(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年6月15日(15.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/106256 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/864 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12Q 1/6897 (2018.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/044701

(22) 国際出願日： 2022年12月5日(05.12.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-198101 2021年12月6日(06.12.2021) JP

(71) 出願人: 学校法人順天堂 (**JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION**) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷２－１－１ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 神谷 和作 (**KAMIYA Kazusaku**); 〒1138421 東京都文京区本郷２－１－１ 順天堂大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 梅田 慎介 (**UMEDA Shinsuke**); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2023/106256 A1

(54) **Title:** MODIFIED ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR

(54) 発明の名称： 改変型アデノ随伴ウイルスベクター

(57) **Abstract:** As a modified adeno-associated virus (AAV) vector having excellent infection directionality to epithelial cells typified by inner ear epithelial cells, provided is a modified AAV vector in which some amino acid residues in the capsid sequence of the wild adeno-associated virus are substituted by other amino acid residues. In this modified AAV vector, one or more amino acid residues selected from among (1) 129th (Leu), (2) 268th (Ser), (3) 447th (Asn), (4) 470th (Gly), (5) 472nd (Ser), (6) 473rd (Thr), (7) 502nd (Thr) and (8) 531st (Glu) of the AAV1 capsid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or amino acid residues at equivalent positions are substituted by other amino acid residues.

(57) 要約：内耳上皮細胞に代表される上皮細胞への感染指向性に優れた改変型ＡＡＶベクターとして、野生アデノ随伴ウイルスのカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型アデノ随伴ウイルスベクターであって、配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列の（１）１２９位（Ｌｅｕ）、（２）２６８位（Ｓｅｒ）、（３）４４７位（Ａｓｎ）、（４）４７０位（ＧＩｙ）、（５）４７２位（Ｓｅｒ）、（６）４７３位（Ｔｈｒ）、（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び（８）５３１位（ＧＩｕ）から選ばれる１以上のアミノ酸残基又はこれに相当する位置のアミノ酸残基を、他のアミノ酸残基に置換した改変型アデノ随伴ウイルスベクターを提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 改変型アデノ随伴ウイルスベクター

技術分野

[0001] 本発明は、改変型アデノ随伴ウイルスベクターに関する。

背景技術

[0002] 遺伝子治療ベクターとして用いられるアデノ随伴ウィルス（ＡＡＶ）には様々な血清型（ＡＡＶ１－１０など）が存在する。ＡＡＶは血清型の種類よって感染指向性が大きく異なり、対象とする遺伝子治療やゲノム編集治療の標的細胞によって最適なベクターを選択することが必要である。しかし現存するＡＡＶベクターが必ずしも標的細胞への最適な感染指向性を示すとは限らない。ＡＡＶの感染指向性はカプシド領域のアミノ酸配列によって変化するため、同配列を改変することによって最適な感染指向性を持つベクターの開発が可能となる。かかる観点から、種々の疾患に対する遺伝子治療用およびゲノム編集治療用の改変型アデノ随伴ウイルスベクターが研究されている。

[0003] これまで内耳への遺伝子治療の候補としてＡＡＶ１、ＡＡＶ２などの野生血清型が用いられてきたが、最近になってＡＡＶ－ＡＮＣ８０Ｌ６５（特許文献１）等のカプシド改変型ベクターも開発されている。これらは内耳への遺伝子導入が可能であるが感染指向性が異なる。例えばＡＡＶ１は蝸牛外構細胞（外らせん溝細胞）への感染能を持つがその他の上皮細胞への感染能は弱い。ＡＡＶ２は蝸牛内有毛細胞への感染能は高いがその他の上皮細胞への感染能は弱い。ＡＡＶ２の内耳への感染能を高めたＡＡＶ－ＡＮＣ８０Ｌ６５ベクターはＡＡＶ２が持つ内有毛細胞への感染能に加えて外有毛細胞の一部への感染能を持つが、ギャップ結合ネットワークを持つ蝸牛外構細胞及び蝸牛内構細胞（内らせん溝細胞）への感染能は低いため、遺伝性難聴で最多のＧＪＢ２変異型難聴（ギャップ結合の形成不全を特徴とする）への遺伝子治療への適用は難しい。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２００７／０１９９９４号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２０１６，９０（１１）：５２１９－５２３０

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 前記のように内耳細胞に代表される上皮細胞や、間質細胞、神経細胞、網膜細胞、水晶体細胞、癌細胞、皮膚細胞、並びにギャップ結合や構成要素のコネキシン分子を発現する細胞への感染指向性に優れた改変型ＡＡＶベクターは未だ開発されていない。

従って、本発明の課題は、内耳細胞に代表される上皮細胞や、間質細胞、神経細胞、網膜細胞、水晶体細胞、癌細胞、皮膚細胞、並びにギャップ結合やコネキシン分子を発現する細胞への感染指向性に優れた改変型ＡＡＶベクターを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] そこで、本発明者は、まず、ＡＡＶの血清型の内耳上皮細胞への感染指向性について検討したところ、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８が内耳上皮細胞、特に内耳ギャップ結合を形成する支持細胞への感染指向性が高いことを見出した。そこで、これらの野生型ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８などに対してアミノ酸配列の一部の改変を行ったところ、特定の位置のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換すれば、特許文献１記載のＡＡＶ－ＡＮＣ８０Ｌ６５ベクターや他の野生型ＡＡＶとは異なる感染指向性を有し、内耳上皮細胞に代表される上皮細胞への感染指向性の高いベクターになることを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、下記の発明［１］～［１７］を提供するものである

。

［１］アデノ随伴ウイルスのカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型アデノ随伴ウイルスベクターであって、配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて（１）１２９位（Ｌｅｕ）、（２）２６８位（Ｓｅｒ）、（３）４４７位（Ａｓｎ）、（４）４７０位（Ｇｌｙ）、（５）４７２位（Ｓｅｒ）、（６）４７３位（Ｖａｌ）、（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び（８）５３１位（Ｇｌｕ）から選ばれる１以上のアミノ酸残基又はこれに相当する位置のアミノ酸残基を、他のアミノ酸残基に置換した改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

［２］前記アミノ酸残基の置換が、Ｌｅｕ１２９Ｐｈｅ、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ、Ｔｈｒ５０２Ａｌａ及びＧｌｕ５３１Ｌｙｓから選ばれる１以上である［１］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

［３］上皮細胞の標的細胞への感染指向性が向上したベクターである［１］又は［２］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

［４］前記上皮細胞が、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、網膜細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、神経細胞、心筋細胞、及びＣｏｎｎｅｘｉｎ発現が関与する癌細胞から選ばれる上皮細胞である［３］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

［５］前記上皮細胞が、内耳上皮細胞である［３］又は［４］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

［６］さらにＧＪＢ２遺伝子、ＳＬＣ２６Ａ４遺伝子、ＴＭＣ１遺伝子、ＴＭＣ２遺伝子及びＡｔｏｈ１遺伝子から選ばれる遺伝性疾患、組織損傷、癌への遺伝子治療又はゲノム編集治療に適用され得る遺伝子が組み込まれている［１］～［５］のいずれかに記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[0009] ［７］［６］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターを含有する、標的細胞における遺伝性疾患、組織損傷、癌の治療用の遺伝子治療薬又はゲノム編集治療薬。

［８］標的細胞における遺伝性疾患、組織損傷、癌の治療用の遺伝子治療薬又はゲノム編集治療薬の製造のための、［６］記載の改変型アデノウイルス随伴ベクターの使用。

［９］標的細胞における遺伝性疾患、組織損傷又は癌の治療に用いるための、［６］記載の改変型アデノウイルス随伴ベクター。

［１０］［６］記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターを投与することを特徴とする、標的細胞における遺伝性疾患、組織損傷又は癌の治療方法。

[0010] ［１１］カプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（ａ）から選択されるいずれか一以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換する工程を含む、標的細胞に対する感染指向性が改善された改変型アデノ随伴ウイルスベクターの製造方法。

（ａ）配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、

（１）１２９位（Ｌｅｕ）、

（２）２６８位（Ｓｅｒ）、

（３）４４７位（Ａｓｎ）、

（４）４７０位（Ｇｌｙ）、

（５）４７２位（Ｓｅｒ）、

（６）４７３位（Ｖａｌ）、

（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び

（８）５３１位（Ｇｌｕ）

に相当する位置のアミノ酸残基。

［１２］基準アデノ随伴ウイルスベクターのカプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（ａ）から選択されるいずれか一以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換して候補改変アデノ随伴ウイルスベクターを作成する工程、

（ａ）配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、

（１）１２９位（Ｌｅｕ）、

（２）２６８位（Ｓｅｒ）、
（３）４４７位（Ａｓｎ）、
（４）４７０位（Ｇｌｙ）、
（５）４７２位（Ｓｅｒ）、
（６）４７３位（Ｖａｌ）、
（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び
（８）５３１位（Ｇｌｕ）
に相当する位置のアミノ酸残基；

前記候補改変アデノ随伴ウイルスベクターの前記標的細胞への感染量をレポーター遺伝子の陽性細胞又は発現タンパク質の陽性細胞数により感染細胞数又は遺伝子導入効率を測定・評価する工程；及び

前記標的細胞への感染量が、前記アミノ酸置換を導入する前の前記基準アデノ随伴ウイルスベクターに比して増加した候補改変アデノ随伴ウイルスベクターを選択する工程；
を含む［１１］記載の製造方法。

［１３］前記基準アデノ随伴ウイルスベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７又はＡＡＶ８である［１２］記載の製造方法。

［１４］前記アミノ酸置換が、
Ｌｅｕ１２９Ｐｈｅ、
Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、
Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、
Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、
Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、
Ｖａｌ４７３Ａｓｎ、
Ｔｈｒ５０２Ａｌａ及び
Ｇｌｕ５３１Ｌｙｓ
から選ばれる１以上である、［１２］記載の製造方法。

［１５］標的細胞が、内耳、皮膚、心臓、眼、脳、上部消化管、下部消化管

又は腎臓の細胞である［１２］記載の製造方法。

［１６］標的細胞が、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、気道上皮細胞、網膜細胞、水晶体細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、神経細胞、心筋細胞、間質系細胞及びＣｏｎｎｅｘｉｎ発現が関与する癌細胞から選ばれる細胞である［１２］記載の製造方法。

［１７］標的細胞が、内耳上皮細胞である［１２］記載の製造方法。

[0011] また、本発明は、他の一側面において、下記の発明〔１〕～〔１７〕をも提供する。

〔１〕標的細胞に対する改善された感染性指向性を示す改変型アデノ随伴ウイルスベクターであって、

カプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換が導入された、改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンの他のアミノ酸残基への置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンの他のアミノ酸残基への置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンの他のアミノ酸残基への置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンの他のアミノ酸残基への置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンの他のアミノ酸残基への置換、及び

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸の他のアミノ酸残基への置換。

〔２〕前記アミノ酸残基の置換が、

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンのフェニルアラニンへの置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンのトレオニンへの置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンのセリンへの置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンのトレオニンへの置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンのアラニンへの置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンのアスパラギンへの置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンのアラニンへの置換、又は

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸のロイシンへの置換、

である、〔１〕に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔３〕前記（２）～（７）のアミノ酸残基の置換を組み合わせて有する、〔１〕又は〔２〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔３－２〕配列番号１４又は配列番号１５のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、〔３〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔４〕前記（１）又は（８）のアミノ酸残基の置換をさらに有する、〔３〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔４－２〕配列番号１６又は配列番号１７のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、〔４〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔４－３〕前記（３）～（７）のアミノ酸残基の置換を組み合わせて有する、〔１〕又は〔２〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔４－４〕配列番号１８のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、〔４－３〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔５〕前記標的細胞が、上皮細胞、間質細胞、水晶体細胞又は癌細胞である、〔１〕－〔４〕のいずれかの改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔６〕前記上皮細胞が、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、網膜細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、神経細胞又は子宮細胞である、〔５〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔７〕前記標的細胞が、ギャップ結合を有するか、あるいはギャップ結合の構成要素となるコネキシン分子を発現する、〔５〕又は〔６〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔８〕コネキシン２６（ＧＪＢ２）遺伝子、ペンドリン（ＳＬＣ２６Ａ４）

遺伝子、ＴＭＣ１遺伝子、ＴＭＣ２遺伝子、電位依存性カリウムチャネルサブファミリーＱメンバー４）（ＫＣＮＱ４）、カドヘリン２３（ＣＨＤ２３）遺伝子、プロトカドヘリン１５（ＰＣＤＨ１５）遺伝子及びオトフェリン（ＯＴＯＦ）遺伝子から選ばれる遺伝性疾患の原因遺伝子、それらのゲノム編集のための遺伝子配列、プロテインアトナールホモログ１（Ａｔｏｈ１）遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子１Ｂ（ＣＤＫＮ１Ｂ）遺伝子及び塩基性ヘリックスループヘリックス型転写因子（Ｈｅｓ１）遺伝子選ばれる細胞分化・増殖のための遺伝子が組み込まれている、〔７〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔９〕ＧＪＢ２遺伝子の上流に、配列番号１１～１３のいずれかの塩基配列を含んでなるプロモーターがＧＪＢ２遺伝子を発現可能に組み込まれている、〔８〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

〔９－２〕ＧＪＢ２遺伝子の上流に、配列番号１９の塩基配列を含んでなるエンハンサーが前記プロモーターを活性化可能に組み込まれている、〔９〕の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[0012] 〔１０〕〔１〕～〔９〕のいずれかの改変型アデノ随伴ウイルスベクターを含む、医薬。

〔１１〕遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療、あるいはゲノム編集に用いられる、〔１０〕の医薬。

〔１２〕遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療、あるいはゲノム編集用の医薬の製造のための、〔１〕～〔９〕のいずれかの改変型アデノ随伴ウイルスベクターの使用。

〔１３〕遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌を有する対象に〔１〕～〔９〕のいずれかの改変型アデノ随伴ウイルスベクターの治療有効量を投与するステップを含む、遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療方法。

〔１４〕対象に〔１〕～〔９〕のいずれかの改変型アデノ随伴ウイルスベクターの有効量を投与するステップを含む、ゲノム編集方法。

[0013] 〔１５〕標的細胞に対する改善された感染性指向性を示す改変型アデノ随伴

ウイルスベクターの製造方法であって、

カプシド配列のアミノ酸配列に、下記の（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換を導入する工程を含む、

製造方法。

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンの他のアミノ酸残基への置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンの他のアミノ酸残基への置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンの他のアミノ酸残基への置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンの他のアミノ酸残基への置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンの他のアミノ酸残基への置換、及び

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸の他のアミノ酸残基への置換。

〔１６〕基準アデノ随伴ウイルスベクターのカプシド配列のアミノ酸配列に、前記（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換を導入して候補アデノ随伴ウイルスベクターを作成する工程と、

前記候補アデノ随伴ウイルスベクターの前記標的細胞の感染量を測定する工程；及び

前記標的細胞の感染量が、前記基準アデノ随伴ウイルスベクターに比して増加した候補アデノ随伴ウイルスベクターを選択する工程；

を含む、〔１５〕の製造方法。

〔１７〕前記基準アデノ随伴ウイルスベクターが、ＡＡＶ１～ＡＡＶ１０、好ましくはＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、より好ましくはＡＡＶ１又はＡＡＶ６、特に好ましくはＡＡＶ１である、〔１５〕の製造方法。

発明の効果

[0014] 本発明の改変型ＡＡＶベクターは、内耳上皮細胞に代表される上皮細胞に対する感染指向性が高いので、これらの上皮細胞の異常に起因する種々の疾患の遺伝子治療薬やゲノム編集治療薬や再生医療用のベクターとして有用である。特に、ＧＪＢ２遺伝子が組み込まれている本発明の改変型ＡＡＶベクターは、難聴遺伝子治療薬として有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1-1]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-2]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-3]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-4]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-5]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-6]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-7]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図1-8]ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを示す図である。

