

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-513072

(P2025-513072A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全31頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-560502(P2024-560502)	(71)出願人	524365911
(86)(22)出願日	令和5年4月11日(2023.4.11)		合肥星眸生物科技有限公司
(85)翻訳文提出日	令和6年12月9日(2024.12.9)		Starrygene Therapeutics Co., Ltd.
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/087598		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进技术研究院嵌入式研发楼103-A6
(87)国際公開番号	WO2023/198050		Embedded R&D Building 103-A6, Institute of Advanced Technology, University of Science and Technology of China, 5089 Wangjiang West Road
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	202210383577.X		
(32)優先日	令和4年4月12日(2022.4.12)		
(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)		

(54)【発明の名称】 融合型アデノ随伴ウイルスおよびその使用

(57)【要約】

本発明は生物学的医薬品の分野に関する。本発明は、融合型アデノ随伴ウイルスならびに耳疾患および眼科疾患におけるその使用を開示する。融合アデノ随伴ウイルスは、血清型AAV1、AAV2、AAV6およびAAV7のペプチドフラグメントまたはそれらの変異体を融合させて形成された融合ペプチドフラグメントを含み、眼科疾患の処置のためにRPE層に効率的に感染できる。融合型アデノ随伴ウイルスは、安全なベクターとして眼科疾患の治療に幅広い応用が期待されている。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質であって、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 6 および A A V 7 由来のペプチドフラグメントの融合ペプチドフラグメント、またはそれらの変異体を含むことを特徴とする、融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質。

**【請求項 2】**

前記融合ペプチドフラグメントは、第 1 のペプチドフラグメント、第 2 のペプチドフラグメント、第 3 のペプチドフラグメント、第 4 のペプチドフラグメントおよび第 5 のペプチドフラグメントが順に連結されて含まれることを特徴とし、ここで、第 1 のペプチドフラグメントは A A V 1 由来のペプチドフラグメントを含み、第 2 のペプチドフラグメントは A A V 7 由来のペプチドフラグメントを含み、第 3 のペプチドフラグメントは A A V 2 由来のペプチドフラグメントを含み、第 4 のペプチドフラグメントは A A V 1 を含むペプチドフラグメントに由来し、かつ第 5 のペプチドフラグメントは A A V 6 を含むペプチドフラグメントに由来する、請求項 1 に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質。

10

**【請求項 3】**

第 1 のペプチドフラグメントが配列番号 3 に示されるアミノ酸フラグメントを含み、第 2 のペプチドフラグメントが配列番号 4 に示されるアミノ酸フラグメントを含み、第 3 のペプチドフラグメントが配列番号 5 に示されるアミノ酸フラグメントを含み、第 4 のペプチドフラグメントが配列番号 6 に示されるアミノ酸フラグメントを含み、かつ第 5 のペプチドフラグメントが配列番号 7 に示されるアミノ酸フラグメントを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質。

20

**【請求項 4】**

1) 血清型 A A V 1 および A A V 6 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 3 回対称軸 (3-fold symmetry axis) の突起に組み立てられる；  
2) 血清型 A A V 2、A A V 6 および A A V 7 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 5 回対称軸 (5-fold symmetry axis) のチャンネルに組み立てられる；  
3) 血清型 A A V 6 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 2 回対称軸 (2-fold symmetry axis) の窪みを形成する  
の少なくとも何れか 1 つを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質。

30

**【請求項 5】**

a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；  
b) 配列番号 2 と 90% 以上の配列同一性を有し、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の機能を有するポリペプチドフラグメント  
を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質。

**【請求項 6】**

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質をコードすることを特徴とする、核酸。

40

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の核酸を含む、コンストラクト。

**【請求項 8】**

融合アデノ随伴ウイルスのカプシド構造が、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を含むことを特徴とする、融合アデノ随伴ウイルス。

**【請求項 9】**

融合アデノ随伴ウイルスが、目的産物をコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の融合アデノ随伴ウイルス、好ましくは、前記目的産物は核酸またはタンパク質であり、より好ましくは、前記核酸は低分子ガイド RNA また

50

は干渉RNAを含む、請求項8に記載の融合アデノ随伴ウイルス。

【請求項10】

宿主細胞であって、該宿主細胞が請求項7のコンストラクトを含むか、該宿主細胞のゲノムが請求項6の外來核酸を組み込むか、該宿主細胞が請求項1から5のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を含むか、または該宿主細胞が請求項8もしくは9に記載の融合アデノ随伴ウイルスで形質転換されることを特徴とする、宿主細胞。

【請求項11】

請求項6に記載の核酸を含むパッケージングプラスミドを含むことを特徴とする、融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム。

【請求項12】

パッケージングプラスミドがアデノ随伴ウイルスのrep遺伝子フラグメントをさらに含むことを特徴とする、請求項11に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム。

【請求項13】

アデノ随伴ウイルスベクターシステムが、目的産物をコードする異種ヌクレオチドを含む発現プラスミドをさらに含むことを特徴とする、請求項12に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム、好ましくは、目的産物は核酸またはタンパク質であり、より好ましくは、核酸は低分子ガイドRNAまたは干渉RNAを含む、請求項12に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム。

【請求項14】

アデノ随伴ウイルスベクターシステムがさらにヘルパーウイルスプラスミドまたはヘルパーウイルスを含み、アデノ随伴ウイルスベクターシステムがさらに宿主細胞を含むことを特徴とする、請求項11から13のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム。

【請求項15】

請求項11から14のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステムのウイルスパッケージングにより得られる、融合アデノ随伴ウイルス。

【請求項16】

医薬組成物またはコンジュゲートであって、該医薬組成物が、請求項8、9および15のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスと、薬学的に許容される補助物質とを含み、該コンジュゲートが、請求項8、9および15のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスおよびそれに連結された生理活性ポリペプチドを含むことを特徴とする、医薬組成物またはコンジュゲート。

【請求項17】

請求項1から5のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質、請求項6に記載の核酸、請求項7に記載のコンストラクト、請求項8、9および15のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルス、請求項10に記載の宿主細胞、請求項11から14のいずれか一項に記載の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム、または請求項16に記載の医薬組成物もしくはコンジュゲートの、疾患の予防および/もしくは処置のための医薬の調製における使用。

【請求項18】

疾患が、聴覚障害性疾患、眼科疾患、炎症、腫瘍、代謝性疾患、疼痛および神経変性炎症性疾患の1以上から選択されることを特徴とする、請求項17に記載の使用。

【請求項19】

眼疾患が、ドライ型加齢黄斑変性(AMD)、ウェット型AMD、または脈絡膜新生血管(CNV)などのRPE層関連疾患、例えば、加齢黄斑変性(AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、脈絡膜新生血管膜(CNVM)、嚢胞様黄斑浮腫(CME)、網膜上膜(ERM)、および黄斑円孔;近視に関連した脈絡膜新生血管、血管痙、網膜剥離、糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫(DME)、網膜色素上皮細胞(RPE)の萎縮性病変、網膜色素上皮細胞(RPE)の肥大性病変、網膜静脈閉塞症、脈絡膜網膜静脈閉塞症、黄斑浮腫

10

20

30

40

50

；低酸素による角膜血管新生、翼状片結膜、網膜下浮腫、網膜内浮腫；網膜静脈閉塞症、網膜色素変性症、スターガルト病、緑内障、炎症性疾患、白内障、難治性異常、円錐角膜、未熟児網膜症、眼球前血管新生、角膜炎後の角膜血管新生、角膜移植、角膜形成術による黄斑浮腫；例えば、レーバー先天性黒内障（LCA）、網膜色素変性症、RPE細胞関連遺伝子変異によるスターガルト病などから選択され得るRPE層関連疾患であることを特徴とする、請求項18に記載の使用、

【請求項20】

医薬が疾患の遺伝子治療に用いられることを特徴とする、請求項17に記載の使用。

【請求項21】

- 1) 聴覚障害は、若年者の蝸牛支持細胞関連聴覚障害を意味する； 10
  - 2) 聴覚障害は、成人における蝸牛内有毛細胞関連の聴覚障害を意味する；
  - 3) 内毛細胞の再生を誘導するために医薬を用いる；
  - 4) 眼疾患はRPE層に関連した疾患である；
  - 5) 聴覚障害は蝸牛の損傷によって引き起こされる；
  - 6) 聴覚障害は細胞の損傷に係する疾患である；
  - 7) 聴覚障害は、遺伝子欠失によって引き起こされる関連疾患である；
  - 8) 聴覚障害疾患は環境要因によって引き起こされる関連疾患であり、環境要因は騒音または毒性薬物から選択される；あるいは
  - 9) 聴覚障害は加齢によって引き起こされる関連疾患である
- の少なくとも1つを含むことを特徴とする、請求項17に記載の使用。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は生物薬物の分野に関し、融合アデノ随伴ウイルスおよびその使用、特に耳疾患および/または眼疾患の予防および/または処置に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

現在までに知られているヒトの疾患は約7,000種あり、そのうちの約80%が遺伝的な問題によって引き起こされ、世界で3億人以上の人々が遺伝的な疾患に深く悩まされている。現在の化学療法およびタンパク質療法などで治療可能なヒトの疾患は500種未満であり、遺伝的な問題に起因する疾患に対する治療は一般に不十分である。そのため、新薬の開発および治療法の開発が必要とされている。 30

【0003】

遺伝子治療は、機能不全に陥った遺伝子を打ち消したり、または置換したりするために、機能的な遺伝子を患者の体内に送達し、化学的介入、放射線療法または外科的手術をせずに疾患を治療できる新しい治療法である。遺伝子治療は、ウイルス性または非ウイルス性のベクターを介して標的細胞に遺伝物質を導入し、欠陥のある遺伝子を修正または補充することで疾患を処置または予防するものであり、処置の効果は反復介入することなく長期間持続する。エクスピボ遺伝子治療は、患者から標的細胞を採取し、遺伝子を改変して患者に戻すものである。インスピボ遺伝子治療は、遺伝物質を患者の標的臓器または組織に直接投与するものである。現在、癌、失明、免疫疾患、神経疾患など様々な疾患の処置に種々のタイプの遺伝子治療戦略が用いられている。 40

【0004】

ウイルスベクターは、細胞内に侵入して遺伝物質を導入する効率が高いため、遺伝子治療導入ベクターとして最も一般的に用いられており、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)などがよく用いられている。現在では、AAVベクターはインスピボでの遺伝子治療の臨床試験で優れた結果を収めており、インスピボでの遺伝子治療の臨床試験では、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベク 50

