

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-508648

(P2020-508648A)

(43) 公表日 令和2年3月26日 (2020.3.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 7/01 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/01	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 35/76 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/76	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 27/16 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/16	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 9/08 (2006.01)</b>	A 6 1 K 9/08	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-542464 (P2019-542464)  
 (86) (22) 出願日 平成30年2月6日 (2018.2.6)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年9月30日 (2019.9.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/017104  
 (87) 国際公開番号 W02018/145111  
 (87) 国際公開日 平成30年8月9日 (2018.8.9)  
 (31) 優先権主張番号 62/455,197  
 (32) 優先日 平成29年2月6日 (2017.2.6)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 596115687  
 ザ チルドレンズ メディカル センター  
 コーポレーション  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021  
 15, ボストン, シャタック・ストリート  
 55  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蝸牛および前庭細胞に核酸を送達するための物質および方法

## (57) 【要約】

本明細書に提供されるものは、核酸を蝸牛および前庭細胞に効率的に送達するための物質および方法ならびに遺伝子異常と関連する感覚トランスダクション障害を治療する方法である。

【選択図】 図 1 - 1

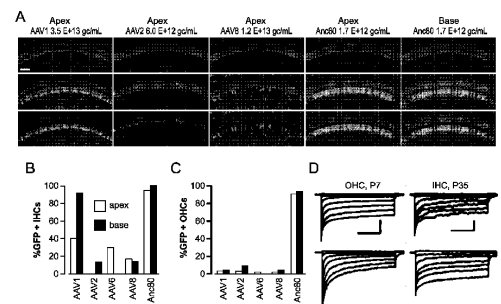


Fig. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

Anc80に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するカブシドをコードし、かつ Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS (LHFPL5) プロモーターからなる群より選択される、ハーモニンa、ハーモニンb、またはハーモニンcポリペプチドの発現を誘導するプロモーターを含む、  
内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。

**【請求項 2】**

少なくとも約70%またはより高い効率で内耳有毛細胞および外耳有毛細胞に形質導入する、  
請求項1記載の内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。

10

**【請求項 3】**

請求項1記載の内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを含む、細胞。

**【請求項 4】**

外耳有毛細胞または内耳有毛細胞である、請求項3記載の細胞。

**【請求項 5】**

対象の細胞を、請求項1記載の内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる段階を含む、対象におけるアッシャー症候群を治療する方法。

**【請求項 6】**

対象の細胞を、請求項1記載の内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる段階を含む、欠陥遺伝子の野生型形態をアッシャー症候群の対象に導入する方法。

20

**【請求項 7】**

対象の細胞を内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる段階を含み、該ベクターが、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS (LHFPL5) プロモーターからなる群より選択されるプロモーターを含み、該プロモーターが、ミオシン7a、ハーモニン、カドヘリン23、プロトカドヘリン15、SANS、ならびにカルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2からなる群より選択されるヒトUSH1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を誘導する、対象におけるアッシャー症候群を治療する方法。

30

**【請求項 8】**

ヒトポリペプチドが、TMC1、TMC2、ハーモニンa、ハーモニンb、またはハーモニンcである、請求項7記載の方法。

**【請求項 9】**

投与が聴力喪失を好転させる、請求項7記載の方法。

**【請求項 10】**

聴力喪失が、部分的な聴力喪失または完全な聴力消失である、請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

聴覚機能の回復が、毛束形態の保存および/またはメカノトランスダクションの回復と関連する、請求項9記載の方法。

40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

関連出願の相互参照

本特許出願は、全体として参照により本明細書に組み入れられる、2017年2月6日に出願された米国特許仮出願第62/455,197号への優先権およびその恩典を主張する。

**【背景技術】****【0002】**

背景

50

遺伝性難聴は、人工内耳以外に治療選択肢が少ない深刻な障害である。遺伝性聴力障害は、多くの場合、単一遺伝子異常によるものである。言語習得前難聴は乳児の1/500において診断され、そのうち約50%が遺伝的病因を有する。それぞれが多数の異なる遺伝子のいずれかの変異によって生じ得る多数の異なる臨床サブタイプと関連するアッシャー症候群が、幼児期難聴の3~6%の原因とされている。すべての遺伝性難聴の1~2%であると推定される、より一般的な遺伝子異常の1つがTMC1遺伝子において発生する。アッシャー症候群のもっとも重篤な形態であるUSH1は、6つの遺伝子：USH1、MYO7A（ミオシン7a）、USH1C（harmonin「ハーモニン」）、CDH23（カドヘリン23）、PCDH15（プロトカドヘリン15）、SANS（sans；USH1Gとも知られる）、およびCIB2（カルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2）の異常と関連する。

10

#### 【0003】

内耳、たとえば蝸牛、特に蝸牛中の内有毛細胞および外有毛細胞（IHCおよびOHC）は、様々な病因の聴力喪失および難聴、とりわけ、一遺伝子形態の遺伝性難聴に介入するためのポリヌクレオチド治療法にとって魅力的な標的である。しかし、IHCおよびOHCならびに遺伝子治療法に関連し得る他の内耳細胞を効率的にターゲティングし、形質導入することは難題であった。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

概要

本発明は、対象の内耳の細胞（たとえば内有毛細胞または外有毛細胞）をターゲティングし、関心対象のポリペプチド（たとえばTMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C（たとえばハーモニンa、b、またはc））をコードする導入遺伝子を発現させるための組成物および方法を提供する。1つの態様において、内耳有毛細胞ターゲティングAAVが、聴覚および/または前庭メカノセンセーションに遺伝子異常を有する対象の内耳に投与される。

20

#### 【0005】

本明細書に示すように、Anc80と呼ばれる祖先足場カプシドタンパク質または特定のAnc80カプシドタンパク質（たとえばAnc80-0065）を含有するアデノ随伴ウイルス（AAV）が、内耳中の様々な細胞、たとえばインビボでIHCおよびOHCを効率的にターゲティングする。

30

#### 【0006】

動物モデルにおける内耳細胞への遺伝子導入は、1つまたは複数のタイプの細胞、たとえば外有毛細胞への限られた形質導入のせいで、限られた効能しか有しない。しかし、Anc80カプシドタンパク質を含有するAAVに基づく新たな組成物および方法を含む、本明細書に記載される新規な遺伝子送達モダリティは、IHCおよびOHCの両方を含む内耳細胞への非常に効率的な遺伝子導入を提供する。

#### 【0007】

1つの局面において、本発明は、ヒトUSH1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有し、USH1ポリペプチドが、ミオシン7a、ハーモニン（たとえばハーモニンa、ハーモニンb、またはハーモニンc）、カドヘリン23、プロトカドヘリン15、SANS、ならびにカルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2、または本明細書に記載される任意の他のポリペプチドである、内耳有毛細胞ターゲティング合成アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを提供する。

40

#### 【0008】

もう1つの局面において、本発明は、Anc80L65に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するカプシドをコードし、ヒトTMC1またはTMC2ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターを含有する内耳有毛細胞ターゲティング合成アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを提供する。

#### 【0009】

もう1つの局面において、本発明は、下流ポリヌクレオチドの発現を誘導するEspinプロ

50

モーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、またはTMHS (LHFPL5) プロモーターであるプロモーターを含有する内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを提供する。

【0010】

もう1つの局面において、本発明は、前記局面の内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを含有する細胞を提供する。

【0011】

もう1つの局面において、本発明は、内耳の細胞を、関心対象のポリペプチドをコードする内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる工程を含み、AAVベクターが、内耳の細胞の少なくとも約70%をトランスフェクトし、祖先AAV配列を含有する、対象の内耳中でポリペプチドを発現させる方法を提供する。

10

【0012】

もう1つの局面において、本発明は、内耳の細胞を、関心対象のヒトポリペプチドをコードする合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる工程を含み、AAVベクターが、Anc80L65に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するカプシドをコードする、対象の内耳中でポリペプチドを発現させる方法を提供する。

【0013】

もう1つの局面において、本発明は、対象の細胞を内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる工程を含み、ベクターが、ヒトUSH1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有し、USH1ポリペプチドが、ミオシン7a、ハーモニン、カドヘリン23、プロトカドヘリン15、SANS、ならびにカルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2のいずれか1つまたは複数である、対象における感覚トランスダクション障害を治療する方法を提供する。

20

【0014】

もう1つの局面において、本発明は、対象の細胞を内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる工程を含み、ベクターが、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS (LHFPL5) プロモーターのいずれかであるプロモーターを含有する、対象における感覚トランスダクション障害を治療する方法を提供する。

【0015】

もう1つの局面において、本発明は、対象の細胞を内耳有毛細胞ターゲッティング合成アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと接触させる工程を含み、ベクターが、Anc80L65に対して少なくとも約85%の配列同一性を有するカプシドをコードし、ミオシン7a、ハーモニン、カドヘリン23、プロトカドヘリン15、SANS、およびカルシウムまたはインテグリン結合タンパク質2であるUSH1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーターを含有する、対象における感覚トランスダクション障害を治療する方法を提供する。

30

【0016】

本明細書に記載される発明の上記局面または任意の他の局面の様々な態様において、感覚トランスダクション障害とは、内耳中に発現するポリペプチドの遺伝子変化と関連する遺伝子疾患である。上記局面の他の態様において、プロモーターは、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS (LHFPL5) プロモーターの任意の1つまたは複数である。上記局面の他の態様において、ベクターは、少なくとも約70%以上の効率で内耳有毛細胞および外耳有毛細胞に形質導入する。上記局面の他の態様において、ハーモニンポリペプチドは、ハーモニンa、ハーモニンb、またはハーモニンcである。上記局面の他の態様において、細胞は外耳有毛細胞または内耳有毛細胞である。上記局面の他の態様において、ベクターは、下流ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターを含有し、プロモーターは、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、またはTMHS (LHFPL5) プロモーターである。上記局面の他の態様において、下流ポリヌクレオチドは、TMC1、TMC2、または、ミオシン7a、ハーモニン、カドヘリン23、プロトカド

40

50

ヘリン15、SANS、ならびにカルシウムまたはインテグリン結合タンパク質2であるUSH1ポリペプチドである。上記局面の特定の態様において、ホルモンポリペプチドは、ホルモンa、ホルモンb、またはホルモンcである。上記局面の他の態様において、内耳有毛細胞ターゲティング合成アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、内耳有毛細胞および外耳有毛細胞を少なくとも約70%、80%、90%、95%以上の効率、さらには100%の効率でターゲティングする。上記局面の他の態様において、ヒトポリペプチドは、TMC1、TMC2、ホルモンa、ホルモンb、またはホルモンcである。上記局面の他の態様において、感覚トランスダクション障害は聴覚障害または前庭障害である。上記局面の他の態様において、感覚トランスダクション障害はアッシャー症候群である。

【0017】

10

定義

別段の定めがない限り、本明細書において使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の参考文献が、本発明において使用される用語の多くの一般的定義を当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)およびHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書において使用される以下の用語は、別段の指定がない限り、以下それらに与えられる意味を有する。

【0018】

20

「祖先AAV配列」とは、天然に存在するAAVの分析および進化的祖先の予測から生じる遺伝子操作の産物である、設計された配列をいう。

【0019】

「Anc80ポリペプチド」とは、以下のポリペプチド配列に対して少なくとも約85%のアミノ酸同一性を有するカプシドポリペプチドをいう。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPYKYLGPFGNLDKGEVNAADA  
AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQPPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPFAAPSGVGSNTMAAGGGAP  
MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDVRVITSTRT ALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW  
GYFDENRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKKNLNFKLFIQVKEVTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ  
LPYVLGSAHQCLPPFPADVFMI PQYGYLTLLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSYTFEDVP  
FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTSAGTNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS  
KTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMATHKDDDEKFFPMSGVLIFGKQAGNSNVLDLNVMI  
TNEEEIKTTNPVATEEYGTVATNLQSANTAPATGTVNSQALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFH  
PSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIE ELQKENSkrwnPEIQ  
YTSNynkSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

30

【0020】

「Anc80ポリヌクレオチド」とは、Anc80ポリペプチドをコードする核酸分子をいう。

【0021】

「血清陽性率」とは、血清学的(血清)検体にに基づき、特定の疾患に関して陽性と判定される集団中の人数をいう。1つの態様において、血清陽性率は、検査された全検体のパーセント値として、または検査された100,000人あたりの割合として特性決定される。

40

【0022】

「内耳有毛細胞ターゲティングAAV」とは、対象の内耳への投与または内耳由来の細胞とのインビトロでの接触ののち、少なくとも内耳有毛細胞の70%および外耳有毛細胞の70%をトランスフェクトするアデノ随伴ウイルスをいう。好ましくは、内耳有毛細胞ターゲティングAAVは、蝸牛へのインビボ注入ののち、少なくとも内耳有毛細胞の90%および外耳有毛細胞の90%をトランスフェクトするAAVである。トランスフェクション効率は、マウスモデルにおいてGFPをコードする遺伝子を使用して評価され得る。

【0023】

50

「メカノセンセーション」とは、機械的刺激に対する反応をいう。機械的刺激から神経シグナルへの変換の例の触覚、聴覚および平衡。メカノセンセーション入力は、「メカノトランスダクション」と呼ばれるプロセスを通して、機械的刺激に対する反応へと変換される。