[図2]ＡＡＶの各種血清型の内耳細胞への感染指向性を示す図である。

[図3]ＡＡＶの各種血清型の内耳細胞への感染指向性を数値化した図である。

[図4]ＧＪＢ２欠損マウスの内耳上皮にＡＡＶ－ｓｉａ１．８でＧＪＢ２を導入した改変型アデノ随伴ウイルスベクターを導入した組織の染色像を示す。赤が導入したＧＪＢ２遺伝子によるコネキシン２６タンパク質を示す。緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。

[図5]ＧＪＢ２欠損マウスの内耳上皮にＡＡＶ－ｓｉａ６．８でＧＪＢ２を導入した改変型アデノ随伴ウイルスベクターを導入した組織の染色像を示す。赤が導入したＧＪＢ２遺伝子によるギャップ結合を示し、緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。細胞間に赤い線が入っている部分が遺伝子治療により形成されたギャップ結合である。

[図6]ＧＪＢ２遺伝子とＥＧＦＰ遺伝子を搭載した野生型ＡＡＶ６及びＡＡＶ－ｓｉａ６．８を感染させたＧＪＢ２欠損マウスの培養蝸牛器官の染色像である。赤がＧＪＢ２遺伝子の発現産物であるコネキシン２６タンパク質を示す。緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。

[図7]蝸牛器官を構成する細胞を示す模式図である。

[図8]外らせん溝細胞の領域（OSC）と、外有毛細胞とダイテルス細胞を含む領域（OHC+DC）におけるＥＧＦＰ陽性面積率を示す。

[図9]難聴患者のｉＰＳＣから誘導した内耳上皮細胞に、野生型ＧＪＢ２遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８を感染させ、コネキシン２６（ＣＸ２６）タンパク質及びコネキシン３０（ＣＸ３０）タンパク質の発現を免疫染色により検出した結果を示す。

[図10]ＣＸ３０タンパク質に対するＣＸ２６タンパク質の発現強度比を示す。

[図11]プロテインアトナールホモログ１（Ａｔｏｈ１）遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８を感染させたマウスの培養蝸牛器官を示す。

[図12]野生型ＧＪＢ２遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８により治療したＧＪＢ２欠損マウスの術前、術後１週間及び２週間のＡＢＲの閾値を示す。

[図13]野生型ＧＪＢ２遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８により治療し

たＧＪＢ２欠損マウスの術前、術後１週間及び２週間のＡＢＲの波形を示す。

[図14]プロモーター２を導入し、ＧＪＢ２遺伝子とＥＧＦＰ遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８を感染させたＧＪＢ２欠損マウスの培養蝸牛器官の染色像である。赤が導入したＧＪＢ２遺伝子によるギャップ結合を示し、緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。

[図15]ＥＧＦＰ遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８とそのＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体を感染させたマウスの培養蝸牛器官の染色像である。

[図16]外らせん溝細胞の領域（OSC）と、外有毛細胞とダイテルス細胞を含む領域（OHC+DC）におけるＥＧＦＰ陽性面積率を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 野生型ＡＡＶは、血清型としてＡＡＶ１～ＡＡＶ１０が存在する。

アミノ酸残基の置換導入対象とする「基準ＡＡＶ」には、特に限定されないが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８が好ましく用いられ、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６又はＡＡＶ８がより好ましく用いられ、ＡＡＶ１又はＡＡＶ６がさらに好ましく用いられ、ＡＡＶ１がよりさらに好ましく用いられる。

図２及び３に示すように、本発明者の各種ＡＡＶベクターを用いた試験により、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７及びＡＡＶ８は、内耳細胞、特にギャップ結合を形成する支持細胞への感染指向性が他の血清型に比べて高いことが判明した。従って、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７及びＡＡＶ８改変のための基準ＡＡＶにするのが好ましい。

[0017] 本発明の改変型ＡＡＶベクターは、野生アデノ随伴ウイルスのカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型アデノ随伴ウイルスベクターであり、好ましくはＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７又はＡＡＶ８のカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型ＡＡＶベクターが好ましい。また、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６又はＡＡＶ８のカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型ＡＡＶベクターがより好ましく、ＡＡＶ１又はＡＡＶ６のカプシド配列

の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型ＡＡＶベクターがさらに好ましく、ＡＡＶ１のカプシド配列の一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された改変型ＡＡＶベクターがよりさらに好ましい。

より具体的には、配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、（１）１２９位（Ｌｅｕ）、（２）２６８位（Ｓｅｒ）、（３）４４７位（Ａｓｎ）、（４）４７０位（Ｇｌｙ）、（５）４７２位（Ｓｅｒ）、（６）４７３位（Ｔｈｒ）、（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び（８）５３１位（Ｇｌｎ）から選ばれる１以上のアミノ酸残基又はこれに相当する位置のアミノ酸残基を、他のアミノ酸残基に置換した改変型アデノ随伴ウイルスベクターが好ましい。

[0018] 上記（１）～（８）に規定する位置に存在するアミノ酸残基は、ＡＡＶの標的細胞に対する感染性指向性の決定に重要な役割を有していることが明らかとなった。したがって、これらの位置に存在するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基への置換することによりＡＡＶの標的細胞に対する感染性指向性を変化させることができ、目的とする標的細胞に対して改善された感染性指向性を示す改変型ＡＡＶを得られると期待できる。

[0019] 従って、本発明は、基準ＡＡＶのカプシド配列のアミノ酸配列に、上記（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換を導入して候補ＡＡＶを作成する工程（候補ＡＡＶ作成工程）と、

前記候補ＡＡＶの前記標的細胞の感染量を測定する工程（測定工程）；及び

前記標的細胞の感染量が、前記基準ＡＡＶに比して増加した候補ＡＡＶを選択する工程（選択工程）；

を含む、標的細胞に対する改善された感染性指向性を示す改変型ＡＡＶの製造方法をも提供する。

[0020] ここで、「配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置」とは、アミノ酸残基の置換の導入対象とする「基準ＡＡＶのカプシド配列」において、当該カプシド

配列のアミノ酸配列を配列番号１のアミノ酸配列とアラインメントさせた場合に、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に対応する位置を意味する。上述のとおり「基準ＡＡＶ」は、特に限定されないが、野生型ＡＡＶであってよく、血清型ＡＡＶ１－１０の野生型ＡＡＶであってよい。従って、「基準ＡＡＶのカプシド配列」は、例えば野生型ＡＡＶのカプシド配列であって、血清型ＡＡＶ１－１０の野生型ＡＡＶのカプシド配列であってよい。

アラインメントは、比較すべき２つのアミノ酸配列のアミノ酸残基ができるだけ多く一致するように両アミノ酸配列を整列させることにより行われる。整列の際には、必要に応じ、比較する２つのアミノ酸配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このようなアミノ酸配列の整列化は、例えばＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、ＣＬＵＳＴＡＬW等の周知のプログラムを用いて行なうことができる。

また、前記特定の位置のアミノ酸残基に相当する位置のアミノ酸残基とは、ＡＡＶ１～ＡＡＶ１０における配列番号１の前記（１）～（８）の位置に相当するアミノ酸残基であればよいが、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８における配列番号１の前記（１）～（８）の位置に相当するアミノ酸残基であることが好ましく、ＡＡＶ６、ＡＡＶ８における配列番号１の前記（１）～（８）の位置に相当するアミノ酸残基であることがより好ましい。ＡＡＶ１のカプシド配列は配列番号１で示される。ＡＡＶ２－１０のカプシド配列を配列番号２－１０に示す。また、ＡＡＶ１－１０のカプシド配列のアラインメントを図１－１～図１－８に示す。

[0021] 図１に示されるように、（１）配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシン、（２）２６８位に相当する位置に存在するセリン、（３）４４７位に相当する位置に存在するアスパラギン、（４）４７０位に相当する位置に存在するグリシン、（５）４７２位に相当する位置に存在するセリン、（６）４７３位に相当する位置に存在するバリン、（７）５０２位に相当する位置に存在するトレオニン、（８）５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸は、ＡＡＶ２のカプシド配列（配列番号２）

では、それぞれ（２－１）１２９位のロイシン、（２－２）２６８位に存在するアスパラギン、（２－３）４４６位に存在するセリン、（２－４）４６９位に存在するアスパラギン酸、（２－５）４７１位に存在するアルギニン、（２－６）４７２位に存在するアスパラギン酸、（２－７）５０１位に存在するセリン、（２－８）５３０位に存在するグルタミン酸である。

また、ＡＡＶ３のカプシド配列（配列番号３）では、それぞれ（３－１）１２９位のロイシン、（３－２）２６８位に存在するアスパラギン、（３－３）４４６位に存在するアスパラギン、（３－４）４７０位に存在するセリン、（３－５）４７２位に存在するセリン、（３－６）４７３位に存在するロイシン、（３－７）５０２位に存在するプロリン、（３－８）５３１位に存在するグルタミン酸である。

ＡＡＶ４のカプシド配列（配列番号４）では、それぞれ（４－１）１２８位のロイシン、（４－２）２５７位に存在するセリン、（４－３）４５０位に存在するグルタミン、（４－４）４６４位に存在するアスパラギン、（４－５）４６６位に存在するセリン、（４－６）４６７位に存在するアスパラギン、（４－７）５０３位に存在するリシン、（４－８）５３０位に存在するアスパラギン酸である。

ＡＡＶ５のカプシド配列（配列番号５）では、それぞれ（５－１）１２８位のフェニルアラニン、（５－２）２５８位に存在するセリン、（５－３）４３９位に存在するバリン、（５－４）ＡＡＶ１の４７０位に相当するアミノ酸が存在しない、（５－５）ＡＡＶ１の４７２位に相当するアミノ酸が存在しない、（５－６）ＡＡＶ１の４７３位に相当するアミノ酸が存在しない、（５－７）４８８位に存在するアラニン、（５－８）５１８位に存在するセリンである。

ＡＡＶ６のカプシド配列（配列番号６）では、それぞれ（６－１）１２９位のフェニルアラニン、（６－２）２６８位に存在するセリン、（６－３）４４７位に存在するアスパラギン、（６－４）４７０位に存在するグリシン、（６－５）４７２位に存在するセリン、（６－６）４７３位に存在するバ

リン、（６－７）５０２位に存在するトレオニン、（６－８）５３１位に存在するリシンである。

ＡＡＶ７のカプシド配列（配列番号７）では、それぞれ（７－１）１２９位のロイシン、（７－２）２６９位に存在するトレオニン、（７－３）４４８位に存在するアラニン、（７－４）４７２に存在するトレオニン、（７－５）４７４に存在するアラニン、（７－６）４７５に存在するグルタミン酸、（７－７）５０４位に存在するアラニン、（７－８）５３３位に存在するグルタミン酸である。

ＡＡＶ８のカプシド配列（配列番号８）では、それぞれ（８－１）１２９位のロイシン、（８－２）２６８位に存在するセリン、（８－３）４４８位に存在するバリン、（８－４）４７０位に存在するセリン、（８－５）４７２位に存在するアラニン、（８－６）４７３位に存在するアスパラギン、（８－７）５０２位に存在するアラニン、（８－８）５３１位に存在するグルタミン酸である。

ＡＡＶ９のカプシド配列（配列番号９）では、それぞれ（９－１）１２９位のロイシン、（９－２）２６８位に存在するセリン、（９－３）４４８位に存在するセリン、（９－４）４７０位に存在するアスパラギン、（９－５）４７２位に存在するアラニン、（９－６）４７３位に存在するバリン、（９－７）５０２位に存在するアラニン、（９－８）５３１位に存在するグルタミン酸である。

ＡＡＶ１０のカプシド配列（配列番号１０）では、それぞれ（１０－１）１２９位のロイシン、（１０－２）２６９位に存在するセリン、（１０－３）４４９位に存在するセリン、（１０－４）４７２位に存在するアスパラギン、（１０－５）４７４位に存在するセリン、（１０－６）４７５位に存在するアラニン、（１０－７）５０４位に存在するアラニン、（１０－８）５３３位に存在するグルタミン酸である。

[0022] 「基準ＡＡＶ」としてＡＡＶ１－１０以外のＡＡＶを用いる場合にも、同様に当該ＡＡＶのカプシド配列のアミノ酸配列を配列番号１のアミノ酸配列

とのアラインメントをとることによって、（１）配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシン、（２）２６８位に相当する位置に存在するセリン、（３）４４７位に相当する位置に存在するアスパラギン、（４）４７０位に相当する位置に存在するグリシン、（５）４７２位に相当する位置に存在するセリン、（６）４７３位に相当する位置に存在するバリン、（７）５０２位に相当する位置に存在するトレオニン、（８）５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸を決定できる。

[0023] さらに好ましい本発明の改変型ＡＡＶベクターは、配列番号１の前記（１）～（８）の位置又はこれに相当する位置のアミノ酸残基の置換が、Ｌｅｕ１２９Ｐｈｅ、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ、Ｔｈｒ５０２Ａｌａ及びＧｌｕ５３１Ｌｙｓから選ばれる１以上であるベクターである。

[0024] 本発明の改変型ＡＡＶベクターは、有毛細胞（内有毛細胞、外有毛細胞）への感染能が高い。特に、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａの置換を組み合わせて有する改変型ＡＡＶベクターは、有毛細胞への感染能が高い。また、これらの置換に組み合わせてさらにＬｅｕ１２９Ｐｈｅ又はＧｌｕ５３１Ｌｙｓの置換を有する改変型ＡＡＶベクターも有毛細胞への感染能が高い。さらに、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａの置換を組み合わせて有する改変型ＡＡＶベクターは、有毛細胞へのさらに高い感染能と、外らせん溝細胞への顕著に高い感染能とを有する。

[0025] 前記改変（組み換え）手段としては、通常のジーンターゲティング手段を用いることができる。具体的には、Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ６，３４３－３４５（２００９）に記載のようなＰＣＲプライマーに変異を加えるジーンターゲティング手段を採用することができる。

[0026] 本発明の標的細胞に対する感染指向性が改善された改変型アデノ随伴ウイルスベクターの製造方法は、カプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（ａ）

から選択されるいずれか一以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換する工程を含む方法であるのが好ましい。

（ａ）配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、

（１）１２９位（Ｌｅｕ）、

（２）２６８位（Ｓｅｒ）、

（３）４４７位（Ａｓｎ）、

（４）４７０位（Ｇｌｙ）、

（５）４７２位（Ｓｅｒ）、

（６）４７３位（Ｖａｌ）、

（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び

（８）５３１位（Ｇｌｕ）

に相当する位置のアミノ酸残基。

[0027] より具体的には、基準アデノ随伴ウイルスベクターのカプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（ａ）から選択されるいずれか一以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換して候補改変アデノ随伴ウイルスベクターを作成する工程（候補ＡＡＶ作成工程）、

（ａ）配列番号１のＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、

（１）１２９位（Ｌｅｕ）、

（２）２６８位（Ｓｅｒ）、

（３）４４７位（Ａｓｎ）、

（４）４７０位（Ｇｌｙ）、

（５）４７２位（Ｓｅｒ）、

（６）４７３位（Ｖａｌ）、

（７）５０２位（Ｔｈｒ）及び

（８）５３１位（Ｇｌｕ）

に相当する位置のアミノ酸残基；

前記候補改変アデノ随伴ウイルスベクターの前記標的細胞への感染量を測定する工程（測定工程）；及び

前記標的細胞への感染量が、前記アミノ酸置換を導入する前の前記基準アデノ随伴ウイルスベクターに比して増加した候補改変アデノ随伴ウイルスベクターを選択する工程（選択工程）；を含む製造方法が好ましい。

[0028] 前記基準アデノ随伴ウイルスベクターとしては、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７又はＡＡＶ８であるのが好ましく、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６又はＡＡＶ８であるのがより好ましい。

前記アミノ酸置換は、Ｌｅｕ１２９Ｐｈｅ、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ、Ｔｈｒ５０２Ａｌａ及びＧｌｕ５３１Ｌｙｓから選ばれる１以上であるのがより好ましい。

[0029] 測定工程における標的細胞への感染量の測定は、候補改変ＡＡＶに搭載した遺伝子（レポータータンパク質等のタンパク質をコードする遺伝子）を発現する細胞の数又は当該細胞におけるタンパク質の発現強度を計測することにより行うことができる。