ターが好ましいベクターとなっている。AAVが治療用遺伝子送達ベクターとして成功した主な要因は、免疫原性が低く、病原性がないことである。AAVベクターが遺伝子治療の主要な遺伝子送達ツールの1つになったことは、複数の市販薬の承認および現在進行中の臨床試験が証明している。2012年、Glyberaはリポタンパク質リパーゼ欠損症の治療薬として欧州で初めて承認されたAAV療法である。これらの薬剤が市場に出回っていることは、AAVを用いた処置法の安全性および有効性を明確に示している。その後、2017年にレーパー先天性黒内障治療薬Luxturna、および2019年に脊髄性筋萎縮症(SMA)治療薬Zolgensmaがそれぞれ米国食品医薬品局(FDA)より承認された。現在の臨床研究では、遺伝子置換、遺伝子サイレンシングまたは遺伝子編集による単一遺伝子疾患の処置に焦点が当てられている。AAVは、がん、失明、免疫疾患、神経疾患などさまざまな病気の治療に用いられるほか、ワクチンの開発にも用いられることが期待されている。

10

#### 【0005】

AAVは免疫原性が低く、かつ病原性が低いという特徴があり、AAVを用いた遺伝子治療も驚くべき成功を収めているが、ヒトの免疫系に天然のAAVカプシドタンパク質の中和抗体が存在するため、現在では50%までの患者がこの治療法から除外されている。このような免疫障害を回避するために、操作されたAAVカプシドを用いて既存の中和抗体を回避する方法、または処置前に中和抗体を一時的に除去する方法を採用できる。操作されたAAVカプシドは、中和抗体を回避できるだけでなく、AAVを予想される組織細胞型に標的化でき、それによって正確な処置の目的を達成できる。指向性進化は、AAVカプシドの現在の改変のための強力なツールであり、原理的には、指向性進化は遺伝子およびそれにコードされたタンパク質に変異を導入するハイスループットの技術的手段を用い、タンパク質の多様化および選択プロセスを大幅に加速するために自然進化をシミュレートする。この方法は、標的遺伝子の配列多様性ライブラリーの確立、変異遺伝子ライブラリーによってコードされるタンパク質ライブラリーからのスクリーニング、および必要なキャラクターをコードする遺伝子配列の増幅という3つの基本ステップを含む。これら3つのステップで指向性進化の1ラウンドが構成され、改良された特性を有する特定の遺伝子/タンパク質が得られるまで、複数回ラウンドの進化的スクリーニングを繰り返すことができる。

20

#### 【0006】

しかしながら、アデノ随伴ウイルスを聴覚系遺伝子治療用ベクターとして用いる現在の使用では、組織特異性が低い、感染効率が低いなどの欠点があり、例えば、アデノ随伴ウイルスベクターは、有毛細胞に感染する一方で支持細胞にも感染することが知られており、支持細胞および有毛細胞はそれぞれ異なる病原遺伝子を発現しており、ベクター感染の非特異性は疾患治療に悪影響を及ぼす。したがって、正確な遺伝子治療を達成するためには、効率的かつ特異的な新規組換えアデノ随伴ウイルスベクターが必要とされる。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

##### 概要

本発明は、先行技術の欠点を克服することを目的とし、遺伝子治療のために蝸牛、眼球網膜、その他の組織に効率的かつ特異的に遺伝子を導入できる新規アデノ随伴ウイルスベクターを提供する。本発明は、改変された新規アデノ随伴ウイルスベクターをマウスの蝸牛にインビボで感染させ、標的遺伝子を介して蝸牛支持細胞で特異的に発現させ、該支持細胞を特異的に標識または制御することができる。新規アデノ随伴ウイルスは、蝸牛支持細胞の構造および機能解析、疾患モデルの確立、遺伝子治療など、幅広い応用価値および市場展望を有している。一方、このウイルスを硝子体を通してマウスの眼球に注入したところ、既存のベクターと比べて感染特性に優れ、また眼細胞の構造および機能解析、疾患モデルの確立、遺伝子治療など、幅広い応用価値および市場展望を有することが見いだされた。

40

#### 【0008】

50

本発明の1つの目的は、血清型AAV1、AAV2、AAV6およびAAV7のペプチドフラグメントの融合ペプチドフラグメント、またはその変異体を含む融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を提供することである。

【0009】

本発明の別の目的は、上記の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質をコードする核酸を提供することである。

【0010】

本発明のもう一つの目的は、上記の核酸を含むコンストラクトを提供することである。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、上記の外来核酸を組み込んだコンストラクトまたはゲノムを含む宿主細胞、あるいは上記の融合アデノ随伴ウイルスを含む宿主細胞を提供することである。

10

【0012】

本発明の別の目的は、融合アデノ随伴ウイルスを提供することであり、融合アデノ随伴ウイルスのカプシド構造は、上記のいずれか1つに記載の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を含む。

【0013】

上記の融合型アデノ随伴ウイルスを用いて形質転換された宿主細胞。

【0014】

本発明のもう一つの目的は、上記の核酸または核酸断片を含むパッケージングプラスミドを含む融合アデノ随伴ウイルスベクターシステムを提供することである。

20

【0015】

本発明のもう一つの目的は、上記の融合アデノ随伴ウイルスベクターシステムのウイルスパッケージングによって得られる融合アデノ随伴ウイルスを提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、上記の融合アデノ随伴ウイルスと、薬学的に許容される補助材料とを含む医薬組成物を提供することである。

【0017】

本発明の別の目的は、疾患を処置するための医薬；好ましくは、疾患の遺伝子治療のための医薬、の調製における、上記の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質、核酸、コンストラクト、融合アデノ随伴ウイルス、宿主細胞、融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム、医薬組成物または結合体の使用を提供することである。

30

【0018】

先行技術と比較して、本発明は以下の利点および有益な効果を有する：(1)新生マウスの蝸牛支持細胞における標的遺伝子の特異的発現を媒介できる支持細胞特異的新規アデノ随伴ウイルスベクターの提供；(2)成体マウスの蝸牛の有毛細胞における標的遺伝子の特異的発現を媒介できる新規アデノ随伴ウイルスベクターの提供；(3)成体マウスの網膜RPE層における標的遺伝子の特異的発現を媒介できる新規アデノ随伴ウイルスベクターの提供；(4)新規アデノ随伴ウイルスベクターが、従来のトランスジェニック法よりも柔軟で、安全で、簡便で、コスト効率よく標的遺伝子の発現を媒介する；および、(5)新規の特異的アデノ随伴ウイルスベクターが、耳鼻咽喉科および眼科関連疾患を的確に処置する遺伝子治療の開発を可能にする。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、DNAファミリーシャッフリングライブラリーのインピボスクリーニング手順を示す。

【図2】図2は、コンピューターでシミュレートしたAAV-M9の構造図を示す。

【図3】図3は、新生仔マウスにおけるアデノ随伴ウイルスの感染特性を示す。図3aは、新生仔マウスの蝸牛にAAV-ieおよびAAV-M9を注入して14日後、蝸牛組織を摘出および解剖した後の緑色蛍光EGFPおよび有毛細胞特異的マーカータンパク質M

50

y o 7 a の免疫染色写真を示す。有毛細胞層の写真が選択されている。図 3 b は、新生児マウスの蝸牛に A A V - i e および A A V - M 9 を注入して 1 4 日後、蝸牛組織を摘出および解剖した後の緑色蛍光 E G F P および有毛細胞特異的マーカータンパク質 M y o 7 a の免疫染色写真を示す。支持細胞層の写真が選択されている。図 3 c は、図 3 a、3 b 中の有毛細胞およびダイターズ細胞 (dieters cell) のデータ統計を示す。

【図 4】図 4 は、新生仔マウスにおけるアデノ随伴ウイルスの安全性を示す。図 4 a は、新生仔マウスの蝸牛および正常マウスの蝸牛組織に A A V - M 9 を注入して 1 4 日後に蝸牛組織を摘出および解剖した後の有毛細胞特異的マーカータンパク質 M y o 7 a の免疫染色写真を示す。図 4 b は、図 4 a の外有毛細胞および内有毛細胞のデータ統計である。

【図 5】図 5 は、成体マウスにおけるアデノ随伴ウイルスの感染特性を示す。図 5 a は、成体マウスの蝸牛に A A V - i e および A A V - M 9 を注入して 1 4 日後、蝸牛組織を摘出および解剖した後の緑色蛍光 E G F P および有毛細胞特異的マーカータンパク質 M y o 7 a の免疫染色写真を示す。図 5 b は図 5 a の外有毛細胞に関するデータ統計を示す。図 5 c は図 5 a の有毛細胞内側のデータ統計を示す。

【図 6】図 6 は、成体マウスにおけるアデノ随伴ウイルスの安全性を示す。図 6 a は、成体マウスの蝸牛および正常マウスの蝸牛組織に A A V - M 9 を注入してから 1 4 日後に蝸牛組織を摘出および解剖した後の有毛細胞特異的マーカータンパク質 M y o 7 a の免疫染色写真を示す。図 6 b は、図 6 a の外有毛細胞と内有毛細胞のデータ統計を示す。

【図 7】図 7 は、眼球の R P E 層における A A V - M 9 - C M V - E G F P の感染を示す。

【図 8】図 8 は、非霊長動物における眼球トランスフェクションのための A A V - M 9 - C M V - E G F P の特徴を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な説明

以下、具体的な実施例を通じて本発明の態様を説明するが、本発明の他の利点および効果は、本明細書の開示から当業者には容易に明らかであり得る。本発明は、他の異なる具体的な態様を通じて実施または適用することも可能であり、本明細書における様々な詳細も、本発明の精神を逸脱することなく、異なる観点および用途に基づいて様々に修正または変更できる。

【0021】

本発明は、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 6 および A A V 7 のペプチドフラグメントまたはその変異体の融合により形成されたペプチドフラグメント (融合ペプチドフラグメントまたはキメラペプチドフラグメント) を含む融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を提供する。

【0022】

いくつかの好ましい態様において、融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質において、融合ペプチドフラグメントは、順に連結された第 1 のペプチドフラグメント、第 2 のペプチドフラグメント、第 3 のペプチドフラグメント、第 4 のペプチドフラグメントおよび第 5 のペプチドフラグメントを含む；第 1 のペプチドフラグメントは A A V 1 由来のペプチドフラグメントを含み、第 2 のペプチドフラグメントは A A V 7 由来のペプチドフラグメントを含み、第 3 のペプチドフラグメントは A A V 2 由来のペプチドフラグメントを含み、第 4 のペプチドフラグメントは A A V 1 を含むペプチドフラグメントに由来し、第 5 のペプチドフラグメントは A A V 6 を含むペプチドフラグメントに由来する。好ましくは、第 1 のペプチドフラグメントは、配列番号 2 (配列番号 3) の位置 1 から位置 2 6 2 までのアミノ酸フラグメント (配列番号 3) を含み、第 2 のペプチドフラグメントは、配列番号 2 の位置 2 6 3 から位置 3 2 5 までのアミノ酸フラグメント (配列番号 4) を含み、第 3 のペプチドフラグメントは、配列番号 2 の位置 3 2 6 から位置 4 1 7 までのアミノ酸フラグメント (配列番号 5) を含み、第 4 のペプチドフラグメントは、配列番号 2 の位置 4 1 8 から位置 5 8 3 までのアミノ酸フラグメント (配列番号 6) を含み、第 5 のペ

