



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월09일

(11) 등록번호 10-2752457

(24) 등록일자 2025년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

A01K 67/0275 (2024.01)

(21) 출원번호 10-2019-7030012

(22) 출원일자(국제) 2018년03월16일

심사청구일자 2021년02월09일

(85) 번역문제출일자 2019년10월14일

(65) 공개번호 10-2019-0131052

(43) 공개일자 2019년11월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/022873

(87) 국제공개번호 WO 2018/170402

국제공개일자 2018년09월20일

(30) 우선권주장

62/472,790 2017년03월17일 미국(US)

62/531,522 2017년07월12일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011075838 A1\*

US20150329875 A1\*

US20150050354 A1\*

WO2004099779 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

레스큐 히어링 인크

미국 32606 플로리다주 게인즈빌 엔더블유 53알디 스트리트 4614

(72) 발명자

스타에커, 힌리치

미국 66209 캔자스주 리우드 더블유 125티에이치 스트리트 2209

류, 쉐, 중

미국 33156 플로리다주 마이애미 에스더블유 128 티에이치 스트리트 7920

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 10 항

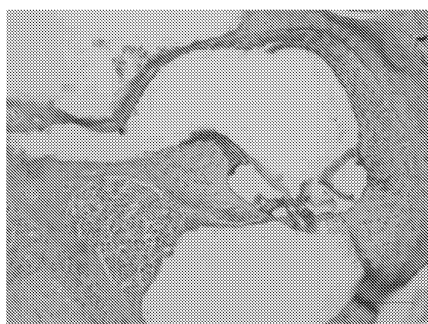
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 청력 상실의 치료를 위한 유전자 요법 구축물 및 방법

### (57) 요약

TMPRSS3 유전자 또는 LOXHD1 유전자의 유전적 돌연변이에 의해 유발되는 청력 상실의 치료 및/또는 예방에 유용한 조성물 및 방법이 개시된다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 내이 내로의 TRMPSS3 또는 LOXHD1의 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 유전자 전달을 사용하여 각각 TMPRSS3 유전자 또는 LOXHD1 유전자의 활성을 복원하고, 유모 세포 생존을 촉진시키고, 청력 상실을 앓고 있는 환자에서 청력을 복원한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

*A61K 48/005* (2013.01)

*A61K 48/0075* (2013.01)

*A61P 27/16* (2018.01)

*C07K 14/47* (2013.01)

*C12N 9/6424* (2013.01)

*A01K 2217/075* (2013.01)

*A01K 2227/105* (2013.01)

*C12N 2750/14122* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

(72) 발명자

천, 정-이

미국 02143 매사추세츠주 소머빌 허드슨 스트리트

22

아알라, 시저, 제임스

미국 32605 플로리다주 게인스빌 엔더블유 29티에

이치 애비뉴 2148

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열식별번호: 1의 핵산 서열; 및  
핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터  
를 포함하는 발현 벡터이며,  
상기 프로모터가 인간 시토메갈로바이러스 (hCMV) 프로모터이고,  
상기 발현 벡터가 야생형 AAV2 아데노-연관 바이러스 벡터인, 발현 벡터.

#### 청구항 2

서열식별번호: 1의 핵산 서열; 및  
핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터  
를 포함하는 발현 벡터로 형질감염된 단리된 세포이며,  
상기 프로모터가 인간 시토메갈로바이러스 (hCMV) 프로모터이고,  
상기 발현 벡터가 야생형 AAV2 아데노-연관 바이러스 벡터인, 단리된 세포.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 세포가 줄기 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 줄기 세포가 유도된 만능 줄기 세포인 단리된 세포.

#### 청구항 5

서열식별번호: 1의 핵산 서열; 및  
핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터  
를 포함하는 발현 벡터의 유효량을 포함하는, 청력 상실의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 청력 상실을 치료하거나 또는 예방하기 위한 제약 조성물이며,  
상기 프로모터가 인간 시토메갈로바이러스 (hCMV) 프로모터이고,  
상기 발현 벡터가 야생형 AAV2 아데노-연관 바이러스 벡터인, 제약 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 발현 벡터가 대상체의 내이 내로의 주사에 의해 투여되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 아데노-연관 바이러스 벡터가 주사 방법에 의해 투여되고, 주사 방법이 와우개창술로의 주사, 정원창 막으로의 주사, 내림프낭, 중간계, 또는 반고리관절개술로의 주사, 내림프낭을 통한 중간계로의 주사, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 대상체가 청력 상실과 연관된 1종 이상의 유전적 위험 인자를 갖는 것인 제약 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 유전적 위험 인자 중 하나가 TMPRSS3 유전자에서의 돌연변이인 제약 조성물.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 대상체가 청력 상실의 임상적 지표를 나타내지 않는 것인 제약 조성물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2017년 3월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 62/472,790, 및 2017년 7월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 62/531,522에 대한 이익을 주장하며, 이들의 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 개시내용의 분야

[0004] TMRSS3 유전자 또는 LOXHD1 유전자의 유전적 돌연변이에 의해 유발되는 청력 상실 및 난청의 치료 및/또는 예방에 유용한 조성물 및 방법이 개시된다.

### 배경 기술

[0005] 청력 상실은 인간에서 가장 통상적인 감각 결손이다. 세계 보건 기구 (WHO)에 의해 발표된 장애를 초래하는 청력 상실의 규모에 대한 2012년의 추정에 따르면, 전세계적으로 장애를 초래하는 청력 상실을 갖고 살아가는 360 백만명의 사람들 (328백만명의 성인 및 32백만명의 아동)이 있으며, 그러한 사람들 중 89% (또는 322백만명)는 저소득 국가에 거주한다 (WHO global estimates on prevalence of hearing loss; *Mortality and Burden of Diseases and Prevention of Blindness and Deafness*, WHO 2012).

[0006] 현재 청력 상실 또는 난청을 예방하거나 또는 치료하기 위한 승인된 치료제는 없다. 장애를 초래하는 청력 상실을 갖는 사람들을 위한 현재 치료 옵션은 와우 이식기이다. 와우 이식은 환자당 \$1,000,000의 생애 비용을 초과하는, 큰 연관된 건강관리 비용을 갖는 통상적인 절차이다 (Mohr PE, et al. (2000). The societal costs of severe to profound hearing loss in the United States; *Int J Technol Assess Health Care*;16(4):1120-35).

[0007] 와우 이식기에 대한 현재 수요는 공급을 초과한다. 제작된 와우 이식기 유닛의 생산율은 매년 50,000 유닛이다. 현재 출생률 및 신생아에서의 장애를 초래하는 청력 상실의 발생률 및 유병률에 기초하여, 각각의 고통받는 아동을 위해 1개의 와우 이식기를 제공하기 위해 134,000개의 와우 이식기가 연간 필요하다. 이 수는 양측 (2개)의 와우 이식기를 필요로 하는 환자가 포함되는 경우에 증가한다.

[0008] 와우 이식기의 생애 비용은 대부분의 사람들에게 대해, 및 특히 장애를 초래하는 청력 상실을 갖는 사람들의 대다수가 거주하는 선진국 외부에 살고 있는 사람들에게 대해 막대하다. 특히 선진국 외부에 살고 있는 사람들에게 대해 와우 이식기에 대한 비용 효과적인 대안을 제공하는 치료 옵션이 필요하다.

[0009] 언어습득전 난청의 50% 초과가 유전적이며, 즉, 유전성이다 (Centers for Disease Control and Prevention-*Genetics of Hearing Loss*). 유전성 청력 상실 및 난청은 전도성, 감각신경성, 또는 둘 다의 조합; 증후군성 (외이 또는 다른 기관의 기형과 또는 다른 기관계를 포함하는 의학적 문제와 연관됨) 또는 비증후군성 (외이의 가시적 이상 또는 임의의 관련된 의학적 문제와 연관되지 않음); 및 언어습득전 (언어가 발달하기 전) 또는 언어습득후 (언어가 발달한 후)일 수 있다 (Richard JH Smith, MD, A Eliot Shearer, Michael S Hildebrand, PhD, and Guy Van Camp, PhD, Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview, *GeneReviews* Initial Posting: February 14, 1999; Last Revision: January 9, 2014). 유전성 청력 상실의 70% 초과가 비증후군성이다. 비증후군성 난청에 대한 상이한 유전자 로커스는 DFN (DeaFNess에 대해)으로 지정된다. 로커스는 유전의 방식에 기초하여 명명된다: DFNA (상염색체 우성), DFNB (상염색체 열성) 및 DFNX (X-연관). 상기 명칭 뒤의 수는 유전자 지도화 및/또는 발견의 순서를 반영한다. 일반적 집단에서, 청력 상실의 유병률은 연령에 따라 증가한다. 이 변화는 유전학 및 환경의 영향 및 환경적 촉발제 및 개체의 유전적 소인 사이의 상호작용을 반영한다.

[0010] 감각신경성 청력 상실 (SNHL)은 인간에서 가장 통상적인 신경퇴행성 질환이며, 현재 승인된 약리학적 개입은 없다. SNHL은 유전적 장애에 의해 유발될 뿐만 아니라 손상, 예컨대 소리 외상 및 이독성을 통해 획득될 수 있다. 유전적 진단은 비증후군성 SNHL을 유발하는 적어도 100개의 유전자가 있음을 입증하였다. 유전학 및 유전자 요법 기법에서의 최근의 진보는 다수의 열성 유형의 난청의 구제가 유전자 요법을 통해 가능한 것으로 제시된 바 있다 (Akil et al., 2012; Askew et al., 2015). 내이로의 장기간 유전자 전달은 아데노 연관 바이러스 벡터 (AAV)를 사용하여 달성된 바 있다 (Shu, Tao, Wang, et al., 2016). 이들 관찰의 첫번째가 수 년 전에 기재되었음에도 불구하고, 인간 임상 시험으로의 해석은 아직 일어나지 않았다. 이 영역에서의 해석적 연구

를 위한 이상적인 질환 표적은 내이 내의 세포의 한정된 군에 영향을 미치는 열성 유전적 청력 상실이며, 출생 후에 구어의 발달 후에 발생한다. 돌연변이의 유병률은 추가의 고려사항이다.

[0011] 본원에 기재된 바와 같이, 청력 상실의 통상적인 열성 원인의 발생 둘 다를 주의깊게 평가하고, 유전자의 크기를 고려함으로써, 접근가능하고 상당히 통상적인 환자 집단을 갖는 유전자 요법 프로그램을 개발하는 것이 가능하다. 예를 들어, 다른 돌연변이보다 덜 통상적이지만, TMPRSS3은 와우 이식을 보증하는데 충분히 중증인 청력 상실의 상당히 통상적인 원인이다. 추가적으로, TMPRSS3에서의 돌연변이를 갖는 환자 뿐만 아니라 다른 돌연변이를 갖는 환자는 와우 이식에 반응하지 않을 수 있다 (Shearer et al., 2017). 이는 독립형 치료제로서, 또는 다른 치료제 및/또는 이 장애를 위한 이식기 결과를 개선시키기 위한 와우 이식과 조합으로, TMPRSS3, 또는 다른 유전자, 예컨대 LOXHD1을 표적화하는 기회를 제공한다. 표 1 (문헌 [Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016]으로부터 개조됨)은 TMPRSS3에서의 돌연변이가 와우 내의 상당히 제한된 분포를 갖는 언어습득후 열성 청력 상실의 가장 통상적인 원인일 수 있으며, 유전자의 크기로 인해, 기존의 AAV 벡터 내로 구축될 수 있음을 입증한다.

돌연변이	발병		173		유전자 크기	유모 세포	우성/열성
	언어습득전	언어습득후	전체	전체의 %			
GJB2	26	3	29	17%	2347	없음	둘 다
CDH23	6	7	13	8%	4843	있음	열성
SLC26A4	8	0	8	5%	4930	없음	열성
MYO7A	3	4	7	4%	7465	있음	둘 다
OTOF	4	0	4	2%	6973	있음	열성
MYO15A	2	2	4	2%	11876	있음	열성
WARDNB SYN	3	0	3	2%	1504	없음	우성
TMPRSS3	0	3	3	2%	2460	있음	열성
ACTG1	0	2	2	1%	2123	있음	우성
USHER (1=CDH23, 1=PCDH15)	2	0	2	1%	4843, 7042	?	열성
Mit1555A>G	0	2	2	1%	NA	?	?
CYRM	0	1	1	1%	1559	없음	우성
DFNA5	0	1	1	1%	2276	있음	우성
COCH	0	1	1	1%	2882	없음	우성
WHRN	0	1	1	1%	2915	있음	열성
LOXHD1	1	0	1	1%	3978	있음	열성
Mit3243A>G	0	1	1	1%	NA	?	?

[0012]

[0013] 표 1: 176명의 성인 와우 이식기 환자에서의 상이한 돌연변이의 발생률

[0014] 인간 막형단 프로테아제, 세린 3 (TMPRSS3; DFNB10, DFNB8, ECHOS1, TADG12로도 지칭됨; Acc: HGNC:11877)은 선천성 (출생 시에 존재함) 및 아동기 발병 상염색체 열성 난청 둘 다와의 그의 연관에 의해 확인되었다. TMPRSS3 유전자에서의 돌연변이는 상염색체 열성 비증후군성 청력 손상 (Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment) 유형 DFNB8 및 10과 연관된다. TMPRSS3은 세린 프로테아제를 코딩하는 1646 염기 쌍 유전자이고, DFNA 8/10과 연관되며, 와우 이식을 겪은 청력 상실을 갖는 환자의 1-5% 이하를 구성할 수 있다 (Weegerink et al., 2011). 이 유전자의 기능의 상실은 돌연변이의 부위에 따라 폭넓은 스펙트럼의 청각 표현형을 초래하는 것으로 보인다. 선천성 및 성인 발병 진행성 청력 상실 둘 다는 이 유전자의 상실과 연관되어 있다.

[0015] DFNB8 청력 상실의 발병은 언어습득후 (연령 10-12세)인 반면, DFNB10 청력 상실의 발병은 언어습득전 (선천성)이다. 이 표현형적 차이는 유전자형적 차이를 반영한다. DFNB8 유발 변이체는 스플라이스 부위 변이체이며, 이는 비효율적 스플라이싱이 언어습득전 난청을 예방하기에는 충분하지만 궁극적 청력 상실을 예방하기에는 충분하지 않은 감소된 양의 정상 단백질과 연관됨을 시사한다. (문헌 [Richard JH Smith, MD, et al. (2014). Genes Known to Cause Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment: Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview; *GeneReviews*] 참조).

[0016] 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 염색체 21 상의 TMPRSS3 돌연변이는 표 2에 기재되어 있다.

표 2. TMPRSS3 돌연변이 (염색체 21)

#	돌연변이 명칭	참고문헌
1	TMPRSS3, IVS4AS, G-A, -6	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
2	TMPRSS3, 8-BP DEL, SATELLITE REPEAT INS	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
3	TMPRSS3, 1-BP DEL, 207C	Wattenhofer M, et al. (2002) Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. <i>J Mol Med (Berl)</i> . 80(2):124-31.
4	c.753G>C (p.Trp251Cys)	Masmoudi S, et al. (2001) Novel missense mutations of TMPRSS3 in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness. <i>Hum Mutat.</i> 18(2):101-8.
5	c.308A>G (p.Asp103Gly)	Wattenhofer M, et al. (2002) Mutations in the TMPRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. <i>J Mol Med (Berl)</i> . 80(2):124-31.
6	c.1211C>T (p.Pro404Leu)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.
7	c.647G>T (p.Arg216Leu)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.

