

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512121
(P2025-512121A)

(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全47頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2025-503026(P2025-503026)	(71)出願人	524365911	合肥星眸生物科技有限公司 Starrygene Therapeutics Co., Ltd. 中華人民共和国230031安徽省合肥市高新区望江西路5089号中国科学技术大学先進技術研究院嵌入式研發樓103-A6 Embedded R&D Building 103-A6, Institute of Advanced Technology, University of Science and Technology of China, 5089 Wangjiang West Road	
(86)(22)出願日	令和5年3月31日(2023.3.31)				
(85)翻訳文提出日	令和6年11月25日(2024.11.25)				
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/085610				
(87)国際公開番号	WO2023/186131				
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)				
(31)優先権主張番号	202210356939.6				
(32)優先日	令和4年4月2日(2022.4.2)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗 V E G F - A および抗 A n g - 2 二重特異性抗体をコードする A A V ベクター

(57)【要約】
二重特異性抗体、それをコードする核酸、その核酸を含む A A V ウイルスベクター、およびウイルス粒子が提供される。さらに、二重特異性抗体、それをコードする核酸、 A A V ウイルスベクター、またはウイルス粒子を含む医薬組成物が提供される。二重特異性抗体は、 V E G F - A および A N G - 2 に特異的な結合ドメインを含み、対象の湿性加齢黄斑変性または糖尿病黄斑浮腫の処置に用いられ得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 V E G F - A および抗 A N G - 2 結合ドメインを含む二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体の重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) が、N 末端から C 末端に向かって以下の順で配置されている、二重特異性抗体：

- 1) V H a n t i - V E G F - A - V L a n t i - V E G F - A - V H a n t i - A N G - 2 - V L a n t i - A N G - 2 ;
- 2) V L a n t i - A N G - 2 - V H a n t i - V E G F - A - V L a n t i - V E G F - A - V H a n t i - A N G - 2 ; または
- 3) V L a n t i - V E G F - A - V H a n t i - A N G - 2 - V L a n t i - A N G - 2 - V H a n t i - V E G F - A ;

ここで、V H a n t i - V E G F - A は、配列番号 1 に示される C D R 1、配列番号 2 に示される C D R 2、および配列番号 3 に示される C D R 3 を含み；

V L a n t i - V E G F - A は、配列番号 4 に示される C D R 1、配列番号 5 に示される C D R 2、および配列番号 6 または配列番号 4 7 に示される C D R 3 を含み；

V H a n t i - A N G - 2 は、配列番号 7 に示される C D R 1、配列番号 8 に示される C D R 2、および配列番号 9 に示される C D R 3 を含み；

V L a n t i - A N G - 2 は、配列番号 1 0 に示される C D R 1、配列番号 1 1 に示される C D R 2、および配列番号 1 2 に示される C D R 3 を含む。

【請求項 2】

V H a n t i - V E G F - A が、配列番号 1 3 に示される配列、または配列番号 1 3 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含み；

V L a n t i - V E G F - A が、配列番号 1 4 に示される配列、または配列番号 1 4 もしくは配列番号 4 8 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含み；

V H a n t i - A N G - 2 が、配列番号 1 5 に示される配列、または配列番号 1 5 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含み；

V L a n t i - A N G - 2 が、配列番号 1 6 に示される配列、または配列番号 1 6 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む、

請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

抗体が、配列番号 1 7、1 8、1 9、4 9、5 1 もしくは 5 3 に示される配列、または配列番号 1 7、1 8、1 9、4 9、5 1 もしくは 5 3 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4】

二重特異性抗体の N 末端がシグナルペプチド配列またはタグ配列を含み、好ましくはシグナルペプチド配列が配列番号 2 3 に示される C D 5 - s p シグナルペプチドである、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

抗体が、配列番号 2 0、2 1、2 2、5 0、5 2 もしくは 5 4 に示される配列、または配列番号 2 0、2 1、2 2、5 0、5 2 もしくは 5 4 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む、請求項 4 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 6】

重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) が (G 4 S) _n で連結されており、ここで n は 1 ~ 4 の何れかの整数である、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

二重特異性抗体の構造が、

V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S) 3 - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S) 3 - V L a n t i - A N G - 2 ;

V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S) 3 - V L a n t i

i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 ;
 V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S) 3 - V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A ;
 C D 5 - s p - V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S) 3 - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S) 3 - V L a n t i - A N G - 2 ;
 C D 5 - s p - V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S) 3 - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 ; または
 C D 5 - s p - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S) 3 - V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A

である、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする核酸配列。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする核酸配列を含むベクターであって、好ましくは A A V ウイルスベクターである、ベクター。

【請求項 10】

5' I T R および 3' I T R、プロモーター、ポリ A 配列をさらに含む、請求項 9 に記載の A A V ウイルスベクター。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の A A V ウイルスベクターおよびカプシドタンパク質を含む、A A V ウイルス粒子。

20

【請求項 12】

カプシドタンパク質の血清型が A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8 または A A V 9 である、請求項 11 に記載の A A V ウイルス粒子。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、請求項 8 に記載の核酸配列、請求項 9 または 10 に記載のベクター、請求項 11 または 12 に記載の A A V ウイルス粒子の少なくとも 1 つ、および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

癌、眼内新生血管症候群、関節リウマチ、乾癬、増殖性網膜症、加齢黄斑変性または糖尿病性黄斑浮腫を処置または予防するための医薬の製造における、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、請求項 8 に記載の核酸配列、請求項 9 または 10 に記載のベクター、請求項 11 または 12 に記載の A A V ウイルス粒子あるいは請求項 13 に記載の医薬組成物の使用。

30

【請求項 15】

加齢黄斑変性が湿性加齢黄斑変性である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

医薬組成物が硝子体内注射、網膜下注射または脈絡膜上注射により投与される、請求項 14 または 15 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、免疫学および遺伝子送達分野に関する。より詳細には、本出願は、抗体などの目的のタンパク質を産生するための組成物、システムおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

加齢黄斑変性 (A M D) は、様々な要因によって引き起こされる加齢黄斑疾患である。その共通の特徴は、黄斑部網膜および網膜色素上皮および脈絡膜の病変であり、患者の視

50

機能障害および中心視力の進行性低下を引き起こす。中国および世界におけるAMDの有病率は加齢とともに増加しており、AMDは50歳以上における不可逆的な視力障害の主な原因の一つである。人口の高齢化に伴い、AMD患者は2040年までに2億8800万人に達すると予想されている。AMDの臨床的分類には統一基準がない。現在、国内外ともにまず病期分類を行い、後期は乾性（萎縮型）および新生血管性（滲出型、湿潤型）の2つに分類される傾向にあり、中でも新生血管性加齢黄斑変性（nAMD）は湿性加齢黄斑変性（wAMD）とも呼ばれ、視力低下を引き起こす主な臨床病型であり、黄斑部に脈絡膜新生血管（CNV）が出現し、黄斑部に出血および滲出が生じることが主な特徴である。糖尿病黄斑浮腫（DME）は現在、欧米先進国では失明の重要な原因の一つであるが、中国では生活水準の向上と人口の高齢化に伴い、DMEの有病率が徐々に増加しており、患者の視機能と生活の質に深刻な影響を及ぼしている。

10

【0003】

血管内皮増殖因子（VEGF）は、wAMDおよびDMEの発症における最も重要な因子の一つであり、血管内皮細胞に特異的に作用し、血管内皮細胞の増殖を促進し、新生血管の形成を誘導し、血管漏出を増加させる。現在、VEGFの発現を阻害することにより、血管の再構築を誘導し、未熟な新生血管の退縮を促進することが判明している。したがって、VEGFはwAMDおよびDMEに対する有望な治療標的である。2006年のラニズマブに代表される抗VEGF薬の出現以来、抗VEGF薬はwAMDおよびDMEの処置に広く用いられてきた。最近10年間で、複数の抗VEGF治療薬の同時適用により、wAMDおよびDMEによる不可逆的失明は大幅に減少した。

20

【0004】

臨床におけるVEGF標的薬の進歩は目覚ましく、血管漏出および浮腫の程度を著しく減少させ、視力を改善し、重篤な合併症は見つかっていないが、体内に注入されたこれらのタンパク質薬剤は代謝により急速に消失するため、治療効果を維持するためには複数回の眼内注射が必要である。長期投与は患者の経済的負担を増大させ、繰り返し注射は患者の苦痛と副作用の可能性を増大させ、常套投与から低頻度投与に変更する際にある程度の視力低下が生じ、治療後に再発しやすい患者もいる。wAMDおよびDMEに対する既存の治療法の限界に対応して、当技術分野では、より経済的で、より持続的で、より効果的な治療戦略が必要とされている。

【0005】

30

本発明は、抗VEGF-Aおよび抗ANG-2遺伝子治療を提供することを目的とする。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、抗VEGF-Aおよび抗ANG-2結合ドメインを含む二重特異性抗体を提供し、この二重特異性抗体は、好ましくはタンデム一本鎖抗体分子（タンデムscFv、ta-scFv）であり、この二重特異性抗体の重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）は、N末端からC末端に向かって以下の順で配置されている：

- 1) VH_{anti-VEGF-A} - VL_{anti-VEGF-A} - VH_{anti-ANG-2} - VL_{anti-ANG-2}；
- 2) VL_{anti-ANG-2} - VH_{anti-VEGF-A} - VL_{anti-VEGF-A} - VH_{anti-ANG-2}；または、
- 3) VL_{anti-VEGF-A} - VH_{anti-ANG-2} - VL_{anti-ANG-2} - VH_{anti-VEGF-A}；

40

ここで、VH_{anti-VEGF-A}は、配列番号1に示されるCDR1、配列番号2に示されるCDR2、および配列番号3に示されるCDR3を含む；

VL_{anti-VEGF-A}は、配列番号4に示されるCDR1、配列番号5に示されるCDR2、および配列番号6または配列番号47に示されるCDR3を含む；

VH_{anti-ANG-2}は、配列番号7に示されるCDR1、配列番号8に示されるCDR2、および配列番号9に示されるCDR3を含む；

50

V L a n t i - A N G - 2 は、配列番号 1 0 に示される C D R 1、配列番号 1 1 に示される C D R 2、および配列番号 1 2 に示される C D R 3 を含む。

【 0 0 0 7 】

一態様において、V H a n t i - V E G F - A は、配列番号 1 3 に示される配列、または配列番号 1 3 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む；

V L a n t i - V E G F - A は、配列番号 1 4 に示される配列、または配列番号 1 4 もしくは配列番号 4 8 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む；

V H a n t i - A N G - 2 は、配列番号 1 5 に示される配列、または配列番号 1 5 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む； 10

V L a n t i - A N G - 2 は、配列番号 1 6 に示される配列、または配列番号 1 6 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む。

【 0 0 0 8 】

一態様において、抗体は、配列番号 1 7、1 8、1 9、4 9、5 1 もしくは 5 3 に示される配列、または配列番号 1 7、1 8、1 9、4 9、5 1 もしくは 5 3 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む。

【 0 0 0 9 】

一態様において、二重特異性抗体構築物の N 末端は、シグナルペプチド配列またはタグ配列を含み、好ましくは、シグナルペプチド配列は、配列番号 2 3 に示される配列を含む C D 5 - s p シグナルペプチドである。 20

【 0 0 1 0 】

一態様において、抗体は、配列番号 2 0、2 1、2 2、5 0、5 2 もしくは 5 4 に示される配列、または配列番号 2 0、2 1、2 2、5 0、5 2 もしくは 5 4 の配列と 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列を含む。

【 0 0 1 1 】

一態様において、重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) は、(G 4 S) _n (ここで n は、1 以上の整数、好ましくは 1 ~ 4 の何れかの整数である)、例えば G 4 S、(G 4 S)₂、(G 4 S)₃ または (G 4 S)₄ により作動可能に連結されており、例えば、 30

1) V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S)_{m+X} - V L a n t i - V E G F - A - (G 4 S)_m - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)_{m+X} - V L a n t i - A N G - 2 ; ここで、m 1、X 2 である、好ましくは、V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S)₃ - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)₃ - V L a n t i - A N G - 2 ;

2) V L a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)_m - V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S)_{m+X} - V L a n t i - V E G F - A - (G 4 S)_m - V H a n t i - A N G - 2、ここで m 1、X 2 である、好ましくは V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A - (G 4 S)₃ - V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 ; または

3) V L a n t i - V E G F - A - (G 4 S)_m - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)_{m+X} - V L a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)_m - V H a n t i - V E G F - A、ここで m 1、X 2 である、好ましくは V L a n t i - V E G F - A - G 4 S - V H a n t i - A N G - 2 - (G 4 S)₃ - V L a n t i - A N G - 2 - G 4 S - V H a n t i - V E G F - A。 40

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明は、上記のような二重特異性抗体をコードする核酸配列を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、二重特異性抗体をコードする核酸配列を含むベクターを提供する。

【 0 0 1 4 】

一態様において、ベクターは好ましくは A A V ウイルスである。

【 0 0 1 5 】

一態様において、AAVウイルスベクターは、5' ITRおよび3' ITR、プロモーター、およびポリA配列をさらに含む。

【0016】

別の態様において、本発明は、上記のようなAAVウイルスベクターのいずれか、およびカプシドタンパク質を含み、好ましくはカプシドタンパク質の血清型がAAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8またはAAV9である、AAVウイルス粒子を提供する。

【0017】

本発明は、二重特異性抗体、核酸配列、上記のAAVウイルスベクターおよび上記のAAVウイルス粒子のようなベクター、ならびに薬学的に許容される担体の少なくとも1つを含む医薬組成物を提供する。 10

【0018】

本発明は、癌、眼内新生血管症候群、関節リウマチ、乾癬、増殖性網膜症、加齢黄斑変性症または糖尿病性黄斑浮腫を処置または予防するための医薬の製造における、二重特異性抗体、核酸配列、上記のようなAAVウイルスベクター、上記のようなAAV粒子などのベクター、または上記のような医薬組成物の使用を提供する。

【0019】

一態様において、加齢黄斑変性は湿性加齢黄斑変性である。

【0020】

特定の態様において、医薬は、硝子体内注射または網膜下注射によって投与される。 20

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、XMV A01、XMV A04およびXMV A09の概略構造図である。

【図2】図2は、pAAV9-XMV A09、ssAAV-XMV A09のベクター情報を示す。

【図3】図3は、pAAV9-XMV A01ベクター、pAAV9-XMV A04ベクターおよびpAAV9-XMV A09ベクターによるトランスフェクション後の細胞におけるVEGF165中和タンパク質の発現レベルを示す。

【図4】図4は、ECGS刺激下でのヒト網膜微小血管内皮細胞(HRM EC)の増殖に対する、細胞内でのXMV A01、XMV A04およびXMV A09の発現の効果を示す。 30

【図5】図5は、XMV A01、XMV A04およびXMV A09の細胞内発現がHRM ECのチューブ形成に及ぼす影響を示す。

【図6】図6は、XMV A01、XMV A04およびXMV A09の細胞内発現がHRM ECのチューブ形成に及ぼす影響を示す。

【図7】図7は、XMV A10の概略構造図を示す。

【図8】図8は、XMV A11の概略構造図を示す。

【図9】図9は、XMV A13の概略構造図を示す。

【図10】図10は、XMV A14の概略構造図を示す。

【図11】図11はXMV A15の概略構造図を示す。 40

【図12】図12は、AAV-XMV A09の注射後のレーザー誘発wAMDモデルマウスのフルオレセイン眼底血管造影(FFA)画像を示す。

【図13】図13は、レーザー誘発wAMDモデルマウスにAAV-XMV A09を注射した後の、グレード3の光斑の割合および漏出光斑の平均スコアを示す。

【図14】図14は、レーザー誘発wAMDモデルアカゲザル対照群におけるグレードIVの光斑数および蛍光漏出面積の変化を示す。

【図15】図15は、AAV-XMV A09を注射したレーザー誘発wAMDモデルアカゲザルにおけるグレードIV光点数および蛍光漏出面積の変化を示す。

【図16】図16は、レーザー誘発性wAMDモデルアカゲザル対照群におけるグレードIV光斑の網膜厚の変化を示す。 50

【図 17】図 17 は、AAV - XMVA09 を注射したレーザー誘発性 wAMD モデルアカゲザルにおけるグレード IV の光斑の網膜厚さの変化を示す。

【図 18】図 18 は、高グルコース誘導 HRMEC の透過性の変化を示す。

【図 19】図 19 は、VE - カドヘリンインジケーターに基づく、HRMEC の透過性に対する XMVA09 の調節効果を示す。

【図 20】図 20 は、ビオチン - アビジン系指標に基づく HRMEC の透過性に対する XMVA09 の調節効果を示す。

【図 21】図 21 は、糖尿病モデルマウスにおける空腹時血糖および体重のモニタリング解析を示す。

【図 22】図 22 は、糖尿病モデルマウスにおける網膜血管漏出の画像を示す。

10

【図 23】図 23 は、糖尿病モデルマウスにおける AAV - XMVA09 注射後の網膜血管漏出領域の変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明を態様に従って、添付図面と共に以下に詳細に説明する。本発明の上記観点およびその他の観点は、以下の詳細な説明において明らかになり得る。本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【0023】

本発明における抗体は多重特異性であり、ヒト化抗体、一本鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え抗体、ヘテロ抗体、変異抗体、および移植抗体であり得る；本発明における抗体フォーマットは、抗体軽鎖可変領域 (VL) および抗体重鎖可変領域 (VH) によってスプライシングされた scFv であり、抗体は VEGF - A および ANG - 2 のような 2 つの異なる抗原に結合することができる。