10

20

30

40

50

チドフラグメントは配列番号2の位置584から位置736までのアミノ酸フラグメント(配列番号7)を含み、そして融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質はS430I変異を含む。

【0023】

【表1-1】

表1. 配列情報

配列番号	配列情報	特記
1	atggctgccgatggttatcttcagattggctcagggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaac ctggagccccgaagcccaagccaaccagcaaaaagcaggacgacggccgggctggtgcttctggctacaagta cctcggacccttcaacggactcgacaaggggagccgtcaacgcgcggaacgcagcggccctcgagcagcaag gcctacgaccagcagctcaaaaggggtgacaatcctacctcgggtataaccacggcagcggatttcaggagcg tctgcaagaagatacgtcttttggggcaacctcgggagcagctctccaggccaagaagcgggttctgaaacct cggctcgtggttaggaaaggcgttaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagc tcctcctcgggcatcggcaagacaggccagcagccgctaaaaagagactcaatlttggctcagactggcagctcaga gtcagctccccgatccacaacctcgggagaacctccagcaacccccgctgctgaggacctaactacaatggctcagg cggtagcgcaacaatgagcaacaatacgaaggcggcagcggagtggttaatgctcaggaaattggcattgcgat tccacatggctggcgacagagatcaccaccagcaccgcaactgggctgcccacctacaacaatcacctctac aagcaaatctcagtgaaactcgagtagtaccacaacgacaacactactcggctacagcaccctcggggatattt gactttaacagattccactcactctcaccacgtgactggcagcagctcatcaacaacactggggattcggccc aagaagctcgggttaacgtcttcaacatccaggtcaaggaggtcagcagaatgacggtagcagcagcagattgcca ataacctaccagcagcgtttaggttactgactcggagtagcagcctccgtactcctcggctcggcgcatcaagg atgctcccggcgttcccagcagcagctctcagtgccacagatggatacctcaccctgaacaacgggagtcaggc agtaggacgctctctatttactgctggaatlttcccacgagatgctgagaacgggcaataactttacctcagct acaccttggaggaagtgccttccacagcagctacgacgacagccagatcctggaccggctgatgaatcctctatc accaatacctgtaltacctgaacagaactcaaaatcagtcggaaagtcgcaaaacaaggacttgcgttttagccgtg ggctcctcagctggcatgctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaac aaaaacagacaacaacaacagcaatlttacctggactggcttcaaaatataacctcaatggcgtgaaatccatca tcaacctggcactgctatggctcacacaagacgacgaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgatatttgg aaaagagagcggcggagcttcaaacactgcatggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaaagccact aacccccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagtcactcagagcagcagcagaccctgcgaccggag atgtgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagcgtatacctcagggaccatttgggcca agattcctcacaccgatggacatttcatccttctcactgatgggaggttttgggctcaaacccccctcctcagatc ctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctcggcggagttttagctcaaaagttgcttattcatccaata ctccacaggacaagtgatggtgaaatgaaatgggagctcgaaagaaaaacagcaagcgtggaatcccgaagt gcagtagcacaatcaatgcaaaaatcggcaacgttgatttactgtggacaacaatggactttactgagcctcggc ccattggcaccgttacctaccgctccctgtaa	核酸配列
2	MAADGYLPDWLEDNLSEGREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGL DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVF QAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSSES VPDPQLGEPATPAAVGPTTMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR VITSTRTWALPTYNNHLYKQISSSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRLI NNNWGFRPKLRFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCL PPFPADVFMVVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEEVPHSSYA HSQILDRLMNPIDQYLYLNRQNSGSAQNKDLLFSRGSAPGMSVQPKNWLPGPCYRQ QRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKFFPMSGVMIFGKES AGASNTALDNNVITDEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSDPATGDVHVMMGALPMMVW QDRDVYLQGPWAKIPHDTGHFHPSPLMGGFGLKHPPIQILKNTVPANPPAEFSATKFAF ITQYSTGQVSVIEIWEQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLT RPL	アミノ酸配列
3	MAADGYLPDWLEDNLSEGREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGL DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVF QAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSSES VPDPQLGEPATPAAVGPTTMSAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDR VITSTRTWALPTYNNHLYKQISS	アミノ酸配列
4	ETAGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKLRFKLFNIQVKE VT	アミノ酸配列
5	QNDGTTIANLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVVPQYGYLTLNNGSQ AVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFE	アミノ酸配列

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

6	EVPFHSSYAHSQILDRLMNPIDQYLYLNRTONQSGSAQNKDLLFSRGSPPAGMSVQPKNW LPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDEDEDKFFPMSG VMIFGKESAGASNTALDENVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVN	アミノ酸 配列
7	LQSSSTDPATGDVHVVMGALPGMVWQDRDQVYLGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKH PPPQILIKNTVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVIEIWEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYA KSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL	アミノ酸 配列
8	gtcaggcaacgtggcgtggtg	核酸配列
9	ggcgatgagttccgccgtggc	核酸配列

10

## 【0024】

本発明の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質では、ペプチドフラグメントは互いに直接融合している。

## 【0025】

本発明の融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質において、血清型 AAV1 および AAV6 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 3 回対称軸 (3-fold symmetry axis) の突起に集合する。血清型 AAV2、AAV6 および AAV7 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 5 回対称軸 (5-fold symmetry axis) のチャンネルに集合する。血清型 AAV6 のペプチドフラグメントは、カプシドタンパク質の 2 回対称軸 (2-fold symmetry axis) に窪みを形成し、そのコンピュータシミュレーション構造図を図 2 に示す。

20

## 【0026】

電子顕微鏡で見ると、アデノ随伴ウイルスのヌクレオカプシドは一般に亜球状 (subo rbicular) である。亜球状カプシドは、実際には複数のタンパク質カプソメアからなる閉じた 20 面体対称の中空カプシドであり、その中にゲノム核酸が包まれている。1 つの正 20 面体対称構造は、3 つの回転対称モードで構成されている。3 回対称、2 回対称、5 回対称である。すなわち、対称三次元構造は、ウイルス粒子の 2 つの対向する側面の中心点を通る 3 回対称軸を有し、その周りにカプソメアが 3 回転してリセットされ、三角形の表面を形成する。2 回対称軸 (エッジ) を有し、その周りにカプソメアを 2 回転させてリセットし、2 つの交差する三角形面を形成し、および 2 つの対向する頂点を通る 5 回対称軸を有し、その周りにカプソメアを 5 回転させてリセットし、ペンタメル (pentamer) を形成する。したがって、正 20 面体対称のカプシドは 20 の正三角形面で構成され、2 つの三角形面はすべて交差して辺を形成し、合計 30 の辺を形成する。

30

## 【0027】

いくつかの好ましい態様では、カプシドタンパク質は、

- a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列；または
- b) 配列番号 2 と 90% 以上の配列同一性を有し、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の機能を有するポリペプチドフラグメントを含む。

## 【0028】

b) のポリペプチドフラグメントとは、具体的には、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に 1 もしくは複数の (具体的には、1 - 50、1 - 30、1 - 20、1 - 10、1 - 5、1 - 3、1、2 または 3 個の) アミノ酸を置換、欠失もしくは付加して得られるポリペプチドフラグメント、または配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の N 末端および / もしくは C 末端に 1 もしくは複数の (具体的には、1 - 50、1 - 30、1 - 20、1 - 10、1 - 5、1 - 3、1、2 または 3 個の) アミノ酸を付加して得られるポリペプチドフラグメントであって、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の機能を有するものを意味し、a) のアミノ酸配列は、配列番号 2 に対して、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 以上の配列同一性を有していてもよい。

40

## 【0029】

50

いくつかの好ましい態様において、カプシドタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含み、好ましくは、カプシドタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列は配列番号 1 に示される。いくつかの好ましい態様において、カプシドタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列は、配列番号 1 に対して 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0030】

本発明はまた、上記のような融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質をコードする核酸を提供する。

【0031】

本発明はまた、上記核酸を含むコンストラクトを提供する。コンストラクトは一般に、上記のような核酸を適切な発現ベクターに挿入することによって得ることができ、適切な発現ベクターは当業者によって選択できる。

【0032】

本発明はさらに宿主細胞を提供し、ここで宿主細胞は上記コンストラクトを含むか、または宿主細胞のゲノムが上記外来核酸を組み込むか、または宿主細胞は上記のいずれか 1 つに記載の融合アデノ随伴ウイルスを含む。

【0033】

好適な宿主細胞の代表例としては、哺乳動物細胞（CHO または COS など）、植物細胞、ヒト細胞（HEK 293 FT などのヒト胚性腎臓細胞）、細菌細胞（大腸菌、ストレプトマイセス属、サルモネラ・チフスマリウムなど）、真菌細胞（酵母など）、昆虫細胞（Sf9 など）などを例示できる。当業者は、本明細書の教示に従って適切な宿主を選択できる。好ましくは、宿主細胞は動物細胞であり、より好ましくはヒト細胞である。宿主細胞は培養細胞であってもよいし、初代細胞、すなわちヒトなどの生物から直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は接着細胞であってもよいし、浮遊細胞、すなわち懸濁状態で増殖させた細胞であってもよい。

【0034】

本発明はまた、上記のいずれか 1 つの融合アデノ随伴ウイルスカプシドタンパク質を含む融合アデノ随伴ウイルスを提供する。

【0035】

さらに、融合アデノ随伴ウイルスは、目的産物をコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含み、目的産物をコードする異種ヌクレオチド配列は、様々なカプシドタンパク質によってカプセル化され、運ばれ得る。上記の目的産物をコードする異種ヌクレオチド配列は、一般にコンストラクトであってもよく、それは一般に目的産物をコードする核酸から構成されていてもよい。コンストラクトは、一般に、目的産物をコードする核酸を適切な発現ベクターに挿入することによって得られる。適切な発現ベクターは、当業者によって選択され得る。例えば、発現ベクターとしては、pAAV-CAG、pAAV-TRE、pAAA-EF1a、pAAV-GFAP プロモーター、pAAA-Lgr5 プロモーター、pAAA-Sox2 プロモーター発現ベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、融合アデノ随伴ウイルスが目的産物をコードする異種ヌクレオチド配列を含む場合、融合アデノ随伴ウイルスはカプシドを含み、ウイルスベクターは遺伝子産物をコードする導入遺伝子を運び、導入遺伝子は宿主細胞における発現を誘導する調節配列によって調節される。いくつかの好ましい態様において、カプシドタンパク質のアミノ酸配列は配列番号 2 に示される。