[0017]

표 2. TMPRSS3 돌연변이 (염색체 21)

#	돌연변이 명칭	참고문헌
8	c.579dupA (p.Cys194Metfs)	Duzkale H, et al. (2013) A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. <i>Clin Genet.</i> 84(5):453-63.
9	c.1192C>T (p.Gln398Ter)	Wattenhofer M, et al. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. <i>Hum Genet.</i> 117(6):528-35.
10	c.323-6G>A	Scott HS, et al. (2001) Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. <i>Nat Genet.</i> 27(1):59-63.
11	c.916G>A (p.Ala306Thr)	Chung J, et al. (2014) A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. <i>J Mol Med (Berl)</i> . 92(6):651-63.
12	c.208delC (p.His70Thrfs)	Battelino S, et al. (2015) TMPRSS3 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. <i>Eur Arch Otorhinolaryngol.</i> 273(5):1151-4.
13	c.1276G>A (p.Ala426Thr)	Weegerink NJ, et al. (2011) Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. <i>J Assoc Res Otolaryngol.</i> 12(6):753-66.
14	c.413C>A (p.Ala138Glu)	Eppsteiner RW, et al. (2012) Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: the spiral ganglion hypothesis. <i>Hear Res.</i> 292(1-2):51-8.
15	c.325C>T (p.Arg109Trp)	Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ (2003) Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3. <i>J Med Genet.</i> 40(8):629-31.

[0018]



표 2. TMPRSS3 돌연변이 (염색체 21)

#	돌연변이 명칭	참고문헌
16	c.346G>A (p.V116M)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USH1C, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One</i> . 9(1):e84773.
17	c.727G>A (p.G243R)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USH1C, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One</i> . 9(1):e84773.
18	c.1156T>C (p.C386R)	Ganapathy A, et al. (2014) Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USH1C, CDH23 and TMIE. <i>PLoS One</i> . 9(1):e84773.

[0019]

[0020]

리폭시게나제 상동성 도메인 1 유전자 (LOXHD1; LH2D1, DFNB77, FLJ32670으로도 지칭됨; OMIM: 613072; Acc:HGNC:26521)는 단백질을 형질 막으로 표적화하는데 관여하는 것으로 생각되는, 전체적으로 PLAT (폴리시스틴/리폭시게나제/알파-독소) 도메인으로 이루어진 고도로 보존된 단백질을 코딩한다. 마우스에서의 연구는 이 유전자가 내이에서 기계감각적 유모 세포에서 발현되고, 이 유전자의 돌연변이가 청각 결손을 초래하며, 이는 이 유전자가 정상적인 유모 세포 기능에 필수적임을 시사함을 제시한다. 인간 패밀리 분리 난청의 스크리닝은 상염색체-열성 비증후군성 청력 상실 (ARNSHL)의 진행성 형태인 DFNB77을 유발하는 이 유전자에서의 돌연변이를 확인하였다. 대안적으로, 상이한 이소형을 코딩하는 스플라이싱된 전사체 변이체는 이 유전자에 대해 주목된 바 있다.

[0021]

LOXHD1의 임상적 특색:

[0022]

- 상염색체 열성

[0023]

- 청력 상실, 감각신경성, 양측성 (낮은 주파수에서의 보다 정도의 청력 상실)

[0024]

- 아슈케나지 유대인 패밀리에서의 7-10세의 와우 이식기를 초래하는 선천성 발병

[0025]

- 동족 이란 패밀리에서의 성인기 동안 중간 및 고 주파수의 중등도-내지-중증 상실로 진행되는 7-8세에 의한 발병

[0026]

상염색체 열성 비증후군성 청력 상실-77 (DFNB77)이 염색체 18q21 상의 LOXHD1 유전자 (613072)에서의 동형접합성 돌연변이에 의해 유발된다는 증거.

[0027]

계내 혼성화는 배아 제13.5일 및 제16일에 마우스 내이를 발달시키는데 있어서 Loxhd1 발현을 검출하였지만, 임의의 다른 조직에서는 그렇지 않았다. 출생후 제4일에, 발현은 와우 및 전정 유모 세포에서 검출되었으며, 핵에서 가장 높은 농도였다. Loxhd1은 세포질에서 점진적으로 국재화하며, 성체에서, Loxhd1은 입체세포의 길이를 따라 유모 세포에서 발현되었다.

[0028]

N-에틸-N-니트로소우레아 (ENU) 돌연변이유발 스크린을 사용하여, 그릴렛(Grillet) 등 (2009)은 3주령까지 청력 손상되고, 8주령까지 청력장애가 된 '삼바' 마우스 계통을 개발하였다. 동형접합성 삼바 마우스는 다른 신경학적 또는 전정 이상을 나타내지 않았으며, 이형접합성 삼바 마우스는 완전히 정상으로 나타났다. 입체세포 발달은 동형접합성 삼바 마우스에서 영향을 받지 않았지만, 유모 세포 기능은 교란되었으며, 유모 세포는 궁극적으로 퇴화되었다.

[0029]

그릴렛 등 (2009)은 삼바가 PLAT 도메인 10의 베타-샌드위치 구조를 탈안정화시키는 마우스 Loxhd1 유전자에서의 돌연변이를 발견하였다. 돌연변이는 입체세포의 길이를 따라 Loxhd1 단백질의 mRNA 또는 단백질 안정성

또는 국제화를 변경시키지 않았다. 그러나, 출생후 제21일까지, 일부 유모 세포는 융합된 입체섬모 및 정단 세포 표면에서의 막 리플링을 갖는 형태적 결함을 나타내었다. 유모 세포 상실 및 나선 신경절 뉴런의 감소를 비롯한 극심한 퇴행성 변화는 출생후 제90일까지 자명하였다. 그릴렛 등 (2009)은 나선 신경절 뉴런의 퇴행이 유모 세포의 기능 및 유지에서의 교란에 부차적일 가능성이 있다고 가설화하였다.

[0030]

청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 염색체 18 상의 LOXHD1 돌연변이는 표 3에 기재되어 있다.

표 3. LOXHD1 돌연변이 (염색체 18)		
#	돌연변이 명칭	참고문헌
1	c.2008C>T (p.Arg670Ter)	Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet.</i> 85(3):328-37.
2	c.3169C>T (p.Arg1057Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. <i>Am J Med Genet A.</i> 155A(5):1170-2.  Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet.</i> 85(3):328-37.
3	c.2303delG (p.Gly768Alafs)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. <i>Am J Med Genet A.</i> 155A(5):1170-2.  Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet.</i> 85(3):328-37.
4	c.4099G>T (p.Glu1367Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. <i>Am J Med Genet A.</i>

[0031]

		155A(5):1170-2.  Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet.</i> 85(3):328-37.
5	c.2497C>T (p.Arg833Ter)	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. <i>Am J Med Genet A.</i> 155A(5):1170-2.  Grillet N, et al. (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. <i>Am J Hum Genet.</i> 85(3):328-37.
6	c.4714C>T	Edvardson S, et al. (2011) A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. <i>Am J Med Genet A.</i> 155A(5):1170-2.

[0032]

[0033]

그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 공개 번호 2013/0095071에는 아토포시스 단백질의 X-연관 억제제 (XIAP)를 내이의 정원창 막으로 전달하는 돌연변이된 티로신 아데노-연관 바이러스 벡터를 사용하여 연령-관련 청력 상실을 복원하기 위한 유전자 요법 방법이 기재되어 있다. 그러나, 상기 정보는 본원에 개시된 바와 같은 TMPRSS3 또는 LOXHD1 유전자의 유전적 돌연변이에 의해 유발된 청력 상실 또는 난청의 발병을 예방하거나 또는 지연시키거나 또는 이를 복원하기 위한 기능적 TMPRSS3 또는 LOXHD1을 코딩하는 핵산 서열의 전달을 고려하지 않는다.

[0034]

추가적으로, 청력 장애를 위한 임상적 유전자 요법을 개발하기 위한 종래 기술의 현재 상태에서의 중요한 함정은 인간 청력 상실을 반영하는 동물 모델의 결여이다. 인간에서의 성인 발병을 갖는 유전적 청력 상실을 위한 이용가능한 마우스 모델 중 많은 것은 전달 연구를 복잡하게 만드는 선천성 청력 상실을 제공한다. 청력의 발달 후에 유전적 청력 상실의 발병을 갖는 모델은 소수이다. 신생아 마우스에서의 벡터의 전달은 성체 마우스에서의 전달과는 상이한 형질감염 패턴을 초래한다 (Shu, Tao, Li, et al., 2016). 상이한 벡터 시스템 및 유전자 표적을 사용하여 청력의 구제를 평가하는데 사용될 수 있는 신규한 동물 모델에 대한 필요가 있다.

[0035]

현재 청력 상실 또는 난청을 예방하거나 또는 치료하기 위한 승인된 치료적 치료는 없으며, 이러한 치료를 시험하기 위한 유용한 전임상적 동물 모델의 결여가 있다. 본 발명은 돌연변이된 TMPRSS3 또는 LOXHD1 유전자의 활성을 복원하고, 유모 세포 생존을 촉진시키고, 청력 상실 또는 난청을 앓고 있는 환자에서의 청력을 복원하기 위한 내이 내로의 TMPRSS3 또는 LOXHD1의 바이러스 벡터 유전자 전달을 위한 조성물 및 방법, 및 이러한 조성물 및 방법을 시험하기 위한 세포-기재 및 동물-기재 모델을 기재한다.

### 발명의 내용

[0036]

서열식별번호(SEQ ID NO): 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열, 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터가 본원에 개시된다. 또한, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열, 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 가지며, 여기서 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터를 포함하는 청력 상실의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 제약 조성물이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열식별번호: 1 또는 서열식별

번호: 2의 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헬퍼 의존성 아데노 바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 AAV2, AAV2/Anc80, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 또는 Anc80으로부터 선택된 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 아데노-연관 바이러스 벡터는 AAV2 또는 Anc80이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 초기 발달에서 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 유도하고, 생애 전반에 걸쳐 발현을 유지하는 임의의 유모 세포 프로모터, 예를 들어, TMPRSS3 프로모터, 인간 시토크갈로바이러스 (HCMV) 프로모터, 시토크갈로바이러스/닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터, Myo7a 프로모터 또는 Pou4f3 프로모터로부터 선택된다.

[0037] 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열, 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터를 갖는 세포가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 유도된 만능 줄기 세포이다.

[0038] 청력 상실의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열, 또는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 청력 상실을 치료하거나 또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 핵산 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 아데노-연관 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 AAV2, AAV2/Anc80, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 또는 Anc80으로부터 선택된 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 아데노-연관 바이러스 벡터는 AAV2 또는 Anc80이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 초기 발달에서 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 유도하고, 생애 전반에 걸쳐 발현을 유지하는 임의의 유모 세포 프로모터, 예를 들어, TMPRSS3 프로모터, 인간 시토크갈로바이러스 (HCMV) 프로모터, 시토크갈로바이러스/닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터, Myo7a 프로모터 또는 Pou4f3 프로모터로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 예를 들어, 주사에 의해 대상체의 내이 내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 전달 방법은 와우개창술, 정원창 막, 반고리관절개술 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다 (문헌 [Erin E. Leary Swan, et al. (2008) Inner Ear Drug Delivery for Auditory Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(15):1583-1599] 참조). 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 내림프관을 통해 중간계 내로 전달된다 (Colletti V, et al. (2010) Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear. *Audiol Neurotol.* 15(6):353-63; Marco Mandala, MD, et al. (2010) Induced endolymphatic flow from the endolymphatic sac to the cochlea in Meniere's disease. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 143, 673-679; Yamasoba T, et al. (1999) Inner ear transgene expression after adenoviral vector inoculation in the endolymphatic sac. *Hum Gene Ther.* 10(5):769-74). 일부 실시양태에서, 대상체는 청력 상실과 연관된 1종 이상의 유전적 위험 인자를 갖는다. 일부 실시양태에서, 유전적 위험 인자 중 하나는 TMPRSS3 유전자에서의 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, TMPRSS3 유전자에서의 돌연변이는 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 임의의 1종 이상의 TMPRSS3 돌연변이로부터 선택된다 (예를 들어, 표 2 참조). 일부 실시양태에서, 유전적 위험 인자 중 하나는 LOXHD1 유전자에서의 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, LOXHD1 유전자에서의 돌연변이는 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 임의의 1종 이상의 LOXHD1 돌연변이로부터 선택된다 (예를 들어, 표 3 참조). 일부 실시양태에서, 대상체는 청력 상실의 임의의 임상적 지표를 나타내지 않는다.

[0039] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 발현 벡터는 다른 핵산 서열을 포함하는 1종 이상의 발현 벡터와의 및/또는 청력 상실을 치료하기 위한 1종 이상의 다른 활성 제약 제제와의 조합 요법으로서 투여된다. 예를 들어, 조합 요법은 서열식별번호: 1의 핵산 서열을 갖는 제1 발현 벡터 및 서열식별번호: 2의 핵산 서열을 갖는 제2 발현 벡터를 포함할 수 있으며, 여기서 둘 다의 발현 벡터는 청력 상실을 치료하기 위한 조합 요법의 일부로서 대상

체에게 투여된다.

- [0040] 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 임의의 1종 이상의 TMPRSS3 돌연변이로부터 선택된 돌연변이를 갖는 인간 TMPRSS3 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스가 본원에 개시된다 (예를 들어, 표 2 참조). 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 임의의 1종 이상의 LOXHD1 돌연변이로부터 선택된 돌연변이를 갖는 인간 LOXHD1 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스가 본원에 개시된다 (예를 들어, 표 3 참조).

### 도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 야생형 인간 TMPRSS3을 코딩하는 cDNA 서열 (진뱅크(GenBank) 수탁 번호 BC074847.2)을 제시한다.
- 도 2는 도 1에서의 cDNA에 의해 코딩되는 야생형 인간 TMPRSS3 아미노산 서열을 제시한다.
- 도 3은 야생형 인간 LOXHD1을 코딩하는 cDNA 서열 (진뱅크 수탁 번호 AK057232.1)을 제시한다.
- 도 4는 도 3에서의 cDNA에 의해 코딩되는 야생형 인간 LOXHD1 아미노산 서열을 제시한다.
- 도 5는 성체 마우스 와우에서의 Tmprss3 면역조직화학을 제시한다 (Fasquelle, L., Scott, H. S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyard, S., ... Delprat, B. (2011). Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383-17397).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 발명으로서 간주되는 대상은 특히 명세서의 결론에서 청구범위에 지적되고 명확하게 청구된다. 본 발명의 상기 및 다른 목적, 특색, 및 이점은 첨부되는 도면과 함께 취해지는 하기 상세한 설명으로부터 명백할 것이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하다", "치료하는", 및 "치료"는 임상적 결과의 바람직한 변화를 목표로 하는 다양한 활동을 포괄한다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하다"는 본원에 기재된 바와 같은 청력 상실의 1종 이상의 임상적 지표 또는 증상의 검출가능한 개선을 달성하는 것을 목표로 하거나, 또는 달성하는 임의의 활동을 포괄한다.
- [0044] TMPRSS3 돌연변이 또는 LOXHD1 돌연변이에 의해 유발되는 청력 상실은 일반적으로 2가지 집단에서 나타난다: (i) 대상체가 청력 상실을 갖고 태어나는 선천성 집단 및 (ii) 대상체가 출생 시에 측정가능한 청력 상실을 갖지 않지만, 시간의 기간에 걸쳐 진행성 청력 상실을 나타내는 진행성 집단. 따라서, 일부 예에서, 대상체는 TMPRSS3 유전자에서의 또는 LOXHD1 유전자에서의 돌연변이를 가질 수 있지만 (예를 들어, 유전적 진단 시험에서 검출된 바와 같음), 청력 상실의 임상적 지표 또는 증상을 아직 나타내지 않으며, 따라서 치료 개입이 개시될 수 있는 창을 제공한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 청력의 점진적 퇴행의 기간 동안 치료 개입을 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 이러한 기간 전에 시작될 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 청력 상실을 치료하는 방법은 청력 상실의 발병 또는 청력 상실의 임상적 지표 또는 증상의 진행을 예방하거나 또는 지연시키는 방법을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "청력 상실"은 소리를 듣는 감소된 능력을 기재하는데 사용되며, 난청 및 소리를 듣는 것의 완전한 불능을 포함한다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 1종 이상의 바람직한 임상적 결과, 예컨대 상기 "치료" 기재에 기재된 것들을 달성하거나, 또는 달성하는 것에 대해 기여하는데 충분한 본원에 기재된 바와 같은 활성제의 양을 지칭한다. 임의의 개별적 경우에서 적절한 "유효"량은 관련 기술분야에 공지된 표준 기법, 예컨대 용량 상승 연구를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "활성제"는 예를 들어 청력 상실을 치료하는 목적을 위해 본원에 기재된 조성물 및 방법에 사용되도록 의도되고, 생물학적으로 활성인 것으로 의도되는 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 AAV 벡터)를 지칭한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "제약 조성물"은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 1종의 활성제 또는 2종 이상의 활성제의 조합, 및 제약 전달에 사용하기에 적합한 1종 이상의 다른 성분, 예컨대 담체, 안정화제, 희석제, 분산제, 현탁화제, 증점제, 부형제 등을 포함하는 조성물을 지칭한다.
- [0049] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 바와 같은 용어 "대상체" 또는 "환자"는 인간, 비-인간 영장류, 설치류



(예컨대 래트, 마우스 및 기니 피그) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물을 포괄한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0050] 본 발명의 활성제의 용량은 활성제의 효능 및/또는 유효량을 결정하기 위해 수행되는 인간 또는 다른 포유동물에서의 연구에 기초하여 계산될 수 있다. 용량 양 및 투여의 빈도 또는 시기는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있으며, 활성제의 제약 형태, 투여 경로, 단지 1종의 활성제 또는 다중 활성제가 사용되는지 여부 (예를 들어, 요구되는 제1 활성제의 투여량은 이러한 작용제가 제2 활성제와 조합으로 사용되는 경우에 더 낮을 수 있음), 및 연령, 체중 또는 약물 대사에 영향을 미치는 임의의 의학적 상태의 존재를 비롯한 환자 특징과 같은 인자에 의존할 수 있다.