【 0 0 2 4 】

「TMC1ポリペプチド」とは、メカノトランスダクションチャネル活性を有する、NCBI Reference Sequence: NP\_619636.2に対して少なくとも約85%以上のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその断片をいう。TMC1の例示的アミノ酸配列を以下に提供する。

```

1 mspkkvqikv eekedetees sseeeeeved klprreslrp krkrtrdvin eddpepeped
61 eetrkareke rrrrlkrgae eeeideeele rlkaeldekr qiatvkcckp wkmeckkievl
121 keakkfvsen egalgkgkgk rwfakmuma kkwakflrdf enfkaacvpw enkikaiesq
181 fgssvasyfl flrwmvgvnm vlfiltfsli mlpeylwglp ygslprktvp raeeasaanf
241 gvlydfngla qysvlfygyy dnkrtigwmn frlplsylfv gimcigysfl vvlkamtkni
301 gddgggddnt fnfswkvfts wdylnpset adnkfnsitm nfkeaiteek aaqveenvhl
361 irflrlanf fvfltlgsg ylifwvkrq qefaqgdpdt lgwweknemn mvmsllgmfc
421 ptlfdlfael edyhplialk wllgrifall lgnlyvfila lmdeinnkie eeklvkanit
481 lweanmikay nasfsenstg ppffvhpadv prgpcwetmv ggefvrlyts dvltyvtil
541 igdflracfv rfcnycwcd leygypsyte fdisgnvial ifnqgmwmg sffapslpgi
601 nilrlhtsmv fqcwvmccn vpearvfkas rsnnfylgml llilflstmp vlymivslpp
661 sfdcgpfsgk nrmfeviget lehdfpswma kilrqlsnpg lviavilvmv laiyylnata
721 kgqkaanldl kkkkmqgale nkmrnkkaa araaaaagrq

```

【 0 0 2 5 】

「TMC1ポリヌクレオチド」とは、TMC1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをいう。例示的なTMC1ポリヌクレオチドの配列が、以下に再現されるNCBI Reference Sequence: NM\_138691.2に提供されている。

1 cagaaactat gagggcagaa cccagcaatc tgtgctttct ttcacaagcc ctccaggagt  
 61 tgctgaaatt taggaatcat tgccccaaaa agtggccctc ataatgatgc cagatgggat  
 121 cttactctgt tgcccaggct ggagtgcagt ggtgcgatct cggtctctg caacctccgc  
 181 ctcccagggt caagtgattc tcctgcctcg gcctcctgag tagctgggat ttcaggccat  
 241 gaaagatcac tgttttagtc tgcgtggtgc agtggaacag atagacctcg gtttgaatct  
 301 cagctctact gtttactaga catgaaatgg ggaaatctaa aatgagatgc cagaagcctc  
 361 aaaaatggaa aacccccctgt gcttcacatc tgaaaatctc tgctgggggc agcaactttg  
 421 agcctgtggg gaaggaactg tccacgtgga gtggtctggt gaatgcttaa ggagctgcag  
 481 aagggagtc cctctccaaa ctagccagcc actgagacct tctgacagga ccccccagg  
 541 atgtcaccca aaaaagtaca aatcaaagtg gagggaaaag aagacgagac tgaggaaagc  
 601 tcaagtgaag aggaagagga ggtggaagat aagctacctc gaagagagag cttgagacca  
 661 aagaggaaac ggaccagaga tgttatcaat gaggatgacc cagaacctga accagaggat  
 721 gaagaaacaa ggaaggcaag agaaaaagag aggaggagga ggctaaagag aggagcagaa  
 781 gaagaagaaa ttgatgaaga ggaattggaa agattgaagg cagagttaga tgagaaaaga  
 841 caaataattg ctactgtcaa atgcaaacca tggaagatgg agaagaaaat tgaagttctc  
 901 aaggaggcaa aaaaatttgt gagtgaat gaaggggctc ttgggaaagg aaaaggaaaa  
 961 cgggtggttg catttaagat gatgatggcc aagaaatggg caaaattcct cctgatttt  
 1021 gagaacttca aagctgcgtg tgtcccatgg gaaataaaaa tcaaggctat tgaaagtcag  
 1081 tttggctcct cagtggcctc atacttctc ttcttgagat ggatgtatgg agtcaatatg  
 1141 gttctcttta tctgacatt tagcctcatc atgttgccag agtacctctg gggtttgcca  
 1201 tatggcagtt tacctaggaa aaccgttccc agagccgaag aggcacggc agcaacttt  
 1261 ggtgtgttgt acgacttcaa tggtttgga caatattccg ttctcttita tggctattat  
 1321 gacaataaac gaacaattgg atggatgaat ttcagggtgc cgctctcta ttttctagt  
 1381 gggattatgt gcattggata cagctttctg gttgtcctca aagcaatgac caaaaacatt  
 1441 ggtgatgatg gaggtggaga tgacaacact ttcaatttca gctggaaggt ctttaccagc  
 1501 tgggactacc tgatcggaac tcctgaaaca gcagacaaca aatttaattc tatcacaatg  
 1561 aactttaagg aagctatcac agaagaaaaa gcagcccaag tagaagaaaa cgtccacttg  
 1621 atcagattcc tgaggtttct ggctaacttc ttcgtgttcc taacacttgg agggagtggg  
 1681 tacctcatct tttgggctgt gaagcgatcc caggaatttg cacagcaaga tcctgacacc  
 1741 cttgggtggt gggaaaaaaa tgaaatgaac atgggttatgt cctcctagg gatgttctgt  
 1801 ccaacattgt ttgacttatt tgctgaatta gaagactacc atcctctcat cgctttgaaa  
 1861 tggctactgg gacgcatttt tgctcttctt ttaggcaatt tatacgtatt tattcttgca  
 1921 ttaatggatg agattaacaa caagattgaa gaggagaagc tagtaaaggc caatattacc  
 1981 ctttgggaag ccaatatgat caaggcctac aatgcacat tctctgaaaa tagcactgga  
 2041 ccaccctttt ttgttcaccc tgcagatgta cctcgaggac cttgctggga aacaatggtg  
 2101 ggacaggagt ttgtgaggct gacagtctct gatgttctga ccacctacgt cacaatcctc  
 2161 attggggact ttctaagggc atgttttctg aggttttgca attattgctg gtgctgggac  
 2221 ttggagtatg gatatccttc atacaccgaa ttcgacatca gtggcaacgt cctcgctctg  
 2281 atcttcaacc aaggcatgat ctggatgggc tccttctttg ctcccagcct ccaggcatc  
 2341 aatatccttc gactccatac atccatgtac ttccagtgtt gggccgttat gtgctgcaat  
 2401 gttoctgagg ccagggtctt caaagcttcc agatcaaata acttctacct gggcatgcta  
 2461 ctgctcatcc tcttctgtc cacaatgcct gtcttgata tgatcgtgtc cctcccacca  
 2521 tcttttgatt gtggtccatt cagtggcaaa aatagaatgt ttgaagtcat tggagagacc  
 2581 ctggagcacg atttcccaag ctggatggcg aagatcttga gacagcttcc aaaccctggg  
 2641 ctggtcattg ctgtcatttt ggtgatggtt ttggccatct attatctcaa tgctactgcc  
 2701 aagggccaga aggcagcgaa tctggatctc aaaaagaaga tgaaaatgca agctttggag  
 2761 aacaaaatgc gaaacaagaa aatggcagct gcacgagcag ctgcagctgc tggctgccag  
 2821 taataagtat cctgagagcc cagaaaaggt acactttgcc ttgctgttta aaagtaatgc  
 2881 aatatgtgaa cgcccagaga acaagcactg tggaactgct attttctgt tctacccttg  
 2941 atggattttc aaggtcatgc tggccaatta aggcacatc agtcctacct gagcaacaag  
 3001 aatctaaact ttattccaag tcagaaactg tttctgcaga gccactctct ccctgtctcc  
 3061 atttctgtac tttttttttt tttttaacaa attgagttta gaagtgaagt taatccagca  
 3121 atacagttta ctggttttagt tgggtgggtta attaaaaaaa atttgctcat atgaactttc  
 3181 attttatatg tttcttttgc c

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

「TMC2ポリペプチド」とは、メカノセンセーションにおいて機能する、NCBI Reference Sequence: NP\_542789に対して少なくとも約85%以上のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその断片をいう。TMC2の例示的アミノ酸配列を以下に提供する。

```
1 mshqykgllke earggvkgrv ksgsphtgdr lgrsssskra lkaegtppgr gaqrsqkera
61 ggspspgsprr rkqtgrrrrhr eelgeqerge aertcegrrr rderasfqr taapkrekei
121 prrekskrq kkprssslas sasggeslse eelaqileqv eekkkliatm rskpwpmak
181 ltelreagef veyegalgk gkgkqlyayk mlmakkwvkf krdfdnfktq cipwemkikd
241 ieshfgssva syfiflrwmy gvnvlvfgli fglviipevl mgmpygsipr ktvpraeeek
301 amdfsvlwdf egyikysalf ygynnrtrti gwlrlyrlpma yfmvgvsvfg ysliivirsm
361 asntqgstge gesdnftfsf kmftswdyli gnsetadnky asittsfkes ivdeqesnke
421 enihltrflr vlnfliicc lcgsgyliyf vvkrsqqfsk mqnvswyern eveivmsllg
481 mfcpplfeti aalenyhprt glkwqlgrif alflgnlytf llalmdvhl klaneetikn
541 ithwtlfnny nssgwnesvp rpplhpadvp rgscwetavg iefmrltvsd mlvtyitill
601 gdflracfvr fmnycwcdwl eagfpsyaef disgnvlgli fnqgmwmgs fyapglvgin
661 vlrlttsmyf qcwavmssnv phervfkasr snnfymglil lvflslslpv aytimsllps
721 fdcgpfsgkn rmydvlqeti endfptflgk ifaflanpgl iipaillmfl aiyylnsvsk
781 slsranaqlr kkiqvlreve kshksvkgka tardsedtpk sssknatqlq ltkeettps
841 asqsgamdkk aqpggtsnsa srttlpasgh lpisrppgig pdsghapsqt hpwrsasgks
901 aqrpph
```

10

## 【 0 0 2 7 】

「ハーモニンポリペプチド」とは、メカノセンセーションにおいて機能するまたはUSH1C、USH1G、CDH23、およびMYO7Aのいずれか1つもしくは複数と相互作用する、Q9Y6N9-1（アイソフォーム1）、Q9Y6N9-2、Q9Y6N9-3、Q9Y6N9-4、Q9Y6N9-5に対して少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその断片をいう。例示的なハーモニンポリペプチド（アイソフォーム1）の配列を以下に提供する。

```
> sp|Q9Y6N9|USH1C_ヒトハーモニン OS=ホモサピエンス GN=USH1C PE=1 SV=3
MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEDKDYLDVLRMYHQTMDVAVLVGDLKLVINEPSRLPLFD
AIRPLIPLKHQVEYDQLTPRRSRKLKEVRLDRLHPEGLGLSVRGGLFEGCGLFISHLIK
GQADSVGLQVGDEIVRINGYSISSCTHEEVINLIRTKKTVSIKVRHIGLIPVKSSPDEPL
TWQYVDQFVSESGGVRGSLGSPGNRENKEKKVFISLVGSRGLGCSISSGPIQKPGIFISH
VKPGSLSAEVGLEIGDQIVEVNGVDFSNLDHKEAVNVKSSRSLTISIVAAAGRELFTD
RERLAEARQRELQRQELLMQKRLAMESNKILQEQQEMERQRRKEIAQKAAEENERYRKEM
EQIVEEEEFKKQWEEDWGSKEQLLLPKTITAEVHPVPLRKPQYDQGVFELEPADDLDG
GTEEQGEQDFRKYEEGFDPYSMFTPEQIMGKDVRLRLRIKKEGSLDLAEGGVDSPIGKVV
VSAVYERGAAERHGGIVKGDEIMAINGKIVTDYTLAEAEALQKAWNQGQDWIDLVAVC
PPKEYDDELTFF
```