【0036】

さらに、目的産物は核酸またはタンパク質であってもよく、核酸はスモールガイド RNA (sgRNA)、干渉 RNA (RNAi) などが挙げられるが、これらに限定されることなく、そしてタンパク質をコードする遺伝子はプレスチンおよび Atoh1 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

10

20

30

40

50

融合アデノ随伴ウイルスは、試験個体の細胞に外来遺伝子を導入するためのベクター材料として用いることができ、AAV-*ie*などのアデノ随伴ウイルスと比較して、幼若個体の支持細胞に特異的に感染し、成熟個体の内毛細胞に特異的に感染できる。

【0038】

本発明はまた、融合アデノ随伴ウイルスの形質転換によって得られた人工宿主細胞を提供する。操作された宿主細胞は融合アデノ随伴ウイルスを含む。宿主細胞は真核細胞および/または原核細胞である。

【0039】

好適な宿主細胞の代表例としては、哺乳動物細胞（CHOまたはCOSなど）、植物細胞、ヒト細胞（HEK293FTなどのヒト胚性腎臓細胞）、細菌細胞（大腸菌、ストレプトマイセス属、サルモネラ・チフスマリウムなど）、真菌細胞（酵母など）、昆虫細胞（Sf9など）などを例示できる。適切な宿主は、本明細書の教示に従って当業者が選択できる。好ましくは、宿主細胞は動物細胞であり、より好ましくはヒト細胞である。宿主細胞は培養細胞であってもよいし、初代細胞、すなわちヒトなどの生物から直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は接着細胞であってもよいし、浮遊細胞、すなわち懸濁状態で増殖した細胞であってもよい。

10

【0040】

本発明はまた、融合アデノ随伴ウイルスベクターシステムを提供し、このベクター系はパッケージングプラスミドを含み、パッケージングプラスミドは上記の核酸または核酸断片を含む。

20

【0041】

さらに、パッケージングプラスミドは、アデノ随伴ウイルスのrep遺伝子断片をさらに含み、ここで、rep遺伝子断片は、転写終結配列を含むイントロンを含む。

【0042】

さらに、アデノ随伴ウイルスベクターシステムは、目的産物をコードする異種ヌクレオチドを含む発現プラスミドをさらに含む。さらに、目的産物は核酸またはタンパク質であってもよく、核酸はスモールガイドRNA（sgRNA）、干渉RNA（RNAi）などを含むが、これらに限定されることなく、そしてタンパク質をコードする遺伝子はプレステインおよびAtoh1を含むが、これらに限定されるものではない。

【0043】

さらに、アデノ随伴ウイルスベクターシステムは、ヘルパーウイルスプラスミドまたはヘルパーウイルスをさらに含む。さらに、アデノ随伴ウイルスベクターシステムは宿主細胞をさらに含む。

30

【0044】

パッケージングプラスミド、発現プラスミドおよびヘルパーウイルスプラスミドが宿主細胞にトランスフェクトされ、すべての核酸配列が宿主細胞に組み込まれ、融合アデノ随伴ウイルスが産生される。いくつかの態様では、核酸配列はすべて、宿主細胞の細胞ゲノム内の単一の遺伝子座と一緒に組み込まれる。いくつかの態様では、様々な遺伝子をコードする核酸配列は別々の発現カセットとして存在し、複製可能なウイルスを形成するための組換えの危険性を防止している；repおよびcap遺伝子をコードする核酸配列は同じ発現カセットに存在する。

40

【0045】

本発明はまた、上記のような融合アデノ随伴ウイルスベクターシステムのウイルスパッケージングによって得られる融合アデノ随伴ウイルスも提供する。

【0046】

本発明はまた、上記の融合アデノ随伴ウイルスおよび薬学的に許容される補助材料を含む医薬組成物を提供する。本発明により提供される融合アデノ随伴ウイルスまたは医薬組成物は、適当な投与様式に適合させることができ、蝸牛、眼、筋肉、神経系または血液循環系に注射できる。当業者であれば、投与形態に応じて適切な投与量を選択できる。

【0047】

50

補助材料は、それ自体は必須の有効成分ではなく、投与後に過度の毒性を有さない様々な賦形剤および希釈剤を含み得る。補助材料は当業者によく知られているものである。許容される担体としては、例えば、滅菌水または生理的食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸など）、緩衝剤（リン酸、クエン酸、その他の有機酸など）、保存剤、界面活性剤（PEG、Tweenなど）、キレート剤（EDTAなど）、接着剤などが挙げられる。さらに、他の低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどのタンパク質；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸；多糖類、単糖類などの糖類または炭水化物；マンニトール、ソルビトールなどの糖アルコールなどを含んでいてもよい。生理的食塩水などの注射用水溶液を調製する場合には、グルコースや他の補助薬物、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムなどを含む等張液、およびアルコール類（エタノールなど）、ポリオール類（プロピレングリコール、PEGなど）、非イオン性界面活性剤（Tween 80、HCO-50）などの適当な可溶化剤を併用できる。

10

#### 【0048】

本発明によって提供される医薬組成物において、融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9は、単一の有効成分であってもよいが、または聴覚障害もしくは眼科疾患の処置に有用な1以上の他の有効成分と組み合わせて配合製剤を形成することもできる。他の活性成分は、聴覚障害または眼科疾患の処置に使用できる他の様々な薬剤であり得る。組成物中の有効成分の量は、一般に、安全かつ有効な量であり、安全かつ有効な量は、当業者にとって調整可能であるべきであり、例えば、融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9および医薬組成物の有効成分の量は、一般に、患者の体重、投与の種類、疾患の状態および重症度によって変わり、例えば、有効成分としての二重機能性化合物の量は、一般に、1~1000mg/kg/日、1~3mg/kg/日、3~5mg/kg/日、5~10mg/kg/日、10~20mg/kg/日、20~30mg/kg/日、30~40mg/kg/日、40~60mg/kg/日、60~80mg/kg/日、80~100mg/kg/日、100~200mg/kg/日、200~500mg/kg/日、または500mg/kg/日以上であってもよい。

20

#### 【0049】

本発明はまた、融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9または上記のように連結された生物活性ポリペプチドを含むコンジュゲートを提供する。

30

#### 【0050】

本発明はまた、融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9カプシドタンパク質、核酸、コンストラクト、融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9、宿主細胞、融合アデノ随伴ウイルスベクターシステム、医薬組成物または結合体の、疾患を予防および/または処置するための医薬の製造における使用を提供する。好ましくは、疾患を予防および/または遺伝学的に処置するための医薬の製造における使用を提供する。疾患としては、聴覚障害疾患、眼科疾患、炎症、腫瘍、代謝性疾患、疼痛、神経変性炎症性疾患などの1以上が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0051】

聴覚障害は、軽度難聴、難聴および耳鳴りから選択される。

40

#### 【0052】

眼科疾患には、ドライ型AMD、ウェット型AMD、または脈絡膜新生血管(CNV)が含まれるが、これらに限定されない。例えば、加齢黄斑変性(AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、脈絡膜新生血管膜(CNVM)、嚢胞様黄斑浮腫(CME)、網膜上膜(ERM)、および黄斑円孔；近視に関連した脈絡膜新生血管、血管縞、網膜剥離、糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫(DME)、網膜色素上皮細胞(RPE)の萎縮性病変、網膜色素上皮細胞(RPE)の肥大性病変、網膜静脈閉塞症、脈絡膜網膜静脈閉塞症、黄斑浮腫；低酸素による角膜血管新生、翼状片結膜、網膜下浮腫および網膜内浮腫；または、網膜静脈閉塞症、網膜色素変性症、スターガルト病、緑内障、炎症性疾患、白内障、難治性異常、円錐角膜、未熟児網膜症、眼前血管新生、角膜炎後の角膜血管新生、角膜移植、角膜

50

形成術による黄斑浮腫の1以上；例えば、レーバー先天性黒内障（LCA）、網膜色素変性症、RPE細胞関連遺伝子変異によるスターガルト病などから選択され得る。ある好ましい態様において、眼科疾患はRPE層関連疾患を意味し、すなわち、眼科疾患の遺伝子治療はRPE層にウイルスを感染させることによって達成できる。

【0053】

炎症は、皮膚炎症、血管炎症、アレルギー、自己免疫疾患、線維組織形成、強皮症または移植片拒絶反応からなる群より選択され、そして自己免疫疾患は、関節リウマチ、全身性硬化症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、多発性筋炎などからなる群より選択される。

【0054】

癌はリンパ腫、血液腫瘍または固形腫瘍から選択され、具体的には、副腎皮質がん、膀胱尿路上皮がん、乳がん、子宮頸部扁平上皮がん、子宮内頸部腺がん、胆管がん、結腸腺がん、リンパ系腫瘍、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、食道がん、多形性膠芽腫、頭頸部扁平上皮がん、腎色素細胞がん、腎明細胞がん、腎乳頭細胞がん、急性骨髄性白血病、低悪性度脳グリオーマ、肝細胞がん、肺腺がん、肺扁平上皮がん、中細胞がん、卵巣がん、膵臓がん、褐色細胞腫および傍神経節腫、前立腺がん、直腸がん、悪性肉腫、黒色腫、胃がん、精巣胚細胞腫瘍、甲状腺がん、胸腺がん、子宮内膜がん、子宮肉腫、ぶどう膜黒色腫、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、T細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫腫瘍細胞の1以上から選択される。好ましくは、腫瘍は結腸直腸癌および/またはメラノサイトーマなどの1以上である。

【0055】

代謝性疾患は、I型糖尿病およびII型糖尿病を含む糖尿病、ならびに糖尿病に関連する疾患および状態から選択される。代謝性疾患には、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、腎症、神経障害、網膜症、細胞機能不全、脂質異常症、高血糖、インスリン抵抗性、慢性閉塞性肺疾患などの1以上が含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

より好ましい態様では、遺伝子治療は聴覚障害疾患の処置を意味する。融合アデノ随伴ウイルスまたは医薬組成物は、個体の有毛細胞および/または支持細胞に目的産物を送達することにより、聴覚障害の処置を達成できる。

【0057】

個体の有毛細胞および/または支持細胞に目的産物を送達するための、本発明の融合アデノ随伴ウイルスAAV-M9、宿主細胞、ベクター系、医薬組成物または結合体の使用において、目的産物の送達は、非診断的治療、例えば、インビトロ、エクスピボの有毛細胞および/または支持細胞への目的産物の送達であってもよい。有毛細胞は一般に外有毛細胞および/または内有毛細胞を含み、好ましくは、有毛細胞は成人個体の内有毛細胞である。