[0030] 前記標的細胞は、上皮細胞、間質細胞、水晶体細胞、角膜細胞、網膜細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、膵細胞、肝細胞、神経細胞、神経膠細胞、血液細胞、軟骨細胞、骨細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、又は癌細胞であってよい。

上皮細胞は、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、網膜細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、口腔粘膜細胞、鼻粘膜細胞、糸球体細胞、膀胱細胞、又は子宮細胞であってよい。

さらに、前記標的細胞は、特に、ギャップ結合を有するか、あるいはギャップ結合の構成要素となるコネキシン分子を発現する細胞であってよい。

[0031] 得られた改変型ＡＡＶベクターは、標的細胞、例えば前記上皮細胞への感染指向性が顕著に向上している。

例えば、ＡＡＶ１のカプシド配列に対して、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａ

ｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａから選ばれる１又は２以上の置換を有する改変型ＡＡＶベクターは、野生型ＡＡＶ１が有毛細胞（内有毛細胞、外有毛細胞）にはほぼ感染しないのに対し、外有毛細胞への特異性が高く、内耳上皮細胞群の中で外有毛細胞への感染能が最も高く８０～１００％の感染効率となる。

これらのアミノ酸置換を任意に組み合わせることで様々な標的細胞に対して感染指向性を有する改変ＡＡＶを創出し得る可能性がある。

このような改変型ＡＡＶベクターの具体例として、配列番号１５のアミノ酸配列のカプシド配列を有するＡＡＶベクター（本開示において「ＡＡＶ－ｓｉａ１．８」と称される）が挙げられる。

また、同改変型ＡＡＶベクターさらなる改変体であり、配列番号１６のアミノ酸配列のカプシド配列を有するＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＧｌｕ５３１Ｌｙｓ改変体）及び配列番号１７のアミノ酸配列のカプシド配列を有するＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＬｅｕ１２９Ｐｈｅ改変体）は、ＡＡＶ１と比して外有毛細胞と支持細胞への感染性が強く、支持細胞においては面積の大きいギャップ結合複合体を多数形成する。一部の内有毛細胞へも感染する。

[0032] また、ＡＡＶ６のカプシド配列に対してＳｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａから選ばれる１又は２以上の置換を有する改変型ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ１のカプシド配列に対して同様の置換を行った改変型ＡＡＶベクターと同様に外有毛細胞への高い感染能を持つ。外有毛細胞への特異性、感染指向性はＡＡＶ１の改変型より弱いが、ＡＡＶ１の改変型より広範囲に感染する能力を持つ。

これらのアミノ酸置換を任意に組み合わせることで様々な標的細胞に対して感染指向性を有する改変ＡＡＶを創出し得る可能性がある。

このような改変型ＡＡＶベクターの具体例として、配列番号１４のアミノ酸配列のカプシド配列を有するＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ６．８）が

挙げられる。

また、同改変型ＡＡＶベクターのさらなる改変体であり、配列番号１８のアミノ酸配列のカプシド配列を有するＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体）は、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８に比して有毛細胞へのさらに高い感染能と、外らせん溝細胞への顕著に高い感染能とを有する。

[0033] 本発明の改変型ＡＡＶベクターは、種々の上皮細胞、特にギャップジャンクションを形成する上皮細胞に対する感染指向性が向上している。具体的な上皮細胞としては、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、網膜細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、神経細胞、心筋細胞、及びＣｏｎｎｅｘｉｎ発現が関与する癌細胞から選ばれる上皮細胞が挙げられる。

従って、本発明の改変型ＡＡＶベクターは、これらの上皮細胞における疾患に対する遺伝子治療、ゲノム編集治療に有用である。

[0034] 本発明の改変型ＡＡＶベクターは、前記標的細胞に対する感染指向性が向上しているので、改変型ＡＡＶベクターに、標的細胞における遺伝性疾患、組織損傷、癌の遺伝子治療、ゲノム編集治療に適用され得る遺伝子を組み込むのが好ましい。このような遺伝子としては、例えば、ＧＪＢ２遺伝子、ＳＬＣ２６Ａ４遺伝子、ＴＭＣ１遺伝子、ＴＭＣ２遺伝子、ＫＣＮＱ４遺伝子、ＣＨＤ２３遺伝子、プロトカドヘリン１５（ＰＣＤＨ１５）遺伝子、オトフェリン（ＯＴＯＦ）遺伝子等の遺伝性疾患の原因遺伝子；Ａｔｏｈ１遺伝子、ＣＤＫＮ１Ｂ遺伝子及びＨｅｓ１遺伝子などの転写因子であって細胞の分化や増殖に関与する遺伝子等が挙げられる。

特に遺伝性難聴に関連する遺伝子のさらなる例として以下が挙げられる。

ACTG1、ADCY1、ADGRV1、AIFM1、BDP1、BSND、BTD、CABP2、CCDC50、CD164、CDC14A、CDH23、CEACAM16、CIB2、CLDN14、CLIC5、CLRN1、COCH、COL11A1、COL11A2、COL2A1、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL4A6、COL9A1、COL9A2、COL9A3、DCDC2、DIAPH1、DMXL2、DSPP、EDN3、EDNRB、ELM0D3、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESRRB、EYA1、EYA4、FAM189A2、GIPC3、GJB3、GJB6、GPSM2、GRHL2、

GRXCR1、GRXCR2、GSDME、HARS1、HGF、H0MER2、ILDR1、KARS1、KCNE1、KCNQ1、LHFPL5、LOXHD1、LRTOMT、 MARVELD2、MCM2、MET、MIR96、MITF、MSRB3、MT-C01、MT-RNR1、MT-TS1、MYH14、MYH9、MYO15A、MYO1A、MYO3A、MYO6、MYO7A、MYO7A、NARS2、NF2、0SBPL2、OTOA、OTOG、OTOGL、P2RX2、PAX3、PEX7、PHYH、PJVK、PNPT1、POU3F4、POU4F3、PRPS1、PTPRQ、RDX、RIPOR2、ROR1、S1PR2、SERPINB6、SIX1、SIX5、SLC17A8、SLC22A4、SLC26A5、SMPX、SOX10、STRC、SYNE4、TBC1D24、TECTA、TIMM8A、TJP2、TMEM132E、TMIE、TMPRSS3、TPRN、TRIO、 TSPEAR、USH1C、USH1G、USH2A、WBP2、WFS1、およびWHRN。

[0035] 本発明の改変型ＡＡＶベクターには、上述の遺伝子の発現のためのプロモーターが組み込まれ得る。プロモーターには、ＣＭＶやＣＡＧなどの既知のプロモーターを用いることができるが、内耳支持細胞等のＧＪＢ２発現細胞での遺伝子のためのプロモーターには、特に配列番号１１～１３のいずれかの塩基配列を含んでなるプロモーターが好適に用いられ得る。プロモーターは１つを複数回連続して繰り返し配列させてもよく（単一プロモーターのタンデム）、２つ以上を組み合わせていずれか又は全てのプロモーターが連続又は不連続に複数回数繰り返して配列されるようにしてもよい（複数プロモーターのタンデム）。

また、本発明の改変型ＡＡＶベクターには、プロモーターの活性を増強するためのエンハンサーが組み込まれ得る。エンハンサーには、既知のエンハンサーを用いることができるが、配列番号１１～１３の塩基配列を含んでなるプロモーターと好適に組み合わせるエンハンサーとして例えば配列番号１９の塩基配列を含んでなるエンハンサー（”Characterization of GJB2 cis regulatory elements in the DFNB1 locus”, Human Genetics (2019) 138:1275-1286）が挙げられる。エンハンサーは１つを複数回連続して繰り返し配列させてもよく（単一エンハンサーのタンデム）、２つ以上を組み合わせていずれか又は全てのエンハンサーが連続又は不連続に複数回数繰り返して配列されるようにしてもよい（複数エンハンサーのタンデム）。

[0036] 本発明の改変型ＡＡＶベクターを用いる遺伝子治療の好ましい具体例とし

ては、遺伝性難聴で最多のＧＪＢ２変異型難聴への遺伝子治療が挙げられる。すなわち、遺伝性難聴で最も多いのがＧＪＢ変異型難聴であり、先天性難聴の全症例の約４５％を占める。本発明の改変型ＡＡＶベクターに正常ＧＪＢ遺伝子を組み込んだ難聴遺伝子治療薬を製造することができる。この遺伝子治療薬は内耳アブミ骨底板からの内耳リンパ液への局所投与や静脈投与などへの投与により投与され、標的遺伝子を標的細胞へ効率よく発現させることにより異常な遺伝子機能を正常化する。

投与は、静脈内、脳室内、蝸牛内、髄腔内、筋肉内、皮下、またはそれらの組み合わせであり得る。特に、投与は、蝸牛または前庭系への投与であってよく、そのたの送達は、正円窓膜（ＲＷＭ）、卵円窓、または半規管を介した蝸牛または前庭系への注射であってよい。

[0037] 本発明の遺伝子治療薬、ゲノム編集治療薬は、前記改変型ＡＡＶベクターを、当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、乳化、カプセル封入、凍結乾燥等により、製剤化することができる。

[0038] 経口投与用の好適な製剤は、本発明の改変型ＡＡＶベクターを、水、生理食塩水のような希釈剤に有効量溶解させた液剤、有効量を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、顆粒剤、散剤又は錠剤、適当な分散媒中に有効量を懸濁させた懸濁液剤、有効量を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

[0039] 非経口投与用には、本発明の改変型ＡＡＶベクターを、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、注射用溶液、懸濁液、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、吸入剤、坐剤等の剤形に製剤化することができる。注射用の処方においては、本発明の改変型ＡＡＶベクターを水性溶液、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液、又は生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、本発明の医薬は、油性又は水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、又は乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、本発明の改変型ＡＡＶベクターを粉体の形態で

製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液又は懸濁液を調製してもよい。吸入による投与用には、本発明の改変型ＡＡＶベクターを粉末化し、ラクトース又はデンプン等の適当な基剤とともに粉末混合物とすることができる。坐剤処方は、本発明改変型ＡＡＶベクターをカカオバター等の慣用の坐剤基剤と混合することにより製造することができる。さらに、本発明の治療剤は、ポリマーマトリクス等に封入して、持続放出用製剤として処方することができる。

[0040] 本発明の改変型ＡＡＶベクターの投与量は、患者の症状、投与経路、体重、年令等によっても異なるが、例えば成人１日あたり０．５μｇ～１００ｍｇであるのが好ましい。

実施例

[0041] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0042] 実施例１：基準ＡＡＶの感染指向性の評価（培養内耳上皮組織）

各種血清型のＡＡＶベクター（ＧｅｎｅＣａｐｏｅｉａ社、ＡＡＶＰｒｉｍｅ™ Ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ（ＡＡＶ） Ｓｅｒｏｔｙｐｅ Ｔｅｓｔｉｎｇ Ｋｉｔ Ｐｌｕｓ，Ｃａｔ． Ｎｏ．ＡＡ３２１）を用いて、羊土社 実験医学別冊 決定版 ウイルスベクターによる遺伝子導入実験ガイド ＡＡＶベクターを用いた内耳への遺伝子治療 Ｐａｇｅ１５９－１６６（２０２０．１１）に記載の方法によって、内耳上皮細胞への感染指向性について検討した。

ＡＡＶベクターには、コネキシン２６をコードするＧＪＢ２遺伝子を配列番号１１－１３のいずれかの塩基配列を含んでなるプロモーター（それぞれプロモーター１、プロモーター２、プロモーター３と称する）の制御下に組み込んだ。

生後４日齢のマウス（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ系）より内耳を摘出し、感覚上皮を含む組織を８ウェルチャンバースライド（Ｍａｔｓｕｎａｍｉ， Ｃａｔ． Ｎｏ．ＳＣＳ－Ｎ３８）上でＤＭＥＭ培地中で１晩培養した。翌日に各

血清型ＡＡＶ（ＡＡＶ１－１０、５×10^{8}－５×10^{9}ＧＣ）を添加した。４－６日間培養し、４％パラホルムアルデヒドで固定後に抗コネキシン２６抗体（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ． Ｃａｔ． Ｎｏ．５１－２８００）による免疫蛍光染色を行い、ＡＡＶのレポーター遺伝子であるＥＧＦＰの緑色蛍光と共に蛍光顕微鏡で観察し、ＥＧＦＰ陽性細胞とコネキシン２６によるギャップ結合を形成する細胞を計測した。

その結果、図２及び図３に示すように、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７及びＡＡＶ８は、内耳細胞、特にギャップ結合を形成する支持細胞への感染指向性が他の血清型に比べて高いことが判明した。

また、プロモーター１（ヒトＧＪＢ２遺伝子の転写開始点から上流の１０６５ｂｐの遺伝子配列）、プロモーター２（ヒトＧＪＢ２遺伝子の転写開始点から上流の７６０ｂｐの遺伝子配列）及びプロモーター３（ヒトＧＪＢ２遺伝子の転写開始点から上流の２６０ｂｐの遺伝子配列）は、内耳支持細胞及び内耳線維細胞での各種タンパク質発現に適していた。コネキシン２６の発現強度に基づいてプロモーター活性を評価したところ、活性が高い順にプロモーター１、プロモーター２、プロモーター３であった。

[0043] 実施例２：基準ＡＡＶへのアミノ酸置換の導入による改変型ＡＡＶの作成と感染指向性の評価（培養内耳上皮組織）

Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ６，３４３－３４５（２００９）に記載のＰＣＲプライマーに変異を加えるジーンターゲティング手段を用いて、カプシド配列のアミノ酸配列に種々のアミノ酸置換を導入したベクターを作成した。なお。改変ベクターには、ＧＪＢ２遺伝子とレポーター遺伝子（ＥＧＦＰ遺伝子）も導入した。

得られた改変ベクターの形質導入効率、感染指向性の変化を表１に示す。

その結果、ＡＡＶ１のカプシド配列に対して、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａの置換を有する改変型ＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ１．８：配列番号１５）は、ＡＡＶ１が有毛細胞（内有毛細胞、

外有毛細胞）にはほぼ感染しないのに対し、外有毛細胞への特異性が高く、内耳上皮細胞群の中で外有毛細胞への感染能が最も高く８０～１００％の感染効率となることがわかった。

また、ＡＡＶ６のカプシド配列に対して、Ｓｅｒ２６８Ｔｈｒ、Ａｓｎ４４７Ｓｅｒ、Ｇｌｙ４７０Ｔｈｒ、Ｓｅｒ４７２Ａｌａ、Ｖａｌ４７３Ａｓｎ及びＴｈｒ５０２Ａｌａの置換を有する改変型ＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｉａ６．８：配列番号１４）においては、前記ＡＡＶ－ｓｉａ１．８と同様に外有毛細胞への高い感染能を持つ。外有毛細胞への特異性、感染指向性はＡＡＶ－ｓｉａ１．８より弱いが、前記ＡＡＶ－ｓｉａ１．８より広範囲の内耳上皮細胞群に感染する能力を持つことがわかった。

[0044] [表1]

改変 AAV	基準 AAV	置換	導入効率	感染指向性の変化
AAV-Sia1.8	AAV1	Ser268Thr, Asn447Ser, Gly470Thr, Ser472Ala, Val473Asn, Thr502Ala	-	OSC から OHC
AAV-Sia.6.8	AAV6	Ser268Thr, Asn447Ser, Gly470Thr, Ser472Ala, Val473Asn, Thr502Ala	↑↑	OSC から OHC/IHC/OSC

[0045] 「↑↑」：５０％以上増加

「↑」：１－５０％未満増加

「↓」：１－５０％未満減少

「↓↓」：５０％以上増加

「ＯＳＣ」：外らせん溝細胞（Ｏｕｔｅｒ　Ｓｕｌｃｕｓ　Ｃｅｌｌ）

「ＯＨＣ」：外有毛細胞（Ｏｕｔｅｒ　Ｈａｉｒ　Ｃｅｌｌ）

「ＩＨＣ」：内有毛細胞（（Ｉｎｎｅｒ　Ｈａｉｒ　Ｃｅｌｌ）

[0046] 実施例３：改変型ＡＡＶへのさらなるアミノ酸置換の導入と感染指向性の評価

実施例２と同様にして、ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＧｌｕ５３１Ｌｙｓ改変体、及びＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＬｅｕ１２９Ｐｈｅ改変体を作成した。

ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＧｌｕ５３１Ｌｙｓ改変体（配列番号１６）は、ＡＡＶ１と比して外有毛細胞と支持細胞への感染性が強く、支持細胞においては面積の大きいギャップ結合複合体を多数形成する。一部の内有毛細胞へも感染する。

また、ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＬｅｕ１２９Ｐｈｅ改変体（配列番号１７）も同様に、ＡＡＶ１と比して外有毛細胞と支持細胞への感染性が強く、支持細胞においては面積の大きいギャップ結合複合体を多数形成する。一部の内有毛細胞へも感染する。

[0047] 実施例４：難聴モデル動物由来培養内耳上皮組織への遺伝子導入

難聴モデル動物（ＧＪＢ２欠損マウス）の内耳上皮にＡＡＶ　ｓｉａ１．８でＧＪＢ２（ＧＪＢ２及びＥＧＦＰ導入済み）を導入した染色像を図４に示す。赤が導入したＧＪＢ２遺伝子によるコネキシン２６タンパク質を示す。緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。外有毛細胞において感染を示すＥＧＦＰ発現が特異的に強く、その他の内有毛細胞や支持細胞などへの感染を示すＥＧＦＰ発現およびコネキシン２６の発現が少ない。

[0048] また、ＧＪＢ２欠損マウスの内耳上皮にＡＡＶ－ｓｉａ６．８でＧＪＢ２（ＧＪＢ２及びＥＧＦＰ導入済み）を導入した染色像を図５に示す。赤が導入したＧＪＢ２遺伝子によるコネキシン２６を含むギャップ結合を示す。緑がＥＧＦＰのレポーターを示す。細胞間に赤い線が入っている部分が遺伝子治療により形成されたギャップ結合である。

[0049] 実施例５：難聴モデル動物由来培養蝸牛器官への遺伝子導入

ＧＪＢ２欠損マウスの培養蝸牛器官を用いて、ＧＪＢ２遺伝子とＥＧＦＰ遺伝子を搭載した野生型ＡＡＶ６及びＡＡＶ－ｓｉａ６．８の感染実験を行った。

[0050] 生後４日のマウスを麻酔下で実験殺し、側頭骨から蝸牛を取り出した。蝸牛から蝸牛軸を取り除き、コルチ器官から血管条を剥がした。コルチ器官を８ウェルチャンバースライドに移し、ダルベッコ改変イーグル培地（高グルコース、ピルビン酸ナトリウム、GlutaMAXTM Supplement、ウシ胎児血清、N2 Supplement、ペニシリンGカリウムを添加）中で一晩培養（5% CO_2雰囲気、37℃）した。その後、培地を、１００μｌあたり４μｌのＡＡＶ溶液（2.05×10^{13}GC/mL）を含む培地に交換した。さらに５日間培養を行った後、コルチ器官を４％パラホルムアルデヒドで処理して固定した。

[0051] 結果を図６に示す。野生型ＡＡＶ６では、ＥＧＦＰシグナルは主に外らせん溝細胞（OSC）で検出された。一方、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８では、内耳上皮全体（OSC, OHC, IHC, DC, ISC）で広範囲にＥＧＦＰシグナルが検出された（図７も参照）。

外らせん溝細胞の領域（OSC）と、外有毛細胞とダイテルス細胞を含む領域（OHC+DC）におけるＥＧＦＰ陽性面積率を画像解析した結果を図８に示す。ＡＡＶ－ｓｉａ６．８は、野生型ＡＡＶ６に比して、外らせん溝細胞の領域（OSC）と、外有毛細胞とダイテルス細胞を含む領域（OHC+DC）のいずれにおいても陽性面積率が高く、内耳上皮細胞の広範囲の細胞に高い効率で遺伝子導入が可能であることが示された。

[0052] 実施例６：遺伝子治療（難聴患者由来iPSC細胞から誘導した内耳上皮細胞におけるギャップ結合の修復）

ＧＪＢ２遺伝子の異常による重度難聴患者と健聴者から樹立された人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）から内耳上皮細胞を分化誘導した。内耳上皮細胞に対して、野生型ＧＪＢ２遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８を感染させ、コネキシン２６（CX26）の発現によるギャップ結合の修復を行った。

[0053] 健聴者由来のｉＰＳＣ株（201B7）は、理化学研究所バイオリソースセンターセルバンクから入手した。

難聴患者由来のｉＰＳＣ株（細胞株名：JUFMDOi005-A）は、本発明者らの学術論文（”Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c.235delC mutation in the GJB2 gene associated with sensorineural hearing loss”, Stem Cell Research, Volume 47, August 2020, 101910）に記載の方法によって作成された。

[0054] ｉＰＳＣを、２０μｍ　Ｙ２７６３２を添加したＳｔｅｍ　Ｆｉｔ培地に懸濁し、９０００細胞／ウェルで９６ウェルプレートに播種した。２日間インキュベーション（37℃、5% CO_2）した後、２％マトリゲルを添加したｇｆＣＤＭ培地（Ham’s F12 GlutaMax/IMDM GlutaMax (1:1) (Gibco), 1 % Chemically defined lipid concentrate (Gibco), 0.5 % BSA (Sigma), 15 μg/ml Transferin (Sigma), 450 μM 1-Thioglycerol (Sigma)）１００μｌを入れた９６ウェルプレートに細胞凝集体を移し、さらにインキュベーションした。７－１１日後に、鉗子を使用して細胞凝集体を半分割した。分割した細胞凝集体を、DFNB培地（DMEM/F12 (1:1) (Gibco), 1% N2 supplement (Gibco), 1% B27 supplement (Gibco)）中のマイトマイシンＣ処理した内耳由来フィーダー細胞（トリプシン耐性内耳細胞：TRIC）上に移した。ＴＲＩＣ上に細胞凝集体を移してから２０－２５日後に、内耳上皮細胞が分化誘導される。

ＴＲＩＣは、１０週齢のマウスから採取した蝸牛組織から調製した。蝸牛組織は、コルチ器官、基底膜、側壁からなり、主に支持細胞、有毛細胞、蝸牛神経線維細胞、その他の基底膜の細胞から構成される。蝸牛組織をトリプシンに曝露し、トリプシン耐性細胞をスクリーニングすることによってＴＲＩＣを得た。これらの細胞を増殖培地（DMEM-GlutaMax (Gibco), 10% FBS (Gibco)）下で維持した。

[0055] コネキシン２６（ＣＸ２６）と比較対象のコネキシン３０（ＣＸ３０：ＧＪＢ６遺伝子産物）の内耳上皮細胞における発現を免疫染色により検出した。また、ＣＸ３０及びＣＸ２６の発現強度を画像解析し、ＣＸ３０に対する

ＣＸ２６の発現強度比を算出した。結果を図９及び図１０に示す。健聴者（201B7）の内耳上皮細胞では、ＣＸ３０及びＣＸ２６が陽性のギャップ結合が明瞭に観察され、ＣＸ３０に対して４０％程度の強度でＣＸ２６が発現していた。難聴患者（GJB2-235delC）の内耳上皮細胞では、内耳ギャップ結合は不明瞭で形成が不十分であり、ＣＸ３０に対するＣＸ２６の発現強度も２５％程度に低下していた。ＡＡＶ－ｓｉａ６．８により野生型ＧＪＢ２遺伝子を導入した難聴患者の内耳上皮細胞では、ＣＸ３０に対するＣＸ２６の発現強度が５０％程度に回復し（GJB2-235delC + AAV-GJB2WT）、ギャップ結合が修復されていることが確認できた。

[0056] 実施例７：遺伝子治療（有毛細胞の再生）

マウスの培養蝸牛器官を用いて、プロテインアトナールホモログ１（Ａｔｏｈ１）遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８の感染実験を行った。転写因子Ａｔｏｈ１は、支持細胞に遺伝子導入されると、支持細胞を有毛細胞へ分化誘導させることが知られている。図１１に示すように、有毛細胞（Hair cells）領域とは異なる領域（図１１（Ａ）において点線で囲った領域）に、有毛細胞様細胞が出現した（図１１（Ｂ）（Ｃ）の矢印参照）。図１１（Ｂ）は、図１１（Ａ）において点線で囲った領域を拡大したものである。騒音性難聴等によって有毛細胞が欠損した場合に有毛細胞を再生するために、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８を有効に利用できる可能性が示された。

[0057] 実施例８：遺伝子治療（難聴モデル動物の聴力回復）

ＧＪＢ２欠損マウス（3-4週齢）の聴力を聴性脳幹反応（ABR）に基づき測定した（術前聴力）。麻酔下でマウスの外側半規管（lateral semicircular canal）の２箇所に歯科用ドリルを用いて小孔を設けた。一方の孔にキャピラリーチューブを挿入して外リンパ液（endolymph）へ１０－１２μｌの野生型ＧＪＢ２遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８溶液（約1×10^{13}GC/ml）を３μｌ／ｍｉｎの速度で注入した。手術後１週間及び２週間後に、聴力を聴性脳幹反応（ABR）に基づき測定した（術後聴力）。

[0058] ＡＢＲの測定は、ステンレス鋼の針電極を左右の耳の頂点と腹外側に配置

し、Ｐｏｗｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙシステム（PowerLab 4/25; AD Instruments）のＳｃｏｐｅソフトウェアの波形保存及び刺激制御を使用して測定した。脳波記録は、細胞外増幅器ＡＣ　ＰｒｅＡｍｐｌｉｆｉｅｒ（モデルP-55; Astro-Med）で行った。音響刺激は、カプラー型スピーカー（モデル ES1spc; Bio Research Center）により行った。閾値は、８、２０、及び４０ｋＨｚの周波数にて５ｄＢ間隔で強度を変化させながら一連の応答に基づき決定した。

[0059] 術前及び術後のＡＢＲの閾値と波形をそれぞれ図１２及び図１３に示す。術後２週間（AAV-Sia6.8-CX26 2W）では、術前（Pre-operation）に比して高波長（20kHz, 40kHz）でのＡＢＲの閾値が低下し、聴力の有意な改善が認められた（図１２参照）。また、術後２週間（2W post-infection）では、術前（CX26cKO pre-injection）では反応がなかった弱い音圧に対しても反応が確認できた（図１３参照）。

[0060] 実施例９：プロモーターを用いた細胞標的化遺伝子導入

プロモーター２（ヒトＧＪＢ２遺伝子の転写開始点から上流の７６０ｂｐの遺伝子配列、配列番号１２）をＡＡＶ－ｓｉａ６．８に導入し、ＧＪＢ２遺伝子とＥＧＦＰ遺伝子を搭載して、ＧＪＢ２欠損マウスの培養蝸牛器官に感染させた。図１４に示すように、支持細胞である外らせん溝細胞（OSC）でＥＧＰＦの発現（緑）と、コネキシン２６の発現（赤）を伴うギャップ結合の形成が確認できた。外有毛細胞及び内有毛細胞（ＯＨＣ及びＩＨＣ）への感染はみられなかった。この結果により、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８は、適切なプロモーターを導入することによって、細胞標的化遺伝子導入（本実施例では支持細胞を標的とした遺伝子導入）に有効に用いられ得ることが示された。

[0061] 実施例１０：改変型ＡＡＶへのさらなるアミノ酸置換の導入と感染指向性の評価２

実施例２と同様にして、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体を作成した。

ＡＡＶ－ｓｉａ６．８の２６８位のアミノ酸は、野生型ＡＡＶ６でのＳｅｒがＴｈｒに置換されている。したがって、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体は、２６８位のアミノ酸を野生型のＳｅｒに戻す改変となる。

[0062] マウスの培養蝸牛器官を用いて、ＥＧＦＰ遺伝子を搭載したＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体の感染実験を行った。ＥＧＦＰの蛍光像と、画像解析によりＥＧＦＰ陽性面積率を算出した結果を、それぞれ図１５及び図１６に示す。ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体（AAV-Sia-T268S）では、ＡＡＶ－ｓｉａ６．８に比して、内耳細胞への感染指向性が向上し、特に外らせん溝細胞（OSC）において感染効率の向上が顕著であった。

配列表フリーテキスト

[0063] 配列番号１：ＡＡＶ１のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号２：ＡＡＶ２のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号３：ＡＡＶ３のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号４：ＡＡＶ４のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号５：ＡＡＶ５のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号６：ＡＡＶ６のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号７：ＡＡＶ７のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号８：ＡＡＶ８のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号９：ＡＡＶ９のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１０：ＡＡＶ１０のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１１：プロモーター１の核酸配列

配列番号１２：プロモーター２の核酸配列

配列番号１３：プロモーター３の核酸配列

配列番号１４：ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１５：ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１６：ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＧｌｕ５３１Ｌｙｓ改変体のカプシ

ド配列のアミノ酸配列

配列番号１７：ＡＡＶ－ｓｉａ１．８のＬｅｕ１２９Ｐｈｅ改変体のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１８：ＡＡＶ－ｓｉａ６．８のＴｈｒ２６８Ｓｅｒ改変体のカプシド配列のアミノ酸配列

配列番号１９：エンハンサー１の核酸配列

請求の範囲

[請求項1] 標的細胞に対する改善された感染性指向性を示す改変型アデノ随伴ウイルスベクターであって、

カプシド配列のアミノ酸配列に、以下の（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換が導入された、改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンの他のアミノ酸残基への置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンの他のアミノ酸残基への置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンの他のアミノ酸残基への置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンの他のアミノ酸残基への置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンの他のアミノ酸残基への置換、及び

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列

番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸の他のアミノ酸残基への置換。

[請求項2] 前記アミノ酸残基の置換が、

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンのフェニルアラニンへの置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンのトレオニンへの置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンのセリンへの置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンのトレオニンへの置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンのアラニンへの置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンのアスパラギンへの置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンのアラニンへの置換、又は

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸のロイシンへの置換、

である、請求項１に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項3] 前記（２）～（７）のアミノ酸残基の置換を組み合わせて有する、請求項１又は２に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項4] 配列番号１４又は配列番号１５のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、請求項３に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項5] 前記（１）又は（８）のアミノ酸残基の置換をさらに有する、請求項３に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項6] 配列番号１６又は配列番号１７のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、請求項５に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項7] 前記（３）～（７）のアミノ酸残基の置換を組み合わせて有する、請求項１又は２に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項8] 配列番号１８のアミノ酸配列からなるカプシド配列を有する、請求項７に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項9] 前記標的細胞が、上皮細胞、間質細胞、水晶体細胞又は癌細胞である、請求項１－６のいずれか一項に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項10] 前記上皮細胞が、内耳上皮細胞、腸上皮細胞、網膜細胞、皮膚細胞、腎細胞、気道上皮細胞、神経細胞又は子宮細胞である、請求項９に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項11] 前記標的細胞が、ギャップ結合を有するか、あるいはギャップ結合の構成要素となるコネキシン分子を発現する、請求項９又は１０に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項12] 遺伝性疾患の原因となる遺伝子、細胞の分化及び／又は増殖に関与する遺伝子、あるいはこれらの遺伝子をゲノム編集するための遺伝子が発現可能に搭載された、請求項１１に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項13] 前記遺伝性疾患の原因となる遺伝子が、コネキシン２６（ＧＪＢ２）遺伝子、ペンドリン（ＳＬＣ２６Ａ４）遺伝子、ＴＭＣ１遺伝子、ＴＭＣ２遺伝子、電位依存性カリウムチャネルサブファミリーＱメン

バー４（ＫＣＮＱ４）遺伝子、カドヘリン２３（ＣＨＤ２３）遺伝子、プロトカドヘリン１５（ＰＣＤＨ１５）遺伝子及びオトフェリン（ＯＴＯＦ）遺伝子からなる群より選択される、請求項１２に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項14] 前記細胞の分化及び／又は増殖に関与する遺伝子が、プロテインアトナールホモログ１（Ａｔｏｈ１）遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子１Ｂ（ＣＤＫＮ１Ｂ）遺伝子及び塩基性ヘリックスループヘリックス型転写因子（Ｈｅｓ１）遺伝子からなる群より選択される、請求項１２に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項15] ＧＪＢ２遺伝子の上流に、配列番号１１～１３のいずれかの塩基配列を含んでなるプロモーターが、任意に配列番号１９のエンハンサーとともに、ＧＪＢ２遺伝子の発現を制御可能に組み込まれている、請求項１３に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクター。