30

## 【 0 0 2 8 】

「Ush1Cポリヌクレオチド」とは、ハーモニンポリペプチドをコードする核酸分子をいう。例示的なUsh1CポリヌクレオチドNM\_005709の配列を以下に提供する。



```

1 agctccgagg gcggctggcc cggtcgcggt cgcggctctt tccagctcct ggcagccggg
61 caccgaagg aacgggtcgt gcaacgacgc agctggacct ggcccagcca tggaccgaaa
121 agtggcccca gaattccggc ataaggtgga ttttctgatt gaaaatgatg cagagaagga
181 ctatctctat gatgtgctgc gaatgtacca ccagaccatg gacgtggccg tgctcgtggg
241 agacctgaag ctggtcatca atgaaccag cgtctgcct ctgtttgatg ccattcggcc
301 gctgatccca ctgaagcacc aggtggaata tgatcagctg acccccggc gctccaggaa
361 gctgaaggag gtgctctggt accgtctgca cccgaaggc ctgggctga gtgtgcgtgg
421 tggcctggag ttggtctgtg ggctcttcat ctcccacctc atcaaaggcg gtcaggcaga
481 cagcgtcggg ctccaggtag gggacgagat cgtccggatc aatggatatt ccattcctc
541 ctgtacccat gaggaggtca tcaacctcat tcgaaccaag aaaactgtgt ccataaagt
601 gagacacatc ggctgatcc cgtgaaaag ctctcctgat gagccctca cttggcagta
661 tgtggatcag ttgtgtcgg aatctggggg cgtgcgaggc agcctgggct cccctggaaa
721 tcgggaaaac aaggagaaga aggtcttcat cagcctggta ggctcccgag gccttgctg
781 cagcatttcc agcggcccca tccagaagcc tggcatcttt atcagccatg tgaacctgg
841 ctccctgtct gctgaggtgg gattggagat aggggaccag attgtcgaag tcaatggcgt
901 cgacttctct aacctggatc acaaggaggc tgtaaagtgt ctgaagagta gccgcagcct
961 gaccatctcc attgtagctg cagctggccg ggagctgttc atgacagacc gggagcggct
1021 ggcagaggcg cgcgagcgtg agctgcagcg gcaggagctt ctcatgcaga agcggctggc
1081 gatggagtcc aacaagatcc tccaggagca gcaggagatg gagcggcaaa ggagaaaaga
1141 aattgcccag aaggcagcag aggaaaatga gagataccgg aaggagatgg aacagattgt
1201 agaggaggaa gagaagttaa agaagcaatg ggaagaagac tggggctcaa aggaacagct
1261 actcttgctt aaaaccatca ctgctgaggt acaccagta ccccttcgca agccaaagta
1321 tgatcaggga gtggaacctg agctcgagcc cgcagatgac ctggatggag gcacggagga
1381 gcagggagag caggatttcc ggaaatatga ggaaggcttt gacctact ctatgttcac
1441 cccagagcag atcatgggga aggatgtccg gctcctacgc atcaagaagg agggatcctt
1501 agacctggcc ctggaaggcg gtgtggactc cccattggg aagggtggtc tttctgctgt
1561 gtatgagcgg ggagctgctg agcggcatgg tggcattgtg aaaggggacg agatcatggc
1621 aatcaacggc aagatttgtga cagactacac cctggctgag gctgaggtg ccctgcagaa
1681 ggcctggaat cagggcgggg actggatcga ccttgtggtt gccgtctgcc ccccaaagga
1741 gtatgacgat gagctgacct tcttctgaag tccaaaaggg gaaaccaaat tcaccgttag
1801 gaaacagtga gtcgggccc cactcgtga acacaaagcc tcggatcagc cttgagagag
1861 gccacactac acacaccaga tggcatcctt gggacctgaa tctatcccc aggaatctca
1921 aactcccttt ggccctgaac cagggccaga taaggaacag ctggggccac tcttctgaag
1981 gccaacgtgg aggaaaggga gcagccagcc atttgggaga agatctcaag gatccagact
2041 ctatttctt tctctggcc cagtgaattt ggtctctccc agctctgggg gactccttcc
2101 ttgaacccta ataagacccc actggagtct ctctctctcc atccctctcc tctgcctct
2161 gctctaattg ctgccaggat tgtcactcca aaccttactc tgagctcatt aataaaatag
2221 atttattttc cagctta

```

10

20

30

40

【 0 0 2 9 】

他の例示的なハーモニン配列を以下に提供する。

ハーモニンB

>XM 011519832.2 予測：ホモサピエンスUSH1タンパク質ネットワーク成分ハーモニン (USH1C)、転写産物変異体X3、mRNA

AGCTCCGAGGGCGGCTGGCCCGGTGCGGGTTCGCGGCTCTTCCAGCTCCTGGCAGCCGGGCACCCGAAGG  
AACGGGTGCTGCAACGACGCGAGCTGGACCTGGCCAGCCATGGACCGAAAAGTGGCCCGAGAATTCGGGC  
ATAAGGTGGATTTTCTGATTGAAAATGATGCAGAGAAGGACTATCTCTATGATGTGCTGCGAATGTACCA  
CCAGACCATGGACGTGGCCGTGCTCGTGGGAGACCTGAAGCTGGTCATCAATGAACCCAGCCGTCTGCCT  
CTGTTTGTATGCCATTTCGGCCGCTGATCCCACTGAAGCACCAGGTGGAATATGATCAGCTGACCCCCCGGC  
GCTCCAGGAAGCTGAAGGAGGTGCGTCTGGACCGTCTGCACCCGAAGGCCTCGGCCTGAGTGTGCGTGG  
TGGCCTGGAGTTTGGCTGTGGGCTCTTCACTCTCCACCTCATCAAAGGCGGTGAGGCAGACAGCGTGGG  
CTCCAGGTAGGGGACGAGATCGTCCGGATCAATGGATATTCATCTCCTCCTGTACCCATGAGGAGGTCA  
TCAACCTCATTGCAACCAAGAAAATGTGTCCATCAAAGTGAGACACATCGGCCTGATCCCCGTGAAAAG  
CTCTCCTGATGAGCCCCCTCACTTGGCAGTATGTGGATCAGTTTGTGTGCGAATCTGGGGCGGTGCGAGGC  
AGCCTGGGCTCCCTGGAAATCGGGAACAAGGAGAAGAAGGTCTTCATCAGCCTGGTAGGCTCCCCGAG  
GCCTTGGCTGCGACATTTCCAGCGGCCCATCCAGAAGCCTGGCATCTTTATCAGCCATGTGAAACCTGG  
CTCCTGTCTGCTGAGGTGGGATTGGAGATAGGGGACCAGATTGTGCGAAGTCAATGGCGTCCGACTTCTCT  
AACCTGGATCACAAGGAGGTGTAAATGTGCTGAAGAGTAGCCGAGCCTGACCATCTCATTGTAGCTG  
CAGCTGGCCGGGAGCTGTTTATGACAGACCGGGAGCGGTGGCAGAGGCGCGGCAGCGTGAGCTGCAGCG  
GCAGGAGCTTCTCATGCAGAACGGCTGGCGATGGAGTCCAACAAGATCCTCCAGGAGCAGCAGGAGATG  
GAGCGGCAAAGGAGAAAAGAAATTGCCAGAAGGCAGCAGAGGAAAATGAGAGATACCGGAAGGAGATGG  
AACAGATTGTAGAGGAGGAAGAGAAGTTTAAAGAAGCAATGGGAAGAAGACTGGGGCTCAAAGGAACAGCT  
ACTCTTGCCCTAAAACCATCACTGCTGAGGTACACCCAGTACCCCTTCGCAAGCCAAAGTATGATCAGGGA  
GTGGAACCTGAGCTCGAGCCCGCAGATGACCTGGATGGAGGCACGGAGGAGCAGGGAGAGCAGAAAGGAA  
AAGATAAGAAAGAAAGCCAAAGTATGGCAGCCTGCAGGACTTGAGAAAGAATAAGAAAGAACTGGAGTTTGA  
GCAAAAGCTTTACAAAGAGAAAGAGGAAATGCTGGAGAAGGAAAAGCAGCTAAAGATCAACCGGCTGGCC  
CAGGAGGATTTCCGGAATATGAGGAAGGCTTTGACCCCTACTCTATGTTTACCCAGAGCAGATCATGG  
GGAAGGATGTCCGGCTCCTACGCATCAAGAAGGAGGGATCCTTAGACCTGGCCCTGGAAGGCGGTGTGGA  
CTCCCCCATTTGGGAAGGTGGTCTGTTTCTGCTGTGTATGAGCGGGGAGCTGCTGAGCGGCATGGTGGCATT  
GTGAAAGGGGACGAGATCATGGCAATCAACGGCAAGATTGTGACAGACTACACCTGGCTGAGGCTGAGG  
CTGCCCTGCGAAGGCCTGGAATCAGGGCGGGGACTGGATCGACCTTGTGGTTGCCCTGCCCCCAGG  
GGAGTATGACGATGAGCTGAGCTTCTTCTGAAGTCCAAAAGGGGAAACCAAATTCACCGTTAGGAAACAG  
TGAGCTCCGGCCCCACCTCGTGAACACAAAGCCTCGGATCAGCCTTGAGAGAGGCCACACTACACACACC  
AGATGGCATCCTTGGGACCTGAATCTATCACCAGGAATCTCAAACCTCCCTTTGGCCCTGAACAGGGGCC  
AGATAAGGAACAGCTCGGGCCACTCTTCTGAAGGCCAACGTTGGAGGAAAGGGACAGCCAGCCATTTGGG  
AGAAGATCTCAAGGATCCAGACTCTCATTCTTCTCTGCCCCAGTGAATTTGGTCTCTCCAGCTCTG  
GGGACTCCTTCTTGAACCTAATAACACCCCACTGGAGTCTCTCTCTCTCCATCCCTCTCCTCTGCCC  
TCTGCTCTAATTGCTGCCAGGATTGTCACTCCAAACCTTACTCTGAGCTCATTAATAAAATAGATTTATT  
TTCCA

10

20

30

【 0 0 3 0 】

## ハーマニンBポリペプチド

MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEKDYLYDVLRLMYHQTMDVAVLVG  
DLKLVINEPSRLPLFDALRPLIPLKHQVEYDQLTPRRSRKLKEVRLDRLHPEGLGLSV  
RGGLEFGGLFISHLIKGGQADSVGLQVGDEIVRINGYSSCTHEEVINLIRTKKT  
SIKVRHIGLIPVKSSPDEPLTWQYVDQFVSESGGVRSLSGSPGNRENKEKKVFISLVG  
SRGLGCSISSGPIQKPGIFISHVKPGSLSAEVGLEIGDQIVEVNGVDFSNLDHKEAVN  
VLKSSRSLTISIVAAAGRELFTDRERLAEARQRELQRELLMQKRLAMESNKILQEQ  
QEMERQRRKEIAQKAAEENERYRKEMEQUIVEEEKFKKQWEEDWGSKEQLLLPKTITA  
EVHPVPLRKPSPFGWFYRYDGFPTIRKKGKDKKKAKYGSLODLRKNKKELEFEQKLY  
KEKEEMLEKEKQLKINRLAQEVSETEREDLEESEKIQYWVERLCQTRLEQISSADNEI  
SEMTTGPPPPPSVSPLAPPLRRFAGGLHLHTDLDLDDIPLDMFYYPKTPSALPVMPPH  
PPPSNPPhKVPAPPVPLPLSGHVSASSSPWVQRTPPPIPIPPPPSVPTQDLTPTRPLPS  
ALEEALSNHPFRGTGTPVEDWEAKNHSGKPTNSPVPEQSFPPTPKTFPCSPQPPRG  
PGVSTISKPMVMVHQEPNFIYRPAVKSEVLPOEMLKRMVVYQTAFRQDFRKYEEGFDPY  
SMFTPEQIMGKDVRLRLRIKKEGSLDLAEGGVDSPIGKVVSVAVERGAERHGGIVK  
GDEIMAINGIKIVTDYTLAEAEALQKAWNQGWDWIDLVAVCPPKEYDDELASLPSSV  
AESQPVRKLLLEDRAAVHRHGFLQLLEPTDLLLKSQRGNQIHR"