【0058】

さらに、目的産物は核酸またはタンパク質であり、核酸はスモールガイドRNA（sgRNA）、干渉RNA（RNAi）などであってもよい。

【0059】

本発明において、聴覚障害疾患は、環境要因による蝸牛の損傷に起因し得る。従って、本発明は、上記融合アデノ随伴ウイルスを、個体の環境要因によって引き起こされる聴覚障害を処置するための医薬品に用いることも提供する。

【0060】

さらに、難聴疾患は有毛細胞および/または支持細胞関連疾患である。いくつかの好ましい態様では、幼若個体の場合、聴覚障害は好ましくは支持細胞関連疾患である。いくつかの好ましい態様では、成体個体について、難聴疾患は好ましくは内耳細胞関連疾患である。いくつかの好ましい態様では、内耳細胞の再生を誘導することによって、聴覚障害疾患を予防または処置する。別の好ましい態様では、Wnt2bおよびAtoh1を過剰発現させて内耳細胞の再生を誘導することにより、聴覚障害を予防または処置する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

さらに、聴覚障害疾患は、遺伝子の欠損、環境損傷または老化に関連する疾患であり、例えば、遺伝子の突然変異に起因する関連疾患であってもよく、例えば、騒音または薬物に起因する関連疾患であってもよく、例えば、老化に起因する関連疾患であってもよい。

## 【 0 0 6 2 】

さらに、難聴疾患は、細胞障害等の関連疾患、具体的には、蝸牛有毛細胞障害、支持細胞障害等であってもよく、より具体的には、遺伝子変異による蝸牛有毛細胞障害、遺伝子変異による支持細胞障害、騒音による細胞障害、薬剤による細胞障害、加齢による細胞障害等であってもよい。

## 【 0 0 6 3 】

さらに、融合アデノ随伴ウイルスは、目的産物を送達するためのベクターとして使用される。

## 【 0 0 6 4 】

本発明はまた、それを必要とする対象に、本発明の融合アデノ随伴ウイルス、宿主細胞、ベクター系、または本発明の医薬組成物もしくは結合体の有効量を投与することを含む、聴覚障害疾患を治療する方法を提供する。通常、医師は一人の患者に最も適した実際の投与量を決定でき、特定の個人の年齢、体重、反応によって変えることができる。

## 【 0 0 6 5 】

本発明では、患者に本発明の融合アデノ随伴ウイルスまたは宿主細胞またはベクター系または医薬組成物を投与できる。当業者であれば、適切な投与様式および投与量を決定できる。

## 【 0 0 6 6 】

本明細書に記載の融合アデノ随伴ウイルスによる1以上の治療遺伝子の送達は、単独で、あるいは他の治療方法または治療成分と組み合わせて用いることができる。

## 【 0 0 6 7 】

本発明の融合アデノ随伴ウイルスは、遺伝子および/または連結された（例えば、共有結合で連結された）生物活性ポリペプチドを細胞に送達するために、細胞を感染させるために使用される。従って、本発明は、1以上の本発明の融合アデノ随伴ウイルスまたはコンジュゲートを細胞に感染させることにより、導入遺伝子を細胞に送達する方法を提供し、ここで、融合アデノ随伴ウイルスまたはコンジュゲートは、1以上の導入遺伝子を含んでなる。

## 【 0 0 6 8 】

本発明はまた、融合アデノ随伴ウイルスベクターを産生する安定な細胞株を生産する方法であって、本明細書で定義する融合アデノ随伴ウイルスベクターを哺乳動物宿主細胞の培養物に導入する工程；およびその培養物内で、哺乳動物宿主細胞の内在性染色体に組み込まれたベクターにコードされる核酸配列を有する哺乳動物宿主細胞を選択する工程を含む方法を提供する。

## 【 0 0 6 9 】

AAVベクター産生細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、哺乳動物細胞は、HEK293細胞、CHO細胞、Jurkat細胞、K562細胞、PerC6細胞、HeLa細胞またはそれらの誘導體から選択される。いくつかの態様では、哺乳動物宿主細胞はHEK293細胞であるか、またはHEK293細胞由来である。ある態様では、HEK293細胞はHEK293T細胞である。

## 【 0 0 7 0 】

AAVの様々な血清型のゲノム配列、および天然ITR、Repタンパク質、カプシドタンパク質の配列は当技術分野で知られている。このような配列は、文献またはGenBankのような公開データベースで見出され得る。その開示内容は、AAV核酸およびア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列における使用に関して、参照により本明細書に包含される。

【0071】

本発明の化合物およびその使用において、融合アデノ随伴ウイルスが他の治療剤と併用されるとき、活性化化合物は他の治療剤と共投与される。“共投与”とは、同一製剤での同時投与、または2つの異なる製剤での同じかもしくは異なる経路による投与、または同じかもしくは異なる経路による逐次投与を意味する。“逐次”投与とは、2種以上の異なる化合物を投与する間に、数秒、数分、数時間または数日の時間差があることを意味する。

【0072】

特定の態様において、本発明の融合アデノ随伴ウイルスおよびその方法は、聴覚障害を予防するために使用でき、聴覚障害前または聴覚障害を起こしやすい環境に暴露された後の一定期間後に、予防的処置として投与できる。 10

【0073】

他に定義されない限り、本明細書で用いるすべての専門用語および科学用語は、当業者に周知のものと同じ意味を有する。

【0074】

用語“ベクター”とは、ポリペプチドを含むか、ポリペプチドと結合しており、細胞へのポリペプチドの送達を媒介するために用いられ得る高分子または高分子の組合せを意味する。例示的なベクターとしては、例えばプラスミド、ウイルスベクター、リポソーム、または他の遺伝子送達ベクターが挙げられる。

【0075】

用語“AAV”とはアデノ随伴ウイルスの略称であり、ウイルスそのものまたはその誘導体を意味するのに用いられる。 20

【0076】

用語“組換えAAVベクター”とは、異種ポリヌクレオチド配列を含むAAVベクターを意味し、この配列は通常、細胞の遺伝的形質転換のための目的の配列である。一般的に、異種ポリヌクレオチドの両末端には、少なくとも1つ、典型的には2つのAAV逆転末端反復(ITSR)が連結されている。

【0077】

用語“AAVウイルス”または“AAVウイルス粒子”または“AAVベクター粒子”とは、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質および1つのカプセル化ポリヌクレオチドを含むAAVベクターのウイルス粒子を意味する。 30

【0078】

用語“パッケージング”とは、AAV粒子の組み立ておよびカプセル化をもたらす一連の細胞内プロセスを意味する。

【0079】

AAVの“rep”遺伝子および“cap”遺伝子とは、アデノ随伴ウイルスの複製およびカプセル化タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を意味する。本明細書においてAAV repおよびcapは、AAV“パッケージング遺伝子”を意味する。

【0080】

AAVの“ヘルパーウイルス”とは、AAVが哺乳類細胞で複製され、パッケージ化されることを可能にするウイルスを意味する。このようなAAVヘルパーウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス(ワクシニアなど)を含み、当技術分野で知られている。 40

【0081】

用語“感染性”ウイルスまたはウイルス粒子とは、ポリヌクレオチド成分を、ウイルス種の親ウイルス性を有する細胞内に送達できるものである。この用語は、ウイルスが複製能を有することを意味する必要はない。

【0082】

用語“生産細胞”とは、AAVパッケージング遺伝子(repおよびcap遺伝子)、所望のヘルパーウイルス遺伝子、および宿主細胞ゲノムに安定的に組み込まれた組換えAA 50

VベクターのDNAゲノム（例えば、2つのAAV逆末端反復（ITR）が隣接する標的導入遺伝子）を有する細胞株を意味する。

【0083】

用語“含む”および“包含する”などは、包括的であると理解され、排他的または網羅的なものではなく、すなわち“含むが、それらに限定されない”。

【0084】

用語“対象”とは、一般に、製剤、キットまたは組合せによる処置から利益を得る可能性のあるヒト、ヒト以外の霊長動物、例えば哺乳動物、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウシなどを含む。

【0085】

用語“治療上有効な量”とは、一般に、適切な投与期間後に上記のような疾患を処置する効果を達成できる量を意味する。

【0086】

用語“治療的”および“予防的”とは、最も広い意味で理解される。用語“治療”とは、哺乳動物が完全に回復するまで処置することを必ずしも意味しない。同様に、“予防的”とは、対象が最終的にその疾患状態に罹患しないことを必ずしも意味しない。このように、処置および予防には、特定の疾患の症状を緩和したり、発症を予防したり、リスクを軽減したりすることが含まれる。用語“予防”とは、特定の障害の発症の重篤度を軽減することも意味すると理解される。また、処置によって既存の病状の重症度が軽減されたり、急性発症の頻度が減ったりすることもある。

【0087】

本発明において、治療的または予防的処置を受ける対象または個体は、好ましくは、ヒト、霊長動物、家畜（例えば、羊、牛、馬、ロバ、豚）、ペット（例えば、イヌ、ネコ）、実験室試験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）または捕獲された野生動物（例えば、キツネ、シカ）などの哺乳動物であるが、これらに限定されない。対象としては霊長動物が望ましい。対象はヒトが最も望ましい。

【0088】

本発明の具体的な態様をさらに説明する前に、本発明の保護範囲は以下の具体的な態様に限定されないことが理解されるべきである。また、本発明の実施例において用いられる用語は、具体的な態様を説明するためのものであり、本発明の保護範囲を限定することを意図するものではないことが理解されるべきである。また、本発明の明細書および特許請求の範囲において、文脈上明らかにそうでないことが示されない限り、単数形“a”、“an”および“the”は複数形を含む。

【0089】

態様が値の範囲を示しているとき、本発明によって別段の指示がない限り、各値の範囲の2つの端点および2つの端点の間の値のいずれかは任意であることを理解すべきである。他に定義がない限り、本発明で用いられるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。態様で用いた特定の装置および材料に加えて、当業者による従来技術の知識および本発明の説明によれば、本発明の態様で説明した装置および材料と類似または同等の何れかの装置および材料を本発明の実施に使用できる。

【0090】

他に記載されない限り、本発明で開示される実験方法、検出方法、調製方法はすべて、従来分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、分析化学、細胞培養、組換えDNA技術、および関連技術における従来技術を用いる。これらの技術は既存の文献に多く記載されている。