20

【0024】

抗体軽鎖可変領域 (VL) および抗体重鎖可変領域 (VH) は、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変領域と、フレームワーク領域 (FWR) と呼ばれる保存領域とにさらに細分化される。本明細書に記載される抗体および抗原結合フラグメントの CDR は、Kabat 番号付けによって定義または同定される。一態様では、各 VH および VL は一般的に、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序で配置された 3 つの CDR および 4 つの FWR を含む：FWR 1、CDR 1、FWR 2、CDR 2、FWR 3、CDR 3、FWR 4。本明細書に記載される抗体および抗原結合フラグメントの CDR は、Kabat 番号付けによって定義または認識される。

30

【0025】

本明細書において“ベクター”とは、発現させるヌクレオチド配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを意味する。

【0026】

以下の実施例における試験方法は、他にこれと異なる記載がされない限り、すべて上等の方法である。

【実施例】

【0027】

実施例 1 . プラスミドベクターの構築

抗 VEGF - A / 抗 ANG - 2 遺伝子を発現する AAV ベクタープラスミドの構築

抗 VEGF の VH アミノ酸配列と VL アミノ酸配列、抗 ANG - 2 の VH アミノ酸配列と VL アミノ酸配列をそれぞれ (G4S)₃、G4S、(G4S)₃ ペプチドリナーで連結された、CD5 - sp - VH anti - VEGF - A - (G4S)₃ - VL anti - VEGF - A - G4S - VH anti - ANG - 2 - (G4S)₃ - VL anti - ANG - 2 の構造を有するオープンリーディングフレームを形成するために、分泌シグナルペプチド CD5 - sp ヌクレオチド配列を N 末端に付加した；ヌクレオチド配列は、ヒトのコドン優先 (preference) に従って設計され、5' 末端に BamH I 切断部位が導入され、3' 末端に EcoR V 切断部位が導入され、表 1 および表 2 のそれぞれの配列に従って構築され

40

50

、X M V A 0 1、X M V A 0 4 および X M V A 0 9 と命名された（全長遺伝子は N a n j i n g G e n S c r i p t B i o t e c h C o r p o r a t i o n によって合成された）。それらの構造の模式図を図 1 に示す。

【 0 0 2 8 】

上記の構築物および p A A V 9 _{n e o} - C A G プラスミドを B a m H I / E c o R V で二重に消化し、ライゲーション、形質転換、クローニングスクリーニングおよび同定などの通常の分子生物学的操作により、p A A V 9 - X M V A 0 1 ベクター、p A A V 9 - X M V A 0 4 ベクターおよび p A A V 9 - X M V A 0 9 ベクターをそれぞれ構築した； p A A V 9 - X M V A 0 9 ベクターの情報を図 2 A に示す。エンドトキシンを含まないプラスミド抽出キット（M N）を用いて、後で使用するための高品質のプラスミド D N A を得た。

10

【 0 0 2 9 】

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. XMVA09 の配列情報

製品番号	配列情報	アミノ酸配列		DNA 配列	
XMVA09	VH _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR1}	DYWIH	SEQ ID NO: 1	gactactggaticac	SEQ ID NO: 24
	VH _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR2}	GITPAGGYTYADS VKG	SEQ ID NO: 2	ggaatcaccocagcaggaggtacacatactatgccacacgtgaagggc	SEQ ID NO: 25
	VH _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR3}	FVFFLPYAMDY	SEQ ID NO: 3	ttcgtgttcttcctgccatagccatggattat	SEQ ID NO: 26
	VH _{anti-VEGF-λ(G6-23)}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 13	gagggtgcagctgggtggagagcggaggaggactgggtgcagccaagggtcctcctgggtgtgtgtgcccagcagcgtttaccatctccgactactggattcactgggtgagacaggcacctggcaagggaatggagtggtggcagaatcaccocagcaggaggtacacatactatgccacacgtgaagggtccgttcaccatctcggccgatactctaaagaacacagccctatctgcagatgaactcctcggggccgaaggacacagccgtgtactattgcgcagattcgtgttcttctgccatccgcatggattattggggccaggccacctggtagacagtggctcc	SEQ ID NO: 27
	VL _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR1}	RASQDVSTAVA	SEQ ID NO: 4	agagcaagccaggacgtgagcaccgcagtggca	SEQ ID NO: 28
	VL _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR2}	SASFLYS	SEQ ID NO: 5	tccgcctcttctgtattct	SEQ ID NO: 29
	VL _{anti-VEGF-λ(G6-23)-CDR3}	KQGYANPWT	SEQ ID NO: 6	aagcagggtctatgccaatccatggacc	SEQ ID NO: 30
	VL _{anti-VEGF-λ(G6-23)}	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSDFTLTITISLQPEDFATYYCKQGYANPWTFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO: 14	gatattcagatgacacagtcctccatctagcctgtctgccacgtgggcgacaggggtgaccatcacatgtagagcaagccaggacgtgagcaccgcagtgccatggtaccagcagaagcctggcaaggccccaagctgtgtactactcgcctcttctgtattctgtgccgtgccaaagcaggttttagcgggtccggtctggaaccgacttcacctgacatctcctctcgcagcctgaggattttgcccatactattgcaagcagggtctatgccaatccatggaccttcggccagggcacaaagggtgagatcaaggagg	SEQ ID NO: 31
	VH _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR1}	NYGMH	SEQ ID NO: 7	aactatggaaatgcac	SEQ ID NO: 32
	VH _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR2}	VISHDGNKYYVD SVKG	SEQ ID NO: 8	gtgatcagccacgaaggcaacaacagttactacgtggacacgtgaagggc	SEQ ID NO: 33
	VH _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR3}	EGIDFWSGLNWFD P	SEQ ID NO: 9	gagggtcatcgacttttggagcggcctgaattggttcgacct	SEQ ID NO: 34
	VH _{anti-ANG-λ(3.19.3)}	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFTNYGMHWGRQAPGKLEWVAVISHDGNNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIDFWSGLNWFDPWGQGLTVTVSSA	SEQ ID NO: 15	cagggtgcagctgggtgaatctgtgtggcggagtgtgcagcctggcagaagcctgagactgtgtgtgtccgcagcggcttcacctcaaccaactatggaatgcactggggcagacaggccctggcaaggacttgaatgggtcgggtgatcagccagcagggcaacaacaagtactactgtggacagcgtgaagggtcagattcaccatcagccgggacaacagcaagaacacccgtgacctgcagatgaacagcctgagagccgaaggacaccgggtgtactattgtgccagagaggcatcgactttggagcggcctgaattggttgaccttgggagaggcaccctggttacagtttcttctgcc	SEQ ID NO: 35
	VL _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR1}	RASQITGSYLA	SEQ ID NO: 10	agagccagccagagcatcaccggctcttaactggct	SEQ ID NO: 36
	VL _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR2}	GASSWAT	SEQ ID NO: 11	ggcgccctcttcttgggccacc	SEQ ID NO: 37
	VL _{anti-ANG-λ(3.19.3)-CDR3}	QQYSSSPIT	SEQ ID NO: 12	cagcagtacagcagcagcccatcacc	SEQ ID NO: 38

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

VL anti-ANG-2(3.19.3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI TGSYLAWYQQKPGQAPRLICGASSWA TGIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYSSSPITF GQGTRLEIKR	SEQ ID NO : 16	gagatcgtgctgacacagagccctggcacactgctactgtctcca ggcgaagagccacactgagctgtagagccagccagagcatca ccggctcttaccctggctgtatcagcagaagccctggacagggccc ctagactgctgatttggcgctctctcttgggccaacggcattccc gatagatttctggcagcggctccggcagcttccctgacaa tcagcagactggaaacccagggaacttcccggttactactgcagc agtacagcagcagcccccattacccttggcaggggcacaagactg gaatcaagcggg	SEQ ID NO : 39
VH anti-VEGF-A ⁺ (G4S) ₃ -VL anti-VEGF-A ⁻ G4S-VH anti-ANG-2 ⁺ (G4S) ₃ -VL anti-ANG-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGLTVTVSSGGGSGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSAFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCKQGYANPWTFGQGTIKVEIKRGGGSGSQVQLVESGGGVVQPGRLSLRISCAASGFTFTNYGMHWGRQAPGKGLEWVAVIDHGNKKYYVDSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARFIDFWGLNWFDPWGQGLTVTVSSAGGGSGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQITGSYLAWYQQKPGQAPRLICGASSWATGIPDRFSGSGTDFLTITISRLEPEDFAVYYCQYYSSSPITFGQGTRL EIKR	SEQ ID NO : 17	gagggtgcagctgggtggagagcggagaggagctgggtgcagcca ggaggtccctcgcgctgtcttgcgcgcagcggctttaccatct ccgactactggatcactgggtggagacaggcaactggcaaggga ctggagtgggtggcaggaaatcccccagcagggtgtacacata ctatgccgacagcgtgaaggccgggttaccatctccgcgatac cttaagaacacagccatctgcagatgaactccctgcggccga ggacacagccgtgtactattgcgcagatctggttcttctccat acgccatgattattggggccagggccacccctgggtgacagtgcct ccgggtggaggtggctccgggtgggtggcagcgggtgggtgcg gctctgatactcagatgacacagtcctccatctagctgtctgcagc gtggggcagcagggtgacatcactatgtagcagaagccagggacg tgagcaccgcagtgcatgtgtaccagcagaagccctggcaaggc cccaagctgctgtactactcgcctcttctgtattctggcggtgcc nagcaggtttagcgggtccggatgtggaaacgacttaccctgtac aatctctctctgcagccctgagcatttggcacatactattgcaagc agggtctatgccaaatccatggacttgcgcagggcacaagggtg gagatcaaggaggcggcggagggcgtctcaggtgcagctgtgtg aatctgggtggcgggtgtgagcagcctggcagaagcctgagactgt ctgtgcccgcagcggcttccacttccacaaactatggaatgcactg gggcagacagggccctggcaaggacttgaatgggtgcgggtg atcagccacagcggcacaacaagactactgtagacagcgtgaa gggcagattaccatcagccgggacaacagcagaacacccctgt acctgcagatgaacagcctgagagccggagacaccgccgtgta ctattgtccagagaggcagcactttggagcggcctgaattgg ttgaccccttgggacagggcaccctgttacaagtcttctgtccg gtggaggtggctccgggtggcgtggcagcggcgggtggcgtc tgagatgtgtgacacagagccctggcactgttactgtctcca ggcgaagagccacactgagctgttagagccagccagagcatca ccggctcttaccctgtgtgatacagcagaagccctggacagggccc ctagactgctgatttggcgcctcttcttgggccaacggcattccc gatagatttctggcagcgggtccggcagcagcttccactgacaa tcagcagactggaacccagggaacttcccggttactactgcagc agtacagcagcagcccccattacccttggcaggggcacaagactg gaatcaagcggg	SEQ ID NO : 40
CD5-sp-VH anti-VEGF-A ⁺ (G4S) ₃ -VL anti-VEGF-A ⁻ G4S-VH anti-ANG-2 ⁺ (G4S) ₃ -VL anti-ANG-2	MPMGSLOPLATLYLLGMLVASCLGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGLTVTVSSGGGSGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSAFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCKQGYANPWTFGQGTIKVEIKRGGGSGSQVQLVESGGGVVQPGRLSLRISCAASGFTFTNYGMHWGRQAPGKGLEWVAVIDHGNKKYYVDSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARFIDFWGLNWFDPWGQGLTVTVSSAGGGSGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQITGSYLAWYQQKPGQAPRLICGASSWATGIPDRFSGSGTDFLTITISRLEPEDFAVYYCQYYSSSPITFGQGTRL EIKR	SEQ ID NO : 20	atgccaatgggggtccctacacccctggcacaactatctgtctag gtatgctcgtggcctcctgttttaggagaggtgcagctgtgtgaga ggcggaggaggaactgtgtcagccaggaggcctcctgcggctgtc ttgcgccgccagcggctttaccatctccgactactggaattcactgg gtgagacagggcaccctggcagaaggactggagtggtggcaggaa tccccagcaggggtgacacatactatgcccagacgcgtgaag ggcgggttaccatctcggcgatacctctaaagaacacagcctatc tgcatgtaactcctcggcgccagacacagccgtgtactatt ggccagattcgtgttcttctgcatacggcattgatttggggc cagggcaccctgggtgacagtgcctccgtggagggtgctcgg gtggcgggtggcagcggcgggtggcggctgtgatattcagatgaca cagtcctccatctagcctgtctgcagcgtggcgacaggggtgac catcatatgtagcagaagccaggagctgagcaccgcagtgcat gttaccagcagaagcctggcagaagccccaagctgtgtatctac tccgctcttctgtattctgtgtgctgccaagcagggtttagcgggtc cggatctggaacgacttccacttgcacaaatctctctgcagcct gaggatttggcacatactattgcaagcagggtctatgccaatccat ggaccttggcagggcacaagaagggtgagatcaagaggggcgg gagggggctctcaggtgcagctgtgtgaatctgtgtggcgggttg tcagccctggcagaagcctgagactgtgtgtgtccggcagcggct tcacttccacaaactatggaatgcactggggcagacagcggcctg gcaaggacttgaatgggtcgggtgacacccacgacggcaac aacaagtactactgtgacagcgtgaaggcagattccattcag ccgggacacagcagaagacacctgtgacttgcagatgaacagc	SEQ ID NO : 41

10

20

30

40

50

【 表 1 - 3 】

		EWVAVISHDGNNK YYVDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR EGIDFWSLNWF PWGQGTTLVTSSA GGGSGGGSGG GGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRA SQSITGSYLAWYQ QKPGQAPRLICG ASSWATGIPDRFSG SGSGTDFTLISRLE PEDFAVYYCQQYS SSPITFGQGRLEIK R		ctgagagccgaggacaccgctgtactattgtccagagaggg catcgacttttgagcggcctgaattggtcgaccctggggacag ggcaccctgggtacagtttcttgcgggtgaggtggctcgggtg gcggtggcagcggcgggtggcggctctgagatcgctgacaca gagccctggcacactgtcactgtctccaggcgaaagagccacac tgagctgtagagccagccagagcatcaccggctcttaccctggctt ggatcagcagaagcctggacaggeccctagactgtgatfllgtg gcgcctcttcttgggccaccggcattcccgatagatttctggcagc ggctcgggeaccgacttcaacctgacaatcagcagactggaaacc cgaggactcgcctgtactactgccagcagtacagcagcagcc ccatcacccttggccaggggcacagactggaatcaagcggg	
-	CD5-sp signal peptide	MPMGSLOPLATLY LLGMLVASCLG	SEQ ID NO : 23	atgccaatgggggtccctacaacccctggcaacactatatctgctag gtatgtctgtggcctcctgttttagga	SEQ ID NO : 42