[0051] 한 실시양태에서, 단일 용량이 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 다중 용량이 시간의 기간에 걸쳐, 예를 들어, 특정된 간격으로, 예컨대 1일당 4회, 1일당 2회, 1일 1회, 매주, 매월 등으로 투여될 수 있다.

[0052] **청력 상실의 임상적 특징.** 유전성 청력 상실 및 난청은 전도성, 감각신경성, 또는 둘 다의 조합; 증후군성 (외이 또는 다른 기관의 기형과 또는 다른 기관계를 포함하는 의학적 문제와 연관됨) 또는 비증후군성 (외이의 가시적 이상 또는 임의의 관련된 의학적 문제와 연관되지 않음); 및 언어습득전 (언어가 발달하기 전) 또는 언어습득후 (언어가 발달한 후)일 수 있다 (Richard JH Smith, MD, et al. (2104) Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*).

[0053] **진단/시험.** 청력 상실의 유전적 형태는 청력 상실의 획득된 (비-유전적) 원인과 구별되어야 한다. 청력 상실의 유전적 형태는 이과학적, 청력적, 및 물리적 검사, 가족력, 보조 시험 (예를 들어, 측두골의 CT 검사), 및 분자 유전학적 시험에 의해 진단된다. 많은 유형의 증후군성 및 비증후군성 난청에 대해 가능한 분자 유전학적 시험은 진단 및 유전적 상담에 중요한 역할을 한다.

[0054] 청력 상실을 측정하기 위해 사용되는 선택된 시험:

[0055] **1. 변조 이음향 방사 (DPOAE).** 변조 이음향 방사 (DPOAE)는 와우가 그의 비가 1.1 내지 1.3인 2가지 순음 주파수에 의해 동시에 자극되는 경우에 생성되는 반응이다. DPOAE의 생성 메카니즘에 대한 최근의 연구는 DPOAE 반응에 있어서의 2가지 중요한 성분의 존재를 강조하였으며, 하나는 상호변조 "변조"에 의해 생성되고, 하나는 "반향"에 의해 생성된다.

[0056] DPOAE의 유병률은 정상 성인 귀에서 100%이다. 좌측 및 우측 귀로부터의 반응은 종종 상관된다 (즉, 이들은 매우 유사함). 정상 대상체에 대해, 여성은 보다 높은 진폭 DPOAE를 갖는다. 노화 과정은 DPOAE 진폭을 저하시키고, DPOAE 반응 스펙트럼을 좁힘으로써 (즉, 보다 높은 주파수에서의 반응이 점차적으로 감소하고 있음) DPOAE 반응에 대한 효과를 갖는다. DPOAE는 또한 임상 연구에 사용되는 다른 동물 종, 예컨대 도마뱀, 마우스, 래트, 기니 피그, 친칠라, 닭, 개 및 원숭이로부터 기록될 수 있다. (Otoacoustic Emissions Website).

[0057] **2. 청각 뇌간 반응 (ABR).** 청각 뇌간 반응 (ABR) 시험은 내이 (와우) 및 청력에 대한 뇌 경로에 대한 정보를 제공한다. 이 시험은 또한 때때로 청각 유발 잠재력 (AEP)으로 지칭된다. 시험은 청력 스크리닝의 통상적인 행동 방법을 갖는 어려운 시간을 갖는 아동 또는 다른 사람들로 사용될 수 있다. ABR은 또한 뇌 또는 뇌 경로에서의 청력 상실의 유형을 시사하는 징후, 증상, 또는 질환을 갖는 사람에 대해 지시된다. 시험은 인간 및 동물 둘 다에 대해 사용된다. ABR은 전극을 머리 상에 붙이고-심전도가 실행되는 경우에 심장 주위에 정치된 전극과 유사함-소리에 반응하여 뇌파 활성을 기록함으로써 수행된다. 시험되는 사람은 시험이 수행되는 동안 조용히 휴식하거나 잠을 잔다. 반응은 필요하지 않다. ABR은 또한 신생아 청력 스크리닝 프로그램에서 스크리닝 시험으로서 사용될 수 있다. 스크리닝 시험으로서 사용되는 경우, 단지 하나의 강도 또는 음량 수준이 점검되고, 아기는 스크린을 통과하거나 실패한다. (American Speech-Language-Hearing Association Website).

[0058] **청력 상실의 임상적 징후.** 청력 상실은 유형 및 발병에 의해 기재된다:

[0059] **유형**

[0060] • 전도성 청력 상실은 외이 및/또는 중이의 소골의 이상으로부터 초래된다.

[0061] • 감각신경성 청력 상실은 내이 구조 (즉, 와우)의 기능부전으로부터 초래된다.

[0062] • 혼합 청력 상실은 전도성 및 감각신경성 청력 상실의 조합이다.

[0063] • 중추 청각 기능이상은 제8 뇌신경, 청각 뇌간, 또는 대뇌 피질의 수준에서의 손상 또는 기능이상으로부터 초래된다.

[0064] **발병**

[0065] • 언어습득전 청력 상실은 구어가 발달하기 전에 존재한다. 모든 선천성 (출생 시에 존재하는) 청력 상실은 언어습득전이지만, 모든 언어습득전 청력 상실이 선천성인 것은 아니다.

[0066] • 언어습득후 청력 상실은 정상 구어의 발달 후에 발생한다.

[0067] (Richard JH Smith, MD, et al.; Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview; GeneReviews; Initial Posting: February 14, 1999; Last Revision: January 9, 2014.)

[0068] **청력 상실의 중증도.** 청력은 데시벨 (dB) 단위로 측정된다. 각각의 주파수에 대한 역치 또는 0 dB 마크는 정상적인 젊은 성인이 시간의 단음 50%를 인지하는 수준을 지칭한다. 청력은 개체의 역치가 정상 역치의 15 dB 내에 있는 경우에 정상으로 간주된다. 청력 상실의 중증도는 표 4에 제시된 바와 같이 등급화된다.

표 4. 데시벨 (dB) 단위의 청력 상실의 중증도	
중증도	데시벨 단위의 청력 역치
경도	26-40 dB
중등도	41-55 dB
중등 중증	56-70 dB
중증	71-90 dB
최중증	90 dB

[0069]

[0070] **퍼센트 청력 손상.** 퍼센트 청력 손상을 계산하기 위해, 25 dB을 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 3000 Hz의 순음 평균으로부터 뺀다. 결과에 1.5를 곱하여 귀-특이적 수준을 얻는다. 손상은 보다 양호한 귀를 보다 불량한 귀에 5배를 가중함으로써 측정된다 (표 5 참조). 일상 대화는 대략 50-60 dB HL (청력 수준)이기 때문에, 순음 평균에 기초하여 기능적 손상을 계산하는 것은 오해의 소지가 있을 수 있다. 예를 들어, 45-dB 청력 상실은 30%가 암시하는 것보다 기능적으로 훨씬 더 유의하다. 상이한 등급화 스케일은 심지어 제한된 청력 상실도 언어 발달에 대한 큰 영향을 가질 수 있는 어린 아동에 대해 적절하다 [Northern & Downs 2002].

표 5. 퍼센트 청력 손상		
% 손상	순음 평균 (dB)*	% 잔류 청력
100%	91 dB	0%
80%	78 dB	20%
60%	65 dB	40%
30%	45 dB	70%
* 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 3000 Hz의 순음 평균		

[0071]

- [0072] **청력 상실의 주파수.** 청력 상실의 주파수는 하기와 같이 지정된다:
- [0073] • 저 (<500 Hz)
- [0074] • 중 (501-2000 Hz)
- [0075] • 고 (>2000 Hz)
- [0076] **유전자 요법.** 유전자 요법은 DNA가 유전적 질환을 치료하기 위해 환자 내로 도입되는 경우이다. 새로운 DNA는 통상적으로 기존의 유전자에서의 질환-유발 돌연변이의 효과를 교정하기 위한 기능화 유전자를 함유한다. 실험 또는 치료 목적 중 어느 하나를 위한 유전자 전달은 유전적 정보를 표적 세포 내로 서플링하기 위한 벡터 또는 벡터 시스템에 의존한다. 벡터 또는 벡터 시스템은 유전자 전달 반응의 효율, 특이성, 숙주 반응, 약리학, 및 지속성의 주요한 결정자인 것으로 간주된다. 현재, 유전자 전달을 달성하기 위한 가장 효율적이고 효과적인 방법은 복제-결합성이 된 바이러스에 기초한 벡터 또는 벡터 시스템의 사용을 통한 것이다 (PCT 공개 번호 WO 2015/054653; 조상 바이러스 서열을 예측하는 방법 및 그의 용도).
- [0077] **벡터.** 지금까지, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 백시니아 바이러스, 레트로 바이러스, 헬퍼 의존성 아데노바이러스 및 렌티바이러스는 모두 와우 유전자 전달에 대해 시험되었다. 이들 중에서, 가장 잠재성을 입증한 것은 아데노 연관 바이러스 (AAV)이다: 이는 비-복제성이고, 트랜스젠을 내이로 효율적으로 전달할 수 있고, 이독성을 유발하지 않는다. 특히, AAV는 유모 세포-특이적 돌연변이로 인한 유전적 결함을 교정하기를 희망하는 경우에 중요한 특색인 내부 유모 세포를 효과적으로 형질감염시킬 수 있다. 지금까지, 다수의 상이한 AAV 하위유형이 와우 유전자 전달에 대해 성공적으로 사용되어 왔으며, 이는 코르티 기관에 대한 손상이 존재하더라도 적응을 입증한다. AAV 혈청형 1, 2, 5, 6 및 8을 연구하는 최근의 보고는 유모 세포, 지지 세포, 청신경 및 나선 인대에서의 성공적인 유전자 발현을 입증하였으며, 유모 세포가 가장 효과적으로 형질도입되었다 (Lawrence R. Lustig, MD and Omar Akil, PhD (2012) Cochlear Gene Therapy. *Curr Opin Neurol.* 25(1): 57-60). 내이로 투여될 수 있는 AAV 벡터의 예는 또한 미국 특허 출원 번호 2013/0095071에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0078] 교정될 수 있는 표적 유전자의 크기는 AAV의 운반 능력에 기초하여 제한된다 (Wu, Yang, & Colosi, 2010). 번역의 목적으로, 이는 열성 청력 상실을 유발하는 상대적으로 작은 유전자 (<4.6 kB)에 의해 유발되는 그러한 유전적 장애에 대한 잠재적 표적을 제한한다. 유전자 요법 약물을 개발하기 위한 초기 접근법으로서, 표적 유전자 돌연변이는 상대적으로 흔해야 하며, 청력 상실은 언어의 발달 후에 발생해야 한다. 이들 특징에 부응하는 진행성 청력 상실을 갖는 환자를 확인하는 것인 그들의 상실의 진행을 개입하고, 중단시키거나 또는 가능하게는 반전시키는 기회를 제공한다. 내이 유전자 요법 시험은 인간에서 후천성 난청에 대해 시작되었으며, 따라서 안전성 및 전달 문제 중 많은 것이 다루어지고 있다 (임상 시험 식별자 NCT02132130). 유전적 시험의 증가하는 이용가능성 및 정확성은 이들 유형의 개입으로부터 유익을 얻을 수 있는 환자의 확인을 초래할 것이다 (Preciado et al., 2005).
- [0079] **유전자 요법의 마우스 모델:** 열성 유전적 난청의 몇몇 상이한 마우스 모델은 유전자 요법을 통해 구제된 바 있다. 예는 VGLUT3, Tlcl1, whirlin, clarin 1 돌연변이 유도된 청력 상실의 교정을 포함한다 (Akil et al., 2012; Askew et al., 2015; Chien et al., 2016; Geng et al., 2017; Isgrig et al., 2017). 이들 모델 모두는 청력의 성숙 전에 및 내이 유모 세포의 퇴행 전에 신생아 마우스 내이 내로의 벡터의 전달을 요구한다. 이는 유전자 요법 전략을 사용한 청력의 구제에 영향을 미치기 위해, 표적 장애는 청력의 상실 및 표적 세포의 퇴행 전에 요법의 전달을 허용하는 인간에서 적어도 저속 진행성이어야 함을 지시한다.
- [0080] **TMPRSS3 돌연변이는 청력 상실을 유도한다:** TMPRSS3에서의 돌연변이와 관련된 청력 상실 (DFNA8/10)은 다양한 상이한 표현형으로 나타날 수 있다. 선천성 최중증 청력 상실 뿐만 아니라 성인 발병 진행성 청력 상실 둘 다가 기재되어 있다 (Weegerink et al., 2011). 현재, Tmprss3 기능이상에 의한 메카니즘은 미궁지되어 있다. 지금까지 출생 시의 청력 상실 및 약간 더 나중 시점이지만 여전히 청력 및 마우스의 성숙 전의 청력 상실의 발병을 갖는 또 다른 것의 2가지 마우스 모델이 개발되어 있다. 파스쿠엘(Fasquelle) 등은 Tmprss3에서의 단백질-말단절단 넌센스 돌연변이를 운반하는 에틸-니트로소우레아-유도된 돌연변이체 마우스를 생성하였다. 이는 청력의 성숙 시점 주위인 출생후 제12일에서의 유모 세포의 상실 및 청력의 퇴행을 입증하였다. 추가적으로, 낭상 유모 세포는 영향을 받았으며, 나선 신경절 세포의 지연된 퇴행이 주목되었다 (Fasquelle et al., 2011). 나선 신경절의 퇴행이 코르티 기관의 퇴행과 관련되는지 또는 나선 신경절에서의 Tmprss3의 기능이상으로 인한



것인지 여부는 마우스 모델로부터 불명확하다. 다수의 연구는 마우스 내이 내의 Tmprss3의 분포를 평가하였으며, 대체로 유모 세포 및 나선 신경절 세포에서의 Tmprss3의 존재를 입증한다 (Fan, Zhu, Li, Ji, & Wang, 2014; Fasquelle et al., 2011). 마우스 Tmprss3의 발현은 항체 항-TMPRSS3 (1:100, ab167160, 압캠(Abcam), 미국 매사추세츠주 캠브리지)을 사용하여 1월령 C57B15 마우스에서 평가되었다. 표지화는 내부 및 외부 유모 세포, 혈관 선조에서 및 나선 신경절 세포의 약 50%에서 나타났다 (도 5). 이는 Tmprss3 기능의 상실에 추가적으로 선조 기능의 상실을 초래할 수 있지만, 와우내 전위의 변화는 파스쿠엘 마우스 모델에서 나타나지 않았음을 시사한다 (Fasquelle et al., 2011).