【 0 0 3 1 】

## ハーマニンC

> NM\_001297764.1 ホモサピエンスUSH1タンパク質ネットワーク成分ハーマニン (USH1C)  
)、転写産物変異体3、mRNA

AGCTCCGAGGGCGGCTGGCCCGGTGCGGGTTCGCGGCTCTTCCAGCTCCTGGCAGCCGGGCACCCGAAGG  
AACGGGTCGTGCAACGACGACGCTGGACCTGGCCAGCCATGGACCGAAAAGTGGCCCGAGAATTCGGGC  
ATAAGGTGGATTTTCTGATTGAAAATGATGCAGAGAAGGACTATCTCTATGATGTGCTGCGAATGTACCA  
CCAGACCATGGACGTGGCCGTGCTCGTGGGAGACCTGAAGCTGGTCATCAATGAACCCAGCCGTCTGCCT  
CTGTTTGTATGCCATTGCGGCCCTGATCCCACTGAAGCACCAGGTGGAATATGATCAGCTGACCCCCCGGC  
CTGCCAGGAAGCTGAAGGAGGTGCGTCTGGACCTCTGCACCCGAAGGCTCGGCCTGAGTGTGCTGG  
TGGCCTGGAGTTTGGCTGTGGGCTCTTCTATCTCCCACTCATCAAAGGCGGTGAGGACAGAGCGTGGG  
CTCCAGGTAGGGGACGAGATCGTCCGGATCAATGGATATTCATCTCCTCCTGTACCCATGAGGAGGTCA  
TCAACCTCATTCGAACCAAGAAAAGTGTGTCCATCAAAGTGAGACACATCGGCCTGATCCCCGTGAAAAG  
CTCTCCTGATGAGCCCTCACTTGGCAGTATGTGGATCAGTTTGTGTGCGAATCTGGGGCGGTGCGAGGC  
AGCCTGGGCTCCCTGGAATCGGGAAAACAAGGAGAAGAAGGTCTTCATCAGCCTGGTAGGCTCCCGAG  
GCCTTGGCTGCGCATTTCAGCGGCCCATCCAGAAGCCTGGCATCTTTATCAGCCATGTGAAACCTGG  
CTCCCTGTCTGCTGAGGTGGGATGGAGATAGGGGACCAGATTGTGCAAGTCAATGGCGTGCACCTTCTCT  
AACCTGGATCACAAGGAGGGCGGGAGCTTTCATGACAGACCGGGAGCGGCTGGCAGAGGCGCGGCAGC  
GTGAGCTGCGAGCGGCGAGGAGCTTCTCATGCAGAAGCGGCTGGCGATGGAGTCCAACAAGATCCTCCAGGA  
CGAGCAGGAGATGGAGCGGCAAAGGAGAAAAGAAATTGCCCAGAAGGCAGCAGAGGAAAATGAGAGATAC  
CGGAAGGAGATGGAACAGATTGTAGAGGAGGAAGAGAAGTTTAAGAAGCAATGGGAAGAAGACTGGGGCT  
CAAAGGAACAGCTACTCTTGCCCTAAAACCATCACTGTGAGGTACACCCAGTACCCCTTCGCAAGCCAAA  
GTATGATCAGGAGTGGAACTGAGCTCGAGCCCGCAGATGACCTGGATGGAGGCACGGAGGAGCAGGGA  
GAGCAGGATTTCGGAAATATGAGGAAGGCTTTGACCCCTACTCTATGTTACCCAGAGCAGATCATGG  
GGAAGGATGTCGGCTCCTACGCATCAAGAAGGAGGGATCCTTAGACCTGGCCCTGGAAGGCGGTGTGGA  
CTCCCCCATTGGGAAGGTGGTCTGTTTCTGCTGTGTATGAGCGGGGAGCTGCTGAGCGGCATGGTGGCATT  
GTGAAAGGGGACGAGATCATGGCAATCAACGGCAAGATTGTGACAGACTACACCTGGCTGAGGCTGAGG  
CTGCCCTGCAGAAGGCTGGAATCAGGGCGGGGACTGGATCGACCTTGTGGTTGCCGTCTGCCCCCAA  
GGAGTATGACGATGAGCTGACCTTCTTCTGAAGTCCAAAAGGGGAAACCAAATTCACCGTTAGGAAACAG  
TGAGCTCCGGCCCCACCTCGTGAACACAAAGCCTCGGATCAGCCTTGAGAGAGGCCACACTACACACACC  
AGATGGCATCCTTGGGACCTGAATCTATCACCCAGGAATCTCAAACCTCCCTTTGGCCCTGAACCAGGGCC  
AGATAAGGAACAGCTCGGGCCACTCTTCTGAAGGCCAACGTGGAGGAAAGGGAGCAGCCAGCCATTGGG  
AGAAGATCTCAAGGATCCAGACTCTCATTCCTTCTCTGCCCCAGTGAATTTGGTCTCTCCCAGCTCTG  
GGGACTCCTTCCTTGAACCTAATAAGACCCCACTGGAGTCTCTCTCTCCATCCCTCTCCTCTGCC  
TCTGCTCTAATTGCTGCCAGGATTGTCACTCAAACCTTACTCTGAGCTCATTAAATAAAATAGATTATT  
TTCAGCTTA

10

20

【0032】

#### ハーモニンCポリペプチド

MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEDKDYLYDVLRMVHQTMDVAVLVG  
DLKLVINEPSRLPLFDALRPLIPLKHQVEYDQLTPRRSRKLKEVRLDRLHPEGLGLSV  
RGGLEFGCGLFIHLIKGGQADSVGLQVDEIVRINGYSISSCTHEEVINLIRTKTV  
SIKVRHIGLIPVKSSPDEPLTWQYVDQFVSESGVRSLSGSPGNRENKEKKVFISLVG  
SRGLGCSISSGPIQKPGIFISHVKPGSLSAEVGLFIDQIIVEVNGVDFSNLDHKECRE  
LFMTDRERLAEARQRELQRQELLMQKRLAMESNKILQEQQEMERQRRKEIAQKAAEEN  
FRYRKEMEQUIVEEEKFKKQWEDWGSKEQLLLPKTITAETHVPVPLRKPKYDQGVPEE  
LEPADDDLDGGTEEQGEQDFRKYEEGFDPYSMTPEQIMGKDVRLRLRIKKEGSLDLALE  
GGVDSPIGKVVSVAVERGAAERHGGIVKGDEIMAINGKIVTDYTLAEAEALQKAWN  
QGGDWIDLVVAVCPPKEYDDELTF"

【0033】

「Espinプロモーター」とは、蝸牛細胞中で下流ポリヌクレオチドの発現を誘導するの  
に十分である、NCBI Reference Sequence: NG\_015866.1に由来する調節ポリヌクレオチド  
配列をいう。1つの態様において、Espinプロモーターは、Espinコード配列の上流の少な  
くとも約350、500、1000、2000、3000、4000、5000またはそれより多くの塩基対を含む。

30

【0034】

「プロトカドヘリン15 (PCDH15) プロモーター」とは、蝸牛細胞中で下流ポリヌクレオ  
チドの発現を誘導するのに十分である、NCBI Reference Sequence: NG\_009191に由来する  
調節ポリヌクレオチド配列をいう。1つの態様において、PCDH15プロモーターは、PCDH15  
コード配列の上流の少なくとも約350、500、1000、2000、3000、4000、5000またはそれよ  
り多くの塩基対を含む。

【0035】

「タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプQ (PTPRQ) プロモーター」とは、蝸  
牛細胞中で下流ポリヌクレオチドの発現を誘導するのに十分である、GeneID: 374462に由  
来する調節ポリヌクレオチド配列をいう。1つの態様において、PTPRQプロモーターは、PT  
PRQコード配列の上流の少なくとも約350、500、1000、2000、3000、4000、5000またはそ  
れより多くの塩基対を含む。

40

【0036】

「脂肪腫HMGIC融合パートナー様5 (LHFPL5) プロモーター」(「TMHSプロモーター」と  
も呼ばれる)とは、蝸牛細胞中で下流ポリヌクレオチドの発現を誘導するのに十分である  
、NCBI Reference Sequence: GeneID: 222662に由来する調節ポリヌクレオチド配列をい  
う。1つの態様において、TMHSプロモーターは、PCDH15コード配列の上流に少なくとも約3  
50、500、1000、2000、3000、4000、5000またはより多くの塩基対を含む。

50

## 【0037】

「作用物質」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは小さな化合物をいう。

## 【0038】

「改善する」とは、疾患または障害の発症または進行を低下させる、抑制する、弱める、減らす、阻止する、または安定化することをいう。

## 【0039】

「変性」とは、本明細書に記載されるものなどの標準的な既知の方法によって検出される、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性の変化（増減）をいう。本明細書において使用される変性は、発現レベルの10%の変化、好ましくは発現レベルの25%の変化、より好ましくは40%の変化、もっとも好ましくは50%以上の変化を含む。

10

## 【0040】

本開示において、「含む」、「含み」、「含有し」、および「有し」などは、米国特許法においてそれらに与えられる意味を有することができ、「含む」、「含み」などを意味することができ；「から本質的になり」または「から本質的になる」などは、米国特許法において与えられる意味を有し、この用語は開放型であり、記載されるもの以外の存在によって記載されるものの基本的または新規な特徴が変わることがない限り、記載されるもの以外の存在をも許すが、従来技術態様を除外する。

## 【0041】

「検出する」とは、検出されるべき分析対象物の存在、非存在または量を識別することをいう。

20

## 【0042】

「疾患」とは、細胞、組織、または器官の正常な機能を損傷または妨害する任意の状態または障害をいう。疾患の例は、たとえば対象の内耳中に発現する、メカノセンセーショントランスダクションにおいて機能するタンパク質中の機能の損失を特徴とする遺伝子疾患を含む。もう1つの態様において、疾患はアッシャー症候群（たとえばUSH1）または加齢性聴力喪失である。1つの態様において、疾患は、遺伝子異常、たとえばTMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7、USH1C（たとえばホルモンa、b、またはc）の異常と関連する聴覚障害である。

## 【0043】

「有効量」とは、未処置の患者に対して疾患の症状を改善するために必要な作用物質の量をいう。疾患の治療処置のために本発明を実施するために使用される活性物質の有効量は、投与方法、対象の年齢、体重および健康状態に依存して異なる。最終的には、主治医または獣医が適切な量および用法・用量を決定する。そのような量が「有効量」と呼ばれる。

30

## 【0044】

「断片」とは、ポリペプチドまたは核酸分子の一部をいう。この部分は、好ましくは、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を含む。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000のヌクレオチドまたはアミノ酸を含有し得る。

40

## 【0045】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸塩基間の、ワトソン・クリック型、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合であり得る水素結合をいう。たとえば、アデニンとチミンが、水素結合の形成を通して対を成す相補的核酸塩基である。

## 【0046】

用語「単離された」、「精製された」、または「生物学的に高純度の」とは、自然な状態で見いだされたとき通常それに付随する成分を様々な程度に含まない物質をいう。「単離」とは、供給源または周囲からのある程度の分離を指す。

## 【0047】

「精製」とは、単離よりも高い程度 of 分離を指す。「精製された」または「生物学的に

50

高純度の」タンパク質は、任意の不純物がタンパク質の生物学的性質に実質的に影響しない、または他の有害な結果を生じさせない程度に十分に、他の物質を含まない。すなわち、本発明の核酸またはペプチドは、組換えDNA技術によって産生される場合、細胞物質、ウイルス物質、または培地を実質的に含まないならば、または化学合成される場合、化学的前駆体または他の薬品を含まないならば、精製されている。純度および均一性は通常は、分析化学技術、たとえばポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液クロマトグラフィーを使用して測定される。用語「精製された」は、電気泳動ゲル中で核酸またはタンパク質が本質的に1つのバンドしか生じさせないことを指すことができる。修飾、たとえばリン酸化またはグリコシル化に付されることができるタンパク質の場合、様々な修飾によって、別々に精製され得る様々な単離されたタンパク質が生じ得る。

10

#### 【0048】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、本発明の核酸分子が由来する生物の天然ゲノム中で当該遺伝子に隣接する遺伝子を含まない核酸（たとえばDNA）をいう。したがって、この語は、たとえば、ベクターに組み込まれている組換えDNA；自律複製性プラスミドもしくはウイルスに組み込まれている組換えDNA；原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれている組換えDNA；または他の配列から独立した別個の分子（たとえば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって産生されたcDNAまたはゲノムもしくはcDNA断片）として存在する組換えDNAを含む。加えて、この用語は、DNA分子から転写されるRNA分子およびさらなるポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAを含む。

20

#### 【0049】

「単離されたポリペプチド」とは、自然にはそれに付随する成分から分離されている本発明のポリペプチドをいう。概して、ポリペプチドは、少なくとも60重量％が、天然においてそれが会合しているタンパク質および天然の有機分子を含まないとき、単離されている。好ましくは、調製物は、少なくとも75％、より好ましくは少なくとも90％、もっとも好ましくは少なくとも99％が本発明のポリペプチドである。本発明の単離されたポリペプチドは、たとえば、天然の供給源からの抽出によって、そのようなポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって；または、タンパク質の化学合成によって、得られ得る。純度は、任意の適切な方法、たとえばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって計測することができる。

30

#### 【0050】

「マーカー」とは、疾患または障害と関連して発現レベルまたは活性の変化を示す任意のタンパク質またはポリヌクレオチドをいう。

#### 【0051】

本明細書において使用される「作用物質を得る」におけるような「得る」は、作用物質を合成する、購入する、または他のやり方で取得することを含む。

#### 【0052】

「プロモーター」とは、下流ポリヌクレオチドの転写を誘導するのに十分なポリヌクレオチドをいう。

#### 【0053】

「減らす」とは、少なくとも10％、25％、50％、75％、または100％の負の変化をいう。

40

#### 【0054】

「参照」とは、標準または対照条件をいう。

#### 【0055】

「参照配列」とは、配列比較のベースとして使用される規定の配列である。参照配列は、指定された配列のサブセットまたは全体；たとえば完全長cDNAもしくは遺伝子配列のセグメントまたは完全なcDNAもしくは遺伝子配列であり得る。ポリペプチドの場合、参照ポリペプチド配列の長さは概して、少なくとも約16アミノ酸、好ましくは少なくとも約20アミノ酸、より好ましくは少なくとも約25アミノ酸、さらに好ましくは約35アミノ酸、約50ア

50

ミノ酸、または約100アミノ酸である。核酸の場合、参照核酸配列の長さは概して、少なくとも約50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約60ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約75ヌクレオチド、さらに好ましくは約100ヌクレオチドまたは約300ヌクレオチドまたはそれらの周辺もしくは間の任意の整数である。