【実施例】

【0091】

実施例1．新規アデノ随伴ウイルスAAV-M9（AAV-WM01とも呼ばれる）の入手

10

20

30

40

50

### a . D N Aファミリーシャッフリングライブラリーの構築

ヒトおよび非ヒト霊長動物に見られる13のAAV血清型(AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13)のカプシド配列を親として、DNAファミリーシャッフリングを行った。合計4μgの親カプシド配列をDNAファミリーシャッフリングのために等モル比で混合し、0.04U DNase Iで25にて30秒間処理し、完全な親カプシド配列を異なる長さの断片にランダムに切断した。100~500bpのDNA断片を回収および精製し、500ngのDNA断片をプライマーレスPCRにかけ、完全なキメラカプシド配列まで伸長させた。増幅によって十分なキメラカプシド配列が得られた後、キメラカプシド配列をAAV2 Rep遺伝子および末端リピート配列を含むライブラリーベクターに組み替えた。組換え産物をエレクトロポレーションによってコンピテントセルに形質転換し、菌液の一部をプレートに播種し、プレート上で増殖したコロニーを数え、コロニーの多様性を調べるためにシーケンシングを実施してコロニーを同定した。残りの菌液を500mLの培地に接種し、37で一晩培養し、翌日抽出したプラスミドがDNAファミリーシャッフリングライブラリーのプラスミドである。DNAファミリーシャッフリングライブラリーのインビボスクリーニング手順を図1に示す。

10

【0092】

### b . DNAファミリー・シャッフリング・ライブラリー・ウイルスのパッケージング

得られたDNAファミリーシャッフリングライブラリープラスミドおよびアデノウイルスヘルパープラスミドpHelper(プラスミドの全長配列はAAV-*ie*特許文献CN110437317Aの配列番号12に示されている)をHEK-293T細胞に適量共形質転換した。各15cmディッシュの細胞に、20ngのDNAファミリーシャッフリングライブラリープラスミドのみをトランスフェクトした。

20

【0093】

培地は72時間のトランスフェクション後に回収し、細胞および培地はさらに48時間後に回収した。細胞を110mMクエン酸緩衝液(pH4.2)で溶解してAAVを遊離させ、ウイルスを含む上清を遠心後1/5容量の2M HEPESで中和し、終濃度8%のポリエチレングリコール8000および500mM塩化ナトリウムを加え、4で一晩ウイルスを沈殿させた。遠心後、沈殿を2mM Mg<sup>2+</sup>を含むPBSに再懸濁し、最終濃度100U/mLのベンゾナーゼを加え、37で少なくとも1時間核酸を消化した。ウイルス懸濁液をヨウジキサノール密度勾配液(15%、25%、40%および60%)で超遠心分離して精製し、AAV2 Rep遺伝子特異的プライマー(WPRE-F:GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTG(配列番号8);WPRE-R:GGCGATGAGTTCCGCCGTGGC(配列番号9))を用いてqPCRでウイルス力価を測定した。

30

【0094】

### c . インビボスクリーニング

マウス蝸牛へのインビボ注射により、蝸牛細胞に効率よく感染する新規アデノ随伴ウイルスをスクリーニングした。

約1E<sup>+</sup>10~11vgのライブラリーウイルスを生後2-3日のマウスの蝸牛に卵円窓から注射し、注射の7-10日後にマウスを安楽死させ、蝸牛を採取した。この時、ライブラリーウイルスの中で蝸牛細胞に感染できたAAVは細胞内に入り、細胞に感染できなかったAAVは免疫系および循環系によって排除された。したがって、本発明は、組織細胞の全DNAからAAV感染細胞のカプシド遺伝子を回収できる。全組織DNAをトリゾル(Trizol)で抽出し、PCR法を用いて全DNAからAAVのカプシド遺伝子を回収し、AAVライブラリーのインビボスクリーニングを完了した。PCRで得られた断片をライブラリーベクターにクローニングして次のライブラリープラスミドを得て、そのライブラリープラスミドを再びウイルスにパッケージしてインビボスクリーニングを繰り返し、3~5回のスクリーニングの後、回収したAAVのカプシド遺伝子を3世代シーケンシングにかけた。このようにして、蝸牛細胞に濃縮されたいくつかのAAV変異型カ

40

50

プシド遺伝子の情報が得られ、存在量の多いいくつかの変異型 A A V は、理論的には効率的に蝸牛細胞を形質導入できる。配列番号 1 に示されるように、得られた A A V - M 9 は高存在変異体の 1 つである。

#### 【 0 0 9 5 】

配列決定の結果、A A V - M 9 は A A V 1、2、6 および 7 のキメラであり、S 4 3 0 I 変異を含んだ。A A V - M 9 カプシドの 3 D ホモロジーモデルは、その親血清型とのアミノ酸配列アラインメントにより、V P 3 領域の残基を用いて作成された。カプシドの内表面 ( B ) および外表面 ( C ) の両方が、4 つの親 A A V からのカプシド断片の存在を示しており、A A V - M 9 の 3 回対称軸の突出部は A A V 1 および A A V 6 から構成され、A A V 2、6、7 は 5 回対称軸のチャンネルを構成し、A A V 6 は 2 回対称軸の窪みを形成していることを示す ( 図 2 )。A A V - M 9 のコード遺伝子の配列を配列番号 1 として、アミノ酸配列を配列番号 2 として示す。コンピューターでシミュレートした A A V - M 9 の構造図を図 2 に示す。

10

#### 【 0 0 9 6 】

実施例 2 . 新規アデノ随伴ウイルス A A V - M 9 - C M V - E G F P の聴覚系における生物学的検証

##### 2 . 1 アデノ随伴ウイルス A A V - M 9 - C M V - E G F P の構築

上記の塩基配列決定結果より得られた A A V - M 9 のコード遺伝子の塩基配列を G E N E W I Z で合成し、A A V - M 9 の R e p - C a p プラスミド、すなわち p A A V - M 9 を得た。得られた A A V - M 9 の R e p - C a p プラスミド p A A V - M 9、緑色蛍光タンパク質 E G F P を発現するゲノムプラスミド p A A V - C M V - E G F P、p H e l p e r プラスミドを適量 H E K 2 9 3 T 細胞に共導入し、A A V はヨウジキサノールの勾配超高速遠心分離で精製し、 $1 E + 1 2 - 1 E + 1 3$  G C / m L のウイルス力価を適当な濃度とし、 $- 8 0$  で保存し、後日使用した。

20

#### 【 0 0 9 7 】

##### 2 . 2 アデノ随伴ウイルス A A V - M 9 - C M V - E G F P の新生マウスへの感染特性

同じ力価の A A V - i e および A A V - M 9 - C M V - E G F P を、卵円窓から生後 2 - 3 日の C 5 7 B L / 6 J マウスの蝸牛に注射した。ウイルス完全感染および E G F P 発現の 1 0 ~ 1 4 日後、マウスを頸椎脱臼で殺し、注射した耳の蝸牛を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドに入れ、室温で 2 時間固定した。P B S で 3 回、毎回 5 分間洗浄した。蝸牛は 0 . 5 m M E D T A で脱灰し、室温で 2 時間浸漬して軟化させた。実体顕微鏡下、眼科用メスで基底膜を剥離した。蝸牛のサンプルは、免疫蛍光染色で調製し、抗 M y o 7 a 抗体で有毛細胞を標識した。共焦点レーザー走査型顕微鏡でイメージングしたところ、ウイルス感染細胞の核に緑色蛍光タンパク質が発現していた。励起光の波長はそれぞれ 4 8 8 n m および 6 4 7 n m であった。生検結果を図 3 a および 3 b に示す。図 3 a は、A A V - i e および A A V - M 9 - C M V - E G F P ウイルスを注入した蝸牛の有毛細胞層のパッチ図、図 3 b は、A A V - i e および A A V - M 9 - C M V - E G F P ウイルスを注入した蝸牛の支持細胞層のパッチ図であり、有毛細胞のマーカータンパク質 M y o 7 a は紫色、ウイルス感染細胞が発現する蛍光タンパク質は緑色で示す。図 3 c は A A V - i e および A A V - M 9 - C M V - E G F P ウイルスを注入した有毛細胞およびダイターズ細胞 ( 支持細胞 ) の統計データである。図 3 c は、A A V - i e および A A V - M 9 - C M V - E G F P ウイルスによる有毛細胞およびダイターズ細胞 ( 支持細胞 ) の統計データであり、この結果から、A A V - M 9 - C M V - E G F P は幼若マウスの蝸牛の支持細胞に特異的に感染するが、有毛細胞には感染特性を示さないことがわかる。ダイターズ細胞は最も再生可能性のある支持細胞と考えられており、したがって A A V - M 9 は支持細胞の遺伝子治療および有毛細胞再生に大きな可能性を有している。

30

40

#### 【 0 0 9 8 】

2 . 3 アデノ随伴ウイルス A A V - M 9 - C M V - E G F P の新生児マウスに対する安全性

A A V - M 9 - C M V - E G F P を生後 2 - 3 日の C 5 7 B L / 6 J マウスの蝸牛に卵

50

円窓から注入した。ウイルスの完全感染および発現から10～14日後、マウスを頸椎脱臼により殺し、注射した耳の蝸牛を摘出した。一方、対照として同年齢のC57BL/6Jマウスの蝸牛を採取し、蝸牛を4%パラホルムアルデヒドに入れ、室温で2時間固定した。PBSで3回、毎回5分間洗浄した。蝸牛は0.5mM EDTAで脱灰し、室温で2時間浸漬して軟化させた。実体顕微鏡下、眼科用メスで基底膜を剥離した。蝸牛のサンプルは、免疫蛍光染色で調製し、抗Myo7a抗体で有毛細胞を標識した。レーザー共焦点顕微鏡でイメージングしたところ、ウイルス感染細胞の核に緑色蛍光タンパク質が発現していた。生検結果を図4aおよび4bに示す。統計の結果、AAV-M9ウイルスを注入したマウスの蝸牛細胞の数および形態は正常なマウスと一致しており、AAV-M9ウイルスは新生仔マウスに対して毒性がないことが示された。

10

【0099】

2.4 アデノ随伴ウイルスAAV-M9-CMV-EGFPの成体マウスへの感染特性  
AAV-ieおよびAAV-M9-CMV-EGFPを、生後30日のC57BL/6Jマウスの蝸牛に後三半規管から注射し、10～14日間ウイルスが完全に感染し、EGFPが発現した後、頸椎脱臼によりマウスを殺し、注射した耳の蝸牛を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに入れ、室温で2時間固定した。PBSで3回、毎回5分間洗浄した。蝸牛は0.5mM EDTAで脱灰し、室温で一晩浸して軟化させた。実体顕微鏡下、眼科用メスで基底膜を剥離した。蝸牛のサンプルは、免疫蛍光染色で調製し、抗Myo7a抗体で有毛細胞を標識した。レーザー共焦点顕微鏡でイメージングすることにより、ウイルス感染細胞の核に緑色蛍光タンパク質が発現していた。励起光の波長はそれぞれ488nmおよび647nmであった。生検結果を図5aに示す。この図は、AAV-ieおよびAAV-M9-CMV-EGFPウイルスを注入した蝸牛のパッチ図である。有毛細胞の標識されたタンパク質Myo7aは紫色、ウイルス感染細胞により発現される蛍光タンパク質は緑色で示され、その結果、AAV-M9は成体マウスの蝸牛の内側有毛細胞に特異的に感染するが、外側有毛細胞には感染特性を持たないことが示され、統計学的な結果から、成体マウスの外側有毛細胞へのAAV-M9の感染率は0.33%±0.333、成体マウスの外側有毛細胞へのAAV-ieの感染率は56.33%±1.202であった(図5bに示す)。AAV-M9の成体マウスの内毛細胞への感染率は98.67%±0.667であり、AAV-ieの成体マウスの内毛細胞への感染率は図5cに示すように100%±0である。AAV-M9は、成体マウスの蝸牛の内毛細胞への感染効率が高く、特異性も高いため、内毛細胞の遺伝子治療に用いることができる。