[0081] Tmprss3 유전자형-표현형 연구는 최종증 선천성 내지 성인 발병 진행성 청력 상실의 범위의 청력 상실의 폭넓은 범위의 상이한 형태를 입증한다 (Chung et al., 2014; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011). 연구는 Tmprss3 돌연변이로 인한 청력 상실이 성인 와우 이식을 겪은 환자의 2 내지 5%를 구성할 수 있음을 시사한다 (Jolly et al., 2012; Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016; Sloan-Heggen et al., 2016). 이들 돌연변이를 갖는 많은 환자는 유의한 양의 잔류 청력을 갖는다. 이는 치료될 수 있는 세포의 기질이 있을 것이기 때문에 이것을 잠재적 구제 요법을 위한 매력적인 표적으로 만들 것이다. 이 돌연변이를 갖는 환자에서의 와우 이식의 성공에 대한 일부 다른 연구가 있다. Tmprss3의 상실에 의해 유도되는 청력 상실의 적어도 일부 형태는 유전적 난청의 다른 형태보다 와우 이식으로는 잘 수행하지 않을 수 있다 (Shearer et al., 2017). 이는 이 유전자에 유모 세포 및 나선 신경절 세포의 50% 이하 둘 다에서 발현된다는 사실과 잠재적으로 관련된다 (도 5 참조). 이들 불일치는 전달을 위한 벡터 시스템을 선택하는 경우에 고려될 필요가 있다. 강한 유모 세포 양성 및 조합된 유모 세포 및 나선 신경절 양성을 갖는 벡터가 시험될 것이다. 벡터 양성의 차이는 또한 신생아 및 성인 내이 전달을 비교하는 경우에 나타난 바 있다 (Shu, Tao, Li, et al., 2016; Shu, Tao, Wang, et al., 2016a). 표적 임상적 집단이 성숙한 청각계를 갖는 인간이기 때문에, 질환 진행 (실시예 1 참조) 및 성인 와우에 대한 구제 요법의 모델 전달 (실시예 2 참조) 둘 다에 대한 모델로서 사용될 수 있는 청력의 성숙 후의 청력 상실의 발병을 갖는 마우스 모델이 본원에 개시된다.

[0082] **내이로의 전달을 위한 AAV 혈청형:** 폭넓게 다양한 상이한 AAV 혈청형은 내이 조직을 형질감염시키는데 유용한 것으로 입증된 바 있다 (Gyorgy et al., 2017; Shu, Tao, Wang, et al., 2016b; Xia, Yin, & Wang, 2012). 신생아 및 성체 동물에서의 벡터 전달 트랜스진의 분포의 차이가 명백하게 있으며, 추가적으로 유모 세포의 형질감염을 평가하는 경우에 외림프 대 내림프로의 전달의 차이가 있다 (Kilpatrick et al., 2011; Wang et al., 2013). 마우스 모델 내에서, 내림프로의 벡터의 전달은 유모 세포의 개선된 형질감염을 초래하지만, 이 접근법이 진행성 청력 상실을 모델링하는 것을 곤란하게 만드는 잔류 청력의 상실을 초래한다. 잠재적으로 보다 큰 동물에서 또는 인간에서, 벡터는 청력 상실을 유발하지 않고 내림프강 내로 전달됨으로써 형질감염 효율을 증가시킬 수 있다 (Colletti et al., 2010). 계획된 연구의 목적으로, 외림프 내로의 전달은 마우스의 청력이 평가되는 것을 허용할 것이다. AAV2는 성체 동물의 유모 세포 및 나선 신경절 세포로 전달되는 것으로 제시된 바 있다 (Tao et al., 2017). AAV2의 추가의 이점은 이것이 인간 유전자 요법 임상 시험에서 대규모의 트랙 기록 및 안전성 데이터를 이미 갖는다는 점이다 (Santiago-Ortiz & Schaffer, 2016). 최근, 다양한 연구는 합성 AAV (AAV2/Anc80)가 유모 세포로의 개선된 전달을 생성하지만, 천연 AAV2와 등가의 나선 신경절로의 전달을 제공하지 않을 수 있는 것으로 제시한 바 있다 (Landegger et al., 2017; Suzuki, Hashimoto, Xiao, Vandenberghe, & Liberman, 2017). 본 발명은 청력의 성인 발병 상실을 갖는 마우스 모델 및 AAV2 또는 AAV2/Anc80 Tmprss3 유전자 요법이 청력 및 나선 신경절 기능의 보다 양호한 구제를 생성하는지 여부를 비교하는 것을 제공한다.

[0083] **유도된 만능 줄기 세포 (iPSC).** 유도된 만능 줄기 세포 (IPS 또는 iPSC)는 세포를 재프로그래밍하고, 이를 배아 줄기 세포의 모든 특징을 갖는 세포 내로 형질전환시키는 유전자의 도입을 통해 성체 세포, 예컨대 피부, 간, 위 또는 다른 성숙한 세포로부터 생성된 줄기 세포이다. 용어 만능은 신체의 기관을 형성하는 모든 3가지 배아 계통, 즉, 신경계, 피부, 근육 및 골격을 비롯한 다중 세포 유형을 생성하는 세포의 능력을 내포한다.

[0084] **CRISPR/Cas9 유전자 편집.** 본원에 기재된 방법은 또한 TMPRSS3 유전자 돌연변이 또는 LOXHD1 유전자 돌연변이를 편집함으로써 청력을 구제하기 위한 CRISPR/Cas9 게놈 편집의 사용을 고려한다. 이 기술은 2가지 유전적 청력 상실 마우스 모델 (Tmc1 및 Pmca2)에서 청력을 성공적으로 구제하는데 사용되어 왔다 (Askew, C et al. (2015) Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *Sci Transl Med.* 7(295):295ra108). 상기 기술은 주로 우성 청력 상실을 표적화하는데 사용되어 왔지만, 이는 Tmprss3 녹-인 마우스 모델에서, 및 궁극적으로 TMPRSS3 유전자 또는 LOXHD1 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되는 청력 상실을 갖는 인간에서 열성 청력 상실을 표적화하고, 청력을 복원하기 위해 개발될 수 있다. 결함성 유전자 서열을 복구하기 위한

CRISPR/Cas9 유전자 편집의 사용은 또한 PCT 공개 번호 WO 2016/069910, PCT 공개 번호 WO 2015/048577, 및 미국 출원 공개 번호 2015/0291966에 기재되어 있으며, 이들의 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0085]

실시에

[0086]

실시에 1 - 환자에서 나타난 출생후 발병 진행성 청력 상실을 반영하는 TMPRSS3 돌연변이의 마우스 모델

[0087]

**마우스에서의 CRISPR/Cas9 시스템으로의 인간 TMPRSS3 돌연변이 [c.916G>A (p.A1a306Thr)]의 표적화된 돌연변이:** 기존의 마우스 모델은 선천성 청력 상실 또는 출생후 제12일의 청력의 발생에서의 유모 세포의 퇴행을 초래하는 TMPRSS3 유전자의 완전한 녹아웃을 갖는다 (Fasquelle et al., 2011). 이 실시예는 인간 TMPRSS3 돌연변이를 운반하는 녹-인 마우스의 개발을 기재한다. TMPRSS3에서의 c.916G>A (p.A1a306Thr)는 중국, 독일, 네덜란드, 및 대한민국 청력장애 환자로부터의 상이한 민족의 10종 초과와 패밀리에서 확인된 가장 통상적인 돌연변이이며, 이는 이 돌연변이가 DFN8/DFN10 표현형에 대한 주요한 기여자임을 시사한다 (Chung et al., 2014; Elbracht et al., 2007; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011). 인간 돌연변이를 운반하는 마우스 모델은 harms(Harms) 등의 이전의 연구에서 상세하게 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas9 기법을 사용하여 생성될 것이다 (Harms et al., 2014). 간략하게, 가이드 RNA (gRNA) 설계 도구를 사용하여 관심의 유전자 및 돌연변이에 대한 적절한 gRNA를 선택하며; 최소 예측된 오프-타겟 게놈 부위 편집을 갖는 gRNA가 선택되고, 관심의 게놈 로커스 및 다른 예측된 오프-타겟 게놈 부위를 증폭시키기 위한 프라이머와 함께, 서비스 제공자에 의해 합성될 것이다.

[0088]

일단 확립되면, 마우스를 유전자형분석하고, ABR 및 DPOAE를 사용하여 2, 4, 및 12주령에서 청력 상실에 대해 평가할 것이다. 청력 상실의 지연된 발병으로, ABR 및 DPOAE 시험의 비교는 Tmprss3 기능의 감소가 유모 세포 또는 나선 신경절 기능에 비대칭적으로 영향을 미치는지 여부를 입증할 수 있다. 이는 쉬어러(Shearer) 등에서의 관찰을 고려하여 임상적 개발을 위한 벡터의 선택에 영향을 미칠 것이다 (Shearer et al., 2017). 인간에서는 우세한 표현형이 아니지만, 마우스 돌연변이체는 정상 유모 세포의 미묘한 퇴행을 나타내었다. 전정계의 조직학적 평가 및 로타로드 시험을 사용하여 균형 기능이상에 대해 스크리닝할 것이다. 와우에서의 돌연변이체 Tmprss3의 발현을 정량적 RT-PCR에 의해 측정할 것이다. 결과를 야생형 마우스 및 동형접합체 Tmprss3 c.916G>A에 대해 분석할 것이다. 출생후 제3일, 및 2, 4, 및 12주령 와우의 조직학적 및 면역조직화학적 분석을 수행하여 유모 세포 상실의 패턴을 확인할 것이다. 조직학적 데이터에 기초하여, 선택된 시점을 유모 세포 생존의 전체 마운트 분석을 위해 선택하여 유모 세포 생존의 기저 내지 정점 구배가 있는지를 측정할 것이다. 지시된 경우, 시편을 또한 주사 전자 현미경검사에 의해 평가하여 입체섬모 묶음 형태를 평가할 수 있다. 통계적 분석을 반복 측정용 ANOVA를 사용하여 그래프패드 프리즘(Graphpad Prism) 버전 7에 의해 수행할 것이다. 추정된 동물은 돌연변이체에 대해 시점당 n=10 및 대조군에 대해 n=3을 사용한다.

[0089]

[c.916G>A (p.A1a306Thr)]에 의해 유도된 청력 상실의 시간 과정의 확립은 구체 연구를 수행하기 위한 시점을 설정할 것이다. 성공적인 경우, 이는 또한 편측 전임상 안전성 연구의 시간 과정을 한정할 것이다.

[0090]

표적화된 돌연변이가 마우스에서 완전한 선천성 청력 상실을 초래하는 경우, 유도가능한 녹아웃 마우스를 설계할 수 있다. 인간은 매우 다양한 표현형을 나타내기 때문에, 이는 또한 마우스에서 관찰될 수 있으며, 이는 통계적 분석을 곤란하게 만든다. 구체 실험을 위해, 이는 대조군으로서 대측 비처리된 귀를 사용함으로써 다루어질 수 있다. 교대로, Tmprss3의 역할은 인간 iPSC 모델에서 평가될 수 있다 (실시에 4에 기재된 바와 같음). 청력 상실의 진행은 실험적 관찰이 6월령으로 확장될 것인 경우에 지연될 수 있다.

[0091]

실시에 2 - 청력 상실 여부를 평가하고, 이 마우스 모델에서 TMPRSS3 유전자 요법에 의해 정지되거나 또는 반전될 수 있다

[0092]

유전자를 내이로 전달하는 다양한 벡터가 제안된 바 있다. 보다 작은 유전자의 장기간 전달을 위해, AAV 벡터는 광범위하게 연구된 바 있으며, 안전하며, 폭넓은 범위의 세포로의 전달을 제공한다. 그러나, 외부 유모 세포로의 AAV 전달은 심지어 보다 높은 역가의 벡터에서도 불완전한 것으로 제시된 바 있다. 최근, 내부 및 외부 유모 세포로의 양호한 전달을 제공하는 합성 아테노 연관 바이러스 벡터 AAV2/Anc80이 개발되어 있다. 2가지 상이한 벡터 시스템을 시험할 것인데, 하나는 Tmprss3 기능이 또한 나선 신경절에서 구체될 필요가 있을 수 있다는 잠재성에 기초한다. 청력의 구체를 이들 2가지 벡터 시스템을 사용하여 마우스 모델에서 비교할 것이다. 잠재적인 결과는 AAV2/Anc80의 경우에 빈약한 ABR로의 DPOAE의 구체를 포함하며, 이는 유모 세포 외에도 나선 신경절을 치료할 필요를 지시할 것이다. 간략하게, 벡터를 실시예 1로부터의 결과에 기초하여 청력 상실의 문서화된 발병 전 1 내지 2주에서 후방 반고리관의 반고리관절개부로 전달할 것이다. 로그 배수 차이에서의 3가

지 상이한 농도의 벡터를 미세 펌프를 사용하여 주사할 것이다. 동물에서의 청력을 실시예 1에서 측정된 시점에서 일련의 ABR 및 DPOAE로 평가할 것이다. 3 내지 6월령에서, 동물을 와우의 조직학, 면역조직화학 및 전체 마운트 평가에 의해 유도 세포 생존에 대해 평가할 것이다. 대조군은 GFP만을 발현하는 벡터 (AAV2.hCMV.GFP 또는 AAV2/Anc80.hCMV.GFP)로 처리된 동물로 이루어질 것이다. 마우스가 추가적으로 임의의 전정을 입증하는 경우, 이들을 또한 전정계 조직학 및 로타로드 시험에 의해 평가할 것이다. 추가적으로, Tmprss3 요법의 독성을 야생형 마우스를 Tmprss3을 발현하는 둘 다의 벡터로 형질감염시킴으로써 평가할 것이다. 통계적 분석을 반복 측정용 ANOVA를 사용하여 그래프패드 프리즘 버전 7에 의해 수행할 것이다. 결과를 벡터 역가당 청력에 기초하여 평가할 것이다. 추정된 동물은 돌연변이체에 대해 시점당 n=60 (2가지 벡터, 3가지 농도의 벡터; 조직학 및 전체 마운트 평가) 및 대조군에 대해 n=3을 사용할 것이다. 과다발현 연구는 2가지 벡터로 n=5 동물을 사용할 것이다.

[0093] Tmprss3 유전자 요법은 청력 상실의 진행을 예방할 것으로 예상된다. 청력 뿐만 아니라 투여량 효과를 구제하는 상이한 벡터에서의 차이가 있을 수 있다.

[0094] 청력의 구제가 불완전한 것으로 밝혀지는 경우, 상이한 벡터가 설계될 수 있다. 잠재적으로 Tmprss3의 발현은 상이한 강도 프로모터를 사용하거나, 또는 Tmprss3의 조절 영역을 포함시킴으로써 최적화될 필요가 있을 수 있다. 잠재적으로 Tmprss3 유전자 요법은 극초기 시점에서 내이에 제공되어야 할 수 있다.

