抗原結合性断片が、検出可能な N e u G c および / または α - G a l 抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。

【0022】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(D R)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に、h V E G F に対する m A b の抗原結合性断片をコードする発現ベクターを投与すること(例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポ手順によって)を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に α 2 , 6 - シアリル化される方法が、本明細書において記載される。

【0023】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(D R)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、h V E G F に対する m A b の抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜に投与または送達すること(例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による)を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に α 2 , 6 - シアリル化される方法が、本明細書において記載される。

【0024】

ある特定の態様では、網膜症(D R)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、h V E G F に対する m A b の抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および / または網膜内腔へ投与すること(例えば、上脈絡膜腔を通して挿入し、トンネルを形成できるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって)を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に α 2 , 6 - シアリル化される方法が、本明細書において記載される。ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(D R)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、h V E G F に対する抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与すること(例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポ手順によって)を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に α 2 , 6 - シアリル化され、前記抗原結合性断片が、検出可能な N e u G c および / または α - G a l 抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。

【0025】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症(D R)を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、h V E G F に対する抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜へ投与または送達すること(例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による)を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に α 2 , 6 - シアリル化され、前記抗原結合性断片が、検出可能な N e u G c および / または α - G a l 抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。

。

10

20

30

40

50

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対する抗原結合性断片をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下腔および／または網膜内へ投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、前記抗原結合性断片の発現が、ヒト不死化網膜由来細胞における前記発現ベクターからの発現の際に $\alpha 2, 6$ -シアリル化され、前記抗原結合性断片が、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。

【0026】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面へ、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を投与すること（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって）を含み、その結果、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカンを含有する前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成される方法が、本明細書において記載される。

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜に投与または送達すること（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）を含み、その結果、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカンを含有する前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成される方法が、本明細書において記載される。

【0027】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔に投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカンを含有する前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成される方法が、本明細書において記載される。

【0028】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与すること（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成され、前記抗原結合性断片がグリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。

【0029】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜に投与または送達すること（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成され、前記抗原結合性断片が、グリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない方法が、本明細書において記載され

10

20

30

40

50

る。

【0030】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔に投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成され、前記抗原結合性断片が、グリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下腔および／または網膜内腔に投与することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、発現ベクターは、 6.4×10^{11} GC/mLの濃度で約 1.6×10^{11} GC/眼または 1.0×10^{12} GC/mLの濃度で約 2.5×10^{11} GC/眼の単回用量で網膜下送達によって投与される。

10

【0031】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔へ投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成され、前記抗原結合性断片が、グリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含有しない方法が、本明細書において記載される。ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔へ投与することを含む方法が、本明細書において記載される。特定の態様では、発現ベクターは、 6.2×10^{11} GC/mLの濃度で約 1.6×10^{11} GC/眼または 1.0×10^{12} GC/mLの濃度で約 2.5×10^{11} GC/眼の単回用量で網膜下送達によって投与される。特定の態様では、発現ベクターは、 6.2×10^{11} GC/mLの濃度で約 1.55×10^{11} GC/眼または 1.0×10^{12} GC/mLの濃度で約 2.5×10^{11} GC/眼の単回用量で網膜下送達によって投与される。

20

30

特定の態様では、抗hVEGF抗体は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1または配列番号3のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。特定の態様では、発現ベクターは、AAV8ベクターである。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片導入遺伝子は、リーダーペプチドをコードする。リーダーペプチドはまた、本明細書においてシグナルペプチドまたはリーダー配列と呼ばれる場合もある。

40

【0032】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与すること（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって）を含み、その結果、 $\alpha 2, 6$ -シアリル化グリカンを含有する前記抗原結合性断片を放出するデポーが形成され、前記組換えベクターが、培養中のPERC6またはRPE細胞に形質導入するために使用される場合に、前記細胞培養において

50

$\alpha 2$, 6 -シアリル化グリカンを含む前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

【0033】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）（特に、滲出型AMD）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜に投与または送達すること（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）を含み、その結果、 $\alpha 2$, 6 -シアリル化グリカンを含む前記抗原結合性断片を放出するデポが形成され、前記組換えベクターが、培養中のPER.C6またはRPE細胞に形質導入するために使用される場合に、前記細胞培養において $\alpha 2$, 6 -シアリル化グリカンを含む前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

10

【0034】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔に投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、 $\alpha 2$, 6 -シアリル化グリカンを含む前記抗原結合性断片を放出するデポが形成され、前記組換えベクターが、培養中のPER.C6またはRPE細胞に形質導入するために使用される場合に、前記細胞培養において $\alpha 2$, 6 -シアリル化グリカンを含む前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

20

【0035】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に投与すること（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポ手順によって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポが形成され、前記抗原結合性断片が、グリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含むせず、前記組換えベクターが、培養中のPER.C6またはRPE細胞に形質導入するために使用される場合に、前記細胞培養においてグリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含むしない前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

30

【0036】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、hVEGFに対するmAbの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔へ投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポが形成され、前記抗原結合性断片が、グリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含むせず、前記組換えベクターが、培養中のPER.C6またはRPE細胞に形質導入するために使用される場合に、前記細胞培養においてグリコシル化されるが、検出可能なNeuGcおよび／または α -Gal抗原を含むしない前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

40

【0037】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置す

50

る方法であって、h V E G Fに対するm A bの抗原結合性断片をコードする組換えヌクレオチド発現ベクターの治療上有効量を、前記ヒト対象の眼中の上脈絡膜腔を経て前記ヒト対象の網膜下および／または網膜内腔へ投与すること（例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスによって）を含み、その結果、前記抗原結合性断片を放出するデポが形成され、前記抗原結合性断片が、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 α -G a l抗原を含有せず、前記組換えベクターが、培養中の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に、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 α -G a l抗原を含有しない前記抗原結合性断片の生成をもたらす方法が、本明細書において記載される。

10

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、ヒト対象は、> 6 9 E T D R S文字（近似スネレン等価物2 0 / 4 0以上）の最高矯正視力（B C V A）を有する。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、B C V Aは、ヒト対象において処置されるべき眼におけるB C V Aである。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、眼に送達することは、眼の網膜、脈絡膜、および／または硝子体液に送達することを含む。本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片は、C末端に1、2、3または4個の追加のアミノ酸を含む重鎖を含む。

20

【0038】

このような遺伝子療法が投与される対象は、抗V E G F療法に対して応答性であるものであるべきである。特定の実施形態では、方法は、網膜症（D R）を有すると診断されており、抗V E G F抗体を用いる処置に対して応答性であると同定されている患者を処置することを包含する。より具体的な実施形態では、患者は、抗V E G F抗原結合性断片を用いる処置に対して応答性である。ある特定の実施形態では、患者は、遺伝子療法を用いる処置の前に硝子体内に注入される抗V E G F抗原結合性断片を用いる処置に対して応答性であると示されていた。具体的な実施形態では、患者は、これまでに、ルセンチス（登録商標）（ラニビズマブ）、E Y L E A（登録商標）（アフリベルセプト）および／またはアバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）を用いて処置されており、前記ルセンチス（登録商標）（ラニビズマブ）、E Y L E A（登録商標）（アフリベルセプト）および／またはアバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）のうち1種または複数に対して応答性であるとわかっていた。

30

【0039】

このようなウイルスベクターまたは他のD N A発現構築物が送達される対象は、ウイルスベクターまたは発現構築物中の導入遺伝子によってコードされた抗h V E G F抗原結合性断片に対して応答性であるべきである。応答性を決定するために、抗V E G F抗原結合性断片導入遺伝子産物（例えば、細胞培養物、バイオリアクターなどにおいて産生される）を、硝子体内注入などによって対象に直接投与してもよい。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片は、C末端に追加のアミノ酸を含まない重鎖を含む。

40

【0040】

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片分子の集団を生成し、抗原結合性断片分子は重鎖を含み、抗原結合性断片分子の集団のうち0 . 5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %または2 0 %以下が、重鎖のC末端に1、2、3または4個の追加のアミノ酸を含む。本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片分子の集団を生成し、抗原結合性断片分子は重鎖を含み、抗原結合性断片分子の集団の0 . 5 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、1 0 %または2 0 %以下であるが0 %より多くが、重鎖のC末端に1、2、3または4個の追加のアミノ酸を含む。

本明細書において記載される方法のある特定の態様では、抗原結合性断片分子の集団を

50

生成し、抗原結合性断片分子は重鎖を含み、抗原結合性断片分子の集団の0.5~1%、0.5%~2%、0.5%~3%、0.5%~4%、0.5%~5%、0.5%~10%、0.5%~20%、1%~2%、1%~3%、1%~4%、1%~5%、1%~10%、1%~20%、2%~3%、2%~4%、2%~5%、2%~10%、2%~20%、3%~4%、3%~5%、3%~10%、3%~20%、4%~5%、4%~10%、4%~20%、5%~10%、5%~20%または10%~20%が、重鎖のC末端に1、2、3または4個の追加のアミノ酸を含む。

【0041】

導入遺伝子によってコードされるHuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFiとして、それだけには限らないが、hVEGFと結合する抗体の抗原結合性断片、例えば、ベバシズマブ、抗hVEGF Fab部分、例えば、ラニズマブまたはFabドメインに追加のグリコシル化部位を含有するように操作されたようなベバシズマブもしくはラニズマブFab部分を挙げるができる（例えば、全長抗体のFabドメインで高度グリコシル化されているベバシズマブの誘導体の説明については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Courtois et al., 2016, mAbs 8: 99-112を参照されたい）。

【0042】

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、ヒト網膜細胞または光受容体細胞に対する指向性を有するべきである。このようなベクターとして、非複製性組換えアデノ随伴ウイルスベクター（「rAAV」）を挙げることができ、特に、AAV8カプシドを有するものが好ましい。しかし、それだけには限らないが、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターを含む他の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発現ベクターを使用してもよい。好ましくは、HuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFi、導入遺伝子は、適当な発現制御エレメント、2、3例を挙げると、例えば、CB7プロモーター（ニワトリβ-アクチンプロモーターおよびCMVエンハンサー）、RPE65プロモーターまたはオブシンプロモーターによって制御されるべきであり、ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を増強する他の発現制御エレメント（例えば、イントロン、例えば、ニワトリβ-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末端切断型イントロン1）、β-グロブリンスプライスドナー/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプターイントロン、アデノウイルススプライスドナー/免疫グロブリンスプライスアクセプターイントロン、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）イントロンおよびハイブリッド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らびにポリAシグナル、例えば、ウサギβ-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）を挙げるができる。例えば、Powell and Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57を参照されたい。

【0043】

遺伝子療法構築物は、重鎖および軽鎖両方が発現されるように設計される。より詳しくは、重鎖および軽鎖は、ほぼ等量で発現されるべきである、言い換えれば、重鎖および軽鎖は、およそ1:1の重鎖対軽鎖の比で発現される。重鎖および軽鎖のコード配列は、重鎖および軽鎖が切断可能なリンカーまたはIRESによってわけられ、その結果、別個の重鎖および軽鎖ポリペプチドが発現される単一構築物中で操作され得る。例えば、本明細書において提供される方法および組成物とともに使用できる、特定のリーダー配列については節5.2.4ならびに特定のIRES、2Aおよび他のリンカー配列については節5.2.5を参照されたい。

【0044】

ある特定の実施形態では、遺伝子療法構築物は、製剤化バッファー中のAAVベクター有効成分の凍結滅菌単回使用溶液として供給される。特定の実施形態では、網膜下投与に

10

20

30

40

50

適した医薬組成物は、生理学的に適合する水性バッファー、界面活性剤および任意選択の賦形剤を含む製剤化バッファー中の組換え（例えば、rHuGlyFabVEGF β ）ベクターの懸濁液を含む。特定の実施形態では、構築物は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.001%のPluronic F68、pH=7.4中で製剤化される。

【0045】

ある特定の実施形態では、遺伝子療法構築物は、製剤化バッファー中のAAVベクター有効成分の凍結滅菌単回使用溶液として供給される。特定の実施形態では、上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与に適した医薬組成物は、生理学的に適合する水性バッファー、界面活性剤および任意選択の賦形剤を含む製剤化バッファー中の、組換え（例えば、rHuGlyFabVEGF β ）ベクターの懸濁液を含む。

10

【0046】

組換えベクターの治療上有効な用量は、 $\geq 0.1\text{ mL} \sim \leq 0.5\text{ mL}$ の範囲の容量で、好ましくは、 $0.1 \sim 0.30\text{ mL}$ （ $100 \sim 300\text{ }\mu\text{L}$ ）で、最も好ましくは、 0.25 mL （ $250\text{ }\mu\text{L}$ ）の容量で網膜下および／または網膜内に（例えば、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入または上脈絡膜腔を経る網膜下投与によって）投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、上脈絡膜に（例えば、上脈絡膜注入によって）、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $50 \sim 100\text{ }\mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、強膜の外表面に（例えば、後強膜近傍デポー手順によって）、 $500\text{ }\mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $10 \sim 20\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20 \sim 50\text{ }\mu\text{L}$ 、 $50 \sim 100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100 \sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $200 \sim 300\text{ }\mu\text{L}$ 、 $300 \sim 400\text{ }\mu\text{L}$ または $400 \sim 500\text{ }\mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。網膜下注入は、訓練された網膜外科医によって実施される外科手技であり、対象を局所麻酔下にする硝子体切除術および網膜への遺伝子療法の網膜下注入を含む（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるCampochiaro et al., 2017, Hum Gen Ther 28(1):99-111を参照されたい）。特定の実施形態では、網膜下投与は、薬物を網膜下腔に注入する上脈絡膜カテーテルを使用して上脈絡膜腔を経て実施される、例えば、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイス（例えば、その各々が、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Baldassarre et al., 2017, Subretinal Delivery of Cells via the Suprachoroidal Space: Janssen Trial. In: Schwartz et al. (eds) Cellular Therapies for Retinal Disease, Springer, Cham、国際特許出願公開番号WO2016/040635を参照されたい）。上脈絡膜投与手順は、眼の上脈絡膜腔への薬物の投与を含み、普通、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器を使用して実施される（例えば、その各々が、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87を参照されたい）。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔中に発現ベクターを蓄積するために使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達デバイス（例えば、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23を参照されたい）およびMedOne上脈絡膜カテーテルが挙げられる。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔を経て網膜下腔中に発現ベクターを蓄積するために使用できる網膜下薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Janssen Pharmaceuticals, Inc.によって製造された網膜下薬物送達デバイス（例えば、国際特許出願公開番号WO2016/040635を参照されたい）が挙げられる。特定の実施形態では、強膜の外表面への投与は、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによって実施される。異なる投与様式の詳細については節5.3.2を参照されたい。上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与は、可溶性導入遺伝子産物の、網膜、硝子体液およ

20

30

40

50

び／または眼房水への送達をもたらすはずである。網膜細胞、例えば、桿体、錐体、網膜色素上皮、水平、双極性、アマクリン、神経節、および／またはミュラー細胞による導入遺伝子産物（例えば、コードされる抗VEGF抗体）の発現は、網膜、硝子体液および／または眼房水における導入遺伝子産物の送達および維持をもたらす。特定の実施形態では、硝子体液において少なくとも $0.330\mu\text{g}/\text{mL}$ の、または眼房水（眼の前房）において $0.110\mu\text{g}/\text{mL}$ のCminの導入遺伝子産物の濃度を3ヶ月間維持する用量が望まれ、その後、 $1.70\sim 6.60\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の導入遺伝子産物の硝子体のCmin濃度、および／または $0.567\sim 2.20\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の眼房Cmin濃度が維持されるべきである。しかし、導入遺伝子産物は、持続的に産生されるので、低濃度の維持が有効であり得る。導入遺伝子産物の濃度は、処置された眼の前房から得た硝子体液および／または眼房の患者サンプルにおいて測定できる。あるいは、硝子体液濃度は、導入遺伝子産物の患者の血清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できる－導入遺伝子産物に対する全身対硝子体曝露の比は、約1:90,000である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Xu L, et al., 2013, Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 54: 1616-1624において1621頁および1623頁の表5で報告されたラニビズマブの硝子体液および血清濃度を参照されたい）。

10

【0047】

特定の実施形態では、網膜下投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムを含む網膜下薬物送達デバイスを用いて実施される（図9Aおよび9Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。ある特定の実施形態では、微小容量注入器のために使用できる微小容量注入送達システムは、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、上脈絡膜ニードル（例えば、Clearside（登録商標）ニードル）、網膜下ニードル、硝子体内ニードル、強膜近傍ニードル、結膜下ニードルおよび／または網膜内ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c） $10\mu\text{L}$ の増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること、（e） $400\mu\text{L}$ のシリンジ用量、（f）デジタル誘導された送達、（g）デジタル記録された送達、および（h）アグノスティックな先端（例えば、網膜下送達のためにMedOne 38gニードルおよびDorc 41gニードルを使用でき、一方で、網膜下送達のために、Clearside（登録商標）ニードルおよびVisionist OYアダプターを使用できる）が挙げられる。

20

30

【0048】

本明細書において記載される方法のある特定の実施形態では、組換えベクターは、上脈絡膜に投与される（例えば、上脈絡膜注入によって）。特定の実施形態では、上脈絡膜投与（例えば、上脈絡膜腔への注入）は、上脈絡膜薬物送達デバイスを使用して実施される。上脈絡膜薬物送達デバイスは、眼の上脈絡膜腔への薬物の投与を含む上脈絡膜投与手順において使用されることが多い（例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; Baldassarre et al., 2017を参照されたい）。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔中に組換えベクターを蓄積するために使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達

40

50

デバイス（例えば、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23を参照されたい）およびMedOne上脈絡膜カテーテルが挙げられる。別の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスは、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される（図9Aおよび9Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）微小容量注入送達システムを含む。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような、高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御する低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、上脈絡膜ニードル（例えば、Clearside（登録商標）ニードル）または網膜下ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c）10 μ Lの増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること、（e）400 μ Lのシリンジ用量、（f）デジタル誘導された送達、（g）デジタル記録された送達、および（h）アグノスティックな先端（例えば、網膜下送達のためにMedOne 38gニードルおよびDorc 41gニードルを使用でき、一方で、上脈絡膜送達のために、Clearside（登録商標）ニードルおよびVisionist IOYアダプターを使用できる）。別の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスは、Visionist IOYによって製造されるアダプターを（好ましくは、ニードルガイドも）有する通常の長さの皮下ニードルを含むツールであり、アダプターは、通常の長さの皮下ニードルを、アダプターから露出するニードルの先端の長さを制御することによって上脈絡膜ニードルにする（図8を参照されたい）（例えば、米国意匠特許番号D878,575および国際特許出願公開番号WO/2016/083669を参照されたい）。特定の実施形態では、上脈絡膜薬物送達デバイスは、1ミリメートルの30ゲージニードルを備えたシリンジである（図5を参照されたい）。このデバイスを使用する注入の際、ニードルが強膜の基部に貫通し、薬物を含有する流体が上脈絡膜腔に入り、上脈絡膜腔の拡大につながる。結果として、注入の際に触覚的および視覚的フィードバックがある。注入後、流体は後側に流れ、脈絡膜および網膜において優位に吸収される。これは、すべての網膜細胞層および脈絡膜細胞からの治療生成物の生成をもたらす。この種のデバイスおよび手順を使用することで、合併症のリスクの低い迅速で、容易なオフィス内手順が可能となる。上脈絡膜腔中に100 μ Lの最大容量を注入できる。

10

20

30

40

50

【0049】

特定の実施形態では、硝子体内投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される、微小容量注入送達システムを含む硝子体内薬物送達デバイスを用いて実施される（図9Aおよび9Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215）、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような、高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御する低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、硝子体内ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手

、1本の指での操作、(c) $10\ \mu\text{L}$ の増分投与量の空圧駆動、(d) 硝子体切除術機器から切り離されること、(e) $400\ \mu\text{L}$ のシリンジ用量、(f) デジタル誘導された送達、(g) デジタル記録された送達、および(h) アグノスティックな先端が挙げられる。

【0050】

特定の実施形態では、強膜近傍投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムを含む強膜近傍薬物送達デバイスを用いて実施される(図9Aおよび9Bを参照されたい)(例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825および米国特許出願公開第2019/0167906を参照されたい)。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、網膜下ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、(a) より制御された送達(例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために)、(b) 1人の外科医、片手、1本の指での操作、(c) $10\ \mu\text{L}$ の増分投与量の空圧駆動、(d) 硝子体切除術機器から切り離されること、(e) $400\ \mu\text{L}$ のシリンジ用量、(f) デジタル誘導された送達、(g) デジタル記録された送達、および(h) アグノスティックな先端が挙げられる。

【0051】

ある特定の実施形態では、投与量は、患者の眼に投与される(例えば、上脈絡膜注入(例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による)、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入または上脈絡膜腔を経る網膜下投与によって)、1mlあたりのゲノムコピーまたはゲノムコピー数によって測定される。ある特定の実施形態では、1mlあたり 2.4×10^{11} ゲノムコピー~1mlあたり 1×10^{13} ゲノムコピーが投与される。特定の実施形態では、1mlあたり 2.4×10^{11} ゲノムコピー~1mlあたり 5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり 5×10^{11} ゲノムコピー~1mlあたり 1×10^{12} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり 1×10^{12} ゲノムコピー~1mlあたり 5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり 5×10^{12} ゲノムコピー~1mlあたり 1×10^{13} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約 2.4×10^{11} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約 5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約 1×10^{12} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約 5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約 1×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $3 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $6 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $4 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $2 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ ゲノムコピーが投与される。特定の実施形態では、約 3×10^9 ゲノムコピーが投与される(これは、 $250\ \mu\text{l}$ の容量で1mlあたり約 1.2×10^{10} ゲノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 1×10^{10} ゲノムコピーが投与される(これは、 $250\ \mu\text{l}$ の容量で1mlあたり約 4×10^{10} ゲノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 6×10^{10} ゲノムコピーが投与される(これは、 $250\ \mu\text{l}$ の容量で1mlあたり約 2.4×10^{11} ゲ

ノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される(これは、 $250 \mu\text{l}$ の容量で 1ml あたり約 6.2×10^{11} ゲノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される(これは、 $250 \mu\text{l}$ の容量で 1ml あたり約 6.4×10^{11} ゲノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 1.55×10^{11} ゲノムコピーが投与される(これは、 $250 \mu\text{l}$ の容量で 1ml あたり約 6.2×10^{11} ゲノムコピーに相当する)。別の特定の実施形態では、約 2.5×10^{11} ゲノムコピー ($250 \mu\text{l}$ の容量で 1ml あたり約 1.0×10^{12} に相当する) が投与される。

【0052】

ある特定の実施形態では、眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり最大 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。

ある特定の実施形態では、眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 3×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり 1ml あたり約 1.0×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり 1ml あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。

【0053】

ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり最大 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。

【0054】

ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 3×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、単回上脈絡膜注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、二重上脈絡膜注入によって眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり最大約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、 $100 \mu\text{l}$ の容量の単回上脈絡膜注入によって眼あたり 1ml あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、各注入が $100 \mu\text{l}$ の容量である二重上脈絡膜注入によって、眼あたり 1ml あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。

【0055】

本明細書で使用される場合、特に断りのない限り、用語「約」とは、所与の値または範囲のプラスまたはマイナス 10% 以内を意味する。ある特定の実施形態では、用語「約」は、列挙された正確な数字を包含する。

本発明は、経時的に消失し、ピークおよびトラフレベルをもたらす VEGF 阻害剤の高用量ボラスの反復された眼への注入を含むケア処置の標準を上回るいくつかの利点を有する。導入遺伝子産物抗体の持続発現は、抗体を反復して注入することとは対照的に、作用部位により一定レベルの抗体が存在することを可能にし、より少ない注入しか行われる必要がなく、その結果、医師にかかることがより少なくなるので、患者にとって危険性が低く、より都合がよい。一定タンパク質生成は、網膜において浮腫リバウンドが生じる可能性が低いので、より良好な臨床アウトカムにつながり得る。さらに、導入遺伝子から発現された抗体は、翻訳の間および翻訳後に存在する異なる微小環境のために、直接注入さ

10

20

30

40

50

れるものとは異なる方法で翻訳後修飾される。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、これは、作用部位に送達される抗体が、直接注入された抗体と比較して「バイオベター」であるように、異なる拡散、生理活性、分布、親和性、薬物動態および免疫原性特徴を有する抗体をもたらす。

【0056】

さらに、*in vivo*で導入遺伝子から発現される抗体は、組換え技術、例えば、タンパク質凝集およびタンパク質酸化によって生成された抗体と会合した分解生成物を含む可能性は低い。凝集は、高いタンパク質濃度、製造装置および容器との表面相互作用ならびにある特定のバッファー系を用いる精製のためにタンパク質生成および保存と関連する問題である。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は存在しない。酸化、例えば、メチオニン、トリプトファンおよびヒスチジン酸化もまた、タンパク質生成および保存と関連しており、ストレスを受ける細胞培養条件、金属および空気接触ならびにバッファーおよび賦形剤中の不純物によって引き起こされる。*in vivo*で導入遺伝子から発現されるタンパク質はまた、ストレスを受ける条件で酸化し得る。しかし、ヒトおよび多数の他の生物は、抗酸化防御システムを備えており、これは、酸化ストレスを低減するだけでなく、酸化を修復するおよび／または逆転させることもある。したがって、*in vivo*で産生されるタンパク質は、酸化形態である可能性は低い。凝集および酸化の両方とも、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。

【0057】

理論に捉われるものではないが、本明細書において提供される方法および組成物は、幾分か以下の原理に基づいている：

(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、網膜細胞におけるロバストなプロセスを含む、分泌されたタンパク質の翻訳後プロセシングの細胞機構を有する分泌細胞である。(ヒト網膜細胞によって行われる翻訳後修飾については、例えば、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれる、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た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)。

(ii) 最先端の理解に反して、抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブ（および全長抗VEGF mAbのFabドメイン、例えば、ベバシズマブ）は、実際にN結合型グリコシル化部位を有する。例えば、ラニビズマブのCHドメイン（TVSWN¹⁶⁵SGAL）中およびCLドメイン（QSGN¹⁵⁸SQE）中の非コンセンサスアスパラギナル（asparaginal）（「N」）グリコシル化部位ならびにVHドメイン（Q¹¹⁵GT）中およびVLドメイン（TFQ¹⁰⁰GT）中のグリコシル化部位であるグルタミン（「Q」）残基（およびベバシズマブのFab中の対応する部位）を同定する図1を参照されたい（抗体中のN結合型グリコシル化部位の同定については、例えば、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Valliere-Douglass et al., 2009, *J. Biol. Chem.* 284: 32493-32506およびValliere-Douglass et al., 2010, *J. Biol. Chem.* 285: 16012-16022を参照されたい）。

(iii) このような非標準部位は普通、抗体集団の低レベルグリコシル化（例えば、約1～5%）をもたらすが、機能的利点は、眼などの免疫特権を有する臓器では大きい場合がある（例えば、van de Bovenkamp et al., 2016, *J. Immunol.* 196:1435-1441を参照されたい）。例えば、Fabグリコシル化は、抗体の安定性、半減期および結合特徴に影響を及ぼし得る。抗体のその標的に対する親和性に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）または表面プラズモン共鳴（SPR）を使用できる。抗体の半減期に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術を、例

例えば、放射標識された抗体が投与されている対象中の血液または臓器（例えば、眼）における放射能のレベルの測定によって使用できる。抗体の安定性、例えば、凝集またはタンパク質アンフォールディングのレベルに対する、F a b グリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、示差走査熱量測定（D S C）、高性能液体クロマトグラフィー（H P L C）、例えば、サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー（S E C - H P L C）、キャピラリー電気泳動、質量分析または濁度測定を使用できる。本明細書において提供される、H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i、導入遺伝子は、非標準部位で 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% または 10% 以上グリコシル化されている F a b の生成をもたらす。ある特定の実施形態では、F a b の集団から 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% または 10% 以上の F a b が、非標準部位でグリコシル化されている。ある特定の実施形態では、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% または 10% 以上の非標準部位が、グリコシル化されている。ある特定の実施形態では、これらの非標準部位での F a b のグリコシル化が、H E K 2 9 3 細胞において産生された F a b におけるこれらの非標準部位のグリコシル化の量よりも 25%、50%、100%、200%、300%、400%、500% またはそれより多い。

10

(i v) グリコシル化部位に加えて、抗 V E G F F a b、例えば、ラニビズマブ（およびベバシズマブの F a b）は、C D R 中またはその付近にチロシン（「Y」）硫酸化部位を含有する、ラニビズマブの V_H（E D T A V Y⁹⁴ Y⁹⁵）および V_L（E D F A T Y⁸⁶）ドメイン中のチロシン-O-硫酸化部位（およびベバシズマブの F a b 中の対応する部位）を同定する図 1 を参照されたい。（例えば、タンパク質チロシン硫酸化に付されるチロシン残基の周囲のアミノ酸の分析については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる Yang et al., 2015, Molecules 20:2138-2164、特に p.2154 を参照されたい。「ルール」は以下のとおりにとめることができる：Y の +5 ~ -5 位置内に E または D を有する Y 残基であって、Y の -1 は、中性または酸性の荷電アミノ酸であるが、塩基性アミノ酸、例えば、硫酸化を無効にする R、K または H ではない）。ヒト I g G 抗体は、いくつかの他の翻訳後修飾、例えば、N 末端修飾、C 末端修飾、アミノ酸残基の分解または酸化、システイン関連バリエーションおよび糖化を示し得る（例えば、Liu et al., 2014, mAbs 6(5):1145-1154 を参照されたい）。

20

(v) ヒト網膜細胞による抗 V E G F F a b、例えば、ラニビズマブまたはベバシズマブの F a b 断片のグリコシル化は、グリカンの付加をもたらす、これは、導入遺伝子産物の安定性、半減期を改善し、不要な凝集および／または免疫原性を低減することができる（F a b グリコシル化の新たに出現した重要性の概要については、例えば、Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196: 1435-1441 を参照されたい）。重要なことに、本明細書において提供される H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i に付加できるグリカンは、2, 6-シアル酸を含有する高度にプロセッシングされた複合型二分岐 N グリカン（例えば、H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i に組み込むことができるグリカンを表す図 2 を参照されたい）および二分(b i s e c t i n g) G l c N A c であるが、N G N A（N-グリコリルノイラミン酸、N e u 5 G c）ではない。このようなグリカンは、ラニビズマブ中（大腸菌（E. c o l i）で作製され、全くグリコシル化されていない）に、またはベバシズマブ中（この翻訳後修飾を行うために必要な 2, 6-シアルルトランスフェラーゼを有さない C H O 細胞で作製され、C H O 細胞は二分 G l c N A c も産生しないが、N e u 5 A c（N A N A）の代わりに、ヒトにとって通常ではない（免疫原性である可能性がある）シアル酸として N e u 5 G c（N G N A）を付加する）に存在しない。例えば、Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol.（アーリーオンライン（E a r l y O n l i n e）、公開されたオンライン 2015 年 9 月 18 日、1 ~ 13 頁の p. 5）を参照されたい。さらに、C H O 細胞はまた、ほとんどの個体中に存在する抗 α - G a l 抗体と反応し、高濃度では、アナフィラキシーを引き起こす場合がある免疫原性グリカン、α - G a l 抗原を産生し得る。例えば、Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156 を参照された

30

40

50

い。本明細書において提供されるHuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iのヒトグリコシル化パターンは、導入遺伝子産物の免疫原性を低減し、有効性を改善するべきである。

(v i) 抗VEGF Fab、例えば、ラニズマブまたはベバシズマブのFab断片のチロシン硫酸化-ヒト網膜細胞におけるロバストな翻訳後プロセスは、VEGFに対するアビディティが増大した導入遺伝子産物をもたらす可能性がある。実際、他の標的に対する治療用抗体のFabのチロシン硫酸化は、抗原に対するアビディティおよび活性を著しく増大すると示されている（例えば、Loos et al., 2015, PNAS 112: 12675-12680およびChoe et al., 2003, Cell 114: 161-170を参照されたい）。このような翻訳後修飾は、ラニズマブ（大腸菌、チロシン硫酸化のために必要な酵素を有さない宿主において作製される）では存在せず、CHO細胞産物であるベバシズマブでは、多めに見積もっても存在量が少ない。ヒト網膜細胞とは異なり、CHO細胞は、分泌細胞ではなく、翻訳後チロシン硫酸化の制限された能力しか有さない（例えば、Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537、特に、p.1537の考察を参照されたい）。

10

【0058】

前述の理由のために、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iの生成は、遺伝子療法によって、例えば、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔、網膜内腔、硝子体腔または強膜の外表面に、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iをコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を投与して（例えば、上脈絡膜注入（例えば、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器による）、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって）、形質導入された網膜細胞によって産生される、完全ヒト翻訳後修飾、例えば、ヒトグリコシル化、硫酸化導入遺伝子産物を持続的に供給する眼中の持続的なデポーを作出することによって達成される糖尿病性網膜症（DR）の処置のために「バイオベター」分子をもたらすべきである。FabVEGF_iのcDNA構築物は、形質導入された網膜細胞による適切な同時翻訳および翻訳後プロセッシング（グリコシル化およびタンパク質硫酸化）を確実にするシグナルペプチドを含むべきである。網膜細胞によって使用されるこのようなシグナル配列として、それだけには限らないが、以下を挙げることができる：

20

30

・MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA（VEGF-Aシグナルペプチド）（配列番号5）

・MERAAPSRRV PLPLLLLLGGL ALLAAGVDA（フィブリリン-1シグナルペプチド）（配列番号6）

・MAPLRPLLLIL ALLAWVALA（ビトロネクチンシグナルペプチド）（配列番号7）

・MRLLAKEIICLMLWAI CVA（補体H因子シグナルペプチド）（配列番号8）

・MRLLAFLSLL ALVLQETGT（オブチシン（Opticin）シグナルペプチド）（配列番号9）

40

・MKWVTFISLLFLFSSAYS（アルブミンシグナルペプチド）（配列番号22）

・MAFLWLLSCWALLGTTFG（キモトリプシノーゲンシグナルペプチド）（配列番号23）

・MYRMQLLSCIALILALVTNS（インターロイキン-2シグナルペプチド）（配列番号24）

・MNLILLILTFVAAAVA（トリプシノーゲン-2シグナルペプチド）（配列番号25）。

使用できるシグナルペプチドについては、例えば、各々その全体が参照により本明細書

50

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を参照されたい。

【0059】

遺伝子療法に対する代替の、または追加の処置として、HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、HuGlyFabVEGF_i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し、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者に、硝子体内または網膜下注入によって投与することができる。HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、糖タンパク質はまた、糖尿病性網膜症（DR）を有する患者に投与できる。このような組換え糖タンパク質生成のために使用できるヒト細胞株として、それだけには限らないが、2、3例を挙げると、ヒト胎児腎臓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が含まれる。（HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、HuGlyFabVEGF_i糖タンパク質の組換え生成のために使用できるヒト細胞株の概要については、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol.（アーリーオンライン、公開されたオンライン2015年9月18日、1～13頁）“Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives”を参照されたい）。完全グリコシル化、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、宿主細胞を、 α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ（または α -2, 3-および α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼの両方）ならびに／または網膜細胞においてチロシン-O-硫酸化に關与するTPST-1およびTPST-2酵素を同時発現するように操作することによって、生成に使用される細胞株を増強できる。

【0060】

他の利用可能な処置の送達を伴う、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iの、眼／網膜への送達の組合せが、本明細書において提供される方法により包含される。追加の処置は、遺伝子療法処置の前、それと同時に、またはその後に投与できる。本明細書において提供される遺伝子療法と組み合わせることができるであろう糖尿病性網膜症（DR）のための利用可能な処置として、それだけには限らないが、レーザー凝固、ベルテポルフィンを用いる光線力学的療法およびそれだけには限らないが、ペガブタニブ、ラニビズマブ、アフリベルセプトまたはベバシズマブを含む抗VEGF剤を用いる硝子体内（IVT）注入が挙げられる。抗VEGF剤、例えば、生物製剤を用いる追加の処置は、「レスキュー」療法と呼ばれることもある。

【0061】

小分子薬物とは異なり、生物製剤は、普通、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修飾または形態を有する多数のバリエーションの混合物を含む。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチのいずれかで生成されたどの分子も完全にグリコシル化され、硫酸化される必要はない。むしろ、有効性を実証するために、生成された糖タンパク質の集団は、2, 6-シアリル化および硫酸化を含む十分なグリコシル化を有するべきである（集団の約1%～約10%）。本明細書において提供される遺伝子療法処置の目的は、最小の介入／侵襲的手順で網膜変性の進行を減速または停止すること、および視力の喪失を減速または防ぐことである。有効性は、BCVA（最高矯正視力）、眼球内圧、スリットランプ検査、間接眼底検査、SD-OCT（SD-光干渉断層撮影）、網膜電図検査（ERG）を測定することによってモニタリングできる。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もモニタリングできる。網膜の厚さをモニタリングして、本明細書において提供される処置の有効性を判定できる。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、網膜の厚さを、臨床読み取り値として使用でき、網膜の厚さの低減が大きいほどまたは網膜の肥厚の前の期間が長いほど、処置はより有効である。網膜の厚さは、例えば、SD-OCTによって決定できる。SD-OCTは、低コヒーレンス干渉法を使用して、目的の物体から反射された後方散乱光のエコー時間遅延と大きさを決定する3次元イメージング技術である。OCTを使用して、3～15 μ mの軸分解能

で組織サンプルの層（例えば、網膜）をスキャンでき、SD-OCTは、軸分解能およびスキャン速度をこれまでの技術の形式を上回って改善する（Schuman, 2008, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 106:426-458）。網膜機能は、例えば、ERGによって決定できる。ERGは、ヒトにおける使用のためにFDAによって承認された、網膜機能の非侵襲的電気生理学的検査であり、眼の光感受性細胞（桿体および錐体）およびその接続する神経節細胞、特に、フラッシュ刺激に対するその応答を調べる。

【0062】

好ましい実施形態では、抗原結合性断片は、検出可能なNeuGcおよび／またはα-Galを含有しない。本明細書において使用される「検出可能なNeuGcおよび／またはα-Gal」という語句は、当技術分野で公知の標準アッセイ法によって検出可能なNeuGcおよび／またはα-Gal部分を意味する。例えば、NeuGcは、NeuGcを検出する方法についての、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: Bio med. 377: 111-119に従ってHPLCによって検出できる。あるいは、NeuGcは、質量分析によって検出できる。α-Galは、ELISAを使用して、例えば、Galili et al., 1998, “A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody.” Transplantation. 65(8):1129-32を参照されたい、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を参照されたい、検出できる。Platts-Mills et al., 2015, “Anaphylaxis to the Carbohydrate Side-Chain Alpha-gal” Immunol Allergy Clin North Am. 35(2): 247-260に引用された参考文献も参照されたい。

【0063】

ある特定の態様では、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む抗VEGF抗原結合性断片（すなわち、VEGFに免疫特異的に結合する抗原結合性断片）も本明細書において提供され、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。本明細書において提供される抗VEGF抗原結合性断片は、本明細書において記載される本発明に