[請求項16] 請求項１－１５のいずれか一項に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターを含む、医薬。

[請求項17] 遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療、あるいはゲノム編集に用いるための、請求項１６に記載の医薬。

[請求項18] 遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療、あるいはゲノム編集用の医薬の製造のための、請求項１－１５のいずれか一項に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターの使用。

[請求項19] 遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌を有する対象に請求項１－１５のいずれか一項に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターの治療有効量を投与するステップを含む、遺伝性疾患、組織損傷及び／又は癌の治療方法。

[請求項20] 対象に請求項１－１５のいずれか一項に記載の改変型アデノ随伴ウイルスベクターの有効量を投与するステップを含む、ゲノム編集方法。

[請求項21] 標的細胞に対する改善された感染性指向性を示す改変型アデノ随伴

ウイルスベクターの製造方法であって、

カプシド配列のアミノ酸配列に、下記の（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換を導入する工程を含む、

製造方法。

（１）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の１２９位に相当する位置に存在するロイシンの他のアミノ酸残基への置換、

（２）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の２６８位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（３）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４４７位に相当する位置に存在するアスパラギンの他のアミノ酸残基への置換、

（４）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７０位に相当する位置に存在するグリシンの他のアミノ酸残基への置換、

（５）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７２位に相当する位置に存在するセリンの他のアミノ酸残基への置換、

（６）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の４７３位に相当する位置に存在するバリンの他のアミノ酸残基への置換、

（７）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５０２位に相当する位置に存在するトレオニンの他のアミノ酸残基への置換、及び

（８）配列番号１のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、配列番号１のアミノ酸配列の５３１位に相当する位置に存在するグルタミン酸の他のアミノ酸残基への置換。

[請求項22] 基準アデノ随伴ウイルスベクターのカプシド配列のアミノ酸配列に、前記（１）～（８）から選択される１又は２以上のアミノ酸残基の置換を導入して候補アデノ随伴ウイルスベクターを作成する工程と、

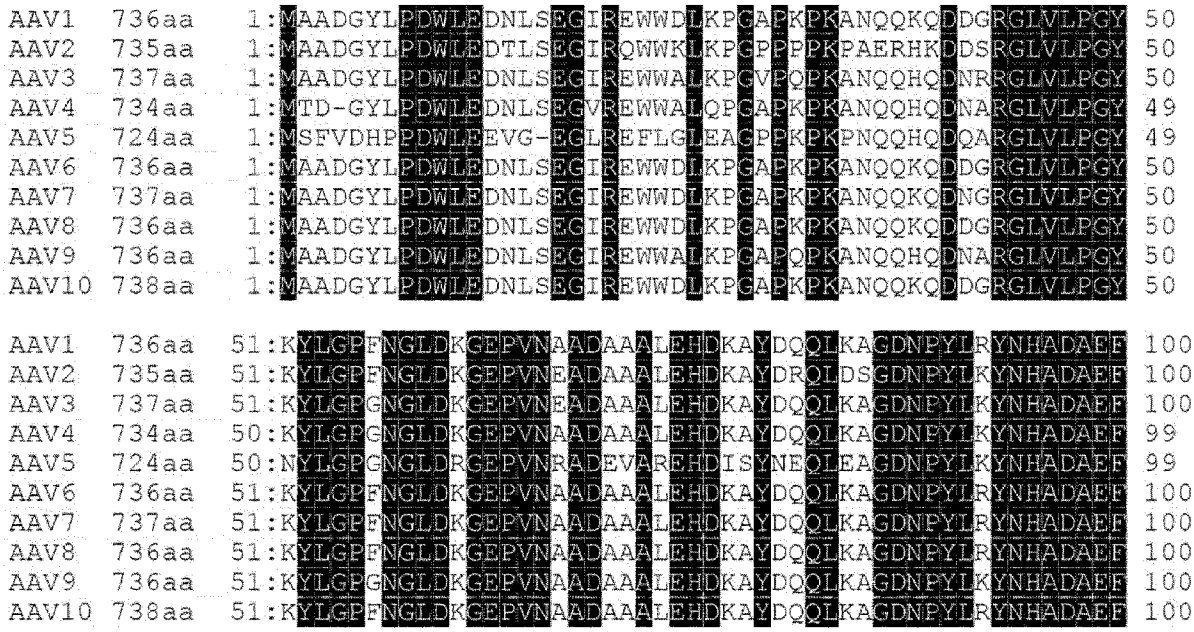
前記候補アデノ随伴ウイルスベクターの前記標的細胞の感染量を測定する工程；及び

前記標的細胞の感染量が、前記基準アデノ随伴ウイルスベクターに比して増加した候補アデノ随伴ウイルスベクターを選択する工程；

を含む、請求項２１に記載の製造方法。

[請求項23] 前記基準アデノ随伴ウイルスベクターが、ＡＡＶ１～ＡＡＶ１０、好ましくはＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、より好ましくはＡＡＶ１又はＡＡＶ６、特に好ましくはＡＡＶ１である、請求項２１に記載の製造方法。

[図1-1]


AAV1 736aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50
AAV2 735aa 1:MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGY 50
AAV3 737aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGY 50
AAV4 734aa 1:MTD-GYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGY 49
AAV5 724aa 1:MSFVDHPPDWLEEVG-EGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGY 49
AAV6 736aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50
AAV7 737aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGY 50
AAV8 736aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50
AAV9 736aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGY 50
AAV10 738aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50
AAV1 736aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100
AAV2 735aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF 100
AAV3 737aa 51:KYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF 100
AAV4 734aa 50:KYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF 99
AAV5 724aa 50:NYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEF 99
AAV6 736aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100
AAV7 737aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100
AAV8 736aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100
AAV9 736aa 51:KYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF 100
AAV10 738aa 51:KYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF 100

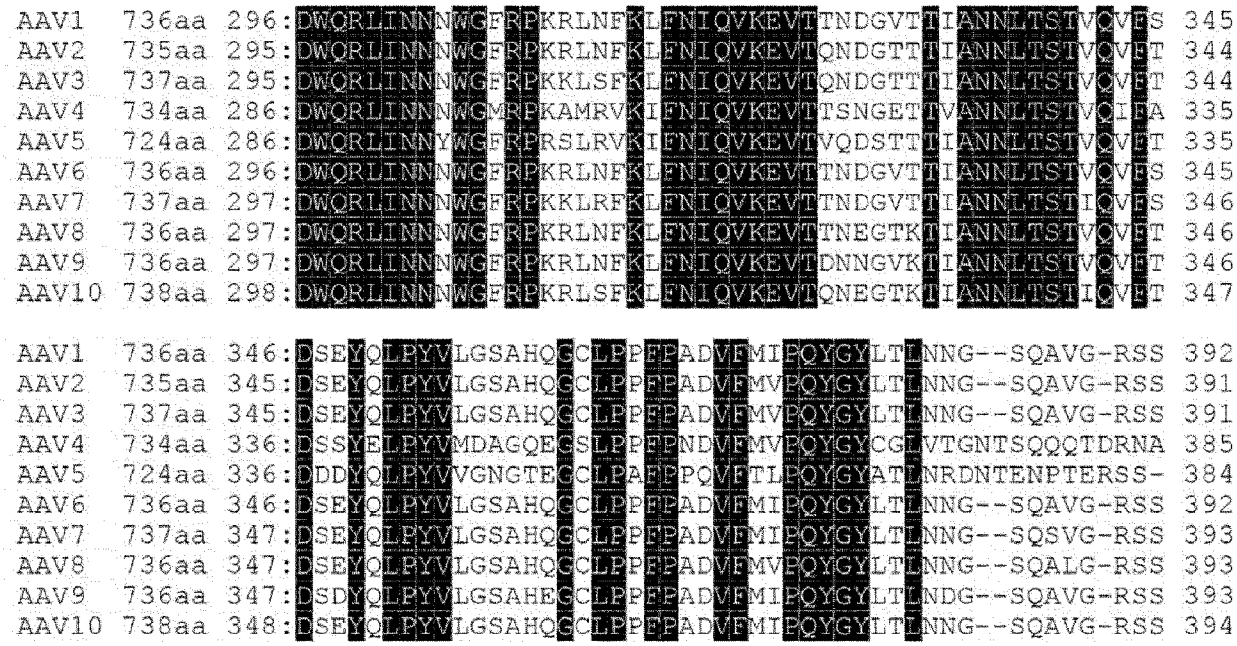
[図1-2]


AAV1 736aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP 150
AAV2 735aa 101:QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP 150
AAV3 737aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSP 150
AAV4 734aa 100:QQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESP 149
AAV5 724aa 100:QEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHF- 148
AAV6 736aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP 150
AAV7 737aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSP 150
AAV8 736aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSP 150
AAV9 736aa 101:QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSP 150
AAV10 738aa 101:QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSP 150
AAV1 736aa 151:QEPDSSSGIG-KTGQQPAKKRLNFGQTGDS-ESVPDPQPLGEPPATPAAV 198
AAV2 735aa 151:VEPDSSS-GTGKAGQQPARKRLNFGQTGDA-DSVPDPQPLGQPPAAPSGL 198
AAV3 737aa 151:QEPDSSSGVG-KSGKQPARKRLNFGQTGDS-ESVPDPQPLGEPPAAPTSL 198
AAV4 734aa 150:QQPDSSTGIGKKGKQPAK-KKLVFEDETGAGDG-P---PEGSTSGAMSDD 194
AAV5 724aa 149:--PKRK-----KARTEEDSK---PSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSL 188
AAV6 736aa 151:QEPDSSSGIG-KTGQQPAKKRLNFGQTGDS-ESVPDPQPLGEPPATPAAV 198
AAV7 737aa 151:QRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS-ESVPDPQPLGEPPAAPSSV 199
AAV8 736aa 151:QEP-DSSSGIGKSGQQPAKKRLNFGQTGDS-ESVPDPQPLGEPPEAPSGL 198
AAV9 736aa 151:QEPDSSAGIGKSGAQ-PAKKRLNFGQTGDT-ESVPDPQPIGEPPAAPSGV 198
AAV10 738aa 151:QRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGES-ESVPDPQPIGEPPAGPSGL 199

[図1-3]


AAV1 736aa 199:GPTTM-ASG-GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT 246
AAV2 735aa 199:GTNTM-ATG-SGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRT 246
AAV3 737aa 199:GSNTM-ASG-GGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRT 246
AAV4 734aa 195:SEMRA-AAG-GAAVEGGQ--GADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRT 240
AAV5 724aa 189:GADTMSA-GGGGPLGDNNQ-GADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRT 236
AAV6 736aa 199:GPTTM-ASG-GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT 246
AAV7 737aa 200:GSGTV-AAG-GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT 247
AAV8 736aa 199:GPNTM-ASG-GGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT 246
AAV9 736aa 199:GSLTM-ASG-GGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRT 246
AAV10 738aa 200:GSGTM-AAG-GGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT 247
AAV1 736aa 247:WALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNH-YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 295
AAV2 735aa 247:WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN-H-YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 294
AAV3 737aa 247:WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN-H-YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 294
AAV4 734aa 241:WVLPTYNNHLYKRL-----GESLQSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 285
AAV5 724aa 237:WVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYF-GYSTPWGYFDFNRFHSHWSPR 285
AAV6 736aa 247:WALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNH-YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 295
AAV7 737aa 248:WALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDN-TYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 296
AAV8 736aa 247:WALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 296
AAV9 736aa 247:WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 296
AAV10 738aa 248:WALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR 297

[図1-4]


AAV1 736aa 296:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS 345
AAV2 735aa 295:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT 344
AAV3 737aa 295:DWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT 344
AAV4 734aa 286:DWQRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFA 335
AAV5 724aa 286:DWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFT 335
AAV6 736aa 296:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS 345
AAV7 737aa 297:DWQRLINNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTIQVFS 346
AAV8 736aa 297:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQVFT 346
AAV9 736aa 297:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFT 346
AAV10 738aa 298:DWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFT 347
AAV1 736aa 346:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG--SQAVG-RSS 392
AAV2 735aa 345:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG--SQAVG-RSS 391
AAV3 737aa 345:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG--SQAVG-RSS 391
AAV4 734aa 336:DSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRNA 385
AAV5 724aa 336:DDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSS- 384
AAV6 736aa 346:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG--SQAVG-RSS 392
AAV7 737aa 347:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG--SQSVG-RSS 393
AAV8 736aa 347:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG--SQALG-RSS 393
AAV9 736aa 347:DSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDG--SQAVG-RSS 393
AAV10 738aa 348:DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG--SQAVG-RSS 394

[図1-5]


AAV1 736aa 393:FYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 442
AAV2 735aa 392:FYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 441
AAV3 737aa 392:FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 441
AAV4 734aa 386:FYCLEYFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQY 435
AAV5 724aa 385:FFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQY 434
AAV6 736aa 393:FYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 442
AAV7 737aa 394:FYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 443
AAV8 736aa 394:FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 443
AAV9 736aa 394:FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 443
AAV10 738aa 395:FYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY 444
AAV1 736aa 443:LYYLNRTQNQSGSAQNK-DL-LFS-RGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRV 489
AAV2 735aa 442:LYYLSRTNTPSGTTTQS-RLQ-FS-QAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV 488
AAV3 737aa 442:LYYLNRTQGTTSGTTNQ-SRLLFS-QAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQRL 489
AAV4 734aa 436:LWGLQSTTTGTTLNAGTATTN-FTKLR-PTNFSNFKKNWLPGPSIKQQGF 483
AAV5 724aa 435:LYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTY--------KN-WFPGPMGRTQGW 475
AAV6 736aa 443:LYYLNRTQNQSGSAQNK-DL-LFS-RGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRV 489
AAV7 737aa 444:LYYLARTQSNPGGTAGN-RELQFY-QGGPSTMAEQAKNWLPGPCFRQQRV 491
AAV8 736aa 444:LYYLVRTQTTGTGG-TQ-T-LAFS-QAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRV 489
AAV9 736aa 444:LYYLSKTINGSGQNQQTLK---FS-VAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRV 489
AAV10 738aa 445:LYYLSRTQSTGGTQGTQ-Q-LLFS-QAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRV 491

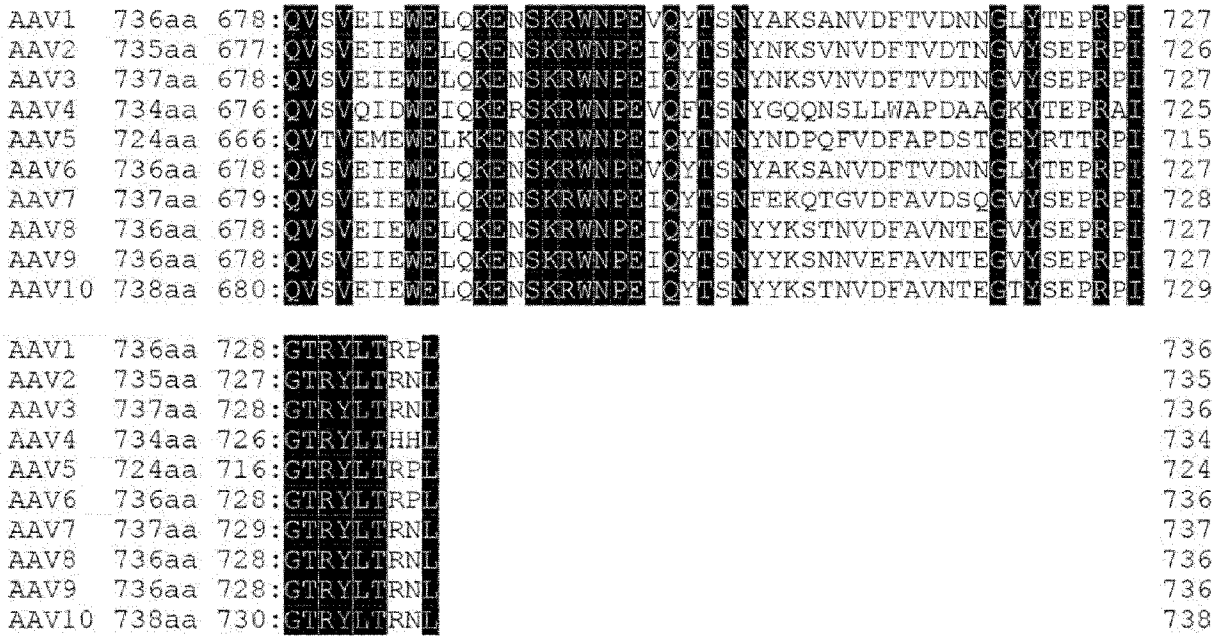
[図1-6]