10

【 0 0 3 0 】

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2. XMVA01 および XMVA04 の配列情報

製品番号	配列情報	AA 配列	DNA 配列
XMVA01	VH _{anti-VEGF-A}	EVQLVESGGGLVQPQGS RLSCTASGFS LD YYMT WVRQAPGKGLEWVGFID <u>PDDDPYYATWAKGRFTIS</u> RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAGGDHNSGWG <u>LDIWGQGTLTVSS</u>	gagggtgcagctgggtgaatctggcggaggactgggtcagcctggcggatctctgagactg agctgtaccggccagcggcttcagcctgaccgactactactacatgacctgggtccgacag gccccctggcaaggactgagtggtgctgggtatcagaccggacgacgatcttactac gceacatgggccaaggcagattaccatcagccgggacaacagcaagaacacctgt acctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtgtactattgtccggcgga gatcacaatagcggctggggtgctgatatgttggggccagggaacactgtgacccgtgtct agt
	VL _{anti-VEGF-A}	EIVMTQSPSTLSASVGD VIITCQASEIIHSWLA WYQKPGKAPKLLIYLA STLASGVPSRFSGSGS GAFTLTISLQPD DFATYYCQNVY LASTNGANFQG TKLTVLG	gagatcgtgatgacacagagccccagcacactgtctgccagcgtgggagacagagtgat catcacatgccaggccagcgagatcatccacagctggctgtggtatcagcagaagc ctggcaaggccccctaaagctgtgatctaccgtgctctacactggccagcggagtgcct gcagatttctgtgctctggaictggcggcaggttaccctgaccatcagtagcctgcagcct gacgacttgcacactactactgccaagctgtgactgtgccagcaccacggcgccaa tttggccaggggcaccgaagctgacagtgctggga
	VH _{anti-ANG-2}	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFTGYYM HWVRQAPGQGLEWMGW <u>INPNSGGTNYAQKFQGRV</u> TMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCAR <u>SPNPYYDSSGYYYPGAFDIWGQGT</u> MVTVSS	cagggtcagctgggtcagctctggcggcgaagtgaagaacctggcgcctctgtgaagggt tctgtcaaggccagcggctacacctttaccgctactacatgactgggtccgacagcgt ccaggacagggacttgaatggatggctggatcaacccaatagcggcgccaccaatfa cgcccaaaattccagggcagagtaccatgaccagagacaccagcatcagcagccgc tactgtgaactgagccggctgagatccgatgacaccgctgtactactgcgcagatct cccaactctactactacacagcagcgggttactactaccaggcgcccttgatatttggg gcaggggcacaatgtgacccgtgtctagt
	VL _{anti-ANG-2}	SYVLTPPPSVSVAPGQTAR ITCGGNNGSKSVHWYQ KPGQAPVLVYDDSDRPS GIPERFSGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDS <u>SSDHWVFGGGTKLTVL</u>	agctacgtgtgacacagcctccatccgtgtctgtggctccaggacagaccgcagaalc acatgcggcgggcaacaacatcgccagcnaagagctgtgactgttatcagcagaacctg gacaggtctctgtgtgtgtgtgtacgacgacagcgatagacctagcggcatcccgag agattcagcggcagcaatccggccaalaccgccactgaccatcagcagagtggaagc tggcgacgagggccgactactactgccaagtgtgggacagcagcagcaccactgggtt tcggcgaggccacaagaagctgacagtgctg
	VH _{anti-VEGF-A} - (G4S)-VL _{anti- VEGF-A} -G4S- VH _{anti-ANG-2} - (G4S)-VL _{anti- ANG-2}	EVQLVESGGGLVQPQGS RLSCTASGFS LD YYMT WVRQAPGKGLEWVGFID PDDDPYYATWAKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAGGDHNSGWG LDIWGQGTLTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSEIVMTQS PSTLSASVGDRIITCQAS EIIHSWLA WYQKPGKAPKLLIYLA STLASGVPSRFS GSGSGAEFTLTISLQPD FATYYCQNVYLASTNGA NFGQGT KLTVLG GGGGSG QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFTGYYM HWVRQAPGQGLEWMGW INPNSGGTNYAQKFQGRV TMTRDTSISTAYMEL SRLR	gagggtgcagctgggtgaatctggcggaggactgggtcagcctggcggatctctgagactg agctgtaccggccagcggcttcagcctgaccgactactactacatgacctgggtccgacag gccccctggcaaggactgagtggtgctgggtatcagaccggacgacgatcttactac gceacatgggccaaggcagattaccatcagccgggacaacagcaagaacacctgt acctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtgtactattgtccggcgga gatcacaatagcggctggggtgctgatatgttggggccagggaacactgtgacccgtgtct agtgtgtggaggtggctccgtggcgggtggcagcggcggtgtgctgtgagatcgtga tgacacagagccccagcacactgtctgccagcgtggggagacagagtgatcatcacatgc caggccagcgagatcatccacagctggctgtggtatcagcagaacctggcaaggc ccctaagctgtgtatctactgtgctctacactggccagcggagtgcttagcagatttctg gctctgtatctggcggcaggttaccctgaccatcagtagcctgcagcctgacgacttgc cacctactactgcagaacgtgtactgtgccagcaccacggcgccaatttggccagggg caccaagctgacagtgctgggagggcgagggggtctcaggttgcgtgtgtcagctgt gcgccgaagtgaagaacctggcgctctgtgaagggtgctgtgcaaggccagcggctac acctttaccggctactacatgacatgggtccgacaggtccaggacagggacttgaatgg atgggtgtgatcaacccaatagcggcgccaccaattaccccagaattccaggggcag agtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgctacatggaaactgagcggcgtg agatccgatgacaccgctgtgtactactgcccagatctcccaactctactactacgaca gcagcgggtactactaccagcgcccttgatatttggggccaggggcacaatgtgaccc

10

20

30

40

50

[illegible]

20

20

40

30

10

20

30

40

実施例 2 . 細胞内での X M V A 0 1、X M V A 0 4、X M V A 0 9 の発現を測定する

HEK293T細胞にそれぞれpAAV9-XMVA01プラスミド、pAAV9-XMVA04プラスミドおよびpAAV9-XMVA09プラスミドをトランスフェクトし、上清を回収し、上清中のタンパク質の発現をELISAで検出した。具体的な操作は以下の通りである：293T細胞を10%ウシ胎仔血清を含むDMEMの完全培養液に懸濁し、培養皿に接種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで細胞のコンフルエンスが70~90%になるまで培養した後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) のトランスフェクション試薬を用いて、その説明書に従ってプラスミドを導入した。72時間培養を続けた後、上清を回収し、後で使用するために-80℃で保存した。

50

【 0 0 3 2 】

E L I S A による特異的検出方法は以下の通りである：E L I S A プレート (Thermo) に $0.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の V E G F 1 6 5 (proteintech) タンパク質を 1 ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ ずつコートし、4 で一晩インキュベートした後、 0.05% Tween (Sangon) を含む P B S で毎回 3 分間ずつ E L I S A プレートを 3 回洗浄した。プレートを 2% B S A (MikeBio) を含む P B S $200 \mu\text{L}$ / ウェルで室温にて 1 時間ブロッキングし、再度 3 回洗浄した。コンベルセプト ($10 \text{mg} / \text{mL}$) 標準品、および H E K 2 9 3 T 細胞に p A A V 9 - X M V A 0 1 プラスミド、p A A V 9 - X M V A 0 4 プラスミド、および p A A V 9 - X M V A 0 9 プラスミドをトランスフェクトした後に回収した細胞上清を E L I S A プレートに添加した。標準液を $312.5 \text{ng} / \text{mL}$ から 8 倍に連続希釈し、試験する上清を 1 : 10 または 1 : 50 に希釈し、データを平均し、プラスミドを導入していない細胞上清を対照群とし、プレートを 37 で 1 時間インキュベートし、3 回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ヒト I g G 抗体 (Jackson Immuno Research) の 1 : 5000 希釈液を各ウェルに加え、37 で 1 時間インキュベートした後、3 回洗浄した。各ウェルに T M B 発色液 (Beyotime) を $100 \mu\text{L}$ / ウェル添加し、暗所で室温にて 6 分間反応させた後、上記ウェルに停止液 (Beyotime) を $100 \mu\text{L}$ / ウェル添加して反応を終了させた。マイクロプレートリーダーで 450nm の O D 値を検出し、検査対象サンプルの含有量を算出した。結果を図 3 に示す。p A A V 9 - X M V A 0 1 ベクター、p A A V 9 - X M V A 0 4 ベクターおよび p A A V 9 - X M V A 0 9 ベクターでトランスフェクトした細胞は、対照群と比較して有意差をもって、V E G F 1 6 5 中和タンパク質を効果的に発現させることができた。

【 0 0 3 3 】

実施例 3 . X M V A 0 1、X M V A 0 4 および X M V A 0 9 の細胞内発現がヒト網膜微細血管内皮細胞 (H R M E C) の増殖に及ぼす影響

H R M E C の細胞密度は、 1% E C G S を含む E C M 完全培養液 (Science Cell) で $4 \times 10^4 / \text{mL}$ に調整し、平底 96 ウェルプレートに $100 \mu\text{L}$ / ウェルずつ接種した；p A A V 9 - X M V A 0 1 プラスミド、p A A V 9 - X M V A 0 4 プラスミドおよび p A A V 9 - X M V A 0 9 プラスミドをそれぞれ H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトした後、回収した細胞上清を $100 \mu\text{L}$ ずつウェルに添加し、プラスミドをトランスフェクトしていない細胞上清を対照群とし、 5% C O ₂ インキュベーター中、37 で 72 時間培養した。Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8、Biosharp) の説明書に従い、試験群および対照群にそれぞれ $20 \mu\text{L}$ / ウェルの CCK - 8 溶液を添加した。4 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて波長 450nm で O D 値を検出した。結果を図 4 に示す。p A A V 9 - X M V A 0 9 が発現するタンパク質は、E C G S 刺激下で H R M E C の増殖を効果的に抑制でき、その抑制効果は p A A V 9 - X M V A 0 1 や p A A V 9 - X M V A 0 4 よりも有意に優れていた。

【 0 0 3 4 】

実施例 4 . X M V A 0 1、X M V A 0 4 および X M V A 0 9 の細胞内発現が H R M E C のチューブ形成に及ぼす影響

解凍したマトリゲル (Corning) を平底 96 ウェルプレートに $50 \mu\text{L}$ / ウェルずつ均一に広げ、37、 5% C O ₂ インキュベーター内で 1 時間インキュベートした；p A A V 9 - X M V A 0 1 プラスミド、p A A V 9 - X M V A 0 4 プラスミドおよび p A A V 9 - X M V A 0 9 プラスミドをそれぞれ H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトした後、回収した細胞上清を H R M E C の処理に用い、プラスミドをトランスフェクトしていない細胞上清を対照群として用いた、48 時間培養後、増殖因子および血清を含まない E C M の基礎培地で細胞を再懸濁し、細胞密度を $2 \times 10^5 / \text{mL}$ に調整し、マトリゲルを含む 96 ウェルプレートに $100 \mu\text{L}$ / ウェルで播種し、37、 5% C O ₂ インキュベーターで培養し、2 時間に 1 回観察した；4 ~ 8 時間後、細胞を顕微鏡で観察および撮影し、試験する上清が H R M E C チューブの形成に及ぼす影響を記録した。結果を図 5 に示す。p A A V 9 - X M V A 0 9 が発現するタンパク質は、H R M E C チューブの形成を効果的

に阻害でき、その阻害効果は p A A V 9 - X M V A 0 1 および p A A V 9 - X M V A 0 4 よりも有意に優れていた。

【 0 0 3 5 】

実施例 5 . 他のプラスミドベクターの構築

スキーム 1

抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列をそれぞれ G₄S ペプチドリンカー、(G₄S)₃ ペプチドリンカーおよび G₄S ペプチドリンカーで連結した、分泌シグナルペプチド C D 5 - s p スクレオチド配列を N 末端に付加し、C D 5 - s p - V L a n t i - A N G - 2 - G₄S - V H a n t i - V E G F - A - (G₄S)₃ - V L a n t i - V E G F - A - G₄S - V H a n t i - A N G - 2 の構造を有するオープンリーディングフレームを形成した；このヌクレオチド配列はヒトのコドン選好に従って設計され、5' 末端には B a m H I 切断部位が、3' 末端には E c o R V 切断部位が導入され、X M V A 1 0 と命名された (図 7)。抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は X M V A 0 9 と同一であった。

10

【 0 0 3 6 】

スキーム 2

抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は、それぞれ G₄S ペプチドリンカー、(G₄S)₃ ペプチドリンカー、G₄S ペプチドリンカーで連結された、分泌シグナルペプチド C D 5 - s p スクレオチド配列を N 末端に付加し、C D 5 - s p - V L a n t i - V E G F - A - G₄S - V H a n t i - A N G - 2 - (G₄S)₃ - V L a n t i - A N G - 2 - G₄S - V H a n t i - V E G F - A の構造を有するオープンリーディングフレームを形成した；このヌクレオチド配列はヒトのコドン優先に従って設計され、5' 末端には B a m H I 切断部位が、3' 末端には E c o R V 切断部位が導入され、X M V A 1 1 と命名された (図 8)。抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は X M V A 0 9 と同一であった。

20

【 0 0 3 7 】

スキーム 3

抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列をそれぞれ (G₄S)₃ ペプチドリンカー、G₄S ペプチドリンカー、(G₄S)₃ ペプチドリンカーで連結した、分泌シグナルペプチド C D 5 - s p スクレオチド配列を N 末端に付加し、C D 5 - s p - V H a n t i - V E G F - A - (G₄S)₃ - V L a n t i - V E G F - A - G₄S - V H a n t i - A N G - 2 - (G₄S)₃ - V L a n t i - A N G - 2 の構造を有するオープンリーディングフレームを形成した；このヌクレオチド配列はヒトのコドン選好に従って設計され、5' 末端には B a m H I 切断部位が導入され、3' 末端には E c o R V 切断部位が導入され、X M V A 1 3 と命名された (図 9)。

30

【 0 0 3 8 】

スキーム 4

抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列をそれぞれ G₄S ペプチドリンカー、(G₄S)₃ ペプチドリンカー、G₄S ペプチドリンカーで連結した、N 末端に分泌シグナルペプチド C D 5 - s p スクレオチド配列を付加し、C D 5 - s p - V L a n t i - A N G - 2 - G₄S - V H a n t i - V E G F - A - (G₄S)₃ - V L a n t i - V E G F - A - G₄S - V H a n t i - A N G - 2 の構造を有するオープンリーディングフレームを形成した；このヌクレオチド配列はヒトのコドン優先に従って設計され、5' 末端には B a m H I 切断部位が、3' 末端には E c o R V 切断部位が導入され、X M V A 1 4 と命名された (図 10)。抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は X M V A 1 3 と同一であった。

40

50

【 0 0 3 9 】

スキーム 5

抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は、それぞれ G₄ S ペプチドリンカー、(G₄ S)₃ ペプチドリンカー、G₄ S ペプチドリンカーで連結された、C D 5 - s p - V L a n t i - V E G F - A - G₄ S - V H a n t i - A N G - 2 - (G₄ S)₃ - V L a n t i - A N G - 2 - G₄ S - V H a n t i - V E G F - A の構造を有するオープンリーディングフレームを形成するために、分泌シグナルペプチド C D 5 - s p スクレオチド配列を N 末端に付加した；このスクレオチド配列はヒトのコドン優先に従って設計され、5' 末端には B a m H I 切断部位が導入され、3' 末端には E c o R V 切断部位が導入され、X M V A 1 5 と命名された (図 1 1) 。抗 V E G F の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列、抗 A N G - 2 の V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列は X M V A 1 3 と同一であった。

10

【 0 0 4 0 】

X M V A 1 0 ベクター、X M V A 1 1 ベクター、X M V A 1 3 ベクター、X M V A 1 4 ベクターおよび X M V A 1 5 ベクターは、ライゲーション、形質転換、クローニングスクリーニングおよび同定などの通常の分子生物学的操作によって構築され、エンドトキシンフリーのプラスミド抽出キット (M N) を用いて、後に使用するための高品質のプラスミド D N A が得られた。

【 0 0 4 1 】

実施例 2 に記載の方法に従い、プラスミドをそれぞれ H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトし、上清を回収し、上清中のタンパク質の発現を E L I S A で検出した。上記のベクターを細胞内で発現させた場合の H R M E C の増殖に対する効果を、実施例 3 に記載した方法に従って検出した。上記のプラスミドを細胞内で発現させた場合の H R M E C チューブ形成に対する効果を、実施例 4 に記載した方法に従って検出した。組み換え A A V ウイルスは、実施例 5 に記載した方法に従って調製し、同定した。

20

【 0 0 4 2 】

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3. XMVA10 - XMVA15 の配列情報

製品番号	配列情報	A A配列		D N A配列	
XMVA10	VL _{anti} -ANG-2 ⁺ GaS-VH _{anti} - VEGF-A ⁺ (GaS) ₃ - VL _{anti} -VEGF- A-GaS- VH _{anti} -ANG-2	EIVLTQSPGTLSSLSPGERAT LSCRASQSIITGSYLAWYQ QKPGQAPRLICGASSWA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYSSS PITFGQGTRLEIKRGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHW VRQAPGKGLEWVAGITPA GGYTTYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARFVFFLPYAMD YWGQGLTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRTVITCRASQ DVSTAVAWYQKQPKGAP KLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCKQGYANPWTFGQ GTKVEIKRGGGGSQVQLV ESGGGVVQPGRLSLRSCA ASGFTFTNYGMHWGRQA PGKGLEWVAVISHDGNK YYVDSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARIGIDFWSGLNWFDP WGQGLTVTVSSA	SEQ ID NO : 18	gagatcgtgctgacacagagccctggcacactgctcactgtctccag gcgaagagccacactgagctgtagagccagccagagccatcccg gctcttacttggtgtalcagcagangctggacagggccctaga ctgctgattgtggcctctcttggccaccggcattcccgatagat ttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagcaga ctggaaaccgaggacttgcctgttactactgccagcagtiacagca gcagccccatcacctttggccagggcacaaagactggaaatcaagc ggggcgagaggggctctgaggtgacgtgtggagagcggagg aggactgtgacagccaggaggctccctggcgtgtcttgcgccgcc agcggctttaccatctccgactactgattcactgggtgagacaggc acctggcaaggagactggagtggtggcaggaalcccccagcag gaggctacacatactatggccagagcgtgaaggccgggtaccat ctccgcgatacctctaaacacagccctatctgcagatgaactccct gcggggccgaggacacagccgtgtactattggccagattcgtgtct tcttgcacatagccatgatttggggccagggccacctgtgtgaca gtgagctccgggtggaggtgctccgtggcggtggcagcggcggt ggcggtgtgtatattcagatgacacagtccectatagcctgtctgac agcgtggcgacaggggtgacatcacatgtagagcaagcagagac gtgagcagccgagtggtggtgtacacagcaggaagcgtggcaaggcc ccaaagctgtgactactccgctcttctgtattctgtgtgtgcca gcaggttttagcgggtccggtatggaaaccgacttccctgacaalc tctctctgagcctgaggattttggacatactattgcaagcagggt atgccaatccatggacttccggcagggcacaaagtgtagatcaa gagggggcgaggggggtctcaggtgacgtgtgtgaaatctgtgtg cgaggtgtgtcagcctggcgaagcgtgagactgtgtgtgtgtgtgt agcggcttcaccttaccactatggaatgcaactggcgagcagacag ccctgtgcaagagactgaatgggtgtccgtgtatcagccacgacg gcaacaacaggtactacgtggacagcgtgaaggcagattaccat cagccgggacacagcagaacacacctgtacctgcagatgaacag cctgagagccgagggacaccgccgtgtactattgtccagagagg catcgactttggagcgccgtgaattgtgtgaccttggggacagg gcacctgtgttacagtttctgtgtgc	SEQ ID NO : 43
	CD5-sp- VL _{anti} -ANG-2 ⁺ GaS-VH _{anti} - VEGF-A ⁺ (GaS) ₃ - VL _{anti} -VEGF- A-GaS- VH _{anti} -ANG-2	MPMGSLOPLATLYLLGML VASCLGEIVLTQSPGTLSSL PGERATLSCRASQSIITGSY LAWYQKQPGQAPRLICG ASSWATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYC QYSSSPITFGQGTRLEIK RGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTISD YWIHWVRQAPGKGLEWV AGITPAGGYTTYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARFVFFL PYAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTVIT CRASQDVSTAVAWYQKQ PKAPKLLIYSASFYSGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCKQGYANPWT FQQGTKVEIKRGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRLSLR SCAASGFTFTNYGMHWG RQAPGKGLEWVAVISHDG NNKYYVDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARIGIDFWSGLN WFDPWGQGLTVTVSSA	SEQ ID NO : 21	atgccaatgggggtccctacacccctggcaacatactatcttaggt atgctgtgtggctctgttttagagagatcgtgtgacacagagccc tggcacactgtcactgtctccaggcgaagagccacactgagctgt gagccagccagagcaccacggcttacttggcttggatcagca gaagcctggagagccctcagactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggccacggcattccgatagttttggcagcgtgtgtgtgtgtgtgt gacttaccctgacaatcagcagactggaaaccggagacttgcgg tgtactactgcccagctagcagcagcagccccatcaccttggccag ggcacaagactggaaatcaaggcgggggcgagggggtgtgtgtgt gcagctgt ccctgt ggattcactgggtgagacagcagcctgtgcaaggcagctgtgtgtgt tggcagggaatccccagcaggaggtctacacatactatgcccagac gcgtgaaggccgggttcacatctccgcccatacctctaaagaacac agcctatctgcagatgaactccctgtggcgagagcagacagccgtg tactattggccagatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ggccagggccacctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt cgggt cagtccecatctagcctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt tcacatgttagagcaagccagcagctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt accagcagaagccgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ctcttctgt ggaaaccgacttaccctgtgaatctctctgtgtgtgtgtgtgtgtgt gccacatactattgtgaagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt ccagggcacaaaggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt aggtgtcagctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt aagcctgt tggaaatgactgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gt cagcgtgaagggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt cacctgt cgt atgt	SEQ ID NO : 44