よる任意の方法で使用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0064】

ある特定の態様では、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む抗VEGF抗原結合性断片も本明細書において提供され、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。本明細書において提供される抗VEGF抗原結合性断片は、本明細書において記載される本発明による任意の方法で使用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0065】

ある特定の態様では、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む抗VEGF抗原結合性断片も本明細書において提供され、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、（2）軽鎖CDR1の第8

および第11のアミノ酸残基（すなわち、S A S Q D I S N Y L N（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロG l u）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖C D R 3の第2のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロG l u）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖C D R 1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖C D R 1～3を含み、重鎖C D R 1の最後のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、軽鎖C D R 3の第2のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。特定の
10 実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖C D R 1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖C D R 1～3を含み、（1）重鎖C D R 1の第9のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロG l u）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖C D R 2の第3のアミノ酸残基（すなわち、W I N T Y T G E P T Y A A D F K R（配列番号18）中のNは、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロG l u）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖C D R 1の最後のア
20 ミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、（2）軽鎖C D R 1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわちS A S Q D I S N Y L N（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロG l u）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖C D R 3の第2のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。本明細書において提供される抗V E G F抗原結合性断片は、本明細書において記載される本発明による任意の方法で使用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0066】

別の企図される投与経路として、上脈絡膜腔を通過して後極に向けて挿入し、トンネルを形成し、網膜下腔中に注入し、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを有する網膜下薬物送達デバイスを使用する、上脈絡膜腔を経る網膜下投与がある。この投与経路によって、硝子体が無傷のままであることが可能となり、したがって、合併症のリスクがより少ないこと（遺伝子療法の退出ならびに網膜剥離および黄斑円孔などの合併症のリスクが少ない）が可能となり、硝子体切除術を用いない場合、結果として生じるブレブがより拡散性に広がる可能性があり、網膜の表面積のより多くがより少ない容量で形質導入されることが可能となる。この手順後に誘導される白内障のリスクは最小化され、これはより若い患者にとって望ましいものである。さらに、この手順は、中心窩下にブレブを標準的な経硝子体アプローチよりもより安全に送達でき、これは、形質導入の標的細胞が黄斑にある、中心視野に影響を及ぼす遺伝性網膜疾患を有する患者にとって望ましいものである。この手順はまた、他の送達経路に影響を及ぼし得る全身循環中に存在するA A Vに対する中和抗体（N a b）を有する患者にとっても都合がよい。さらに、この方法
30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120 15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360 15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600 15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840 15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000 16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080 16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160 16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240 16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800 16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880 16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960 16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040 17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120 17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360 17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520 17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600 17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680 17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760 17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840 17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920 17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000 18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080 18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160 18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240 18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320 18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400 18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480 18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560 18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640 18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720 18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800 18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880 18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960 18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040 19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120 19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200 19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280 19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360 19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440 19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520 19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600 19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680 19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760 19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840 19850 19860 19870 19880 19890 19900 19910 19920 19930 19940 19950 19960 19970 19980 19990 20000 20010 20020 20030 20040 20050 20060 20070 20080 20090 20100 20110 20120 20130 20140 20150 20160 20170 20180 20190 20200 20210 20220 20230 20240 20250 20

G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである方法が、本明細書において提供される。

【0068】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中の網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターが、 6.2×10^{11} G C / m L の濃度で約 1.55×10^{11} G C / 眼または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で約 2.5×10^{11} G C / 眼の単回用量で網膜下送達によって投与され、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである方法が、本明細書において提供される。

10

【0069】

ある特定の態様では、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中の網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターが、 6.4×10^{11} G C / m L の濃度で約 1.6×10^{11} G C / 眼または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で約 2.5×10^{11} G C / 眼の単回用量で網膜下送達によって投与され、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである方法が、本明細書において提供される。

20

【0070】

ある特定の態様では、製剤化バッファー（p H = 7.4）中に 6.2×10^{11} G C / m L の濃度で 1.6×10^{11} G C または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で 2.5×10^{11} G C の抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.0001% Pluronic F68 を含み、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである単回用量組成物が、本明細書において提供される。

30

【0071】

ある特定の態様では、製剤化バッファー（p H = 7.4）中に 6.2×10^{11} G C / m L の濃度で 1.55×10^{11} G C または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で 2.5×10^{11} G C の抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.0001% Pluronic F68 を含み、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである単回用量組成物が、本明細書において提供される。

ある特定の態様では、製剤化バッファー（p H = 7.4）中に 6.4×10^{11} G C / m L の濃度で 1.6×10^{11} G C または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で 2.5×10^{11} G C の抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.0001% Pluronic F68 を含み、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである単回用量組成物が、本明細書において提供される。

40

【0072】

ある特定の態様では、製剤化バッファー（p H = 7.4）中に眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピー、眼あたり 1.6×10^{11} ゲノムコピー、眼あたり 2.5×10^{11} ゲノ

50

ムコピー、眼あたり 5.0×10^{11} ゲノムコピーまたは眼あたり 3.0×10^{12} ゲノムコピーの抗ヒト血管内皮増殖因子 (hVEGF) 抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.0001% Pluronic F68 を含み、抗 hVEGF 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、AAV8 ベクターである単回用量組成物が、本明細書において提供される。

【0073】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症 (DR) を有する対象を処置する方法であって、対象が、DR を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

10

(1) 対象の ETDRS-DR 重症度スケール (DRSS) レベルを決定するステップ、および

(2) 対象の ETDRS-DRSS がレベル 47、53、61 または 65 である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (hVEGF) 抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

一部の実施形態では、方法は、対象から生体サンプルを得ることまたは得られた生体サンプルを有することおよび対象が 10% 以下のヘモグロビン A1c の血清レベルを有することを決定することをさらに含む。

一部の実施形態では、方法は、対象において網膜症の増殖性段階への進行を妨げる。

20

【0074】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、中程度～重症の非増殖性糖尿病性網膜症 (NPDR) を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

(1) 対象の ETDRS-DR 重症度スケール (DRSS) レベルを決定するステップ、および

(2) 対象の ETDRS-DRSS がレベル 47 である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (hVEGF) 抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

30

【0075】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、重症 NPDR を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

(1) 対象の ETDRS-DR 重症度スケール (DRSS) レベルを決定するステップ、および

(2) 対象の ETDRS-DRSS がレベル 53 である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (hVEGF) 抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、軽度の増殖性糖尿病性網膜症 (PDR) を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

40

(1) 対象の ETDRS-DR 重症度スケール (DRSS) レベルを決定するステップ、および

(2) 対象の ETDRS-DRSS がレベル 61 である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (hVEGF) 抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、中程度の PDR を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

50

(1) 対象の E T D R S - D R 重症度スケール (D R S S) レベルを決定するステップ、および

(2) 対象の E T D R S - D R S S がレベル 6 5 である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (h V E G F) 抗体をコードする発現ベクターを投与するステップ

を含む方法が本明細書において提供される。

【0076】

E T D R S - D R 重症度スケール (D R S S) レベルは、標準の 4 広視野デジタル立体眼底写真または同等のものを使用して決定され、それらはまた、Li et al., 2010, Retina Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:3184-3192 または類似の方法に従って、モノスコピックまたは立体写真によって測定される場合もある。

10

【0077】

本明細書において記載される方法のある特定の実施形態では、方法は、投与ステップ後に、赤外線サーマルカメラを使用して眼の表面の温度をモニタリングするステップをさらに含む。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、F L I R T 5 3 0 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、F L I R T 4 2 0 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、F L I R T 4 4 0 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、F l u k e T i 4 0 0 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、F L I R E 6 0 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの赤外線解像度は、7 5 , 0 0 0 ピクセル以上である。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの熱感受性は、3 0 °C で 0 . 0 5 °C 以下である。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの視野 (F O V) は、2 5 ° × 2 5 ° 以下である。

20

【0078】

3. 1 例示の実施形態

1. 糖尿病性網膜症 (D R) を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中的網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子 (h V E G F) 抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、発現ベクターが、 6.2×10^{11} G C / m L の濃度で約 1.6×10^{11} G C / 眼または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で約 2.5×10^{11} G C / 眼の単回用量で網膜下送達によって投与され、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが A A V 8 ベクターである、方法。

30

2. 投与することが、網膜下薬物送達デバイスを使用して網膜下腔中へ発現ベクターを注入することによる、項 1 に記載の方法。

3. 投与することが、抗 h V E G F 抗体の治療上有効量を前記ヒト対象の網膜へ送達する、項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

4. 抗 h V E G F 抗体の治療上有効量が、前記ヒト対象のヒト網膜細胞によって産生される、項 3 に記載の方法。

5. 抗 h V E G F 抗体の治療上有効量が、前記ヒト対象のヒト光受容体細胞、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される、項 4 に記載の方法。

40

6. ヒト光受容体細胞が、錐体細胞および／または桿体細胞である、項 5 に記載の方法。

7. 網膜神経節細胞が、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリアである、項 6 に記載の方法。

8. 発現ベクターが、C B 7 プロモーターを含む、項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

9. 発現ベクターが、構築物 I I である、項 8 に記載の方法。

10. 製剤化バッファー (p H = 7 . 4) 中に 6.2×10^{11} G C / m L の濃度で 1.6×10^{11} G C または 1.0×10^{12} G C / m L の濃度で 2.5×10^{11} G C の抗

50

ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.001% Pluronic F68 を含み、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが A A V 8 ベクターである、単回用量組成物。

11. 発現ベクターが I I である、項 10 に記載の組成物。

12. 投与ステップ後に、赤外線サーマルカメラを使用して眼における注入された物質の眼注入後熱プロファイルをモニタリングするステップをさらに含む、項 1～9 のいずれか 1 つに記載の方法。

13. 赤外線サーマルカメラが、F L I R T 5 3 0 赤外線サーマルカメラである、項 12 に記載の方法。

10

14. D R を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中的網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーの発現ベクターが、二重上脈絡膜注入によって投与され、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである、方法。

15. D R を有すると診断されたヒト対象を処置する方法であって、前記ヒト対象の眼中的網膜下腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを投与することを含み、眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーの発現ベクターが、二重上脈絡膜注入によって投与され、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、発現ベクターが、A A V 8 ベクターである、方法。

20

16. 投与することが、抗 h V E G F 抗体の治療上有効量を前記ヒト対象の網膜に送達する、項 14～15 のいずれか 1 つに記載の方法。

17. 抗 h V E G F 抗体の治療上有効量が、前記ヒト対象のヒト網膜細胞によって産生される、項 16 に記載の方法。

18. 抗 h V E G F 抗体の治療上有効量が、前記ヒト対象のヒト光受容体細胞、水平細胞、双極性細胞、アマクリン細胞、網膜神経節細胞および／または外境界膜の網膜色素上皮細胞によって産生される、項 17 に記載の方法。

30

19. ヒト光受容体細胞が、錐体細胞および／または桿体細胞である、項 18 に記載の方法。

20. 網膜神経節細胞が、ミジェット細胞、パラソル細胞、重層状細胞、巨大網膜神経節細胞、感光性神経節細胞および／またはミュラーグリアである、項 19 に記載の方法。

21. 発現ベクターが、C B 7 プロモーターを含む、項 14～20 のいずれか 1 つに記載の方法。

22. 発現ベクターが構築物 I I である、項 21 に記載の方法。

23. 投与ステップ後に、赤外線サーマルカメラを使用して眼における注入された物質の眼注入後熱プロファイルをモニタリングするステップをさらに含む項 14～22 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

24. 赤外線サーマルカメラが、F L I R T 5 3 0 赤外線サーマルカメラである、項 23 に記載の方法。

25. 製剤化バッファー（p H = 7.4）中に眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピー、眼あたり 1.6×10^{11} ゲノムコピー、眼あたり 2.5×10^{11} ゲノムコピー、眼あたり 5.0×10^{11} ゲノムコピーまたは眼あたり 3.0×10^{12} ゲノムコピーの抗ヒト血管内皮増殖因子（h V E G F）抗体をコードする発現ベクターを含む単回用量組成物であって、製剤化バッファーが、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および 0.001% Pluronic F68 を含み、抗 h V E G F 抗体が、配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含む

50

軽鎖を含み、発現ベクターが、AAV8ベクターである、単回用量組成物。

26. 発現ベクターが構築物IIである、項16に記載の組成物。

27. 発現ベクターの脱落をもたらさない、項1～9および12～24のいずれか1つに記載の方法。

28. 1000発現ベクター遺伝子コピー／5μl未満、500発現ベクター遺伝子コピー／5μl未満、100発現ベクター遺伝子コピー／5μl未満、50発現ベクター遺伝子コピー／5μl未満または10発現ベクター遺伝子コピー／5μl未満が、投与後任意の時点で生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である、項1～9および12～24のいずれか1つに記載の方法。

29. 210発現ベクター遺伝子コピー／5μl以下が、投与後任意の時点で生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である項1～9および12～24のいずれか1つに記載の方法。

30. 1000ベクター遺伝子コピー／5μl未満、500ベクター遺伝子コピー／5μl未満、100ベクター遺伝子コピー／5μl未満、50ベクター遺伝子コピー／5μl未満または10ベクター遺伝子コピー／5μl未満が、投与後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14週まで生物学的流体において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である、項1～9および12～24のいずれか1つに記載の方法。

31. ベクター遺伝子コピーが、ベクターの投与後14週まで生物学的流体において検出可能ではない、項1～9および12～24のいずれか1つに記載の方法。

32. 生物学的流体が、涙、血清または尿である、項28～31のいずれか1つに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】ベバシズマブFab（下部）中に5つの異なる残基を示すラニビズマブ（上部）のアミノ酸配列を示す図である。可変および定常重鎖（V_HおよびC_H）ならびに軽鎖（V_LおよびC_L）の開始は、矢印（→）によって示され、CDRは下線が引かれている。非コンセンサスグリコシル化部位（「G部位」）チロシン-O-硫酸化部位（「Y部位」）が示されている。

【図2】HuGlyFabVEGF₁に結合され得るグリカンを示す図である（Bondt et al., 2014, Mol & Cell Proteomics 13.1: 3029-3039から適応された）。

【図3】ラニビズマブ（上部）およびベバシズマブFab（下部）の高度グリコシル化バリエーションのアミノ酸配列を示す図である。可変および定常重鎖（V_HおよびC_H）ならびに軽鎖（V_LおよびC_L）の開始は、矢印（→）によって示され、CDRは下線が引かれている。非コンセンサスグリコシル化部位（「G部位」）およびチロシン-O-硫酸化部位（「Y部位」）が示されている。4種の高度グリコシル化バリエーションがアスタリスク（*）で示されている。

【図4】AAV8抗VEGF₁fabゲノムの模式図を示す図である。

【図5】Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達デバイスを示す図である。

【図6】Janssen Pharmaceuticals, Inc.によって製造された、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスを示す図である。

【図7A-7D】後強膜近傍デポ手順を例示する図である。

【図8】AAVカプシド1～9（配列番号41～51）のClustal多重配列アラインメントを示す図である。他のアラインされたAAVカプシドの対応する位置からアミノ酸残基を「補充する」ことによってAAV9およびAAV8カプシドに対してアミノ酸置換（最終行で太字で示される）を行うことができる。「HVR」=超可変領域によって指定された配列領域。

【図9A-9B】Altavizによって製造された微小容量注入器薬物送達デバイスを

10

20

30

40

50

示す図である。

【図10A-10B】Visionist IOYによって製造された薬物送達デバイスを示す図である。具体的には、図10Aは、30gの短い皮下ニードルを上脈絡膜／網膜下ニードルに変換できる注入アダプターを表す。デバイスは、アダプターの遠位先端から露出されるニードルの先端の長さを制御できる。10 μ Lで調整を行うことができる。デバイスは、上脈絡膜送達および／または眼外網膜下送達のために調整する能力を有する。図8Bは、眼瞼を開けたままにし、ニードルを送達のために最適な角度および深度で保持するニードルアダプターガイドを表す。ニードルアダプターは、安定化デバイスにロックされる。ニードルアダプターは、標準化および最適化されたオフィス内上脈絡膜および／または網膜下注入のための一体型のツールである。

10

【発明を実施するための形態】

【0080】

糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中的網膜／硝子体液へのVEGFに対する完全ヒト翻訳後修飾（HuPTM）抗体の送達のための組成物および方法が記載される。抗体には、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え生成された抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、2つの重鎖および2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、一価抗体および全長抗体の抗原結合性断片および上記のものの融合タンパク質が含まれる。このような抗原結合性断片には、それだけには限らないが、単ドメイン抗体（重鎖抗体の可変ドメイン（VHH）またはナノボディ）、全長抗VEGF抗体（好ましくは、全長抗VEGFモノクローナル抗体（mAb））のFab、F(ab')₂およびscFv（単鎖可変断片）（まとめて本明細書において「抗原結合性断片」と呼ばれる）が含まれる。好ましい実施形態では、VEGFに対する完全ヒト翻訳後修飾抗体は、VEGFに対するモノクローナル抗体（mAb）の完全ヒト翻訳後修飾抗原結合性断片（「HuPTMFabVEGF」）である。さらに好ましい実施形態では、HuPTMFabVEGFは、抗VEGF mAbの完全ヒトグリコシル化抗原結合性断片（「HuGlyFabVEGF」）である。本明細書において記載される本発明に従って使用できる組成物および方法については、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開番号WO/2017/180936（2017年4月14日出願された国際特許出願番号PCT/US2017/027529）、国際特許出願公開番号WO/2017/181021（2017年4月14日出願された国際特許出願番号PCT/US2017/027650）および国際特許出願公開番号WO2019/067540（2018年9月26日出願された国際特許出願番号PCT/US2018/052855）も参照されたい。代替実施形態では、全長mAbを使用できる。送達は、遺伝子療法によって、例えば、抗VEGF抗原結合性断片またはmAb（または高度グリコシル化誘導体）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、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者（ヒト対象）の眼中的上脈絡膜腔、網膜下腔（経硝子体アプローチから、または上脈絡膜腔を通るカテーテルを用いて）、網膜内腔、硝子体腔、および／または強膜の外表面（すなわち、強膜近傍投与）へ投与して、ヒトPTM、例えば、ヒトグリコシル化、導入遺伝子産物を持続的に供給する眼中的持続的なデポーを作出することによって達成され得る。例えば、節5.3.2に記載される投与様式を参照されたい。

20

30

40

【0081】

ある特定の実施形態では、患者は、遺伝子療法を用いる処置の前に硝子体内に注入される抗VEGF抗原結合性断片を用いる処置に対して応答性であるとして示されていた。具体的な実施形態では、患者は、これまでに、ルセンティス（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／またはアバスチン（登録商標）（バシズマブ）を用いて処置されており、前記ルセンティス（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／またはアバスチン（登録商標）

50

(ベバシズマブ)のうち1種または複数に対して応答性であるとわかっていた。

【0082】

このようなウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物が送達される対象は、ウイルスベクターまたは発現構築物中の導入遺伝子によってコードされた抗hVEGF抗原結合性断片に対して応答性であるべきである。応答性を決定するために、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子産物（例えば、細胞培養物、バイオリアクターなどにおいて産生される）を、硝子体内注入などによって対象に直接投与してもよい。

【0083】

導入遺伝子によってコードされるHuPTM FabVEGF_i、例えば、HuGly FabVEGF_iとして、それだけには限らないが、hVEGFと結合する抗体の抗原結合性断片、例えば、ベバシズマブ、抗hVEGF Fab部分、例えば、ラニビズマブまたはFabドメインに追加のグリコシル化部位を含有するように操作されたようなベバシズマブもしくはラニビズマブFab部分を挙げることができる（例えば、全長抗体のFabドメインで高度グリコシル化されているベバシズマブの誘導体の説明については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Courtois et al., 2016, mAbs 8: 99-112を参照されたい）。

【0084】

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、ヒト網膜細胞または光受容体細胞に対する指向性を有するべきである。このようなベクターとして、非複製性組換えアデノ随伴ウイルスベクター（「rAAV」）を挙げることができ、特に、AAV8カプシドを有するものが好ましい。しかし、それだけには限らないが、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターを含む他の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発現ベクターを使用してもよい。好ましくは、HuPTM FabVEGF_i、例えば、HuGly FabVEGF_i、導入遺伝子は、適当な発現制御エレメント、2、3例を挙げると、例えば、CB7プロモーター（ニワトリβ-アクチンプロモーターおよびCMVエンハンサー）、RPE65プロモーターまたはオブシンプロモーターによって制御されるべきであり、ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を増強する他の発現制御エレメント（例えば、イントロン、例えば、ニワトリβ-アクチンイントロン、マウスの微小ウイルス（MV）イントロン、ヒト第IX因子イントロン（例えば、FIX末端切断型イントロン1）、β-グロブリンスプライスドナー/免疫グロブリン重鎖スプライスアクセプターイントロン、アデノウイルススプライスドナー/免疫グロブリンスプライスアクセプターイントロン、SV40後期スプライスドナー/スプライスアクセプター（19S/16S）イントロンおよびハイブリッド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らびにポリAシグナル、例えば、ウサギβ-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）を挙げることができる。例えば、Powell and Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57を参照されたい。

【0085】

好ましい実施形態では、遺伝子療法構築物は、重鎖および軽鎖両方が発現されるように設計される。より詳しくは、重鎖および軽鎖は、ほぼ等量で発現されるべきである、言い換えれば、重鎖および軽鎖は、およそ1:1の重鎖対軽鎖の比で発現される。重鎖および軽鎖のコード配列は、重鎖および軽鎖が切断可能なリンカーまたはIRESによって分けられ、その結果、別個の重鎖および軽鎖ポリペプチドが発現される単一構築物中で操作され得る。例えば、本明細書において提供される方法および組成物とともに使用できる、特定のリーダー配列については節5.2.4ならびに特定のIRES、2Aおよび他のリンカー配列については節5.2.5を参照されたい。

【0086】

ある特定の実施形態では、遺伝子療法構築物は、製剤化バッファー中のAAVベクター有効成分の凍結滅菌単回使用溶液として供給される。特定の実施形態では、網膜下投与に

10

20

30

40

50

適した医薬組成物は、生理学的に適合する水性バッファー、界面活性剤および任意選択の賦形剤を含む製剤化バッファー中の組換え（例えば、rHuGLyFabVEGF_i）ベクターの懸濁液を含む。特定の実施形態では、構築物は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.001%のPluronic F68、pH=7.4中で製剤化される。
【0087】

組換えベクターの治療上有効な用量は、 $\geq 0.1 \text{ mL} \sim \leq 0.5 \text{ mL}$ の範囲の容量で、好ましくは、 $0.1 \sim 0.30 \text{ mL}$ （ $100 \sim 300 \mu\text{L}$ ）で、最も好ましくは、 0.25 mL （ $250 \mu\text{L}$ ）の容量で網膜下および／または網膜内に（例えば、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入または上脈絡膜腔を経る網膜下投与によって）投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、上脈絡膜に（例えば、上脈絡膜注入によって）、 $100 \mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、強膜の外表面に、 $500 \mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $10 \sim 20 \mu\text{L}$ 、 $20 \sim 50 \mu\text{L}$ 、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ 、 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ 、 $200 \sim 300 \mu\text{L}$ 、 $300 \sim 400 \mu\text{L}$ または $400 \sim 500 \mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。網膜下注入は、訓練された網膜外科医によって実施される外科手技であり、対象を局所麻酔下にする部分硝子体切除術および網膜への遺伝子療法の注入を含む（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるCampochiaro et al., 2017, Hum Gen Ther 28(1):99-111を参照されたい）。特定の実施形態では、網膜下投与は、上脈絡膜腔を通して後極に向けて挿入し、トンネルを形成でき、そこで小さいニードルが網膜下腔中に注入されるカテーテルを含む網膜下薬物送達デバイスを使用して上脈絡膜腔を経て実施される（例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Baldassarre et al., 2017, Subretinal Delivery of Cells via the Suprachoroidal Space: Janssen Trial. In: Schwartz et al. (eds) Cellular Therapies for Retinal Disease, Springer, Cham、国際特許出願公開番号WO2016/040635を参照されたい）。上脈絡膜投与手順は、眼の上脈絡膜腔への薬物の投与を含み、普通、上脈絡膜薬物送達デバイス、例えば、マイクロニードルを備えた微量注入器を使用して実施される（例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87を参照されたい）。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔中に発現ベクターを蓄積するために使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達デバイス（例えば、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23を参照されたい）が挙げられる。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔を経て網膜下腔中に発現ベクターを蓄積するために使用できる網膜下薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Janssen Pharmaceuticals, Inc.によって製造された網膜下薬物送達デバイス（例えば、国際特許出願公開番号WO2016/040635を参照されたい）が挙げられる。特定の実施形態では、強膜の外表面への投与は、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニューレを含む強膜近傍薬物送達デバイスによって実施される。異なる投与様式のより詳細については節5.3.2を参照されたい。上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与は、可溶性導入遺伝子産物の、網膜、硝子体液および／または眼房水への送達をもたらすはずである。網膜細胞、例えば、桿体、錐体、網膜色素上皮、水平、双極性、アマクリン、神経節および／またはミュラー細胞による導入遺伝子産物（例えば、コードされる抗VEGF抗体）の発現は、網膜、硝子体液および／または眼房水における導入遺伝子産物の送達および維持をもたらす。特定の実施形態では、硝子体液において少なくとも $0.330 \mu\text{g/mL}$ の、または眼房水（眼の前房）において $0.110 \mu\text{g/mL}$ の $C_{\min}$ の導入遺伝子産物の濃度を3ヶ月間維持する用量が望まれ、その後、 $1.70 \sim 6.60 \mu\text{g/mL}$ の範囲の導入遺伝子産物の硝子体の $C_{\min}$ 濃度および／または $0.567 \sim 2.20 \mu\text{g/mL}$ の範囲の眼房 $C_{\min}$ 濃度が維持されるべきである。しかし、導入遺伝子産物は、持続的に産生される

10

20

30

40

50

ので、低濃度の維持が有効であり得る。特定の実施形態では、導入遺伝子産物の濃度は、処置された眼の前房から得た硝子体液および／または眼房の患者サンプルにおいて測定できる。あるいは、硝子体液濃度は、導入遺伝子産物の患者の血清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できる－導入遺伝子産物に対する全身対硝子体曝露の比は、約1：90，000である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Xu L, et al., 2013, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 1616-1624において1621頁および1623頁の表5で報告されたラニビズマブの硝子体液および血清濃度を参照されたい）。

【0088】

ベクター導入遺伝子は、脱落（標的細胞に感染しなかった、および糞便または体液を介して身体から除去されたベクターの放出）、可動化（導入遺伝子複製および標的細胞からの移動）または生殖系列伝達（精液を介した子孫への遺伝子伝達）から意図されないレシピエントへ広がる可能性を有する。ベクター脱落は、例えば、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を使用して涙、血清または尿などの生物学的流体においてベクターDNAを測定することによって決定できる。一部の実施形態では、ベクター遺伝子コピーは、ベクターの投与後いかなる時点でも生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において検出可能ではない。一部の実施形態では、1000ベクター遺伝子コピー／5μl未満、500ベクター遺伝子コピー／5μl未満、100ベクター遺伝子コピー／5μl未満、50ベクター遺伝子コピー／5μl未満または10ベクター遺伝子コピー／5μl未満が、投与後任意の時点で生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である。具体的な実施形態では、210ベクター遺伝子コピー／5μl以下が、血清において検出可能である。一部の実施形態では、1000ベクター遺伝子コピー／5μl未満、500ベクター遺伝子コピー／5μl未満、100ベクター遺伝子コピー／5μl未満、50ベクター遺伝子コピー／5μl未満または10ベクター遺伝子コピー／5μl未満が、投与後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14週まで生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である。具体的な実施形態では、ベクター遺伝子コピーは、ベクターの投与後14週まで血清において検出可能ではない。

【0089】

本発明は、経時的に消失し、ピークおよびトラフレベルをもたらすVEGF阻害剤の高用量ボラスの反復された眼への注入を含むケア処置の標準を上回るいくつかの利点を有する。導入遺伝子産物抗体の持続発現は、抗体を反復して注入することとは対照的に、作用部位により一定レベルの抗体が存在することを可能にし、より少ない注入しか行われる必要がなく、その結果、医師にかかることがより少なくなるので、患者にとって危険性が低く、より都合がよい。一定タンパク質生成は、網膜において浮腫リバウンドが生じる可能性が低いので、より良好な臨床アウトカムにつながり得る。さらに、導入遺伝子から発現された抗体は、翻訳の間および翻訳後に存在する異なる微小環境のために、直接注入されるものとは異なる方法で翻訳後修飾される。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、これは、作用部位に送達される抗体が、直接注入された抗体と比較して「バイオベター」であるように、異なる拡散、生理活性、分布、親和性、薬物動態および免疫原性特徴を有する抗体をもたらす。

【0090】

さらに、*in vivo*で導入遺伝子から発現される抗体は、組換え技術、例えば、タンパク質凝集およびタンパク質酸化によって生成された抗体と会合した分解生成物を含む可能性は低い。凝集は、高いタンパク質濃度、製造装置および容器との表面相互作用ならびにある特定のバッファー系を用いる精製のためにタンパク質生成および保存に関連する問題である。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は存在しない。酸化、例えば、メチオニン、トリプトファンおよびヒスチジン酸化もまた、タンパク質生成および保存に関連しており、ストレスを受ける細胞培養条件、金属および空気接触ならびにバッファーおよび賦形剤中の不純物によって引き起こされる。*in*

*in vivo*で導入遺伝子から発現されるタンパク質はまた、ストレスを受ける条件で酸化し得る。しかし、ヒトおよび多数の他の生物は、抗酸化防御システムを備えており、これは、酸化ストレスを低減するだけでなく、酸化を修復するおよび／または逆転させることもある。したがって、*in vivo*で産生されるタンパク質は、酸化形態である可能性は低い。凝集および酸化の両方とも、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。

【0091】

理論に捉われるものではないが、本明細書において提供される方法および組成物は、幾分か以下の原理に基づいている：

(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、網膜細胞におけるロバストなプロセスを含む、分泌されたタンパク質の翻訳後プロセシングの細胞機構を有する分泌細胞である。(ヒト網膜細胞によって行われる翻訳後修飾については、例えば、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれる、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た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)。

(ii) 最先端の理解に反して、抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブ（および全長抗VEGF mAbのFabドメイン、例えば、ベバシズマブ）は、実際にN結合型グリコシル化部位を有する。例えば、ラニビズマブのCHドメイン（TVSWN¹⁶⁵SGAL）中およびCLドメイン（QSGN¹⁵⁸SQE）中の非コンセンサスアスパラギナル（asparaginal）（「N」）グリコシル化部位ならびにVHドメイン（Q¹¹⁵GT）中およびVLドメイン（TFQ¹⁰⁰GT）中のグリコシル化部位であるグルタミン（「Q」）残基（およびベバシズマブのFab中の対応する部位）を同定する図1を参照されたい（抗体中のN結合型グリコシル化部位の同定については、例えば、各々その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Valliere-Douglass et al., 2009, J. Biol. Chem. 284: 32493-32506およびValliere-Douglass et al., 2010, J. Biol. Chem. 285: 16012-16022を参照されたい）。

(iii) このような非標準部位は普通、抗体集団の低レベルグリコシル化（例えば、約1～5%）をもたらすが、機能的利点は、眼などの免疫特権を有する臓器では大きい場合がある（例えば、van de Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196:1435-1441を参照されたい）。例えば、Fabグリコシル化は、抗体の安定性、半減期および結合特徴に影響を及ぼし得る。抗体のその標的に対する親和性に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）または表面プラズモン共鳴（SPR）を使用できる。抗体の半減期に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術を、例えば、放射標識された抗体が投与されている対象中の血液または臓器（例えば、眼）における放射能のレベルの測定によって使用できる。抗体の安定性、例えば、凝集またはタンパク質アンフォールディングのレベルに対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、示差走査熱量測定（DSC）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、例えば、サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）、キャピラリー電気泳動、質量分析または濁度測定を使用できる。本明細書において提供される、HuPTM FabVEGF i、例えば、HuGly FabVEGF i、導入遺伝子は、非標準部位で0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上グリコシル化されているFabの生成をもたらす。ある特定の実施形態では、Fabの集団から0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上のFabが、非標準部位でグリコシル化されている。ある特定の実施形態では、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上の非標準部位が、グリコシル化されている。ある特定の実施

形態では、これらの非標準部位での F a b のグリコシル化が、H E K 2 9 3 細胞において産生された F a b におけるこれらの非標準部位のグリコシル化の量よりも 2 5 %、5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 %、3 0 0 %、4 0 0 %、5 0 0 % またはそれより多い。

(i v) グリコシル化部位に加えて、抗 V E G F F a b、例えば、ラニビズマブ（およびベバシズマブの F a b）は、C D R 中またはその付近にチロシン（「Y」）硫酸化部位を含有する、ラニビズマブの V_H（E D T A V Y⁹⁴ Y⁹⁵）および V_L（E D F A T Y⁸⁶）ドメイン中のチロシン-O-硫酸化部位（およびベバシズマブの F a b 中の対応する部位）を同定する図 1 を参照されたい。（例えば、タンパク質チロシン硫酸化に付されるチロシン残基の周囲のアミノ酸の分析については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる Yang et al., 2015, Molecules 20:2138-2164、特に 2154 頁を参照されたい。10 「ルール」は以下のとおりにまとめることができる：Y の + 5 ~ - 5 位置以内に E または D を有する Y 残基であって、Y の - 1 位は、中性または酸性の荷電アミノ酸であるが、塩基性アミノ酸、例えば、硫酸化を無効にする R、K または H ではない）。ヒト I g G 抗体は、いくつかの他の翻訳後修飾、例えば、N 末端修飾、C 末端修飾、アミノ酸残基の分解または酸化、システイン関連バリエーションおよび糖化を示し得る（例えば、Liu et al., 2014, mAbs 6(5):1145-1154 を参照されたい）。

(v) ヒト網膜細胞による抗 V E G F F a b、例えば、ラニビズマブまたはベバシズマブの F a b 断片のグリコシル化は、グリカンの付加をもたらし、これは、導入遺伝子産物の安定性、半減期を改善し、不要な凝集および／または免疫原性を低減することができる（F a b グリコシル化の新たに出現した重要性の概要については、例えば、Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196: 1435-1441 を参照されたい）。重要なことに、本明細書において提供される H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i に付加できるグリカンは、2, 6-シアル酸を含有する高度にプロセッシングされた複合型二分岐 N グリカン（例えば、H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i に組み込むことができるグリカンを表す図 2 を参照されたい）および二分 G l c N A c であるが、N G N A（N-グリコリルノイラミン酸、N e u 5 G c）ではない。このようなグリカンは、ラニビズマブ中（大腸菌で作製され、全くグリコシル化されていない）に、またはベバシズマブ中（この翻訳後修飾を行うために必要な 2, 6-シアルルトランスフェラーゼを有さない C H O 細胞で作製され、C H O 細胞は二分 G l c N A c も産生しないが、N e u 5 A c（N A N A）の代わりに、ヒトにとって通常ではない（免疫原性である可能性がある）シアル酸として N e u 5 G c（N G N A）を付加する）に存在しない。例えば、Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol.（アーリーオンライン、公開されたオンライン 2 0 1 5 年 9 月 1 8 日、1 ~ 1 3 頁の p. 5）を参照されたい。さらに、C H O 細胞はまた、ほとんどの個体中に存在する抗 α - G a l 抗体と反応し、高濃度では、アナフィラキシーを引き起こす場合がある免疫原性グリカン、α - G a l 抗原を産生し得る。例えば、Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156 を参照されたい。本明細書において提供される H u P T M F a b V E G F i、例えば、H u G l y F a b V E G F i のヒトグリコシル化パターンは、導入遺伝子産物の免疫原性を低減し、有効性を改善するべきである。20

(v i) 抗 V E G F F a b、例えば、ラニビズマブまたはベバシズマブの F a b 断片のチロシン硫酸化-ヒト網膜細胞におけるロバストな翻訳後プロセスは、V E G F に対するアビディティが増大した導入遺伝子産物をもたらし可能性がある。実際、他の標的に対する治療用抗体の F a b のチロシン硫酸化は、抗原に対するアビディティおよび活性を著しく増大すると示されている（例えば、Loos et al., 2015, PNAS 112: 12675-12680 および Choe et al., 2003, Cell 114: 161-170 を参照されたい）。このような翻訳後修飾は、ラニビズマブ（大腸菌、チロシン硫酸化のために必要な酵素を有さない宿主において作製される）では存在せず、C H O 細胞産物であるベバシズマブでは、多めに見積もっても存在量が少ない。ヒト網膜細胞とは異なり、C H O 細胞は、分泌細胞ではなく、翻訳後チロシン硫酸化の制限された能力しか有さない（例えば、Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537、特に、1537 頁の考察を参照され 30

10

20

30

40

50

たい)。

【0092】

前述の理由のために、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iの生成は、遺伝子療法によって、例えば、糖尿病性網膜症(DR)を有すると診断された患者(ヒト対象)の眼中の上脈絡膜腔、網膜下腔または強膜の外表面に、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iをコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物を投与して(例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって)、形質導入された網膜細胞によって産生される、完全ヒト翻訳後修飾、例えば、ヒトグリコシル化、硫酸化導入遺伝子産物を持続的に供給する眼中の持続的なデポーを

10

作出することによって達成される糖尿病性網膜症(DR)の処置のために「バイオベター」分子をもたらすべきである。FabVEGF_iのcDNA構築物は、形質導入された網膜細胞による適切な同時翻訳および翻訳後プロセッシング(グリコシル化およびタンパク質硫酸化)を確実にするシグナルペプチドを含むべきである。網膜細胞によって使用されるこのようなシグナル配列として、それだけには限らないが、以下を挙げることができる：

・MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA (VEGF-Aシグナルペプチド) (配列番号5)

・MERAAPSRRV PLPLLLLLGGL ALLAAAGVDA (フィブリン-1シグナルペプチド) (配列番号6)

・MAPLRPLLLIL ALLAWVALA (ビトロネクチンシグナルペプチド) (配列番号7)

20

・MRLLAFLSLL ALVLQETGT (オブチシンシグナルペプチド) (配列番号9)

・MKWVTFISLLFLFSSAYS (アルブミンシグナルペプチド) (配列番号22)

・MAFLWLLSCWALLGTTFG (キモトリプシノーゲンシグナルペプチド) (配列番号23)

・MYRMQLLLSCIALILALVTNS (インターロイキン-2シグナルペプチド) (配列番号24)

30

・MNLILLILTFVAAAVA (トリプシノーゲン-2シグナルペプチド) (配列番号25)。

【0093】

使用できるシグナルペプチドについては、例えば、各々その全体が参照により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を参照されたい。

【0094】

遺伝子療法に対する代替の、または追加の処置として、HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、HuGlyFabVEGF_i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し、糖尿病性網膜症(DR)を有すると診断された患者に、硝子体内注入によって投与することができる。HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、糖タンパク質はまた、糖尿病性網膜症(DR)を有する患者に投与できる。このような組換え糖タンパク質生成のために使用できるヒト細胞株として、それだけには限らないが、2、3例を挙げると、ヒト胎児腎臓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が含まれる。(HuPTMFabVEGF_i生成物、例えば、HuGlyFabVEGF_i糖タンパク質の組換え生成のために使用できるヒト細胞株の概要については、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dumont et al., 2015, Crit. Rev. Biotechnol. (アーリーオンライン、公開されたオンライン2015年9月18日、1～