#### 【0056】

本発明の方法に有用な核酸分子は、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子を含む。そのような核酸分子は、内在性核酸配列に対して100%同一である必要はないが、概して実質的な同一性を示す。内在性配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは概して、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることができる。本発明の方法に有用な核酸分子は、本発明のポリペプチドまたはその断片をコードする任意の核酸分子を含む。そのような核酸分子は、内在性核酸配列に対して100%同一である必要はないが、概して実質的な同一性を示す。内在性配列に対して「実質的な同一性」を有するポリヌクレオチドは概して、二本鎖核酸分子の少なくとも1つの鎖とハイブリダイズすることができる。

10

#### 【0057】

「ハイブリダイズする」とは、様々なストリンジェンシーの条件下、相補的ポリヌクレオチド配列（たとえば、本明細書に記載される遺伝子）間でまたはその部分の間で二本鎖分子を形成するために対を成すことをいう（たとえば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507を参照）。

20

#### 【0058】

たとえば、ストリンジェントな塩濃度は通常、約750mM NaClおよび75mMクエン酸三ナトリウム未満、好ましくは約500mM NaClおよび50mMクエン酸三ナトリウム未満、より好ましくは約250mM NaClおよび25mMクエン酸三ナトリウム未満である。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、有機溶媒、たとえばホルムアミドの非存在において得ることができ、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、少なくとも約35%ホルムアミド、より好ましくは少なくとも約50%ホルムアミドの存在において得ることができる。ストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約30℃、より好ましくは少なくとも約37℃、もっとも好ましくは少なくとも約42℃の温度を含む。様々なさらなるパラメータ、たとえばハイブリダイゼーション時間、洗浄剤、たとえばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の濃度およびキャリヤDNAの包含または非包含が当業者に周知である。これら様々な条件を必要に応じて組み合わせることにより、様々なレベルのストリンジェンシーが達成される。好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウムおよび1% SDS中、30℃で実施される。より好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、500mM NaCl、50mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、35%ホルムアミドおよび100 µg/ml 変性サケ精子DNA（ssDNA）中、37℃で実施される。もっとも好ましい態様において、ハイブリダイゼーションは、250mM NaCl、25mMクエン酸三ナトリウム、1% SDS、50%ホルムアミドおよび200 µg/ml ssDNA中、42℃で実施される。これらの条件に対する有用な変更が当業者には容易に理解されよう。

30

#### 【0059】

大部分の応用の場合、ハイブリダイゼーションに続く洗浄工程もまた、ストリンジェンシーにおいて異なる。洗浄ストリンジェンシー条件は、塩濃度および温度によって決めることができる。上記のように、洗浄ストリンジェンシーは、塩濃度を下げることによって、または温度を上げることによって、高めることができる。たとえば、洗浄工程のためのストリンジェントな塩濃度は、好ましくは、約30mM NaClおよび3mMクエン酸三ナトリウム未満であり、もっとも好ましくは、約15mM NaClおよび1.5mMクエン酸三ナトリウム未満であろう。洗浄工程のためのストリンジェントな温度条件は通常、少なくとも約25℃、より好ましくは少なくとも約42℃、さらに好ましくは少なくとも約68℃を含む。好ましい態様において、洗浄工程は、30mM NaCl、3mMクエン酸三ナトリウムおよび0.1% SDS中、25℃で実施される。より好ましい態様において、洗浄工程は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナト

40

50

リウムおよび0.1% SDS中、42 で実施される。より好ましい態様において、洗浄工程は、15mM NaCl、1.5mMクエン酸三ナトリウムおよび0.1% SDS中、68 で実施される。これらの条件に対するさらなる変更が当業者には容易に理解されよう。ハイブリダイゼーション技術は当業者に周知であり、たとえば、Benton and Davis (Science 196:180, 1977) ; Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975) ; Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001) ; Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York) および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

#### 【0060】

10

「実質的に同一」とは、ポリペプチドまたは核酸分子が参照アミノ酸配列（たとえば、本明細書に記載されるアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（たとえば、本明細書に記載される核酸配列のいずれか1つ）に対して少なくとも50%の同一性を示すことをいう。好ましくは、そのような配列は、比較に使用される配列に対してアミノ酸レベルまたは核酸において少なくとも60%、より好ましくは80%または85%、より好ましくは90%、95%、または99%同一である。

#### 【0061】

配列同一性は一般的に、配列分析ソフトウェア（たとえば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAPまたはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を使用して計測される。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失および/または他の修飾にホモロジー度を割り当てることにより、同一または類似の配列をマッチさせる。保存的置換は一般的に以下のグループ内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニンおよびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を測定するための例示的手法においてはBLASTプログラムが使用され得、 $e^{-3} \sim e^{-100}$ の間の確率スコアが、密接に関連する配列を示す。

20

#### 【0062】

「対象」とは、ヒトまたは非ヒト哺乳動物、たとえばウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、またはネコをはじめとする哺乳動物をいう。

30

#### 【0063】

「導入遺伝子」とは、作為的に細胞に挿入され、その細胞から発生する生物のゲノムの一部となる、または、線虫導入遺伝子の場合、遺伝性染色体外アレイの一部となる、DNAの任意のピースをいう。そのような導入遺伝子は、トランスジェニック生物にとって部分的または完全に異種（すなわち外因性）である遺伝子を含み得る、または生物の内在性遺伝子に相同な遺伝子を表し得る。

#### 【0064】

本明細書に提供される範囲は、範囲内の値のすべてのための省略表現であると理解されよう。たとえば、1~50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群からの任意の数、数の組み合わせ、または部分範囲を含むことが理解されよう。

40

#### 【0065】

本明細書において使用される用語「治療する」、「治療」などは、障害および/またはそれに伴う症状を軽減または改善することをいう。障害または状態の治療は、障害、状態またはそれに伴う症状が完全に解消されることを要求しない（除外はされないが）ということが理解されよう。

#### 【0066】

具体的に述べられない、または文脈から明白でない限り、本明細書において使用される用語「または」は包括的であると理解されよう。具体的に述べられない、または文脈から

50

明白でない限り、「1つの」、「ある」、および「その」は単数でも複数でもあるということが理解されよう。

【0067】

具体的に述べられない、または文脈から明白でない限り、本明細書において使用される用語「約」は、当技術分野における通常の許容範囲内、たとえば平均値の2標準偏差内と理解されよう。「約」は、述べられた値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内と理解することができる。そうでないことが文脈から明白でない限り、本明細書に提供されるすべての数値は用語「約」によって修飾される。

【0068】

本明細書における変数の任意の定義における化学的グループのリストの記載は、任意の1つのグループまたはリストされたグループの組み合わせとしての当該変数の定義を含む。本明細書における変数または局面に関する態様の記載は、任意の1つの態様としての当該態様または任意の他の態様もしくはその部分との組み合わせとしての当該態様を含む。

【0069】

本明細書に提供される任意の組成物または方法は、本明細書に提供される他の組成物および方法のいずれの1つまたは複数と組み合わせることができる。

【0070】

別段の定めがない限り、本明細書において使用されるすべての科学技術用語は、方法および物質組成が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等である方法および材料を方法および物質組成の実施または試験に使用することもできるが、適当な方法および材料が本明細書に記載される。加えて、材料、方法および例は例示でしかなく、限定的であることを意図したものではない。本明細書において挙げられるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0071】

パート1：高効率蝸牛遺伝子導入

【図1】図1A~1Gは、一連の顕微鏡写真(A)および6つのグラフ(B~G)を提供する。天然AAV血清型およびAnc80のインビボ蝸牛形質導入。(A) Alexa-546ファロイジン(赤)で対比染色され、eGFP(緑 本明細書を通しては中間および下パネル中の明るい染色として示される)に関して画像化されたマウスコルチ器の共焦点画像。マウスに対し、各パネルの上に示す力価でAAVストック溶液1  $\mu$ Lを注入した。スケールバー = 50  $\mu$ m。(B) AAV-eGFP注入蝸牛の基底および頂端におけるeGFP陽性IHCの定量。(C) AAV-eGFP注入蝸牛の基底および頂端におけるeGFP陽性OHCの定量。C57BL/6マウスの一方の耳に注入を実施した：5匹(AAV1)、4匹(AAV2)、2匹(AAV8)、1匹(AAV6)、3匹(Anc80)。(D) eGFP陰性OHC(黒)およびeGFP陽性OHC(緑)からP7(左)で記録された感覚トランスダクション電流の群。毛束を-0.1~1  $\mu$ mの間で0.1  $\mu$ m刻みで偏向させた。垂直スケールバーは200pAを示し；水平スケールバーは20msecを示す。eGFP陰性(黒)およびeGFP陽性(緑)P35 IHCからの電流が右に示されている。垂直スケールバーは100pAを示し；水平スケールバーは20msecを示す。(E) 下に示す年齢の103のIHCおよびOHCに関してプロットされた感覚トランスダクション電流振幅。eGFP陰性(黒)およびeGFP陽性(緑)からのデータが示されている。各グループ中の細胞の数がグラフに示されている。すべてのマウスに対してP1で注入を実施した。(F) 平均値  $\pm$  標準偏差(SD)。4つのAnc80注入耳(緑)および4つの非注入耳(黒)に関してプロットされたABR閾値ならびに注入関連の損傷のせいでeGFP蛍光を示さなかった1つの注入耳(赤)からのデータ。(G) 平均値  $\pm$  SD。4つのAnc80注入耳(緑)および4つの非注入耳(黒)ならびにeGFP蛍光を示さない、注入損傷を有する1つの陰性対照耳(赤)に関するDPOAE閾値がプロットされている。B~G中のデータ点の注入力価はAにおけるものと同様である。

【図2】図2A~2Dは、前庭感覚上皮中のAnc80-eGFP形質導入を示す画像である。(A) Anc

10

20

30

40

50



80-eGFP1  $\mu\text{L}$  ( $1.7 \times 10^{12}$  GC/mL) を注入されたP1マウスからのマウス卵形嚢。組織をP10で採取し、固定し、Alexa546ファロイジン (赤) で染色し、eGFP (緑) に関して画像化した。eGFP陽性細胞の複数の焦点面の形態学的評価は、検査したすべての試料において、I型細胞のステレオタイプのフラスコ形態およびII型細胞の円柱形態の形質導入を実証した (図示せず)。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。(B) パネルAに関して記載した同じマウスの半規管後部の稜。スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ 。(C) ヒト卵形嚢の感覚上皮。組織を  $10^{10}$  個のGC Anc80 .CMV .eGFP .WPRES に24時間曝露し、10日間培養し、固定し、Alexa546ファロイジン (赤) で染色し、eGFP蛍光 (緑) に関して画像化した。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。(D) Alexa546ファロイジン (赤) およびMyo7A (青) で染色され、Cと同一の条件で形質導入されたeGFP (緑) に関して画像化された卵形嚢中のヒト上皮の高倍率図。オーバーレイパネル中の白い矢印は、選択されたeGFP陽性 / Myo7A陽性細胞を示す。スケールバー = 20  $\mu\text{m}$ 。

【図3】図3A~3Eは、Anc80を用いたマウス蝸牛中の広範な内有毛細胞および外有毛細胞形質導入を示す画像である。(A) P1でAnc80-eGFP1  $\mu\text{L}$  ( $1.7 \times 10^{12}$  GC/mL) を注入されたマウス蝸牛の頂端部全体の低倍率画像。蝸牛をP10で採取し、Alexa546ファロイジン (赤) で染色し、eGFP (緑) に関して画像化した。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。(B) P1でAnc80-493 eGFP1  $\mu\text{L}$  ( $1.7 \times 10^{12}$  GC/mL) を注入された異なるマウス蝸牛からの基底部の高倍率画像。蝸牛をP10で採取し、Alexa546ファロイジン (赤) で染色し、eGFP (緑) に関して画像化した。スケールバー = 20  $\mu\text{m}$ 。(C、D) P1~2のC57BL/6マウスの正円窓注入後のすべての血清型に関する等用量での内有毛細胞および外有毛細胞の形質導入効率の定量的比較。C、Dのマウス蝸牛に  $1.36 \times 10^{12}$  個のAAV1、AAV2、AAV8およびAnc80を注入し、落射蛍光顕微鏡検査による生細胞画像化および定量的のために7~9日で採取した (1グループあたり  $n=8$ )。(E) Anc80有毛細胞形質導入の用量依存性。2つの異なるAnc80-eGFP力価 ( $1.8 \times 10^{12}$  対  $1.36 \times 10^{12}$  GC) に曝露した蝸牛を固定し、Alexa546ファロイジン (赤) で染色し、eGFP (緑) に関して画像化した。スケールバー = 20  $\mu\text{m}$ 。

【図4】図4A~4Bは、Anc80蝸牛形質導入後の前庭機能を示す、それぞれ画像およびグラフである。P1でRWMを介してマウスにAnc80 .CMV .eGFPを注入し、ロータロッド装置上で発現および平衡機能に関して評価した。前庭組織中のeGFP (緑色) の発現は、Myo7A (赤) に関する免疫蛍光染色を用いた共焦点顕微鏡検査によるものである (A)。ロータロッドデータは、注入対照と非注入対照との間に差がないことを明らかにした。マウスが装置から落ちるまでの平均時間 + / - SEMがプロットされている。N = 3匹、それぞれ5回試行 (注入) および2匹、それぞれ5回試行 (対照) (B)。スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ 。