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 3 - 3】

VH _{anti-VEGF-A(G6-31)} -CDR2	GITPAGGYTYADSVKVG	SEQ ID NO : 2	ggaaacacccacagcaggaggtacacatactatgccgacagcgtg aagggc	SEQ ID NO : 25
VH _{anti-VEGF-A(G6-31)} -CDR3	FVFFLPYAMDY	SEQ ID NO : 3	ttcgtgttcttctgccatacgcctatggattat	SEQ ID NO : 26
VH _{anti-VEGF-A(G6-31)}	EVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPA GGYYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMD YWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO : 13	gaggtgcagctgggtggagagcggaggaggactgggtgcagccagg aggtccctgcggctgtcttgcgcgcagcgggttaccatctccg actactggattcactgggtgagacagcacttggcaaggagactgga gtgggtggcaggaaacacccacagcagggtacacatactatgcc gacagcgtgaaggccgggttaccatctccgcgatacctctaaga acacagcctatctgcagatgaactccctgcggccgaggacacag ccgtgtactattgcgcagactgtgttcttccgcaatagccatgga ttattggggccaggacccctgtgacagtgaactcc	SEQ ID NO : 27
VL _{anti-VEGF-A(G6-31)} -CDR1	RASQDVSTAVA	SEQ ID NO : 4	agagcaagccaggacgtgagcacccgacgtggca	SEQ ID NO : 28
VL _{anti-VEGF-A(G6-31)} -CDR2	SASFLYS	SEQ ID NO : 5	tccgctcttctgtattct	SEQ ID NO : 29
VL _{anti-VEGF-A(G6-31)} -CDR3	QQGYGNPFT	SEQ ID NO : 47	cagcagggctatggcaatccatcc	SEQ ID NO : 55
VL _{anti-VEGF-A(G6-31)}	DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPFRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQGYGN PFTFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO : 48	galattcagatgacacagtcctccatctagcctgtctgccagcgtgg gacaggggtgaccatcacatgtagagcaagccaggacgtgagcac ccagtggtgcatgtaccagcagaaagcgtggcaaggcccaagct gctgaltactactccctcttctgtatctgtggtggtgccaaggtta gcgggtccggtatctggaaccgacttaccctgacatctctctctg cagcctgaggaatttgcacatactattgccagcagggtctatggcaat ccattcaccttggccaggacacaaagggtgagatcaagagg	SEQ ID NO : 56
VH _{anti-ANG-2(3.19.3)}	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFTNYGMHWGRQAPGKGLEWVAVISH DGNKKYYVDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREGIDFWSGL NWFDPWQGGLTVTVSSA	SEQ ID NO : 15	cagggtgcagctgggtgaatctgggtggagggtgtgagccttggca gaagcctgagactgtctgttgcgcgcagcgggttcaccttcaacac tatggaatgcactgggtgacagcagccctggcaaggacttgaat gggtgcgcgtgacagccacgagggcaacaaactactactgtgg acagcgtgaaggcagattcaccatcagccgggacacagcagaaga acacctgtactctgagatgaacagcctgagagccgaggacaccc ccgtgtactattgtgccagagaggcctgacttggagcggcctg aattggttcgaccttggggacagggcacccctgtgtacagtttctctg cc	SEQ ID NO : 35
VL _{anti-ANG-2(3.19.3)}	EIVLTQSPGTLTSLSPGERAT LSCRASQSYLAWYQ QKPGQAPRLICGASSWA TGIPDRFSGSGSGTDFLTIS SRLEPEDFAVYYCQQYSSS PITFGQGTRLLEIKR	SEQ ID NO : 16	gagatcgtgtgacacagacccctggcacactgtcactgtctccag gcgaaagagccacactgagctgtagagccagcagacatcaccg gccttaccctggtctgtatcagcagaaagcctggacagcccttga ctgtgatttgggtccctcttcttggccaccggcaltccgtagat ttctggcagcggctccggcaccgacttaccctgacaatcagcaga ctggaaacccgaggaacttgcgcgtgtactactccagcagtagaca gcagcccatcaccttggccaggggcacaaagactggaatcaagc gg	SEQ ID NO : 39
VH _{anti-VEGF-A-(G4S)3} -VL _{anti-VEGF-A-(G4S)3} -VH _{anti-ANG-2-(G4S)3} -VL _{anti-ANG-2}	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPA GGYYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMD YWGQGLTVTVSSGGGSGSGSGGGSDIQMTQSP SLSASVGRVITITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYS GVPFRFSGSGSGTDFLTISLQPEDF ATYYCQQGYGNPFTFGQG TKVEIKRGGGSGSQVQLVE SGGGVVQPRSLRLSCAA SGFTFTNYGMHWGRQAP GKGLEWVAVISHDGNKKY	SEQ ID NO : 49	gaggtgcagctgggtggagagcggaggaggactgggtgcagccagg aggtccctgcggctgtcttgcgcgcagcgggttaccatctccg actactggattcactgggtgagacagcacttggcaaggagactgga gtgggtggcaggaaacacccacagcagggtacacatactatgcc gacagcgtgaaggccgggttaccatctccgcgatacctctaaga acacagcctatctgcagatgaactccctgcggccgaggacacag ccgtgtactattgcgcagacttcttcttccgcaatagccatgga ttattggggccagggcacccctgtgacagtgaactccgggtgaggt gggtccgggtgggtggcagcggcgggtggcgtctgaltatcag atgacacagtcctcatctagcctgtcttgcagcgtgtggcgacagg gtgacctacatgtagagcaagccaggacgtgagcaccgacgtgg catgtaccagcagaagcctggcaaggcccaagctgtgtatcta ctccgctcttctgtatttggcgtgccaagcaggttttagcgggtcc ggatcgggaacaggacttaccctgacaatctctctctgagcctgag gattttgcacatactattgccagcagggtatggcaatccatcactt tggccagggcacaaaggttgagatcaagaggcggaggggggtg ctctcaggtgcagctgtggaatctgtggcggagttgtgagcctg	SEQ ID NO : 57

10

20

30

40

【表 3 - 4】

XMVA14	CD5-sp- VH _{anti-VEGF-A⁺ (G4S)₃} - VL _{anti-VEGF-A⁺ G4S} - VH _{anti-ANG-2⁺ (G4S)₃} - VL _{anti-ANG-2}	YVDSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNLSRAEDTAVYY CAREGIDFWSGLNWFDP WGQGT _{LVTVSS} AGGGGS GGGGSGGGSEIVLTQSP GTL _{SLSPGERAT} LSRASQ SITGSYLAWYQKPGQAP RLLICGASSWATGIPDRFS GSGSGTDFLTISRLEPEDF AVYYCQQYSSSPITFGQGT RLEIKR	SEQ ID NO : 50	gcagaagcctgagactgcttggccgccagcgggttcaccttacc aactatggaatgcactggggcagacagccctggcaaggactt gaatgggtcgcctgacagccacgagcccaacaacagctac gtggagcgcgtgaaggcagattacatcagccgggacaacagc aagaaacacctgtacctgcagatgaacagccctgagagccgaggac accgcccgtgactattgtccagagaggcagcacttttggagcgg cctgaattgggtcgaaccttggggacagggcaccctgttacagt ttctgcgggtggaggtggctccgggtggcgggtggcagcggcgggtg cgggtctgagatcgtgctgacacagagccctggcacactgicactgt ctccagcgggaagagccacactgagctgtagagccagccagagca tcacccgtcttacctggctgtgtatcagcagaagcctggacagcc cctagactgctgatttggcgcctctcttggccaccggcattccc gatagatttctggcagcgcctccggcaccgacttaccctgacaat cagcagactgggaacccgaggacttgcctgtgtactactgccagcag tacagcagcagcccatcacttggccaggccacaagactggaaa tcaagcgg	10
		MPMGS _{LQPLAT} LYLLGML VASCLGEVQLVESGGGLV QP _{GGSLRL} SCAASGFTISD YWIHW _{RQAP} KGLEWV AGITPAGGYTYADSVK RFTISADTSKNTAYLQMN LRAEDTAVYYCARFVFFL PYAMDYWGQGT _{LVTVSS} GGGGSGGGSGGGSDIQ MTQSP _{SSLASV} GDRTIT CRASQDVSTAVAWYQK KAP _{KLIIYSAS} FLYSGVP SRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQGYGNPFT FGQGT _{TKVEIKR} GGGSGV QLVESGGGVVQ _{PGRL} SL SCAASGFTFTNYGMHW RQAP _{KGLEWV} AVISHDG NNKYYVDSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMNLSRAEDT AVYYCAREGIDFWSGLN WFDPWGQGT _{LVTVSS} AG GGGGSGGGSGGGSEIVL TQSP _{GTL} SLSPGERATLSC RASQSITGSYLAWYQK KAP _{RLIIYSAS} FLYSGVP DRFSGSGSGTDFLTISR LEPEDFAVYYCQQYSSSPIT FGQGT _{RLEIKR}	SEQ ID NO : 50	atgccaatggggtccctacaacccctggcaacatatactgctagt atgctcgtgctcctcgttttagagagggtgcagctgtgtagagc gaggaggactgtgtagccaggaggtccctcgggtgtgtgtg ccgccagcggcttaccatctccactactggaicactgggtgaga caggcacctggcaaggagctgaggtgggtggcagggaatcacc agcaggaggctacacatactatgccagagcgtgaaggcgggtt caccatctccgccgatacctctaaagacacagcctatctcagatga actccctcggggcggagacacagccgtgtactattgcccagatt cgtgttcttctgccatacggcatggatttggggccaggccaccct ggtagacgtgagctccgggtggaggtgtgcctgggtggcgggtg cggcgggtggtcggctctgatatcagatgacacgtcccatctagcc tgtctccagcgtggggcagaggggtgacatcagatgtagagcaag ccaggagcgtgagcaccgcagtgccagtgccagcagcaagcctgg caaggccccaagcgtgctgtacttccgccttcttctgtattctg gtgccaagcaggtttagcgggtccggatctggaaccgacttaccct gacaatctctctctgcagcctgaggatttggccacatactattg cagggtctatggcaatccatcacttggccaggccacaaggtg agatcaagaggggcggaggggcctcaggtgcagctgtgtgaat ctgtgtggcgggtgtgtgcagcctggcagaagcctgagactgtgt ggcggcagcgggttcaccttccaaactatggaatgcaactgggca gacaggccctggcaaggactggaatgggtgcctgtgacagcc acgacggcaacaacagtaactgtgagacagcgtgaaggcagat tcaccatcagccgggacacagcaagaacaccctgtactctgcagat gaacagcctgagagccgaggaacacggcgtgtactattgtgccaga gaggccatcgaacttggagcggcctgaattgttgcacccgtggg acagggcaccctgtgtacagtttcttccgggtggaggtgtgtccg gtggcgggtggcagcggcgtggcggctctgagatcgtgctgacac agagccctggcacactgtacgtgtctcagcggcaagagccacact gagctgtagagccagccagagcagcaccgcttaccgtgtgtgt atcagcagaagcctggacagccctagactgtgtatttgggcgc ctcttctggccaccggcattcccgatagatttctggcagcggctc cggcaccgacttaccctgacaatcagcagactggaaccggaggga cttcggcgtgtactactgcagcagtagacagcagcggccatcact ttggccaggccacaagactggaatcaagcgg	20
	VL _{anti-ANG-2⁺ G4S} - VH _{anti-VEGF-A⁺ (G4S)₃} - VL _{anti-VEGF-A⁺ G4S} - VH _{anti-ANG-2}	EIVLTQSPGTL _{SLSPGERAT} LSRASQSITGSYLAWYQ KPGQAP _{RLLICGASSWA} TGIPDRFSGSGSGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQYSS SPITFGQGT _{RLEIKR} GGGG EVQLVESGGGLVQP _{GGSL} LSCAASGFTISDYWIHW VRQAP _{KGLEWV} AGITPA GGYTYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNLSRAED TAVYYCARFVFFLPYAMD YWGQGT _{LVTVSS} GGGG GGGGSGGGSDIQMTQSP SSLASVGDRTITCRASQ DVSTAVAWYQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDF ATYYCQQGYGNPFTFGQG TKVEIKRGGGGSGVQLVE	SEQ ID NO : 51	gagatcgtgctgacacagccctggcacactgtactgtctccag gcgaagagccacactgagctgtagagccagccagagcatcaccg gctcttacctggctgtgtatcagcagaagcctggacagcccttaga ctgtgtatttggcggcctcttcttggccaccggcattccgtagat tttctggcagcgggtccggcaacgacttaccctgacaatcagcaga ctggaaccggaggaacttgcgggtgtacttgcagcaggtacagca gcagcccatcacttggccaggcgaagaagctggaatcaagc ggggcggaggggcctctgagggtcagctgtggagagcggagg aggactgtgtcagccaggaaggctccctggcgtgtcttgcggcc aggcgttaccatctccactactggaactgtgtgtgagacaggc acctggcaagggaactggaggtgggtggcaggaatcaccggcag gaggctacacatactatggcagacgctgtgaaggcggcgttaccat ctccgccatacttgaagacacagcctatctgcagatgaactccct gcggccggaggacacagcgtgtactattgcccagattgtgttct tcttgcatacggcatgtatttggggcagggcaccctgtgtgaca gtgagctccgtgtgggtgtgtcctgggtgtgtgtgtgtgtgtgt ggcggcctgtgtatcagatgacacagtcctccatctagcctgtgtcc agcgt gt gt ccaaagctgt	30