40

50

13頁) “Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives”を参照されたい)。完全グリコシル化、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、宿主細胞を、 α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼ (または α -2, 3-および α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼの両方) ならびに／または網膜細胞においてチロシン-O-硫酸化に関与するTPST-1およびTPST-2酵素を同時発現するように操作することによって、生成に使用される細胞株を増強できる。

【0095】

他の利用可能な処置の送達を伴う、HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iの、眼／網膜への送達の組合せが、本明細書において提供される方法により包含される。追加の処置は、遺伝子療法処置の前、それと同時に、またはその後に投与できる。本明細書において提供される遺伝子療法と組み合わせることができるであろう糖尿病性網膜症(DR)のための利用可能な処置として、それだけには限らないが、レーザー凝固、ベルテポルフィンを用いる光線力学的療法およびそれだけには限らないが、ペガブタニブ、ラニビズマブ、アフリベルセプトまたはベバシズマブを含む抗VEGF剤を用いる硝子体内(IVT)注入が挙げられる。抗VEGF剤、例えば、生物製剤を用いる追加の処置は、「レスキュー」療法と呼ばれることもある。

【0096】

小分子薬物とは異なり、生物製剤は、普通、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修飾または形態を有する多数のバリエーションの混合物を含む。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチのいずれかで生成されたどの分子も完全にグリコシル化され、硫酸化される必要はない。むしろ、有効性を実証するために、生成された糖タンパク質の集団は、2, 6-シアリル化および硫酸化を含む十分なグリコシル化を有するべきである(集団の約1%~約10%)。本明細書において提供される遺伝子療法処置の目的は、最小の介入／侵襲的手順で網膜変性の進行を減速または停止すること、および視力の喪失を減速または防ぐことである。有効性は、BCVA(最高矯正視力)、眼球内圧、スリットランプ検査、間接眼底検査、SD-OCT(SD-光干渉断層撮影)、網膜電図検査(ERG)を測定することによってモニタリングできる。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もモニタリングできる。網膜の厚さをモニタリングして、本明細書において提供される処置の有効性を判定できる。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、網膜の厚さを、臨床読み取り値として使用でき、網膜の厚さの低減が大きいほどまたは網膜の肥厚の前の期間が長いほど、処置はより有効である。網膜の厚さは、例えば、SD-OCTによって決定できる。SD-OCTは、低コヒーレンス干渉法を使用して、目的の物体から反射された後方散乱光のエコー時間遅延と大きさを決定する3次元イメージング技術である。OCTを使用して、3~15 μ mの軸分解能で組織サンプルの層(例えば、網膜)をスキャンでき、SD-OCTは、軸分解能およびスキャン速度をこれまでの技術の形式を上回って改善する(Schuman, 2008, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 106:426-458)。網膜機能は、例えば、ERGによって決定できる。ERGは、ヒトにおける使用のためにFDAによって承認された、網膜機能の非侵襲的電気生理学的検査であり、眼の光感受性細胞(桿体および錐体)およびその接続する神経節細胞、特に、フラッシュ刺激に対するその応答を調べる。

【0097】

5.1 N-グリコシル化、チロシン硫酸化およびO-グリコシル化

本明細書において記載される方法において使用されるHuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_iの抗VEGF抗原結合性断片のアミノ酸配列(一次配列)は、N-グリコシル化またはチロシン硫酸化が起こる少なくとも1つの部位を含む。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片のアミノ酸配列は、少なくとも1つのN-グリコシル化部位および少なくとも1つのチロシン硫酸化部位を含む。このような部位は、以下に詳細に記載される。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片のアミノ酸配列は、少なくとも1つのO-グリコシル化を含み、これは、1つもしくは複

数の N-グリコシル化部位および／またはチロシン硫酸化部位に加えて前記アミノ酸配列中に存在し得る。

【0098】

5.1.1 N-グリコシル化

逆グリコシル化部位

標準 N-グリコシル化配列は、 $Asn-X-Ser$ （または Thr ）（ここで、 X は、 Pro を除く任意のアミノ酸であり得る）であると当技術分野で公知である。しかし、ヒト抗体のアスパラギン（ Asn ）残基は、逆コンセンサスモチーフ、 Ser （または Thr ）- $X-Asn$ （ここで、 X は、 Pro を除く任意のアミノ酸であり得る）の関連でグリコシル化され得ることが最近実証された。Valliere-Douglass et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:32493-32506 および Valliere-Douglass et al., 2010, J. Biol. Chem. 285:16012-16022 を参照されたい。本明細書において開示されるように、最先端の理解に反して、本明細書において記載される方法に従って使用するための抗 VEGF 抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、このような逆コンセンサス配列のうちいくつかを含む。したがって、本明細書において記載される方法は、配列 Ser （または Thr ）- $X-Asn$ （ここで、 X は、 Pro を除く任意のアミノ酸であり得る）（本明細書において「逆 N-グリコシル化部位」とも呼ばれる）を含む少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片の使用を含む。

10

【0099】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法は、配列 Ser （または Thr ）- $X-Asn$ （ここで、 X は、 Pro を除く任意のアミノ酸であり得る）を含む 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 10 より多い N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片の使用を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 10 より多い逆 N-グリコシル化部位ならびに 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 10 より多い非コンセンサス N-グリコシル化部位（以下に本明細書において定義されるような）を含む抗 VEGF 抗原結合性断片の使用を含む。

20

【0100】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用される 1 つまたは複数の逆 N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片は、それぞれ配列番号 1 および 2 の軽鎖および重鎖を含むラニビズマブである。別の特定の実施形態では、方法において使用される 1 つまたは複数の逆 N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片は、それぞれ配列番号 3 および 4 の軽鎖および重鎖を含むペバシズマブの Fab を含む。

30

【0101】

非コンセンサスグリコシル化部位

逆 N-グリコシル化部位に加えて、最近、ヒト抗体のグルタミン（ Gln ）残基は、非コンセンサスモチーフ、 $Gln-Gly-Thr$ の関連でグリコシル化され得ることが実証された。Valliere-Douglass et al., 2010, J. Biol. Chem. 285:16012-16022 を参照されたい。驚くべきことに、本明細書において記載される方法に従って使用するための抗 VEGF 抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、このような非コンセンサス配列のうちいくつかを含む。したがって、本明細書において記載される方法は、配列 $Gln-Gly-Thr$ （本明細書において「非コンセンサス N-グリコシル化部位」とも呼ばれる）を含む少なくとも 1 つの N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片の使用を含む。

40

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法は、配列 $Gln-Gly-Thr$ を含む 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 10 より多い N-グリコシル化部位を含む抗 VEGF 抗原結合性断片の使用を含む。

【0102】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用される 1 つまたは

50

複数の非コンセンサス N-グリコシル化部位を含む抗 V E G F 抗原結合性断片は、ラニビズマブ（それぞれ配列番号 1 および 2 の軽鎖および重鎖を含む）である。別の特定の実施形態では、方法において使用される 1 つまたは複数の非コンセンサス N-グリコシル化部位を含む抗 V E G F 抗原結合性断片は、ペバシズマブの F a b（それぞれ配列番号 3 および 4 の軽鎖および重鎖を含む）を含む。

【0103】

操作された N-グリコシル化部位

ある特定の実施形態では、抗 V E G F 抗原結合性断片をコードする核酸は、普通、H u G l y F a b V E G F i と関連するであろうよりも、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれよりも多い N-グリコシル化部位（標準 N-グリコシル化コンセンサス配列、逆 N-グリコシル化部位および非コンセンサス N-グリコシル化部位を含む）を含むように（例えば、非修飾状態の抗 V E G F 抗原結合性断片と関連している N-グリコシル化部位の数と比較して）修飾される。具体的な実施形態では、グリコシル化部位の導入は、N-グリコシル化部位（標準 N-グリコシル化コンセンサス配列、逆 N-グリコシル化部位および非コンセンサス N-グリコシル化部位を含む）の、抗原結合性断片の一次構造中のいずれかの場所への挿入によって、前記導入が、抗原結合性断片のその抗原、V E G F への結合に影響を及ぼさない限り達成される。グリコシル化部位の導入は、例えば、抗原結合性断片もしくは抗原結合性断片が由来する抗体の一次構造に新規アミノ酸を付加すること（すなわち、グリコシル化部位が全体でまたは一部で付加される）によって、または抗原結合性断片もしくは抗原結合性断片が由来する抗体中の既存のアミノ酸を突然変異して、N-グリコシル化部位を生成すること（すなわち、抗原結合性断片／抗体にアミノ酸が付加されないが、抗原結合性断片／抗体の選択されたアミノ酸が、N-グリコシル化部位を形成するように突然変異される）によって達成できる。当業者ならば、当技術分野で公知のアプローチ、例えば、タンパク質をコードする核酸配列の修飾を含む組換えアプローチを使用してタンパク質のアミノ酸配列を容易に修飾できるということを認識するであろう。

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用される抗 V E G F 抗原結合性断片は、網膜細胞において発現される場合に、高度グリコシル化され得るよう修飾される。その全体が参照により本明細書に組み込まれる Courtois et al., 2016, mAbs 8:99-112 を参照されたい。特定の実施形態では、前記抗 V E G F 抗原結合性断片は、ラニビズマブ（それぞれ配列番号 1 および 2 の軽鎖および重鎖を含む）である。別の特定の実施形態では、前記抗 V E G F 抗原結合性断片は、ペバシズマブの F a b（それぞれ配列番号 3 および 4 の軽鎖および重鎖を含む）を含む。

【0104】

抗 V E G F 抗原結合性断片の N-グリコシル化

小分子薬とは異なり、生物製剤は、普通、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修飾または形態を有する多数のバリエーションの混合物を含む。遺伝子療法またはタンパク質療法アプローチのいずれかにおいて生成されるどの分子も完全にグリコシル化され、硫酸化されることは必須ではない。むしろ、生成された糖タンパク質の集団は、有効性を実証するため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。本明細書において提供される遺伝子療法処置の目的は、最小の介入／侵襲的手順で網膜変性の進行を減速または停止すること、および視力の喪失を減速または防ぐことである。

【0105】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される抗 V E G F 抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、網膜細胞において発現される場合、その N-グリコシル化部位の 100% でグリコシル化される可能性がある。しかし、当業者ならば、グリコシル化の利点を得られるために、抗 V E G F 抗原結合性断片のすべての N-グリコシル化部位が N-グリコシル化される必要はないということを理解するであろう。むしろ、グリコシル化の利点は、N-グリコシル化部位のあるパーセンテージのみがグリコシ

ル化される場合および／または発現された抗原結合性断片のあるパーセンテージのみがグリコシル化される場合に実現され得る。したがって、ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片は、網膜細胞において発現される場合に、その利用可能なN-グリコシル化部位の10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~100%でグリコシル化される。ある特定の実施形態では、網膜細胞において発現される場合に、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片の10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~100%が、その利用可能なN-グリコシル化部位の少なくとも1つでグリコシル化される。

10

【0106】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片中に存在するN-グリコシル化部位の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%が、抗VEGF抗原結合性断片が網膜細胞において発現される場合に、N-グリコシル化部位中に存在するAsn残基（または他の関連残基）でグリコシル化される。すなわち、得られたHuGlyFabVEGFのN-グリコシル化部位の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%がグリコシル化される。

20

【0107】

別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片中に存在するN-グリコシル化部位の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%が、抗VEGF抗原結合性断片が網膜細胞において発現される場合に、N-グリコシル化部位中に存在するAsn残基（または他の関連残基）に連結された同一の結合されたグリカンでグリコシル化される。すなわち、得られたHuGlyFabVEGFのN-グリコシル化部位の少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%が同一の結合されたグリカンでグリコシル化される。

30

【0108】

本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブが、網膜細胞において発現される場合には、抗原結合性断片のN-グリコシル化部位は、種々の異なるグリカンでグリコシル化され得る。抗原結合性断片のN-グリカンは、当技術分野で特性決定されている。例えば、Bondt et al., 2014, Mol. & Cell. Proteomics 13.11:3029-3039 (Fabと会合しているN-グリカンの開示について、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)では、Fabと会合しているグリカンが特性決定されており、抗体のFabおよびFc部分は、別個のグリコシル化パターンを含み、Fabグリカンは、ガラクトシル化、シアリル化および二分（例えば、二分GlcNAcを有する）が高度であるが、Fcグリカンに関してはフコシル化が低いことを実証する。Bondtと同様に、Huang et al., 2006, Anal. Biochem. 349:197-207 (Fabと会合しているN-グリカンの開示について、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)によって、Fabのほとんどのグリカンがシアリル化されていることがわかった。しかし、Huang (マウス細胞バックグラウンドで産生された)によって調べられた抗体のFabでは、同定されたシアル酸残基(sialic residues)は、N-アセチルノイラミン酸(「Neu5Ac」、主なヒトシアル酸)の代わりにN-グリコシルノイラミン酸(「Neu5Gc」または「NeuGc」)(ヒトにとって自然ではない)である。さらに、Song et al., 2014, Anal. Chem. 86:5661-5666 (Fabと会合しているN-グリカンの開示について、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)には、市販の抗体と会合しているN-グリカンのライブラリーが記載されている。

40

50

【0109】

重要なことに、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニズマブが、ヒト網膜細胞において発現される場合、原核生物の宿主細胞（例えば、大腸菌）または真核生物の宿主細胞（例えば、CHO細胞）における *in vitro* 生成の必要性が回避される。代わりに、本明細書において記載される方法（例えば、抗hVEGF抗原結合性断片を発現させるための網膜細胞の使用）の結果として、抗VEGF抗原結合性断片のN-グリコシル化部位は、有利なことに、ヒトの処置と関連しヒトの処置に有益なグリカンで装飾される。このような有利な点は、抗体／抗原結合性断片生成においてCHO細胞または大腸菌が利用される場合には、例えば、CHO細胞は、（1）2, 6シアルルトランスフェラーゼを発現せず、したがって、N-グリコシル化の際に2, 6シアル酸を付加できない、および（2）Neu5Acの代わりにシアル酸としてNeu5Gcを付加できるために、また大腸菌が、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は含有しないために達成可能ではない。したがって、一実施形態では、本明細書において記載される処置の方法において使用されるHuGlyFabVEGF_iを生じさせるために網膜細胞において発現された抗VEGF抗原結合性断片は、ヒト網膜細胞、例えば、網膜色素細胞ではタンパク質がN-グリコシル化される方法でグリコシル化されるが、CHO細胞ではタンパク質がグリコシル化される方法でグリコシル化されない。別の実施形態では、本明細書において記載される処置の方法において使用されるHuGlyFabVEGF_iを生じさせるために網膜細胞において発現された抗VEGF抗原結合性断片は、ヒト網膜細胞、例えば、網膜色素細胞ではタンパク質がN-グリコシル化される方法でグリコシル化され、このようなグリコシル化は、原核生物の宿主細胞を使用すると、例えば、大腸菌を使用すると天然には可能ではない。

10

20

【0110】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニズマブは、ヒト抗体のFabと会合している1、2、3、4、5つまたはそれより多い別個のN-グリカンを含む。特定の実施形態では、前記のヒト抗体のFabと会合しているN-グリカンは、Bondt et al., 2014, Mol. & Cell. Proteomics 13.11:3029-3039、Huang et al., 2006, Anal. Biochem. 349:197-207および／またはSong et al., 2014, Anal. Chem. 86:5661-5666に記載されるものである。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニズマブは、検出可能なNeuGcおよび／またはα-Gal抗原を含まない。

30

【0111】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニズマブは、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンで主にグリコシル化される。ある特定の実施形態では、2, 6-連結されたシアル酸を含むHuGlyFabVEGF_iは、ポリシアル化されている、すなわち、1つより多いシアル酸を含有する。ある特定の実施形態では、前記HuGlyFabVEGF_iの各N-グリコシル化部位は、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンを含む、すなわち、前記HuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の100%が、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンを含む。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%が、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の少なくとも10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~99%が、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って網膜細胞において発現された抗原結合性断片の少なくとも2

40

50

0%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%（すなわち、HuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブを生じさせる抗原結合性断片）は、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って網膜細胞において発現された抗原結合性断片の少なくとも10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~99%（すなわち、HuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブを生じさせるFab）は、2, 6-連結されたシアル酸を含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、前記シアル酸は、Neu5Acである。このような実施形態によれば、HuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位のあるパーセンテージのみが、2, 6シアル化またはポリシアル化される場合に、残りのN-グリコシル化は、別個のN-グリカンを含む場合がある、またはN-グリカンを全く含まない（すなわち、非グリコシル化のままである）場合がある。

10

【0112】

HuGlyFabVEGF_iが、2, 6ポリシアル化される場合には、複数のシアル酸残基、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個または10個より多いシアル酸残基を含む。ある特定の実施形態では、HuGlyFabVEGF_iがポリシアル化される場合には、2~5、5~10、10~20、20~30、30~40または40~50個のシアル酸残基を含む。ある特定の実施形態では、HuGlyFabVEGF_iがポリシアル化される場合には、2, 6-連結された（シアル酸）ⁿを含み、nは、1~100の任意の数字であり得る。

20

【0113】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブは、二分GlcNAcを含むグリカンで主にグリコシル化されている。ある特定の実施形態では、前記HuGlyFabVEGF_iの各N-グリコシル化部位は、二分GlcNAcを含むグリカンを含む、すなわち、前記HuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の100%が、二分GlcNAcを含むグリカンを含む。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%が、二分GlcNAcを含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_iのN-グリコシル化部位の少なくとも10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~99%が、二分GlcNAcを含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って網膜細胞において発現された抗原結合性断片の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%（すなわち、HuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブを生じさせる抗原結合性断片）が、二分GlcNAcを含むグリカンでグリコシル化されている。別の特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って網膜細胞において発現された抗原結合性断片の少なくとも10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%または90%~99%（すなわち、HuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブを生じさせる抗原結合性断片）は、二分GlcNAcを含むグリカンでグリコシル化されている。

30

40

【0114】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブは、高度グリコシル化されている、すなわち、天然に存在するN-グリコシル化部位の結果として生じるN-グリコシル化に加えて、前記HuGlyFabVEGF_iは、HuGlyFabVEGF_iを生じさせる抗原結

50

合性断片のアミノ酸配列中に存在するように操作されたN-グリコシル化部位にグリカンを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用されるHuGlyFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブは、高度グリコシル化されているが、検出可能なNeuGcおよび／またはα-Gal抗原を含まない。

【0115】

抗原結合性断片を含む抗体のグリコシル化パターンを決定するアッセイは、当技術分野で公知である。例えば、ヒドラジン分解を使用して、グリカンを分析できる。第1に、ヒドラジンとともにインキュベートすることによって、多糖が、その会合しているタンパク質から放出される(Ludger Liberateヒドラジン分解グリカン放出キット、Oxfordshire、UKを使用できる)。求核試薬ヒドラジンは、多糖と担体タンパク質の間のグリコシド結合を攻撃し、結合されたグリカンの放出を可能にする。この処置の際にN-アセチル基は失われ、再N-アセチル化によって再構築しなければならない。グリカンはまた、グリコシダーゼまたはエンドグリコシダーゼ、例えば、PNGase FおよびEndo Hなどの酵素を使用して放出されることもあり、これは、ヒドラジンよりもきれいに切断し、少ない副反応を伴う。遊離グリカンを炭素カラムで精製し、その後、フルオロフォアである2-アミノベンズアミドを用いて還元末端で標識できる。標識された多糖を、Royle et al, Anal Biochem 2002, 304(1):70-90のHPLCプロトコールに従ってGlycoSep-Nカラム(GL Sciences)で分離できる。得られた蛍光クロマトグラムは、多糖の長さおよび反復単位数を示す。構造情報は、個々のピークを収集することおよびその後、MS/MS分析を実施することによって集めることができる。それによって、反復単位の単糖組成および配列を確認することができ、さらに、多糖組成の均一性において同定できる。MALDI-MS/MSによって低または高分子量の特定のピークを分析し、結果を使用して、グリカン配列を確認できる。クロマトグラム中の各ピークは、ある特定の数の反復単位およびその断片、例えば、糖残基からなるポリマー、例えば、グリカンに対応する。したがって、クロマトグラムによって、ポリマー、例えば、グリカン、長さ分布の測定が可能となる。溶出時間は、ポリマー長の指標であり、一方で蛍光強度は、それぞれのポリマー、例えば、グリカンのモル存在量と相関する。抗原結合性断片と会合しているグリカンを評価するための他の方法として、Bondt et al., 2014, Mol. & Cell. Proteomics 13.11:3029-3039、Huang et al., 2006, Anal. Biochem. 349:197-207および／またはSong et al., 2014, Anal. Chem. 86:5661-5666によって記載されるものが挙げられる。

【0116】

抗体(抗原結合性断片を含む)と会合しているグリカンパターンの均一性または不均一性は、グリカンの長さまたは大きさおよびグリコシル化部位全体に存在するグリカン数の両方に関連するので、当技術分野で公知の方法、例えば、グリカンの長さまたは大きさおよび流体力学半径を測定する方法を使用して評価できる。HPLC、例えば、サイズ排除、順相、逆相および陰イオン交換HPLCならびにキャピラリー電気泳動によって、流体力学半径の測定が可能となる。タンパク質中にグリコシル化部位数が多いほど、少ないグリコシル化部位を有する担体と比較して、流体力学半径のより高い変動につながる。しかし、単一グリカン鎖が分析される場合には、それらは、より制御された長さのためにより均質であり得る。グリカン長は、ヒドラジン分解、SDS PAGEおよびキャピラリーゲル電気泳動によって測定できる。さらに、均一性はまた、ある特定のグリコシル化部位使用パターンが、より広い／より狭い範囲に変化することを意味する場合がある。これらの因子は、グリコペプチドLC-MS/MSによって測定できる。

【0117】

N-グリコシル化の利点

N-グリコシル化は、本明細書において記載される方法において使用されるHuGlyFabVEGF_iに多数の利点を付与する。このような利点は、大腸菌はN-グリコシル化に必要な構成成分を天然に有さないので大腸菌における抗原結合性断片の産生によって達成することは不可能である。さらに、一部の利点は、例えば、CHO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GlcNAc）の付加に必要な構成成分を欠くので、またCHO細胞は、ヒトにとって通常ではないグリカン、例えば、Neu5Gcを付加できるので、CHO細胞における抗体産生によって達成することは不可能である。例えば、Song et al., 2014, Anal. Chem. 86:5661-5666を参照されたい。したがって、抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、非標準N-グリコシル化部位（逆および非コンセンサスグリコシル化部位の両方を含む）を含むという本明細書において示される発見により、そのグリコシル化（したがって、抗原結合性断片と関連する利点の改善）をもたらす方法で、このような抗VEGF抗原結合性断片を発現する方法が実現された。特に、ヒト網膜細胞における抗VEGF抗原結合性断片の発現は、そうでなければ抗原結合性断片またはその親抗体と会合しないであろう有益なグリカンを含むHuGlyFabVEGF_i（例えば、ラニビズマブ）の生成をもたらす。

10

【0118】

非標準グリコシル化部位は、普通、抗体集団の低レベルグリコシル化（例えば、1～5%）をもたらすが、機能的利点は、免疫特権を有する器官、例えば、眼では大きい場合がある（例えば、van de Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196:1435-1441を参照されたい）。例えば、Fabグリコシル化は、抗体の安定性、半減期および結合特徴に影響を及ぼし得る。抗体のその標的に対する親和性に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）または表面プラズモン共鳴（SPR）を使用できる。抗体の半減期に対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術を、例えば、放射標識された抗体が投与されている対象中の血液または器官（例えば、眼）における放射能のレベルの測定によって使用できる。抗体の安定性、例えば、凝集またはタンパク質アンフォールディングのレベルに対する、Fabグリコシル化の効果を決定するために、当業者に公知の任意の技術、例えば、示差走査熱量測定（DSC）、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、例えば、サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー（SEC-HPLC）、キャピラリー電気泳動、質量分析または濁度測定を使用できる。本明細書において提供されるHuGlyFabVEGF_i導入遺伝子は、非標準部位で0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上グリコシル化されている抗原結合性断片の生成をもたらす。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片の集団から0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上の抗原結合性断片が、非標準部位でグリコシル化されている。ある特定の実施形態では、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以上の非標準部位が、グリコシル化されている。ある特定の実施形態では、これらの非標準部位での抗原結合性断片のグリコシル化が、HEK293細胞において産生された抗原結合性断片におけるこれらの非標準部位のグリコシル化の量よりも25%、50%、100%、200%、300%、400%、500%またはそれよりも多い。

20

30

【0119】

本明細書において記載される方法において使用されるHuGlyFabVEGF_iでのシアル酸の存在は、HuGlyFabVEGF_iのクリアランス速度、例えば、硝子体液からのクリアランスの速度に対して影響を及ぼし得る。したがって、HuGlyFabVEGF_iのシアル酸パターンを使用して、最適化されたクリアランス速度を有する治療薬を生成できる。抗原結合性断片クリアランス速度を評価する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Huang et al., 2006, Anal. Biochem. 349:197-207を参照されたい。

40

別の特定の実施形態では、N-グリコシル化によって付与される利点は、凝集の低減である。占有されたN-グリコシル化部位は、凝集傾向のアミノ酸残基をマスクすることができ、その結果、凝集が減少する。このようなN-グリコシル化部位は、本明細書において使用された抗原結合性断片にとって天然である場合も、本明細書において使用される抗原結合性断片に操作される場合もあり、発現される場合、例えば、網膜細胞において発現される場合に凝集しにくいHuGlyFabVEGF_iをもたらす。抗体の凝集を評価す

50

る方法は、当技術分野で公知である。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるCourtois et al., 2016, mAbs 8:99-112を参照されたい。

【0120】

別の特定の実施形態では、N-グリコシル化によって付与される利点は、免疫原性の低減である。このようなN-グリコシル化部位は、本明細書において使用される抗原結合性断片にとって天然である場合も、本明細書において使用される抗原結合性断片に操作される場合もあり、発現される場合、例えば、網膜細胞において発現される場合に免疫原性になりにくいHuGlyFabVEGF_iをもたらす。

別の特定の実施形態では、N-グリコシル化によって付与される利点は、タンパク質安定性である。タンパク質のN-グリコシル化は、それらに安定性を付与すると周知であり、N-グリコシル化に起因するタンパク質安定性を評価する方法は、当技術分野で公知である。例えば、Sola and Griebenow, 2009, J Pharm Sci., 98(4): 1223-1245を参照されたい。

10

【0121】

別の特定の実施形態では、N-グリコシル化によって付与される利点は、結合親和性の変更である。抗体の可変ドメイン中のN-グリコシル化部位の存在は、抗体のその抗原に対する親和性を増大し得るということは当技術分野で公知である。例えば、Bovenkamp et al., 2016, J. Immunol. 196:1435-1441を参照されたい。抗体結合親和性を測定するアッセイは、当技術分野で公知である。例えば、Wright et al., 1991, EMBO J. 10:2717-2723およびLeibiger et al., 1999, Biochem. J. 338:529-538を参照されたい。

20

【0122】

5.1.2 チロシン硫酸化

チロシン硫酸化は、Yの+5~-5位置内にグルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)を有するチロシン(Y)残基で生じ、Yの-1位は、中性または酸性の荷電アミノ酸であるが、塩基性アミノ酸、例えば、硫酸化を無効にするアルギニン(R)、リシン(K)またはヒスチジン(H)ではない。驚くべきことに、本明細書において記載される方法に従って使用するための抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、チロシン硫酸化部位を含む(図1を参照されたい)。したがって、本明細書において記載される方法は、少なくとも1つのチロシン硫酸化部位を含む抗VEGF抗原結合性断片、例えば、HuPTMFabVEGF_iの使用を含み、このような抗VEGF抗原結合性断片は、網膜細胞において発現される場合、チロシン硫酸化され得る。

30

【0123】

重要なことに、チロシン硫酸化抗原結合性断片、例えば、ラニビズマブは、天然に、チロシン硫酸化に必要な酵素を有さない大腸菌においては産生され得ない。さらに、CHO細胞は、チロシン硫酸化について欠損している-それらは分泌細胞ではなく、翻訳後チロシン硫酸化のための制限された能力しか有さない。例えば、Mikkelsen & Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537を参照されたい。有利なことに、本明細書において提供される方法は、分泌性であり、チロシン硫酸化のための能力を有する網膜細胞における抗VEGF抗原結合性断片、例えば、HuPTMFabVEGF_i、例えば、ラニビズマブの発現を必要とする。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。

40

【0124】

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、標的に対する治療用抗体の抗原結合性断片のチロシン硫酸化は、抗原に対するアビディティおよび活性を著しく増大すると示されている。例えば、Loos et al., 2015, PNAS 112: 12675-12680およびChoe et al., 2003, Cell 114: 161-170を参照されたい。チロシン硫酸化を検出するアッセイは、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。

50

【0125】

5.1.3 O-グリコシル化

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。抗体のヒンジ領域中に存在するアミノ酸残基は、O-グリコシル化され得るということが実証された。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される抗VEGF抗原結合性断片、例えば、ラニズマブは、そのヒンジ領域のすべてまたは部分を含み、したがって、ヒト網膜細胞において発現される場合にO-グリコシル化されることが可能である。やはり大腸菌はヒト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天然に含有しないので（代わりに、大腸菌におけるO-グリコシル化は、細菌が特定のO-グリコシル化機構を含有するように修飾される場合のみであると実証されている。例えば、Faridmoayer et al., 2007, J. Bacteriol. 189:8088-8098を参照されたい。）、O-グリコシル化の可能性は、例えば、大腸菌によって産生される抗原結合性断片と比較して、本明細書において提供されるHuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFiに別の有利な点を付与する。O-グリコシル化HuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFiは、グリカンを持つために、N-グリコシル化HuGly Fab VEGFi（上記で論じられたような）と有利な特徴を共有する。

10

【0126】

5.2 構築物および製剤

本明細書において提供される方法において使用するために、抗VEGF抗原結合性断片または抗VEGF抗原結合性断片の高度グリコシル化誘導体をコードするウイルスベクターまたは他のDNA発現構築物がある。本明細書において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、導入遺伝子を標的細胞（例えば、網膜色素上皮細胞）に送達するための任意の適した方法を含む。導入遺伝子の送達的手段として、ウイルスベクター、リボソーム、他の脂質含有複合体、他の高分子複合体、合成修飾mRNA、非修飾mRNA、小分子、非生物学的に活性な分子（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挙げられる。一部の実施形態では、ベクターは、標的化されるベクター、例えば、網膜色素上皮細胞に標的化されるベクターである。

20

【0127】

一部の態様では、本開示は、使用するための核酸を提供し、核酸は、CB7プロモーター（ニワトリβ-アクチンプロモーターおよびCMVエンハンサー）、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プロモーターおよびオプシンプロモーター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たHuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFiをコードする。特定の実施形態では、HuPTM Fab VEGFiは、CB7プロモーターに作動可能に連結される。

30

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、本明細書において提供される。核酸は、DNA、RNAまたはDNAおよびRNAの組合せを含み得る。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、抗VEGF抗原結合性断片）の配列、非翻訳領域および終結配列からなる群から選択される配列のうち1つまたは複数を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において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したプロモーターを含む。

40

ある特定の実施形態では、本明細書において開示される核酸（例えば、ポリヌクレオチド）および核酸配列は、例えば、当業者に公知の任意のコドン最適化技術によってコドン最適化され得る（例えば、Quax et al., 2015, Mol Cell 59:149-161による概説を参照されたい）。

【0128】

50

特定の実施形態では、本明細書において記載される構築物は、構築物 I であり、構築物 I は、以下の構成成分：（１）発現カセットに隣接する A A V 8 逆方向末端反復配列、（２）a) C M V エンハンサー／ニワトリβ-アクチンプロモーターを含む C B 7 プロモーター、b) ニワトリβ-アクチンイントロンおよび c) ウサギβ-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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 A リンカーによってわけられた抗 V E G F 抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。

【 0 1 2 9 】

別の特定の実施形態では、本明細書において記載される構築物は、構築物 I I であり、構築物 I I は、以下の構成成分：（１）発現カセットに隣接する A A V 2 逆方向末端反復配列、（２）a) C M V エンハンサー／ニワトリβ-アクチンプロモーターを含む C B 7 プロモーター、b) ニワトリβ-アクチンイントロンおよび c) ウサギβ-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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 A リンカーによってわけられた抗 V E G F 抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。特定の実施形態では、本明細書において記載される構築物は、図 4 に例示される。

【 0 1 3 0 】

5. 2. 1 m R N A

ある特定の実施形態では、本明細書において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、抗 V E G F 抗原結合性断片部分）をコードする修飾された m R N A である。導入遺伝子を網膜色素上皮細胞に送達するための修飾されたおよび修飾されていない m R N A の合成は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる H ansson et al., J. Biol. Chem., 2015, 290(9):5661-5672 において教示されている。ある特定の実施形態では、抗 V E G F 抗原結合性断片部分をコードする修飾された m R N A が本明細書において提供される。

【 0 1 3 1 】

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（A A V、例えば、A A V 8）、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（H V J）、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（M L V）-およびヒト免疫不全ウイルス（H I V）-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（S F V）およびシンドビスウイルス（S I N）が含まれる。ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において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に欠陥があるように変更される。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、ハイブリッドベクター、例えば、「ヘルプレス」アデノウイルスベクター中に入れられた A A V ベクターである。ある特定の実施形態では、第 1 のウイルスに由来するウイルスカプシドおよび第 2 のウイルスに由来する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、本明細書において提供される。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（V S V）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、V S V-G タンパク質である。

【 0 1 3 2 】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、H I V 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、本明細書において提供される H I V 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、g a g および p o l 遺伝子は、H I V ゲノムに由来し、e n v 遺伝子は、別のウイルスに由来する。

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書にお

10

20

30

40

50

いて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つまたは複数の前初期（IE）遺伝子を含まず、それらを実質的に無細胞毒性にするように修飾される。

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において提供されるMLVベースのベクターは、ウイルス遺伝子の代わりに最大8 kbの異種DNAを含む。

【0133】

ある特定の実施形態では、本明細書において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ベクターである。ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において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、本明細書において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、本明細書において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：長い末端反復配列、プライマー結合部位、ポリプリン配列（polypurine tract）、att部位およびカプシド形成部位のうち1つまたは複数を含む。

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において提供されるアルファウイルスベクターは、組換え、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、本明細書において提供されるアルファウイルスベクター中のアルファウイルスレプリコンは、そのビリオン表面に機能的異種リガンドを提示することによって指定の細胞種へ標的化される。

【0134】

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において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、本明細書において提供されるAAV8ベースのウイルスベクターは、網膜細胞に対する指向性を保持する。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるAAVベースのベクターは、AAV rep 遺伝子（複製のために必要とされる）および／またはAAV cap 遺伝子（カプシドタンパク質の合成のために必要とされる）をコードする。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、本明細書において提供されるAAVベースのベクターは、AAVの1つまたは複数の血清型に由来する構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるAAVベースのベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11またはAAVrh10のうち1つまたは複数に由来するカプシド構成成分を含む。好ましい実施形態では、本明細書において提供されるAAVベースのベクターは、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11またはAAVrh10血清型のうち1つまたは複数に由来する構成成分を含む。

【0135】

特定の実施形態では、調節エレメントの制御下に、ITRおよび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カプシドの生物学的機能を保持しながら、AAV8カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号48）に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、99%もしくは99.9%同一であるウイルスカプシドに隣接して、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を含むAAV8ベクターが提供される。ある特定の実施形態では、コードされるAAV8カプシドは、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する配列番号48の配列を有する。図8は、SUBSとラベル付けされた行における比較に基づく、アラインされた配列中のある特定の位置で置換され得る可能性がある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配列中のその位置には存在しない、図8のSUBS行で同定される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のアミノ酸置換を有するAAV8カプシドバリエーションを含む。

【0136】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるAAVは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるZinn et al., 2015, Cell Rep. 12 (6): 1056-1068に記載されるようなAnc80またはAnc80L65である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるAAVは、以下のアミノ酸挿入：各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,193,956号、同9,458,517号および同9,587,282号ならびに米国特許出願公開第2016/0376323号に記載されるような、LGECTRIPまたはLALGECTRIPのうち1つを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるAAVは、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,193,956号、同9,458,517号および同9,587,282号ならびに米国特許出願公開第2016/0376323号に記載されるようなAAV.7m8である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるAAVは、米国特許第9,585,971号において開示される任意のAAV、例えば、AAV-PHP.Bである。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるAAVは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、以下の特許および特許出願において開示されるAAVである：米国特許第7,906,111号、同8,524,446号、同8,999,678号、同8,628,966号、同8,927,514号、同8,734,809号、同9,284,357号、同9,409,953号、同9,169,299号、同9,193,956号、同9,458,517号および同9,587,282号、米国特許出願公開第2015/0374803号、同2015/0126588号、同2017/0067908号、同2013/0224836号、同2016/0215024号、同2017/0051257号ならびに国際特許出願公開番号PCT/US2015/034799、PCT/EP2015/053335。

【0137】

AAV8ベースのウイルスベクターが、本明細書において記載される方法のある特定のもののにおいて使用される。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は、例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,282,199号、米国特許第7,790,449号、米国特許第8,318,480号、米国特許第8,962,332号および国際特許出願公開番号PCT/EP2014/076466において教示されている。一態様では、導入遺伝子（例えば、抗VEGF抗原結合性断片）をコードするAAV（例えば、AAV8）ベースのウイルスベクターが、本明細書において提供される。具体的な実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片をコードするAAV8ベースのウイルスベクターが、本明細書において提供される。より具体的な実施形態では、ラニビズマブをコードするAAV8ベースのウイルスベクターが、本明細書において提供される。

【0138】

ある特定の実施形態では、一本鎖AAV (ssAAV) が使用され得る（前掲）。ある特定の実施形態では、自己相補的ベクター、例えば、scAAVを使用できる（例えば、各々、全体が参照により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、同7,125,717号および同7,456,683号を参照されたい）。

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるウイル

スペクターは、アデノウイルススペ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を使用して、抗VEGF抗原結合性断片において導入できる。組換えアデノウイルスは、E1が欠失しており、E3が欠失しているか、していない、いずれかの欠失された領域中に発現カセットが挿入された第1世代のベクターであり得る。組換えアデノウイルスは、E2およびE4領域の完全または部分欠失を含有する第2世代のベクターであり得る。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(phi)のみを保持する。導入遺伝子は、パッケージングシグナルと3' ITRの間に挿入され、およそ36 kbの野生型の大きさに近いゲノムを維持するためにスタッパー配列を有するか、または有さない。アデノウイルスベクターの生成のための例示的プロトコルは、その全体が参照により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。

10

【0139】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用されるウイルスベクターは、レンチウイルススペ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を使用して、抗VEGF抗原結合性断片において導入できる。構築物を作製するために4種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抗VEGF抗原結合性断片遺伝子を有するシスプラスミド。