20

30

【0100】

2.5 アデノ随伴ウイルスAAV-M9-CMV-EGFPの成体マウスへの安全性  
AAV-M9-CMV-EGFPを、生後30日のC57BL/6Jマウスの蝸牛に卵円窓から注入した。ウイルスの完全感染および発現から10～14日後、マウスを頸椎脱臼により死亡させ、注射した耳の蝸牛を摘出した。一方、対照として同年齢のC57BL/6Jマウスの蝸牛を採取し、蝸牛を4%パラホルムアルデヒドに入れ、室温で2時間固定した。PBSで3回、毎回5分間洗浄した。蝸牛は0.5mM EDTAで脱灰し、室温で2時間浸漬して軟化させた。実体顕微鏡下、眼科用メスで基底膜を剥離した。蝸牛のサンプルは、免疫蛍光染色で調製し、抗Myo7a抗体で有毛細胞を標識した。共焦点レーザー走査型顕微鏡でイメージングしたところ、ウイルス感染細胞の核に緑色蛍光タンパク質が発現していた。生検結果を図6aおよび6bに示す。統計の結果は、AAV-M9ウイルスを注射したマウスの蝸牛細胞の数および形態が正常マウスと一致しており、AAV-M9ウイルスは成体マウスに対して毒性がないことを示す。

40

【0101】

実施例3. アデノ随伴ウイルスAAV-M9-CMV-EGFPの聴覚系における生物学的検証

麻酔した成体マウスを顕微鏡下に置き、トロピカミド点眼液を1～2滴眼球に滴下して瞳孔を拡散させた。左手に持った肘付きピンセットで眼球を視標から持ち上げ固定し、右手に持った1mLの注射器またはガラス針で角膜を穿刺して眼圧を下げた。目の周りの液

50

体はペーパータオルで拭き取った。眼球を左手のピンセットで固定し、右手に2  $\mu$ Lのウイルスを保持したガラス針を用いて、実施例2の2.1で構築したアデノ随伴ウイルスAAV-M9-CMV-EGFPを角膜後縁に虹彩面に対して50°でゆっくりと注入し、力価は1.5E13 gc/mLとした。注射後、ガラス針を30秒間保持し、ゆっくりと引き抜いた。傷口にエリスロマイシン軟膏を塗布した後、マウスを41の水浴中のケージに入れて保温し、マウスが目覚めた後、マウス飼育室に移して給餌した。10日後、アイカップは取り除かれた。マウスを頸椎脱臼で殺し、眼球を摘出し、角膜を1 mLの注射器で穿刺して房水を放出させた。眼球をPBS溶液で満たした小さな培養皿に入れ、顕微鏡下で解剖した。先のとがったピンセットで角膜を押さえ、角膜の傷口から眼科用ハサミを突き刺し、角膜を円周方向に切断し、ピンセットで水晶体を取り除き、視神経を2 mmほど残した。アイカップは4% PFAで4にて12時間固定した。固定した眼杯を30% ショ糖中、4で12時間脱水した。凍結切片作製後、蛍光顕微鏡下で染色効果のある切片と完全な組織を摘出した。免疫蛍光の結果は、AAV-M9がRPE層に感染できることを示している。バイオスピの結果を図7に示す。この図はAAV-M9-CMV-EGFPウイルスを注入した網膜切片である。また、AAV-M9-CMV-EGFPは網膜RPE層への感染性が高く、眼科遺伝子治療に使用できることが示された。

10

#### 【0102】

実施例4. 非ヒト霊長動物を用いたAAV-M9-CMV-EGFPの眼球トランスフェクションの特徴

この試験では、50  $\mu$ Lのアデノ随伴ウイルスAAV-M9-CMV-EGFPを、健康な雄の成体アカゲザルの両眼の硝子体に注射した。ウイルス力価は3.89  $\times$  10<sup>12</sup> vg/mLであった。ウイルス注入後63日目(D63)に動物を安楽死させ、眼球を摘出し、網膜と脈絡膜を病理学的切片作製と染色を行い、眼球組織のトランスフェクション特性を解析した。結果を図8に示す。GFPは主に網膜の桿体・錐体層(RCL)と色素上皮層(RPE)で発現し、脈絡膜や強膜の一部の血管内皮細胞でも発現する。

20

#### 【0103】

本発明の融合型アデノ随伴ウイルスAAV-M9およびその耳疾患または眼疾患の予防および/または治療への使用は、従来技術の様々な欠点を効果的に克服し、産業上の利用価値が高い。

#### 【0104】

上記の例は、本開示の態様を説明するためのものであり、本開示を限定するものとして解釈されるべきものではない。さらに、本明細書に記載された種々の変更、ならびに本発明の方法および組成物の変形は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく当業者には明らかであろう。本発明をその様々な具体的好ましい態様に関連して詳細に説明したが、本発明はこれらの具体例に限定されるべきではないことを理解されたい。実際、当業者には明らかであろう上述のような様々な修飾は、本発明の範囲に包含されるべきである。