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

		SGGGVVQPGRSRLRLSCAA SGFTFTNYGMHWGRQAP GKGLEWVAVISHDGNKYN YVDSVKGRFTISRDNSEN TLYLQMNSLRAEDTAVYY CAREGIDFWWSGLNWFDP WGQGLTLTVSSA		gcagggttagcgggtccggatctggaaccgacttaccctgacaatc tctctctgcagcctgaggattttccacatactattgcccaggggt atggcaatccattacatttggccaggcgaacaaagggtgagatcaa ggggggcggggggggctctcaggctcagctgggtgaatctgggtg cggagttgtgcagcctggcagaagcctgagactgtctgtgcccgc agcggcttcacettaccacatattggaatgcactggggcagacagg cccctggcaaggacttgaatgggtccgggtgacagccacgacg gcaacaacagctactacgtggcagcgtggaaggcagattaccat cagccgggacaacagcaagacacccctgacctgacatgaacag cctgagagcccgaggacacccggctgtactattgtgccagagagg catcgactttggagcggcctgaattgggtgacccctggggcaggg gcacccctgttacagtttcttctcc	
	CD5-sp- VL _{anti-ANG-2} - G4S-VH _{anti- VEGF-A} - (G4S) ₃ - VL _{anti-VEGF- A} -G4S- VH _{anti-ANG-2}	MPMGLQPLATLYLLGML VASCLGEIVLTQSPGTL PGERATLSCRASQSTGSY LAWYQQKPGQAPRLICG ASSWATGIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYSSSPITFGQTRLEIK RGGGSGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTISD YWIHWVRQAPGKLEWV AGITPAGGYTYADSVK RFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARFVFL PYAMDYWGQGLTLTVSS GGGGSGGGGGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGRVTIT CRASQDVSFAVWYQQK GKAPKLLIYSASFYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQGYGNPFT FGQGTKVEIKRGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRSRL SCAASGFTFTNYGMHW RQAPGKLEWVAVISHD GNKYYVDSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREGIDFWWSGLN WFDPWGQGLTLTVSSA	SEQ ID NO : 52	atgccaatgggtccctacacccctggcaacatatactcttaggt atgctctgtgcccctctgttttaggagagatcgtgctgacacagagccc tggcacactgtcactgtctctcaggcgaaggacacactgagctgta gagccagccagagatcacccggctcttaccctgctgtgacagca gaagcctggacagggcccctgactgtgattgtggcgcctctctt ggccacccggcattcccgatagatttctggcagcggctccgcacc gacttaccctgacaatcagcagactggaaccccgaggacttgcgg tgtactactgcccagcagtagacagcagcccacatcacttggccag ggcacagagctggaaatcaagcggggcggagggggcctctgaggt gcagctgtggagagcggagggagactgtgtgacgacgagggct cccctgcccgtgtctgtgcccgcagcggcttaccatctcgcactact ggaltcactgtgtgagacagcagctggcagggactgtgagtggtg tggcaggaatcaccacagcaggaggtctacacatctatgcccaca gcgtgaaggggcgggttaccatctccgggatacctctgaagacac agcctatctgcagatgaactcctcggggcggagacacagccgtg tactattgcccagattcgtgttcttctccatagccatgattattg ggccaggggcaccctgtgtgacagtgagctccgggtgaggtggctc cgggtggcgggtggcagcggcgtgtgcccgtctgattcagatgaca cagtcctccatctagcctgtgtgcccgtggcggcagaggggtgacca tcacatgtagagcaagccagagcgtgagcagccagctgagcagtg accagcagaagcctggcgaaggcccgaagcgtgtgacttactccgc ctcttctgttatttggcgtgcccagcaggtttgcccgttccggatct ggaaaccgacttaccctgacaatctctctctgacccctgaggatatt ggccacatactattggcagagggctatggcaatcatttacccttggc cagggcacaagggtggagataagaggggcggagggggctctca gggtcagctgtgtgaatctgtgtggcgaggtgtgagcctgagcaga agcctgagactgtgtgtgcccagcggccttacccttaccacat ggatgactgtggggcagacagcccctggcaaggacttgaatgg gtcgcctgtgacagccagcagcgaacaaagactactgtgtgac agcgtgaaggcagattaccatcagcgggacacagcaagaaac accctgtactcagatgaacagcctgagagccgaggaacacccgc gtgtactattgtgcccagaggggacacgactttggagcggcctgaat tgggttccaccctggggcagagggcaccctgtgttaccatttcttctcc	SEQ ID NO : 60
XMVA15		DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQDVSFAVWYQ QKPGKAPKLLIYSASFYLS GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQGYGN PFTFGQGTKVEIKRGGGG SQVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFTNYGMH WGRQAPGKLEWVAVISH DGNKYYVDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREGIDFWWSGL NWFDPWGQGLTLTVSSA GGGGSGGGGGGGGGSEIV LTQSPGTLISLSPGERATLS CRASQSTGSYLAWYQQK PGQAPRLICGASSWATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYSSSPIT FGQGTTRLEIKRGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTISDYWIHWVR QAPGKLEWVAGITPAGG YTYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAV		gatattcagatgaacacagtcctccatctagcctgtctgcccagctggg cgacagggtgacacatcactgttagagcaagccagagcgtgagcac cgaggtgcatgtgacagcagaagcctggcaaggcccacaaact gctgactactccgccttctctgtattctggcgtgcccagcaggttta gggggtccggatctggaaccgacttaccctgacaaatctctctctg cagcctgagagatttggccacatactattggcagcggctatggcaat ccattcactttggccagggcacaagggtggagatcaagaggggc ggagggggctctcaggtgagcgtgtgaaatctgtgtgcccaggttg tgagcctggcagaagcctgagactgtgtgtccggccagcggcttc acccttaccacatggaatgacgtggggcagacaggcccctggca aaggacttgaatgggtgcctgtgacacccagcagcgaacaaaca agtactactgtgacagcgtgaaggcagattaccatcagcggg acaacagcaagacacccctgactgtgagatgaacagcctgagag ccgaggacacccggctgtactattgtgccaagaggcagcagcttt tgagcggcctgaattgtgtgacccctggggagacaggccacccctg ttacagtttctctgcccgtggaggtggctccgggtggcgggtggcagc ggcgggtggcggctgtgagatctgtgctgacacagagccctggcaca ctgtcactgtctccagcgaaggcaccactgagctgttagagcca ccagagcagcaccggctcttaccctgtgtgtgatacagagaagcct ggacagggcccctagactgtgattgtggcgcctcttcttgggcccac cggcaatcccgatagatttctgacagcggctcctggcagcagcacttca ccctgacaatcagcagactggaacccgaggacttgcgcgtgtacta ctgccaagcagtagacagcagcccacacacttggccaggggcaaca agactggaatcaagcggggcggagggggctgtgaggtgagct gggtgagagcggagaggagactgtgagcagcagaggagctcctgc	SEQ ID NO : 53
	VL _{anti-VEGF- A} -G4S - VH _{anti-ANG- 2} -(G4S) ₃ - VL _{anti-ANG-2} - G4S -VH _{anti- VEGF-A}		SEQ ID NO : 53	gatattcagatgaacacagtcctccatctagcctgtctgcccagctggg cgacagggtgacacatcactgttagagcaagccagagcgtgagcac cgaggtgcatgtgacagcagaagcctggcaaggcccacaaact gctgactactccgccttctctgtattctggcgtgcccagcaggttta gggggtccggatctggaaccgacttaccctgacaaatctctctctg cagcctgagagatttggccacatactattggcagcggctatggcaat ccattcactttggccagggcacaagggtggagatcaagaggggc ggagggggctctcaggtgagcgtgtgaaatctgtgtgcccaggttg tgagcctggcagaagcctgagactgtgtgtccggccagcggcttc acccttaccacatggaatgacgtggggcagacaggcccctggca aaggacttgaatgggtgcctgtgacacccagcagcgaacaaaca agtactactgtgacagcgtgaaggcagattaccatcagcggg acaacagcaagacacccctgactgtgagatgaacagcctgagag ccgaggacacccggctgtactattgtgccaagaggcagcagcttt tgagcggcctgaattgtgtgacccctggggagacaggccacccctg ttacagtttctctgcccgtggaggtggctccgggtggcgggtggcagc ggcgggtggcggctgtgagatctgtgctgacacagagccctggcaca ctgtcactgtctccagcgaaggcaccactgagctgttagagcca ccagagcagcaccggctcttaccctgtgtgtgatacagagaagcct ggacagggcccctagactgtgattgtggcgcctcttcttgggcccac cggcaatcccgatagatttctgacagcggctcctggcagcagcacttca ccctgacaatcagcagactggaacccgaggacttgcgcgtgtacta ctgccaagcagtagacagcagcccacacacttggccaggggcaaca agactggaatcaagcggggcggagggggctgtgaggtgagct gggtgagagcggagaggagactgtgagcagcagaggagctcctgc	SEQ ID NO : 61

10

20

30

40

50

	YYCARFVFFFLPYAMDYWGQGLTLVTVSS		gggtctgtctggcgcgcagcggtttaccatctccgactactggtatcactgggtgagacaggccactggcgaaggagctggagtggtggcagggaatcaccaccagcaggaggtctacacatactatgccgacagcgtgaaggccgggttcaccatctccgcgatacctcttaagaacacagccta	
CD5-sp- VL _{anti-VEGF-A} -G4S - VH _{anti-ANG-2} -(G4S) ₃ - VL _{anti-ANG-2} -G4S -VH _{anti-VEGF-A}	MPMGSLLQPLATLYLLGML VASCLGDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITICRASQDVSTA VAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLLQPEDFATYYC QQGYGNPFTFGQGTKVEI KRGGGGSQVQLVESGGG VVQPGRSRLSCLASGFT FTNYGMHWGRQAPGKGL EWVAVISHDGNKYYVDS VKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAREDVAVYYCAREG IDFWSGLNWFDPWGQGT LVTVSSAGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPGTLSP GERATLSRASQSITGSYL AWYQQKPGQAPRLICGAS SWATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYSSSPITFGQGTREIKR GGGGSSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCLASGFTISDY WIIHWVRQAPGKGLEWVA GITPAGGYTYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARFVFFFLP YAMDYWGQGLTLVTVSS	SEQ ID NO : 54	gggtctgtctggcgcgcagcggtttaccatctccgactactggtatcactgggtgagacaggccactggcgaaggagctggagtggtggcagggaatcaccaccagcaggaggtctacacatactatgccgacagcgtgaaggccgggttcaccatctccgcgatacctcttaagaacacagccta tctgcagatgaactccctcgcggccgaggacacagccgtgtactatt gcgcagatctgtgtctctccatccatgccatggattattggggcc agggcaccctgggtgacagtggctcc atgccaatggggctccataaacccctggcaacactatatactgttaggt atgctcgtggccctcgttttaggagatactcagatgacacagtccecat ctagcctgtctgccagcgtggcgacagggtagaccatcacatgttag agcaagccaggacgtgagcaccgcagtggtggtaccagcaga agcctggcaaggccccaaagctgtctgactactccgcttctctgt attctggcggtcccaagcaggtttagcgggtccggatctggaaaccga cttcaccctgacaaatctctctctgcagcctgaggattttgccatac tattccagcagggtctatggcaatccatccctttggccagggcac aaaggtggagatacaggaggccggaggggcctctcaggtgcagc tgggtgaatctgtggcgagggtgtgcagcctggcagaagcctgag actgtctgtgcgcgcagcggcttcaccctcccaacatggaatgca ctggggcagacaggccccctggcaaaaggacttgaatgggtgcctg gatcagccacgacggccaacaacagtaactacgtggacagcgtgaa gggcagatcacatcagcgggacaacagcaagaacaccctgtta cctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgcctgtactat tgtgcagagagggcacatgacttttgaggcgccctgaattgttgga cctgtgggcagcagggaacctgtctacagtttctgtcgggtggag gtgtgcctcgggtggcggtggcagcggcggtggcgctctgagatcg tgtctgacacagagccctggcaactgtctactgtctccaggcgaaag agccacactgtagctgtagccagccagagcctacaccggctcttac ctggcttggtatcagcagaagcctggacaggccccctagactgtgat ttgtggcgccctcttcttgggccaccggcattccgatatgatttctggc agcggctccggccaccactcaccttgacaattcagcagactggaac ccgaggacttgcctgtactactgccagcagtacagcagcagccc catcacctttggccagggcacaaagactggaaatcaagcggggcgg agggggcctctgaggtgcagctggtggagagcggaggagactgg tgcagccaggaggctccctcggcgtgtcttgcggccagcggctt taccatctccgactactggaattcagctgggtgagacaggccacttggca aggggacttggagtggtggcgaggaaatcccccagcaggaggttac acatactatgccgacagcgtgaaggcgccgttccatctccgcgg atacctctaagaacacagcctatctgcagatgaactccctggggcc gaggacacagcgtgtactattgcgcagatctgtgtctctcccca tacgccatggattattggggccaggccaccctgggtgacagtgagct cc	SEQ ID NO : 62

X M V A 0 9 コンストラクトおよび s s A A V プラスミドを B a m H I / E c o R V で二重消化し、ライゲーション、形質転換、クローニングスクリーニング、同定などの常套の分子生物学的操作によって s s A A V - X M V A 0 9 ベクターを構築し、ベクター情報を図 2 B に示した。エンドトキシン不含有のプラスミド抽出キット (M N) を用いて後に用いるための高品質なプラスミド D N A を取得し、ヘルパープラスミド (p h e l p e r) 、 A A V の C a p および R e p タンパク質発現プラスミド、目的遺伝子を発現するプラスミド (s s A A V - X M V A 0 9) の 2 : 1 : 1 質量比の 3 プラスミドパッケージングシステムを用いて、P E I トランスフェクションプロモーターとトランスフェクション複合体を形成させ、H E K 2 9 3 T 細胞にトランスフェクションして A A V - X M V A 0 9 のパッケージングを行うことにより、組換え A A V ウイルスを調製した。トランスフェクション後 3 日目および 7 日目の 2 回上清を回収し、目的遺伝子を含む A A V 粒子を得た。密度勾配遠心分離 (ベックマン社製超遠心機) を、ヨードキサノールの勾配を変えて (1 5 % 、 2 5 % 、 4 0 % 、 6 0 %) 行い、精製 A A V ウイルスを得た。A A V の品質は透過型電子顕微鏡で確認し、A A V ウイルス力価を q P C R で定量した。

制 效 果

網膜高エネルギーレーザー光凝固によって誘発されたC N Vの動物モデルは、国内外で一般的に用いられている動物モデルであり、現在ほとんどの処置評価試験において標準的な動物モデルとなっている。高エネルギーレーザー光凝固は、光受容体外節ディスク膜、ブルッフ膜、網膜色素上皮および前部脈絡膜毛細血管網の一部を選択的に破壊し、その後、線維芽細胞、網膜色素上皮細胞および血管内皮細胞の浸潤および増殖を含む損傷修復反応が起こり、最終的に光凝固領域に新生血管が形成される。

【 0 0 4 5 】

体重22～25gのSPFグレードの6～8週齢の雄性C57BL/6Jマウス(Beijing Vital River Laboratories Experimental Animal Technology Co., Ltd.より購入)30匹を用いた。具体的な投与スキームを以下の表4に示す:

【 0 0 4 6 】

【表4】

表4. 投与スキーム

グループ	投薬	薬物濃度(vg/mL)	投与量(μL)	投与量(vg/目)	投与経路	頭数
対照	PBS	—	2.5	—	硝子体内注射	15
XMVA09	AAV-XMV A09	2.5×10 ¹²	2.5	6.25×10 ⁹	硝子体内注射	15

【 0 0 4 7 】

AAV注射後、一定期間経過すると目的遺伝子の発現が安定するため、1日目に硝子体内注射を行い、22日目に注射に成功した動物に両眼眼底レーザー光凝固術を行い、C N Vモデルを誘導した。

【 0 0 4 8 】

マウスC N Vモデルの確立：マウスの両眼の瞳孔をトピカミド点眼液1～2滴で拡張し、麻酔のために5%抱水クロラルを筋肉内注射した。麻酔後、カルボマー点眼薬を両眼に点眼し、眼底レーザースコープを装着し、視神経乳頭を中心に視神経乳頭から約1.5～2PDの距離で血管を避けて光凝固を行った。レーザーパラメーターは以下の通りである：波長532nm、エネルギー80mW、スポットサイズ50μm、照射時間100ms。光凝固後の動物の両眼にエリスロマイシン眼軟膏を塗布した。

【 0 0 4 9 】

29日目に、マウスに対してフルオレセイン眼底血管造影(FFA)検出を行った：フルオレセインナトリウム注射液(15mg/mL、10mL/kg)を腹腔内注射し、フルオレセインナトリウム注射後早期(1.5分以内)および後期(3分後)に両目の鮮明な写真を数枚とり、有効光点(effective light spot)の蛍光漏出度を評価し、グレード3の漏出光斑の割合および漏出光斑の平均点を算出した。結果を図12および図13に示す。レーザー誘発wAMDモデルマウスでは、AAV-XMVA09の単回硝子体内注射により、C N Vの形成が有意に抑制された。

【 0 0 5 0 】

有効光点とは、近くに重度の網膜出血がなく、FFAで完全に表示できる光スポットを意味する。蛍光漏出スポットの等級基準は以下の通りである：等級0(蛍光漏れなし)、等級1(軽度蛍光漏出、レーザースポット径の1～50%の蛍光の漏れがある)、等級2(中程度蛍光漏出、レーザースポット径の50～100%の蛍光の漏れがある)、等級3(重度蛍光漏出、レーザースポット径よりも漏出面積が大きい)。

【 0 0 5 1 】

各グレードの光スポットの割合(%)=対応するグレードの光スポットの総数÷4種の光スポットの総数×100%。

【 0 0 5 2 】

漏出光点の平均点 = [(グレード 0 の光点数 × 0) + (グレード 1 の光点数 × 1) + (グレード 2 の光点数 × 2) + (グレード 3 の光点数 × 3)] ÷ 4 種の光点の総数。

【 0 0 5 3 】

実施例 8 . レーザー誘発 w A M D モデルのアカゲザルの C N V に対する X M V A 0 9 の抑制効果

5 ~ 6 歳の一般的グレード (検査前に検疫で適格とされた) のオスアカゲザル 7 頭 (Y a ' a n P r i m e d B i o - t e c h C o . , L t d .) から購入した) を用いた。具体的な投与スキームを以下の表 5 に示す :

【 0 0 5 4 】

【 表 5 】

表 5 . 投与スキーム

グループ	投薬	薬物濃度(vg/mL)	投与量(μ L)	投与量(vg /目)	投与経路	頭数
対照	PBS	-	50	-	硝子体内注射	3
XMVA09	AAV-XMV A09	1.94×10 ¹²	50	9.7×10 ¹⁰	硝子体内注射	4

【 0 0 5 5 】

X M V A 0 9 群 : レーザーモデリング前の 2 1 日目に A A V - X M V A 0 9 (5 0 μ L / 眼) を両眼に硝子体内注射し、 0 日目に眼底レーザーで両眼に C N V を誘導した。