20

【0140】

レンチウイルスベクター生成のために、4種のプラスミドを細胞（すなわち、HEK293ベースの細胞）中に同時トランスフェクトし、それによって、中でもポリエチレンジオキサイド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できる。次いで、上清においてレンチウイルスを回収する（レンチウイルスは、活性であるために細胞から出芽する必要があり、そのため、細胞回収は行われる必要がない／行われるべきではない）。上清を濾過し（0.45 μm）、次いで、塩化マグネシウムおよびベンゾナーゼを添加する。さらなる下流プロセスは広く変わり得るが、TFFおよびカラムクロマトグラフィーを使用することが最もGMP適合性のあるものである。他のものは、カラムクロマトグラフィーと伴に／伴わずに超遠心分離法を使用する。レンチウイルスベクターの生成のための例示的プロトコルは、両方ともその全体が参照により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。

30

【0141】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用するためのベクターは、抗VEGF抗原結合性断片（例えば、ラニビズマブ）をコードするものであり、その結果、関連細胞（例えば、in vivoまたはin vitroでの網膜細胞）中にベクターが導入されると、抗VEGF抗原結合性断片のグリコシル化、またはチロシン硫酸化バリエーションが、細胞によって発現される。特定の実施形態では、発現された抗VEGF抗原結合性断片は、上記の節5.1に記載されるようなグリコシル化および／またはチロシン硫酸化パターンを含む。

40

【0142】

5.2.3 遺伝子発現のプロモーターおよびモディファイヤー

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるベクターは、遺伝子送達または遺伝子発現を調節する構成成分（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、本明細書において提供されるベクターは、遺伝子発現を調節する構成成分を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書にお

50

いて提供されるベクターは、取り込み後の細胞内のポリヌクレオチド（例えば、導入遺伝子）の局在性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、本明細書において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でいる細胞を検出または選択するための検出可能なまたは選択マーカーとして使用できる構成成分を含む。

【0143】

ある特定の実施形態では、本明細書において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、誘導性プロモーターである。誘導性プロモーターは、治療効力を求めて望まれるように導入遺伝子発現をオンおよびオフにすることができるように好ましいものであり得る。このようなプロモーターとして、例えば、低酸素誘導性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挙げられる。低酸素誘導性プロモーターには、HIF結合部位を有するプロモーターが含まれる、低酸素誘導性プロモーターの教示については、例えば、各々、参照により本明細書に組み込まれる、Schodel, et al., 2011, Blood 117(23):e207-e217およびKenneth and Rocha, 2008, Biochem J. 414:19-29を参照されたい。さらに、構築物において使用され得る低酸素誘導性プロモーターには、エリスロポエチンプロモーターおよびN-WASPプロモーターが含まれる（低酸素誘導性プロモーターの教示については、両方とも参照により本明細書に組み込まれる、エリスロポエチンプロモーターの開示についてのTsuchiya, 1993, J. Biochem. 113:395およびN-WASPプロモーターの開示についてのSalvi, 2017, Biochemistry and Biophysics Reports 9:13-21を参照されたい）。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類似体の投与によって誘導可能なプロモーターを含有し得る（例えば、その薬物誘導性プロモーターの開示について、参照により本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開番号WO94/18317、WO96/20951、WO96/41865、WO99/10508、WO99/10510、WO99/36553およびWO99/41258ならびに米国特許番号US7,067,526（ラパマイシン類似体を開示する）を参照されたい）。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、低酸素誘導性因子（HIF）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、HIF-1 α 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、HIF-2 α 結合部位を含む。ある特定の実施形態では、HIF結合部位は、RCGTGモチーフを含む。HIF結合部位の位置および順序に関する詳細については、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるSchodel, et al., 2011, Blood 117(23):e207-e217を参照されたい。ある特定の実施形態では、プロモーターは、HIF転写因子以外の低酸素誘導性転写因子の結合部位を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において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IRES部位を含む。低酸素誘導性遺伝子発現に関する教示およびそれに関連する因子については、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kenneth and Rocha, Biochem J., 2008, 414:19-29を参照されたい。

【0144】

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（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dinculescu et al., 2005, Hum Gene Ther 16:649-663を参照されたい）。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増強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は、ニワトリ β -アクチンイントロンおよび／またはウサギ β -グロビンポリAシグナルを含む。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を、互いに反転または移動できる。ある特定の実施形態では、プロモーターのエレメントを、協同的に機能するように配置する。ある特定の実施形態では、プロモーターの

エレメントを独立に機能するように配置する。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、ヒトCMV前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、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、本明細書において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、本明細書において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)を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、RPE65プロモーターを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるベクターは、VMD2プロモーターを含む。

10

【0145】

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において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、本明細書において提供されるウイルスベクターは、レプレッサーを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において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。

20

【0146】

5. 2. 4 シグナルペプチド

ある特定の実施形態では、本明細書において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、本明細書において提供されるウイルスベクターは、1つまたは複数のシグナルペプチドを含む。シグナルペプチドはまた、「リーダー配列」または「リーダーペプチド」と呼ばれることもある。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドによって、導入遺伝子産物(例えば、抗VEGF抗原結合性断片部分)が、細胞において適切なパッケージング(例えば、グリコシル化)を達成することが可能となる。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドによって、導入遺伝子産物(例えば、抗VEGF抗原結合性断片部分)が、細胞において適切な局在性を達成することが可能となる。ある特定の実施形態では、シグナルペプチドによって、導入遺伝子産物(例えば、抗VEGF抗原結合性断片部分)が、細胞からの分泌を達成することが可能となる。本明細書において提供されるベクターおよび導入遺伝子と関連して使用されるべきシグナルペプチドの例は、表1に見出すことができる。

30

【0147】

40

50

【表 1】

表 1. 本明細書において提供されるベクターとともに使用するためのシグナルペプチド

配列番号	シグナルペプチド	配列
5	VEGF-A シグナルペプチド	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA
6	フィブリン-1 シグナルペプチド	MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA
7	ビトロネクチンシグナルペプチド	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
8	補体 H 因子シグナルペプチド	MRLAKIICLMLWAICVA
9	オプチシンシグナルペプチド	MRLLAFLSLL ALVLQETGT
22	アルブミンシグナルペプチド	MKWVTFISLLFLFSSAYS
23	キモトリプシノーゲンシグナルペプチド	MAFLWLLSCWALLGTTFG
24	インターロイキン-2 シグナルペプチド	MYRMQLLSCIALILALVTNS
25	トリプシノーゲン-2 シグナルペプチド	MNLLLILTFVAAAVA

10

20

【0148】

5. 2. 5 ポリシストロン性メッセージ-IRES および F2A リンカー

配列内リボソーム進入部位。単一構築物を、切断可能なリンカーまたは IRES によってわけられた重鎖および軽鎖の両方をコードし、その結果、形質導入された細胞から別個の重鎖および軽鎖ポリペプチドが発現されるように操作することができる。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、ポリシストロン性（例えば、バイシストロン性）メッセージを提供する。例えば、ウイルス構築物は、配列内リボソーム進入部位（IRES）エレメントによってわけられた重鎖および軽鎖をコードし得る（例えば、バイシストロン性ベクターを作出するために IRES エレメントの使用によって、例えば、その全体が参照により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、リボソームスキヤニングモデルを迂回し、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、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Furling et al., 2001, Gene Ther 8(11): 854-73に記載されている。ある特定の実施形態では、バイシストロン性メッセージは、中のポリヌクレオチドの大きさが制限されたウイルスベクター内に含有される。ある特定の実施形態では、バイシストロン性メッセージは、AAV ウイルスベースのベクター（例えば、AAV 8 ベースのベクター）内に含有される。

30

【0149】

フューリン-F2A リンカー。他の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、自己切断性フューリン/F2A (F/F2A) リンカーなどの切断可能なリンカーによってわけられた重鎖および軽鎖をコードする（各々、その全体が参照により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）。

40

【0150】

重鎖および軽鎖コード配列を分離するために、例えば、フューリン-F2A リンカーを発現カセット中に組み込むことができ、その結果、構造：

リーダー-重鎖-フューリン部位-F2A 部位-リーダー-軽鎖-ポリ A
を有する構築物が得られる。

50

【0151】

アミノ酸配列 L L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 26) 内の F 2 A 部位は、自己プロセッシングであり、最後の G と P アミノ酸残基の間で「切断」をもたらす。使用できるであろう追加のリンカーとして、それだけには限らないが、以下が挙げられる：

- ・ T 2 A : (G S G) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号 27)、
- ・ P 2 A : (G S G) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号 28)、
- ・ E 2 A : (G S G) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 29)、
- ・ F 2 A : (G S G) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号 30)

10

【0152】

リボソームがオープンリーディングフレーム中の F 2 A 配列に遭遇すると、ペプチド結合がスキップされ、その結果、翻訳が終結されるか、または下流配列 (軽鎖) の翻訳が継続される。この自己プロセッシング配列は、重鎖の C 末端の末端に一連の追加のアミノ酸をもたらす。しかし、このような追加のアミノ酸は次いで、F 2 A 部位の直前および重鎖配列の後ろに位置するフューリン部位で宿主細胞フューリンによって切断され、カルボキシペプチダーゼによってさらに切断される。得られた重鎖は、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応じて、C 末端に含まれる 1、2、3 個またはより多くの追加のアミノ酸を有する場合もあり、このような追加のアミノ酸を有さない場合もある。がある (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を参照されたい)。使用できるフューリンリンカーは、一連の 4 個の塩基性アミノ酸、例えば、R K R R、R R R R、R R K R または R K K R 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、追加のアミノ酸が残る場合があり、その結果、追加の 0、1、2、3 または 4 個のアミノ酸が、重鎖の C 末端に残る場合がある、例えば、R、R R、R K、R K R、R R R、R R K、R K K、R K R R、R R R R、R R K R または R K K R。ある特定の実施形態では、1つ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、追加のアミノ酸は残らない。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用するための構築物によって生成される抗体、例えば、抗原結合性断片集団の 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15% または 20% またはそれより少ないが、0% より多くは、切断後に重鎖の C 末端上に残る 1、2、3 または 4 個のアミノ酸を有する。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法において使用するための構築物によって生成される抗体、例えば、抗原結合性断片集団の 0.5~1%、0.5%~2%、0.5%~3%、0.5%~4%、0.5%~5%、0.5%~10%、0.5%~20%、1%~2%、1%~3%、1%~4%、1%~5%、1%~10%、1%~20%、2%~3%、2%~4%、2%~5%、2%~10%、2%~20%、3%~4%、3%~5%、3%~10%、3%~20%、4%~5%、4%~10%、4%~20%、5%~10%、5%~20% または 10%~20% は、切断後に重鎖の C 末端上に残る 1、2、3 または 4 個のアミノ酸を有する。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、その結果、重鎖の C 末端の追加のアミノ酸は、R、R X、R X K、R X R、R X K R または R X R R である (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、追加のアミノ酸が重鎖の C 末端に残らない場合がある。

20

30

40

【0153】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される発現カセットは、中のポリヌクレオチドの大きさが制限されたウイルスベクター内に含有される。ある特定の実施形態では、発現カセットは、A A V ウイルスベクターのベクター (例えば、A A V 8 ベースのベクター) 内に含有される。

50

【0154】

5.2.6 非翻訳領域

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスペクターは、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。

【0155】

5.2.7 逆方向末端反復配列

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスペクターは、1つまたは複数の逆方向末端反復配列（ITR）配列を含む。ITR配列を、ウイルスペクターのビリオン中へ組換え遺伝子発現カセットをパッケージングするために使用できる。ある特定の実施形態では、ITRは、AAV、例えば、AAV8またはAAV2に由来する（例えば、各々、その全体が参照により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、米国特許第7,790,449号、米国特許第8,318,480号、米国特許第8,962,332号および国際特許出願番号PCT/EP2014/076466を参照されたい）。

【0156】

5.2.8 導入遺伝子

導入遺伝子によってコードされるHuPTM Fab VEGFi、例えば、HuGly Fab VEGFiとして、それだけには限らないが、VEGFに結合する抗体の抗原結合性断片、例えば、ペバシズマブ、抗VEGF Fab部分、例えば、ラニズマブ、またはFabドメインに追加のグリコシル化部位を含有するように操作されたこのようなペバシズマブもしくはラニズマブのFab部分を挙げることができる（例えば、全長抗体のFabドメインで高度グリコシル化されているペバシズマブの誘導体の説明については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Courtois et al., 2016, mAbs 8: 99-112を参照されたい）。

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるペクターは、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子をコードする。具体的な実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、網膜細胞における発現のために適当な発現制御エレメントによって制御される。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、軽鎖および重鎖cDNA配列のペバシズマブFab部分を含む（それぞれ、配列番号10および11）。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、ラニズマブ軽鎖および重鎖cDNA配列を含む（それぞれ、配列番号12および13）。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、それぞれ配列番号3および4の軽鎖および重鎖を含むペバシズマブFabをコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号3で示される配列に対して少なくとも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む軽鎖を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号4で示される配列に対して少なくとも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む重鎖を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号3で示される配列に対して少なくとも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む軽鎖および配列番号4で示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

10

20

30

40

50

98%または99%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、それぞれ、配列番号1および2の軽鎖および重鎖を含む高度グリコシル化ラニビズマブをコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号1で示される配列に対して少なくとも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む軽鎖を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号2で示される配列に対して少なくとも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む重鎖を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号1で示される配列に対して少なくとも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む軽鎖および配列番号2で示される配列に対して少なくとも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む重鎖を含む抗原結合性断片をコードする。

10

【0157】

ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、以下の突然変異：L118N（重鎖）、E195N（軽鎖）またはQ160NもしくはQ160S（軽鎖）のうち1つまたは複数を有する配列番号3および4の軽鎖および重鎖を含む高度グリコシル化バシズマブFabをコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、以下の突然変異：L118N（重鎖）、E195N（軽鎖）またはQ160NもしくはQ160S（軽鎖）のうち1つまたは複数を有する配列番号1および2の軽鎖および重鎖を含む高度グリコシル化ラニビズマブをコードする。抗原結合性断片導入遺伝子cDNAの配列は、例えば、表2に見出すことができる。ある特定の実施形態では、抗原結合性断片導入遺伝子cDNAの配列は、配列番号10および11または配列番号12および13のシグナル配列を、表1に列挙された1つまたは複数のシグナル配列と置き換えることによって得られる。

20

【0158】

ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、抗原結合性断片をコードし、6つのバシズマブCDRのヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、抗原結合性断片をコードし、6つのラニビズマブCDRのヌクレオチド配列を含む。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、ラニビズマブの重鎖CDR1~3（配列番号20、18および21）を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、ラニビズマブの軽鎖CDR1~3（配列番号14~16）を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、バシズマブの重鎖CDR1~3（配列番号17~19）を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、バシズマブの軽鎖CDR1~3（配列番号14~16）を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、ラニビズマブの重鎖CDR1~3（配列番号20、18および21）を含む重鎖可変領域およびラニビズマブの軽鎖CDR1~3（配列番号14~16）を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、バシズマブの重鎖CDR1~3（配列番号17~19）を含む重鎖可変領域およびバシズマブの軽鎖CDR1~3（配列番号14~16）を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードする。

30

40

【0159】

50

ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

10

20

【0160】

ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわちWINTYTGETTYAADFKR（配列番号18）中のNは、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわちGYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGETTYAADFKR（配列番号18）中のNは、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。好ましい実

30

40

50

施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0161】

ある特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわちGYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域および配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわちSASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗VEGF抗原結合性断片導入遺伝子は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域および配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域を含む抗原結合性断片をコードし、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されておらず、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号20の重鎖CDR1を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0162】

ある特定の態様では、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む抗VEGF抗原結合性断片ならびにこのような抗原-VEGF抗原結合性断片をコードする導入遺伝子も本明細書において提供され、軽

10

20

30

40

50

鎖 C D R 3 の第 2 のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号 1 6）中の第 2 の Q）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、軽鎖 C D R 1 の第 8 および第 1 1 のアミノ酸残基（すなわち、S A S Q D I S N Y L N（配列番号 1 4）中の 2 つの N は各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、軽鎖 C D R 3 の第 2 のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号 1 6）中の第 2 の Q）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、軽鎖 C D R 3 の第 2 のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号 1 6）中の第 2 の Q）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、軽鎖 C D R 1 の第 8 および第 1 1 のアミノ酸残基（すなわち、S A S Q D I S N Y L N（配列番号 1 4）中の 2 つの N は各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、軽鎖 C D R 3 の第 2 のアミノ酸残基（すなわち、Q Q Y S T V P W T F（配列番号 1 6）中の第 2 の Q）は、アセチル化されていない。本明細書において提供される抗 V E G F 抗原結合性断片および導入遺伝子は、本明細書において記載される本発明に従って任意の方法で利用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

10

20

【0163】

ある特定の態様では、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含む抗 V E G F 抗原結合性断片およびこのような抗原－V E G F 抗原結合性断片をコードする導入遺伝子も本明細書において提供され、重鎖 C D R 1 の最後のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の N）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、重鎖 C D R 1 の第 9 のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の M）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、重鎖 C D R 2 の第 3 のアミノ酸残基（すなわち、W I N T Y T G E P T Y A A D F K R（配列番号 1 8）中の N は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、重鎖 C D R 1 の最後のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の N）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、重鎖 C D R 1 の最後のアミノ酸残基（すなわち G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の N）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号 1 4～1 6 の軽鎖 C D R 1～3 ならびに配列番号 2 0、1 8 および 2 1 の重鎖 C D R 1～3 を含み、重鎖 C D R 1 の第 9 のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の M）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、重鎖 C D R 2 の第 3 のアミノ酸残基（すなわち、W I N T Y T G E P T Y A A D F K R（配列番号 1 8）中の N は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロ G l u）のうち 1 つまたは複数を保持し、重鎖 C D R 1 の最後のアミノ酸残基（すなわち、G Y D F T H Y G M N（配列番号 2 0）中の N）は、アセチル化

30

40

50

されていない。本明細書において提供される抗VEGF抗原結合性断片および導入遺伝子は、本明細書において記載される本発明に従って任意の方法で使用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0164】

ある特定の態様では、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含む抗VEGF抗原結合性断片ならびにこのような抗原-VEGF抗原結合性断片をコードする導入遺伝子も本明細書において提供され、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGETTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持せず、（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持しない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。特定の実施形態では、抗原結合性断片は、配列番号14～16の軽鎖CDR1～3ならびに配列番号20、18および21の重鎖CDR1～3を含み、（1）重鎖CDR1の第9のアミノ酸残基（すなわち、GYDFTHYGMN（配列番号20）中のM）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR2の第3のアミノ酸残基（すなわち、WINTYTGETTYAADFKR（配列番号18）中のN）は、以下の化学修飾：アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、重鎖CDR1の最後のアミノ酸残基（すなわちGYDFTHYGMN（配列番号20）中のN）は、アセチル化されておらず、（2）軽鎖CDR1の第8および第11のアミノ酸残基（すなわち、SASQDISNYLN（配列番号14）中の2つのNは各々、以下の化学修飾：酸化、アセチル化、脱アミド化およびピログルタミル化（ピロGlu）のうち1つまたは複数を保持し、軽鎖CDR3の第2のアミノ酸残基（すなわち、QQYSTVPWTF（配列番号16）中の第2のQ）は、アセチル化されていない。本明細書において提供される抗VEGF抗原結合性断片および導入遺伝子は、本明細書において記載される本発明に従って任意の方法で使用できる。好ましい実施形態では、本明細書において記載される化学修飾または化学修飾の欠如（場合によっては）は、質量分析によって決定される。

【0165】

【表 2】

表 2. 例示の導入遺伝子配列

配列 番号	VEGF 抗原 結合性断 片	配列
1	ラニビズ マブ Fab アミノ酸 配列 (軽 鎖)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAP KVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
2	ラニビズ マブ Fab アミノ酸 配列 (重 鎖)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
3	ベバシズ マブ Fab アミノ酸 配列 (軽 鎖)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAP KVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4	ベバシズ マブ Fab アミノ酸 配列 (重 鎖)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG LEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
10	ベバシズ マブ cDNA (軽鎖)	gctagcgcca ccattgggctg gtcctgcac atcctgttcc tggtggccac cgccaccggc gtgcactccg acatccagat gaccagtc ccctcctccc tgccgcctc cgtgggagac cgggtgacca tcacctgctc cgcctcccag gacatctcca actacctgaa ctggtaccag cagaagccc gcaaggcccc caagggtgctg atctacttca cctcctccct gcaactccgc gtgcccctccc ggttctccgg ctccggctcc ggcaccgact tcacctgac catctcctcc ctgcagccc aggacttcgc cacctactac tgccagcagt actccaccgt gccctggacc ttcgggcagg gcaccaagg ggagatcaag cggaccgtgg ccgccccctc cgtgttcac ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtgggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caagggtgcag tgggaagggtg acaacgccc gcagtccggc aactcccagg agtccgtgac cgagcaggac tccaaggact ccacctact cctgtcctcc accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtcctcccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggagagtg ctgagcggcc gcctcgag

10

20

30

40

50

40

13	ラニビズ マブ cDNA (シグ ナル配列 を含む重 鎖)	gagctcatat gaaatacctg ctgccgaccg ctgctgctgg tctgctgctc ctgctgccc agccggcgat ggccgaagtt cagctgggtg aaagcgggtg tggctctggt cagcctgggtg gtagcctgcg tctgagctgt gcagcaagcg gttatgattt taccattat ggtatgaatt gggttcgtca ggcaccgggt aaaggtctgg aatgggttgg ttggattaat acctataccg gtgaaccgac ctatgcagca gatttttaaac gtcgtttttac ctttagcctg gataccagca aaagcaccgc atatctgcag atgaatagcc tgcgtgcaga agataccgca gtttattatt gtgccaaata tccgtattac tatggcacca gccactggta tttcgatgtt tggggtcagg gcaccctggg taccgttagc agcgcaagca ccaaaggtcc gagcgttttt ccgctggcac cgagcagcaa aagtaccagc ggtggcacag cagcactggg ttgtctggtt aaagattatt ttccggaacc ggttaccgtg agctggaata gcggtgcact gaccagcggg gttcatacct ttccggcagt tctgcagagc agcggctctgt atagcctgag cagcgttggt accgttccga gcagcagcct gggcaccacg acctatattt gtaatgttaa tcataaaccg agcaatacca aagtggataa aaaagttgag ccgaaaagct gcgataaaac ccatctgtaa taggggtacc
	ベバシズ マブ軽鎖 CDR (14、15 および 16)	SASQDISNYLN FTSSLHS QQYSTVPWT
	ベバシズ マブ重鎖 CDR (17、18 および 19)	GYTFTNYGMN WINTYTGEPTYAADFQR YPHYGSSHWYFDV
	ラニビズ マブ軽鎖 CDR (14、15 および 16)	SASQDISNYLN FTSSLHS QQYSTVPWT
	ラニビズ マブ重鎖 CDR (20、18 および 21)	GYDFTHYGMN WINTYTGEPTYAADFQR YPYYGTSHWYFDV

10

20

30

40

50

【0166】

5.2.9 構築物

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、以下の順序で以下の要素を含む：a) 構成的または低酸素誘導性プロモーター配列、およびb) 導入遺伝子（例えば、抗VEGF抗原結合性断片部分）をコードする配列。ある特定の実施形態では、導入遺伝子をコードする配列は、IRESエレメントによって分けられる複数のORFを含む。ある特定の実施形態では、ORFは、抗VEGF抗原結合性断片の重鎖および軽鎖ドメインをコードする。ある特定の実施形態では、導入遺伝子をコードする配列は、F/F2A配列によって分けられた1つのORF中に複数のサブユニットを含む。

ある特定の実施形態では、導入遺伝子を含む配列は、F／F 2 A配列によってわけられた抗V E G F抗原結合性断片の重鎖および軽鎖ドメインをコードする。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、以下の順序で以下の要素：a) 構成的または低酸素誘導性プロモーター配列、およびb) 導入遺伝子（例えば、抗V E G F抗原結合性断片部分）をコードする配列を含み、導入遺伝子は、V E G Fのシグナルペプチド（配列番号5）を含み、導入遺伝子は、I R E Sエレメントによってわけられた軽鎖および重鎖配列をコードする。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、以下の順序で以下の要素：a) 構成的または低酸素誘導性プロモーター配列、およびb) 導入遺伝子（例えば、抗V E G F抗原結合性断片部分）をコードする配列を含み、導入遺伝子は、V E G Fのシグナルペプチド（配列番号5）を含み、導入遺伝子は、切断可能なF／F 2 A配列によってわけられた軽鎖および重鎖配列をコードする。

10

【0167】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、以下の順序で以下の要素：a) 第1のI T R配列、b) 第1のリンカー配列、c) 構成的または低酸素誘導性プロモーター配列、d) 第2のリンカー配列、e) イントロン配列、f) 第3のリンカー配列、g) 第1のU T R配列、h) 導入遺伝子（例えば、抗V E G F抗原結合性断片部分）をコードする配列、i) 第2のU T R配列、j) 第4のリンカー配列、k) ポリA配列、l) 第5のリンカー配列、およびm) 第2のI T R配列を含む。

20

ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるウイルスベクターは、以下の順序で以下の要素：a) 第1のI T R配列、b) 第1のリンカー配列、c) 構成的または低酸素誘導性プロモーター配列、d) 第2のリンカー配列、e) イントロン配列、f) 第3のリンカー配列、g) 第1のU T R配列、h) 導入遺伝子（例えば、抗V E G F抗原結合性断片部分）をコードする配列、i) 第2のU T R配列、j) 第4のリンカー配列、k) ポリA配列、l) 第5のリンカー配列、およびm) 第2のI T R配列を含み、導入遺伝子は、V E G Fのシグナルペプチド（配列番号5）を含み、導入遺伝子は、切断可能なF／F 2 A配列によってわけられた軽鎖および重鎖配列をコードする。

【0168】

特定の実施形態では、本明細書において記載される構築物は、構築物Iであり、構築物Iは、以下の構成成分：（1）発現カセットに隣接するA A V 8逆方向末端反復配列、（2）a) C M Vエンハンサー／ニワトリβ-アクチンプロモーターを含むC B 7プロモーター、b) ニワトリβ-アクチンイントロンおよびc) ウサギβ-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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 Aリンカーによってわけられた抗V E G F抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。

30

【0169】

別の特定の実施形態では、本明細書において記載される構築物は、構築物IIであり、構築物IIは、以下の構成成分：（1）発現カセットに隣接するA A V 2逆方向末端反復配列、（2）a) C M Vエンハンサー／ニワトリβ-アクチンプロモーターを含むC B 7プロモーター、b) ニワトリβ-アクチンイントロンおよびc) ウサギβ-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）等量の重鎖および軽鎖ポリペプチドの発現を確実にする、自己切断性フューリン（F）／F 2 Aリンカーによってわけられた抗V E G F抗原結合性断片の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列を含む。

40

【0170】

5. 2. 10 ベクターの製造および試験

本明細書において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できる。本明細書において提供されるウイルスベクターは、哺乳類宿主細胞、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

50

できる。本明細書において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に由来する宿主細胞を使用して製造できる。

宿主細胞は、導入遺伝子をコードする配列および関連する要素（すなわち、ベクターゲノム）ならびに宿主細胞においてウイルスを産生する手段、例えば、複製およびカプシド遺伝子（例えば、AAVのrepおよびcap遺伝子）を用いて安定して形質転換される。AAV8カプシドを有する組換えAAVベクターを生成する方法については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,282,199号の発明を実施するための形態の節IV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、TAQMAN（登録商標）分析によって決定できる。ビリオンは、例えば、CsCl₂沈降によって回収できる。

10

【0171】

in vitroアッセイ、例えば、細胞培養アッセイを使用して、本明細書において記載されるベクターからの導入遺伝子発現を測定できる、したがって、例えば、ベクターの効力を示すことができる。例えば、ヒト胚性網膜細胞に由来する細胞株であるPER.C6（登録商標）細胞株（Lonza）または網膜色素上皮細胞、例えば、網膜色素上皮細胞株hTERT RPE-1（ATCC（登録商標）から入手可能）を使用して、導入遺伝子発現を評価できる。ひとたび発現されると、HuGlyFabVEGFと関連するグリコシル化およびチロシン硫酸化パターンの決定を含む、発現された生成物（すなわち、HuGlyFabVEGF）の特徴を決定できる。グリコシル化パターンおよびそれを決定する方法は、節5.1.1に論じられており、一方でチロシン硫酸化パターンおよびそれを決定する方法は、節5.1.2に論じられている。さらに、細胞によって発現されたHuGlyFabVEGFのグリコシル化／硫酸化に起因する利点を、当技術分野で公知のアッセイ、例えば、節5.1.1および5.1.2に記載される方法を使用して決定できる。

20

【0172】

5.2.11 組成物

本明細書において記載される導入遺伝子をコードするベクターおよび適した担体を含む組成物が記載されている。適した担体（例えば、上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与のための）は、当業者によって容易に選択される。

ある特定の実施形態では、遺伝子療法構築物は、製剤化バッファー中のAAVベクター有効成分の凍結滅菌、単回使用溶液として供給される。特定の実施形態では、網膜下投与に適した医薬組成物は、生理学的に適合する水性バッファー、界面活性剤および任意選択の賦形剤を含む製剤化バッファー中の組換え（例えば、rHuGlyFabVEGF）ベクターの懸濁液を含む。特定の実施形態では、遺伝子療法構築物は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.001% Pluronic F68、pH=7.4中で製剤化される。

30

【0173】

5.3 遺伝子療法

眼疾患、特に、新血管新生の増大によって引き起こされた眼疾患を有するヒト対象への導入遺伝子構築物の治療上有効な量の投与のための方法が記載されている。より詳しくは、特に、上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポ手順による）のための、糖尿病性網膜症（DR）を有する患者への導入遺伝子構築物の治療上有効な量の投与のための方法が記載されている。

40

糖尿病性網膜症を有すると診断された患者への導入遺伝子構築物の治療上有効な量の上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、結膜下および／または網膜内投与（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入または上脈絡膜腔を経る網膜下投与による）のための方法が記載されている。

また、導入遺伝子構築物の治療上有効な量の上脈絡膜、網膜下、強膜近傍、硝子体内、

50

結膜下および／または網膜内のための方法（例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポ一手順による）および網膜色素上皮への導入遺伝子構築物の治療上有効な量の投与の方法も本明細書において提供される。

【0174】

5.3.1 標的患者集団

本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、任意の哺乳動物、例えば、げっ歯類、飼育動物、例えば、イヌもしくはネコまたは霊長類、例えば、非ヒト霊長類であり得る。好ましい実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、眼疾患、特に、新血管新生の増大によって引き起こされた眼疾患を有すると診断された患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、糖尿病性網膜症（DR）を有すると診断された患者へ投与するためである。

10

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、重症糖尿病性網膜症を有すると診断された患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、減弱した糖尿病性網膜症を有すると診断された患者へ投与するためである。

【0175】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、中程度～重症NPDRを有すると診断された患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、重症NPDRを有すると診断された患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、軽度PDRを有すると診断された患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、中程度PDRを有すると診断された患者へ投与するためである。

20

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、ETDRS-DRSSレベルが47、53、61または65である患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、ETDRS-DRSSレベルが、レベル47である患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、ETDRS-DRSSレベルがレベル53である患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、ETDRS-DRSSレベルがレベル61である患者へ投与するためである。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法は、ETDRS-DRSSレベルがレベル65である患者へ投与するためである。

30

【0176】

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、女性である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、男性である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、任意の年齢であり得る。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、18歳以上である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、18～89歳の間である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、1型糖尿病に続発するDRを有する。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、2型糖尿病に続発するDRを有する。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、1型または2型糖尿病に続発するDRを有する18歳以上である。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、1型または2型糖尿病に続発するDRを有する18～89歳の間である。

40

【0177】

特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、妊娠の可能性のない女性である。

50

具体的な実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、有水晶体である。他の具体的な実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、偽水晶体である。

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、ヘモグロビン A1c $\leq 10\%$ （臨床検査評価によって確認される）を有する。

ある特定の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って処置される対象は、 > 69 ETDRS 文字（近似スネレン等価物 $20/40$ 以上）の処置されるべき眼における最高矯正視力（BCVA）を有する。

【0178】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症（DR）を有する対象を処置する方法であって、対象が DR を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

（1）対象の ETDRS-DR 重症度スケール（DRSS）レベルを決定するステップ、および

（2）対象の ETDRS-DRSS がレベル 47、53、61 または 65 である場合に、ヒト対象の眼中の網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

【0179】

一部の実施形態では、方法は、対象から生体サンプルを得ることまたは得られた生体サンプルを有することおよび対象が 10% 以下のヘモグロビン A1c の血清レベルを有することを決定することをさらに含む。

一部の実施形態では、方法は、対象において網膜症の増殖性段階への進行を妨げる。

【0180】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、中程度～重症の非増殖性糖尿病性網膜症（NPDR）を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

（1）対象の ETDRS-DR 重症度スケール（DRSS）レベルを決定するステップ、および

（2）対象の ETDRS-DRSS がレベル 47 である場合に、ヒト対象の眼中の網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、重症 NPDR を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

（1）対象の ETDRS-DR 重症度スケール（DRSS）レベルを決定するステップ、および

（2）対象の ETDRS-DRSS がレベル 53 である場合に、ヒト対象の眼中の網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

【0181】

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、軽度の増殖性糖尿病性網膜症（PDR）を有する少なくとも 1 つの眼を有し、以下のステップ：

（1）対象の ETDRS-DR 重症度スケール（DRSS）レベルを決定するステップ、および

（2）対象の ETDRS-DRSS がレベル 61 である場合に、ヒト対象の眼中の網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子（hVEGF）抗体をコードする発現ベクターを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

ある特定の実施形態では、糖尿病性網膜症を有する対象を処置する方法であって、対象が、中程度のPDRを有する少なくとも1つの眼を有し、以下のステップ：

(1) 対象のETDRS-DR重症度スケール(DRSS)レベルを決定するステップ、および

(2) 対象のETDRS-DRSSがレベル65である場合に、ヒト対象の眼中的網膜下腔または上脈絡膜腔に、抗ヒト血管内皮増殖因子(hVEGF)抗体をコードする発現ベクターを投与するステップ

を含む方法が本明細書において提供される。

【0182】

ETDRS-DR重症度スケール(DRSS)レベルは、標準の4広視野デジタル立体眼底写真または同等のものを使用して決定され、それらはまた、Li et al., 2010, Retina Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51:3184-3192または類似の方法に従って、モノスコピックまたは立体写真によって測定される場合もある。

【0183】

5.3.2 投与量および投与様式

組換えベクターの治療上有効な用量は、 $\geq 0.1 \text{ mL} \sim \leq 0.5 \text{ mL}$ の範囲の容量で、好ましくは、 $0.1 \sim 0.30 \text{ mL}$ ($100 \sim 300 \mu\text{L}$)で、最も好ましくは、 0.25 mL ($250 \mu\text{L}$)の容量で網膜下および／または網膜内に（例えば、経硝子体アプローチ（外科手技）による網膜下注入によって、または上脈絡膜腔を経て）投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、上脈絡膜に（例えば、上脈絡膜注入によって）、 $100 \mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量は、強膜の外表面に、 $500 \mu\text{L}$ 以下の容量で、例えば、 $10 \sim 20 \mu\text{L}$ 、 $20 \sim 50 \mu\text{L}$ 、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ 、 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ 、 $200 \sim 300 \mu\text{L}$ 、 $300 \sim 400 \mu\text{L}$ または $400 \sim 500 \mu\text{L}$ の容量で投与されるべきである。組換えベクターの治療上有効な用量はまた、強膜の外表面に、 $500 \mu\text{L}$ 以下の容量、例えば、 $10 \sim 20 \mu\text{L}$ 、 $20 \sim 50 \mu\text{L}$ 、 $50 \sim 100 \mu\text{L}$ 、 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ 、 $200 \sim 300 \mu\text{L}$ 、 $300 \sim 400 \mu\text{L}$ または $400 \sim 500 \mu\text{L}$ の容量の2回以上の注入で投与される場合もある。2回以上の注入は、同一訪問中に投与されてもよい。

【0184】

ある特定の実施形態では、組換えベクターは、上脈絡膜に（例えば、上脈絡膜注入によって）投与される。特定の実施形態では、上脈絡(suprachoroidal)投与（例えば、上脈絡膜腔への注入）は、上脈絡膜薬物送達デバイスを使用して実施される。上脈絡膜薬物送達デバイスは、眼の上脈絡膜腔への薬物の投与を含む上脈絡膜投与手順において使用されることが多い（例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23、Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; Baldassarre et al., 2017を参照されたい）。本明細書において記載される本発明に従って網膜下腔中に発現ベクターを蓄積するために使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達デバイス（例えば、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23を参照されたい）およびMedOne上脈絡膜カテーテルが挙げられる。

【0185】

特定の実施形態では、上脈絡膜薬物送達デバイスは、1ミリメートルの30ゲージニードルを備えたシリンジである（図5を参照されたい）。このデバイスを使用する注入の際、ニードルが強膜の基部に貫通し、薬物を含有する流体が上脈絡膜腔に入り、上脈絡膜腔の拡大につながる。結果として、注入の際に触覚的および視覚的フィードバックがある。注入後、流体は後側に流れ、脈絡膜および網膜において優位に吸収される。これは、すべての網膜細胞層および脈絡膜細胞からの導入遺伝子タンパク質の生成をもたらす。この種のデバイスおよび手順を使用することで、合併症のリスクの低い迅速で、容易なオフィス

10

20

30

40

50

内手順が可能となる。上脈絡膜腔中に100 μ lの最大容量を注入できる。

【0186】

ある特定の実施形態では、組換えベクターは、網膜下薬物送達デバイスの使用によって上脈絡膜腔を経て網膜下に投与される。ある特定の実施形態では、網膜下薬物送達デバイスは、外科手技の際に周囲の上脈絡膜腔を通して眼の裏側へと挿入し、トンネルを形成して網膜下腔へ薬物を送達するカテーテルである（図6を参照されたい）。この手順によって、硝子体が無傷のままであることが可能となり、したがって、合併症のリスクがより少なくなり（遺伝子療法の退出ならびに網膜剥離および黄斑円孔などの合併症の少ないリスク）、硝子体切除術を用いない場合、結果として生じるブレイブがより拡散性に広がる可能性があり、網膜の表面積のより多くがより少ない容量で形質導入されることが可能となる。この手順後に誘導される白内障のリスクは最小化され、これはより若い患者にとって望ましいものである。さらに、この手順は、中心窩下にブレイブを標準的な経硝子体アプローチよりもより安全に送達でき、これは、形質導入の標的細胞が黄斑にある、中心視野に影響を及ぼす遺伝性網膜疾患を有する患者にとって望ましいものである。この手順はまた、他の送達経路（例えば、上脈絡膜および硝子体内）に影響を及ぼし得る全身循環中に存在するAAVに対する中和抗体（Nab）を有する患者にとっても都合がよい。さらに、この方法は、標準的な経硝子体アプローチよりも網膜切開術部位からの退出が少ないブレイブを作出すると示した。このような目的のために、元々Janssen Pharmaceuticals, Inc.によって、現在はOrbit Biomedical Inc.によって製造される網膜下薬物送達デバイス（例えば、Subretinal Delivery of Cells via the Suprachoroidal Space: Janssen Trial. In: Schwartz et al. (eds) Cellular Therapies for Retinal Disease, Springer, Cham、国際特許出願公開番号WO2016/040635を参照されたい）を使用できる。