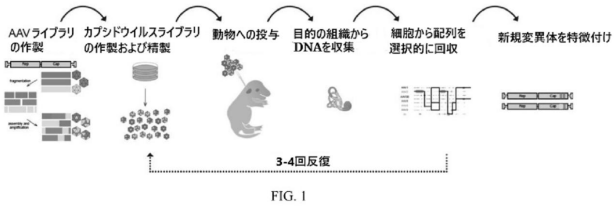
30

40

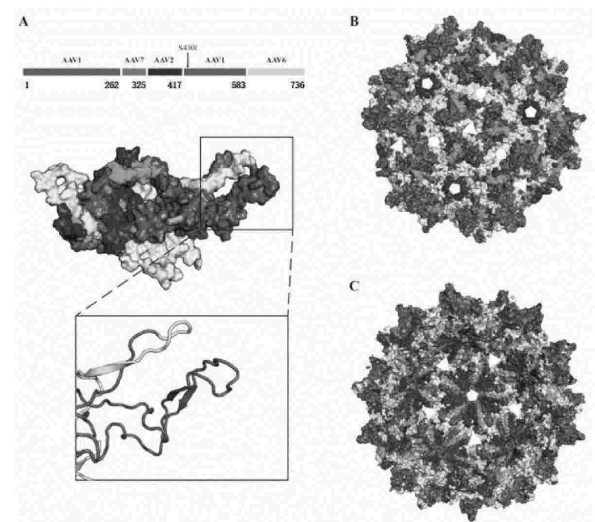
50

【 図面 】

【 図 1 】

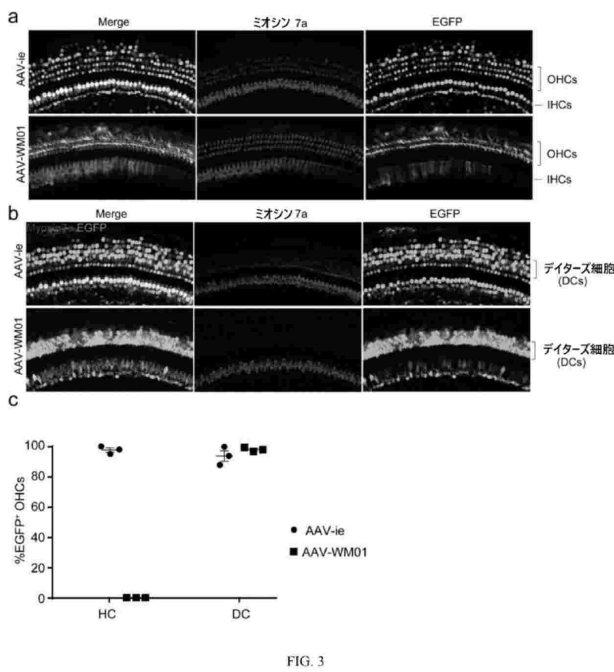


【 図 2 】

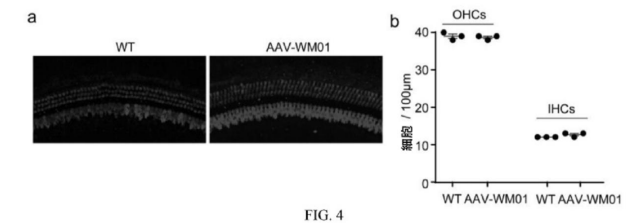


10

【 図 3 】



【 図 4 】



20

30

40

50

【 図 5 】

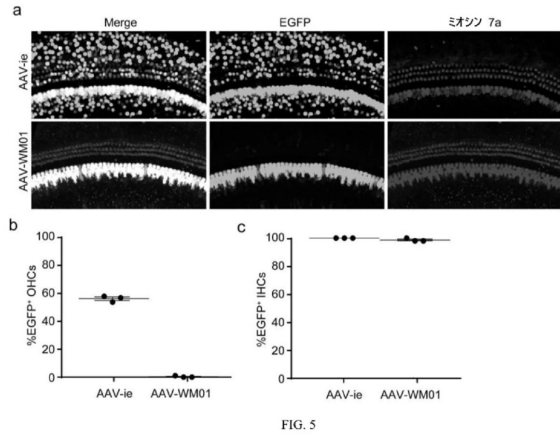


FIG. 5

【 図 6 】

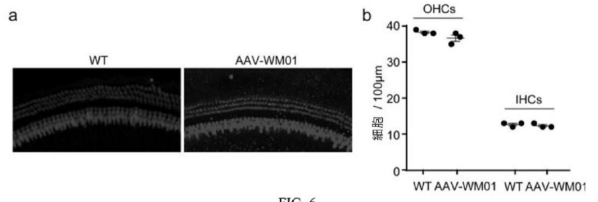


FIG. 6

10

【 図 7 】

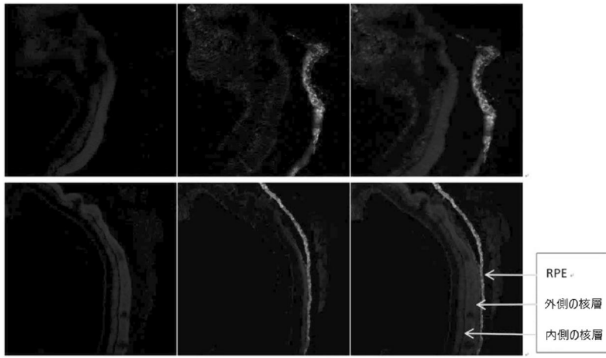


FIG. 7

【 図 8 】

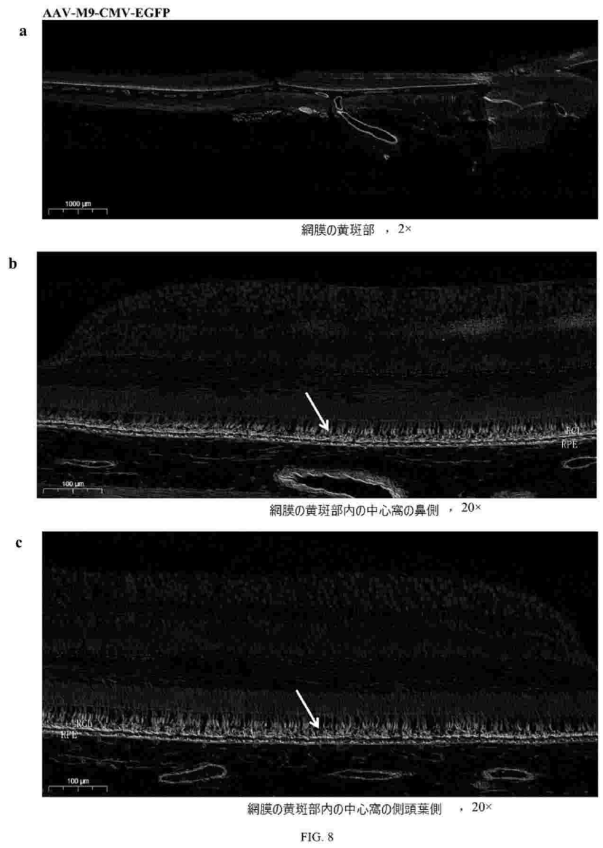


FIG. 8

20

30

40

50

【配列表】

2025513072000001.xml

10

20

30

40

50

## 【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CN2023/087598</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 14/015(2006.01)i; C12N 15/35(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; NCBI; 中国专利生物序列检索; ISI Web of Science; 读秀学术; Springer; STNext; 合肥星眸, 才源, 腺病毒, 视网膜, 丝氨酸, 异亮氨酸, 突变, 序列检索, Cai yuan, adenovirus, AAV, retina, RPE, serine, ser, Isoleucine, ile, mutation, s430I		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109476707 A (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC.) 15 March 2019 (2019-03-15) description, paragraphs [0059], [0227], [0232]-[0234], [0250]-[0252]	1, 2, 4-21
X	CN 112813037 A (INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 18 May 2021 (2021-05-18) description, paragraphs [0045]-[0120]	1, 2, 4-21
X	CN 111349148 A (HUIDA (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY CO., LTD) 30 June 2020 (2020-06-30) description, paragraphs [0069], [0083], [0089], [0096]-[0103]	1, 2, 4-21
A	CHEN, Haifeng. "Adeno-associated virus vectors for human gene therapy" <i>World Journal of Medical Genetics</i> , Vol. 5, No. (3), 27 August 2015 (2015-08-27), page 30, figure 1	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 <b>11 July 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>20 July 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer   Telephone No.

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2023/087598**

**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 13*ter*.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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2023/087598**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109476707	A	15 March 2019	NZ	748395	A	20 December 2019
				CO	2018013255	A2	14 December 2018
				PT	3445773	T	13 March 2023
				SG	11201809684	YA	29 November 2018
				US	2023001018	A1	05 January 2023
				US	11576983	B2	14 February 2023
				FI	3445773	T3	30 March 2023
				IL	262922	A	31 December 2018
				IL	262922	B	26 September 2019
				UA	124343	C2	01 September 2021
				KR	20190005223	A	15 January 2019
				KR	102234930	B1	02 April 2021
				PE	20190129	A1	17 January 2019
				US	2021069348	A1	11 March 2021
				US	11167041	B2	09 November 2021
				MX	2018013463	A	04 July 2019
				US	2021177990	A1	17 June 2021
				ES	2941502	T3	23 May 2023
				ZA	201905485	B	31 March 2021
				SA	518400418	B1	20 December 2022
				EP	3445773	A2	27 February 2019
				EP	3445773	A4	02 October 2019
				EP	3445773	B1	28 December 2022
				CL	2018003196	A1	15 February 2019
				RU	2018142768	A	16 June 2020
				RU	2018142768	A3	30 June 2020
				US	2021162071	A1	03 June 2021
				US	11419949	B2	23 August 2022
				AU	2017261812	A1	15 November 2018
				AU	2017261812	B2	18 April 2019
				BR	112018072849	A2	06 March 2019
				BR	112018072849	B1	22 December 2020
				DK	3445773	T3	20 March 2023
				JP	2019518458	A	04 July 2019
				JP	6592208	B2	16 October 2019
				WO	2017197355	A2	16 November 2017
				WO	2017197355	A3	28 December 2017
				CR	20180589	A	27 February 2019
				ZA	201807625	B	26 February 2020
				MA	44740	A	27 February 2019
				PH	12018502387	A1	25 March 2019
				US	2021069349	A1	11 March 2021
				US	11179477	B2	23 November 2021
				CA	3023592	A1	16 November 2017
				CA	3023592	C	08 December 2020
				US	2019255192	A1	22 August 2019
				US	11364308	B2	21 June 2022
CN	112813037	A	18 May 2021	CN	112813037	B	10 May 2022
CN	111349148	A	30 June 2020	EP	4122946	A1	25 January 2023
				WO	2021179861	A1	16 September 2021

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

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/087598

<b>A. 主题的分类</b>		
C07K 14/015(2006.01)i; C12N 15/35(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 7/01(2006.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 27/16(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>B. 检索领域</b>		
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; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方; NCBI; 中国专利生物序列检索; ISI Web of Science; 读秀学术; Springer; STNext; 合肥星眸, 才源, 腺病毒, 视网膜, 丝氨酸, 异亮氨酸, 突变, 序列检索, Cai yuan, adenovirus, AAV, retina, RPE, serine, ser, Isoleucine, ile, mutation, s4301		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 109476707 A (4D分子治疗有限公司) 2019年3月15日 (2019 - 03 - 15) 说明书第[0059]、[0227]、[0232]-[0234]、[0250]-[0252]段	1、2、4-21
X	CN 112813037 A (中国科学院动物研究所) 2021年5月18日 (2021 - 05 - 18) 说明书第[0045]-[0120]段	1、2、4-21
X	CN 111349148 A (辉大(上海)生物科技有限公司) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 说明书第[0069]、[0083]、[0089]、[0096]-[0103]段	1、2、4-21
A	Haifeng Chen. "Adeno-associated virus vectors for human gene therapy" World Journal of Medical Genetics, 第5卷, 第3期, 2015年8月27日 (2015 - 08 - 27), 第30页图1	1-21
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 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7月11日		国际检索报告邮寄日期 2023年7月20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 杨凤娇 电话号码 (+86) 0512-88995733

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/087598

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。

10

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:

20

30

40

50

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2023/087598

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	109476707	A	2019年3月15日	NZ 748395 A	2019年12月20日
				CO 2018013255 A2	2018年12月14日
				PT 3445773 T	2023年3月13日
				SG 11201809684 YA	2018年11月29日
				US 2023001018 A1	2023年1月5日
				US 11576983 B2	2023年2月14日
				FI 3445773 T3	2023年3月30日
				IL 262922 A	2018年12月31日
				IL 262922 B	2019年9月26日
				UA 124343 C2	2021年9月1日
				KR 20190005223 A	2019年1月15日
				KR 102234930 B1	2021年4月2日
				PE 20190129 A1	2019年1月17日
				US 2021069348 A1	2021年3月11日
				US 11167041 B2	2021年11月9日
				MX 2018013463 A	2019年7月4日
				US 2021177990 A1	2021年6月17日
				ES 2941502 T3	2023年5月23日
				ZA 201905485 B	2021年3月31日
				SA 518400418 B1	2022年12月20日
				EP 3445773 A2	2019年2月27日
				EP 3445773 A4	2019年10月2日
				EP 3445773 B1	2022年12月28日
				CL 2018003196 A1	2019年2月15日
				RU 2018142768 A	2020年6月16日
				RU 2018142768 A3	2020年6月30日
				US 2021162071 A1	2021年6月3日
				US 11419949 B2	2022年8月23日
				AU 2017261812 A1	2018年11月15日
				AU 2017261812 B2	2019年4月18日
				BR 112018072849 A2	2019年3月6日
				BR 112018072849 B1	2020年12月22日
				DK 3445773 T3	2023年3月20日
				JP 2019518458 A	2019年7月4日
				JP 6592208 B2	2019年10月16日
				WO 2017197355 A2	2017年11月16日
				WO 2017197355 A3	2017年12月28日
				CR 20180589 A	2019年2月27日
				ZA 201807625 B	2020年2月26日
				MA 44740 A	2019年2月27日
				PH 12018502387 A1	2019年3月25日
				US 2021069349 A1	2021年3月11日
				US 11179477 B2	2021年11月23日
				CA 3023592 A1	2017年11月16日
				CA 3023592 C	2020年12月8日
				US 2019255192 A1	2019年8月22日
				US 11364308 B2	2022年6月21日
CN	112813037	A	2021年5月18日	CN 112813037 B	2022年5月10日
CN	111349148	A	2020年6月30日	EP 4122946 A1	2023年1月25日
				WO 2021179861 A1	2021年9月16日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

## 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 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
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 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 27/12 (2006.01)	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	

,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,CO,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,IR,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,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T W E E N

, High - tech Zone Hefei , Anhui 2 3 0 0 3 1 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 朱 瑩  
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 潔  
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 鐘 桂生  
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区蔡倫路 7 8 1 号 8 0 7 室
- (72)発明者 儲 岑鳳  
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区蔡倫路 7 8 1 号 8 0 7 室

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y  
AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 BD15 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 CA01 CA53 MA66 NA13 NA14 ZA021  
ZA022 ZA081 ZA082 ZA331 ZA332 ZA341 ZA342 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262

## F ターム (参考)

---

ZC211 ZC212  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA08 ZA33  
ZA34 ZB11 ZB26 ZC21  
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA01 EA20 EA50 FA74