【 0 0 5 6 】

対照群 : 0 日目に眼底レーザーで両眼に C N V を誘導し、 2 1 日目に P B S (5 0 μ L / 眼) を両眼に硝子体内注射した。

【 0 0 5 7 】

すべての動物は、レーザーモデリングおよび眼底写真 (F P) の前に光干渉断層計 (O C T) による検査を受け、レーザーモデリングの 1 9 日目および 7 7 日目に F F A 検査および O C T 検査を行い、グレード I V の光斑の数、漏出面積、網膜厚を主な有効性評価指標とした。アカゲザル C N V モデルの確立 : 動物を塩酸ケタミン (2 0 m g / k g) および塩酸デクスメデトミジン (0 . 0 3 m g / k g) の筋肉内注射で麻酔し、ミドリ (トロピカミド配合点眼薬) の点眼で両眼の瞳孔を拡張させた。両眼の瞳孔が 6 m m 以上になった後、動物の頭部を眼科用レーザー光凝固装置の前に固定し、眼底スコープで網膜構造を観察した後、黄斑中心を中心とした視神経円板距離でレーザー光凝固を片眼 9 点ずつ行った。レーザーパラメーターは、波長 5 3 2 n m 、エネルギー 6 5 0 m W - 7 0 0 m W 、スポットサイズ 5 0 μ m 、露光時間 0 . 1 秒であった。フルオレセイン漏出面積は F P および F F A により測定し、具体的な検査方法は以下の通りである : (1) 動物を塩酸ケタミン (2 0 m g / k g) および塩酸デクスメデトミジン (0 . 0 3 m g / k g) の筋肉内注射により麻酔した。 (2) トロピカミド配合点眼薬 1 ~ 2 滴で両目の瞳孔を拡張させた。 (3) 瞳孔拡張後の動物の瞳孔を観察し、光照射下で瞳孔が 6 m m 以上であれば、眼底カメラで黄斑を中心とした眼底のカラー写真を撮影した。 (4) その後、1 0 % フルオレセインナトリウム注射液 (フルオレサイト、Alcon 社製) を 0 . 0 7 5 m L / k g の量で下肢伏在静脈より急速注射した。フルオレセイン注射後、初期 (1 分以内) 、中期 (5 分以内) 、後期 (1 0 分以内) に、黄斑を中心とした F F A 写真を眼底カメラで撮影した。 (6) F F A 撮影の後期 (1 0 分) におけるグレード I V スポットのフルオレセイン漏出面積を Image J ソフトウェア (バージョン 1.53e, NIH, Wayne, Raband, USA) により自動測定し、F F A の有効性の評価指標とした。レーザースポットのフルオレセイン漏れの評定基準は、グレード I (光スポットに高い蛍光はない) 、グレード I I (光スポッ

トは高い蛍光を発し、漏出はない)、グレードⅢⅢⅢ(光スポットは高い蛍光を発し、わずかにフルオレセインが漏れるが、漏れは光スポットの端を超えない)、グレードⅣⅣ(光スポットは高い蛍光を発し、フルオレセインの漏れが顕著で、漏れは光スポットの端を超える)である。

【0058】

網膜厚の変化をOCTにより測定した。具体的な検査方法は以下の通りである：(1)FPおよびFFA検査終了後、動物をOCT装置の前に置き、動物の眼が走査レンズを直視するように調整した。(2)多層線形スキャン(Multi-layer linear scanning)を、黄斑を中心としたフォローアップモードを採用してスキャン領域がすべてのレーザーポイントをカバーするように行った。(3)モデリング後の網膜厚変化が最も明瞭で網膜境界が明瞭な層を選択し、その領域の網膜厚の最大値を装置に搭載されている測定ソフトを用いて測定し、OCTの有効性評価指標とした。

10

【0059】

結果を図14、15、16および17に示す。各群の動物におけるレーザーモデリングの19日目および77日目のFFA検査では、眼底のレーザースポットで異なる蛍光漏出が示された。対照群と比較して、AAV-XMVA09の単回硝子体内注射は、レーザー誘発wAMDアカゲザルモデルにおけるCNVのグレードⅣⅣの光スポットの数、漏出面積および網膜厚に対して明らかな改善効果を示した。

【0060】

実施例9．高グルコースによるHRMEC透過性増加モデル

20

24ウェルプレートに0.1%ゼラチンで37℃にて1-2時間前処理した後、数分間乾燥させた；その後、HRMECを10%FBS+1%PS+1%ECGSを含むECM(Sciencell)完全培養液に再懸濁し、 3×10^5 /ウェルの標準に従ってウェルプレートに均一に播種した。翌日、0.5%FBSを含む低血清培地で7時間飢餓処理を開始し、その後、HRMECを30mMの高グルコース環境に一晚曝露した。対照群は高グルコース処理を行わなかった。翌日、細胞の膜タンパク質をVE-カドヘリンで、核をDAPIで免疫蛍光共染色し、蛍光顕微鏡観察および写真撮影を行った。結果を図18に示す。高グルコースで処理したHRMECの細胞膜の連続性は破壊され、その結果、細胞間が拡大し、透過性が増大した。

【0061】

30

免疫蛍光染色の手順：培養液の上清を捨て、残りが200μLになるようにし、4%PFAを200μL加えて室温で20分間勾配固定を開始した。上清を捨てた後、直接PFAを200μL加えて室温で10分間固定を続けた。固定液を捨てた後、PBSで3回洗浄し、各回5分間洗浄した。VE-カドヘリン(Santa Cruz Biotechnology Inc)をPBSで1:150に希釈し、300μL/ウェルを加え、室温で2時間インキュベートし、上清を捨て、PBSで3回洗浄した。上清を捨て、PBSで3回洗浄(各回5分間)した。ロバ抗マウスIgG(H+L)高吸着性二次抗体、AlexaFluorTM488(Invitrogen)をPBSで1:200に希釈し、200μL/ウェルを加え、室温にて2時間インキュベートした。上清を捨て、PBSで3回洗浄(各回5分間)した。最後にDAPI含有マウント剤(Beyotime)を100μL/ウェル添加し、蛍光顕微鏡で観察および撮影した。

40

【0062】

実施例10．VE-カドヘリンインジケータに基づくHRMECの透過性に対するXMVA09タンパク質の制御効果の決定

24ウェルプレートに0.1%ゼラチンを4℃で一晩、または37℃で2時間プレコートし、コート液を捨て、HRMEC細胞を 3×10^5 /ウェル播種した。翌日、単層細胞が一定のコンフルエントに達した時点で、0.5%FBSを含む低血清培地で7時間の飢餓処理を開始した。未トランスフェクションHEK293T細胞の上清と、ssAAV-XMVA09プラスミドをトランスフェクションしたHEK293T細胞の上清を、それぞれ高グルコース(30mMグルコース)と共培養した。HRMECは一晩処理し、対照

50

群は高グルコース処理なしの非モデリング群とした。VE - カドヘリンの免疫蛍光染色を行い、詳細な手順は実施例 9 と同様であり、蛍光顕微鏡下で写真解析を行った。結果を図 19 に示す。ssAAV - XMVA09 によって発現されたタンパク質は、高グルコース処理後の HRMEC の透過性上昇に対して有意な抑制効果を示した。

【0063】

実施例 11 . ビオチン - アビジン系指標に基づく HRMEC の透過性に対する XMVA09 タンパク質の制御効果の決定

ゼラチンを EZ-Link (商標) NHS - LC - LC - ビオチンで処理し、ビオチン化ゼラチンを得た。ビオチン化ゼラチンを用いて細胞培養プレートを 4 で一晩または 37 で 2 時間コートした。HRMEC を培養プレートに直接播種し、細胞の接種量は 3×10^5 / ウェルであった。翌日、まず 0 . 5 % FBS を含む低血清培地で 7 時間飢餓処理を開始した。その後、未トランスフェクション HEK293T 細胞の上清と ssAAV - XMVA09 プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞の上清をそれぞれ高グルコース (30 mM グルコース) と共培養し、HRMEC を 17 時間処理し、対照群は高グルコース処理を行わない非モデリング群とした。FITC - アビジンで染色し、4 % PFA で固定した後、AF594 - ファロイジン (Invitrogen A12381) で染色を開始し、DAPI を含む抗蛍光消光剤を加え、蛍光顕微鏡で写真解析を行った。結果を図 20 に示す。ssAAV - XMVA09 によって発現されたタンパク質は、高グルコース処理後の HRMEC の透過性上昇に対して有意な抑制効果を示した。

【0064】

実施例 12 . 糖尿病モデルマウスの構築

薬物誘導は、糖尿病の臨床病理学的症状および臨床的特徴をよりよくシミュレートできる糖尿病モデル動物を確立するための現在の方法の一つである。ストレプトゾトシン (STZ) は、糖尿病を誘発するための最も一般的に用いられる薬物であり、主に膵β細胞を破壊することによって高血糖を引き起こし、その結果、毛細血管周囲細胞の喪失、血管層の菲薄化、血液網膜関門の破壊を引き起こし、さらに血管漏出を引き起こし、DME を試験するための適当なモデルである。

【0065】

糖尿病モデルマウスの樹立:

体重 20 ~ 25 g の SPF グレードの 6 ~ 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (Zhejiang Vital River Laboratories Experimental Animal Technology Co., Ltd. より購入) 80 匹を、ブランク群、DME モデル対照群、DME モデル群に無作為に分けた。モデリング前に、3 群のマウスの空腹時血糖値および体重を測定した。モデリング 0 日目に、6 時間の絶食 (水への自由アクセス可) 後、血糖値測定のために尾の先端から採血し、マウスの体重を測定した。モデリングは 1 日目に開始され、マウスを 6 時間絶食させた (水への自由アクセス可)。ブランク群には投与せず、DME モデル対照群には 50 mM クエン酸ナトリウム溶液 (Sigma) 60 mg / kg を 5 日間連続単回腹腔内投与し、DME モデル群には STZ (Sigma) 60 mg / kg を 5 日間連続単回腹腔内投与した。マウスは自由に飲食し、血糖値および体重を定期的に測定および記録した。モデリングは 135 日間継続した。

【0066】

結果を図 21 に示す。モデリング後 19 日目には、マウスの空腹時血糖値が 16 . 7 mmol / L を超える状態が約 3 週間続き、このことは糖尿病モデルマウスの構築に成功したことを示す。

【0067】

実施例 13 . 糖尿病モデルマウスにおける DME の表現型検証

モデリング後 81 日目に、実施例 12 の 3 群それぞれのマウスの一部にエバンスブルー (Evans Blue) を尾静脈注射し、網膜を剥離して分離し、蛍光顕微鏡で血管漏出を観察した。具体的な操作は以下の通りである: エバンスブルー (Sigma) 50 mg / mL を尾静脈に 50 μ L / マウス注射し、1 . 5 時間血液を循環させた後、マウスを安楽死させ

、両目を核出後、4 % パラホルムアルデヒド (Biosharp) で 4 5 分間固定し、眼球の網膜を剥がして広げ、蛍光顕微鏡で観察および撮影した。

【 0 0 6 8 】

結果を図 2 2 に示す。D M E モデル群の網膜血管漏出は、D M E モデル対照群およびブランク群と比較して明らかに増加しており、D M E モデル対照群の網膜とブランク群の網膜との間には明らかな差はなく、糖尿病モデルマウスは D M E の表現型を有していた。

【 0 0 6 9 】

実施例 1 4 . 糖尿病モデルマウスにおける X M V A 0 9 の網膜血管漏出抑制効果

実施例 1 2 の D M E モデルマウスには、モデリング後 9 5 日目に注射投与した。具体的な投与スキームを以下の表 6 に示す：

【 0 0 7 0 】

【表 6 】

表 6 . 投与スキーム

グループ	投薬	薬物濃度(vg/mL)	投与量(μ L)	投与量(vg /目)	投与経路	頭数
対照	PBS	—	2.5	—	硝子体内注射	6
XMVA09	AAV-XMV A09	2.5×10 ¹²	2.5	6.25×10 ⁹	硝子体内注射	6

【 0 0 7 1 】

注射後 2 9 日目に、上記 X M V A 0 9 群、対照群および実施例 1 2 の D M E モデル対照群のマウスに尾静脈注射によりエバンスブルーを注射し、網膜を解剖して蛍光顕微鏡で血管漏出を観察した。

【 0 0 7 2 】

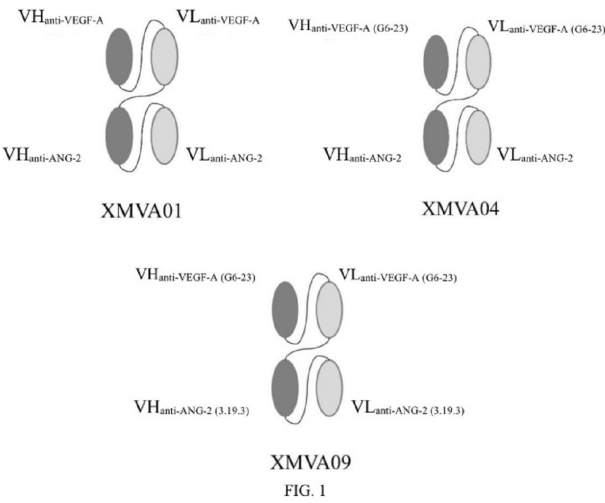
結果を図 2 3 に示す。D M E モデル対照群の網膜血管漏出割合は対照群より有意に低く、X M V A 0 9 群の網膜血管漏出割合は対照群より有意に低いことから、A A V - X M V A 0 9 の単回硝子体内注射は糖尿病モデルマウスの網膜血管漏出に対して有意な抑制効果を有することが示された。

【 0 0 7 3 】

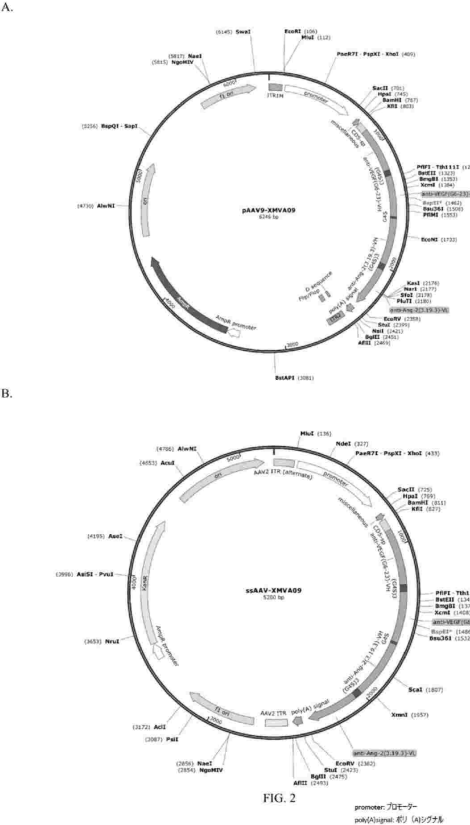
統計分析

データ処理および統計解析には GraphPad Prism 8.0 ソフトウェアを使用した。統計レベルは 5 % または p 0 . 0 5 とし、各分析指標の平均値および標準誤差 (平均 ± S E M) を算出した。p 0 . 0 5 は統計的に有意な差を意味する。

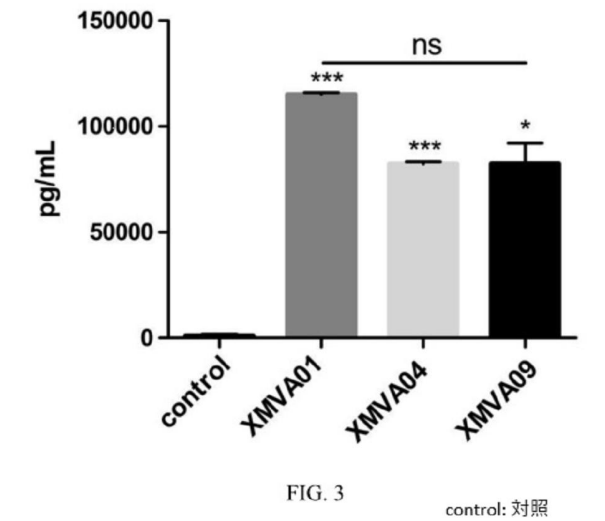
【 図 面 】
【 図 1 】



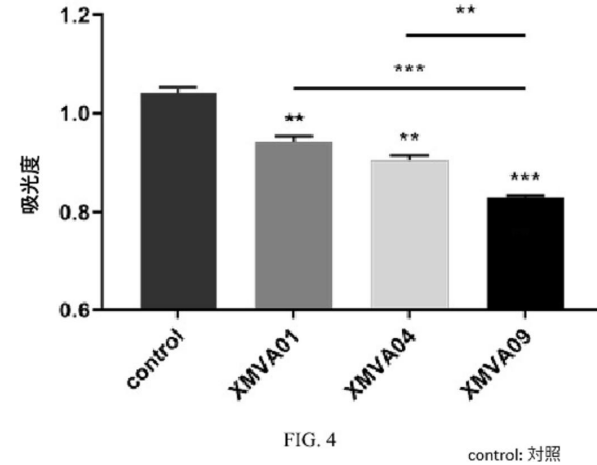
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

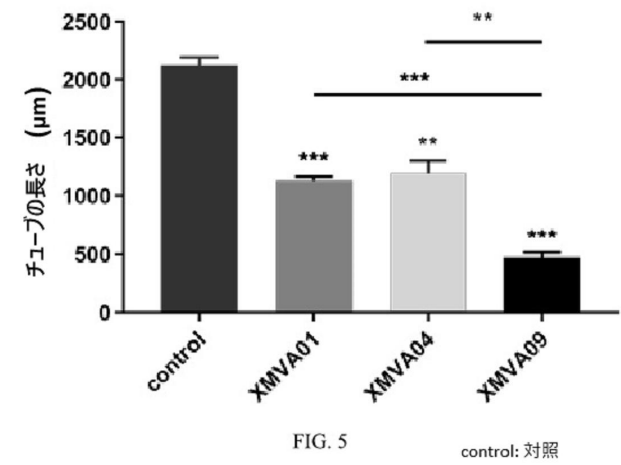
20

30

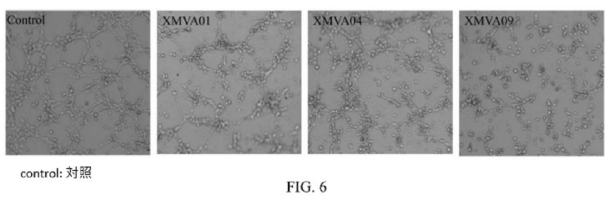
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