AAV1 736aa 490:SKTKTDNNN-------SNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTA-MASHKDDE 531
AAV2 735aa 489:SKTSADNNN-------SEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPA-MASHKDDE 530
AAV3 737aa 490:SKTANDNNN-------SNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPA-MASHKDDE 531
AAV4 734aa 484:SKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHST--LDGRWSALTPGPP-MATAGPAD 530
AAV5 724aa 476:-------NLGSGV-NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGS 518
AAV6 736aa 490:SKTKTDNNN-------SNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTA-MASHKDDK 531
AAV7 737aa 492:SKTLDQNNN-------SNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVA-MATHKDDE 533
AAV8 736aa 490:STTTNQNNN-------SNFAWTGAAKFKLNGRDSLMNPGVA-MASHKDDE 531
AAV9 736aa 490:STTVTQNNN-------SEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPA-MASHKEGE 531
AAV10 738aa 492:STTLSQNNN-------SNFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVA-MATHKDDE 533
AAV1 736aa 532:DKFFPMSGVMIFGK--ESAGASN-TALD-NVMITDEEEIKATNPVATERF 577
AAV2 735aa 531:EKFFPQSGVLIFGK--QGSEKTN-VDIE-KVMITDEEEIRTTNPVATEQY 576
AAV3 737aa 532:EKFFPMHGNLIFGK--EGTTASN-AELD-NVMITDEEEIRTTNPVATEQY 577
AAV4 734aa 531:SKFSNS-Q-LIFAGPKQN-GNTATVPGT-LIF-TSEEELAATNATDTDMW 575
AAV5 724aa 519:NTYALENTMI-FNSQPANPGTTATYLEGNMLI-TSESETQPVNRVAYNVG 566
AAV6 736aa 532:DKFFPMSGVMIFGK--ESAGASN-TALD-NVMITDEEEIKATNPVATERF 577
AAV7 737aa 534:DRFFPSSGVLIFGK--TGATNKT-T-LE-NVLMTNEEEIRPTNPVATEEY 578
AAV8 736aa 532:DRFFPSSGVLIFGK--QGAGNDG-VDYS-QVLITDEEEIKATNPVATEEY 577
AAV9 736aa 532:DRFFPLSGSLIFGK--QGTGRDN-VDAD-KVMITNEEEIKTTNPVATESY 577
AAV10 738aa 534:ERFFPSSGVLMFGK--QGAGRDN-VDYS-SVMLTSEEEIKTTNPVATEQY 579

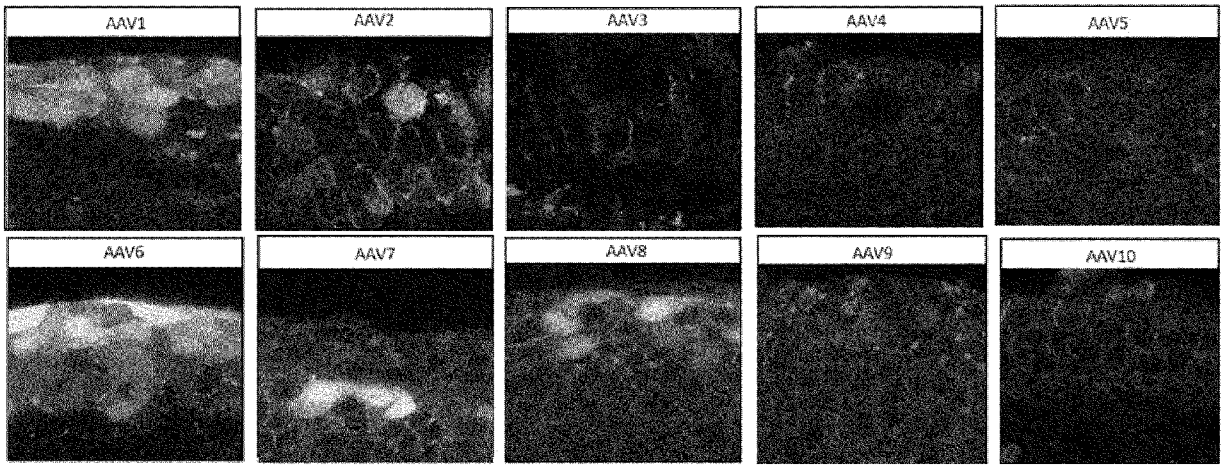
[図1-7]


AAV1 736aa 578:GTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV2 735aa 577:GSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 626
AAV3 737aa 578:GTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV4 734aa 576:GNLPGGDQSNSNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDG 625
AAV5 724aa 567:GQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGA 616
AAV6 736aa 578:GTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV7 737aa 579:GIVSSNLQAANTAAQTQVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDG 628
AAV8 736aa 578:GAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV9 736aa 578:GQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV10 738aa 580:GVVADNLQQANTGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDG 629
AAV1 736aa 628:HFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTG 677
AAV2 735aa 627:HFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTG 676
AAV3 737aa 628:HFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTG 677
AAV4 734aa 626:HFHPSPLIGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTG 675
AAV5 724aa 617:HFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITS-FSDVPVSSFITQYSTG 665
AAV6 736aa 628:HFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTG 677
AAV7 737aa 629:NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTG 678
AAV8 736aa 628:NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPLTFNQAKLNSFITQYSTG 677
AAV9 736aa 628:NFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTG 677
AAV10 738aa 630:NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTG 679

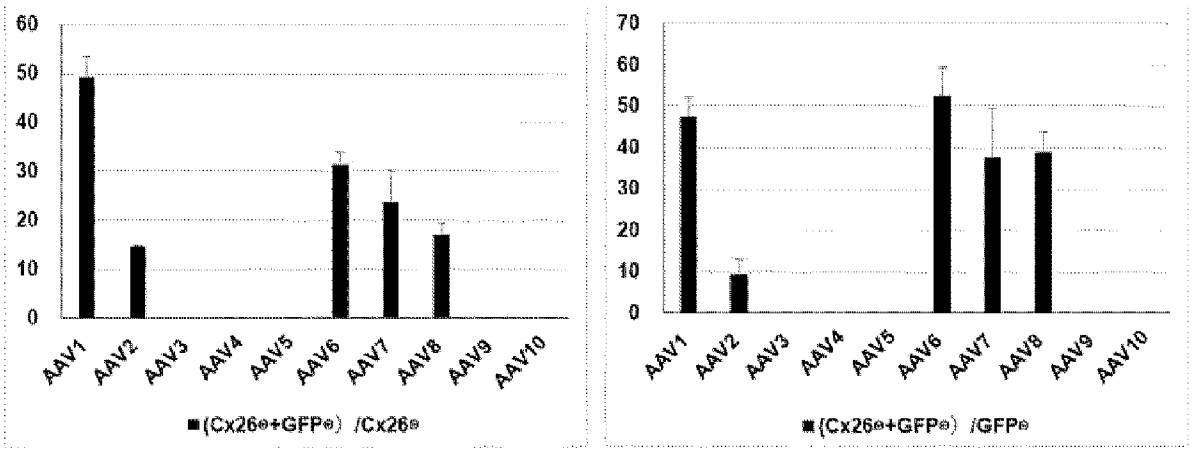
[図1-8]


AAV1 736aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPI 727
AAV2 735aa 677:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI 726
AAV3 737aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI 727
AAV4 734aa 676:QVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAI 725
AAV5 724aa 666:QVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPI 715
AAV6 736aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPI 727
AAV7 737aa 679:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPI 728
AAV8 736aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPI 727
AAV9 736aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPI 727
AAV10 738aa 680:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGIYSEPRPI 729
AAV1 736aa 728:GTRYLTRPL 736
AAV2 735aa 727:GTRYLTRNL 735
AAV3 737aa 728:GTRYLTRNL 736
AAV4 734aa 726:GTRYLTHHL 734
AAV5 724aa 716:GTRYLTRPL 724
AAV6 736aa 728:GTRYLTRPL 736
AAV7 737aa 729:GTRYLTRNL 737
AAV8 736aa 728:GTRYLTRNL 736
AAV9 736aa 728:GTRYLTRNL 736
AAV10 738aa 730:GTRYLTRNL 738

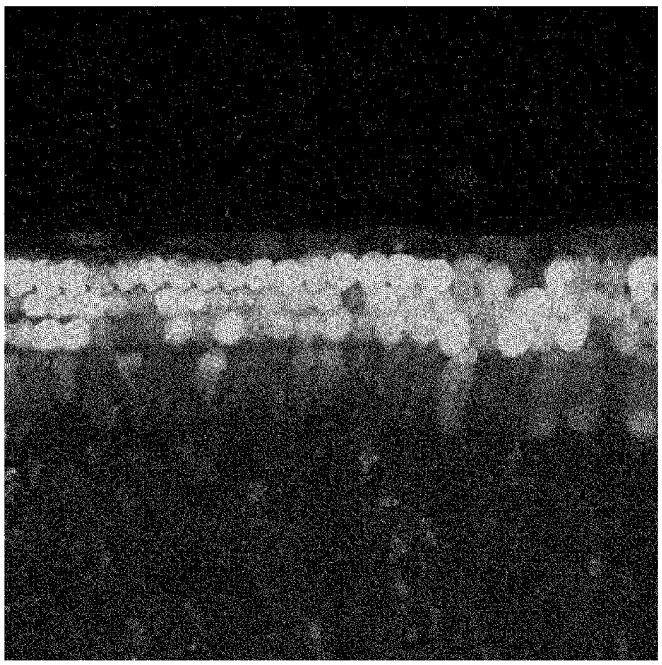
[図2]


AAV1
AAV2
AAV3
AAV4
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10

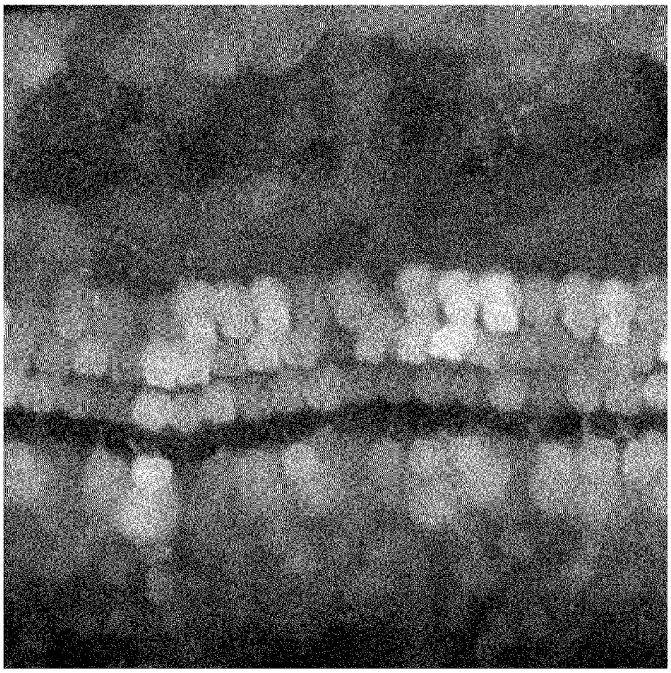
[図3]


60
50
40
30
20
10
0
AAV1
AAV2
AAV3
AAV4
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10
■(Cx26e+GFPe) /Cx26e
70
60
50
40
30
20
10
0
AAV1
AAV2
AAV3
AAV4
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10
■(Cx26e+GFPe) /GFPe

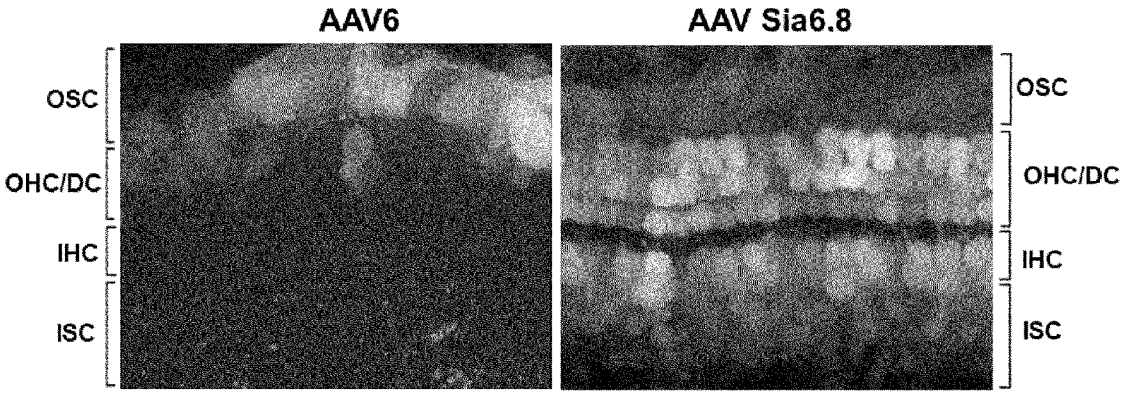
[図4]



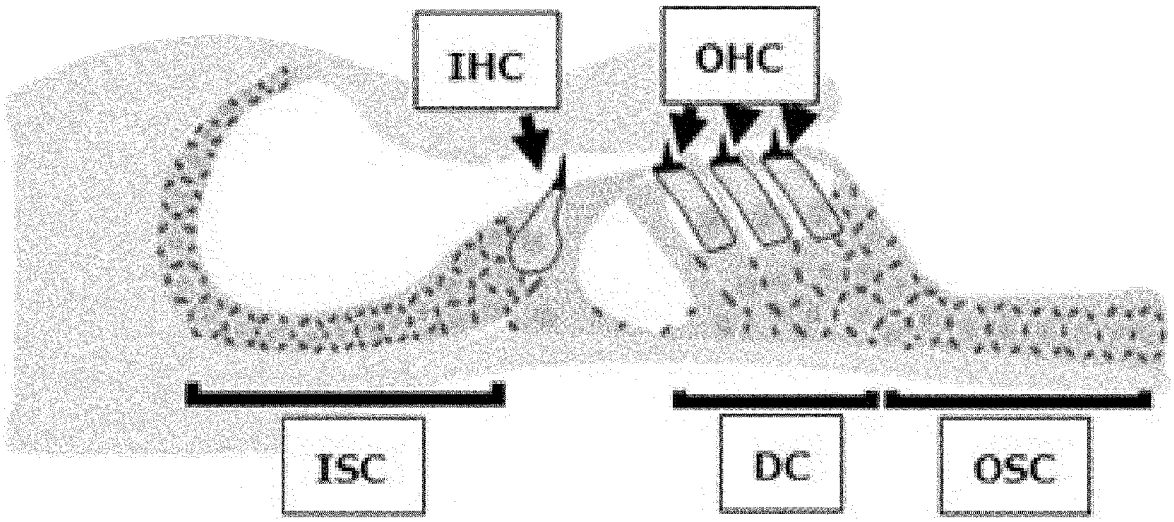
[図5]



[図6]



[図7]