【0187】

ある特定の実施形態では、組換えベクターは、強膜の外表面に（例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニユーレを含む強膜近傍薬物送達デバイスの使用によって）投与される。特定の実施形態では、強膜の外表面への投与は、後強膜近傍デポ手順を使用して実施され、これは、先端が鈍い湾曲したカニユーレに薬物を引き込み、眼球を穿刺することなく強膜の外表面と直接接触して送達することを含む。特に、裸の強膜へ小さな切開を作出した後、カニユーレの先端を挿入する（図7Aを参照されたい）。カニユーレシャフトの曲がった部分を挿入し、カニユーレの先端を強膜表面に直接並置して維持する（図7B～7Dを参照されたい）。カニユーレを完全に挿入した後（図7D）、カニユーレシャフトの上部および側部に沿って滅菌綿棒で穏やかな圧力を維持しながら薬物をゆっくりと注入する。この送達方法によって、眼球内感染および網膜剥離、治療薬を目に直接的に注入することと一般に関連する副作用のリスクが避けられる。

【0188】

硝子体液において少なくとも0.330 μ g/mLの、または眼房水（眼の前房）において0.110 μ g/mLのCminの導入遺伝子産物の濃度を3ヶ月間維持する用量が望まれ、その後、1.70～6.60 μ g/mLの範囲の導入遺伝子産物の硝子体のCmin濃度および／または0.567～2.20 μ g/mLの範囲の眼房Cmin濃度が維持されるべきである。しかし、導入遺伝子産物は、持続的に産生される（構成的プロモーターの制御下で、または低酸素誘導性プロモーターを使用する場合には低酸素条件によって誘導されて）ので、低濃度の維持が有効であり得る。硝子体液濃度は、硝子体液または前房から収集された流体の患者サンプルにおいて直接測定でき、または導入遺伝子産物の患者の血清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できる。導入遺伝子産物に対する全身対硝子体曝露の比は、約1:90,000である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Xu L, et al., 2013, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 1616-1624において1621頁および1623頁の表5で報告されたラニビズマブの硝子体液および血清濃度を参照されたい）。

【0189】

ある特定の実施形態では、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムが、本明細書において記載される（図7Aおよび7Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。ある特定の実施形態では、微小容量注入器のために使用できる微小容量注入送達システムは、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、上脈絡膜ニードル（例えば、Clearside（登録商標）ニードル）、網膜下ニードル、硝子体内ニードル、強膜近傍ニードル、結膜下ニードルおよび／または網膜内ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c）10 μ Lの増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること、（e）400 μ Lのシリンジ用量、（f）デジタル誘導された送達、（g）デジタル記録された送達、および（h）アグノスティックな先端（例えば、網膜下送達のためにMedOne 38gニードルおよびDorc 41gニードルを使用でき、一方で、網膜下送達のために、Clearside（登録商標）ニードルおよびVisionist IOYアダプターを使用できる）が挙げられる。

10

20

【0190】

本明細書において記載される方法のある特定の実施形態では、組換えベクターは、上脈絡膜に投与される（例えば、上脈絡膜注入によって）。特定の実施形態では、上脈絡膜投与（例えば、上脈絡膜腔への注入）は、上脈絡膜薬物送達デバイスを使用して実施される。上脈絡膜薬物送達デバイスは、眼の上脈絡膜腔への薬物の投与を含む上脈絡膜投与手順において使用されることが多い（例えば、各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23, Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87; Baldassarre et al., 2017を参照されたい）。本明細書において記載される本発明に従って上脈絡膜腔中に組換えベクターを蓄積するために使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスとして、それだけには限らないが、Clearside（登録商標）Biomedical, Inc.によって製造された上脈絡膜薬物送達デバイス（例えば、Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23を参照されたい）およびMedOne上脈絡膜カテーテルが挙げられる。別の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用できる上脈絡膜薬物送達デバイスは、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される（図7Aおよび7Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）微小容量注入送達システムを含む。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、上脈絡膜ニードル（例えば、Clearside（登録商標）ニードル）または網膜下ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c）10 μ Lの増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること

30

40

50

、（e）400 μ Lのシリンジ用量、（f）デジタル誘導された送達、（g）デジタル記録された送達、および（h）アグノスティックな先端（例えば、網膜下送達のためにMedOne 38gニードルおよびDorc 41gニードルを使用でき、一方で、上脈絡膜送達のためにClearside（登録商標）ニードルおよびVisionist IOYアダプターを使用できる）。別の実施形態では、本明細書において記載される方法に従って使用される上脈絡膜薬物送達デバイスは、Visionist IOYによって製造されるアダプター（好ましくは、ニードルガイドも）有する通常の長さの皮下ニードルを含むツールであり、アダプターは、通常の長さの皮下ニードルを、アダプターから露出するニードルの先端の長さを制御することによって上脈絡膜ニードルにする（図8を参照されたい）（例えば、米国意匠特許番号D878,575および国際特許出願公開番号WO/2016/083669を参照されたい）。特定の実施形態では、上脈絡膜薬物送達デバイスは、1ミリメートルの30ゲージニードルを備えたシリンジである（図1を参照されたい）。このデバイスを使用する注入の際、ニードルが強膜の基部に貫通し、薬物を含有する流体が上脈絡膜腔に入り、上脈絡膜腔の拡大につながる。結果として、注入の際に触覚的および視覚的フィードバックがある。注入後、流体は後側に流れ、脈絡膜および網膜において優位に吸収される。これは、すべての網膜細胞層および脈絡膜細胞からの治療生成物の生成をもたらす。この種のデバイスおよび手順を使用することで、合併症のリスクの低い迅速で、容易なオフィス内手順が可能となる。上脈絡膜腔中に100 μ Lの最大容量を注入できる。

10

20

30

40

50

【0191】

特定の実施形態では、硝子体内投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムを含む硝子体内薬物送達デバイスを用いて実施される（図7Aおよび7Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215）、米国特許出願公開第2019/0175825および同2019/0167906を参照されたい）。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、硝子体内ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c）10 μ Lの増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること、（e）400 μ Lのシリンジ用量、（f）デジタル誘導された送達、（g）デジタル記録された送達、および（h）アグノスティックな先端が挙げられる。特定の実施形態では、網膜下投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムを含む網膜下薬物送達デバイスを用いて実施される（図7Aおよび7Bを参照されたい）（例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい）。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、網膜下ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、（a）より制御された送達（例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために）、（b）1人の外科医、片手、1本の指での操作、（c）10 μ Lの増分投与量の空圧駆動、（d）硝子体切除術機器から切り離されること、（

e) 400 μ L のシリンジ用量、(f) デジタル誘導された送達、(g) デジタル記録された送達、および(h) アグノスティックな先端(例えば、網膜下送達のために MedOne 38 g ニードルおよび Dorc 41 g ニードルを使用でき、一方で、上脈絡膜送達のために、Clearside (登録商標) ニードルおよび Visionist IO アダプターを使用できる)。

【0192】

ある特定の実施形態では、組換えベクターは、強膜の外表面に(例えば、その先端を挿入し、強膜表面に直接並置して維持することができるカニユーレを含む強膜近傍薬物送達デバイスの使用によって)投与される。特定の実施形態では、強膜の外表面への投与は、後強膜近傍デポー手順を使用して実施され、これは、先端が鈍い湾曲したカニユーレに薬物を引き込み、眼球を穿刺することなく強膜の外表面と直接接触して送達することを含む。特に、裸の強膜へ小さな切開を作出した後、カニユーレの先端を挿入する(図7Aを参照されたい)。カニユーレシャフトの曲がった部分を挿入し、カニユーレの先端を強膜表面に直接並置して維持する(図7B~7Dを参照されたい)。カニユーレを完全に挿入した後(図7D)、カニユーレシャフトの上部および側部に沿って滅菌綿棒で穏やかな圧力を維持しながら薬物をゆっくりと注入する。この送達方法によって、眼球内感染および網膜剥離、治療薬を目に直接的に注入することと一般に関連する副作用のリスクが避けられる。特定の実施形態では、強膜近傍投与は、眼への投与のために本明細書において記載される任意の投与経路のために使用できる、Altavizによって製造される微小容量注入送達システムを含む強膜近傍薬物送達デバイスを用いて実施される(図7Aおよび7Bを参照されたい)(例えば、国際特許出願公開番号WO2013/177215、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号を参照されたい)。微小容量注入送達システムは、米国特許出願公開第2019/0175825号および米国特許出願公開第2019/0167906号に記載されるような高力送達および改善された精度を提供するガス動力モジュールを含み得る。さらに、微小容量注入送達システムは、一定用量速度を提供する油圧式駆動と、ガス動力モジュール、次いで、流体送達を制御するための低力起動レバーとを含み得る。微小容量注入器は、用量ガイダンスを備えた微小容量注入器であり、例えば、強膜近傍ニードルとともに使用できる。微小容量注入器を使用する利点として、(a) より制御された送達(例えば、正確な注入流速制御および用量ガイダンスを有するために)、(b) 1人の外科医、片手、1本の指での操作、(c) 10 μ L の増分投与量の空圧駆動、(d) 硝子体切除術機器から切り離されること、(e) 400 μ L のシリンジ用量、(f) デジタル誘導された送達、(g) デジタル記録された送達、および(h) アグノスティックな先端が挙げられる。

【0193】

ある特定の実施形態では、投与量は、患者の眼に投与される(例えば、上脈絡膜に、網膜下に、硝子体内に、強膜近傍に、結膜下におよび/または網膜内に投与される(例えば、上脈絡膜注入、経硝子体アプローチ(外科手技)による網膜下注入、上脈絡膜腔を経る網膜下投与または後強膜近傍デポー手順によって)1mlあたりのゲノムコピーまたはゲノムコピー数によって測定される。ある特定の実施形態では、1mlあたり2.4 $\times 10^{11}$ のゲノムコピー~1mlあたり1 $\times 10^{13}$ のゲノムコピーが投与される。特定の実施形態では、1mlあたり2.4 $\times 10^{11}$ のゲノムコピー~1mlあたり5 $\times 10^{11}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり5 $\times 10^{11}$ のゲノムコピー~1mlあたり1 $\times 10^{12}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり1 $\times 10^{12}$ のゲノムコピー~1mlあたり5 $\times 10^{12}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり5 $\times 10^{12}$ のゲノムコピー~1mlあたり1 $\times 10^{13}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約2.4 $\times 10^{11}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約5 $\times 10^{11}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあたり約1 $\times 10^{12}$ のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1mlあ

たり約 5×10^{12} のゲノムコピーが投与される。別の特定の実施形態では、1 ml あたり約 1×10^{13} のゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $3 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $6 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $4 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ ゲノムコピーが投与される。具体的な実施形態では、 $2 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ ゲノムコピーが投与される。特定の実施形態では、約 3×10^9 ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 1.2×10^{10} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 1×10^{10} ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 4×10^{10} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 6×10^{10} ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 2.4×10^{11} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 6.2×10^{11} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 1.55×10^{11} ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 6.2×10^{11} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される（これは、250 μ l の容量で 1 ml あたり約 6.4×10^{11} ゲノムコピーに相当する）。別の特定の実施形態では、約 2.5×10^{11} ゲノムコピー（250 μ l の容量で 1 ml あたり約 1.0×10^{12} に相当する）が投与される。

10

20

30

40

50

【0194】

ある特定の実施形態では、眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり最大 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。

ある特定の実施形態では、眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり約 3×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり 1 ml あたり約 1.0×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、眼あたり 1 ml あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。

ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 6.0×10^{10} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 1.6×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、網膜下注入によって眼あたり最大 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。

【0195】

ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 3×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、単回上脈絡膜注入によって眼あたり約 2.5×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、二重上脈絡膜注入によって眼あたり約 5.0×10^{11} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、上脈絡膜注入によって眼あたり最大約 3.0×10^{13} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、100 μ l の容量の単回上脈絡膜注入によって眼あたり 1 ml あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。ある特定の実施形態では、各注入が 100 μ l の容量である二重上脈絡膜注

入によって、眼あたり 1 m l あたり約 2.5×10^{12} ゲノムコピーが投与される。

【0196】

本明細書で使用される場合、特に断りのない限り、用語「約」とは、所与の値または範囲のプラスまたはマイナス 10 % 以内を意味する。

ある特定の実施形態では、用語「約」は、列挙された正確な数字を包含する。

ある特定の実施形態では、例えば、SCS 内の溶液の広がり of の可視化を可能にし、投与が成功裏に完了されたか否かを決定できる可能性がある眼表面の熱プロファイルの変化を検出するために、赤外線サーマルカメラを使用して、体温よりも冷たい溶液を投与した後の眼表面の熱プロファイルの変化を検出できる。これは、ある特定の実施形態では、投与されるべき組換えベクターを含有する製剤が最初に凍結され、室温（68～72 ° F）にされ、投与の前に短時間解凍され（例えば、少なくとも 30 分間）、したがって、製剤が、注入時にヒトの眼（約 92 ° F）よりも冷たい（時には、室温よりも冷たい）ためである。薬物製品は、通常、解凍の 4 時間以内に使用され、溶液がとる最も温かいものは室温である。好ましい実施形態では、手順は、赤外線ビデオでビデオ化される。

10

【0197】

赤外線サーマルカメラは、温度の小さい変化を検出できる。それらはレンズを通して赤外線エネルギーをとらえ、エネルギーを電子信号に変換する。赤外線は、エネルギーを熱画像に変換する赤外線センサーアレイに焦点を合わせる。赤外線サーマルカメラを、本明細書において記載される任意の投与経路、例えば、上脈絡膜投与、網膜下投与、結膜下投与、硝子体内投与または上脈絡膜腔中への低速注入カテーテルの使用を用いる投与を含む眼への投与の任意の方法のために使用できる。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、FLIR T530 赤外線サーマルカメラである。FLIR T530 赤外線サーマルカメラは、 ± 3.6 ° F の精度でわずかな温度の相違をとらえることができる。カメラは、76,800 ピクセルの赤外線解像度を有する。カメラはまた、より小さい視野をとらえる 24 ° のレンズを利用する。高い赤外線解像度と組み合わせたより小さい視野は、オペレーターがイメージしているもののより詳細な熱プロファイルに貢献する。しかし、異なる赤外線解像度を有する、および／または異なるレンズの度を有する、わずかな温度変化をとらえるための異なる能力および精度を有する他の赤外線カメラを使用できる。

20

【0198】

特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、FLIR T420 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、FLIR T440 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、Fluke Ti400 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラは、FLIRE60 赤外線サーマルカメラである。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの赤外線解像度は、75,000 ピクセル以上である。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの熱感受性は、30 ° C で 0.05 ° C 以下である。特定の実施形態では、赤外線サーマルカメラの視野（FOV）は、25 ° × 25 ° 以下である。

30

ある特定の実施形態では、鉄フィルターを赤外線サーマルカメラとともに使用して、眼表面の熱プロファイルの変化を検出する。好ましい実施形態では、鉄フィルターの使用によって、疑似カラー画像を生成でき、ここで、最も温かいまたは高い温度の部分は白色であり、中間温度は、赤色および黄色であり、最も冷たいまたは低い温度の部分は黒色である。ある特定の実施形態では、熱プロファイルの疑似カラー画像を生成するために他の種類のフィルターも使用できる。

40

【0199】

各投与方法の熱プロファイルは異なる場合がある。例えば、一実施形態では、上脈絡膜注入の成功は、（a）暗い色のゆっくりとした広い放射状の広がり、（b）始まりでの非常に暗い色、および（c）明るい色への注入物の段階的な変化、すなわち、より明るい色によって示される温度の勾配によって特徴付けることができる。一実施形態では、上脈絡膜注入の不成功は、（a）暗い色の広がりがないこと、および（b）分布を全く伴わない注入部位に局在する色のわずかな変化によって特徴付けることができる。ある特定の実施形

50

態では、小さい局在した温度の低下は、眼組織（高温）に接触しているカニューレ（低温）に起因する。一実施形態では、硝子体内注入の成功は、（a）暗い色の広がりがないこと、（b）注入部位に局在する極めて暗い色への最初の変化および（c）より暗い色への眼全体の段階的な均一の変化によって特徴付けることができる。一実施形態では、眼外流出は、（a）眼の外側外表面での迅速に流れる流れ、（b）始まりでの非常に暗い色および（c）より明るい色への迅速な変化によって特徴付けることができる。

【0200】

5.3.3 サンプル採取および有効性のモニタリング

視覚障害に対する本明細書において提供される処置の方法の効果は、BCVA（最高矯正視力）、眼球内圧、スリットランプ検査および／または間接眼底検査によって測定できる。眼球外の動きも評価できる。眼球内圧測定は、TonopenまたはGoldmann圧平眼圧測定を使用して実施できる。スリットランプ検査は、眼瞼／まつ毛、結膜／強膜、角膜、前房、虹彩、レンズ、および／または硝子体の評価を含み得る。

【0201】

具体的な実施形態では、視覚障害に対する本明細書において提供される方法の効果は、本明細書において記載される方法によって処置されるヒト患者の眼が、処置後（例えば、処置後46～50週または98～102週）に43文字超のBCVAに達するか否かによって測定できる。43文字のBCVAは、20／160近似スネレン等価物に相当する。特定の実施形態では、本明細書において記載される方法によって処置されるヒト患者の眼が、処置後（例えば、処置後46～50週または98～102週）に43文字超のBCVAに達する。

具体的な実施形態では、視覚障害に対する本明細書において提供される方法の効果は、本明細書において記載される方法によって処置されるヒト患者の眼が、処置後（例えば、処置後46～50週または98～102週）に84文字超のBCVAに達するか否かによって測定できる。84文字のBCVAは、20／20近似スネレン等価物に相当する。特定の実施形態では、本明細書において記載される方法によって処置されるヒト患者の眼が、処置後（例えば、処置後46～50週または98～102週）に84文字超のBCVAに達する。BCVA試験は、ETDRSチャートを使用して4メートルの距離で実施できる。視力が低減した（4メートルで ≥ 20 文字を正しく読むことができない）参加者については、1メートルの距離でBCVA試験を実施してもよい。

眼／網膜の物理的变化に対する本明細書において提供される処置の方法の効果は、SD-OCT（SD-光干渉断層撮影）によって測定できる。

有効性は、網膜電図検査（ERG）によって測定されるようにモニタリングできる。

本明細書において提供される処置の方法の効果は、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できる。

【0202】

網膜肥厚をモニタリングして、本明細書において提供される処置の有効性を決定できる。いずれか特定の理論に捉われようとは思わないが、網膜の厚みを臨床読み取り値として使用でき、網膜の厚さの低減が大きいほどまたは網膜の肥厚の前の期間が長いほど、処置はより有効である。網膜機能は、例えば、ERGによって決定できる。ERGは、ヒトにおける使用のためにFDAによって承認された、網膜機能の非侵襲的電気生理学的検査であり、眼の光感受性細胞（桿体および錐体）およびその接続する神経節細胞、特に、フラッシュ刺激に対するその応答を調べる。網膜の厚さは、例えば、SD-OCTによって決定できる。SD-OCTは、低コヒーレンス干渉法を使用して、目的の物体から反射された後方散乱光のエコー時間遅延と大きさを決定する3次元イメージング技術である。OCTを使用して、3～15 μm の軸分解能で組織サンプルの層（例えば、網膜）をスキャンでき、SD-OCTは、軸分解能およびスキャン速度をこれまでの技術の形式を上回って改善する（Schuman, 2008, Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 106:426-458）。

【0203】

本明細書において提供される方法の効果はまた、国立眼病研究所の視覚機能質問票、ラ

ッシュスコアバージョン（NEI-VFQ-28-R）におけるベースラインからの変化（複合スコア、活動制限ドメインスコア、および社会的感情機能ドメインスコア）によっても測定できる。本明細書において提供される方法の効果はまた、国立眼病研究所の視覚機能質問票25項目バージョン（NEI-VFQ-25）におけるベースラインからの変化（複合スコアおよびメンタルヘルスサブスケールスコア）によって測定できる。本明細書において提供される方法の効果はまた、黄斑疾患処置満足度質問票（MacTSQ）におけるベースラインからの変化（複合スコア、安全性、有効性、および不快感ドメインスコア、ならびに情報提供および利便性ドメインスコア）によって測定できる。

【0204】

具体的な実施形態では、本明細書において記載される方法の有効性は、約4週間、12週間、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月での、または他の望ましい時点での視覚の改善によって反映される。特定の実施形態では、視覚の改善は、BCVAの増大、例えば、1文字、2文字、3文字、4文字、5文字、6文字、7文字、8文字、9文字、10文字、11文字または12文字またはそれより多くの増大を特徴とする。特定の実施形態では、視覚の改善は、ベースラインからの視力の5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%またはそれより多くの増大を特徴とする。

10

【0205】

具体的な実施形態では、本明細書において記載される方法の有効性は、約4週間、12週間、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月での、または他の望ましい時点での中心網膜厚（CRT）の低減、例えば、ベースラインからの中心網膜厚の5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%またはそれより多くの減少によって反映される。

20

具体的な実施形態では、処置後に眼に炎症はない、または処置後に眼に炎症はほとんどない（例えば、ベースラインから10%、5%、2%、1%またはそれより少ない炎症のレベルの増大）。視覚障害に対する本明細書において提供される方法の効果は、視覚運動性眼振（OKN）によって測定できる。

【0206】

理論に捉われるものではないが、この視力スクリーニングでは、OKNの不随意反射の原理を使用して、患者の眼が動く標的を追跡できるかどうかを客観的に評価する。OKNを使用することによって、試験者と患者の間に言語コミュニケーションは必要とされない。したがって、OKNを使用して、言語前および／または非言語患者の視力を測定できる。ある特定の実施形態では、1ヶ月齢、2ヶ月齢、3ヶ月齢、4ヶ月齢、5ヶ月齢、6ヶ月齢、7ヶ月齢、8ヶ月齢、9ヶ月齢、10ヶ月齢、11ヶ月齢、1歳、1.5歳、2歳、2.5歳、3歳、3.5歳、4歳、4.5歳または5歳である患者において視力を測定するためにOKNが使用される。ある特定の実施形態では、患者がiPadで動きを見ている場合、OKN反射の検出によって視力を測定するためにiPadが使用される。

30

【0207】

理論に捉われるものではないが、この視力スクリーニングは、OKNの不随意反射の原理を使用して、患者の眼が動く標的を追跡できるかどうかを客観的に評価する。OKNを使用することによって、試験者と患者の間に言語コミュニケーションは必要とされない。したがって、OKNを使用して、言語前および／または非言語患者の視力を測定できる。ある特定の実施形態では、1.5ヶ月齢、2ヶ月齢、3ヶ月齢、4ヶ月齢、5ヶ月齢、6ヶ月齢、7ヶ月齢、8ヶ月齢、9ヶ月齢、10ヶ月齢、11ヶ月齢、1歳、1.5歳、2歳、2.5歳、3歳、3.5歳、4歳、4.5歳または5歳未満である患者において視力を測定するためにOKNが使用される。別の特定の実施形態では、1～2ヶ月齢、2～3ヶ月齢、3～4ヶ月齢、4～5ヶ月齢、5～6ヶ月齢、6～7ヶ月齢、7～8ヶ月齢、8～9ヶ月齢、9～10ヶ月齢、10～11ヶ月齢、11ヶ月～1歳、1～1.5歳、1.5～2歳、2～2.5歳、2.5～3歳、3～3.5歳、3.5～4歳、4～4.5歳または4.5～5歳である患者において視力を測定するためにOKNが使用される。別の特定の実施形態では、6ヶ月～5歳である患者において視力を測定するためにOKNが使用される。ある特定の実施形態では、患者がiPadで動きを見ている場合、OKN反射の

40

50

検出によって視力を測定するために iPad が使用される。

ヒト患者が小児である場合には、視覚的機能を視覚運動性眼振（OKN）ベースアプローチまたは改変 OKN ベースアプローチを使用して評価できる。

【0208】

ベクター脱落は、例えば、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を使用して生物学的流体、例えば、涙、血清または尿中のベクター DNA を測定することによって決定できる。一部の実施形態では、ベクター遺伝子コピーは、ベクターの投与後いずれの時点でも尿において検出可能ではない。一部の実施形態では、1000 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、500 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、100 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、50 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満または 10 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満が、投与後任意の時点で生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である。具体的な実施形態では、210 ベクター遺伝子コピー／5 μl 以下が、血清において検出可能である。一部の実施形態では、1000 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、500 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、100 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満、50 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満または 10 ベクター遺伝子コピー／5 μl 未満が、投与後 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 週まで生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって検出可能である。具体的な実施形態では、ベクター遺伝子コピーは、ベクターの投与後 14 週まで生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において検出可能ではない。一部の実施形態では、ベクター遺伝子コピーは、ベクターの投与後任意の時点で生物学的流体（例えば、涙、血清または尿）において検出可能ではない。

10

20

【0209】

一部の実施形態では、本明細書において提供される方法に従って処置された患者は、中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫（CIEDME）、白内障、新血管新生、網膜剥離、糖尿病性合併症、血管退縮、漏出の面積および／または網膜非灌流の面積の発生についてモニタリングされる。CIEDME、白内障、新血管新生、網膜剥離、糖尿病性合併症、血管退縮、漏出の面積および網膜非灌流の面積の発生は、当技術分野で公知の、または本明細書において提供される任意の方法によって評価できる。対象において発生した糖尿病性合併症は、汎網膜光凝固（PRP）、抗 VEGF 療法および／または外科的介入を必要とする場合がある。糖尿病性合併症は、視力を脅かすものであり得る。対象において発生した白内障は、手術を必要とする場合がある。一部の実施形態では、本明細書において提供される方法に従って処置された患者のバイタルサイン（例えば、心拍数、血圧）をモニタリングできる。

30

【0210】

本明細書において記載される処置の方法の安全性は、当技術分野で公知のアッセイによって評価され得る。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される処置の方法の安全性は、例えば、グルコース、血中尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、塩化物、二酸化炭素、カルシウム、総タンパク質アルブミン総ビリルビン、直接ビリルビン、アルカリホスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、および／またはクレアチンキナーゼのレベルの血清化学測定によって評価される。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される処置の方法の安全性は、例えば、血小板、ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球、白血球、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、平均赤血球容量、平均赤血球ヘモグロビンおよび／または平均赤血球ヘモグロビン濃度の血液学的測定によって評価される。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される処置の方法の安全性は、尿検査、例えば、グルコース、ケトン、タンパク質および／または血液のレベルのディップスティック検査（必要な場合には、顕微鏡評価を完了できる）によって評価される。ある特定の実施形態では、本明細書において記載される処置の方法の安全性は、血液凝固（例えば、プロトロンビン時間および／または部分トロンボプラスチン時間）の測定によって、またはヘモグロビン A

40

50

1 c の測定によって評価される。

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される方法の効果は、統計分析によって決定される。統計的推測は、両側 $\alpha = 0.02$ の有意レベルで行うことができる。統計的エンドポイントは、対応する 80% 信頼区間を用いてまとめることができる。

本明細書において提供される方法の効果は、フィッシャーの正確確率検定によって決定でき、処置される集団は、未処置集団における過去の応答率（例えば、5%）に対して試験される。

【0211】

5.4 併用療法

本明細書において提供される処置の方法を、1つまたは複数の追加の療法と組み合わせることができる。一態様では、本明細書において提供される処置の方法は、レーザー凝固とともに投与される。一態様では、本明細書において提供される処置の方法は、ベルテポルフィンを用いる光線力学的療法とともに投与される。

【0212】

一態様では、本明細書において提供される処置の方法は、それだけには限らないが、ヒト細胞株において産生される HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_i を含む抗VEGF剤（Dumont et al., 2015、前掲）、または他の抗VEGF剤、例えば、ペガブタニブ、ラニビズマブ、アフリベルセプトもしくはベバシズマブを用いる硝子体内（IVT）注入とともに投与される。

追加の療法は、遺伝子療法処置の前、それと同時に、またはその後に投与されてもよい。

【0213】

遺伝子療法処置の有効性は、標準処置、例えば、それだけには限らないが、ヒト細胞株において産生される HuPTMFabVEGF_i、例えば、HuGlyFabVEGF_i を含む抗VEGF剤または他の抗VEGF剤、例えば、ペガブタニブ、ラニビズマブ、アフリベルセプトもしくはベバシズマブを用いる硝子体内注入を使用するレスキュー処置の排除またはその数の低減によって示すことができる。

【0214】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. 配列の表

配列番号	説明	配列
1	ラニビズマブ Fab アミノ酸配列 (軽鎖)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPG KAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
2	ラニビズマブ Fab アミノ酸配列 (重鎖)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AKYPYYGTSHWYF DVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
3	ベバシズマブ Fab アミノ酸配列 (軽鎖)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPG KAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPW TFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
4	ベバシズマブ Fab アミノ酸配列 (重鎖)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYC AKYPHYGGSSHWYF DVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
5	VEGF-A シグナルペプチド	MNFLLSWVHW SLALLLLYLHH AKWSQA
6	フィブリリン-1 シグナルペプチド	MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA
7	ビトロネクチンシグナルペプチド	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
8	補体 H 因子シグナルペプチド	MRLLAKEIICMLWAICVA
9	オプチシンシグナルペプチド	MRLLAFLSLL ALVLQETGT

10

20

30

40

50

10	ペバシズマブ cDNA (軽鎖)	gctagcgcca ccattgggctg gtccctgcata atccctgttcc tgggtggccac cgccaccggc gtgcactccg acatccagat gaccacagtc ccctccctccc tgtccgcctc cgtgggcgac cgggtgaoca tcacctgtc cgcctcccag gacatctcca actacctgaa ctggtaccag cagaagcccg gcaaggcccc caagggtgctg atctacttca cctcctccct gcactccggc gtgccctccc ggttctccgg ctccggctcc ggcaccgact tcacctgac catctccctc ctgcagcccg aggacttcgc caccactactac tgccagcagt actccaccgt gccctggacc ttcggccagg gcaccaagggt ggagatcaag cggaccgtgg ccgccccctc cgtgttcata ttccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgact ccgtgggtgt cctgctgaac aactttctacc cccgggaggc caagggtgcag tggaaggtgg acaacgcctt gcaagtccggc aactccagg agtccgtgac cgagcaggac tccaaggact ccacctactc cctgtcctcc accctgaccc tgtccaaggc cgaactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgagggtgacc caccaggggc tgtccctccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg ctgagcggcc gcctcgag
11	ペバシズマブ cDNA (重鎖)	gctagcgcca ccattgggctg gtccctgcata atccctgttcc tgggtggccac cgccaccggc gtgcactccg aggtgcagct ggtggagtc ggcggcgggc tgggtgcagcc cggcggtcc ctgcggctgt cctgcgcgc ctcggctac accttcaoca actacggcat gaactgggtg cggcaggccc ccggcaaggg cctggagtg gtgggctgga tcaacaccta caccggcgag cccacctacg ccgccgactt caagcggcgg ttcaccttct ccctggacac ctccaagtcc accgcctacc tgcagatgaa ctccctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc aagtaccccc actactacgg ctccctccac tggtacttcg acgtgtgggg ccaggggcac ctggtgaccg tgtccctccg ctccaccaag ggccccctcc tgttccccct ggccccctcc tccaagtcca cctccggcgg caccgcgcgc ctgggctgcc tgggtgaagg ctacttcccc gagcccggtg ccgtgtcttg gaactccggc gocctgaact ccggcgtgca caacttcccc gocgtgctgc agtccctccg cctgtactcc ctgtccctcc tgggtgacct gccctccctc tccttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agccctccaa caccaagggtg gacaagaagg tggagcccaa gtccctgcgac aagaccaca cctgcccccc ctgccccgcc ccgagctgc tgggcgggcc ctccgtgttc ctgttccccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatctccc ggacccccga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggagggtg acaacgcccc gaccaaggcc cgggagggag agtacaactc cactaccgg gtggtgtccg tgcagacct gctgcaccag gactggctga accgcaaggg gtacaagtgc aagggtgtca acaaggccct gcccgcccc atcgagaaga ccacttccaa ggccaagggg cagccccggg agccccagggt gtacaacctg ccccctccc gggaggagat gaccaagaac caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggg ttctacccct ccgacatcgc cgtggagtg gagtcacaac gccagccoga gaaccaactac

10

20

30

40

50

		aagaccaccc ccccggtgct ggactccgac ggctccttct tctgtactc caagctgacc gtggacaagt cccggtggca gcagggcaac gtgttctcct gctccgtgat gcacgagggc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg tccctgtccc cccgcaagtg agcggccgcc
12	ラニビズマブ cDNA (シグナ ル配列を含む 軽鎖)	gagctccatg gagtttttca aaaagacggc acttgccgca ctggttatgg gtttttagtg tgcagcattg gccgatatcc agctgaccca gagcccgagc agcctgagcg caagcgttgg tgatcgtgtt accattacct gtagcgcaag ccaggatatt agcaattatc tgaattggta tcagcagaaa cccgggtaaag caccgaaagt tctgatttat ttaccagca gcctgcatag cgggtgttccg agcgttttta gcggtagcgg tagtggcacc gatttttacc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatt ttgcaacct ttattgtcag cagtatagca ccgttccgtg gacctttggt cagggcacca aagttgaaat taaacgtacc gttgcagcac cgagcgtttt tatttttccg cctagtgatg aacagctgaa aagcggcacc gcaagcgttg tttgtctgct gaataatttt tatccgcgtg aagcaaaagt gcagtggaaa gttgataatg cactgcagag cggtaatagc caagaaagcg ttaccgaaca ggatagcaaa gatagcacct atagcctgag cagcaccctg accctgagca aagcagatta tgaaaaacac aaagtgtatg cctgcgaagt taccatcag ggtctgagca gtccggttac caaaagtttt aatcgtggcg aatgctaata gaagcttgggt acc
13	ラニビズマブ cDNA (シグナ ル配列を含む 重鎖)	gagctcatat gaaatacctg ctgccgaccg ctgctgctgg tctgctgctc ctgctgccc agccggcgat ggccgaagtt cagctggttg aaagcgggtg tggctctggt cagcctggtg gtagcctgcg tctgagctgt gcagcaagcg gttatgattt taccattat ggtatgaatt gggttcgtca ggcaccgggt aaaggctctg aatgggttgg ttggattaat acctataccg gtgaaccgac ctatgcagca gattttaaac gtcgtttttac ctttagcctg gataccagca aaagcaccgc atatctgcag atgaatagcc tgctgcaga agataccgca gtttattatt gtgccaataa tccgtattac tatggcacca gccactggta ttctgatgtt tggggtcagg gcaccctggt taccgttagc agcgcaagca ccaaagggtc gagcgttttt ccgctggcac cgagcagcaa aagtaccagc ggtggcacag cagcactggg ttgtctggtt aaagattatt ttccggaacc ggttaccgtg agctggaata gcggtgcact gaccagcggg gttcatacct ttccggcagt tctgcagagc agcggctctg atagcctgag cagcgttgtt accgttccga gcagcagcct gggcaccag acctatatatt gtaatgttaa tcataaacg agcaatacca aagtggataa aaaagttagc ccgaaaagct gcgataaaac ccatctgtaa tagggtagc

10

20

30

40

50

14	ベバシズマブ およびラニビ ズマブ軽鎖 CDR1	SASQDISNYLN
15	ベバシズマブ およびラニビ ズマブ軽鎖 CDR2	FTSSLHS
16	ベバシズマブ およびラニビ ズマブ軽鎖 CDR3	QQYSTVPWT
17	ベバシズマブ 重鎖 CDR1	GYTFTNYGMN
18	ベバシズマブ およびラニビ ズマブ重鎖 CDR2	WINTYTGEPTYAADFKR
19	ベバシズマブ 重鎖 CDR3	YPHYYGSSHWFYFDV
20	ラニビズマブ 重鎖 CDR1	GYDFTHYGMN
21	ラニビズマブ 重鎖 CDR3	YPYYYGTSHWFYFDV
22	アルブミンシ グナルペプチ ド	MKWVTFISLLFLFSSAYS
23	キモトリプシ ノーゲンシグ ナルペプチド	MAFLWLLSCWALLGTTFG
24	インターロイ キン-2 シグナ ルペプチド	MYRMQLLSCIALILALVTNS
25	トリプシノー ゲン-2 シグナ ルペプチド	MNLLLILTFVAAAVA
26	F2A 部位	LLNFDLLKLAGDVESNP GP
27	T2A 部位	(GSG) EGRGSL LTCGDVEENP GP
28	P2A 部位	(GSG) ATNFSLLKQAGDVEENP GP
29	E2A 部位	(GSG) QCTNYALLKLAGDVESNP GP
30	F2A 部位	(GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP
31	フューリンリ ンカー	RKRR

10

20

30

40

50

32	フューリンリ ンカー	RRRR
33	フューリンリ ンカー	RRKR
34	フューリンリ ンカー	RKKR
35	フューリンリ ンカー	R-X-K/R-R
36	フューリンリ ンカー	RXKR
37	フューリンリ ンカー	RXRR
38	ラニビズマブ Fab アミノ酸 配列 (軽鎖)	MDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
39	ラニビズマブ Fab アミノ酸 配列 (重鎖)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTSLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHLRKRR
40	ラニビズマブ Fab アミノ酸 配列 (重鎖)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTSLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
41	AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDD GRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQ QPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPATPAAVGPTTMS GGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITSTRT WALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTND GVTTIANNLSTTVQVFSDESQYLPYVLGSAHQGCLPPFPAD VFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNF TFSYTFEEVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQN QSGSAQNKDLLFSRGSPPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDK FFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVAT ERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVLQ GPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPA NPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWNP EVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL

10

20

30

40

50

42	AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLKP GPPPPKPAERHKDD SRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQ LDSGDNPYLKYNHADA E FQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEPVK TAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQ QPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGNTMAT GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRT WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRF HCHFSPRDWQRLINNNWGFRRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDG TTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADV FMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFT FSYTFEDVPPHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTP SGTTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTS ADNNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEK FPQSGVLI FGKQSGSEKTNVDIEKVMITDEEEI RTTNPVATE QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQ PIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTVPAN PSTTTFSAAKFASFITQYSTGQVSV EIEWELQKENS KRWNPE IQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
43	AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWALKPGVPQPKANQQHQDN RRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLKYNHADA E FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKK RILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQEPDSSSGVGKSGK QPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSTSLGSNTMAS GGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD RVITTTSTRT WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRF HCHFSPRDWQRLINNNWGFRRPKKLSFKLFNIQVRGVTQNDG TTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADV FMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQ FSYTFEDVPPHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGT TSGTTNQSRLLFQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQQRRLSKT ANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEK FFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEI RTTNPVAT EQYGTVANNLQSSNTAPTGTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQIMIKNTVPAP NPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSV EIEWELQKENS KRWNPE EIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
44	AAV4-4	MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNA RGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQL KAGDNPYLKYNHADA E FQQLRQGDTSFGGNLGRAVFQAKKR VLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQPDSSTGIGKKGKQ PAKKKLVFEDETGA GDGPPEGSTSGAMSDDSEMRAAAGGAA VEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPY NNHLYKRLGESLQSN TYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDW QRLINNNWGM RPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLT STVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYC GLVTGNTSQQQTD RNAFYCLEYFPSQMLRTGNNFEITYSFE KVPFHS MYAHSSQLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAG TATTNFTKL RPTNFSNF KKNWLPGPSIKQQGF SKTANQNYK IPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKF SNSQLIFAGPKQNGNTATVP GTLIFTSEEE LAATNATD TDM WGNLPGGDQSN SNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGP IWAKIPHTDGHFHPSP LIGGFGLKHPPPQIFI KNTVPV PANP ATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQKERSKRWNPEV QFTSNYGGQNSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL

10

20

30

40

50

45	AAV5	MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQA RGLVLPGYNYLGPNGNLDGRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQL EAGDNPYLKYNHADAEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKR VLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPST SSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGGLGDNN QGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSSYNNHQ YREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW QRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLIT STVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQPQVFTLPQYGYA TLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEE VPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNK NLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATATT NRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQP ANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQ SSTTAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKI PETG AHFHSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTVPVGNITSFSDVPVS SFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ FVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL
46	AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDD GRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKK RVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQ QPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPTTMS GGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRTVITSTR WALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTND GVTTIANNLITSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD VFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF TFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRQTQ QSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDK FFPMSGVMI FGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVAT ERFGTVAVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQPILIKNTVP NPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN EVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
47	AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDN GRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPS PQRS PDSSTGIGKKG QQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPSSVSGTVA AGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRTVITSTR TWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFN RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTTN DGVTTIANNLITSTIQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPA DVFMIPQYGYLTLNNGSQSVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN FEFSYSFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLARTQ SNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNWLPGPCFRQQRVS KTLDQNNNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDE DRFFPSSGVLI FGKTGATNKTTLENVLMTNEEEIRPTNPVA TEEYGI VSSNLQAANTAAQTQVVNNQ GALPGMVWQNRDVYL QGPIWAKI PHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQPILIKNTVP ANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN PEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

20

30

40

50

48	AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDD GRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQ LQAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGKKG QQPARKRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMA AGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDVITSTR TWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDF NRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQ NEGTKTIANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP ADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGN NFQFTYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRT QTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVS TTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDD ERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSVMLTSEEEIKTTNPV ATEEYGVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVY LQGPIWAKIPHDTGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPV PADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRW NPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
49	hu31	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDD SRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGS QPAKKKLNFGQTGDTESVDPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTAS GGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVITSTR WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFN RFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDN NGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPA DVFMIPQYGYLTLNDGGQAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGN FQFSYEFENVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTI NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTT VTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDR FFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVAT ESYQGVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKIPHDTGNFHPSPMLGGFGMKHPPPQILIKNTPVPA DPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN EIQYTSNYYKSNNVEFAVSTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
50	hu32	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDD SRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGS QPAKKKLNFGQTGDTESVDPDPQPIGEPPAAPSGVGSMTAS GGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVITSTR WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFN RFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDN NGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPA DVFMIPQYGYLTLNDGSAVGRSSFYCLEYFPPSOMLRTGN FQFSYEFENVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTI NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTT VTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDR FFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVAT ESYQGVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKIPHDTGNFHPSPMLGGFGMKHPPPQILIKNTPVPA DPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN EIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

20

30

40

50

51	AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDN ARGLVLPGYKYLGPNGLDKGEFVNAADAAALEHDKAYDQQ LKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK RLLEPLGLVVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGA QPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSILTMA GGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVITSTRT WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFN RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDN NGVKTIANNLSTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPA DVFMIPOYGYLTLDNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN FQFSYEFENVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYLSTKI NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGSPYRQQRVSTT VTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDR FFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVAT ESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGMKHPPQILIKNTVPVA DPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN EIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
----	------	--

10

20

30

40

50

【実施例】

【0215】

6. 実施例

(実施例1)

6.1 実施例1：ベバシズマブFab cDNAベースのベクター

軽鎖および重鎖cDNA配列（それぞれ、配列番号10および11）のベバシズマブFab部分を含む導入遺伝子を含む、ベバシズマブFab cDNAベースのベクターを構築する。導入遺伝子はまた、表1に列挙される群から選択されるシグナルペプチドを含む核酸も含む。軽鎖および重鎖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切断部位によってわけられており、バイシストロン性ベクターを作出する。任意選択で、ベクターは、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。

【0216】

(実施例2)

6.2 実施例2：ラニビズマブcDNAベースのベクター

ラニビズマブFab軽鎖および重鎖cDNA（それぞれ、シグナルペプチドをコードしない配列番号12および13の部分）を含む導入遺伝子を含むラニビズマブFab cDNAベースのベクターを構築する。導入遺伝子はまた、表1に列挙される群から選択されるシグナルペプチドを含む核酸も含む。軽鎖および重鎖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切断部位によってわけられており、バイシストロン性ベクターを作出する。任意選択で、ベクターは、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。

【0217】

(実施例3)

6.3 実施例3：高度グリコシル化ベバシズマブFab cDNAベースのベクター

以下の突然変異：L118N（重鎖）、E195N（軽鎖）、またはQ160NもしくはQ160S（軽鎖）のうち1つまたは複数にコードする配列への突然変異を有する、軽鎖および重鎖cDNA配列のベバシズマブFab部分（それぞれ配列番号10および11）を含む導入遺伝子を含む高度グリコシル化ベバシズマブFab cDNAベースのベクターを構築する。導入遺伝子はまた、表1に列挙される群から選択されるシグナルペプチドを含む核酸も含む。軽鎖および重鎖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切断部位によってわけられており、バイシストロン性ベクターを作出する。任意選択で、ベクターは、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。

【0218】

(実施例4)

6. 4 実施例 4：高度グリコシル化ラニビズマブ cDNA ベースのベクター

以下の突然変異：L 1 1 8 N（重鎖）、E 1 9 5 N（軽鎖）または Q 1 6 0 N もしくは Q 1 6 0 S（軽鎖）のうち 1 つまたは複数をコードする配列への突然変異を有する、ラニビズマブ Fab 軽鎖および重鎖 cDNA（それぞれ、シグナルペプチドをコードしない配列番号 1 2 および 1 3 の部分）を含む導入遺伝子を含む高度グリコシル化ラニビズマブ Fab cDNA ベースのベクターを構築する。導入遺伝子はまた、表 1 に列挙される群から選択されるシグナルペプチドを含む核酸も含む。軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列は、IRES エlement または 2 A 切断部位によってわけられており、バイシストロン性ベクターを作出する。任意選択で、ベクターは、低酸素誘導性プロモーターをさらに含む。

【0219】

（実施例 5）

6. 5 実施例 5：ラニビズマブベースの HuGlyFabVEGF i

ラニビズマブ Fab cDNA ベースのベクター（実施例 2 を参照されたい）を、AAV8 バックグラウンドにおいて PER.C6（登録商標）細胞株（Lonza）において発現させる。得られた生成物、ラニビズマブベースの HuGlyFabVEGF i は、安定に産生されると決定される。HuGlyFabVEGF i の N-グリコシル化を、ヒドラジン分解および MS/MS 分析によって確認する。例えば、Bondt et al., Mol. & Cell. Proteomics 13.11:3029-3039 を参照されたい。グリカン分析に基づいて、HuGlyFabVEGF i は、N-グリコシル化されていると確認され、2, 6 シアル酸の主な修飾を有する。N-グリコシル化 HuGlyFabVEGF i の有利な特性は、当技術分野で公知の方法を使用して決定される。HuGlyFabVEGF i は、安定性の増大およびその抗原（VEGF）に対する親和性の増大を見出すことができる。安定性を評価する方法については、Sola and Griebenow, 2009, J Pharm Sci., 98(4): 1223-1245 を、ならびに親和性を評価する方法については、Wright et al., 1991, EMBO J. 10:2717-2723 および Leibiger et al., 1999, Biochem. J. 338:529-538 を参照されたい。

【0220】

（実施例 6）

6. 6 実施例 6：オープンラベル第 2 a 相 糖尿病性網膜症を有する参加者における構築物 II 遺伝子療法用量評価

この実施例は、糖尿病性網膜症（DR）を有する参加者における構築物 II 遺伝子療法の第 2 a 相、用量評価の概要を提供する。DR に対する 1 回の遺伝子療法処置後の構築物 II 導入遺伝子産物の持続性の安定発現は、視覚を維持しながら現在利用可能な療法の処置負担を潜在的に低減する可能性があり、好都合な利益：リスクプロファイルを有する。現在の概念実証研究は、DR を有する参加者における 2 つの異なる用量レベルでの構築物 II 遺伝子療法の安全性および有効性を評価するように意図される。

【0221】

6. 6. 1 目的およびエンドポイント

10

20

30

40

50

【表 4】

表4:一次および二次目的ならびにエンドポイント

	目的	エンドポイント
一次		
有効性	24週目でのETDRS-DRSSでの構築物IIの効果を評価するため	24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて2段階以上の改善を達成した参加者の割合
二次		
有効性	追加の時点でのETDRS-DRSSでの構築物IIの効果を評価するため	12週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて2段階以上の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて0段階(変化なし)、1段階、2段階または3段階の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて1段階以上または3段階以上の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて1段階以上、2段階以上または3段階以上の悪化を伴う参加者の割合 - レベル47または53 (NPDR) への退縮を達成したベースラインでレベル61または65 (PDR) として類別された参加者の割合
安全性/免疫原性	構築物IIの安全性、耐容性および免疫原性を評価するため	18週目もしくは24週目のいずれかに、または18週目より前の予定外の訪問時に除去のためのプロトコールによって指定された基準を満たす白内障を有する参加者の割合 - 眼および全身AEの発生率 24週にわたる免疫原性測定 (AAV8に対する血清中和抗体および構築物II TPに対する血清抗体)

10

20

30

40

50

安全性/有効性	糖尿病性合併症による追加のSOC介入の必要性を評価するため	24週目までの糖尿病性合併症のための任意の追加の介入を必要とする参加者の割合 24週目までの任意の視力を脅かす糖尿病合併症を有する参加者の割合 24週目までのSOCあたりの抗VEGF処置を必要とする糖尿病性合併症 (例えば、CI-DMEまたは新血管新生) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: 24週目までに受けた抗VEGF注入の数 - SOCあたりの研究介入 (1日目) から第1の抗VEGF投与までの期間 24週目までのSOCあたりのPRPを必要とする糖尿病性合併症 (例えば、DRによる新血管新生) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 研究介入 (1日目) から第1のPRPまでの期間 1よりも多いPRPを必要とする参加者の割合 - SOCあたりの外科的介入 (気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックル) を必要とする糖尿病性合併症 (例えば、網膜剥離) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 研究介入 (1日目) から外科的介入までの期間
薬動力学	眼房構築物II TP濃度を測定するため	4週目、12週目および24週目での眼房構築物II TP濃度
探索的		
有効性/安全性	すべての評価可能な参加者における視力のアウトカムに対する構築物IIの効果を評価するため	- ベースラインから24週目まで視覚的安定性 (5以内のETDRS文字または±5のETDRS文字) を有する参加者の割合 - ベースラインから24週目まで>5のETDRS文字の視力の向上または視力の喪失を有する参加者の割合

10

20

30

40

50

	すべての評価可能な参加者におけるSD-OCTを使用して評価される解剖学的アウトカムに対する構築物IIの効果の評価するため	12週目および24週目でのSD-OCTでのCSTの平均変化 12週目および24週目でのSD-OCTで$\leq 250 \mu\text{m}$のCSTを達成した参加者の割合 - ベースラインから12週目および24週目で$\text{CST} \geq 30 \mu\text{m}$の臨床的に有意な黄斑肥厚を有する参加者の割合 - CRCによって決定されるようなSD-OCTに基づくベースラインからの黄斑容量の平均変化および黄斑容量の低減パーセント	10
	ベースラインPDR (レベル61または65) を有する参加者の血管退縮の証拠を評価するため	FAに基づいて24週目で血管退縮の証拠を有するベースラインでレベル61または65と類別される参加者の割合	
	ベースラインPDR (レベル61または65) を有する参加者の漏出の面積の変化を評価するため	FAに基づくベースラインから24週目までの漏出の面積の変化を有するベースラインでレベル61または65と類別される参加者の割合	20
	すべての評価可能な参加者における網膜非灌流の面積におけるベースラインからの変化を評価するため	すべての評価可能な参加者におけるFAに基づく24週目での網膜非灌流の面積のベースラインからの平均変化	
バイオマーカー	眼房VEGF-A濃度を測定するため	評価される時点での眼房流体中のVEGF-A濃度	30

AAV8=アデノ随伴ウイルス血清型8、AE=有害事象、CI-DME=中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫、CRC=中央読影センター、CST=中心サブフィールド厚、DR=糖尿病性網膜症、DRSS=糖尿病性網膜症重症度スケール、ETDRS=早期処置糖尿病性網膜症研究、FA=フルオレセイン血管造影、PDR=増殖性糖尿病性網膜症、PRP=汎網膜光凝固、SD-OCT=スペクトルドメイン-光干渉断層撮影、SOC=標準治療、TP=導入遺伝子産物、VEGF=血管内皮増殖因子

【0222】

6.6.2 組み入れ基準

参加者は、この研究にとって適格となるために以下の基準のすべてを満たさなければならない。すべての眼性基準は研究眼を指す：（1）1型または2型糖尿病に続発するDRを有する ≥ 18 歳の年齢の男性または女性。参加者は、ヘモグロビンA1c $\leq 10\%$ （スクリーニングで得られた臨床検査評価によって、またはスクリーニング前60日以内の日付の文書化された検査室報告書によって確認されるような）を有さなくてはならない、（2）研究者によって適当な外科的候補であると思われる参加者、（3）スクリーニング後少なくとも6ヶ月間、研究者の見解でPRPまたは抗VEGF注入を安全に延期できる、中程度～重症NPDR、重症NPDR、軽度PDRまたは中程度PDR（CRCによって決定されるような、標準の4広視野デジタル立体眼底写真を使用してETDRS-DRSレベル47、53、61または65）を有する研究眼、（4）以下：（i）視神経の1

10

20

30

40

50

乳頭面積以内の新規血管、または視神経乳頭でのあまり広範ではない新規血管と関連する、もしくは乳頭面積の半分もしくはそれより大きいサイズの他の場所での新規血管と関連する硝子体もしくは網膜前出血、および (i i) 臨床検査で研究眼において前眼部 (例えば、虹彩または角) 新血管新生の証拠がないことを含む、研究者による視力喪失と通常関連するハイリスク特徴の証拠が研究眼にないこと、(5) > 6 9 E T D R S 文字 (近似スネレン等価物 2 0 / 4 0 以上) の研究眼における最高矯正視力 (B C V A) 、両目が適格である場合には、研究眼は、登録前に研究者によって決定されるような、参加者の悪く見える眼でなくてはならないことは留意されたい、(6) 研究眼における C I - D M E の以前の病歴は、過去 6 ヶ月以内に硝子体内抗 V E G F または短時間作用型ステロイド注入が与えられておらず、かつ、スクリーニング前 3 年に 1 0 以下の文書化された注入が与えられた場合には許容される、(7) 女性は、閉経後 ≥ 1 年または外科的に不妊化されなくてはならない。そうでない場合には、女性は、スクリーニングで陰性血清妊娠検査を有し、1 日目 (構築物 I I 手術日) に陰性確証的尿 ; 妊娠検査結果を有し、研究の間に追加の妊娠検査を進んで受け入れなくてはならない、(8) 妊娠の可能性のある女性、その男性パートナー、および妊娠の可能性のある女性パートナーを有する性的に活発な男性参加者は、スクリーニングからベクター投与後 2 4 週間まで高度に効果的な避妊の方法を使用することを進んで受け入れなければならない。この時点以後の受胎調節の中止は、主治医と議論しなくてはならない、(9) すべての研究手順を進んで遵守できなければならず、研究期間中利用可能でなければならない、(1 0) 書面で署名されたインフォームドコンセントを進んで提供できなければならない。

10

20

【 0 2 2 3 】

6 . 6 . 3 除外基準

参加者は、以下の基準のうちいずれかが当てはまる場合に研究から除外される : (1) 以下の閾値 : ハイデルベルグスペクトラリス : 3 2 0 μ m を使用する、臨床検査で、または研究眼の中心垂領域内の研究者によって決定されるような任意の活性 C I - D M E の存在、(2) 研究者による、D R 以外の原因からの研究眼における新血管新生、(3) ベースライン F A での末梢網膜の > 5 0 % または中心窩もしくは乳頭黄斑領域を含む研究眼における虚血の、研究者によって決定されるような研究眼における証拠、(4) 臨床検査での視神経蒼白の、または研究者によって決定されるようなベースライン F A での視神経乳頭新血管新生の研究眼における証拠、(5) 研究眼における P R P の任意の証拠もしくは文書化された病歴、または研究眼における後極の外側の焦点もしくはグリッドレーザーの任意の証拠、(6) 外科手技を干渉する可能性がある研究眼における眼または眼周囲の感染、(7) スクリーニング後 6 ヶ月以内に外科的介入を必要とする可能性がある研究眼における任意の眼の状態 (硝子体出血、組み入れ基準を満たさない白内障、網膜牽引、網膜上膜など) または研究者の見解で、参加者のリスクを増大し得る、視力喪失を防ぐもしくは処置するために研究の間に医学的もしくは外科的介入を必要とし得る、もしくは研究手順もしくは評価を干渉し得る研究眼における任意の状態、(8) 研究眼における活発な網膜剥離または病歴、(9) スクリーニング時の研究眼におけるインプラントの存在 (眼球内レンズ [I O L] を除く)、(1 0) ペンタカムデバイスによってスキャンされ、C R C によって検証され、または節 6 . 6 . 5 (c) において概説されたように他のベースライン白内障基準を満たさない、ペンタカム核病期分類スコア ≥ 1 、(1 1) 研究者による臨床検査もしくは C R C によって決定されるようなレンズイメージングのいずれかによる、および / または C R C によって決定されるような A R E D S レベル 2 (軽度核混濁) を超える核レンズイメージグレードを有する、文書化された既存の皮質もしくは後囊下白内障、(1 2) 参加者の緑内障専門家との協議によって評価されるような、研究眼における進行した緑内障 (すなわち、2 回以上の点滴処置またはチューブもしくはシャントなどの介入にもかかわらず制御されない) または緑内障手術の文書化された病歴、(1 3) スクリーニング前 1 2 週間以内の研究眼における眼球内手術の病歴、イットリウムアルミニウムガーネット囊切開術は、スクリーニング前 > 1 0 週間で実施された場合には許可される、(1 4) スクリーニング前 6 ヶ月以内の抗 V E G F 療法を含む研究眼における硝子体内

30

40

50

療法の履歴およびスクリーニングの3年以内のDMEのための研究眼における10回より多い以前の抗VEGFまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入の文書化、(15)スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内ステロイド注入、スクリーニング前12ヶ月以内のOzurdex(登録商標)の研究眼における投与またはスクリーニング前36ヶ月以内のIluvien(登録商標)の研究眼における投与、(16)スクリーニング前6ヶ月以内の任意の以前の全身抗VEGF処置、またはスクリーニング後次の6ヶ月の間の全身抗VEGF療法を使用する計画(17)網膜毒性を引き起こしたと知られている療法またはVAに影響を及ぼし得る、もしくは公知の網膜毒性を有する任意の薬物、例えば、クロロキンもしくはヒドロキシクロロキンとの同時療法の履歴、(18)スクリーニング前6ヶ月以内の心筋梗塞、脳血管発作または一過性脳虚血発作、(19)最大の医学的処置にもかかわらず制御されない高血圧症(収縮期血圧[BP]>180mmHg、拡張期BP>100mmHg)、BPが180/100mmHg未満にされ、研究者および/またはプライマリケア医によって決定されるように降圧処置によって安定化される場合には、参加者は、適格性について再審査され得るということは留意されたい、(20)研究者の見解で、研究への参加を排除するであろう全身状態(血糖管理の不良、制御されない高血圧症など)、(21)研究者の見解で、眼の外科手技または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置、(22)スクリーニング前5年における化学療法および/または放射線照射を必要とする免疫系を損なう可能性がある悪性腫瘍または血液悪性腫瘍の病歴、局在基底細胞癌は許可される、(23)研究者の見解で、研究においてすべての評価およびフォローアップを完了するための参加者の安全性または能力を損なう可能性がある、重篤な、慢性のまたは不安定な医学的もしくは心理的状态を有する、(24)スクリーニング時に以下の検査室の値を有する任意の参加者は、研究から除外される：(i)アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)/アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)>2.5×正常の上限(ULN)、(ii)参加者がこれまでに知られているジルベール症候群の病歴を有さない限りおよび総ビリルビンの<35%の抱合ビリルビンを示す分画ビリルビンを有さない限り、総ビリルビン>1.5×ULN、(iii)参加者が抗凝固剤処置されない限り、プロトロンビン時間>1.5×ULN。抗凝固剤処置されている参加者は、研究手順のために抗凝固療法を保持または橋渡しするために地方の検査室によってモニタリングされ、地方の慣行により管理される、参加者が抗凝固剤処置されている場合には、医療モニターとの協議が必要である、(iv)男性参加者についてヘモグロビン<10g/dLおよび女性参加者について<9g/dL、(v)血小板<100×10³/μL、(vi)推定糸球体濾過速度<30mL/分/1.73m²、(25)透析または腎臓移植を必要とする慢性腎不全の病歴、(26)スクリーニング前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置(ポンプまたは1日に複数回の注入)の開始またはスクリーニングの6ヶ月以内のそのようにする計画、(27)構築物II投与に対する抗凝固療法を保持することが、医療モニターによって検証して、処置する研究者(すなわち、網膜外科医)ならびに参加者の抗凝固を処方する医師の見解で、適応とならない、または安全ではないと考えられる抗凝固療法を現在受けていること、(28)構築物IIを含む任意の他の遺伝子療法研究への参加、または登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方の任意の治験薬の投薬または登録後6ヶ月以内に治験薬を使用する任意の計画、(29)ラニビズマブまたはその構成成分のいずれかに対する既知過敏症。

10

20

30

40

50

【0224】

6.6.4 研究介入

研究介入は、研究プロトコルに従って研究参加者に投与されるように意図される任意の治験介入、市販の製品、プラセボまたは医療デバイスとして定義される。

【0225】

適格参加者は、構築物IIの単回用量(用量1)または構築物IIの単回用量(用量2)のいずれかを受け取るように割り当てられる。すべての参加者は、手術室において網膜下送達によって1日目に研究介入を受け取る。

【 0 2 2 6 】

【表 5】

表5:研究介入の概要

アーム名	構築物II用量1	構築物II用量2
種類	遺伝子療法 (AAV8. CB7. CI. amd42. rBG)	
用量製剤	溶液	
単位用量強度	6.2×10^{11} GC/mL	1.0×10^{12} GC/mL
投与量レベル	250 μ L (1.6×10^{11} GC/眼) 1回用量	250 μ L (2.5×10^{11} GC/眼) 1回用量
投与経路	網膜下送達	
物理的説明	構築物II治験薬は、製剤バッファー中のAAVベクター有効成分 (AAV8. CB7. CI. amd42. rBG) の凍結、滅菌、単回使用溶液として供給される。ベクターは、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水および0.001% Pluronic F68、pH=7.4中で製剤化される。溶液は、室温で透明から乳白色で、無色、眼に見える粒子を含まないようである。	
パッケージングおよびラベリング	研究介入は、ラテックスフリーのゴム製ストッパーおよびアルミニウム製フリップオフシールで密封された2-mL Crystal Zenith(登録商標)バイアル中の滅菌、単回使用溶液として供給される。各バイアルは、適用可能な規制要件ごとに必要に応じてラベルされる。	

10

20

この研究における参加者は、構築物II（用量1）または構築物II（用量2）を受け取るように双方向応答技術システムを使用してスクリーニングで無作為化される（1：1）。

【 0 2 2 7 】

6. 6. 5 事前および同時療法

(a) 薬物適用および療法

以下の薬物適用は、研究に登録する前に禁止される：

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の全身性または眼の抗VEGF処置。

- ・スクリーニングの3年以内のDMEのための研究眼における10回より多い以前の、文書化された抗VEGFまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入。

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内短時間作用型ステロイド注入、スクリーニング前12ヶ月以内のOzurdexの研究眼における投与またはスクリーニング前36ヶ月以内のIluvienの研究眼における投与。

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置（ポンプまたは1日に複数回の注入）の開始、この基準を満たす参加者のために、そのプライマリケア提供者または他の処置の提供者によって推奨および文書化されるように研究の間にレジメンの変更が許可される。

- ・参加者は、研究者の見解で、構築物II投与または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置を使用してはならない。

- ・参加者は、構築物II投与に対する抗凝固療法を保持することが、処置する研究者（すなわち、網膜外科医）ならびに参加者の抗凝固を処方する医師の見解で、適応とならない、または安全ではないと考えられる、抗凝固療法を受けることを禁止される。

- ・参加者は、登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方で任意の治験薬を使用してはならない。

30

40

50

以下の同時薬物適用は、研究の間禁止される：

- ・眼性糖尿病性合併症の処置のための節 6 . 6 . 5 (b) において記載されるような状況を除く、スクリーニング後 6 ヶ月の間の研究眼における抗 V E G F 療法。

- ・これまでに示されたように、集中的なインスリン処置（ポンプまたは 1 日に複数回の注入）の開始は、研究の間許可されない。処置の開始が、スクリーニング前少なくとも 6 ヶ月で生じた場合には、研究の間に処置レジメンの改変が許可される。

構築物 I I を受け取っている参加者の術後ケアは、手順マニュアルに記載されている。この研究における事前または同時療法に対する他の制限はない。

【 0 2 2 8 】

(b) 眼性糖尿病性合併症の処置

眼性糖尿病のすべての合併症は、各研究センター S O C に従って管理される。

研究の間、S O C による抗 V E G F 処置を必要とする糖尿病性合併症を発症する参加者は、必要に応じて療法を投与され得る。必要な場合には、研究センターは、F D A によって承認された抗 V E G F 療法のその自身の供給を提供する。C I - D M E の発生は、A E として記録されなければならない、受け取られた抗 V E G F 注入の数およびすべての投与のタイミングも原文書および e C R F に記録されなければならない。

P R P S O C を必要とする糖尿病性合併症を発症する患者は、P R P の時間が原文書および e C R F に記録されなければならない。

外科的介入 S O C （気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックルのいずれか）を必要とする糖尿病性合併症を発症する参加者は、介入の種類および介入の時間が原文書および e C R F に記録されなければならない。

【 0 2 2 9 】

(c) 白内障形成のための介入

スクリーニング

スクリーニング訪問の間に、一連の評価を完了して、適格性を決定し、参加者のベースライン白内障状態を確立する。これらの評価には、以下が含まれる：（１）S O C による参加者の症状の評価、（２）皮質白内障または後囊下白内障の任意の徴候が存在するか否かを決定するための臨床検査の実施、（３）眼のペンタカム核病期分類システムを用いるイメージング、および（４）標準化前眼部写真を用いる参加者のレンズのイメージング、これは、類別および研究適格性の確認のために C R C に提出される。除外基準番号 1 1 を満たすスクリーニング訪問時に白内障を有する参加者は、登録されてはならない。

【 0 2 3 0 】

研究中の白内障評価および介入

研究の間、白内障外科医は、以下に指定される除外のための基準を満たす白内障の存在について参加者を評価し続ける。

A E として報告されるべき、医学的に適応となる白内障摘出のための基準は以下のとおりである：網膜研究者が、糖尿病性眼疾患および／または全体的な網膜の状態を安全にモニタリングおよび管理するために、網膜を適切に見るおよび／または画像化することができない。

任意のベースライン後訪問時に医学的に適応となる白内障摘出の基準が満たされる場合は、白内障摘出手術のための予定外の訪問が、白内障外科医とともに研究コーディネーターによって 5 営業日以内にスケジュール化される。

【 0 2 3 1 】

医学的に適応となる白内障摘出の基準は満たされないが、参加者が、任意のベースライン後訪問時に以下の二次基準のうち 2 つ以上を満たす場合には、研究コーディネーターは、参加者を、白内障摘出手術が白内障外科医によって 1 0 営業日以内に実施されるための予定外の訪問のためにスケジュール化する。A E としても報告されるべき二次基準は以下のとおりである：

- ・視力変化：白内障外科医によれば、レンズにおけるベースラインからの変化とも関連している、研究の間に記録された最良値（ベースラインまたはベースライン後）と比較し

10

20

30

40

50

て、 ≥ 5 の E T D R S 文字の B C V A の低下。

- ・屈折シフト：白内障外科医によると、レンズのベースラインからの変化とも関連している、任意の研究訪問で記録された B C V A の間の屈折異常 ≥ 1 ジオプトリーの変化（ベースラインでの屈折異常と比較して）。

- ・構造的：ベースラインからのレンズ内の不透明化の増大を反映する、ペンタカム核病期分類スコアでベースラインからの > 1 グレードの変化。

- ・参加者によって報告されるもの：参加者によって報告されるような、ベースラインからの視覚的機能変化。

- ・C R C イメージング：C R C によって決定されるような、核、皮質または後囊下スケールでのベースラインからの > 1 グレード／亜領域の変化（A R E D S 白内障スケール [詳細については手順マニュアルを参照されたい] ）。

10

【 0 2 3 2 】

単焦点の 1 ピースアクリル I O L が、この研究において使用するために選択したレンズである。一部の例では、円環体（乱視補正）I O L を考慮することができるが、スポンサーおよび医療モニターによって別段承認されない限り、単焦点 I O L と円環体レンズの間の費用のあらゆる相違は、参加者の責任である。多焦点または他のプレミアム I O L は、それらが網膜病態の任意の変化を正確に追跡する能力を減少させる可能性があるために、研究の間排除される。シリコン光学 I O L は、任意のその後の網膜手順を複雑化するその能力のために使用されない。白内障外科医は、参加者に、光学術後 V A および視覚的機能を提供する可能性が最も高い推奨事項を提供する場合がある。

20

【 0 2 3 3 】

術後、合併症を制限するように意図された S O C プロトコルをたどる。好ましい S O C プロトコルとして以下が挙げられる：フルオロキノロン（f l u r o q u i n o l o n e）液滴、1 日 4 回 1 週間、I l e v r o（ネパフェナク）1 日 2 回 1 ヶ月間および 1 日 4 回 1 週間で出発し、1 日 3 回、1 日 2 回、最後に、1 日 1 回まで一度につき 1 週間漸減する酢酸プレドニゾロンを用いるステロイドテーパー。参加者の安全性のために、適切な場合には、医療モニターによる承認をもって、代替術後プロトコルを使用できる。

【 0 2 3 4 】

（実施例 7）

6 . 7 実施例 7：オープンラベル第 2 a 相 糖尿病性網膜症を有する参加者における構築物 I I 遺伝子療法の用量評価

30

この実施例は、実施例 6 の最新バージョンであり、糖尿病性網膜症（D R）を有する参加者における構築物 I I 遺伝子療法の第 2 a 相、用量評価の概要を提供する。D R に対する 1 回の遺伝子療法処置後の構築物 I I 導入遺伝子産物の持続性の安定発現は、視覚を維持しながら現在利用可能な療法の処置負担を潜在的に低減する可能性があり、好都合な利益：リスクプロファイルを有する。現在の概念実証研究は、D R を有する参加者における 2 つの異なる用量レベルでの構築物 I I 遺伝子療法の安全性および有効性を評価するように意図される。

【 0 2 3 5 】

6 . 7 . 1 目的およびエンドポイント

40

【表 6】

表6: 一次および二次目的およびエンドポイント

	目的	エンドポイント
一次		
有効性	24週目でのETDRS-DRSSでの構築物IIの効果を評価するため	24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて2段階以上の改善を達成した参加者の割合
二次		
有効性	追加の時点でのETDRS-DRSSでの構築物IIの効果を評価するため	12週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて2段階以上の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて0段階(変化なし)、1段階、2段階または3段階の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて1段階以上または3段階以上の改善を達成した参加者の割合 12週目および24週目で4広視野デジタル立体眼底写真でETDRS-DRSSにおいて1段階以上、2段階以上または3段階以上の悪化を伴う参加者の割合 - レベル47または53 (NPDR) への退縮を達成したベースラインでレベル61または65 (PDR) として類別された参加者の割合
安全性/免疫原性	構築物IIの安全性、耐容性および免疫原性を評価するため	18週目もしくは24週目のいずれかに、または18週目より前の予定外の訪問時に除去のためのプロトコールによって指定された基準を満たす白内障を有する有水晶体参加者の割合 - 眼および全身AEの発生率 24週にわたる免疫原性測定 (AAV8に対する血清中和抗体および構築物II TPに対する血清抗体)

10

20

30

40

50

安全性/有効性	糖尿病性合併症による追加のSOC介入の必要性を評価するため	24週目までの糖尿病性合併症のための任意の追加の介入を必要とする参加者の割合 24週目までの任意の視力を脅かす糖尿病合併症を有する参加者の割合 24週目までのSOCあたりの抗VEGF処置を必要とする糖尿病性合併症(例えば、CI-DMEまたは新血管新生)を発症する参加者の割合;この集団については、以下のエンドポイントを評価する: 24週目までに受けた抗VEGF注入の数 - SOCあたりの研究介入(1日目)から第1の抗VEGF投与までの期間 24週目までのSOCあたりのPRPを必要とする糖尿病性合併症(例えば、DRによる新血管新生)を発症する参加者の割合;この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 研究介入(1日目)から第1のPRPまでの期間 1よりも多いPRPを必要とする参加者の割合 - SOCあたりの外科的介入(気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックル)を必要とする糖尿病性合併症(例えば、網膜剥離)を発症する参加者の割合;この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 研究介入(1日目)から外科的介入までの期間
薬動力学	眼房および血清構築物II TP濃度を測定するため	- 評価される時点での眼房構築物II TP濃度 - 評価される時点での血清構築物II TP濃度
探索的 有効性/安全性	すべての評価可能な参加者における視力のアウトカムに対する構築物IIの効果を評価するため	- ベースラインから24週目まで視覚的安定性(5以内のETDRS文字または±5のETDRS文字)を有する参加者の割合 - ベースラインから24週目まで>5のETDRS文字の視力の向上または視力の喪失を有する参加者の割合

10

20

30

40

50

	すべての評価可能な参加者におけるSD-OCTを使用して評価される解剖学的アウトカムに対する構築物IIの効果を評価するため	12週目および24週目でのSD-OCTでのCSTの平均変化 12週目および24週目でのSD-OCTで$\leq 290 \mu\text{m}$のCSTを達成した参加者の割合 - ベースラインから12週目および24週目でCST$\geq 30 \mu\text{m}$の臨床的に有意な黄斑肥厚を有する参加者の割合 - CRCによって決定されるようなSD-OCTに基づくベースラインからの黄斑容量の平均変化および黄斑容量の低減パーセント
	ベースラインPDR(レベル61または65)を有する参加者の血管退縮の証拠を評価するため	FAに基づいて24週目で血管退縮の証拠を有するベースラインでレベル61または65と類別される参加者の割合
	ベースラインPDR(レベル61または65)を有する参加者の漏出の面積の変化を評価するため	FAに基づくベースラインから24週目までの漏出の面積の変化を有するベースラインでレベル61または65と類別される参加者の割合
	すべての評価可能な参加者における網膜非灌流の面積におけるベースラインからの変化を評価するため	すべての評価可能な参加者におけるFAに基づく24週目での網膜非灌流の面積のベースラインからの平均変化
バイオマーカー	眼房VEGF-A濃度を測定するため	評価される時点での眼房流体中のVEGF-A濃度

AAV8=アデノ随伴ウイルス血清型8、AE=有害事象、CI-DME=中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫、CRC=中央読影センター、CST=中心サブフィールド厚、DR=糖尿病性網膜症、DRSS=糖尿病性網膜症重症度スケール、ETDRS=早期処置糖尿病性網膜症研究、FA=フルオレセイン血管造影、PDR=増殖性糖尿病性網膜症、PRP=汎網膜光凝固、SD-OCT=スペクトルドメイン-光干渉断層撮影、SOC=標準治療、TP=導入遺伝子産物、VEGF=血管内皮増殖因子

【0236】

6.7.2 組み入れ基準

参加者は、この研究にとって適格となるために以下の基準のすべてを満たさなければならない。すべての眼性基準は研究眼を指す：(1) 1型または2型糖尿病に続発するDRを有する18～89歳の間の年齢の男性または女性。参加者は、ヘモグロビンA1c $\leq 10\%$ (スクリーニングで得られた臨床検査評価によって、またはスクリーニング前60日以内の日付の文書化された検査室報告書によって確認されるような)を有さなくてはならない、(2) 研究者によって適当な外科的候補であると思われる参加者、(3) スクリーニング後少なくとも6ヶ月間、研究者の見解でPRPまたは抗VEGF注入を安全に延期できる、中程度～重症NPDR、重症NPDR、軽度PDRまたは中程度PDR(CRCによって決定されるような、標準の4広視野デジタル立体眼底写真を使用してETDRS-DRSSレベル47、53、61または65)を有する研究眼、(4) 以下：(i) 視神経の1乳頭面積以内の新規血管、または視神経乳頭でのあまり広範ではない新規血管と関連する、もしくは乳頭面積の半分もしくはそれより大きいサイズの他の場所での新規血管と関連する硝子体もしくは網膜前出血および(ii) 臨床検査で研究眼において前眼部

(例えば、虹彩または角)新血管新生の証拠がないことを含む、研究者による視力喪失と通常関連するハイリスク特徴の証拠が研究眼にないこと、(5) > 69 E T D R S文字(近似スネレン等価物20/40以上)の研究眼における最高矯正視力(B C V A)、両目が適格である場合には、研究眼は、登録前に研究者によって決定されるような、参加者の悪く見える眼でなくてはならないことは留意されたい、(6)研究眼におけるC I - D M Eの以前の病歴は、過去6ヶ月以内に硝子体内抗V E G Fまたは短時間作用型ステロイド注入が与えられておらず、かつ、スクリーニング前3年に10以下の文書化された注入が与えられた場合には許容される、(7)妊娠の可能性のある女性パートナーを有する性的に活発な男性参加者は、スクリーニングからベクター投与後24週間まで、コンドームおよび医学的に許容される形態のパートナーの避妊を進んで使用しなければならない、(9)すべての研究手順を進んで遵守できなければならない、研究期間中利用可能でなければならない、(10)書面で署名されたインフォームドコンセントを進んで提供できなければならない。