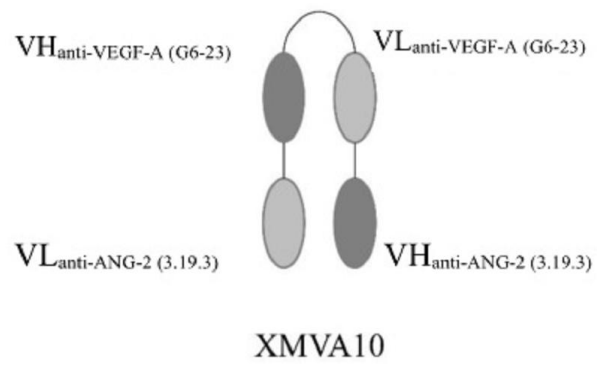


FIG. 7

【 図 8 】

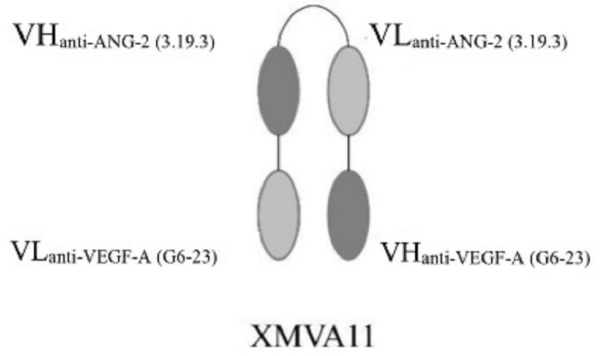


FIG. 8

10

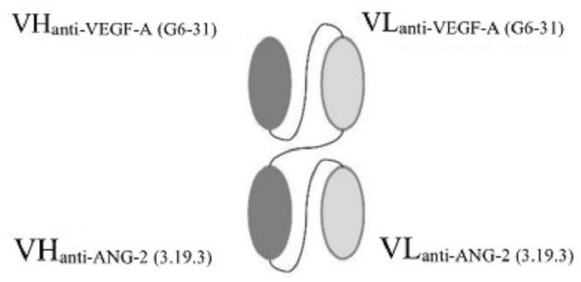
20

30

40

50

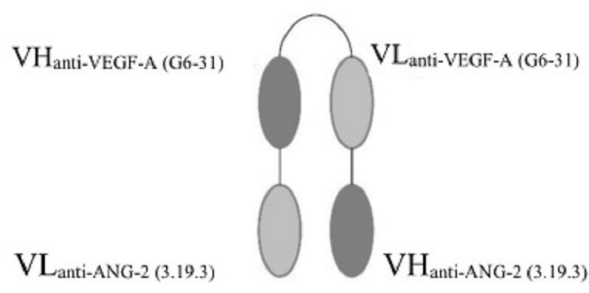
【 図 9 】



XMVA13

FIG. 9

【 図 10 】

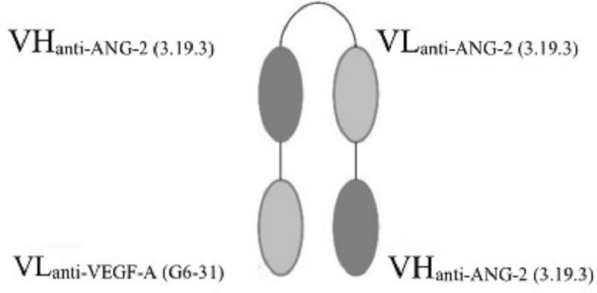


XMVA14

FIG. 10

10

【 図 11 】



XMVA15

FIG. 11

【 図 12 】

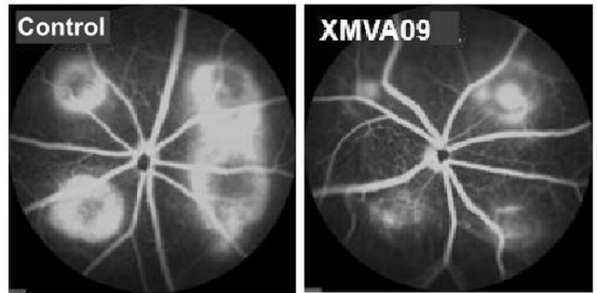


FIG. 12

20

30

40

50

【 図 1 3 】

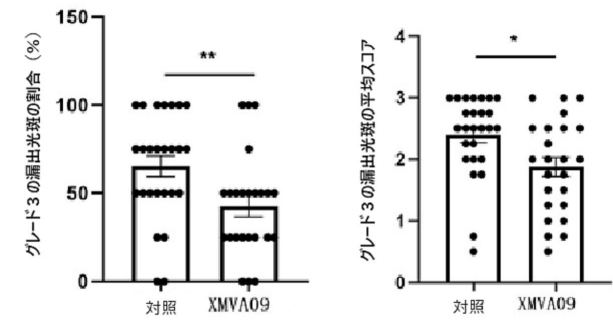


FIG. 13

【 図 1 4 】

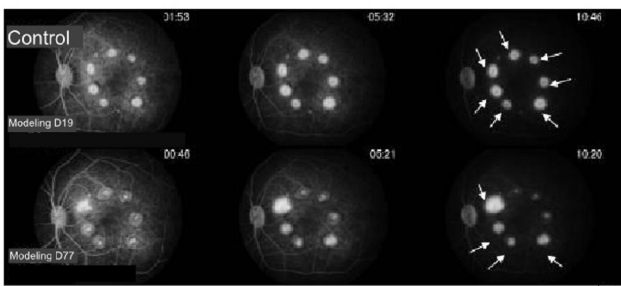


FIG. 14

control: 対照

10

【 図 1 5 】

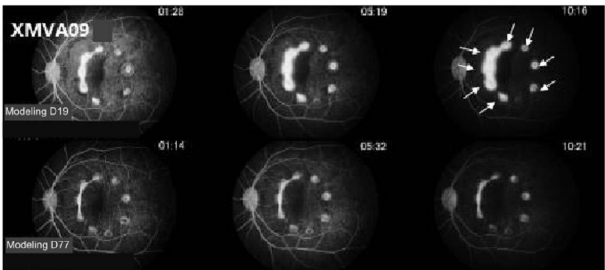


FIG. 15

【 図 1 6 】

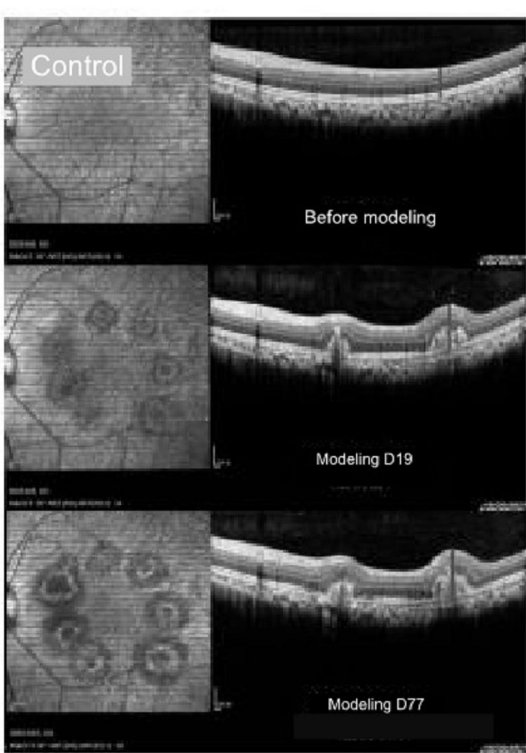


FIG. 16

control: 対照

before modeling: モデリング前

20

30

40

50

【 图 1 7 】

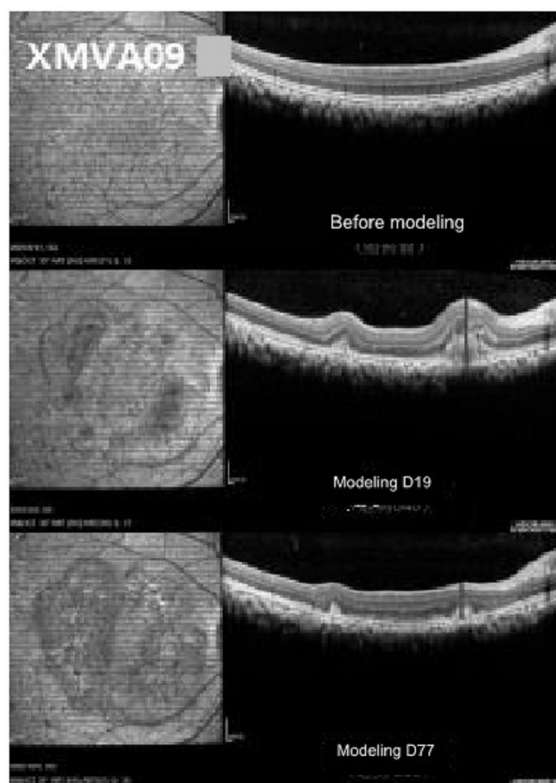


FIG. 17 before modeling: モデリング前

【 ㊦ 1 8 】

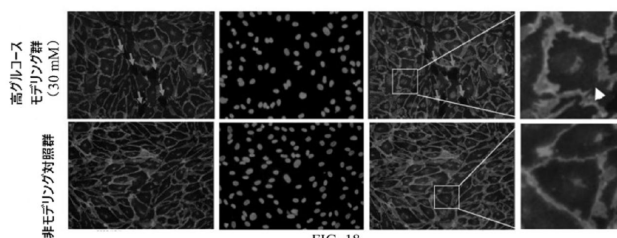


FIG. 18

10

20

【 圖 1 9 】

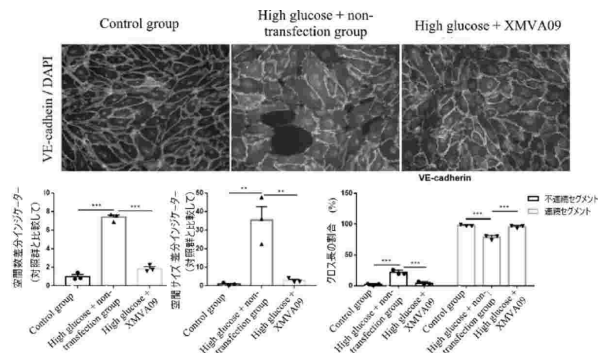


FIG. 19

Control group: 対照群
High glucose: 高グルコース
non-transfection group: 非トランスフェクション群
cadherin: カドヘリン

【 図 2 0 】

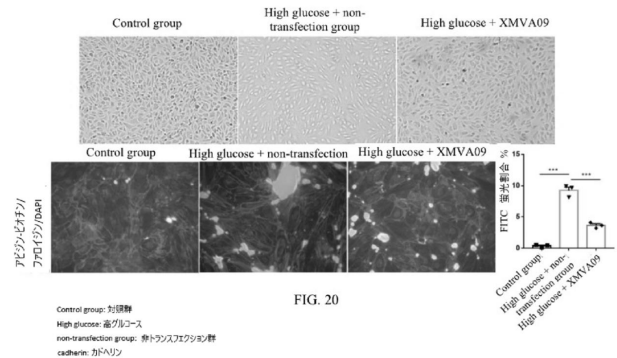


FIG. 20

Control group: 対照群
High glucose: 高グルコース
non-transfection group: 非トランスフェクション群
cadherin: カドヘリン

30

40

50

【図 2 1】

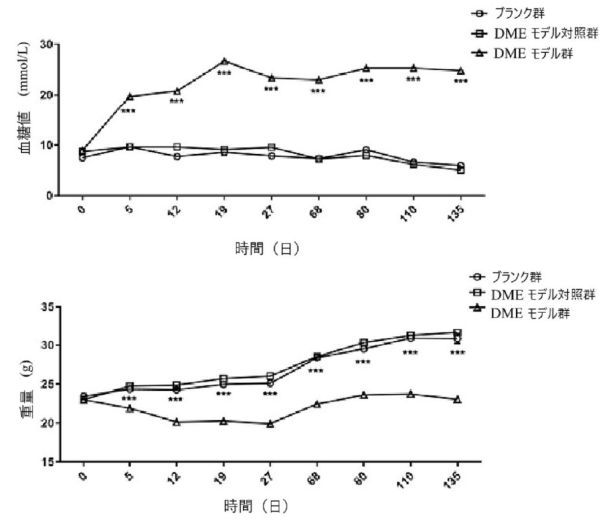


FIG. 21

【図 2 2】

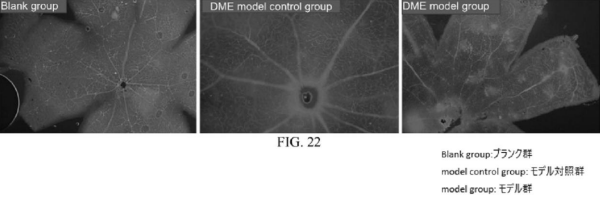


FIG. 22

Blank group: ブランク群
model control group: モデル対照群
model group: モデル群

10

【図 2 3】

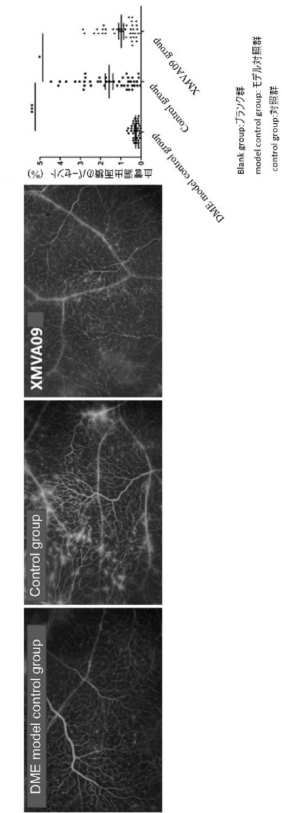


FIG. 23

20

30

40

【配列表】

2025512121000001.xml

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/085610
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/46(2006.01)i; C07K16/22(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P19/02(2006.01)i; A61P27/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K,C12N,A61K,A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; WPABS; WPABSC; ENTXTC; DWPI; VEN; CNKI; ISI; ELSEVEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; STN; 万方, WANFANG; 中国专利生物序列检索系统数据库, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; 血管内皮生长因子, 血管生成素-2, VEGF, VEGF-A, ANG-2, 双特异性抗体, bispecific Antibody, SEQ ID NOS: 1-62		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102753577 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; HUF MONLARO AG) 24 October 2012 (2012-10-24) see description, paragraphs 0020-0280, and SEQ ID NOS: 23-24	1-16
Y	CN 101370519 A (ASTRAZENECA AB) 18 February 2009 (2009-02-18) see description, page 7, paragraph 8 to page 28, paragraph 8, and SEQ ID NOS: 6 and 8	1-16
Y	US 5877291 A (DOW CHEMICAL CO.) 02 March 1999 (1999-03-02) see description, column 2, line 30 to column 7, line 15	1-16
Y	CN 104761643 A (GENENTECH INC.) 08 July 2015 (2015-07-08) see SEQ ID NOS: 141-144 and 261-264	1-16
Y	CN 1795208 A (MICROMET AG) 28 June 2006 (2006-06-28) see description, page 4, paragraph 4 to page 21, paragraph 1, and claims	1-16
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 27 June 2023		Date of mailing of the international search report 07 July 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/085610	
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.			10
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.			
3. Additional comments:			20
			30
			40
			50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/085610

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102753577	A	24 October 2012	ECSP	11010969	A	31 May 2011
				MY	178926	A	23 October 2020
				AR	073775	A1	01 December 2010
				BRPI	0919663	A2	01 December 2015
				US	2017369566	A1	28 December 2017
				ES	2455217	T3	15 April 2014
				US	2021047394	A1	18 February 2021
				CL	2011000769	A1	16 September 2011
				SG	195536	A1	30 December 2013
				US	2010111967	A1	06 May 2010
				US	8268314	B2	18 September 2012
				CO	6351794	A2	20 December 2011
				HK	1172354	A1	19 April 2013
				PT	2344537	E	09 May 2014
				PL	2344537	T3	31 July 2014
				DK	2344537	T3	10 February 2014
				HK	1199265	A1	26 June 2015
				JP	2012504943	A	01 March 2012
				JP	5368570	B2	18 December 2013
				NZ	591602	A	29 June 2012
				CY	1115030	T1	14 December 2016
				HRP	20140376	T1	23 May 2014
				ZA	201102203	B	28 December 2011
				EP	2792687	A1	22 October 2014
				EP	2792687	B1	16 May 2018
				KR	20130118994	A	30 October 2013
				TW	201334788	A	01 September 2013
				TWI	458492	B	01 November 2014
				US	2012321627	A1	20 December 2012
				US	8703130	B2	22 April 2014
				TW	201018485	A	16 May 2010
				TWI	393571	B	21 April 2013
				RU	2011117410	A	20 December 2012
				RU	2542382	C2	20 February 2015
				RU	2014149553	A	27 June 2016
				RU	2640253	C2	27 December 2017
				WO	2010040508	A1	15 April 2010
				WO	2010040508	A8	24 February 2011
				WO	2010040508	A9	21 April 2011
				JP	2014039549	A	06 March 2014
				SI	2344537	T1	30 May 2014
				US	2015004166	A1	01 January 2015
				US	9708396	B2	18 July 2017
				PE	20110425	A1	01 July 2011
				CA	2739122	A1	15 April 2010
				CA	2739122	C	15 May 2018
				AU	2009301431	A1	15 April 2010
				AU	2009301431	B2	31 October 2013
				AU	2009301431	B8	14 November 2013
				CR	20110166	A	03 June 2011