OSC: 外らせん溝細胞（Outer Sulcus Cell）

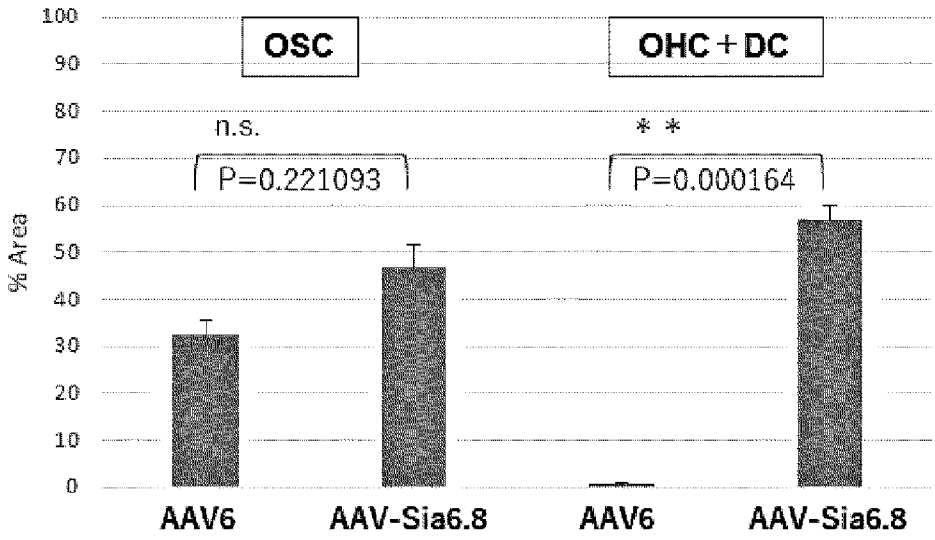
OHC: 外有毛細胞（Outer Hair Cell）

DC: ダイテルス細胞（Deiters Cell）

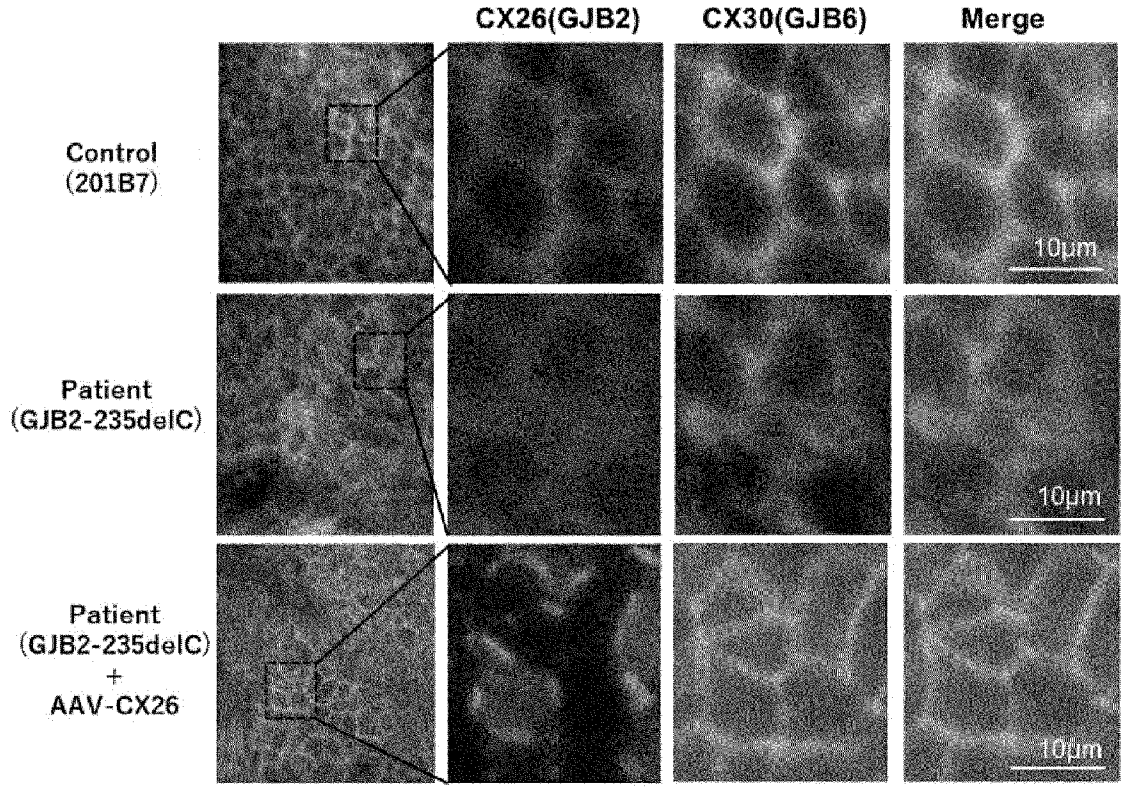
IHC: 内有毛細胞（Inner Hair Cell）

ISC: 内らせん溝細胞（Inner Sulcus Cell）

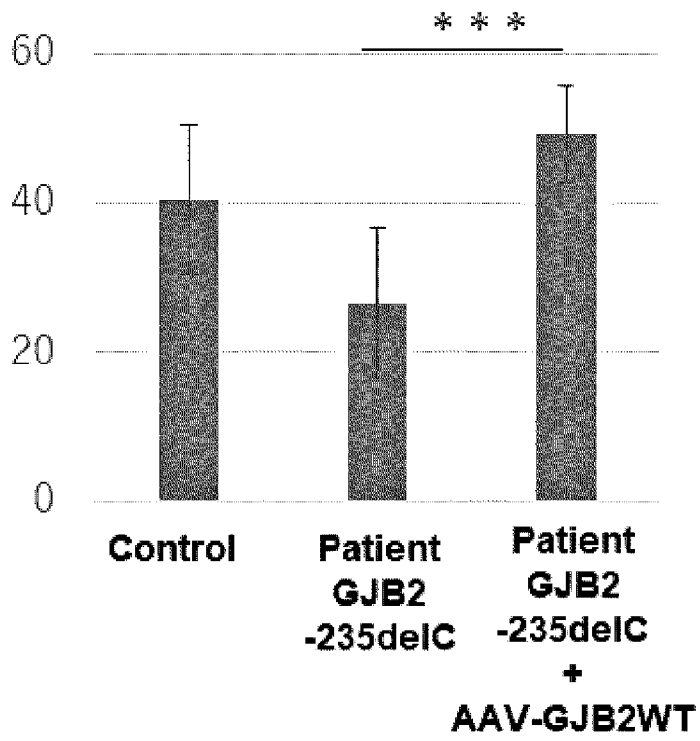
[図8]



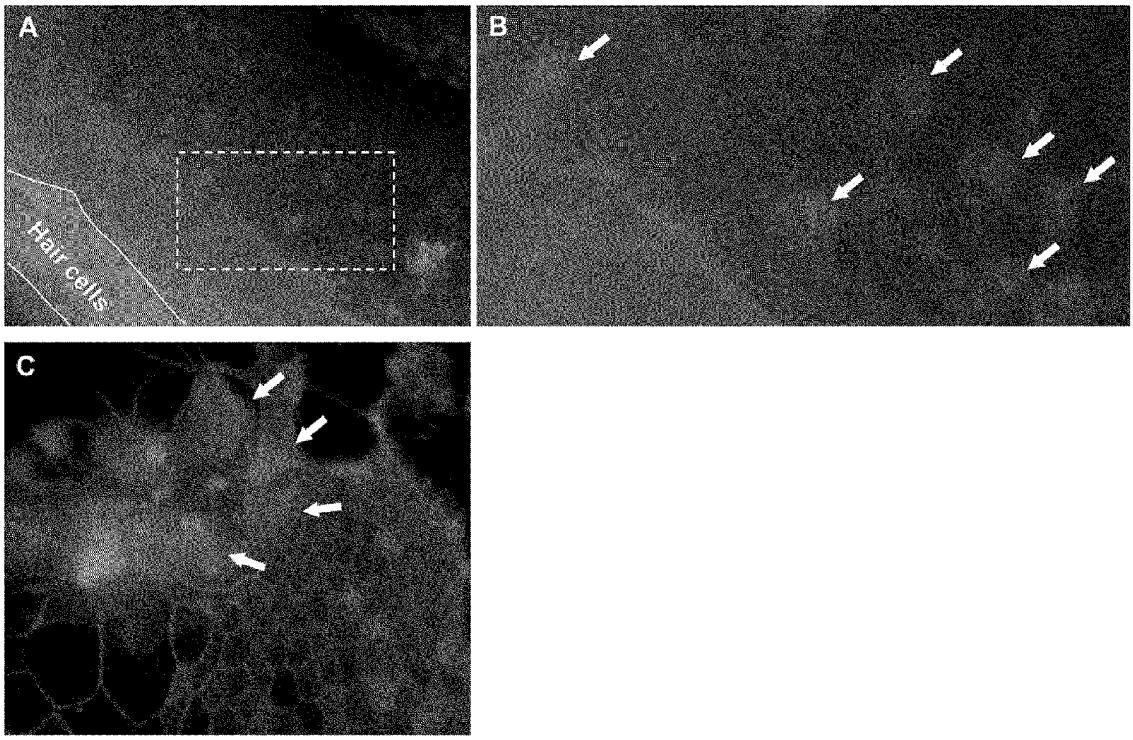
[図9]


CX26(GJB2)
CX30(GJB6)
Merge
Control
(201B7)
Patient
(GJB2-235delC)
Patient
(GJB2-235delC)
+
AAV-CX26
10μm
10μm
10μm

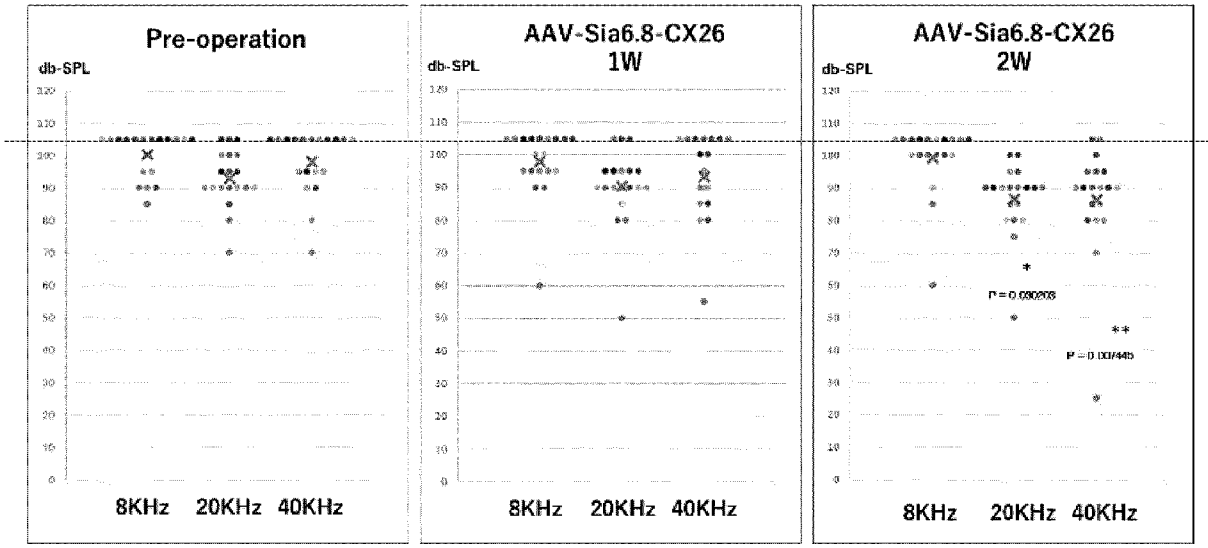
[図10]


* * *
60
40
20
0
Control
Patient
GJB2
-235delC
Patient
GJB2
-235delC
+
AAV-GJB2WT

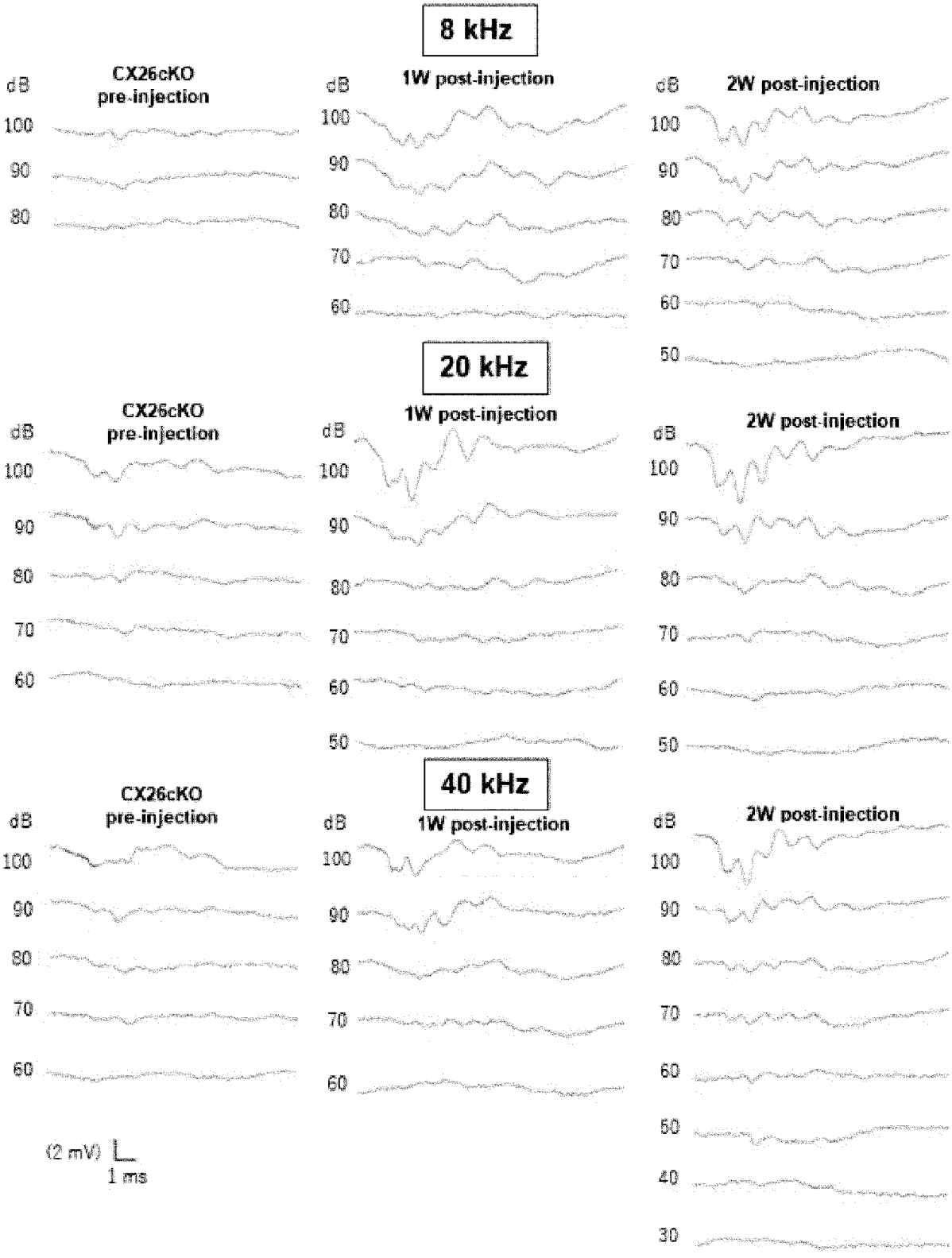
[図11]