10

【0237】

6.7.3 除外基準

参加者は、以下の基準のうちいずれかが当てはまる場合に研究から除外される：(1)閉経後としても、外科的に不妊化されたとしても定義されない妊娠の可能性のある女性。閉経後は、連続12ヶ月月経がないと実証されると定義される。外科的に不妊は、両側性卵管結紮術/両側性卵管切除術、両側性卵管閉塞術、子宮摘出術または両側性卵巢摘出術が施されていると定義される、(2)以下の閾値：ハイデルベルグスペクトラリス：320 μ mを使用する、臨床検査で、または研究眼の中心亜領域内の研究者によって決定されるような任意の活性C I - D M Eの存在、(3)研究者による、D R以外の原因からの研究眼における新血管新生、(4)ベースラインF Aでの末梢網膜の> 50%または中心窩もしくは乳頭黄斑領域を含む研究眼における虚血の、研究者によって決定されるような研究眼における証拠、(5)臨床検査での視神経蒼白の、または研究者によって決定されるような研究眼における証拠、(6)研究眼におけるP R Pまたは網膜レーザーの任意の証拠もしくは文書化された病歴、(7)外科手技を干渉する可能性がある研究眼における眼または眼周囲の感染、(8)スクリーニング後6ヶ月以内に外科的介入を必要とする可能性がある研究眼における任意の眼の状態(硝子体出血、組み入れ基準を満たさない白内障、網膜牽引、網膜上膜など)または研究者の見解で、参加者のリスクを増大し得る、視力喪失を防ぐもしくは処置するために研究の間に医学的もしくは外科的介入を必要とし得る、もしくは研究手順もしくは評価を干渉し得る研究眼における任意の状態、(9)研究眼における活発な網膜剥離または病歴、(10)スクリーニング時の研究眼におけるインプラントの存在(眼球内レンズ[I O L]を除く)、(11)有水晶体参加者についてのペンタカムデバイスによってスキャンされ、C R Cによって検証され、または節6.6.5(c)において概説されたように他のベースライン白内障基準を満たさない、ペンタカム核病期分類スコア ≥ 1 、(12)参加者の緑内障専門家との協議によって評価されるような、研究眼における進行した緑内障(すなわち、2回以上の点滴処置またはチューブもしくはシャントなどの介入にもかかわらず制御されない)または緑内障手術の文書化された病歴、(13)スクリーニング前12週間以内の研究眼における眼球内手術の病歴、イットリウムアルミニウムガーネット(Y A G)囊切開術は、スクリーニング前> 10週間で実施された場合には許可される、(14)スクリーニング前6ヶ月以内の抗V E G F療法を含む研究眼における硝子体内療法の履歴およびスクリーニングの3年以内のD M Eのための研究眼における10回より多い以前の抗V E G Fまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入の文書化、(15)スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内ステロイド注入、スクリーニング前12ヶ月以内のO z u r d e x(登録商標)の研究眼における投与またはスクリーニング前36ヶ月以内のI l u v i e n(登録商標)の研究眼における投与、(16)スクリーニング前6ヶ月以内の任意の以前の全身抗V E G F処置、またはスクリーニング後次の6ヶ月の間の全身抗V E G F療法を使用する計画、(17)網膜毒性を引き起こしたと知られている療法またはV Aに影響を及ぼし得る

20

30

40

50

、もしくは公知の網膜毒性を有する任意の薬物、例えば、クロロキンもしくはヒドロキシクロロキンとの同時療法の履歴、(18)スクリーニング前6ヶ月以内の心筋梗塞、脳血管発作または一過性脳虚血発作、(19)最大の医学的処置にもかかわらず制御されない高血圧症(収縮期血圧[B P] > 180 mmHg、拡張期B P > 100 mmHg)、B Pが180 / 100 mmHg未満にされ、研究者および／またはプライマリケア医によって決定されるように降圧処置によって安定化される場合には、参加者は、適格性について再審査され得るということは留意されたい、(20)研究者の見解で、研究への参加を排除するであろう全身状態(血糖管理の不良、制御されない高血圧症など)、(21)研究者の見解で、眼の外科手技または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置、(22)スクリーニング前5年における化学療法および／または放射線照射を必要とする免疫系を損なう可能性がある悪性腫瘍または血液悪性腫瘍の病歴、局在基底細胞癌は許可される、(23)研究者の見解で、研究においてすべての評価およびフォローアップを完了するための参加者の安全性または能力を損なう可能性がある、重篤な、慢性のまたは不安定な医学的もしくは心理的状态を有する、(24)スクリーニング時に以下の検査室の値を有する任意の参加者は、研究から除外される：(i) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(A S T) / アラニンアミノトランスフェラーゼ(A L T) > 2.5 × 正常の上限(U L N)、(i i) 参加者がこれまでに知られているジルベール症候群の病歴を有さない限りおよび総ビリルビンの< 35 %の抱合ビリルビンを示す分画ビリルビンを有さない限り、総ビリルビン > 1.5 × U L N、(i i i) 参加者が抗凝固剤処置されない限り、プロトロンビン時間 > 1.5 × U L N。抗凝固剤処置されている参加者は、研究手順のために抗凝固療法を保持または橋渡しするために地方の検査室によってモニタリングされ、地方の慣行により管理される、参加者が抗凝固剤処置されている場合には、医療モニターとの協議が必要である、(i v) 男性参加者についてヘモグロビン < 10 g / d Lおよび女性参加者について < 9 g / d L、(v) 血小板 < 100 × 10³ / μ L、(v i) 推定糸球体濾過速度 < 30 mL / 分 / 1.73 m²、(25) 透析または腎臓移植を必要とする慢性腎不全の病歴、(26) スクリーニング前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置(ポンプまたは1日に複数回の注入)の開始またはスクリーニングの6ヶ月以内のそのようにする計画、(27) 構築物 I I 投与に対する抗凝固療法を保持することが、医療モニターによって検証して、処置する研究者(すなわち、網膜外科医)ならびに参加者の抗凝固を処方する医師の見解で、適応とならない、または安全ではないと考えられる、抗凝固療法を現在受けていること、(28) 構築物 I I を含む任意の他の遺伝子療法研究への参加、または登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方の任意の治験薬の投薬または登録後6ヶ月以内に治験薬を使用する任意の計画、(29) ラニビズマブまたはその構成成分のいずれかに対する既知過敏症。

10

20

30

40

50

【0238】

6.7.4 研究介入

研究介入は、研究プロトコールに従って研究参加者に投与されるように意図される任意の治験介入、市販の製品、プラセボまたは医療デバイスとして定義される。

【0239】

適格参加者は、構築物 I I の単回用量(用量1)または構築物 I I の単回用量(用量2)のいずれかを受け取るように割り当てられる。すべての参加者は、手術室において網膜下送達によって1日目に研究介入を受け取る。

【表 7】

表7:研究介入の概要

アーム名	構築物II用量1	構築物II用量2
種類	遺伝子療法 (AAV8, CB7, CI, amd42, rBG)	
用量製剤	溶液	
単位用量強度	6.2×10^{11} GC/mL	1.0×10^{12} GC/mL
投与量レベル	250 μ L (1.6×10^{11} GC/眼) 1回用量	250 μ L (2.5×10^{11} GC/眼) 1回用量
投与経路	網膜下送達	
物理的説明	構築物II治験薬は、製剤バッファー中のAAVベクター有効成分 (AAV8, CB7, CI, amd42, rBG) の凍結、滅菌、単回使用溶液として供給される。溶液は、室温で透明から乳白色で、無色、眼に見える粒子を含まないようである。	
パッケージングおよびラベリング	研究介入は、ラテックスフリーのゴム製ストッパーおよびアルミニウム製フリップオフシールで密封された2-mL Crystal Zenith (登録商標) バイアル中の滅菌、単回使用溶液として供給される。各バイアルは、適用可能な規制要件ごとに必要に応じてラベルされる。	

10

20

【0240】

この研究における参加者は、構築物II（用量1）または構築物II（用量2）を受け取るように双方向応答技術システムを使用してスクリーニングで無作為化される（1：1）。

30

【0241】

6.7.5 事前および同時療法

(a) 薬物適用および療法

以下の薬物適用は、研究に登録する前に禁止される：

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の全身性または眼の抗VEGF処置。

- ・スクリーニングの3年以内のDMEのための研究眼における10回より多い以前の、文書化された抗VEGFまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入。

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内短時間作用型ステロイド注入、スクリーニング前12ヶ月以内のOzurdexの研究眼における投与またはスクリーニング前36ヶ月以内のIluvienの研究眼における投与。

40

- ・スクリーニング前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置（ポンプまたは1日に複数回の注入）の開始、この基準を満たす参加者のために、そのプライマリケア提供者または他の処置の提供者によって推奨および文書化されるように研究の間にレジメンの改変が許可される。

- ・参加者は、研究者の見解で、構築物II投与または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置を使用してはならない。

- ・参加者は、構築物II投与に対する抗凝固療法を保持することが、処置する研究者（すなわち、網膜外科医）ならびに参加者の抗凝固を処方する医師の見解で、適応とならない、または安全ではないと考えられる、抗凝固療法を受けることを禁止される。

50

・参加者は、登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方で任意の治験薬を使用してはならない。

以下の同時薬物適用は、研究の間禁止される：

・眼性糖尿病性合併症の処置のための節6.7.5(b)において記載されるような状況を除く、スクリーニング後6ヶ月の間の研究眼における抗VEGF療法。

・これまでに示されたように、集中的なインスリン処置（ポンプまたは1日に複数回の注入）の開始は、研究の間許可されない。処置の開始が、スクリーニング前少なくとも6ヶ月で生じた場合には、研究の間に処置レジメンの改変が許可される。

構築物IIを受け取っている参加者の術後ケアは、手順マニュアルに記載されている。この研究における事前または同時療法に対する他の制限はない。

10

【0242】

(b) 眼性糖尿病性合併症の処置

眼性糖尿病のすべての合併症は、各研究センターSOCに従って管理され、AEとして文書化されなければならない。

研究の間、SOCによる抗VEGF処置を必要とする糖尿病性合併症を発症する参加者は、必要に応じて療法を投与され得る。必要な場合には、研究センターは、FDAによって承認された抗VEGF療法のその自身の供給を提供する。受け取られた抗VEGF注入の数およびすべての投与のタイミングも原文書およびeCRFに記録されなければならない。

PRP SOCを必要とする糖尿病性合併症を発症する患者は、PRPの時間が原文書およびeCRFに記録されなければならない。

20

外科的介入SOC（気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックルのいずれか）を必要とする糖尿病性合併症を発症する参加者は、介入の種類および介入の時間が原文書およびeCRFに記録されなければならない。

【0243】

(c) 白内障形成のための介入

有水晶体参加者のベースラインスクリーニング

スクリーニング訪問の間に、一連の評価を完了して、適格性を決定し、有水晶体参加者のみの参加者のベースライン白内障状態を確立する。これらの評価には、以下が含まれる：(1) SOCによる参加者の症状の評価、(2) 白内障研究者による任意の臨床上有意味な白内障が存在するか否かを決定するための臨床検査の実施、(3) 眼のペンタカム核病期分類(PNS)システムを用いるレンズ核のイメージング。ペンタカムグレード ≤ 1 は、研究における組み入れのために許容される。ペンタカム適格性は、サイトで決定されるべきであり、ペンタカムスキャンは、検証のためにCRCに提出されるべきである、ならびに(4) 標準化赤色反射前眼部写真を用いる参加者の皮質および水晶体後囊のイメージング、これは、類別および研究適格性の確認のためにCRCに提出される。 $\geq$ レベル2のAREDS（軽度混濁）の皮質または後囊下いずれかのレンズイメージグレードを有する任意の対象は、適格ではない。

30

【0244】

有水晶体参加者の研究中の白内障評価および介入

研究の間、網膜研究者および白内障研究者は、以下に指定される除外のための基準を満たす白内障の存在について参加者を評価し続ける。

AEとして報告されるべき、医学的に適応となる白内障摘出のための基準は以下のとおりである：網膜研究者が、糖尿病性眼疾患および／または全体的な網膜の状態を安全にモニタリングおよび管理するために、網膜を適切に見るおよび／または画像化することができない。

40

任意のベースライン後訪問時に医学的に適応となる白内障摘出の基準が満たされる場合は、白内障摘出手術のための予定外の訪問が、白内障研究者とともに研究コーディネーターによってできる限り早くスケジュール化される。

【0245】

50

医学的に適応となる白内障摘出の基準は満たされないが、参加者が、任意のベースライン後訪問時に以下の2つの二次基準（以下に記載されるBCVA減少または参加者によって報告されるもの）のうちいずれかを満たす場合には、研究コーディネーターは、確証的ペンタカムおよびCRCによって類別されたレンズ写真を得るために予定外の訪問をできる限り早くスケジュール化すべきである。（その訪問でまだ入手可能でない場合）：

1. BCVA減少：白内障の悪化の結果であると考えられる、研究の間に記録された最良値（ベースラインまたはベースライン後）と比較した、 >5 のETDRS文字のBCVAの低下。

2. 参加者によって報告されるもの：白内障の悪化の結果であると考えられる、参加者によって報告されるようなライフスタイルの障害をもたらす視覚的症状。

10

【0246】

予定外の訪問の際に、 ≥ 1 グレードのペンタカム核病期分類でベースラインからの核硬化の変化または中程度の白内障のCRCによって類別された皮質または後囊下赤色反射レンズイメージング（すなわち、中心の5mmの5%の関与）が確認される場合に、白内障摘出の二次基準が満たされる。これは、AEとして報告されるべきであり、研究コーディネーターは、白内障研究者によるできる限り早い白内障摘出のために予定外の訪問をスケジュール化すべきである。

単焦点の1ピースアクリルIOLが、この研究において使用するために選択したレンズである。一部の例では、円環体（乱視補正）IOLを考慮することができるが、スポンサーおよび医療モニターによって別段承認されない限り、単焦点IOLと円環体レンズの間の費用のあらゆる相違は、参加者の責任である。多焦点または他のプレミアムIOLは、それらが網膜病態の任意の変化を正確に追跡する能力を減少させる可能性があるために、研究の間排除される。シリコン光学IOLは、任意のその後の網膜手順を複雑化するその能力のために使用されない。白内障外科医は、参加者に、光学術後VAおよび視覚的機能を提供する可能性が最も高い推奨事項を提供する場合がある。

20

術後、合併症を制限するように意図されたSOCプロトコルをたどる。好ましいSOCプロトコルとして以下が挙げられる：フルオロキノロン液滴、1日4回1週間、Ileвро（ネパフェナク）1日2回1ヶ月間および1日4回1週間で出発し、1日3回、1日2回、最後に、1日1回まで一度につき1週間漸減する酢酸プレドニゾロンを用いるステロイドテーパー。参加者の安全性のために、適切な場合には、医療モニターによる承認をもって、代替術後プロトコルを使用できる。

30

【0247】

（実施例8）

6.8 実施例8：糖尿病性網膜症（DR）を有し、中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫（CIEDME）を有さない参加者における、1回または2回の上脈絡膜腔（SCS）注入によって送達された構築物II遺伝子療法の有効性、安全性および耐容性を評価するための第2相、無作為化、用量漸増、観察対照研究

【0248】

6.8.1 目的およびエンドポイント

40

【表 8】

表 8:目的およびエンドポイント

	目的	エンドポイント
一次		
有効性	48 週目での ETDRS-DRSS による DR での構築物 II の効果を評価するため	48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で ETDRS-DRSS によって DR において 2 段階以上の改善を達成した参加者の割合
二次		
有効性	経時的な DR (ETDRS-DRSS) での構築物 II の効果を評価するため	4 週目、12 週目および 24 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で ETDRS-DRSS によって DR において 2 段階以上の改善を達成した参加者の割合 4 週目、12 週目、24 週目および 48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で ETDRS-DRSS によって DR において 0 段階(変化なし)、1 段階以上または 3 段階以上の改善を達成した参加者の割合 4 週目、12 週目、24 週目および 48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で ETDRS-DRSS によって DR において 1 段階以上、2 段階以上または 3 段階以上の悪化を伴う参加者の割合 24 週目および 48 週目でレベル 47 または 53 (NPDR) への退縮を達成したベースラインでレベル 61 または 65 (PDR) として類別された参加者の割合
安全性/免疫原性	構築物 II の安全性、耐容性および免疫原性を評価するため	- 全身および眼 AE の発生率 24 週にわたる免疫原性測定 (AAV8:NAb、Tab、および ELISpot; 構築物 II タンパク質:Tab および ELISpot)
安全性/有効性	眼性糖尿病性合併症による追加の SOC 介入の必要性を評価するため	48 週目までの眼性糖尿病性合併症のための任意の追加の介入を必要とする参加者の割合 48 週目までの任意の視力を脅かす眼性糖尿病合併症を有する参加者の割合 48 週目までの SOC あたりの抗 VEGF 処置を必要とする眼性糖尿病性合併症 (例えば、CI-DME または新血管新生) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 受けた抗 VEGF 注入の数 - SOC あたりの研究介入 (1 日目) から第 1 の抗 VEGF 投与までの期間 48 週目までの SOC あたりの PRP を必要とする眼性糖尿病性合併症 (例えば、DR による新血管新生) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 研究介入 (1 日目) から第 1 の PRP までの期間

10

20

30

40

50

		○ 1 よりも多い PRP を必要とする参加者の割合 ● SOC あたりの外科的介入 (気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックル) を必要とする眼性糖尿病性合併症 (例えば、網膜剥離) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: ○ 研究介入 (1 日目) から外科的介入までの期間
薬動力学	● 眼房および血清構築物 II TP 濃度を測定するため	● 評価される時点での眼房構築物 II TP 濃度 ● 評価される時点での血清構築物 II TP 濃度
探索的		
有効性/安全性	● 視力のアウトカムに対する構築物 II の効果 (すべての構築物 II で処置された参加者における BCVA) を評価するため	● ベースラインから 48 週目まで視覚的安定性 (5 以内の ETDRS 文字または ±5 の ETDRS 文字) を有する参加者の割合 ● ベースラインから 48 週目まで >5 の ETDRS 文字の視力の向上または視力の喪失を有する参加者の割合
	● すべての構築物 II で処置された参加者における視野に対する構築物 II の効果を評価するため	● 研究者によって決定されるような、ベースラインから 48 週までの視野の臨床的に有意な変化を伴う参加者の割合
	● すべての構築物 II で処置された参加者における SD-OCT を使用して評価される解剖学的アウトカムに対する構築物 II の効果を評価するため	● 24 週目および 48 週目での SD-OCT での CST のベースラインからの平均変化 ● 24 週目および 48 週目での SD-OCT で $\leq 290 \mu\text{m}$ の CST を達成した参加者の割合 ● CRC によって決定されるような、24 週目および 48 週目でベースラインから $\text{CST} \geq 30 \mu\text{m}$ の臨床的に有意な黄斑肥厚を有する参加者の割合 ● CRC によって決定されるような SD-OCT でのベースラインに対する 48 週目での黄斑容量の平均変化および黄斑容量の低減パーセント
	● ベースライン PDR (レベル 61 または 65) を有する参加者の FA での血管退縮の証拠を評価するため	● CRC によって決定されるような、FA に基づいて 24 週目および 48 週目で血管退縮の証拠を有するベースラインでレベル 61 または 65 と類別される参加者の割合
	● ベースライン PDR (レベル 61 または 65) を有する参加者の FA での漏出の面積の変化を評価するため	● CRC によって決定されるような、FA に基づくベースラインから 24 週目および 48 週目までの漏出の面積の変化を有するベースラインでレベル 61 または 65 と類別される参加者の割合
	● すべての評価可能な参加者における Optos 広視野 FA での	● CRC によって決定されるような、すべての評価可能な参加者における FA に基づく 24 週目および 48 週目での網膜非

10

20

30

40

50

	網膜非灌流の面積におけるベースラインからの変化を評価するため	灌流の面積のベースラインからの平均変化
バイオマーカー	・ 眼房 VEGF-A 濃度を測定するため	・ 評価される時点での眼房液中の VEGF-A 濃度

AAV8=アデノ随伴ウイルス血清型 8、AE=有害事象、BCVA=最高矯正視力、CI-DME=中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫、CRC=中央読影センター、CST=中心サブフィールド厚、DR=糖尿病性網膜症、DRSS=糖尿病性網膜症重症度スケール、ELISpot=酵素結合免疫スポット、ETDRS=早期処置糖尿病性網膜症研究、FA=フルオレセイン血管造影、NAb=中和抗体、PDR=増殖性糖尿病性網膜症、PRP=汎網膜光凝固、SD-OCT=スペクトルドメイン-光干渉断層撮影、SOC=標準治療、Tab=総結合性抗体、TP=導入遺伝子産物、VEGF=血管内皮増殖因子

10

20

30

40

50

【0249】

6. 8. 2 組み入れ基準

研究に入るすべての参加者

評価された時点での眼房および血清中の構築物 I I T P 濃度 (ng/mL) は、処置アームによって、および研究全体によって記述的にまとめられる。参加者は、この研究にとって適格となるために以下の基準のすべてを満たさなければならない。すべての眼の基準は、研究眼を指す：

1. 1 型または 2 型糖尿病に続発する DR を有する 25～89 歳の年齢の男性または女性。参加者は、ヘモグロビン A1c ≤ 10% (スクリーニング訪問 2 で得られた臨床検査評価によって、またはスクリーニング訪問 2 の前 60 日以内の日付の文書化された検査室報告書によって確認されるような) を有さなくてはならない。

2. スクリーニング訪問 2 の前 180 日以内の AAV8 NAb の陰性または低い (≤ 300) 血清力価結果を有さなくてはならない。

3. スクリーニング訪問 2 後少なくとも 6 ヶ月間、研究者の見解で PRP または抗 VEGF 注入を安全に延期できる、中程度～重症 NPDR、重症 NPDR または軽度 PDR (CRC によって決定されるような、標準の 4 広視野デジタル立体眼底写真を使用して ETDRS-DRSS レベル 47、53 または 61) を有する研究眼。

4. 以下を含む、研究者による視力喪失と通常関連するハイリスク特徴の証拠が研究眼にないこと：

・ 視神経の 1 乳頭面積以内の新規血管。

・ 視神経乳頭でのあまり広範ではない新規血管と関連する、もしくは乳頭面積の半分もしくはそれより大きいサイズの他の場所での新規血管と関連する硝子体もしくは網膜前出血。

・ 臨床検査で研究眼において前眼部 (例えば、虹彩または角) 新血管新生の証拠がないこと。

5. ≥ 69 ETDRS 文字 (近似スネレン等価物 20/40 以上) の研究眼における最高矯正視力、両目が適格である場合には、研究眼は、登録前に研究者によって決定されるような、参加者の悪く見える眼でなくてはならないことは留意されたい。

6. 研究眼における CI-DME の以前の病歴は、過去 6 ヶ月以内に硝子体内抗 VEGF または短時間作用型ステロイド注入が与えられておらず、かつ、スクリーニング訪問 2 の前 3 年に 10 以下の文書化された注入が与えられた場合には許容される。

7. 妊娠の可能性のある女性パートナーを有する性的に活発な男性参加者は、スクリーニング訪問 2 からベクター投与後 24 週間まで、コンドームおよび医学的に許容される形態のパートナーの避妊を進んで使用しなければならない。

8. すべての研究手順を進んで遵守できなければならず、研究期間中利用可能でなければ

ばならない。

9. 書面で署名されたインフォームドコンセントを進んで提供できなければならない。

【0250】

構築物ⅠⅠに切り替える48週目以降の観察対照アーム参加者

48週目以降に構築物ⅠⅠを用いる処置に切り替えることを選択するラニビズマブ対照アーム中の参加者は、49週目の訪問で以下の基準のうちすべてを満たさなくてはならない：

1. 研究眼は、無作為化で資格を与えられる眼でなくてはならない。

2. 切り替えるコホート必要条件のNAb力価について資格を与えられなければならない。

3. 参加者は、研究者の見解で、49週目でラニビズマブに対する適切な応答を達成しなくてはならず、研究者は、スポンサーとの協議後に構築物ⅠⅠに切り替えることを推奨しなくてはならない。

4. 中程度～重症NPDR、重症NPDRまたは軽度PDR（CRCによって決定されるような、標準の4広視野デジタル立体眼底写真を使用してETDRS-DRSSレベル47、53または61）を有する研究眼。

5. 以下を含む、研究者による視力喪失と通常関連するハイリスク特徴の証拠が研究眼にないこと：

・視神経の1乳頭面積以内の新規血管、または視神経乳頭でのあまり広範ではない新規血管と関連する、もしくは乳頭面積の半分もしくはそれより大きいサイズの他の場所での新規血管と関連する硝子体もしくは網膜前出血。

6. 臨床検査で研究眼において前眼部（例えば、虹彩または角）新血管新生の証拠がないこと。

7. >69ETDRS文字（近似スネレン等価物20/40以上）の研究眼におけるBCVA。

8. 女性は、閉経後である（少なくとも連続12ヶ月月経がないと定義される）または外科的に不妊化されていなくてはならない（すなわち、両側性卵管結紮術／両側性卵管切除術、両側性卵管閉塞術、子宮摘出術または両側性卵巢摘出術を有する）。そうでない場合には、女性は、1日目に陰性血清および尿妊娠検査を有し、研究の間に追加の妊娠検査を進んで受け入れなくてはならない。

9. すべてのWOCBP（およびその男性パートナー）は、高度に効果的な避妊の方法を進んで使用しなければならず、WOCBPと性的関係にある男性参加者は、54週目から構築物ⅠⅠ投与後24週間までコンドームを進んで使用しなくてはならない。

【0251】

6.8.3 除外基準

研究に入るすべての参加者

参加者は、以下の基準のいずれかが当てはまる場合には研究から除外される：

1. 妊娠の可能性がある女性（すなわち、閉経後でも、外科的に不妊でもない女性）はこの臨床研究から除外される。

・閉経後は、連続12ヶ月月経がないと実証されると定義される。

・外科的に不妊は、両側性卵管結紮術／両側性卵管切除術、両側性卵管閉塞術、子宮摘出術または両側性卵巢摘出術を施されていると定義される。

2. 以下の閾値：

・ハイデルベルグスペクトラリス： $\geq 320\mu\text{m}$

を使用する、CRCによって評価されるSD-OCTによって決定されるような、臨床検査で、または研究眼の中心垂領域内の研究者によって決定されるような任意の活性CI-DMEの存在。

3. 研究者による、DR以外の原因からの研究眼における新血管新生。

4. 研究者によって決定されるような、臨床検査での視神経蒼白の研究眼における証拠

。

5. 研究眼におけるPRPまたは網膜レーザーの任意の証拠もしくは文書化された病歴。

6. SCS手順を干渉する可能性がある研究眼における眼または眼周囲の感染。

7. スクリーニング訪問2後6ヶ月以内に外科的介入を必要とする可能性がある研究眼における任意の眼の状態（硝子体出血、白内障、網膜牽引、網膜上膜など）または研究者の見解で、参加者のリスクを増大し得る、視力喪失を防ぐもしくは処置するために研究の間に医学的もしくは外科的介入を必要とし得る、もしくは研究手順もしくは評価を干渉し得る研究眼における任意の状態。

8. 研究眼における活発な網膜剥離または病歴。

9. スクリーニング訪問2時の研究眼におけるインプラントの存在（眼球内レンズを除く）。

10. 以前の硝子体切除術を有する参加者。

11. IOP > 23 mmHg、緑内障を処置するための2回のIOP低下性薬物適用、任意の侵襲的手順（例えば、シャント、チューブまたはMIGSデバイス、しかし、選択的レーザー線維柱帯切除術およびアルゴンレーザー線維柱帯形成術は許可される）によって制御されない、または中心固定を侵襲する視野喪失によって定義されるような、研究眼における進行した緑内障。

12. スクリーニング訪問2の前12週間以内の研究眼における眼球内手術の病歴、イットリウムアルミニウムガーネット（YAG）囊切開術は、スクリーニング訪問2の前> 10週間で実施された場合には許可される。

13. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の抗VEGF療法を含む研究眼における硝子体内療法の履歴およびスクリーニング訪問2の3年以内の研究眼における10回より多い以前の抗VEGFまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入の文書化。

14. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内ステロイド注入、スクリーニング訪問2の前12ヶ月以内のOzurdex（登録商標）の研究眼における投与またはスクリーニング訪問2前36ヶ月以内のIluvien（登録商標）の研究眼における投与。

15. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の任意の以前の全身抗VEGF処置、またはスクリーニング訪問2の後、次の48週間の間の全身抗VEGF療法を使用する計画。

16. 網膜毒性を引き起こしたと知られている療法またはVAに影響を及ぼし得る、もしくは公知の網膜毒性を有する任意の薬物、例えば、クロロキンもしくはヒドロキシクロロキンとの同時療法の履歴。

17. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の心筋梗塞、脳血管発作または一過性脳虚血発作。

18. 最大の医学的処置にもかかわらず制御されない高血圧症（収縮期血圧[BP] > 180 mmHg、拡張期BP > 100 mmHg）、BPが180/100 mmHg未満にされ、研究者および／またはプライマリケア医によって決定されるように降圧処置によって安定化される場合には、参加者は、適格性について再審査され得るということは留意されたい。

19. 研究者の見解で、研究への参加を排除するであろう全身状態（血糖管理の不良、制御されない高血圧症など）。

20. 研究者の見解で、眼の外科手技または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置。

21. スクリーニング訪問2の前5年における化学療法および／または放射線照射を必要とする免疫系を損なう可能性がある、療法を伴うか伴わない悪性腫瘍または血液悪性腫瘍の病歴。局在基底細胞癌は許可される。

22. 研究者の見解で、研究においてすべての評価およびフォローアップを完了するための参加者の安全性または能力を損なう可能性がある、重篤な、慢性のまたは不安定な医学的もしくは心理的状态を有する。

23. スクリーニング訪問2時に以下の検査室の値を有する任意の参加者は、研究から

10

20

30

40

50

除外される：

- ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）／アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）＞2.5×正常の上限（ULN）。
- ・参加者がこれまでに知られているジルベール症候群の病歴を有さない限りおよび総ビリルビンの＜35%の抱合ビリルビンを示す分画ビリルビンを有さない限り、総ビリルビン＞1.5×ULN。
- ・参加者が抗凝固剤処置されない限り、プロトロンビン時間＞1.5×ULN。
- ・男性参加者についてヘモグロビン＜10 g／dLおよび女性参加者について＜9 g／dL。
- ・血小板＜100×10³／μL。
- ・推定糸球体濾過速度＜30 mL／分／1.73 m²。

10

24. 透析または腎臓移植を必要とする慢性腎不全の病歴。

25. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置（ポンプまたは1日に複数回の注入）の開始または1日目の48週間以内のそのようにする計画。

26. 構築物IIを含む任意の他の遺伝子療法研究への参加、または登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方の任意の治験薬の投薬または登録後6ヶ月以内に治験薬を使用する任意の計画。

27. ラニビズマブまたはその構成成分のいずれかに対する既知過敏症。

【0252】

構築物IIに切り替える48週目以降の観察対照アーム参加者

20

48週目以降に構築物IIを用いる処置に切り替えることを選択する観察対照アーム中の参加者は、糖尿病性合併症のためにSOCとして投与される研究眼における処置を除いて（すなわち、研究眼においてSOCを受け取ることは、49週目に構築物IIに移行することによって除外性ではない）、彼らがスクリーニングのために指定された除外基準のいずれかを満たす場合にはそうするために不適格となる。

【0253】

6.8.4 施される研究介入

適格参加者は、研究眼においていずれかの構築物IIの単回用量（用量1または用量2）を受け取るように割り当てられる、または観察のみについて追跡される。

【表9】

30

表9:構築物IIに関する情報

アーム名	構築物II 用量1	構築物II 用量2
種類	遺伝子療法 (AAV8, CB7, CI, amd42, RBG)	
用量製剤	溶液	
単位用量強度	1.0 × 10 ¹² GC/mL	2.5 × 10 ¹² GC/mL
投与量レベル	単回 SCS 注入によって送達される 100 μl (2.5×10 ¹¹ GC/眼)	同一訪問時に2回の SCS 注入によって送達される 100 μl (5.0×10 ¹¹ GC/眼)
投与経路	微量注入器を使用する研究眼における上脈絡膜腔注入	
物理的説明	構築物II 治験薬は、製剤バッファー中の AAV ベクター有効成分 (AAV8, CB7, CI, amd42, RBG) の凍結、滅菌、単回使用溶液として供給される。溶液は、室温で透明から乳白色で、無色、眼に見える粒子を含まないようである。	
パッケージングおよびラベリング	構築物II は、ラテックスフリーのゴム製ストッパーおよびアルミニウム製フリップオフシールで密封された 2-mL Crystal Zenith (登録商標) バイアル中の滅菌、単回使用溶液として供給される。各バイアルは、国別の規制要件ごとに必要に応じてラベルされる。	

40

50

【0254】

(実施例9)

6.9 実施例9：ブタにおいて注入をモニタリングするための赤外線サーマルカメラの使用

FLIR T530 赤外線サーマルカメラを使用して、生存するブタにおいて眼注入後熱プロファイルを特徴付けた。あるいは、FLIR T420、FLIR T440、Fluke Ti400またはFLIRE60 赤外線サーマルカメラを使用する。研究では、室温生理食塩水（68～72 °F）の上脈絡膜（図6）、不成功の上脈絡膜、硝子体内および眼外流出注入を評価した。用量容量は、冷蔵庫から注入のための室温への溶液を用いて注入のたびに100 μLとした。

10

【0255】

赤外線カメラレンズから眼の表面までの距離は、およそ1フィートで設定した。見るためのカメラでの手動での温度範囲は、～80–90 °Fに設定した。イメージングオペレーターは、カメラを保持し、ビデオ録画中に注入部位に向けられたセンタースクリーンカーソルを設定した。ブタに、より良好な視感度のために眼を眼球突出するために生理食塩水の眼球後注入を与え、眼瞼を切断して引き戻し、注射部位で強膜を露出させた。サーマルビデオ録画の間に鉄フィルターを使用した。

上脈絡膜注入の成功は、（a）暗い色のゆっくりとした広い放射状の広がり、（b）始まりでの非常に暗い色、および（c）明るい色への注入物の段階的な変化、すなわち、より明るい色によって示される温度の勾配によって特徴付けられた。上脈絡膜注入の不成功は、（a）暗い色の広がりがなく、および（b）注入部位に局在する色のわずかな変化によって特徴付けられた。硝子体内注入の成功は、（a）暗い色の広がりがなく、（b）注入部位に局在する極めて暗い色への最初の変化および（c）注入後に生じ、時間につれて発達する、より暗い色への眼全体の段階的な均一の変化によって特徴付けられた。眼外流出は、（a）眼の外側外面での迅速に流れる流れ、（b）始まりでの非常に暗い色および（c）より明るい色への迅速な変化によって特徴付けられた。

20

【0256】

(実施例10)

6.10 実施例10：ヒト患者において注入をモニタリングするための赤外線サーマルカメラの使用

糖尿病性網膜症（DR）を呈する対象に、ラニビズマブ Fab をコードする AAV8 を、硝子体液中、少なくとも0.330 μg/mLのCminの導入遺伝子産物の濃度を3ヶ月間もたらすのに十分な用量で投与する（例えば、網膜下投与、上脈絡膜投与、または硝子体内投与によって）。FLIR T530 赤外線サーマルカメラを使用して、手順の際に注入を評価し、注入後に評価して、投与が成功裏に完了したか、または投与の誤投与のいずれかを確認するために利用可能である。あるいは、FLIR T420、FLIR T440、Fluke Ti400またはFLIRE60 赤外線サーマルカメラを使用する。処置後、臨床効果の徴候ならびにDRの徴候および症状の改善について、対象を臨床的に評価する。

30

【0257】

(実施例11)

6.11 実施例11：糖尿病性網膜症（DR）を有し、中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫（CME）を有さない参加者における、実施例11：1回または2回の上脈絡膜腔（SCS）注入によって送達された構築物II遺伝子療法の有効性、安全性および耐容性を評価するための第2相、無作為化、用量漸増、観察対照研究

この実施例は、実施例8の最新バージョンであり、糖尿病性網膜症（DR）を有する参加者における構築物II遺伝子療法の第2a相、用量評価の概要を提供する。

40

【0258】

6.11.1 目的およびエンドポイント

50

【表 10】

表 10: 目的およびエンドポイント

	目的	エンドポイント
一次		
有効性	48 週目での EDRS-DRSS による DR での構築物 II の効果を評価するため	48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で EDRS-DRSS によって DR において 2 段階以上の改善を達成した参加者の割合
二次		
有効性	経時的な DR (EDRS-DRSS) での構築物 II の効果を評価するため	4 週目、12 週目および 24 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で EDRS-DRSS によって DR において 2 段階以上の改善を達成した参加者の割合 4 週目、12 週目、24 週目および 48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で EDRS-DRSS によって DR において 0 段階 (変化なし)、1 段階以上または 3 段階以上の改善を達成した参加者の割合 4 週目、12 週目、24 週目および 48 週目で 4 広視野デジタル立体眼底写真で EDRS-DRSS によって DR において 1 段階以上、2 段階以上または 3 段階以上の悪化を伴う参加者の割合 24 週目および 48 週目でレベル 47 または 53 (NPDR) への退縮を達成したベースラインでレベル 61 (PDR) として類別された参加者の割合
安全性/免疫原性	構築物 II の安全性、耐容性および免疫原性を評価するため	- 全身および眼 AE の発生率 48 週にわたる免疫原性測定 (AAV8: Nab、TAb、および ELISpot; 構築物 II TP: 抗構築物 II TP 抗体および ELISpot)
安全性/有効性	眼性糖尿病性合併症による追加の SOC 介入の必要性を評価するため	48 週目までの眼性糖尿病性合併症のための任意の追加の介入を必要とする参加者の割合 48 週目までの任意の視力を脅かす眼性糖尿病合併症を有する参加者の割合 48 週目までの SOC あたりの抗 VEGF 処置を必要とする眼性糖尿病性合併症 (例えば、CI-DME または新血管新生) を発症する参加者の割合; この集団については、以下のエンドポイントを評価する: - 受けた抗 VEGF 注入の数 - SOC あたりの研究介入 (1 日目) から第 1 の抗 VEGF 投与までの期間 48 週目までの SOC あたりの PRP を必要とする眼性糖尿病性合併症 (例え