#### 【0072】

パート2：遺伝子治療はアッシャー症候群1C型のマウスモデルにおいて聴覚および前庭機能を回復させる

【図5】図5A~5Lは、P8のUsh1c c.216G > A変異体マウス中のコルチ器の走査電子顕微鏡検査結果を示す画像である。(A~F) P8のc.216GA ( $n=3$  マウス) およびc.216AA ( $n=4$  マウス) 変異体マウスにおけるコルチ器の基底、中間および頂端領域を画像化した。OHCおよびIHC毛束はヘテロ接合型マウスにおいては保存されたが、一部の毛束はホモ接合型216AAマウスにおいてはコルチ器に沿って崩壊しているように見えた。(G~L) 高倍率画像が、すべてではないが多くのOHC (G~H) およびIHC (I~J) において、断片化され、崩壊した束と階段状配列の崩壊を明らかにした。P8で器官の中央領域で画像化されたOHC毛束の例は、同じ標本中に存在する保存された毛束 (K) および崩壊した毛束 (L) を示す。星印は保存された毛束を示し；矢じりは崩壊した毛束を示し；矢印は波状のIHC束を示す。スケールバー 低倍率：5  $\mu\text{m}$  (A~F)；高倍率：2  $\mu\text{m}$  (G)、3  $\mu\text{m}$  (H)、2  $\mu\text{m}$  (I-863 J) および1  $\mu\text{m}$  (K、L)。

【図6】図6A~6Hは、Ush1c c.216G > A新生仔変異体マウスの有毛細胞におけるメカノトランスダクションを示す画像である。(A~D) 透過性スチリル色素FM1-43を使用して、c.216GAおよびc.216AAマウスの有毛細胞中のオープントランスダクションチャネルの存在を評価した。コルチ器中、P4で、c.216AAマウスの感覚有毛細胞中のFM取り込みは減少した (A~B、中間基底)。IHC FM1-43蛍光は、IHCが異なる焦点面にあるため、よりうす暗く

見えることに注目すること。左：DIC、右：FM1-43；スケールバー10  $\mu\text{m}$ 。卵形囊中、FM1-43取り込みは、P6ではc.216AA変異体中のストリオーラ外領域に限定され（C；スケールバー50  $\mu\text{m}$ ）、卵形囊有毛細胞は、DICによる評価では、概ね正常な束形態を保持した（D；スケールバー10  $\mu\text{m}$ ）。パネルD上の白線は、ストリオーラ領域（取り込みなし）とストリオーラ外領域（取り込みあり）との境界を画定する。実験を3回繰り返した。（E~H）新生仔c.216GAおよびc.216AAマウスにおいてOHC、IHCおよびVHC中のメカノトランスダクションを評価した（記録されたマウスの数は、それぞれ、OHCの場合、 $n=7$ 、6、IHCの場合、 $n=2$ 、4およびVHCの場合、 $n=2$ 、6であり、細胞の数は棒グラフの上に示されている）。代表的なトランスダクション電流（E）、二次ボルツマン関数に当てはめたそれらの関連する電流/変位プロット（F）および平均ピークトランスダクション電流（G~H）がプロットされている。蝸牛中、P3~P6で、器官の中および中~頂回転で記録を得た。卵形囊中、P5とP7との間でストリオーラ外およびストリオーラ領域のVHCからトランスダクション電流を記録した（E~F）。DIC下で毛束はよく保存されているように見えたが、c.216AA変異体においては、より小さな平均トランスダクション電流が誘発された（H）。平均ピークトランスダクションは、OHC、IHCおよびVHC中、2つの遺伝子型間で有意に異なっていた（\*\*\* $P<0.01$ 、一元配置ANOVA）。

【図7】図7A~7Eは、インビトロおよびインビボでアデノ随伴ウイルスベクターに曝露された組織中の蛍光標識ハーモニンの発現および局在化を示す画像である。（A~C）速やかに解体したP0~P1内耳組織をAAV2/1ベクターに24時間曝露し、培養状態で7~8日維持したのち固定し、対比染色し（Alexa Fluorファロイジン、Invitrogen）、Zeiss LSM共焦点顕微鏡で画像化した。多数の感覚有毛細胞が野生型卵形囊に感染し、EGFPに融合したハーモニンb1の発現が大部分の有毛細胞中で明白であり、特に感覚毛束の頂端に局在化していた（A、スケールバー：10  $\mu\text{m}$ -上パネル；5  $\mu\text{m}$ -下パネル）。同様に、EGFP::harmonin-b1の発現が、c.216AAおよび野生型マウスのOHCおよびIHC中、不動毛の先端で明白であった（B、スケールバー：10  $\mu\text{m}$ ；C、スケールバー：3  $\mu\text{m}$ ）。P1でAAV2/1.CMV.EGFP::harmonin-b1ベクターを注入すると、P60で、左注入耳中のいくつかのIHCおよびOHC中でEGFPシグナルが検出された（D、スケールバー：30  $\mu\text{m}$ ）。P0でAAV2/1.CMV.tdTomato::harmonin-a1に24時間曝露されたP7器官型培養物中、IHCおよびOHCの細胞体中に外因性tdTomato::harmonin-a1が検出された（E、スケールバー：5  $\mu\text{m}$ ）。特に感覚細胞の基底で、おそらくはリボンシナプスの近くで、いくつかのハーモニンa1斑点がCTBP2（青；マウス抗CTBP2 1/200、BD bioscience）と共局在化していた。不動毛束中に発現は認められなかった。

【図8】図8A~8Cは、Anc80ハーモニンベクターを注入されたマウスの有毛細胞中のメカノトランスダクションの回復を示す画像である。（A~C）c.216AA非注入対照マウス（ $n=8$ 細胞、マウス1匹）およびP1でAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたc.216AAマウス（0.8  $\mu\text{L}$ 、 $n=15$ 細胞、マウス1匹）およびP1でAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1とAAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1との組み合わせを注入されたc.216AAマウス（0.5  $\mu\text{L}$  + 0.5  $\mu\text{L}$ 、 $n=7$ 細胞、マウス1匹）のIHC中、メカノトランスダクション電流を記録した。P6で器官型培養物を調製し、P15とP16との間で記録を実施した（9~10DIV）。c.216AAマウスの毛束刺激によって小さなメカノトランスダクション電流を誘導することができたが、ハーモニンb1の発現またはハーモニンa1とb1との二重発現を駆動するベクターを注入されたc.216AAマウスにおいて、より大きな電流が誘発された（A）。各データセットの対応するI/X曲線および二重ボルツマン当てはめ関数。それぞれの最大メカノトランスダクション電流 $I_{\text{max}}=102.1\text{pA}$ （c.216AA）；424.3pA（c.216AA + ハーモニンb1）および341.1pA（c.216AA + ハーモニンa1 & b1）（B）。平均反応（平均値  $\pm$  S.D.）は、非注入マウスと比べて、ハーモニンb1注入マウスおよびハーモニンa1 + b1注入マウスの場合にトランスダクションの有意な回復（\*\*\* $P<0.001$ ）を示す。平均トランスダクション電流は、ハーモニンb1注入マウスとc.216GA対照マウスとで有意に異ならなかった（N.S.  $P>0.5$ ）。ハーモニンaとハーモニンbとを組み合わせた場合でも、メカノトランスダクションの回復は有意には改善しなかった。（C）一元配置ANOVA。

【図9】図9A~9Eは、P1でAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたマウスにおけるABR

およびDPOAE閾値回復を示す画像である。(A) 6週齢c.216AA対照マウスおよびハーモニンa1、ハーモニンb1、または2つの組み合わせをコードするベクターをP1でRWMを介して注入されたc.216AAマウスにおける16kHzトーンの場合の代表的なABR反応。ハーモニンb1のみを注入された、またはハーモニンa1およびb1をいっしょに注入されたマウスにおいて、30 dB SPLに近い回復したABR閾値が計測された。(B) c.216AA (n = 13) ; c.216GA (n = 12) ; c.216AA + ハーモニンa1 (n = 12) ; c.216AA + ハーモニンb1 (n = レスキュー19 / 試験25) ; c.216AA + ハーモニンa1 & b1 (n = レスキュー6 / 試験11) に関して得られた平均ABR反応。平均値  $\pm$  S.E、連続線。点線：16kHz記録がパネルAに示されているマウスにおける全周波数範囲のABR閾値。(C) c.216AA (n = 13) ; c.216GA (n = 12) ; c.216AA + ハーモニンa1 (n = 12) ; c.216AA + ハーモニンb1 (n = レスキュー15 DPOAE < 70dB SPL / 試験25) ; c.216AA + ハーモニンa1 & b1 (n = レスキュー4 DPOAE < 70dB SPL / 試験11) に関して得られた平均DPOAE反応。平均値  $\pm$  S.E、連続線。点線：その記録がパネルAに示されている4匹のマウスの場合のDPOAE閾値。矢印は、閾値が、試験した最大刺激レベルよりも高いことを示す。(D~E) 45dB以下の初期ABR閾値を示した8匹のマウスにおいて6週および3月で得られたABRおよびDPOAE反応。8匹のマウスのうち6匹を6ヶ月間飼育し、ABRおよびDPOAEを評価した(点線)。平均値  $\pm$  SE。最初の3ヶ月間、ABRおよびDPOAE閾値シフトは明白であったが、6月齢で、低めの低周波数範囲における聴覚レスキューは依然として顕著であった。

【図10】図10A~10Eは、P1でAAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1およびAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたマウスにおける驚愕反応、ロータロッドパフォーマンスおよびオープンフィールド行動回復を示す画像である。(A) 6週齢の対照c.216GA、c.216AAおよびc.216AA注入マウスにおいて、ホワイトノイズ刺激に対する驚愕反応を記録した。ハーモニンa1ではなくハーモニンb1を注入されたマウスにおいて部分的な驚愕レスキューが明白であった(データは対照c.216AAマウスと重複する)。平均は  $\pm$  S.Eで示されている。(B) 対照c.216GA、c.216AAおよびc.216AA注入マウスにおいて、ロータロッドパフォーマンスを4~6週で記録した。ハーモニンb1およびハーモニンa1/b1を注入されたマウスにおいて完全な回復が認められた。ハーモニンa1単独では回復は認められなかった。平均は  $\pm$  S.Eで示されている。(C~E) 6週齢の対照c.216GA、c.216AAおよびc.216AAおよびc.216GA注入マウスにおいてオープンフィールド観察を5分間実施した。2.5分間の代表的なトラックが示されている(B)。c.216AA変異体マウスはフィールド全体を探索し、繰り返し全身を回転させるが、P1でハーモニンa1、ハーモニンb1、または2つのベクターの組み合わせを注入されたc.216AAマウスは、ヘテロ接合型c.216GA対応物または切断型ベクターを注入されたc.216GAマウスに類似する正常な行動を示す。(C)。グラフは、回転数および1分あたりの移動距離に関して平均値  $\pm$  SDを示す。非注入マウスと注入マウスとの間で有意な回復\*\* \*P < 0.001が認められた。一元配置ANOVAによる統計的解析。

【図11】AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたマウスにおけるコルチ器の走査電子顕微鏡検査画像である。P1で注入(RMW注入0.8  $\mu$ l AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1)を受けたc.216GA、c.216AA、およびc.216AAマウスにおいて6週でコルチ器の基底、中間、および頂端領域を画像化した。OHCおよびIHC毛束は、c.216GAマウスにおいては保存されたが、c.216AAマウスにおいてはコルチ器に沿って崩壊しているように見えた。c.216AAマウスにおいて顕著な有毛細胞損失(星印)および毛束崩壊が認められ、器官の基底端における縮退がより顕著であった。c.216AAマウスの毛束は正常な不動毛列を欠いていた。低めの列は収縮しているように見えたが、もっとも高い列はc.216AAマウスにおいて維持されていた(矢印)。有毛細胞損失および束崩壊は、レスキューされたc.216AAマウスにおいても明白であったが、有毛細胞生存率は、器官の基底および中間領域において顕著に高かった。有毛細胞数が棒グラフにまとめられている。合計1824個の細胞がc.216AAマウス(4つの耳)において数えられ、792個がレスキューされたc.216AAマウス(2つの耳)において数えられた。平均値  $\pm$  SE。高倍率画像は、注入を受けたc.216AAマウス(矢印)における、全部ではないが多くの細胞(矢じり)中の階段状配列のレスキューを明らかにする。スケールバー低倍率：5  $\mu$ m；高倍率：1  $\mu$ m。

10

20

30

40

50

【図 1 2】図12A～12Lは、P18のUsh1c c.216G>Aマウスにおける毛束形態の分析をSEMによって示す画像である。(A～C)ヘテロ接合型c.216GAマウスはP18で正常な毛束形態を示した。(D～I)P18のホモ接合型c.216AA変異体マウスの器官に沿って崩壊した毛束が認められた。(J～L)c.216AAマウスにおいてIHC毛束が軽度崩壊していた。頂点から計測した距離：基底3.5～4mm；中間1.8～2.2mm；頂端0.6～0.8mm。スケールバー低倍率：5  $\mu$ m；高倍率：1  $\mu$ m。