A
Hair cells
B
C

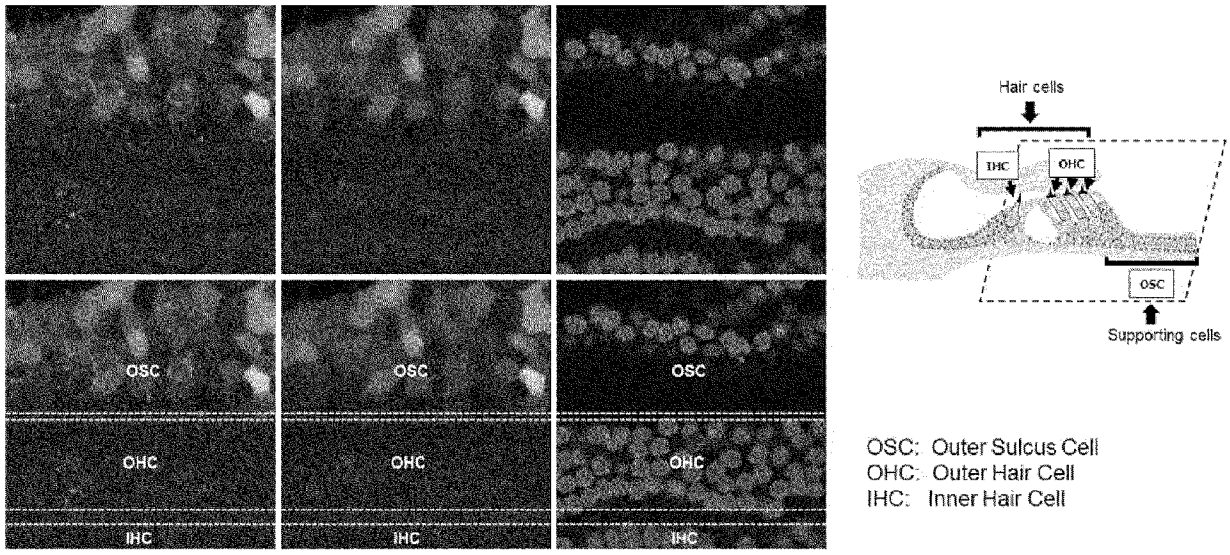
[図12]


Pre-operation
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz
AAV-Sia6.8-CX26
1W
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz
AAV-Sia6.8-CX26
2W
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz

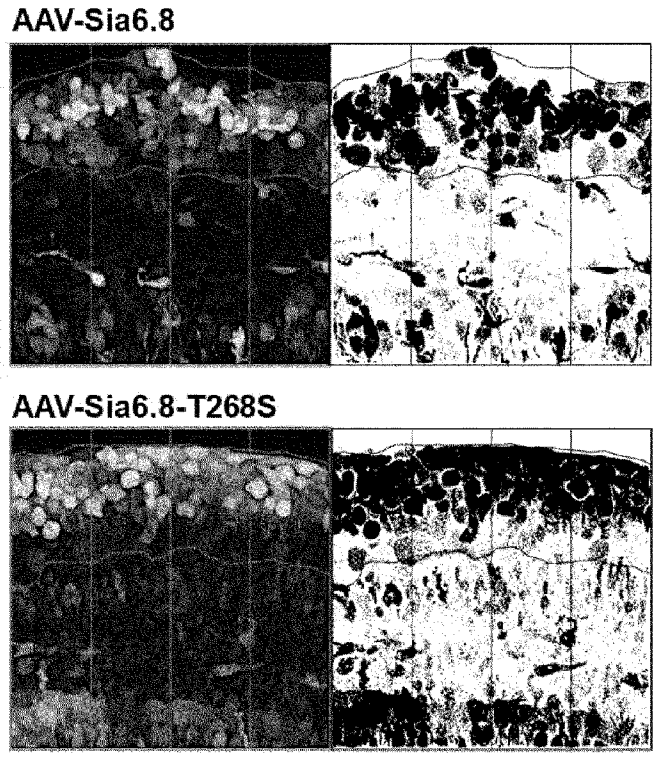
[図13]


8 kHz
CX26cKO
pre-injection
1W post-injection
2W post-injection
20 kHz
40 kHz
dB
100
90
80
70
60
50
40
30
(2 mV)
1 ms

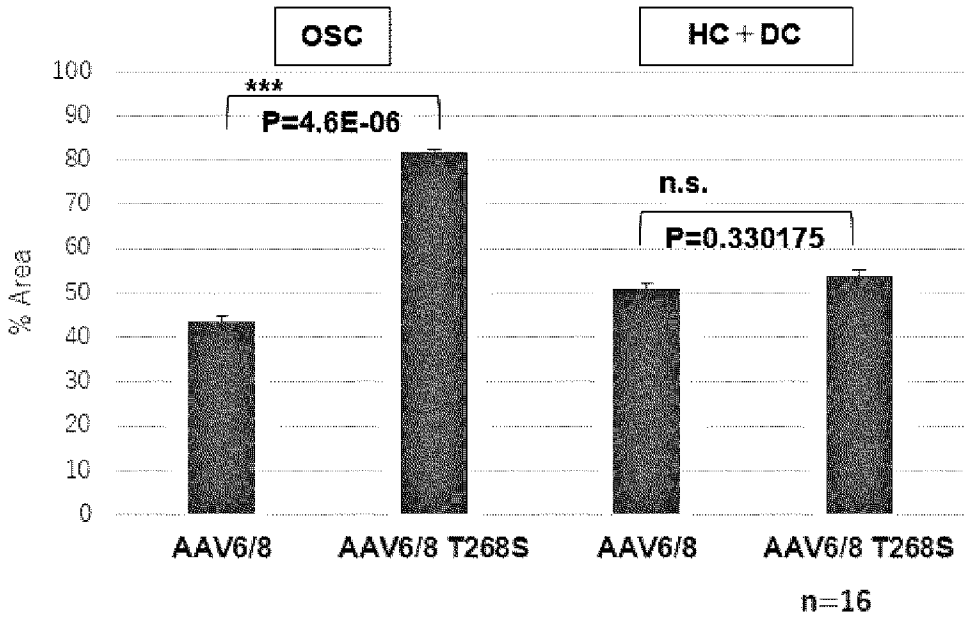
[図14]


OSC
OHC
IHC
OSC
OHC
IHC
OSC
OHC
IHC
Hair cells
IHC
OHC
OSC
Supporting cells
OSC: Outer Sulcus Cell
OHC: Outer Hair Cell
IHC: Inner Hair Cell

[図15]


AAV-Sia6.8
AAV-Sia6.8-T268S

[図16]


OSC
HC + DC
***
P=4.6E-06
n.s.
P=0.330175
% Area
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
AAV6/8
AAV6/8 T268S
AAV6/8
AAV6/8 T268S
n=16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/044701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/864(2006.01)i; ***A61K 35/76***(2015.01)i; ***A61K 48/00***(2006.01)i; ***A61P 1/00***(2006.01)i; ***A61P 13/12***(2006.01)i; ***A61P 17/00***(2006.01)i; ***A61P 25/00***(2006.01)i; ***A61P 27/02***(2006.01)i; ***A61P 27/16***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C07K 14/015***(2006.01)i; ***C12N 15/09***(2006.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i; ***C12Q 1/6897***(2018.01)i; ***C12Q 1/70***(2006.01)i
FI: C12N15/864 100Z; A61P35/00; A61K48/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P27/16; C12N15/09 100; C12Q1/6897; C12Q1/70; C07K14/015; C12N15/12; A61K35/76 ZNA; A61P1/00

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)

C12N15/864; A61K35/76; A61K48/00; A61P1/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P27/16; A61P35/00; C07K14/015; C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/6897; C12Q1/70

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/0095313 A1 (APPLIED GENETIC TECHNOLOGIES CORPORATION) 01 April 2021 (2021-04-01) claims, abstract, example 3, fig. 19C	1, 9-13, 16-19, 21-23
Y	claims, abstract, example 3, fig. 19C	1-3, 5, 7, 9-23
A		4, 6, 8
Y	MOISAN, S. et al. Characterization of GJB2 cis-regulatory elements in the DFNB1 locus. Human Genetics. 2019, vol. 138, pp. 1275-1286 p. 1275, summary, p. 1280, right column, line 13 from the bottom to p. 1282, left column, line 1 from the bottom, fig. 2, 3	15-20
A		1-14, 21-23

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 February 2023	**21 February 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FAKHIRI, J. et al. Breaking the sound barrier: Towards next-generation AAV vectors for gene therapy of hearing disorders. Hearing Research. 2020, vol. 413, article no. 108092, pp. 1-16 p. 1, summary, p. 8, left column, line 19 to p. 11, left column, line 10 from the bottom, fig. 3, 4	1-3, 5, 7, 9-23
A		4, 6, 8
X	WO 2021/009805 A1 (GENE THERAPY RES INSTITUTION CO LTD) 21 January 2021 (2021-01-21) abstract, paragraphs [0002], [0015], [0019], [0042], [0054]	1, 2, 9, 12-14, 16-23
Y	abstract, paragraphs [0002], [0015], [0019], [0042], [0054]	12-20
A		3-8, 10, 11
X	JP 2019-518458 A (4D MOLECULAR THERAPEUTICS INC) 04 July 2019 (2019-07-04) claims, abstract, paragraphs [0166]-[0168]	1, 9, 10, 12-14, 16-23
Y	claims, abstract, paragraphs [0166]-[0168]	12-20
A		2-8, 11
X	JP 2018-514190 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 07 June 2018 (2018-06-07) claims	1, 9, 10, 12-14, 16-23
Y	claims	12-20
A		2-8, 11
X	JP 2012-165744 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 06 September 2012 (2012-09-06) claims, example 5	1, 2, 9, 12-14, 16-19, 21-23
A		3-8, 10, 11, 15, 20
X	JP 2014-204723 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 30 October 2014 (2014-10-30) claims, abstract	1, 9, 10, 12-14, 16-19, 21-23
A		2-8, 11, 15, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/044701

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"Annex C/ST.25 text file format" should be read as "ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/044701

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2021/0095313 A1	01 April 2021	WO 2021/067448 A1	
WO 2021/009805 A1	21 January 2021	US 2022/0265853 A1 abstract, paragraphs [0002], [0063], [0082], [0120], [0133]-[0151] EP 4006160 A1	
JP 2019-518458 A	04 July 2019	US 2019/0255192 A1 WO 2017/197355 A2 claims, abstract, paragraphs [0176]-[0178] US 2021/0069348 A1 US 2021/0069349 A1 US 2021/0162071 A1 US 2021/0177990 A1	
JP 2018-514190 A	07 June 2018	US 2018/0066285 A1 WO 2016/154344 A1 claims US 2021/0147876 A1	
JP 2012-165744 A	06 September 2012	JP 2008-538286 A JP 2014-204723 A JP 2015-96070 A JP 2016-168047 A WO 2006/110689 A2 claims, example 5 US 2009/0197338 A1 US 2015/0159173 A1 US 2017/0191079 A1 US 2018/0057841 A1 US 2019/0218574 A1 US 2020/0208176 A1 US 2021/0040504 A1 US 2020/0325491 A1 EP 2357010 A1 EP 2359865 A1 EP 2359866 A1 EP 2359867 A1 EP 2383346 A1 EP 3085389 A1 EP 3409296 A1 EP 3603676 A1	
JP 2014-204723 A	30 October 2014	JP 2008-538286 A JP 2012-165744 A JP 2015-96070 A WO 2006/110689 A2 claims, abstract JP 2016-168047 A US 2009/0197338 A1 US 2015/0159173 A1 US 2017/0191079 A1 US 2018/0057841 A1 US 2019/0218574 A1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/044701

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2020/0208176 A1	
		US 2021/0040504 A1	
		US 2020/0325491 A1	
		EP 2357010 A1	
		EP 2359865 A1	
		EP 2359866 A1	
		EP 2359867 A1	
		EP 2383346 A1	
		EP 3085389 A1	
		EP 3409296 A1	
		EP 3603676 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/044701

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/864(2006.01)i; A61K 35/76(2015.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 1/00(2006.01)i; A61P 13/12(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 27/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 14/015(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/6897(2018.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i

FI: C12N15/864 100Z; A61P35/00; A61K48/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P27/16; C12N15/09 100; C12Q1/6897; C12Q1/70; C07K14/015; C12N15/12; A61K35/76 ZNA; A61P1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/864; A61K35/76; A61K48/00; A61P1/00; A61P13/12; A61P17/00; A61P25/00; A61P27/02; A61P27/16; A61P35/00; C07K14/015; C12N15/09; C12N15/12; C12Q1/6897; C12Q1/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2021/0095313 A1 (APPLIED GENETIC TECHNOLOGIES CORPORATION) 01.04.2021 (2021-04-01) 特許請求の範囲，要約，実施例３，図１９Ｃ	1,9-13,16-19,21-23
Y	特許請求の範囲，要約，実施例３，図１９Ｃ	1-3,5,7,9-23
A		4,6,8
Y	MOISAN, S. et al., Characterization of GJB2 cis-regulatory elements in the DFNB1 locus, Human Genetics, 2019, Vol.138, p.1275-1286 第１２７５頁要旨，第１２８０頁右欄下から第１３行－第１２８２頁左欄下から第１行，図２，図３	15-20
A		1-14,21-23

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
14.02.2023	21.02.2023

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
白井　美香保 4B 4502

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	FAKHIRI, J. et al., Breaking the sound barrier: Towards next-generation AAV vectors for gene therapy of hearing disorders, Hearing Research, 2020, Vol.413, Article No.108092, p.1-16 第１頁要旨，第８頁左欄第１９行－第１１頁左欄下から第１０行，図３，図４	1-3,5,7,9-23
A		4,6,8
X	WO 2021/009805 A1 (株式会社遺伝子治療研究所) 21.01.2021 (2021-01-21) 要約，段落０００２，００１５，００１９，００４２，００５４	1,2,9,12-14,16-23
Y	要約，段落０００２，００１５，００１９，００４２，００５４	12-20
A		3-8,10,11
X	JP 2019-518458 A (４ディー モレキュラー セラピューティクス インコーポレイテッド) 04.07.2019 (2019-07-04) 特許請求の範囲，要約，段落０１６６－０１６８	1,9,10,12-14,16-23
Y	特許請求の範囲，要約，段落０１６６－０１６８	12-20
A		2-8,11
X	JP 2018-514190 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 07.06.2018 (2018-06-07) 特許請求の範囲	1,9,10,12-14,16-23
Y	特許請求の範囲	12-20
A		2-8,11
X	JP 2012-165744 A (ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア) 06.09.2012 (2012-09-06) 特許請求の範囲，実施例５	1,2,9,12-14,16-19,21-23
A		3-8,10,11,15,20
X	JP 2014-204723 A (ザ・トラステイーズ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・ペンシルベニア) 30.10.2014 (2014-10-30) 特許請求の範囲，要約	1,9,10,12-14,16-19,21-23
A		2-8,11,15,20

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/044701

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/044701

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2021/0095313 A1	01.04.2021	WO 2021/067448 A1	
WO 2021/009805 A1	21.01.2021	US 2022/0265853 A1 要約，段落０００２，００６３，００８２，０１２０，０１３３－０１５１ EP 4006160 A1	
JP 2019-518458 A	04.07.2019	US 2019/0255192 A1 WO 2017/197355 A2 特許請求の範囲，要約，段落００１７６－００１７８ US 2021/0069348 A1 US 2021/0069349 A1 US 2021/0162071 A1 US 2021/0177990 A1	
JP 2018-514190 A	07.06.2018	US 2018/0066285 A1 WO 2016/154344 A1 特許請求の範囲 US 2021/0147876 A1	
JP 2012-165744 A	06.09.2012	JP 2008-538286 A JP 2014-204723 A JP 2015-96070 A JP 2016-168047 A WO 2006/110689 A2 特許請求の範囲，実施例５ US 2009/0197338 A1 US 2015/0159173 A1 US 2017/0191079 A1 US 2018/0057841 A1 US 2019/0218574 A1 US 2020/0208176 A1 US 2021/0040504 A1 US 2020/0325491 A1 EP 2357010 A1 EP 2359865 A1 EP 2359866 A1 EP 2359867 A1 EP 2383346 A1 EP 3085389 A1 EP 3409296 A1 EP 3603676 A1	
JP 2014-204723 A	30.10.2014	JP 2008-538286 A JP 2012-165744 A JP 2015-96070 A WO 2006/110689 A2 特許請求の範囲，要約 JP 2016-168047 A US 2009/0197338 A1 US 2015/0159173 A1 US 2017/0191079 A1 US 2018/0057841 A1 US 2019/0218574 A1	

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/044701

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
		US 2020/0208176 A1	
		US 2021/0040504 A1	
		US 2020/0325491 A1	
		EP 2357010 A1	
		EP 2359865 A1	
		EP 2359866 A1	
		EP 2359867 A1	
		EP 2383346 A1	
		EP 3085389 A1	
		EP 3409296 A1	
		EP 3603676 A1	