[0095] **AAV2 TMPRSS3 전달 시스템의 평가:** 인간 CMV (hCMV) 프로모터에 의해 유도된 인간 TMPRSS3 (BC074847)을 AAV2 벡터 시스템 내로 클로닝하였다. 벡터를 염화세슘 구배에 걸쳐 정제하였다. 역가를 pPCR ( $1.1 \times 10^{13}$  GC/ml)에 의해 측정하였다. 합성 및 정제 후, 벡터를 20  $\mu$ l 부피로 분취하고, -80°C에서 5% 글리세롤 중 PBS에서 저장하였다.

[0096] **TMPRSS3 전달을 위한 검정 시스템의 개발:** 벡터 기능의 효율을 평가하기 위해, 본 발명자들은 TMPSS3 생산을 검정하기 위한 시스템을 개발하기를 원했다. 이는 또한 나중에 상이한 프로모터를 갖는 벡터 설계를 평가하고, 벡터 안정성을 평가하는 기능을 할 것이다. 세포주는 상이한 AAV 혈청형으로 형질감염 효율의 차이를 갖는다 (Ellis et al., 2013). 다양한 세포주를 AAV2로 형질감염되는 능력에 대해 스크리닝하였다. 불행하게도, AAV2로 형질감염가능한 통상적으로 사용되는 세포주 중 많은 것은 천연 TMPRSS3을 발현한다. RNAseq에 의해 TMPRSS3을 발현하지 않는 것으로 확증된 바 있는 다양한 인간 암 세포주를 스크리닝하였다. 1차 소아 비인두 혈관섬유종 (JNA) 세포는 AAV2hcmv.gfp로 형질감염되는 것으로 밝혀졌다. 세포를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지하면서 DMEM 및 10% 열 불활성화된 소 태아 혈청 (FBS) (인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스버드)으로 보충된 T-75 플라스크에 플레이트하였다. 배지 교환은 48시간마다 일어났다. 세포가 P4에 도달하고, 90-100% 융합성이었을 경우, 3 ml의 0.05% 트립신을 첨가하여 세척하고, 흡인한 후, 3 ml의 트립신을 첨가하여 세포를 제거하였다. 인큐베이션은 37°C에서 3-5분 동안 일어났다. 트립신을 10% FBS/DMEM으로 중화시켰다. 세포의 용액을 15 ml 원뿔형 바이알에서 수집하고, 1200 rpm에서 5분 동안 4°C에서 스펀시켰다. 그 후, 세포를 10 ml의 10% FBS/DMEM에 현탁시키고, 플레이트하여 24시간 부착되게 하였다. AAV2-TMPRSS3의 형질도입을 500  $\mu$ L의 배지 중 2  $\mu$ L/ml 농도의 AAV2.hcmv.TMPRSS3으로 세포를 시딩하는 4 웰 챔버화된 밀리셀 EZ 슬라이드(Millicell EZ Slide) (PEZGS0416, 밀리포어시그마(MilliporeSigma), 미국 매사추세츠주 벨링턴) 상에 세포를 플레이트함으로써 수행하였다. 세포 배지를 24시간 후에, 그 후 세포를 분석할 때까지 형질감염 후 48시간마다 교환하였다.

[0097] **AAV2-TMPRSS3 형질감염된 세포의 면역세포화학:** 형질감염된 JNA 세포를 처음에 PBS로 세척한 후, PBS 중 4% 파라포름알데히드로 실온에서 10분 동안 고정시켰다. 세포를 차단하고, 1% 트리톤-X 100 / 1% 소 혈청 알부민 / 10% 정상 혈청으로 실온에서 1시간 동안 침투화하였다. 1차 항체 (1:100, ab167160, 압캠, 미국 매사추세츠주 캠프리지 / 1:50, GTX81644, 진텍스(GeneTex), 미국 캘리포니아주 엘바인)를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 PBS로 세정한 후, 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor) 488 (1:500, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스버드)로 표지하였다. 이들 세포를 PBS로 추가로 세척한 후, 0.2  $\mu$ g/ml 4',6-디아미디노-2-페닐인돌을 갖는 프로롱 골드(ProLong Gold) 안티페이드 마운팅 배지 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스버드)를 사용하여 염색하였다.

[0098] **AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP의 구축.** 본 발명자들은 바이러스로 감염된 세포가 GFP 발현에 의해 추적될 수 있도록 인간 TMPRSS3 전장 cDNA를 eGFP 마커를 갖는 AAV/Anc80 벡터 내로 클로닝할 것이다. 본 발명자들은 서열이 확인된 인간 TMPRSS3 전장 cDNA를 얻었다. 본 발명자들은 클로닝을 위해 AAV/Anc80 벡터를 사용할 것이다. 이전에 인간 ISL1 유전자를 동일한 벡터 내로 클로닝하고, AAV/Anc80-ISL1-IRES-GFP를 각각 와우개창술 및 받고



리관절개술에 의해 신생아 및 성체 마우스 내이 내로 주사하였다. AAV/Anc80은 유모 세포 손상 또는 청력 상실을 유발하지 않고, 신생아 및 성체 유모 세포 내로의 유전자 전달을 효율적으로 매개한다. 트랜스진의 추가의 발현은 시간 경과에 따라 유지되며, 이는  $Tmprss3^{-/-}$  유모 세포에서의 TMPRSS3 유전자를 발현하여 유전자 발현을 복원하고, 청력을 회복하려는 본 발명자들의 목표에 이상적이다 (Shu et al., 2016; Tao et al., 2017).

[0099] AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP의 벡터 내로의 TMPRSS3의 클로닝 후, 벡터를  $10^{12}$ 의 바이러스 역가를 달성하는 것을 목표로 증폭시키고, 패키징할 것이다. 본 발명자들은 먼저 인간 세포를 감염시킴으로써 AAV/Anc80-TMPRSS3-IRES-GFP 바이러스를 시험할 것이다. 본 발명자들은 항-TMPRSS3 항체로의 면역표지화를 수행하고, 이를 GFP와 공동-국재화시켜, TMPRSS3 및 GFP가 동일한 세포에서 발현되었는지를 조사할 것이다. 생체내 연구를 위해, 본 발명자들은 벡터를 야생형 신생아 내이 내로 와우개창술에 의해 및 성체 내이 내로 반고리관절개술에 의해 각각 주사함으로써 시험할 것이다. 주사 후 2주에, 마우스 와우를 수확하여 GFP 신호가 유모 세포에 국한되는지를 조사할 것이다. 본 발명자들의 이전의 연구에서, 본 발명자들은 100% 내부 유모 세포에서 강한 GFP 발현 및 외부 유모 세포의 95% 초과에서 중등도의 발현을 관찰하였다. 따라서, 본 발명자들은 TMPRSS3 유전자로 유사한 발현 패턴을 관찰할 것으로 예상한다.

[0100] AAV/Anc80-TMPRSS3-GFP를 이어서 와우개창술에 의해  $Tmprss3^{-/-}$  와우 내로 주사할 것이며, 청력은 1개월 후에 연구될 것이다. 본 발명자들은 비주사된 대조군 내이에 비해 주사된 내이에서 보다 양호한 청력을 볼 것으로 예상한다. 이는 특히  $Tmprss3^{-/-}$  마우스가 최중증 조기 발병 청력 상실을 앓고 있는 경우에 명백할 것이다.  $Tmprss3^{-/-}$ 에서의 청력 상실의 지연된 발병을 갖는 진행성인 경우, 본 발명자들은 나중 단계, 예를 들어 2 및 3 월령에서 청력 구제를 보기 시작할 수 있다. 청력 연구는 ABR 및 DPOAE에 의해 수행될 것이다. ABR 및 DPOAE 역치가 주사된 귀에서 임의의 주파수에서 유의하게 더 낮은 경우, 이는  $Tmprss3^{-/-}$  마우스에서의 AAV-매개된 청력 구제의 지표이다. 본 발명자들은 6개월 동안 청력 구제의 진행을 추적하여, 청력 회복이 지속되는지를 측정할 것이다.

[0101]  $Tmprss3^{-/-}$  마우스에서, 유모 세포는 궁극적으로 사멸할 것이다. AAV-매개 유전자 전달로, 유모 세포 기능의 회복은 가능하게는 시간 경과에 따른 유모 세포 생존을 초래할 것이며, 이는 시간 경과에 따른 와우의 길이를 따른 유모 세포 카운팅에 의해 측정될 것이다. 본 발명자들은 비주사된 대조군 와우에 비해 주사된 와우에서 유의하게 더 많은 유모 세포를 볼 것으로 예상한다. 청력 결과 및 세포 생존의 비교는 어느 것이 최적 벡터이고 구제 요법을 위한 벡터의 용량인지를 결정할 것이다.

[0102] 실시예 3 - TMPRSS3

[0103] **TMPRSS3-돌연변이체 마우스 모델의 개발.** 인간 상태를 가능한 한 가깝게 닮은 마우스 모델의 개발은 장래의 요법에 대한 핵심이다. 녹-아웃  $Tmprss3$  마우스 모델은 상업적 판매자로부터 이용가능하며, 이들 실시예에 기재된 실험에 사용될 수 있지만, 상기 기재된 바와 같이 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 인간 돌연변이를 갖는 마우스 모델을 개발하는 것이 보다 적절할 것이다. 모델은 인간 돌연변이가 인간에서와 같이 마우스에서 청력 상실을 유발함을 제시할 것으로 예상되며, 이는 모델을 치료를 위해 연구되기에 가치있게 만든다. 트랜스제닉 마우스 계통을 제조하는 방법은 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 중요하게는, 마우스 모델을 생성하는 시간은 단지 수 년 전에 평균적으로 2년에서 CRISPR/Cas9 기술의 사용으로 오늘날 수 개월로 상당히 단축된 바 있다. 따라서, 마우스 모델을 제조하는데 걸리는 시간은 더 이상 속도-제한 인자가 아니다. 본 발명자들은 본 발명자들의 연구를 위해 인간 돌연변이를 운반하는 TMPRSS3 마우스 모델을 생성할 것을 제안하고 있다. TMPRSS3 녹-아웃 마우스에서, 유모 세포는 사멸하고, 마우스는 최중증 청력 상실을 나타낸다.  $Tmprss3$  녹-인 마우스 모델의 생성 후, 본 발명자들은 ABR 및 DPOAE에 의해 유모 세포의 생존 및 청력 상실을 연구할 것이다. 마우스 모델이 유모 세포의 상실의 진행성 청력 상실을 나타내는 경우, 이는 본 발명자들이 인간 DFNB8을 위한  $Tmprss3$  마우스 모델을 생성하였다는 입증이다.

[0104] **유전자 요법을 위한 AAV-TMPRSS3을 제조하기 위해.** 본 발명자들은 AAV-매개 유전자 요법을 사용하여  $Tmprss3$  돌연변이체 마우스를 치료할 것이다. 본 발명자들은 연구를 위해 2가지 AAV 벡터 (Anc80 및 AAV2)를 확인하였지만, 다른 발현 벡터, 예컨대 아데노바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 다른 아데노-연관 바이러스 벡터, 예컨대 AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6,

AAV7 또는 AAV8은 또한 시험될 수 있다. Anc80 및 AAV2 둘 다는 정상 청력에 유해하게 영향을 미치지 않고 포유동물 신생아 유모 세포 내로 유전자를 전달하는 높은 효율을 갖는다. 또한, 둘 다는 정상 청력에 영향을 미치지 않고 성체 마우스 유모 세포 내로 유전자를 전달하는데 사용될 수 있는 것으로 최근에 제시되었다 (Zinn, E. et al., *In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector*, *Cell Rep.* 2015 Aug 11;12(6):1056-68; 및 Askew, C. et al., *Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice*, *Sci Transl Med.* 2015 Jul 8;7(295):295ra108). 본 발명자들은 인간 TMPRSS3 cDNA를 벡터 내로 클로닝하여 AAV-TMPRSS3 바이러스를 제조할 것이다. 본 발명자들은 TMPRSS3이 시험관내 배양 시스템을 사용하여 제조됨을 제시하기 위한 연구를 수행할 것이다. 확증 후, AAV-TMPRSS3을 신생아 야생형 마우스 내이 내로 주사하여, 이것이 내이의 세포 분석에 의해 및 청력 연구 (ABR 및 DPOAE)에 의해 제시된 유해 효과를 갖지 않음을 제시할 것이다.

[0105] **청력의 복원에서의 AAV-TMPRSS3의 연구.** 본 발명자들은 AAV-TMPRSS3을 신생아 *Tmprss3* 녹-인 돌연변이체 마우스 내이 내로 주사할 것이다. 청력 시험, 세포 및 분자 연구 및 장기간 효과를 포함할 것인 주사된 및 AAV-GFP로 주사된 대조군 마우스에 대한 분석을 수행할 것이다. 세포 수준에서, 본 발명자들은 AAV-TMPRSS3이 1월령에서 유모 세포 생존을 촉진시키는지를 측정할 것이다. AAV-GFP로 주사된 대조군 돌연변이체 귀에서, 본 발명자들은 이 시점에서 유모 세포의 상실을 볼 것으로 예상된다. 대조적으로, 본 발명자들은 AAV-TMPRSS3 주사된 유모 세포가 생존하는 것을 볼 것으로 예상된다. 본 발명자들은 보다 양호한 청력 회복을 위해 주사 절차 (와우 개창술, 정원창 막, 반고리관절개술) 및 용량을 최적화할 것이다. 중요하게는, 본 발명자들은 성체 (1-6월령) 마우스에서 주사를 수행하고, 청력 회복을 평가할 것이다. 성체 주사 결과를 신생아 결과와 비교할 것이고, 이는 본 발명자들에게 개입이 여전히 유효한 시간 창에 대해 알려줄 것이다.

[0106] 실시예 4 - 환자 유도된 만능 줄기 세포 (iPS) 세포로부터 유래된 유모 세포의 연구

[0107] 연구의 한 가지 중요한 측면은 본 발명자들의 전략이 인간 유모 세포로 작동함을 입증하는 것이다. 인간 측두골이 연구에 이용가능하지 않기 때문에, 본 발명자들은 대신 환자 섬유모세포 뿐만 아니라 대조군 패밀리 구성원 섬유모세포를 사용하여 환자 iPS 세포주를 확립할 것이다. 섬유모세포를 가장 빈번한 돌연변이를 갖는 환자로부터 수확할 것이고, iPS 세포주를 확립할 것이다. iPS 세포주를 유모 세포를 포함하는 내이 세포로 분화시킬 것이다. 배양 시스템으로, AAV-TMPRSS3을 사용하여 iPS-유래 유모 세포를 감염시킬 것이다. 감염된 유모 세포를 패치 클램핑에 의해 생존 및 유모 세포 형질도입에 대해 연구할 것이다. 본 발명자들은 비감염된 및 비-처리된 대조군 유모 세포에 비해 개선된 유모 세포 생존 및 유모 세포 기능을 볼 것으로 예상된다. 연구는 인간 유모 세포에서의 AAV-TMPRSS3 감염 및 TMPRSS3 유전자의 발현의 효율을 평가하는 기회를 제공할 것이다. 이러한 성취는 결합성 인간 유모 세포가 AAV-TMPRSS3으로 치료될 수 있으며, 이는 이를 장래의 임상적 연구를 향한 하나의 주요한 단계로 만들 것의 입증이다.