【図 1 3】図13A～13Jは、c.216AA変異体マウスにおけるメカノトランスダクション性質を示す画像である。(A～E)蝸牛の中および中～頂回転からの新生仔OHC中のメカノトランスダクションの分析、P3～P6。～Po=0.5からの代表的な電流トレースを二重指数関数減衰関数に当てはめて、c.216GAおよびc.216AA変異体における順応を評価した(A)。当てはめを使用して、高速時定数(C)および低速時定数(D)ならびに順応の程度(E)を生成した。10～90%作動範囲は有意に変化しなかった(B)。c.216AAマウスにおける順応の程度は、この散布図に示すヘテロ接合型OHCよりも有意に低かった(E)。(F～J)新生仔IHC中のメカノトランスダクションの分析。10～90%作動範囲値は、c.216AA IHCに対し、c.216GA IHC中で小さかった(G)。c.216AA IHC中のわずかに低い速さおよび有意に小さな程度にもかかわらず、順応は常に存在した(H～J)。統計的解析が各プロットに示されている：\*P<0.05、\*\*P<0.01および\*\*\*P<0.001、一元配置ANOVA。

【図 1 4】図14A～14Cは、P1でのデュアルベクター注入から6週での、c.216AAコルチ器中の蛍光標識ハーモニンaおよびハーモニンb Anc80ベクターの発現を示す画像である。(A～C)AAV2/Anc80.CMV.tdTomato::harmonin-a1 (0.5  $\mu$ l；4.11E<sup>12</sup>gc/ml)およびAAV2/Anc80.CMV.eGFP::harmonin-b1 (0.5  $\mu$ l；2.99E<sup>12</sup>gc/ml)のP1同時注入後、6週齢c.216AAマウスにおける基底回転の共焦点画像。全細胞数の69%および74%がそれぞれeGFP(A)およびtdTomato(C)を発現し、65%が両方のマーカーを発現して、同時形質導入の成功を実証した。スケールバー：20  $\mu$ m。

【図 1 5】図15A～15Fは、6週齢対照c.216GAマウスおよび注入を受け、レスキューされたc.216AAマウスにおけるABR反応の分析を示すデータである。(A、D)対照c.216GAおよびレスキューされたc.216AAマウスに関する8および16kHzでのABR反応の例。(B～C、E～F)匹敵しうる閾値を有する6週齢マウスにおける8～11.3および16kHzでの平均ピーク1振幅(B～D)および潜時(C～D)(n=8 c.216GA、n=5 c.216AA+ハーモニンb1 RWM P1)。平均値±S.E。一元配置ANOVA。

【図 1 6】図16A～16Dは、Ush1c c.216G>Aマウスにおいて発現したハーモニンの変異体形態が有毛細胞または聴覚機能を変化させないことを示す。(A)野生型ハーモニンb1タンパク質と、Ush1c遺伝子のエクソン3中のアカディアN>G変異を伴う隠れたスプライシングおよびフレームシフトの結果として分泌される切断型ハーモニンとの間の配列アラインメント。(B)P2～P3野生型マウス、c.216GAおよびc.216AA変異体マウスの聴覚器官からの半定量的RT-PCRが、c.216GAおよびc.216AAマウスにおける野生型(450bp)および切断型(-35bp)ハーモニンの発現を確認させる。(C～D)6週齢c.216GA注入マウスならびに対照c.216GAおよびc.216AAマウスにおいて聴性脳幹反応(ABR、C)および歪成分耳音響放射(DPOAE、D)を計測した。プロットは平均値±S.Eとして示されている。対照216GAマウスに対し、注入を受けたマウスにおいて閾値シフトは認められなかった。

【図 1 7】図17A～17Cは、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入された6週齢マウスの内耳中の正しいUsh1cスプライシングの回復を示す画像である。(A)Ush1c.216Aアレルからの正しくスプライシングされた(450bp)および異常な(415bp)mRNAの半定量的RT-PCR定量が、c.216AAレスキューマウス#1および#2の注入耳(I)および反対側耳(C)における正しいUsh1cスプライシングの回復を示す(注入耳からの11.3kHzで35dBのSPL反応)。不十分なABR反応(11.3kHzで90dB SPL)のマウス#3は、正しいmRNA発現の適度な回復を示し、マウス#4(11.3kHzで100dB SPL)は何も示さない。非注入c.216AAマウス(マウス#5、6)においては正しいスプライスフォームは検出されないが、c.216GAマウス(マウス#7、8、9)においては、正しいスプライスフォームおよび切断型スプライスフォームの両方が検出されている。下パネルに示す対応するマウスGapdhは、物質の相対量を確認するために

増幅したものである。(B) 半定量放射能標識PCR分析は、Ush1c.216AAマウスの注入耳および反対側耳中のAAV-mUsh1cの存在を確認させる。相対レベルのAAV-mUsh1c DNAが存在したが、マウス#3および#4においては低下していた。(C) 相対量のAAV-mUsh1cがABR閾値と相関する。11.3および16kHzの場合の分析が示されている。線形回帰が2つの間の高い相関を示す。

【図18】長期的ABR閾値回復が聴覚器官の中間～頂端領域におけるOHC生存率と相関することを示すグラフである。6月齢の3匹の非注入c.216AAおよび5匹の注入c.216AA (P1 RWM注入、0.8  $\mu$ l AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1) の左耳で、死後にコルチ器全体の有毛細胞計数を実施した。インサート：5.6～16kHzの音刺激に対し、マウスの2匹 (#1および#2) は試験範囲全体で低いABR反応閾値を示し (95dB SPL)、3匹 (#3～5) は35～55dB SPLの閾値範囲で反応した。IHCおよびOHC有毛細胞の総数は注入マウスにおいて増加していた。レスキューされた注入マウスと、低いレスキューを示した注入マウスとの比較は、IHCの数は異ならないが、有意な数のOHCがレスキューマウスにおいて認められたことを示す。器官の全長にわたる分析が、この差を器官の中間領域から頂端領域までの有毛細胞生存率の増大として説明づけることができることを示した。

【0073】

パート3：聴力喪失に関与するさらなる変異の遺伝子治療

【図19】図19A～19Dは、P2でAnc80-harmonin::GFP (すなわち、GFPがハーモニンポリペプチドに融合している) 1ml ( $6 \times 10^{12}$ gc/ml) をRWMを介して注入され、P9で採取され、アクチン (赤；19A)、Myo7a (青；19B) で染色され、GFP (緑；19C) に関して画像化されたUsh1c変異体マウスからの蝸牛の代表的な共焦点画像である。(19A)、(19B) および(19C) の合成画像が(19D) に示されている。

【図20】Ush1c変異体マウス (四角) およびAnc80-Harmonin::GFPベクターを注入されたUsh1c変異体マウス (丸) に関して音周波数の関数としてプロットされたABR閾値を示すグラフである。

【図21】図21A～21Cは、高倍率の非注入蝸牛 (21C) に対する、P2でAnc80-KCNQ4 1  $\mu$ l ( $6 \times 10^{12}$ gc/ml) をRWMによって注入され、P9で採取され、Alexa 546ファロイジン (赤) およびKCNQ4に対する抗体 (緑) で染色されたKCNQ4-/-蝸牛の、低倍率 (21A) および高倍率 (21B) での代表的な共焦点画像である。

【図22】図22A～22Cは、P10の野生型マウス (22A)、P10のKCNQ4-/-マウス (22B) およびRWMを介してAnc80-KCNQ4 ( $2.4 \times 10^{13}$ gc/ml) を注入されたP10のKCNQ4-/-マウス (22C) におけるKCNQ4電流を示す一連のグラフである。注入から8日後に蝸牛を採取した。

【図23】Anc80-CMV-Tmc1ベクターを注入されたTmc1-/-組織におけるFM1-43取り込み (FM1-43は機能的Tmc1チャネルのみを透過する) の一連の3つの画像である。P2のTmc1-/-マウスに対し、RWMを介してAnc80-CMV-Tmc1ベクター ( $2.4 \times 10^{13}$ gc/ml) を注入し、注入から6～7日後に蝸牛を採取した。

【図24】図24Aは、P10の野生型マウス (左)、P10のTmc1-/-マウス (中間) およびRWMを介してP2でAnc80-CMV-Tmc1 ( $2.4 \times 10^{13}$ gc/ml) を注入されたP10のTmc1-/-マウス (右) のIHCから記録された感覚トランスダクション電流の代表的な群を示す。注入から8日後に蝸牛を採取した。図24Bは、図24Aに示すマウスの回復率のグラフ表示である。図24B中のグラフは、野生型マウス (左)、Tmc1-/-マウス (中間) およびAnc80-CMV-Tmc1を注入されたTmc1-/-マウス (右) における機能細胞の割合を示す。

【図25】歪成分耳音響放射 (DPOAE) 閾値を、野生型、Tmc1-/-マウスおよびAnc80-CMV-Tmc1を注入されたTmc1-/-マウスの場合の刺激周波数の関数として示すグラフである。

【図26】図26A～26Cは、発現に対する様々なプロモーターの効果を示す。図26Aは、有毛細胞および支持細胞におけるAnc80-Pcdh15-GFP発現を示し、GFPおよびミオシン7aが指示されるように示され、有毛細胞がミオシン7a (有毛細胞マーカー) について赤く染色されている。図26Bは、Anc80-Myo6-GFPを、GFP発現を示す内有毛細胞および外有毛細胞とともに示す。この実験の場合、対比染色はなかった。図26Cは、Anc80-KCNQ4-GFPを、GFP発現を示す外有毛細胞とともに示す。有毛細胞を照らすために組織をファロイジンで対比染

10

20

30

40

50

色した。

【発明を実施するための形態】

【0074】

詳細な説明

本発明は、聴覚および/または前庭機能を含むメカノセンセーションに必要なタンパク質（たとえばTMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C（たとえばハーモニンa、b、またはc））を、当該タンパク質のレベルまたは活性の損失または低下を有する対象の内耳の細胞、たとえば蝸牛細胞（たとえば内有毛細胞または外有毛細胞）中に送達し、発現させるための組成物および方法を提供する。

10

【0075】

本発明は、少なくとも部分的に、Anc80カプシドをコードする合理的に設計された合成ベクター（「Anc80ベクター」）が蝸牛への効率的な導入遺伝子送達に有用であり；また、このベクターを使用して、アッシャー症候群のマウスモデルの内耳に野生型Ush1cを送達することができるという発見に基づく。正円窓膜注入が、マウスの内有毛細胞および外有毛細胞の非常に効率的な形質導入（従来のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを上回る実質的な改善）を生じさせた。Anc80正円窓注入は、感覚細胞機能、聴覚および前庭機能、ならびに免疫学的パラメータによって示されるように、良好な忍容性を示した。複雑な聴覚機能の回復のための要件である、Anc80が外有毛細胞を高比率でターゲティングする能力が、聴覚および平衡障害のための将来の遺伝子療法を可能にし得る。Ush1cをコードするAnc80ベクターを注入されたマウスは、ほぼ野生型レベルまでの、遺伝子およびタンパク質発現の回復、感覚細胞機能の回復、複雑な聴覚機能のレスキュー、ならびに聴覚および平衡行動の回復を実証した。データは、内耳機能の前例のない回復を表し、難聴を治療するための生物学的療法が遺伝性内耳障害の人への応用に適し得ることを示す。

20

【0076】

アッシャー症候群

ヒトアッシャー症候群（USH）は、盲聾の原因である希な遺伝子疾患である。常染色体劣性形質として遺伝し、米国において16,000～20,000人を冒し、幼児期難聴の3～6%の原因である。アッシャー症候群は、症状の重度にしたがって3つの臨床亜型（USH-1、2、および3）に分類される。USH1が最重症型である。USH1に冒された患者は、先天性の両側性重度感音性聴力喪失、前庭反射消失、および思春期前の網膜色素変性症（網膜の桿体および錐体機能の進行性両側性対称性縮退）を病む。人工内耳を装着しない限り、個体は一般的に発声能力を発達させない。現在、アッシャー患者のための生物学的治療は存在しないが、欠陥遺伝子の野生型形態の早期再導入が疾患の好転を許し得る。

30

【0077】

6つのアッシャー遺伝子：MYO7A（ミオシン7a）、USH1C（ハーモニン）、CDH23（カドヘリン23）、PCDH15（プロトカドヘリン15）、SANS（sans）、およびCIB2（カルシウムおよびインテグリン結合タンパク質2）がUSH1に関連している。これらの遺伝子は、内耳中の毛束形態形成に関与し、インタラクトームの一部であるタンパク質をコードする（たとえば、Mathur & Yang, 2015, Biochim. Biophys. Acta, 1852:406-20を参照）。ハーモニンはUSH1インタラクトームの中心に存在し、そこで他のUsher1タンパク質に結合する。そのPDZ（PSD-59 95/Dlg/ZO-1）相互作用ドメインのために、ハーモニンは、足場タンパク質として機能することが提唱されてきた。インビトロの結合研究により、すべての他の既知のUSH1タンパク質が、USH2タンパク質の2つであるUsherinおよびVLGR1と同様、ハーモニンのPDZドメインに結合することを示した。USH1C遺伝子は28のエクソンからなり、これらのエクソンは、タンパク質のドメイン組成に依存して3つの異なるサブクラス（a、b、およびc）に分類される、ハーモニンの10種のオルタナティブスプライス形態をコードする。3つのアイソフォームは、PDZタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、コイルドコイル（CC）ドメイン、およびプロリン-セリン-トレオニン（PST）リッチドメインの数において異なる。