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/085610

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
						MA	32712	B1	02 October 2011
						KR	20110055726	A	25 May 2011
						KR	101345522	B1	31 December 2013
						IL	211729	A0	30 June 2011
						IL	211729	A	29 October 2015
						EP	2344537	A1	20 July 2011
						EP	2344537	B1	29 January 2014
						MX	2011003190	A	27 April 2011
						EP	2781526	A1	24 September 2014
CN	101370519	A	18 February 2009			NO	20082448	L	10 July 2008
						NZ	569787	A	29 July 2011
						UY	30015	A1	31 July 2007
						AR	058359	A1	30 January 2008
						US	2014023654	A1	23 January 2014
						AU	2006324477	A1	21 June 2007
						US	2011097321	A1	28 April 2011
						JP	2009521412	A	04 June 2009
						JP	5179373	B2	10 April 2013
						EP	3168234	A1	17 May 2017
						US	2012288497	A1	15 November 2012
						ES	2411505	T3	05 July 2013
						ZA	200805158	B	25 November 2009
						CA	2633211	A1	21 June 2007
						BRPI	0619853	A2	23 August 2016
						EP	2518083	A2	31 October 2012
						EP	2518083	A3	05 December 2012
						EP	1962903	A1	03 September 2008
						EP	1962903	B1	13 March 2013
						TW	200730191	A	16 August 2007
US	5877291	A	02 March 1999			US	2016251421	A1	01 September 2016
						US	2009123474	A1	14 May 2009
						KR	20080073766	A	11 August 2008
						KR	101371773	B1	07 March 2014
						JP	2012211155	A	01 November 2012
						WO	2007068895	A1	21 June 2007
						WO	2007068895	A9	12 June 2008
						AU	2011201326	A1	14 April 2011
						AU	2011201326	B2	12 January 2012
						EP	0628078	A1	14 December 1994
						EP	0628078	B1	08 December 1999
						CA	2117477	A1	23 June 1994
						CA	2117477	C	12 June 2001
						AT	187494	T	15 December 1999
						AU	5747794	A	04 July 1994
						AU	680461	B2	31 July 1997
						JPH	07503622	A	20 April 1995
						JP	3312357	B2	05 August 2002
						WO	9413806	A1	23 June 1994
						US	5892020	A	06 April 1999
						SG	55079	A1	21 December 1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/085610

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				DE	69327229	D1	13 January 2000	
				DE	69327229	T2	30 March 2000	
CN	104761643	A	08 July 2015	NZ	545135	A	30 October 2009	
				HK	1211600	A1	27 May 2016	
				IL	173317	A0	11 June 2006	
				IL	173317	A	29 February 2016	
				US	2013266581	A1	10 October 2013	
				US	9018357	B2	28 April 2015	
				US	2012322982	A1	20 December 2012	
				US	8492527	B2	23 July 2013	
				US	2017073405	A1	16 March 2017	
				EA	200600344	A1	25 August 2006	
				EA	012835	B1	30 December 2009	
				MXPA	06001319	A	04 May 2006	
				KR	20160052799	A	12 May 2016	
				US	2015232549	A1	20 August 2015	
				US	9353177	B2	31 May 2016	
				OA	13225	A	13 December 2006	
				NO	20061014	L	24 April 2006	
				CA	2932216	A1	10 February 2005	
				KR	20110059806	A	03 June 2011	
				KR	20130098436	A	04 September 2013	
				JP	2011046732	A	10 March 2011	
				JP	5162644	B2	13 March 2013	
				CA	2533297	A1	10 February 2005	
				CA	2533297	C	07 June 2016	
				IL	243914	A0	21 April 2016	
				US	2010189719	A1	29 July 2010	
				US	8092797	B2	10 January 2012	
				SG	193170	A1	30 September 2013	
				US	2006280747	A1	14 December 2006	
				US	7811785	B2	12 October 2010	
				US	2005106667	A1	19 May 2005	
				NZ	575674	A	27 August 2010	
				WO	2005012359	A2	10 February 2005	
				WO	2005012359	A3	15 December 2005	
				KR	20120074336	A	05 July 2012	
				KR	101446849	B1	15 October 2014	
				BRPI	0412637	A	26 September 2006	
				JP	2007526756	A	20 September 2007	
				JP	4845732	B2	28 December 2011	
				KR	20140048973	A	24 April 2014	
				KR	101644717	B1	01 August 2016	
				KR	20060067950	A	20 June 2006	
				KR	101359142	B1	07 February 2014	
				EP	1648939	A2	26 April 2006	
				SG	145725	A1	29 September 2008	
				US	2011020346	A1	27 January 2011	
				US	8101177	B2	24 January 2012	
				EP	2420512	A2	22 February 2012	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/085610

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				EP	2420512	A3	21 August 2013
				AU	2004262006	A1	10 February 2005
				AU	2004262006	A2	22 December 2011
				AU	2004262006	B2	18 October 2012
				US	2007141065	A1	21 June 2007
				US	7691977	B2	06 April 2010
CN	1795208	A	28 June 2006	ZA	200508280	B	25 April 2007
				WO	2004106381	A1	09 December 2004
				US	2007123479	A1	31 May 2007
				US	7635472	B2	22 December 2009
				RU	2005141512	A	20 July 2007
				JP	2008501621	A	24 January 2008
				JP	2015110628	A	18 June 2015
				AU	2004242846	A1	09 December 2004
				JP	2013063981	A	11 April 2013
				JP	6025502	B2	16 November 2016
				CA	2522586	A1	09 December 2004
				CA	2522586	C	21 February 2017
				EP	1629012	A1	01 March 2006
				EP	1629012	B1	28 November 2018

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/085610
A. 主题的分类 C07K16/46(2006.01)i; C07K16/22(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P19/02(2006.01)i; A61P27/02(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNTXT; WPABS; WPABSC; ENTXTC; DWPI; VEN; CNKI; ISI; ELSEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; STN; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库, 检索词: 血管内皮生长因子, 血管生成素-2, VEGF, VEGF-A, ANG-2, 双特异性抗体, bispecific Antibody, SEQ ID NOS:1-62		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 102753577 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司, 赫孚孟拉罗股份公司) 2012年10月24日 (2012 - 10 - 24) 参见说明书第0020-0280段, SEQ ID NOS:23-24	1-16
Y	CN 101370519 A (阿斯利康(瑞典)有限公司) 2009年2月18日 (2009 - 02 - 18) 参见说明书第7页第8段-第28页第8段, SEQ ID NOS:6, 8	1-16
Y	US 5877291 A (DOW CHEMICAL CO) 1999年3月2日 (1999 - 03 - 02) 参见说明书第2栏第30行-第7栏第15行	1-16
Y	CN 104761643 A (健泰科生物技术公司) 2015年7月8日 (2015 - 07 - 08) 参见SEQ ID NOS:141-144, 261-264	1-16
Y	CN 1795208 A (麦克罗梅特股份公司) 2006年6月28日 (2006 - 06 - 28) 参见说明书第4页第4段-第21页第1段, 权利要求书	1-16
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年6月27日		国际检索报告邮寄日期 2023年7月7日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 马岚 电话号码 (+86) 010-62412181

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/085610
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。 2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。 3. 补充意见:		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/085610

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102753577	A	2012年10月24日	ECSP	11010969	A	2011年5月31日
				MY	178926	A	2020年10月23日
				AR	073775	A1	2010年12月1日
				BR-PI	0919663	A2	2015年12月1日
				US	2017369566	A1	2017年12月28日
				ES	2455217	T3	2014年4月15日
				US	2021047394	A1	2021年2月18日
				CL	2011000769	A1	2011年9月16日
				SG	195536	A1	2013年12月30日
				US	2010111967	A1	2010年5月6日
				US	8268314	B2	2012年9月18日
				CO	6351794	A2	2011年12月20日
				HK	1172354	A1	2013年4月19日
				PT	2344537	E	2014年5月9日
				PL	2344537	T3	2014年7月31日
				DK	2344537	T3	2014年2月10日
				HK	1199265	A1	2015年6月26日
				JP	2012504943	A	2012年3月1日
				JP	5368570	B2	2013年12月18日
				NZ	591602	A	2012年6月29日
				CY	1115030	T1	2016年12月14日
				HRP	20140376	T1	2014年5月23日
				ZA	201102203	B	2011年12月28日
				EP	2792687	A1	2014年10月22日
				EP	2792687	B1	2018年5月16日
				KR	20130118994	A	2013年10月30日
				TW	201334788	A	2013年9月1日
				TWI	458492	B	2014年11月1日
				US	2012321627	A1	2012年12月20日
				US	8703130	B2	2014年4月22日
				TW	201018485	A	2010年5月16日
				TWI	393571	B	2013年4月21日
				RU	2011117410	A	2012年12月20日
				RU	2542382	C2	2015年2月20日
				RU	2014149553	A	2016年6月27日
				RU	2640253	C2	2017年12月27日
				WO	2010040508	A1	2010年4月15日
				WO	2010040508	A8	2011年2月24日
				WO	2010040508	A9	2011年4月21日
				JP	2014039549	A	2014年3月6日
				SI	2344537	T1	2014年5月30日
				US	2015004166	A1	2015年1月1日
				US	9708396	B2	2017年7月18日
				PE	20110425	A1	2011年7月1日
				CA	2739122	A1	2010年4月15日
				CA	2739122	C	2018年5月15日
				AU	2009301431	A1	2010年4月15日
				AU	2009301431	B2	2013年10月31日
				AU	2009301431	B8	2013年11月14日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/085610

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CR 20110166 A	2011年6月3日
		MA 32712 B1	2011年10月2日
		KR 20110055726 A	2011年5月25日
		KR 101345522 B1	2013年12月31日
		IL 211729 A0	2011年6月30日
		IL 211729 A	2015年10月29日
		EP 2344537 A1	2011年7月20日
		EP 2344537 B1	2014年1月29日
		MX 2011003190 A	2011年4月27日
		EP 2781526 A1	2014年9月24日
CN 101370519 A	2009年2月18日	NO 20082448 L	2008年7月10日
		NZ 569787 A	2011年7月29日
		UY 30015 A1	2007年7月31日
		AR 058359 A1	2008年1月30日
		US 2014023654 A1	2014年1月23日
		AU 2006324477 A1	2007年6月21日
		US 2011097321 A1	2011年4月28日
		JP 2009521412 A	2009年6月4日
		JP 5179373 B2	2013年4月10日
		EP 3168234 A1	2017年5月17日
		US 2012288497 A1	2012年11月15日
		ES 2411505 T3	2013年7月5日
		ZA 200805158 B	2009年11月25日
		CA 2633211 A1	2007年6月21日
		BR-PI 0619853 A2	2016年8月23日
		EP 2518083 A2	2012年10月31日
		EP 2518083 A3	2012年12月5日
		EP 1962903 A1	2008年9月3日
		EP 1962903 B1	2013年3月13日
		TW 200730191 A	2007年8月16日
		US 2016251421 A1	2016年9月1日
		US 2009123474 A1	2009年5月14日
		KR 20080073766 A	2008年8月11日
		KR 101371773 B1	2014年3月7日
		JP 2012211155 A	2012年11月1日
		WO 2007068895 A1	2007年6月21日
		WO 2007068895 A9	2008年6月12日
		AU 2011201326 A1	2011年4月14日
		AU 2011201326 B2	2012年1月12日
US 5877291 A	1999年3月2日	EP 0628078 A1	1994年12月14日
		EP 0628078 B1	1999年12月8日
		CA 2117477 A1	1994年6月23日
		CA 2117477 C	2001年6月12日
		AT 187494 T	1999年12月15日
		AU 5747794 A	1994年7月4日
		AU 680461 B2	1997年7月31日
		JPH 07503622 A	1995年4月20日
		JP 3312357 B2	2002年8月5日
		WO 9413806 A1	1994年6月23日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/085610

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				US	5892020	A	1999年4月6日
				SG	55079	A1	1998年12月21日
				DE	69327229	D1	2000年1月13日
				DE	69327229	T2	2000年3月30日
CN	104761643	A	2015年7月8日	NZ	545135	A	2009年10月30日
				HK	1211600	A1	2016年5月27日
				IL	173317	A0	2006年6月11日
				IL	173317	A	2016年2月29日
				US	2013266581	A1	2013年10月10日
				US	9018357	B2	2015年4月28日
				US	2012322982	A1	2012年12月20日
				US	8492527	B2	2013年7月23日
				US	2017073405	A1	2017年3月16日
				EA	200600344	A1	2006年8月25日
				EA	012835	B1	2009年12月30日
				MXPA	06001319	A	2006年5月4日
				KR	20160052799	A	2016年5月12日
				US	2015232549	A1	2015年8月20日
				US	9353177	B2	2016年5月31日
				OA	13225	A	2006年12月13日
				NO	20061014	L	2006年4月24日
				CA	2932216	A1	2005年2月10日
				KR	20110059806	A	2011年6月3日
				KR	20130098436	A	2013年9月4日
				JP	2011046732	A	2011年3月10日
				JP	5162644	B2	2013年3月13日
				CA	2533297	A1	2005年2月10日
				CA	2533297	C	2016年6月7日
				IL	243914	A0	2016年4月21日
				US	2010189719	A1	2010年7月29日
				US	8092797	B2	2012年1月10日
				SG	193170	A1	2013年9月30日
				US	2006280747	A1	2006年12月14日
				US	7811785	B2	2010年10月12日
				US	2005106667	A1	2005年5月19日
				NZ	575674	A	2010年8月27日
				WO	2005012359	A2	2005年2月10日
				WO	2005012359	A3	2005年12月15日
				KR	20120074336	A	2012年7月5日
				KR	101446849	B1	2014年10月15日
				BR-PI	0412637	A	2006年9月26日
				JP	2007526756	A	2007年9月20日
				JP	4845732	B2	2011年12月28日
				KR	20140048973	A	2014年4月24日
				KR	101644717	B1	2016年8月1日
				KR	20060067950	A	2006年6月20日
				KR	101359142	B1	2014年2月7日
				EP	1648939	A2	2006年4月26日
				SG	145725	A1	2008年9月29日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2023/085610			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
				US	2011020346	A1	2011年1月27日
				US	8101177	B2	2012年1月24日
				EP	2420512	A2	2012年2月22日
				EP	2420512	A3	2013年8月21日
				AU	2004262006	A1	2005年2月10日
				AU	2004262006	A2	2011年12月22日
				AU	2004262006	B2	2012年10月18日
				US	2007141065	A1	2007年6月21日
				US	7691977	B2	2010年4月6日
CN	1795208	A	2006年6月28日	ZA	200508280	B	2007年4月25日
				WO	2004106381	A1	2004年12月9日
				US	2007123479	A1	2007年5月31日
				US	7635472	B2	2009年12月22日
				RU	2005141512	A	2007年7月20日
				JP	2008501621	A	2008年1月24日
				JP	2015110628	A	2015年6月18日
				AU	2004242846	A1	2004年12月9日
				JP	2013063981	A	2013年4月11日
				JP	6025502	B2	2016年11月16日
				CA	2522586	A1	2004年12月9日
				CA	2522586	C	2017年2月21日
				EP	1629012	A1	2006年3月1日
				EP	1629012	B1	2018年11月28日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 0 7 K	16/22 (2006.01)	C 0 7 K	16/22	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW ,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL ,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW , High - tech Zone Hefei , Anhui 230031 China

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 才 源

中華人民共和国 2 3 0 0 3 1 安徽省合肥市高新区望江西路 5 0 8 9 号中国科学技術大学先進技術研究院嵌入式研発楼 1 0 3 - A 6

(72)発明者 馬 珍

中華人民共和国 2 3 0 0 3 1 安徽省合肥市高新区望江西路 5 0 8 9 号中国科学技術大学先進技術研究院嵌入式研発楼 1 0 3 - A 6

(72)発明者 周 佩佩

中華人民共和国 2 3 0 0 3 1 安徽省合肥市高新区望江西路 5 0 8 9 号中国科学技術大学先進技術研究院嵌入式研発楼 1 0 3 - A 6

(72)発明者 張 明亮

中華人民共和国 2 3 0 0 3 1 安徽省合肥市高新区望江西路 5 0 8 9 号中国科学技術大学先進技術研究院嵌入式研発楼 1 0 3 - A 6

(72)発明者 趙 錦

中華人民共和国 2 3 0 0 3 1 安徽省合肥市高新区望江西路 5 0 8 9 号中国科学技術大学先進技術研究院嵌入式研発楼 1 0 3 - A 6

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA43 CA44

4C084 AA13 MA58 MA66 NA14 ZA33 ZA89 ZA96 ZB15 ZB26

4C085 AA14 BB11 BB31 DD62 EE01 GG01

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA58 MA66 NA14 ZA33 ZA89 ZA96
ZB15 ZB26

4H045 AA10 AA11 BA09 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74