[0108] 실시예 5 - LOXHD1

[0109] **LOXHD1-돌연변이체 마우스 모델의 개발.** 인간 상태를 가능한 한 가깝게 닮은 마우스 모델의 개발은 장래의 요법에 대한 핵심이다. 녹-아웃 LOXHD1 마우스 모델은 상기 기재된 바와 같이 청력 상실을 유발하는 것으로 공지된 인간 돌연변이를 갖는 모델을 개발하는데 적절할 것이다. 모델은 인간 돌연변이가 인간에서와 같이 마우스에서 청력 상실을 유발함을 제시할 것으로 예상되며, 이는 모델을 치료를 위해 연구되기에 가치있게 만든다. 트랜스제닉 마우스 계통을 제조하는 방법은 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 중요하게는, 마우스 모델을 생성하는 시간은 단지 수 년 전에 평균적으로 2년에서 CRISPR/Cas9 기술의 사용으로 오늘날 수 개월로 상당히 단축된 바 있다. 따라서, 마우스 모델을 제조하는데 걸리는 시간은 더 이상 속도-제한 인자가 아니다. 본 발명자들은 본 발명자들의 연구를 위해 인간 돌연변이를 운반하는 LOXHD1 마우스 모델을 생성할 것을 제안하고 있다. LOXHD1 녹-아웃 마우스에서, 유모 세포는 사멸하고, 마우스는 최종청력 청력 상실을 나타낸다. LOXHD1 녹-인 마우스 모델의 생성 후, 본 발명자들은 ABR 및 DPOAE에 의해 유모 세포의 생존 및 청력 상실을 연구할 것이다. 마우스 모델이 유모 세포의 상실의 진행성 청력 상실을 나타내는 경우, 이는 본 발명자들이 인간 DFNB77을 위한 LOXHD1 마우스 모델을 생성하였다는 입증이다.

[0110] **유전자 요법을 위한 AAV-LOXHD1을 제조하기 위해.** 본 발명자들은 AAV-매개 유전자 요법을 사용하여 LOXHD1 돌연변이체 마우스를 치료할 것이다. 본 발명자들은 연구를 위해 2가지 AAV 벡터 (Anc80 및 AAV2)를 확인하였지만, 다른 발현 벡터, 예컨대 아데노바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 다른 아데노-연관 바이러스 벡터, 예컨대 AAV5, AAV6,

AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8은 또한 시험될 수 있다. Anc80 및 AAV2 둘 다는 정상 청력에 유해하게 영향을 미치지 않고 포유동물 신생아 유모 세포 내로 유전자를 전달하는 높은 효율을 갖는다. 또한, 둘 다는 정상 청력에 영향을 미치지 않고 성체 마우스 유모 세포 내로 유전자를 전달하는데 사용될 수 있는 것으로 최근에 제시되었다 (Zinn, E. et al. (2015) In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Rep.* 11;12(6):1056-68; 및 Askew, C. et al. (2015) Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mic. *Sci Transl Med.* 7(295):295ra108). 본 발명자들은 인간 LOXHD1 cDNA를 벡터 내로 클로닝하여 AAV-LOXHD1 바이러스를 제조할 것이다. 본 발명자들은 LOXHD1이 시험관내 배양 시스템을 사용하여 제조됨을 제시하기 위한 연구를 수행할 것이다. 확증 후, AAV-LOXHD1을 신생아 야생형 마우스 내이 내로 주사하여, 이것이 내이의 세포 분석에 의해 및 청력 연구 (ABR 및 DPOAE)에 의해 제시된 유해 효과를 갖지 않음을 제시할 것이다.

[0111] **청력의 복원에서의 AAV-LOXHD1의 연구.** 본 발명자들은 AAV-LOXHD1을 신생아 LOXHD1 녹-인 돌연변이체 마우스 내이 내로 주사할 것이다. 청력 시험, 세포 및 분자 연구 및 장기간 효과를 포함할 것인 주사된 및 AAV-GFP로 주사된 대조군 마우스에 대한 분석을 수행할 것이다. 세포 수준에서, 본 발명자들은 AAV-LOXHD1이 1월령에서 유모 세포 생존을 촉진시키는지를 측정할 것이다. AAV-GFP로 주사된 대조군 돌연변이체 귀에서, 본 발명자들은 이 시점에서 유모 세포의 상실을 볼 것으로 예상한다. 대조적으로, 본 발명자들은 AAV-LOXHD1 주사된 유모 세포가 생존하는 것을 볼 것으로 예상한다. 본 발명자들은 보다 양호한 청력 회복을 위해 주사 절차 (와우개창술, 정원창 막, 반고리관절개술) 및 용량을 최적화할 것이다. 중요하게는, 본 발명자들은 성체 (1-6월령) 마우스에서 주사를 수행하고, 청력 회복을 평가할 것이다. 성체 주사 결과를 신생아 결과와 비교할 것이고, 이는 본 발명자들에게 개입이 여전히 유효한 시간 창에 대해 알려줄 것이다.

[0112] **환자 유도된 만능 줄기 세포 (iPS) 세포로부터 유래된 유모 세포의 연구.** 연구의 한 가지 중요한 측면은 본 발명자들의 전략이 인간 유모 세포로 작동함을 입증하는 것이다. 인간 측두골이 연구에 이용가능하지 않기 때문에, 본 발명자들은 대신 환자 섬유모세포 뿐만 아니라 대조군 패밀리 구성원 섬유모세포를 사용하여 환자 iPS 세포주를 확립할 것이다. 섬유모세포를 가장 빈번한 돌연변이를 갖는 환자로부터 수확할 것이고, iPS 세포주를 확립할 것이다. iPS 세포주를 유모 세포를 포함하는 내이 세포로 분화시킬 것이다. 배양 시스템으로, AAV-LOXHD1을 사용하여 iPS-유래 유모 세포를 감염시킬 것이다. 감염된 유모 세포를 패치 클램핑에 의해 생존 및 유모 세포 형질도입에 대해 연구할 것이다. 본 발명자들은 비감염된 및 비-처리된 대조군 유모 세포에 비해 개선된 유모 세포 생존 및 유모 세포 기능을 볼 것으로 예상한다. 연구는 인간 유모 세포에서의 AAV-LOXHD1 감염 및 LOXHD1 유전자의 발현의 효율을 평가하는 기회를 제공할 것이다. 이러한 성취는 결합성 인간 유모 세포가 AAV-LOXHD1로 치료될 수 있으며, 이는 이를 장래의 임상적 연구를 향한 하나의 주요한 단계로 만들 것의 입증이다.

[0113] 실시예 6 - 예시적인 방법

[0114] **ABR 측정:** ABR 역치를 인텔리전트 히어링 시스템스 스마트 EP 프로그램(Intelligent Hearing Systems Smart EP program) (IHS, 미국 플로리다주 마이애미)을 사용하여 기록하였다. 동물을 상기 기재된 바와 같이 마취시키고, 가열 패드 (37°C) 상에서 따뜻하게 유지하였다. 바늘 전극을 볼텍스 상 (+), 좌이 뒤 (-) 및 반대 귀 뒤 (그라운드)에 정치하였다. 단음을 고주파수 변환기를 사용하여 500  $\mu$ s의 기간으로 4, 8, 16 및 32 kHz에서 제시하였다. 기록을 100K와 동등한 총 획득을 사용하여 및 고 및 저-패스 필터에 대해 100 Hz 및 15 kHz 설정을 사용하여 수행하였다. 최소 128 스위프를 90 dB SPL에서 제시하였다. SPL은 10 dB 단계로 감소되었다. 역치 수준 부근에서, 1024회 이하의 제시를 사용한 5 dB SPL 단계를 각각의 주파수에서 수행하였다. 역치는 파동 중 적어도 하나가 기록의 2회 이상의 반복에서 확인될 수 있는 SPL로서 정의되었다. 작동전 역치를 제1 작동 전에 측정하고, 최종 작동후 역치를 동물을 희생시키기 전에 측정하였다. 본 발명자들은 마우스를 각각의 벡터 전달 전에 및 최종 벡터 전달 후 3일에 시험하였다.

[0115] **DPOAE 측정:** OHC 상의 기능적 손상을 평가하기 위해, 변조 이음향 방사 (DPOAE) 및 입력/출력 기능 (I/O 기능)을 상기 기재된 IHS 프로그램을 사용하여 양측 상에 기록하였다. 변조를 IHS 고주파수 변환기를 사용하여 2 kHz 내지 32 kHz의 순음에 대해 측정하였다. 에티모틱 10B+ 프로브를 외이도에 삽입하였다. L1 수준을 65 dB로 설정하였다. L2 수준을 55 dB로 설정하였다. 주파수를 16 스위프를 사용하여 1.22의 F2-F1 비로 획득하였다. I/O 기능을 16 kHz의 주파수에서 획득하였다. 65 dB SPL 내지 31 dB SPL의 범위의 9가지 자극 수준을 5 dB 단계로 사용하였다. 마우스를 각각의 벡터 전달 전에 및 최종 벡터 전달 후 3일에 시험하였다.

- [0116] **내이 내로의 TMPRSS3 발현 AAV의 전달:** 모든 절차는 적절한 동물 관리 및 사용 위원회 (Animal Care and Use Committee)에 의해 검토되고, 승인되었다. 성체 마우스를 염화나트륨 0.9% 중 케타민 (150 mg/kg), 크실로카인 (6 mg/kg) 및 아세프로마진 (2 mg/kg)의 혼합물의 i. p. 주사로 마취시켰다. 벡터를 후방 반고리관으로 전달하였다. 등쪽 이후방 절개를 수행하고, 후방 또는 측면 반고리관을 노출시켰다. 마이크로드릴을 사용하여, 반고리관절개부를 생성하여, 외림프 공간을 노출시켰다. 이어서 0.5  $\mu$ l의 벡터를 0.1  $\mu$ l 눈금 및 36게이지 바늘을 갖는 해밀톤 마이크로시린지를 사용하여 주사하였다. 반고리관절개부를 골 왁스로 밀봉하고, 동물을 회복시켰다.
- [0117] **로타로드 (RR) 훈련 및 마우스의 시험을 위한 프로토콜:** 훈련을 위해, 마우스를 RR 로타로드 (ENV-575M, 메드 어소시에이티드 인크.(Med Associated Inc.), 미국 조지아주) 상에 한 번에 하나씩 정치하고, 프로그램을 4-40 rpm의 속도에서 개시하였다. 마우스가 제1 슬롯에서 떨어지고/점프하고/정지하고, 회전할 때, 이들을 집어서, 프로그램을 정지시키지 않고 연속 슬롯 내로 정치한다. 처리 후, 마우스를 RR 상에, 각각의 슬롯에 한 마리의 마우스를 정치하고, 프로그램을 개시한다. 마우스가 떨어질 때, 이들을 집어서, 동물 하우스링 유닛에 정치하여 다른 마우스가 프로그램을 종료할 때까지 기다린다.
- [0118] **참고문헌**
- Akil, O., Seal, R. P., Burke, K., Wang, C., Alemi, A., During, M., ... Lustig, L. R. (2012). Restoration of Hearing in the VGLUT3 Knockout Mouse Using Virally Mediated Gene Therapy. *Neuron*, 75(2), 283–293.
- Askew, C., Rochat, C., Pan, B., Asai, Y., Ahmed, H., Child, E., ... Holt, J. R. (2015). Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice. *Science Translational Medicine*, 7(295), 295ra108.
- Chien, W. W., Isgrig, K., Roy, S., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., May, L. A., ... Cunningham, L. L. (2016). Gene Therapy Restores Hair Cell Stereocilia Morphology in Inner Ears of Deaf Whirler Mice. *Molecular Therapy*, 24(1), 17–25.
- Chung, J., Park, S. M., Chang, S. O., Chung, T., Lee, K. Y., Kim, A. R., ... Choi, B. Y. (2014). A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. *Journal of Molecular Medicine*, 92(6), 651–663.
- Colletti, V., Mandalà, M., Carner, M., Barillari, M., Cerini, R., Pozzi Mucelli, R., & Colletti, L. (2010). Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear. *Audiology & Neuro-Otology*, 15(6), 353–63.
- Elbracht, M., Senderek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., & Zerres, K. (2007). Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel TMPRSS3 mutations in German siblings. *Journal of Medical Genetics*, 44(6), e81.
- Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Barker, J. C., Connelly, J. P., Steininger, R. J., & Porteus, M. H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology Journal*, 10(1), 74.
- Fan, D., Zhu, W., Li, D., Ji, D., & Wang, P. (2014). Identification of a novel homozygous mutation, TMPRSS3: C.535G>A, in a tibetan family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE*, 9(12), 1–13.
- Fasquelle, L., Scott, H. S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyard, S., ... Delprat, B. (2011). Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383–17397.
- [0119]



- Gao, X., Yuan, Y. Y., Wang, G. J., Xu, J. C., Su, Y., Lin, X., & Dai, P. (2017). Novel mutations and mutation combinations of TMPRSS3 cause various phenotypes in one Chinese family with autosomal recessive hearing impairment. *BioMed Research International*, 2017.
- Geng, R., Omar, A., Gopal, S. R., Chen, D. H.-C., Stepanyan, R., Basch, M. L., ... Alagramam, K. N. (2017). Modeling and Preventing Progressive Hearing Loss in Usher Syndrome III. *Scientific Reports*, 7(1), 13480.
- György, B., Sage, C., Indzhykulyan, A. A., Scheffer, D. I., Brisson, A. R., Tan, S., ... Maguire, C. A. (2017). Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Molecular Therapy*, 25(2), 379–391.
- Harms, D. W., Quadros, R. M., Seruggia, D., Ohtsuka, M., Takahashi, G., Montoliu, L., ... Gurumurthy, C. B. (2014). Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. In *Current Protocols in Human Genetics* (p. 15.7.1-15.7.27). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Isgrig, K., Shteamer, J. W., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., Fitzgerald, T. S., Vijayakumar, S., ... Chien, W. W. (2017). Gene Therapy Restores Balance and Auditory Functions in a Mouse Model of Usher Syndrome. *Molecular Therapy*, 25(3), 780–791.
- Jolly, C., Mistrik, P., Rajan, G., Green, K., Staecker, H., Helbig, S., & Usami, S.-I. (2012). New trends with cochlear implants and atraumaticity demonstrated by deep electrode insertion and hearing preservation. *Practica Oto-Rhino-Laryngologica*, (SUPPL. 132).
- Kilpatrick, L. A., Li, Q., Yang, J., Goddard, J. C., Fekete, D. M., & Lang, H. (2011). Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear. *Gene Therapy*, 18(6), 569–578.
- Landegger, L. D., Pan, B., Askew, C., Wassmer, S. J., Gluck, S. D., Galvin, A., ... Vandenberghe, L. H. (2017). A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. *Nature Biotechnology*, 35(3), 280–284.
- Miyagawa, M., Nishio, S.-Y., & Usami, S.-I. (2016). A Comprehensive Study on the Etiology of Patients Receiving Cochlear Implantation With Special Emphasis on Genetic Epidemiology. *Otology & Neurotology*, 37(2), e126–e134.
- Preciado, D. a, Lawson, L., Madden, C., Myer, D., Ngo, C., Bradshaw, J. K., ... Greinwald, J. H. (2005). Improved diagnostic effectiveness with a sequential diagnostic paradigm in idiopathic pediatric sensorineural hearing loss. *Otology & Neurotology : Official Publication of the American Otological Society, American*



*Neurotology Society [and] European Academy of Otolology and Neurotology*, 26(4), 610–5.

Santiago-Ortiz, J. L., & Schaffer, D. V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy.

Shearer, A. E., Eppsteiner, R. W., Frees, K., Tejani, V., Sloan-Heggen, C. M., Brown, C., ... Smith, R. J. H. (2017). Genetic variants in the peripheral auditory system significantly affect adult cochlear implant performance. *Hearing Research*, 348, 138–142.

Shu, Y., Tao, Y., Li, W., Shen, J., Wang, Z., & Chen, Z.-Y. (2016). Adenovirus Vectors Target Several Cell Subtypes of Mammalian Inner Ear *In Vivo*. *Neural Plasticity*, 2016, 1–8.

Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., ... Chen, Z.-Y. (2016a). Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes. *Human Gene Therapy*, 27(9), 687–699.

Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., ... Chen, Z.-Y. (2016b). Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes. *Human Gene Therapy*, 27(9), 687–699.

Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., ... Smith, R. J. H. (2016). Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Human Genetics*, 135(4), 441–450.

Suzuki, J., Hashimoto, K., Xiao, R., Vandenberghe, L. H., & Liberman, M. C. (2017). Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction. *Scientific Reports*, 7, 45524.

Tao, Y., Huang, M., Shu, Y., Ruprecht, A., Wang, H., Tang, Y., ... Chen, Z.-Y. (2017). Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors in Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes without Auditory Dysfunction. *Human Gene Therapy*, hum.2017.120.

Wang, Y., Sun, Y., Chang, Q., Ahmad, S., Zhou, B., Kim, Y., ... Lin, X. (2013). Early postnatal virus inoculation into the scala media achieved extensive expression of exogenous green fluorescent protein in the inner ear and preserved auditory brainstem response thresholds. *The Journal of Gene Medicine*, 15(3–4), 123–133.

Weegerink, N. J. D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., Granneman, S., ... Kunst, H. P. M. (2011). Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(6), 753–766.

Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(1), 80–6.

Xia, L., Yin, S., & Wang, J. (2012). Inner Ear Gene Transfection in Neonatal Mice Using Adeno-Associated Viral Vector: A Comparison of Two Approaches. *PLoS ONE*, 7(8), e43218.

본 발명의 하나 이상의 실시양태가 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변형은 본 발명의 정신 및 범위로 부터 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 다른 실시양태는 하기 청구범위의 범위 내에 있다.

## 도면

### 도면1

```

1      cggatgtcag aggtcctgaa atagtcacca tgggggaaaa tgatccgcct gctgttgaag
61     ccccttctc attccgatcg ctttttggcc ttgatgattt gaaaataagt cctgttgcac
121    cagatgcaga tgctgttgct gcacagatcc tgtcactgct gccattgaag ttttttccaa
181    tcatcgatcat tgggatcatt gcattgatat tagcactggc cattgggtctg ggcatccact
241    tcgactgctc agggaagtac agatgtcgct catcctttaa gtgtatcgag ctgatagctc
301    gatgtgacgg agtctcggat tgcaaagacg gggaggacga gtaccgctgt gtccgggtgg
361    gtggtcagaa tgccgtgctc cagggtgttca cagctgcttc gtggaagacc atgtgctccg
421    atgactggaa gggtcactac gcaaatgttg cctgtgcccc actgggttcc ccaagctatg
481    taagttcaga taacctcaga gtgagctcgc tggaggggca gttccgggag gagtttgtgt
541    ccatcgatca cctcttgcca gatgacaagg tgactgcatt acaccactca gtatatgtga
601    gggaggggatg tgccctctggc cagctgggtta ccttgacgtg cacagcctgt ggtcatagaa
661    ggggctacag ctacgcacgc gtgggtggaa acatgtcctt gctctcgagc tggccctggc
721    aggccagcct tcagttccag ggctaccacc tgtgcggggg ctctgtcatc acgcccctgt
781    ggatcatcac tgtgcacac tgtgtttatg acttgtaacct cccaagtca tggaccatcc
841    aggtgggtct agtttccctg ttggacaatc cagcccatc ccacttggtg gagaagattg
901    tctaccacag caagtacaag ccaaagaggc tgggcaatga catcgccctt atgaagctgg
961    ccggggccact caggttcaat gaaatgatcc agcctgtgtg cctgccaac tctgaagaga
1021   acttccccga tggaaaagtg tgctggacgt caggatgggg gccacagag gatggagcag
1081   gtgacgcctc cctgtcctg aaccacgcgg ccgtcccttt gatttccaac aagatctgca
1141   accacaggga cgtgtacggt ggcatcatct cccctccat gctctgcgcg ggctacctga
1201   cgggtggcgt ggacagctgc caggggggaca gcggggggcc cctggtgtgt caagagagga
1261   ggctgtggaa gttagtggga gcgaccagct ttggcatcgg ctgcgcagag gtgaacaagc
1321   ctggggtgta caccctgtgc acctccttcc tggactggat ccacgagcag atggagagag
1381   acctaaaaac ctgaaaagga aggggacaag tagccacct (SEQ ID NO:1)

```

### 도면2

```

MGENDPPAVEAPFSFRSLFGLDDLKISPVAPDADAVAAQILSLPLKFFPIIVIGIILALILALAIGLGIHFD
CSGKYRCRSSFKCIELIARCDGVSDCKDGEDEYRCVRVGGQNAVLQVFTAASWKTMCSDDWKGHYANVACAQ
LGFPSYVSSDNLRVSSLEGQFREEFVSI DHLLPDDKVTALHHSVYVREGCASGHVVTLQCTACGHRRGYSSR
IVGGNMSLLSQWPWQASLQFQGYHL CGGSVITPLWIIITAAHCYDLYLPKSWTIQVGLVSLLDNPA PSHLVE
KIVYHISKYKPKRLGNDIALMKLAGPLTFNEMI QPVCLPNSEENFPDGKVCWTSWGATEDGAGDASPVLNHA
AVPLISNKICNHRDVYGGIISPSMLCAGYLTGGVDS CQGD SGGPLVCQERRLWKLVGATSF GIGCAEVNKP G
VYTRVTSFLDWIHEQMERDLKT (SEQ ID NO:2)

```

도면3

```

1      gtagaaccga ggtgggggct tgggaaggc acaccaggaa gagcaggctg cgcctcacc
61     tccagtggag acagagggca gacattctct ttggagcaca cctcaggcta aatggcaaaa
121    ccccaatctc aagtgaactt catggaacta ggggattgtc tcaattctcc agtggattga
181    ggcagtgtct cctctgttct ctatgaaatg acggtgtgga caggggatgt ggttggcggg
241    ggcactgact ccaacatctt catgaccctc tacggcatca acgggagcac agaggagatg
301    cagctggaca aaaagaaaagc caggtttgag cgggagcaga acgacacctt catcatggag
361    atcctagaca ttgctccatt caccaagatg cggatccgga ttgatggcct gggcagtcgg
421    cgggagtggg tcctggagag gatcctactg aagaacatga aactggaga cctgaccatg
481    ttctactatg gagactggct gtcccagcgg aagggaaga agaccctggt gtgtgaaatg
541    tgtgccgtta tcgatgagga agaaatgatg gagtggacct cctacaccgt cgcagttaag
601    accagcgaca tcctgggagc aggcactgat gccaacgtgt tcatcatcat cttcggggag
661    aacggggata gtgggacact ggccctgaag cagtcggcaa actggaacaa gtttgagcgg
721    aacaacacgg acacattcaa cttccctgac atgctgagct tgggccacct ctgcaagctg
781    agggctctggc acgacaacaa agggatattt cctggctggc atctgagcta tgcgatgtg
841    aaggacaact ccgcgcagca gacctccac ttccagtgtg actgctggct ctccaagagt
901    gagggtgacg ggcagacggt ccgcgacttt gcctgtgcc aacaacagat ctgtgatgag
961    ctggaagaga ccacctacga gatcgctcata gaaacgggca acggaggcga aaccagggag
1021   aacgtctggc tcatcctgga gggcaggaag aaccgatcca aagagtttct catggaaaat
1081   tcttctaggc agcgggcctt taggaagggg accacagaca cgtttgagtt tgacagcatc
1141   tacttggggg acattgcctc cctctgtgtg ggccaccttg ccagggaaga ccggtttatc
1201   cccaagagag aacttgctcg gcatgtcaag accatcacca tcaccgagat ggagtacggc
1261   aatgtgtacc tctttaactg tgactgcctc atccccctca agaggaagag gaagtacttc
1321   aaggtattcg aggttaccaa gacgacagag agctttgcc gcaaggcca gagcctggtg
1381   cccgtcaagt acgaagtcac cgtgacaaca ggctatgagc caggggcagg cactgatgcc
1441   aacgtcttcg tgacctctt tggggccaac ggagacacag gcaagcggga gctgaagcag
1501   aaaatgcgca acctcttcga gcggggcagc acagaccgct tcttcttgga gacgctggag
1561   ctgggtgagc tgcgcaagta gtgaccaggc tgggacttgc tgcagagtgt ggatgagaaa
1621   ttgagtcttc acccagggga tagaagtgga gaagcagagg ccatcaagat ggtgtatttt
1681   aagcaaaaac taattaacac ttttcccaa aaaagctagg ctaattaaat tattaccaac
1741   catatctat aaagaactca tcttagcatc tgcttgctaa gaagtgtata cttttccca
1801   gtttcaataa acccagtggc aagtgg (SEQ ID NO:3)

```

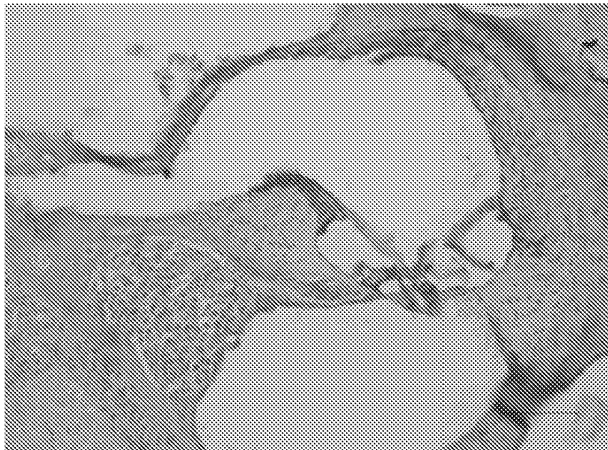
도면4

```

MNNEITYYFPCQRLAVEEDDGLSRELLPVDESIVLPQSEGRGGGDNPLDNLALEQK
DKSTTFSVTIKTGVKKNAGTDANVFITLFGTQDDTGMTLLKSKTNSDKFERDSIEFTV
ETLDLGLDWKVRGLHDNTGKAPGWFDVWEVDAPSLGKCMTFPCGRWLAKNEDDGSIIIRD
LFHAELQTRLYTPFVPEITLYTSDVFAAGTDANIFIYGCDAVCTQQKYLCTNKREQK
QFFERKSASRFIVELEDVGEIIEKIRIGHNNTGMNPGWHCSHVDIRLLPKDGAETLTF
PCDRWLATSEDDKKTIRELVPYDIFTEKYMKGDSLQVYKEVEEPLDIVLSVQIFTGNI
PGAGTDAKVYITIIYDGLDGTGERYLGKSENRTNKFERTADTFIEAADLGVIYKIKLRH
DNSKWCADWYVEKVEIWNDTNEDEFLFLCGRWLSLKKEDGRRLERLFYEKEYTGDRSSNCS
SPADFWEIALSSKMADVDISTVTGPMADYVQEGPIIPYYVSVTTGKHKDAATDSRAFI FL
IGEDDERSKRIWLDYPRGKRGFSRGSVEEFYVAGLDVGIIKKIELGHDGASPESCWLVEE
LCLAVPTQGTKYMLNLCNWLAKDRGDGITSRVFDLLDAMVVNIGVKVLYEMTVWTDVVG
GGTDSNIFMTLYGINGSTEEMQLDKKARFEREQNDTFIMEILDIAFTKMRIRIDGLGS
RPEWFLERILLKNMNTGDLTMFYGDWLSQRKGKTLVCEMCAVIDEEMMEWTSYTVAV
KTSIDLGAAGTDANVFIIIFGENGDSGTLALKQSANWNKFERNNTDTFNFPMLSLGLHCK
LRVWHDNKGIFPGWHSYVDVKDNSRDETFFHQDCWLSKSEGDGQTVRDFACANNKICD
ELEETTYEIVLETGNGGETRENVWLILEGRKNRSKEFLMENS SRQRAFRKGTDTTDFEEDS
IYLGDIASLCVGHAREDRFIKRELAWHVKTITITEMEYGNVYFFNCDCLIPLRKRKY
FKFEVTKTTESFASKVQSLVPKYEVIVTTGYEPGAGTDANVFVTFI FGANGDTGKRELK
QKMRNLFERGSTDRFFLETLELVVTRLGLAAECG (SEQ ID NO:4)

```

## 도면5



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> RESCUE HEARING INC

<120> GENE THERAPY CONSTRUCTS AND METHODS FOR TREATMENT OF HEARING LOSS

<130> 104042-201

<140> PCT/US2018/022873

<141> 2018-03-16

<150> 62/531,522

<151> 2017-07-12

<150> 62/472,790

<151> 2017-03-17

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cggatgtcag aggtcctgaa atagtcacca tgggggaaaa tgatccgcct gctgttgaag 60

cccccttctc attccgatcg ctttttggcc ttgatgattt gaaaataagt cctgttgcac 120

cagatgcaga tgctgttgct gcacagatcc tgcactgct gccattgaag ttttttccaa 180

tcacgtcatc tgggatcatt gcattgatat tagcactggc cattgggtctg ggcatccact 240  
 tcgactgctc agggaagtac agatgtcgct catcctttaa gtgtatcgag ctgatatgctc 300  
 gatgtgacgg agtctcggat tgcaaagacg gggaggacga gtaccgctgt gtccgggtgg 360  
 gtggtcagaa tgccgtgctc cagggtgtca cagctgcttc gtggaagacc atgtgctccg 420  
 atgactggaa gggtcactac gcaaagtgtg cctgtgcccc actgggtttc ccaagctatg 480  
 taagttcaga taacctcaga gtgagctcgc tggaggggca gttccgggag gagttttgtg 540

ccatcgatca cctcttgcca gatgacaagg tgactgcatt acaccactca gtatatgtga 600  
 gggaggggatg tgccctggc cagctgggta ccttgctgtg cacagcctgt ggtcatagaa 660  
 ggggctacag ctcacgcacg gtgggtggaa acatgtcctt gctctcgag tggccctggc 720  
 aggccagcct tcagttccag ggctaccacc tgtgcggggg ctctgtcatc acgccctgt 780  
 ggatcatcac tctgtcacac tgtgtttatg acttgtacct cccaagtca tggaccatcc 840  
 aggtgggtct agtttccctg ttggacaatc cagccccatc ccacttgggtg gagaagattg 900  
 tctaccacag caagtacaag ccaaagaggc tgggcaatga catcgccctt atgaagctgg 960

ccgggccact cacgttcaat gaaatgatcc agcctgtgtg cctgcccac tetgaagaga 1020  
 acttccccga tggaaaagtg tgctggacgt caggatgggg ggccacagag gatggagcag 1080  
 gtgacgctc cctgtcctg aaccacgcgg ccgtccctt gatttccaac aagatctgca 1140  
 accacagga cgtgtacgtt ggcatcatc cccctccat gctctgcgag ggctacctga 1200  
 cgggtggcgt ggacagctgc cagggggaca gcggggggcc cctggtgtgt caagagagga 1260  
 ggctgtggaa gttagtggga gcgaccagct ttggcatcgg ctgcgcagag gtgaacaagc 1320  
 ctggggtgta caccgtgtc acctccttcc tggactggat ccacgagcag atggagagag 1380

acctaataac ctgaaaagga aggggacaag tagccacct 1419

<210> 2

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Glu Asn Asp Pro Pro Ala Val Glu Ala Pro Phe Ser Phe Arg