10

20

30

40

50

		ば、DR による新血管新生)を発症する参加者の割合;この集団については、以下のエンドポイントを評価する: ○ 研究介入(1日目)から第1のPRPまでの期間 ○ 1よりも多いPRPを必要とする参加者の割合 ● SOCあたりの外科的介入(気体網膜復位術、冷凍凝固または強膜バックル)を必要とする眼性糖尿病性合併症(例えば、網膜剥離)を発症する参加者の割合;この集団については、以下のエンドポイントを評価する: ○ 研究介入(1日目)から外科的介入までの期間
薬動力学	● 眼房および血清構築物 II TP 濃度を測定するため	● 評価される時点での眼房構築物 II TP 濃度 ● 評価される時点での血清構築物 II TP 濃度
探索的		
有効性/安全性	● 視力のアウトカムに対する構築物 II の効果(すべての構築物 II で処置された参加者における BCVA)を評価するため	● ベースラインから 48 週目まで視覚的安定性(5 以内の ETDRS 文字または ± 5 の ETDRS 文字)を有する参加者の割合 ● ベースラインから 48 週目まで >5 の ETDRS 文字の視力の向上または視力の喪失を有する参加者の割合
	● すべての構築物 II で処置された参加者における視野に対する構築物 II の効果を評価するため	● 研究者によって決定されるような、ベースラインから 48 週までの視野の臨床的に有意な変化を伴う参加者の割合
	● すべての構築物 II で処置された参加者における SD-OCT を使用して評価される解剖学的アウトカムに対する構築物 II の効果を評価するため	● 24 週目および 48 週目での SD-OCT での CST のベースラインからの平均変化 ● 24 週目および 48 週目での SD-OCT で $\leq 290 \mu m$ の CST を達成した参加者の割合 ● CRC によって決定されるような、24 週目および 48 週目でベースラインから $CST \geq 30 \mu m$ の臨床的に有意な黄斑肥厚を有する参加者の割合 ● CRC によって決定されるような SD-OCT でのベースラインに対する 48 週目での黄斑容量の平均変化および黄斑容量の低減パーセント
	● ベースライン PDR(レベル 61)を有する参加者の FA での血管退縮の証拠を評価するため	● CRC によって決定されるような、FA に基づいて 24 週目および 48 週目で血管退縮の証拠を有するベースラインでレベル 61 と類別される参加者の割合

10

20

30

40

50

	ベースライン PDR (レベル 61) を有する参加者の FA での漏出の面積の変化を評価するため	CRC によって決定されるような、FA に基づくベースラインから 24 週目および 48 週目までの漏出の面積の変化を有するベースラインでレベル 61 と類別される参加者の割合
	すべての評価可能な参加者における Optos 広視野 FA での網膜非灌流の面積におけるベースラインからの変化を評価するため	CRC によって決定されるような、すべての評価可能な参加者における FA に基づく 24 週目および 48 週目での網膜非灌流の面積のベースラインからの平均変化

10

AAV8=アデノ随伴ウイルス血清型 8、AE=有害事象、BCVA=最高矯正視力、CI-DME=中心窩を侵している糖尿病性黄斑浮腫、CRC=中央読影センター、CST=中心サブフィールド厚、DR=糖尿病性網膜症、DRSS=糖尿病性網膜症重症度スケール、ELISpot=酵素結合免疫スポット、ETDRS=早期処置糖尿病性網膜症研究、FA=フルオレセイン血管造影、NAb=中和抗体、PDR=増殖性糖尿病性網膜症、PRP=汎網膜光凝固、SD-OCT=スペクトルドメイン-光干渉断層撮影、SOC=標準治療、TAb=総結合性抗体、TP=導入遺伝子産物、VEGF=血管内皮増殖因子

20

【0259】

6.11.2 組み入れ基準

参加者は、この研究にとって適格となるために以下の基準のすべてを満たさなければならない。すべての眼性基準は研究眼を指す：

【0260】

1. 1 型または 2 型糖尿病に続発する DR を有する 25～89 歳の年齢の男性または女性。参加者は、ヘモグロビン A1c $\leq 10\%$ (スクリーニング訪問 2 で得られた臨床検査評価によって、またはスクリーニング訪問 2 の前 60 日以内の日付の文書化された検査室報告書によって確認されるような) を有さなくてはならない。

30

2. スクリーニング訪問 2 後少なくとも 6 ヶ月間、研究者の見解で PRP または抗 VEGF 注入を安全に延期できる、中程度～重症 NPDR、重症 NPDR または軽度 PDR (CRC によって決定されるような、標準の 4 広視野デジタル立体眼底写真を使用して ETDRS-DRSS レベル 47、53 または 61) を有する研究眼。

3. 以下を含む、研究者による視力喪失と通常関連するハイリスク特徴の証拠が研究眼にないこと：

- 視神経の 1 乳頭面積以内の新規血管。

- 視神経乳頭でのあまり広範ではない新規血管と関連する、もしくは乳頭面積の半分もしくはそれより大きいサイズの他の場所での新規血管と関連する硝子体もしくは網膜前出血。

40

- 臨床検査で研究眼において前眼部 (例えば、虹彩または角) 新血管新生の証拠がないこと。

4. AAV8 NAb の陰性または低い (≤ 300) 血清力価結果を有さなくてはならない。

5. ≥ 69 ETDRS 文字 (近似スネレン等価物 20/40 以上) の研究眼における最高矯正視力、両目が適格である場合には、研究眼は、登録前に研究者によって決定されるような、参加者の悪く見える眼でなくてはならないことは留意されたい。

6. 研究眼における CI-DME の以前の病歴は、過去 6 ヶ月以内に硝子体内抗 VEGF または短時間作用型ステロイド注入が与えられておらず、かつ、スクリーニング訪問 2

50

の前3年に10以下の文書化された注入が与えられた場合には許容される。

7. 妊娠の可能性のある女性パートナーを有する性的に活発な男性参加者は、スクリーニング訪問2からベクター投与後24週間まで、コンドームおよび医学的に許容される形態のパートナーの避妊を進んで使用しなければならない。

8. すべての研究手順を進んで遵守できなければならず、研究期間中利用可能でなければならない。

9. 書面で署名されたインフォームドコンセントを進んで提供できなければならない。

【0261】

6. 1. 1. 3 除外基準

参加者は、以下の基準のいずれかが当てはまる場合には研究から除外される：

1. 妊娠の可能性のある女性（すなわち、閉経後でも、外科的に不妊でもない女性）はこの臨床研究から除外される。

・閉経後は、連続12ヶ月月経がないと実証されると定義される。

・外科的に不妊は、両側性卵管結紮術／両側性卵管切除術、両側性卵管閉塞術、子宮摘出術または両側性卵巢摘出術を施されていると定義される。

2. 以下の閾値：

・ハイデルベルグスペクトラリス：320 μmより大きいCST

を使用する、CRCによって評価されるSD-OCTによって決定されるような、臨床検査で、または研究眼の中心垂領域厚（CST）内の研究者によって決定されるような任意の活性CI-DMEの存在。

3. 研究者による、DR以外の原因からの研究眼における新血管新生。

4. 研究者によって決定されるような、臨床検査での視神経蒼白の研究眼における証拠。

5. 研究眼におけるPRPまたは網膜レーザーの任意の証拠もしくは文書化された病歴。

6. SCS手順を干渉する可能性がある研究眼における眼または眼周囲の感染。

7. スクリーニング訪問2後6ヶ月以内に外科的介入を必要とする可能性がある研究眼における任意の眼の状態（硝子体出血、白内障、網膜牽引、網膜上膜など）または研究者の見解で、参加者のリスクを増大し得る、視力喪失を防ぐもしくは処置するために研究の間に医学的もしくは外科的介入を必要とし得る、もしくは研究手順もしくは評価を干渉し得る研究眼における任意の状態。

8. 研究眼における活発な網膜剥離または病歴。

9. スクリーニング訪問2時の研究眼におけるインプラントの存在（眼球内レンズを除く）。

10. 以前の硝子体切除術を有する参加者。

11. IOP > 23 mmHg、緑内障を処置するための2回のIOP低下性薬物適用、任意の侵襲的手順（例えば、シャント、チューブまたはMIGSデバイス、しかし、選択的レーザー線維柱帯切除術およびアルゴンレーザー線維柱帯形成術は許可される）によって制御されない、または中心固定を侵襲する視野喪失によって定義されるような、研究眼における進行した緑内障。

12. スクリーニング訪問2の前12週間以内の研究眼における眼球内手術の病歴、イットリウムアルミニウムガーネット（YAG）囊切開術は、スクリーニング訪問2の前>10週間で実施された場合には許可される。

13. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の抗VEGF療法を含む研究眼における硝子体内療法の履歴およびスクリーニング訪問2の前36ヶ月以内の研究眼における10回より多い以前の抗VEGFまたは短時間作用型ステロイド硝子体内注入の文書化。

14. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の研究眼における任意の以前の硝子体内ステロイド注入、スクリーニング訪問2の前12ヶ月以内のOzurdex（登録商標）の研究眼における投与またはスクリーニング訪問2前36ヶ月以内のIluvien（登録商標）の研究眼における投与。

10

20

30

40

50

15. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の任意の以前の全身抗VEGF処置、またはスクリーニング訪問2の後、次の48週間の間の全身抗VEGF療法を使用する計画。

16. 網膜毒性を引き起こしたと知られている療法またはVAに影響を及ぼし得る、もしくは公知の網膜毒性を有する任意の薬物、例えば、クロロキンもしくはヒドロキシクロロキンとの同時療法の履歴。

17. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の心筋梗塞、脳血管発作または一過性脳虚血発作。

18. 最大の医学的処置にもかかわらず制御されない高血圧症（収縮期血圧〔BP〕>180mmHg、拡張期BP>100mmHg）、BPが180/100mmHg未満にされ、研究者および／またはプライマリケア医によって決定されるように降圧処置によって安定化される場合には、参加者は、適格性について再審査され得るということは留意されたい。

19. 研究者の見解で、研究への参加を排除するであろう全身状態（血糖管理の不良、制御されない高血圧症など）。

20. 研究者の見解で、眼の手順または治療プロセスに干渉する可能性がある任意の同時処置。

21. スクリーニング訪問2の前5年における化学療法および／または放射線照射を必要とする免疫系を損なう可能性がある、療法を伴うか伴わない悪性腫瘍または血液悪性腫瘍の病歴。局在基底細胞癌は許可される。

22. 研究者の見解で、研究においてすべての評価およびフォローアップを完了するための参加者の安全性または能力を損なう可能性がある、重篤な、慢性のまたは不安定な医学的もしくは心理的状态を有する。

23. スクリーニング訪問2時に以下の除外性の検査室の値のうちいずれか1つを満たす：

- ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）および／またはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）>2.5×正常の上限（ULN）。

- ・参加者がこれまでに知られているジルベール症候群の病歴を有さない限りおよび総ビリルビンの<35%の抱合ビリルビンを示す分画ビリルビンを有さない限り、総ビリルビン>1.5×ULN。

- ・参加者が抗凝固剤処置されない限り、プロトロンビン時間>1.5×ULN。

- ・男性参加者についてヘモグロビン<10g/dLおよび女性参加者について<9g/dL。

- ・血小板<100×10³/μL。

- ・推定糸球体濾過速度<30mL/分/1.73m²。

24. 透析または腎臓移植を必要とする慢性腎不全の病歴。

25. スクリーニング訪問2の前6ヶ月以内の集中的なインスリン処置（ポンプまたは1日に複数回の注入）の開始または1日目の48週間以内のそのようにする計画。

26. 構築物IIを含む任意の他の遺伝子療法研究への参加、または登録前30日以内もしくは治験薬の5半減期以内のいずれか長い方の任意の治験薬の投薬または登録後6ヶ月以内に治験薬を使用する任意の計画。

27. ラニビズマブまたはその構成成分のいずれかに対する既知過敏症。

【0262】

6.11.4 施される研究介入

適格参加者は、研究眼においていずれかの構築物IIの単回用量（用量1または用量2）を受け取るように割り当てられる、または観察のみについて追跡される。構築物IIに関する情報は、以下である。

【0263】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 11: 構築物 II に関する情報

アーム名	構築物 II 用量 1	構築物 II 用量 2
種類	遺伝子療法 (AAV8, CB7, CI, amd42, RBG)	
用量製剤	溶液	
単位用量強度	2.5×10^{12} GC/mL	2.5×10^{12} GC/mL
投与量レベル	単回の $100 \mu\text{L}$ の SCS 注入によって送達される 2.5×10^{11} GC/眼 ($100 \mu\text{L}$ の総容量)	同一訪問時に 2 回の $100 \mu\text{L}$ の SCS 注入によって送達される 5.0×10^{11} GC/眼 ($200 \mu\text{L}$ の総容量)
投与経路	微量注入器を使用する研究眼における上脈絡膜腔注入	
物理的説明	構築物 II 治験薬は、製剤バッファー中の AAV ベクター有効成分 (AAV8, CB7, CI, amd42, RBG) の凍結、滅菌、単回使用溶液として供給される。溶液は、室温で透明から乳白色で、無色、眼に見える粒子を含まないようである。	
パッケージングおよびラベリング	構築物 II は、ラテックスフリーのゴム製ストッパーおよびアルミニウム製フリップオフシールで密封された 2-mL Crystal Zenith (登録商標) バイアル中の滅菌、単回使用溶液として供給される。各バイアルは、国別の規制要件ごとに必要に応じてラベルされる。	

10

20

【0 2 6 4】

6. 1 1. 5 ベクター脱落

ベクター濃度の測定のために構築物 II 参加者について、血液（血清）、尿および涙のサンプル採取を実施する。サンプルの処理、取り扱いおよび輸送に関する追加の情報については、研究者の実験室マニュアルを参照されたい。

これらの生物学的流体において収集された脱落データは、標的患者集団における構築物 II の脱落プロファイルを提供し、未処置個体への伝播の可能性を推定するために使用される。脱落は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を使用して測定される。

30

【0 2 6 5】

(実施例 1 2)

6. 1 2 実施例 1 2: カニクイザルにおける構築物 II の毒性研究

カニクイザルでは、構築物 II を、微量注入器デバイスを使用して最大 3×10^{12} GC/眼の用量で上脈絡膜に投与した。動物を、3 ヶ月後に評価した。

この研究では、微量注入器は、構築物 II を SCS 腔中に成功裏に投与し、デバイスまたは構築物 II の使用と関連する有害な所見は観察されなかった。網膜および RPE/脈絡膜において形質導入によって決定される広範な体内分布はなく、眼房および硝子体液の両方において検出可能な TP (抗 VEGF Fab) があった。この研究において、有害作用が観察されないレベル (NOAEL) は、試験した最高用量である 3×10^{12} GC/眼であった。3 ヶ月の非ヒト霊長類 (NHP) 毒性研究におけるすべての用量で、ベクター DNA が肝臓において検出され、これは、ベクターは上脈絡膜注入後に脈絡毛細管を介して全身循環に入る場合があることを示す。試験された最高用量 (3×10^{12} GC/眼) で、低レベルのベクター DNA がまた、さらなる末梢組織（後頭葉、海馬、視床、心臓、肺、腎臓および卵巣）において検出された。しかし、抗 VEGF Fab の血清濃度の増大または全身毒性の何らかの証拠はなかった。さらに、遺伝子療法において一般に見られる所見である研究の最後での全血におけるベクター DNA の存在は、観察された末梢の体内分布の一部に影響を及ぼした可能性がある。

40

【0 2 6 6】

50

要約すると、NHPにおける上脈絡膜投薬について、NOAELは、試験した最高用量である 3×10^{12} GC/眼であった。肝臓におけるベクターDNAの存在は、血清抗VEGF Fabの増大がなかったので、重要性が不明である。最高用量のみで、低レベルのベクターDNAがまた、さらなる末梢組織において検出されたが、ベクターDNAは同時点で血液においても検出されたので、重要性が不明である。したがって、末梢組織体内分布について、重量ベースの安全性マージンが使用されている。最高用量、 3×10^{12} GC/眼または 1.5×10^{12} GC/kgで、肝臓中のベクターDNAと関連していたTPの全身濃度の増大の証拠または何らかの肝臓変化の証拠はなかった。したがって、ヒトでは、最大 1.5×10^{11} GC/kgの用量は、3ヶ月の毒性研究において投与された最高用量よりも10倍低い用量と同等であるので許容されると考えられる。

10

SCS微量注入器内で、100 μ Lの単回注入容量をヒトにおいて容易に投与できる。各マイクロニードルは、ニードルあたり合計100 μ Lに目盛付けされる。

【0267】

7. 均等物

本発明はその特定の実施形態を参照して詳細に記載されるが、機能的に均等である変動は、本発明の範囲内にあるということは理解されよう。実際、本明細書において示され、記載されるものに加えて、前述の説明および添付の図面から本発明の種々の改変が、当業者には明らかとなろう。このような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入るものとする。当業者ならば、日常の実験のみを使用して、本明細書において記載される本発明の特定の実施形態の多数の均等物を認識し、または確認できるであろう。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。

20

【0268】

本明細書に記載されているすべての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願のそれぞれ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かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図1】

ラニズマブ/ベバシズマブ Fab 重鎖のアミノ酸配列																	
→V _H	10	20	30	40	50	60											
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTYGPTY																	
-----T-N-----																	
	70	80	90	100	110	120											
AADFRRRTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYGTSWYFDVWGQGLVT																	
-----Y部位-----H-S-----G部位																	
→C _H	130	140	150	160	170	180											
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPMVLTSSNSGALTSGVHTFPAVL																	
-----G部位-----																	
	190	200	210	220	230												
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL																	

ラニズマブ/ベバシズマブ Fab 軽鎖のアミノ酸配列																	
→V _L	10	20	30	40	50	60											
DIQLTQSPSSLASVGDRTTITCSASQDINSYLNWYQKPKAPKVLIFTSSLHSGVPS																	
-----M-----																	
	70	80	90	100	110	120											
RFGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYCQQYSTVPMTFCGCKVEIKRTVAAPSVFIFPP																	
-----Y部位-----G部位-----																	
	130	140	150	160	170	180											
SDEQLKSGTASVYCLLNIFYPREAKVQWKNVDNALQSGNSQESVTEGDSKOSTYSLSSTLT																	
-----G部位-----																	
	190	200	210														
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC																	
-----G部位-----																	

FIG. 1

【図2】

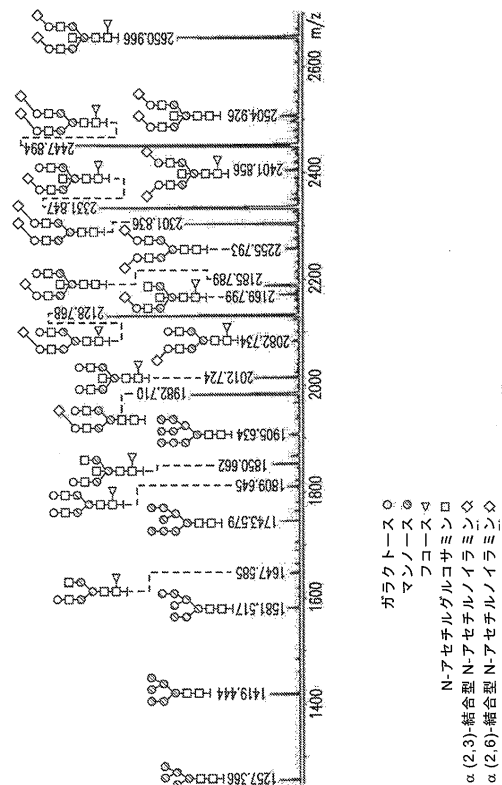


FIG. 2

30

40

50

【図 3】



【図 4】

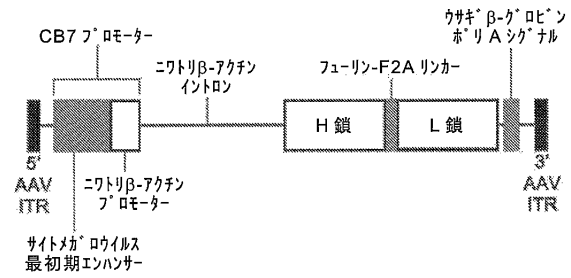


FIG. 4

10

20

【図 5】

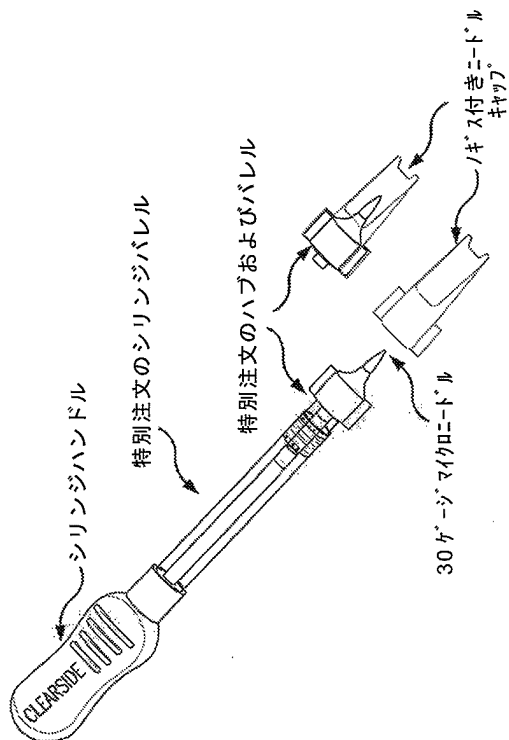


FIG. 5

【図 6】

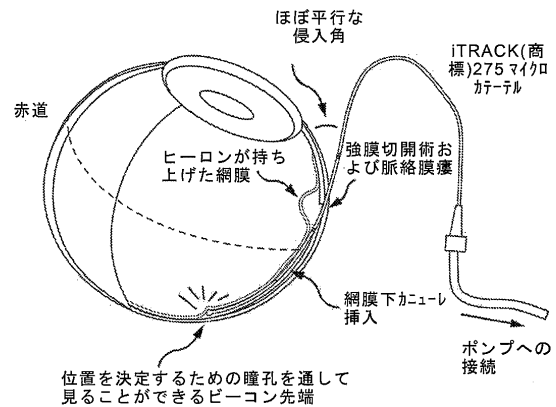


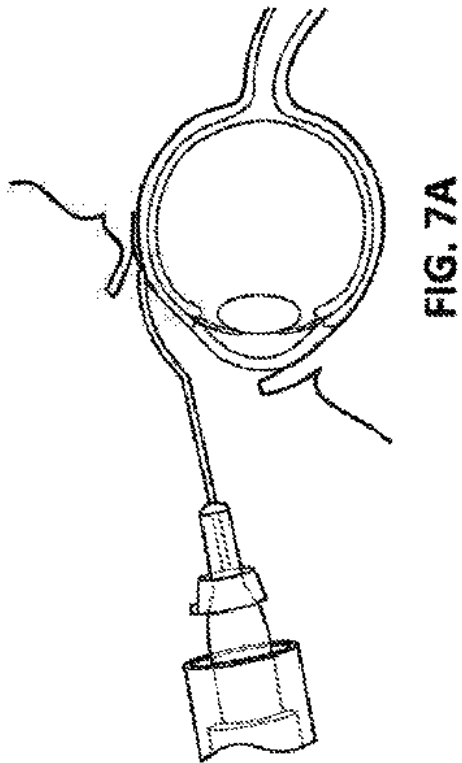
FIG. 6

30

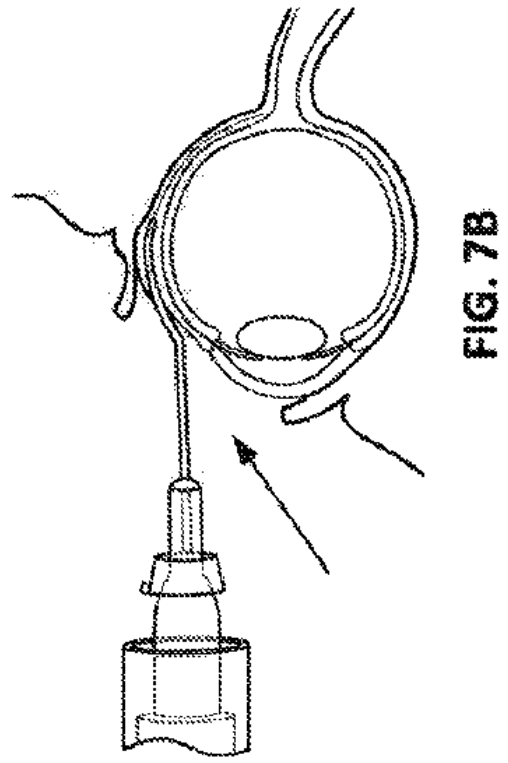
40

50

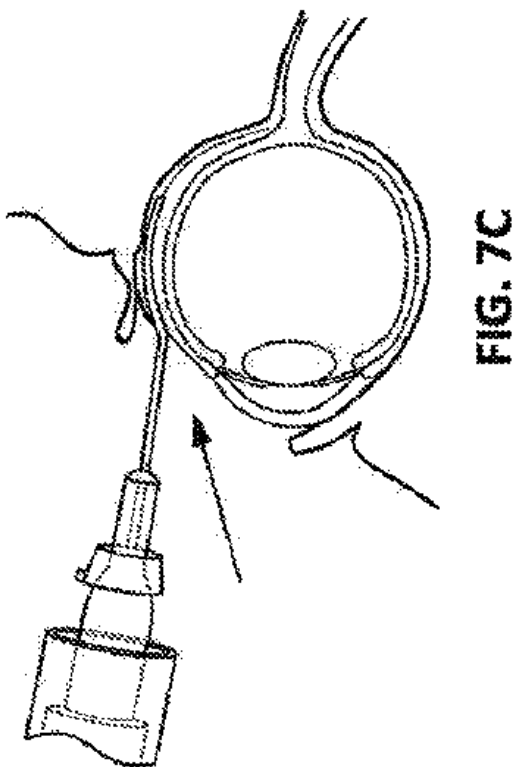
【図 7 A】



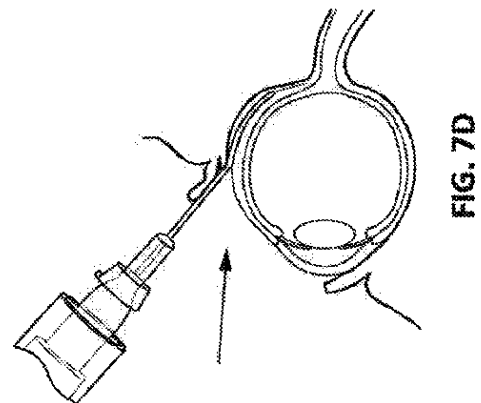
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】



10

20

30

40

50

【図 8 - 1】

VP1-756→

AAV1 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV2 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV3-3 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV4-4 MPDGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 59

AV5 MSFVDPHDPVLEGE-VGEGLKFLGLEAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 59

AAV6 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV7 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV8 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

hu31 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

hu32 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

AAV9 MAADGYLPWLENDLSEGIKRWNDLKPGAPKPKANQKQDGRGLVLPQYKLGPNGLD 60

SUBS -STVDPH-----ETVG-V-QFLK-CA-P-K-PARRK-DG-----K-----F-----

MP L D E V P QS

K G Q C A P K R

AAV1 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV2 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV3-3 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV4-4 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 119

AV5 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 119

AAV6 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV7 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV8 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

hu31 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

hu32 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV9 KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPLYLNHADAEPQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

SUBS R-----E-EV-R-----IS-NR-DS-----R-----QR-QD-----K-----

R R R AG

Q

VP2138→ HVB1-7

AAV1 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

AAV2 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

AAV3-3 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

AAV4-4 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 178

AV5 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 178

AAV6 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

AAV7 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 180

AAV8 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 180

hu31 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

hu32 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

AAV9 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTCQPPAKKRINFQGTGDS 179

SUBS -----V-F-----QGS-----TG-GIDDF-V-S-----S-T-KKQARTKSVPEDETG

I A S E

EV A ALIP Q T V T K E D K STSS S

R A

FIG. 8

【図 8 - 2】

HVR2-7 VP3203→

AAV1 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV2 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV3-3 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV4-4 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AV5 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV6 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV7 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV8 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

hu31 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

hu32 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

AAV9 ESVPD-RQRLGEFFATFAAGVETTMASGGGAPMADHNEAGAGVGNASGNHHCDSFWLGD 238

SUBS GDG-S-S-QUOCTSGTMASLDNEVRAAA-GAMCEGQ-----NA-----T-MECH

DA E S AQPATA AG ST S IV

I -- DT

TD S

SV3

AAV1 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 297

AAV2 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

AAV3-3 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

AAV4-4 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

AV5 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 297

AAV6 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 297

AAV7 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

AAV8 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

hu31 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

hu32 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

AAV9 VITSTRWALPTYNHLYKQIS-SAST-GASNNHNYFGYSTPWGTFDFNRFCHFSFPRW 296

SUBS -T-K-----V-S-----Q-RKLGSQSGSDATQA-T-----S-N-----

V E K AATTEGL S H

G V

E A

AAV1 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 357

AAV2 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 356

AAV3-3 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 356

AAV4-4 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 347

AV5 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 347

AAV6 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 357

AAV7 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 358

AAV8 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 359

hu31 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 358

hu32 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 358

AAV9 QRLINNNWGERPKRINFLKFLNIQKVEVTINDQVTTIANNLSTVQVFSGSYQLPYVLGS 358

SUBS -----M-RAMV-I-----VQSTT-----I-I-S-DE-----MDA

K S QSE S

S

FIG. 8 (continued)

【図 8 - 3】

HVR4

AAV1 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 414

AAV2 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 413

AAV3-3 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 413

AAV4-4 GQESLFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 407

AV5 GQESLFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 414

AAV6 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 414

AAV7 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 415

AAV8 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 416

hu31 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 415

hu32 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 415

AAV9 AHQGLPFPFADVFMIPQYCYLTLNG-----SQAVGRSSFYCLEYFPQMLRTGNFTTSY 415

SUBS GQO-S-A-PQ-TL-----CG-VND-----GNPTD-NA-F-----EIT-

T N V A T Q Q E S

R E S

HVR5

AAV1 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 473

AAV2 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 472

AAV3-3 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 472

AAV4-4 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 467

AV5 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 469

AAV6 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 473

AAV7 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 475

AAV8 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 475

hu31 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 473

hu32 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 473

AAV9 TFEVVFTHSYAHQSGLDRMLNPLIDQYLYLNRQT-NQSSAGNNDLFRSGSFAQSV 473

SUBS T-D-----MF-----A-V-----NGSP-OWTS-ADZKTP-POGAAATV

S E QS NHTPE TONSOWN NKUL QGYRD

N K V TG Q T AE L YRL TR L

A RG G GS E

ND

HVR6 HVR7 HVR8

AAV1 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

AAV2 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 527

AAV3-3 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

AAV4-4 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 527

AV5 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 514

AAV6 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

AAV7 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 530

AAV8 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 530

hu31 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

hu32 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

AAV9 QPKNWLEPGFCYQCGVSKTSDN-----NNSEHXTGASKYHNGRSLINPGLAMASHK 528

SUBS FAK-WL-----CIKT-GNGLSGG-----TG-DLKLKETHST-D-ASYQV-QPTGATG

TP F F F L KA V P TAG KIN W II I V

K F F L KA V P TAG KIN W II I V

S LD S H E A

T

FIG. 8 (continued)

【図 8 - 4】

HVR9

AAV1 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

AAV2 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 584

AAV3-3 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

AAV4-4 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 583

AV5 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 584

AAV6 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

AAV7 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 586

AAV8 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 587

hu31 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

hu32 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

AAV9 DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ 585

SUBS DDEKTFPMGVMIFGKESA-----GASTALD-NVHTDEELIATNPVATERFOTVAVFQ

DDK NN V TFS AK KTY L A R R NVF TWGN L

S I N N EI

N Y

HVR10

AAV1 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

AAV2 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 644

AAV3-3 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

AAV4-4 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 643

AV5 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 634

AAV6 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

AAV7 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 647

AAV8 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 647

hu31 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

hu32 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

AAV9 SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP 645

SUBS SSSTDPATGQVHMALEPGVWQDRDYVLQGPWAKIPHTDGNHFPSPLMGGFGLKHPFP

ASMTA ALADYTHM V N

QCTRD QT NH

Q V L

V S

HVR11

AAV1 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 705

AAV2 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 704

AAV3-3 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 705

AAV4-4 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 703

AV5 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 703

AAV6 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 706

AAV7 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 707

hu31 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 705

hu32 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 705

AAV9 QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY 705

SUBS QILIKNTVPANPFAEPAKASFTTQYSTGQSVLEIEMLOKNSKRNNHPEVQTSNY

MM-----G-IAAE-SDVFS-----QMD-IR-R-----V-----

F SET TAA FA

S PT

V QS

S

FIG. 8 (continued)

10

20

30

40

50

【 図 8 - 5 】

```

-----HVRI2-----
AAV1 AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL 736 (SEQ ID NO. 41)
AAV2 NKGVNVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRNL 735 (SEQ ID NO. 42)
AAV3-3 NKGVNVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRNL 736 (SEQ ID NO. 43)
AAV4-4 GQGNILLWPDAAKRYTEPRPIGTRYLTRNL 734 (SEQ ID NO. 44)
AV5 NDPQFVDFADSTCEYRTTNPPIGTRYLTRPL 724 (SEQ ID NO. 45)
AAV6 AKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL 736 (SEQ ID NO. 46)
AAV7 ERQTGVDFADSTCEYTEPRPIGTRYLTRNL 737 (SEQ ID NO. 47)
AAV8 YKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 738 (SEQ ID NO. 48)
hu31 YKGNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 736 (SEQ ID NO. 49)
hu32 YKGNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 736 (SEQ ID NO. 50)
AAV9 YKGNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL 736 (SEQ ID NO. 51)
SUBS GQGVSLWTPDAA-K-RTT-A-----HP-
      NDPQF D SSN E T H
      A TG NQ L
      E A T

```

FIG. 8 (continued)

【 図 9 A 】

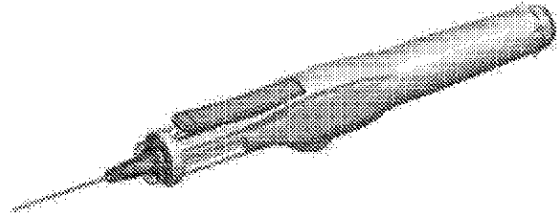


FIG. 9A

10

【 図 9 B 】

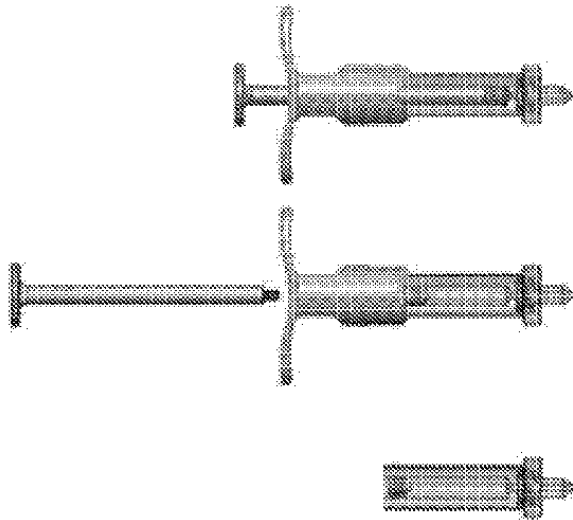
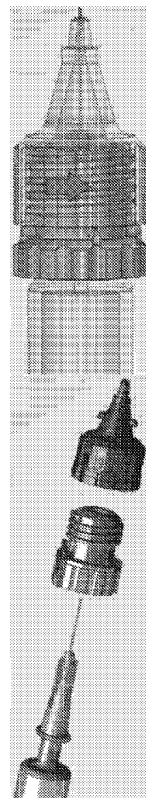


FIG. 9B

【 図 10 A 】



20

30

40

50

【図 10 B】

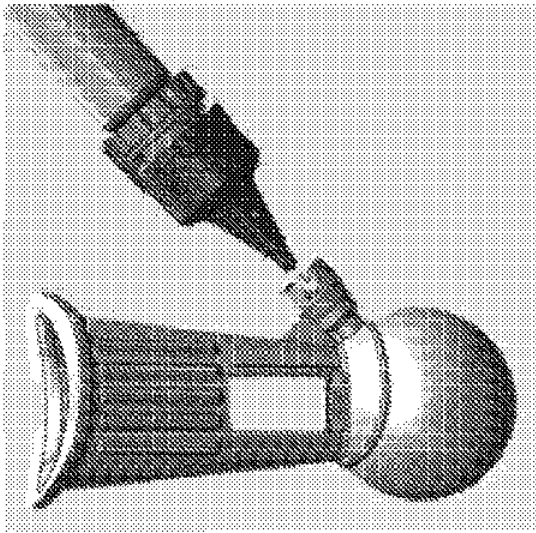


FIG. 10B

10

20

【配列表】

2022545967000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/047733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 A61P27/02 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) A61P 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, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/067540 A1 (REGENXBIO INC [US]; UNIV JOHNS HOPKINS [US]) 4 April 2019 (2019-04-04) the whole document	1-32
Y	WO 2017/181021 A1 (REGENXBIO INC [US]) 19 October 2017 (2017-10-19) the whole document	1-32
Y	WO 2019/079494 A1 (REGENXBIO INC [US]) 25 April 2019 (2019-04-25) the whole document	1-32
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 November 2020		08/12/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scheffzyk, Irmgard

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/047733

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019067540 A1	04-04-2019	AU 2018342094 A1 CA 3076905 A1 EP 3687464 A1 KR 20200060456 A SG 11202002396T A US 2020277364 A1 WO 2019067540 A1	02-04-2020 04-04-2019 05-08-2020 29-05-2020 29-04-2020 03-09-2020 04-04-2019
WO 2017181021 A1	19-10-2017	AU 2017250797 A1 CA 3019665 A1 EP 3442577 A1 JP 2019515027 A KR 20190003556 A SG 10202008378U A SG 11201808440Y A US 2019127455 A1 US 2019211091 A1 WO 2017181021 A1	25-10-2018 19-10-2017 20-02-2019 06-06-2019 09-01-2019 29-10-2020 30-10-2018 02-05-2019 11-07-2019 19-10-2017
WO 2019079494 A1	25-04-2019	AU 2018350990 A1 CA 3079565 A1 EP 3697449 A1 WO 2019079494 A1	21-05-2020 25-04-2019 26-08-2020 25-04-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 5/10	

(32)優先日 令和1年8月26日(2019.8.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. P L U R O N I C

2. i P a d

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 パコラ スティーヴン ジョセフ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 5 3 3 アービントン ルイス ロード 1 5

(72)発明者 ヴァン エヴェレン シェリ

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

(72)発明者 ヨー ジェシー アイ

アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 3 0 6 アトランタ ベルビュー ドライヴ ノースイースト 1 0 2 1

(72)発明者 パテル サミール マガンバイ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 0 2 2 コロンブス ガーフィールド コート 1 1

(72)発明者 ガーネカール アヴァンティ アーヴィンド

アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 3 0 1 8 セントルイス ラクリード アヴェニュー 4 4 2 4

(72)発明者 オベリー アンソニー レイ

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 1 クラークスバーグ レジーナ ドライヴ 2 2 5 1

(72)発明者 アーウィン・パック キム リース

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 9 ミルククリーク サウス モンテ ヴェルデ ドライヴ 3 4 8 1

(72)発明者 カーティス ダリン トーマス

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 4 ポトマック ウッド スラッシュ レーン 1 1 8 1 3

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C076 AA11 AA95 BB24 CC10 FF11 FF68

4C084 AA13 MA16 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33

4C085 AA13 AA14 DD62 EE01 GG10

F ターム (参考)	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA16 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33
	4C087	AA01 AA02 CA12 CA20 MA16 MA58 MA66 NA13 NA14 ZA33
	4H045	AA11 AA20 AA30 DA76 EA28 FA74