1 5 10 15

Ser Leu Phe Gly Leu Asp Asp Leu Lys Ile Ser Pro Val Ala Pro Asp

20 25 30

Ala Asp Ala Val Ala Ala Gln Ile Leu Ser Leu Leu Pro Leu Lys Phe

35	40	45
Phe Pro Ile Ile Val Ile Gly Ile Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu Ala		
50	55	60
Ile Gly Leu Gly Ile His Phe Asp Cys Ser Gly Lys Tyr Arg Cys Arg		
65	70	75
Ser Ser Phe Lys Cys Ile Glu Leu Ile Ala Arg Cys Asp Gly Val Ser		
85	90	95
Asp Cys Lys Asp Gly Glu Asp Glu Tyr Arg Cys Val Arg Val Gly Gly		
100	105	110
Gln Asn Ala Val Leu Gln Val Phe Thr Ala Ala Ser Trp Lys Thr Met		
115	120	125
Cys Ser Asp Asp Trp Lys Gly His Tyr Ala Asn Val Ala Cys Ala Gln		
130	135	140
Leu Gly Phe Pro Ser Tyr Val Ser Ser Asp Asn Leu Arg Val Ser Ser		
145	150	155
Leu Glu Gly Gln Phe Arg Glu Glu Phe Val Ser Ile Asp His Leu Leu		
165	170	175
Pro Asp Asp Lys Val Thr Ala Leu His His Ser Val Tyr Val Arg Glu		
180	185	190
Gly Cys Ala Ser Gly His Val Val Thr Leu Gln Cys Thr Ala Cys Gly		
195	200	205
His Arg Arg Gly Tyr Ser Ser Arg Ile Val Gly Gly Asn Met Ser Leu		
210	215	220
Leu Ser Gln Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Phe Gln Gly Tyr His		
225	230	235
Leu Cys Gly Gly Ser Val Ile Thr Pro Leu Trp Ile Ile Thr Ala Ala		
245	250	255
His Cys Val Tyr Asp Leu Tyr Leu Pro Lys Ser Trp Thr Ile Gln Val		
260	265	270
Gly Leu Val Ser Leu Leu Asp Asn Pro Ala Pro Ser His Leu Val Glu		
275	280	285

Lys Ile Val Tyr His Ser Lys Tyr Lys Pro Lys Arg Leu Gly Asn Asp  
290 295 300

Ile Ala Leu Met Lys Leu Ala Gly Pro Leu Thr Phe Asn Glu Met Ile  
305 310 315 320

Gln Pro Val Cys Leu Pro Asn Ser Glu Glu Asn Phe Pro Asp Gly Lys  
325 330 335

Val Cys Trp Thr Ser Gly Trp Gly Ala Thr Glu Asp Gly Ala Gly Asp  
340 345 350

Ala Ser Pro Val Leu Asn His Ala Ala Val Pro Leu Ile Ser Asn Lys  
355 360 365

Ile Cys Asn His Arg Asp Val Tyr Gly Gly Ile Ile Ser Pro Ser Met  
370 375 380

Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Thr Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp  
385 390 395 400

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Glu Arg Arg Leu Trp Lys Leu Val  
405 410 415

Gly Ala Thr Ser Phe Gly Ile Gly Cys Ala Glu Val Asn Lys Pro Gly  
420 425 430

Val Tyr Thr Arg Val Thr Ser Phe Leu Asp Trp Ile His Glu Gln Met  
435 440 445

Glu Arg Asp Leu Lys Thr  
450

<210> 3

<211> 1826

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtagaaccga ggtgggggct tggatgaaggc acaccaggaa gagcaggctg cgcctcaccc	60
tccagtggag acagagggca gacattctct ttggagcaca cctcaggcta aatggcaaaa	120
ccccaatctc aagtgaactt catggaacta ggggattgtc tcacttctcc agtggattga	180
ggcagtgtct cctctgttct ctatgaaatg acggtgtgga caggggatgt ggttggcggg	240

ggcaactgact ccaacatctt catgaccctc tacggcatca acgggagcac agaggagatg 300  
 cagctggaca aaaagaaagc caggtttgag cgggagcaga acgacacctt catcatggag 360  
 atcctagaca ttgctccatt caccaagatg cggatccgga ttgatggcct gggcagtcgg 420  
 ccggagtggg ttctggagag gatcctactg aagaacatga aactggaga cctgaccatg 480  
 ttctactatg gagactggct gtcccagcgg aagggcaaga agaccctggg gtgtgaaatg 540  
 tgtgccgtta tcgatgagga agaaatgatg gattggacct cctacaccgt cgcagttaag 600  
 accagcgaca ttctgggagc aggcactgat gccaacgtgt tcatcatcat cttcggggag 660  
  
 aacggggata gtgggacact ggccctgaag cagtcggcaa actggaacaa gtttgagcgg 720  
 aacaacacgg acacattcaa ctccctgac atgctgagct tgggccacct ctgcaagctg 780  
 agggctctggc acgacaacaa agggatattt cctggctggc atctgagcta tgtcgatgtg 840  
 aaggacaact cccgcgacga gacctccac ttccagtgtg actgctggct ctccaagagt 900  
 gagggtgacg ggcagacggg ccgcgacttt gcctgtgcca acaacaagat ctgtgatgag 960  
 ctggaagaga ccacctacga gatcgtcata gaaacgggca acggaggcga aaccaggagg 1020  
 aacgtctggc tcatcctgga gggcaggaag aaccgatcca aagagtttct catggaaaat 1080  
  
 tcttctaggc agcgggcctt taggaagggg accacagaca cgtttgagtt tgacagcatc 1140  
 tacttggggg acattgcctc cctctgtgtg ggccaccttg ccagggaaga ccggtttatc 1200  
 cccaagagag aacttgcttg gcatgtcaag accatcacca tcaccgagat ggagtacggc 1260  
 aatgtgtacc tctttaactg tgactgcctc atccccctca agaggaagag gaagtacttc 1320  
 aaggtattcg aggttaccaa gacgacagag agctttgcca gcaaggtcca ggcctgggtg 1380  
 cccgtcaagt acgaagtcac cgtgacaaca ggctatgagc caggggcagg cactgatgcc 1440  
 aacgtcttcg tgaccatctt tggggccaac ggagacacag gcaagcgga gctgaagcag 1500  
  
 aaaatgcga acctcttcga gcggggcagc acagaccgt tcttctgga gacgtggag 1560  
 ctgggtgagc tgcgcaagta gtgaccaggc tgggacttgc tgcagagtgt ggatgagaaa 1620  
 ttgagtcttc acccaggga tagaagtga gaagcagagg ccatcaagat ggtgtatatt 1680  
 aagcaaaaac taattaacac ttttcccaa aaaagctagg ctaattaaat tattaccaac 1740  
 catatcctat aaagaactca tcttagcatc tgcttgctaa gaagtgtata ctttccca 1800  
 gtttcaataa acccagtggc aagtgg 1826  
  
 <210> 4  
 <211> 1114  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



<400> 4

Met Asn Asn Glu Ile Thr Tyr Tyr Phe Pro Cys Gln Arg Trp Leu Ala  
1 5 10 15

Val Glu Glu Asp Asp Gly Gln Leu Ser Arg Glu Leu Leu Pro Val Asp  
20 25 30

Glu Ser Tyr Val Leu Pro Gln Ser Glu Glu Gly Arg Gly Gly Gly Asp  
35 40 45

Asn Asn Pro Leu Asp Asn Leu Ala Leu Glu Gln Lys Asp Lys Ser Thr  
50 55 60

Thr Phe Ser Val Thr Ile Lys Thr Gly Val Lys Lys Asn Ala Gly Thr  
65 70 75 80

Asp Ala Asn Val Phe Ile Thr Leu Phe Gly Thr Gln Asp Asp Thr Gly  
85 90 95

Met Thr Leu Leu Lys Ser Ser Lys Thr Asn Ser Asp Lys Phe Glu Arg  
100 105 110

Asp Ser Ile Glu Ile Phe Thr Val Glu Thr Leu Asp Leu Gly Asp Leu  
115 120 125

Trp Lys Val Arg Leu Gly His Asp Asn Thr Gly Lys Ala Pro Gly Trp  
130 135 140

Phe Val Asp Trp Val Glu Val Asp Ala Pro Ser Leu Gly Lys Cys Met  
145 150 155 160

Thr Phe Pro Cys Gly Arg Trp Leu Ala Lys Asn Glu Asp Asp Gly Ser  
165 170 175

Ile Ile Arg Asp Leu Phe His Ala Glu Leu Gln Thr Arg Leu Tyr Thr  
180 185 190

Pro Phe Val Pro Tyr Glu Ile Thr Leu Tyr Thr Ser Asp Val Phe Ala  
195 200 205

Ala Gly Thr Asp Ala Asn Ile Phe Ile Ile Ile Tyr Gly Cys Asp Ala  
210 215 220

Val Cys Thr Gln Gln Lys Tyr Leu Cys Thr Asn Lys Arg Glu Gln Lys  
225 230 235 240

Gln Phe Phe Glu Arg Lys Ser Ala Ser Arg Phe Ile Val Glu Leu Glu

245	250	255
Asp Val Gly Glu Ile Ile Glu Lys Ile Arg Ile Gly His Asn Asn Thr		
260	265	270
Gly Met Asn Pro Gly Trp His Cys Ser His Val Asp Ile Arg Arg Leu		
275	280	285
Leu Pro Asp Lys Asp Gly Ala Glu Thr Leu Thr Phe Pro Cys Asp Arg		
290	295	300
Trp Leu Ala Thr Ser Glu Asp Asp Lys Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val		
305	310	315
		320
Pro Tyr Asp Ile Phe Thr Glu Lys Tyr Met Lys Asp Gly Ser Leu Arg		
325	330	335
Gln Val Tyr Lys Glu Val Glu Glu Pro Leu Asp Ile Val Leu Tyr Ser		
340	345	350
Val Gln Ile Phe Thr Gly Asn Ile Pro Gly Ala Gly Thr Asp Ala Lys		
355	360	365
Val Tyr Ile Thr Ile Tyr Gly Asp Leu Gly Asp Thr Gly Glu Arg Tyr		
370	375	380
Leu Gly Lys Ser Glu Asn Arg Thr Asn Lys Phe Glu Arg Gly Thr Ala		
385	390	395
Asp Thr Phe Ile Ile Glu Ala Ala Asp Leu Gly Val Ile Tyr Lys Ile		
405	410	415
Lys Leu Arg His Asp Asn Ser Lys Trp Cys Ala Asp Trp Tyr Val Glu		
420	425	430
Lys Val Glu Ile Trp Asn Asp Thr Asn Glu Asp Glu Phe Leu Phe Leu		
435	440	445
Cys Gly Arg Trp Leu Ser Leu Lys Lys Glu Asp Gly Arg Leu Glu Arg		
450	455	460
Leu Phe Tyr Glu Lys Glu Tyr Thr Gly Asp Arg Ser Ser Asn Cys Ser		
465	470	475
Ser Pro Ala Asp Phe Trp Glu Ile Ala Leu Ser Ser Lys Met Ala Asp		
485	490	495

Val Asp Ile Ser Thr Val Thr Gly Pro Met Ala Asp Tyr Val Gln Glu  
500 505 510

Gly Pro Ile Ile Pro Tyr Tyr Val Ser Val Thr Thr Gly Lys His Lys  
515 520 525

Asp Ala Ala Thr Asp Ser Arg Ala Phe Ile Phe Leu Ile Gly Glu Asp  
530 535 540

Asp Glu Arg Ser Lys Arg Ile Trp Leu Asp Tyr Pro Arg Gly Lys Arg  
545 550 555 560

Gly Phe Ser Arg Gly Ser Val Glu Glu Phe Tyr Val Ala Gly Leu Asp  
565 570 575

Val Gly Ile Ile Lys Lys Ile Glu Leu Gly His Asp Gly Ala Ser Pro  
580 585 590

Glu Ser Cys Trp Leu Val Glu Glu Leu Cys Leu Ala Val Pro Thr Gln  
595 600 605

Gly Thr Lys Tyr Met Leu Asn Cys Asn Cys Trp Leu Ala Lys Asp Arg  
610 615 620

Gly Asp Gly Ile Thr Ser Arg Val Phe Asp Leu Leu Asp Ala Met Val  
625 630 635 640

Val Asn Ile Gly Val Lys Val Leu Tyr Glu Met Thr Val Trp Thr Gly  
645 650 655

Asp Val Val Gly Gly Gly Thr Asp Ser Asn Ile Phe Met Thr Leu Tyr  
660 665 670

Gly Ile Asn Gly Ser Thr Glu Glu Met Gln Leu Asp Lys Lys Lys Ala  
675 680 685

Arg Phe Glu Arg Glu Gln Asn Asp Thr Phe Ile Met Glu Ile Leu Asp  
690 695 700

Ile Ala Pro Phe Thr Lys Met Arg Ile Arg Ile Asp Gly Leu Gly Ser  
705 710 715 720

Arg Pro Glu Trp Phe Leu Glu Arg Ile Leu Leu Lys Asn Met Asn Thr  
725 730 735

Gly Asp Leu Thr Met Phe Tyr Tyr Gly Asp Trp Leu Ser Gln Arg Lys

740	745	750
Gly Lys Lys Thr Leu Val Cys Glu Met Cys Ala Val Ile Asp Glu Glu		
755	760	765
Glu Met Met Glu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Ala Val Lys Thr Ser Asp		
770	775	780
Ile Leu Gly Ala Gly Thr Asp Ala Asn Val Phe Ile Ile Ile Phe Gly		
785	790	795
Glu Asn Gly Asp Ser Gly Thr Leu Ala Leu Lys Gln Ser Ala Asn Trp		
805	810	815
Asn Lys Phe Glu Arg Asn Asn Thr Asp Thr Phe Asn Phe Pro Asp Met		
820	825	830
Leu Ser Leu Gly His Leu Cys Lys Leu Arg Val Trp His Asp Asn Lys		
835	840	845
Gly Ile Phe Pro Gly Trp His Leu Ser Tyr Val Asp Val Lys Asp Asn		
850	855	860
Ser Arg Asp Glu Thr Phe His Phe Gln Cys Asp Cys Trp Leu Ser Lys		
865	870	875
Ser Glu Gly Asp Gly Gln Thr Val Arg Asp Phe Ala Cys Ala Asn Asn		
885	890	895
Lys Ile Cys Asp Glu Leu Glu Glu Thr Thr Tyr Glu Ile Val Ile Glu		
900	905	910
Thr Gly Asn Gly Gly Glu Thr Arg Glu Asn Val Trp Leu Ile Leu Glu		
915	920	925
Gly Arg Lys Asn Arg Ser Lys Glu Phe Leu Met Glu Asn Ser Ser Arg		
930	935	940
Gln Arg Ala Phe Arg Lys Gly Thr Thr Asp Thr Phe Glu Phe Asp Ser		
945	950	955
Ile Tyr Leu Gly Asp Ile Ala Ser Leu Cys Val Gly His Leu Ala Arg		
965	970	975
Glu Asp Arg Phe Ile Pro Lys Arg Glu Leu Ala Trp His Val Lys Thr		
980	985	990

Ile Thr	Ile Thr	Glu Met	Glu Tyr	Gly Asn	Val Tyr	Phe	Phe Asn	Cys
995		1000		1005				
Asp Cys	Leu Ile	Pro Leu	Lys Arg	Lys Arg	Lys Tyr	Phe	Lys Val	
1010		1015		1020				
Phe Glu	Val Thr	Lys Thr	Thr Glu	Ser Phe	Ala Ser	Lys Val	Gln	
1025		1030		1035				
Ser Leu	Val Pro	Val Lys	Tyr Glu	Val Ile	Val Thr	Thr Gly	Tyr	
1040		1045		1050				
Glu Pro	Gly Ala	Gly Thr	Asp Ala	Asn Val	Phe Val	Thr Ile	Phe	
1055		1060		1065				
Gly Ala	Asn Gly	Asp Thr	Gly Lys	Arg Glu	Leu Lys	Gln Lys	Met	
1070		1075		1080				
Arg Asn	Leu Phe	Glu Arg	Gly Ser	Thr Asp	Arg Phe	Phe Leu	Glu	
1085		1090		1095				
Thr Leu	Glu Leu	Val Val	Thr Arg	Leu Gly	Leu Ala	Ala Glu	Cys	
1100		1105		1110				
Gly								