40

50

## 【0078】

USH1タンパク質は、多数の細胞外リンクによって相互接続された何百もの不動毛で構成されているメカノセンセーション毛束中の有毛細胞の頂端に局在化している。カドヘリン23およびプロトカドヘリン15は、Usher遺伝子（それぞれUSH1DおよびUSH1E）の産物であり、不動毛の遠位端に位置する感覚系を形成する。ハーモニンbは、CDH23、PCDH15、Fアクチンおよびそれ自体に結合する。これは、有毛細胞の感覚系挿入点の近くの不動毛の先端に見られ、そこで、有毛細胞中のトランスダクションおよび順応において機能的役割を演じると考えられている。ハーモニンbは出生後早期に発現するが、その発現は、蝸牛および前庭の両方において出生後30日（P30）ごろに減少する。ハーモニンaもまた、カドヘリン23に結合し、不動毛中に見られる。最近の報告がシナプスにおけるハーモニンaのさらなる役割（Cav1.3 Ca<sup>2+</sup>チャンネルと会合して、ユビキチン依存性経路を介するチャンネル利用可能性を制限する）を明らかにした。

10

## 【0079】

アッシャー症候群のいくつかのマウスモデルが過去10年にわたり同定または操作され、そのうちの7つはハーモニンに影響を及ぼす。これらのうち、1つのモデル、Ush1c c.216G>Aモデルだけが、ヒトアッシャー症候群を特徴づける聴覚および網膜両方の異常を再現する。Ush1c c.216G>Aは、フランス系アカディア人USH1C患者のコホートにおいて見られるものに類似する点変異のせいで、すべての従来のハーモニンアイソフォームの発現に影響するノックインマウスモデルである。変異は、Ush1c遺伝子のエクソン3の端部に隠れたスプライス部位を導入する。この隠れたスプライス部位の使用が、35bp欠失を有するフレームシフト転写産物を生成し、PDZ、PST、およびCCドメインを欠く重度に切断されたタンパク質の翻訳を生じさせる。ホモ接合型c.216AAノックインマウスは1月齢で重度の聴力喪失をこうむるが、ヘテロ接合型c.216GAマウスは任意の異常な表現型を呈しない。c.216AAマウスにおける蝸牛組織診は、P30で、中および基底回転中、崩壊した毛束、異常な細胞列ならびに内および外両方の有毛細胞の損失を示す。

20

## 【0080】

本明細書において、祖先AAVカプシドタンパク質を含有するAAVが、有毛細胞にうまく形質導入し、ハーモニンスプライスフォームの発現および正確な局在化を駆動するということが実証される。さらには、本明細書において、本明細書に記載される、祖先AAVカプシドタンパク質を含有するAAVの出生後早期の正円窓膜注入がホモ接合型c.216AAマウスにおける聴覚および前庭機能をうまく回復させるということが実証される。注入を受けたマウスにおける聴覚機能の回復は、野生型ハーモニンをコードするmRNA発現の回復ならびに毛束形態およびメカノトランスダクションの保存と関連している。本明細書に提供される結果は、本明細書に記載される祖先AAVカプシドタンパク質を含有するAAVを使用する野生型ハーモニンの早期再導入がUSH1Cの治療に有用であり得ることを実証する。

30

## 【0081】

## TMC1/TMC2

難聴を生じさせる40を超える異なる変異がTMC1において同定されている。これらは、35の劣性変異および5つの優性変異へと細分される。劣性変異の大多数は重度の先天性聴力喪失を生じさせるが（たとえばDFNB7/11）、少数は晩期発症型の中～重度の聴力喪失を生じさせる。優性変異のすべてが、十代半ばに発症する、進行性の聴力喪失を生じさせる（たとえばDFNA36）。特に、本明細書に記載されるAnc80カプシドタンパク質を含むAAVベクターは、非変異体（たとえば野生型）TMC1配列またはTMC2配列を送達し、それによって、聴力喪失（たとえば、さらなる聴力喪失）を予防する、および/または聴覚機能を回復させるために使用することができる。

40

## 【0082】

## 聴力喪失の治療のための治療戦略

成体哺乳動物蝸牛の感覚細胞は自己修復能力を欠くため、現在の治療戦略（障害のレベルおよび正確な位置に依存する）は、増幅（補聴器）、より良い音声伝達（中耳プロテーゼ/アクティブインプラント）または直接神経刺激（人工内耳）に依存して、聴覚神経を

50

形成し、音響情報を脳へと中継する一次感覚有毛細胞またはらせん神経節ニューロンへの永久的損傷を補償する。これらの手法は変革的であったが、現代生活にとって重要な複雑なヒト聴覚機能の回復においては依然、最適からはほど遠い。特に、主な問題はさらに、限られた周波数感度、不自然な音声知覚および騒がしい環境における限られた語音弁別を含む。

#### 【 0 0 8 3 】

蝸牛への治療的遺伝子導入が、加齢性および環境誘発性の聴力喪失から遺伝的な難聴形態に及ぶ現在の標準的治療をさらに改善すると考えられてきた。300を超える遺伝子座が、記載された70を超える原因遺伝子による遺伝性聴力喪失と関連付けられている (Parker & Bitner-Glindzicz, 2015, Arch. Dis. Childhood, 100:271-8)。これらの手法における治療の成功は、蝸牛中のコルチ器 (OC) 中の関連する治療標的細胞への外因性遺伝子構築物の安全かつ効率的な送達に有意に依存する。

10

#### 【 0 0 8 4 】

OCは、2つのクラスの感覚有毛細胞：音によって運ばれた機械的情報を、ニューロン構造に伝達される電気シグナルへと変換するIHC；および蝸牛反応を増幅し、調整する（複雑な聴覚機能に必要なプロセス）ように働くOHCを含む。内耳中の他の潜在的標的は、らせん神経節ニューロン、らせん板縁の円柱細胞を含み、これらは、隣接する蓋膜または支持細胞（保護機能を有し、早期新生児期までに有毛細胞へと分化転換するように誘発されることができる）の維持に重要である。

20

#### 【 0 0 8 5 】

高カリウム内リンパ液で満たされている蝸牛管への注入が有毛細胞への直接アクセスを提供することができる。しかし、この精巧な流体環境への変更は、蝸牛内電位を乱して、注入関連毒性のリスクを高めるおそれがある。蝸牛管、鼓室階、および前庭階を包囲する外リンパで満たされた空間は、中耳から、前庭窓膜または正円窓膜 (RWM) のいずれかを通してアクセスすることができる。内耳に通じる唯一の非骨質開口部であるRWMは、多くの動物モデルにおいて比較的容易にアクセス可能であり、この経路を使用するウイルスベクターの投与は良好に忍容される。ヒトにおいて、人工内耳の配置は慣例的に、RWMに通す外科的電極挿入に依存する。

#### 【 0 0 8 6 】

器官型蝸牛外植片およびインビボ内耳注入においてAAV血清型を評価した以前の研究が遺伝性難聴のマウスモデルにおいて部分的にのみ聴力レスキューを生じさせている。予想外に、祖先AAVカプシドタンパク質を含有するアデノ随伴ウイルス (AVV) が高い効率でOHCに形質導入する。この知見は、従来のAAV血清型を使用する蝸牛遺伝子療法の開発の成功を制限してきた低い形質導入率を克服する。本明細書に記載される祖先AAVカプシドタンパク質を含有するAAVは、IHCおよびOHCならびに遺伝性聴覚および平衡障害によって損なわれる他の様々な内耳細胞型への内耳遺伝子送達のための貴重なプラットフォームを提供する。高い形質導入率を提供することに加え、本明細書に記載される祖先AAVカプシドタンパク質を含有するAAVは、全身注射時、マウスおよび非ヒト霊長類において類似した安全性プロファイルを有することが示され、循環AAVとは抗原的に異なり、従来のAAVベクターの効能を制限する既存の免疫に関して潜在的な利益を提供する。

30

40

#### 【 0 0 8 7 】

しかし、細胞、特に内耳内、たとえば蝸牛中の細胞（または蝸牛の細胞もしくは蝸牛細胞）への、TMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C（たとえばハーモニンa、bまたはc）の1つまたは複数をコードするポリヌクレオチドの発現を誘導する核酸（たとえばAAVベクター、たとえばプロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS (LHFPL5)）を含むANC80ベクター）の高効率送達を可能にする組成物および方法が本明細書に記載される。本明細書において使用される内耳細胞とは、非限定的に、内有毛細胞 (IHC)、外有毛細胞 (OHC)、らせん神経節ニューロン、血管条、前庭有毛細胞、前庭神経節ニューロン、および支持細胞をいう。支持細胞は、興奮性ではない耳の中の細胞、たとえば、有毛細胞またはニューロンではない

50



細胞をいう。支持細胞の一例がシュワン細胞である。

【 0 0 8 8 】

本明細書に記載される核酸の1つまたは複数の核酸の内耳細胞への送達は、概して部分的聴力喪失または完全な聴力消失によって定義される、任意の数の遺伝性または後天性聴覚障害を治療するために使用することができる。本明細書に記載される方法は、聴覚障害、たとえば非限定的に、劣性難聴、優性難聴、アッシャー症候群および他の症候群性難聴ならびに外傷または加齢による聴力喪失を治療するために使用することができる。

【 0 0 8 9 】

特定の導入遺伝子を保有するウイルスを作製する方法

本明細書に記載されるように、祖先AAVカプシドタンパク質を含有するアデノ随伴ウイルス (AAV) は、核酸 (たとえば、TMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C (たとえばハーモニンa、b、またはc) の1つまたは複数のコードするポリヌクレオチドをはじめとする導入遺伝子) を内耳細胞に送達する場合に特に効率的であり、特に有効なクラスの祖先AAVカプシドタンパク質は、SEQ ID NO: 1に示される、Anc80と指定された祖先足場カプシドタンパク質によって指定される。Anc80ベクターが、好都合にも内有毛細胞または外有毛細胞の約60%、70%、80%、90%、95%超、または100%に形質導入した内耳有毛細胞ターゲティングAAVの一例である。Anc80祖先カプシドタンパク質のクラスに入るある特定の祖先カプシドタンパク質がAnc80-0065 (SEQ ID NO: 2) であるが、全体として参照により本明細書に組み入れられるWO2015/054653が、Anc80祖先カプシドタンパク質のクラスに入るさらなる祖先カプシドタンパク質をいくつか記載している。

10

20

【 0 0 9 0 】

特定の態様において、アデノ随伴ウイルス (AAV) は、有毛細胞のための天然の、または操作された向性を有する祖先AAVカプシドタンパク質を含有する。いくつかの態様において、ウイルスは、導入遺伝子 (たとえば、TMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C (たとえばハーモニンa、b、またはc) の1つまたは複数のコードするポリヌクレオチド) を対象の内耳に送達する内耳有毛細胞ターゲティングAAVである。いくつかの態様において、ウイルスは、精製されたカプシドポリペプチドを含むAAVである。いくつかの態様において、ウイルスは人工ウイルスである。いくつかの態様において、ウイルスは祖先AAV配列を含有する。いくつかの態様において、ウイルスは、AAV2よりも低い血清陽性率を有するAAVである。いくつかの態様において、ウイルスはエクソーム関連AAVである。いくつかの態様において、ウイルスは、Anc80カプシドタンパク質に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性または相同性を有するカプシドタンパク質を含む。

30

【 0 0 9 1 】

Anc80カプシドタンパク質を含有する、本明細書に記載されるウイルスは、多様な核酸を内耳細胞に送達するために使用することができる。1つの態様において、TMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 USH1C (たとえばハーモニンa、b、またはc) の1つまたは複数のコードするポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーター (たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS (LHFPL5)) を含む内耳有毛細胞ターゲティングAAV (たとえばANC80ベクター)。発現のために細胞に送達される核酸配列はしばしば導入遺伝子と呼ばれる。内耳細胞に送達され、その中で発現することができる代表的な導入遺伝子は、非限定的に、聴覚および/または前庭メカノセンセーションにおいて機能するポリペプチドをコードする導入遺伝子 (たとえばTMC1、TMC2、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7 (たとえばハーモニンa、b、またはc))、神経栄養因子をコードする導入遺伝子 (たとえばGDNF、BDNF、またはHSP70)、免疫調節タンパク質または抗発癌性転写産物を含む。加えて、内耳細胞に送達され、その中で発現することができる代表的な導入遺伝子はまた、非制限的に、抗体もしくはその断片、アンチセンス、サイレンシングもしくは長鎖非

40

50

コードRNA種またはゲノム編集システム（たとえば、遺伝子改変ジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはCRISPR（クラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート））をコードする導入遺伝子を含む。さらに、内耳細胞に送達され、その中で発現することができる代表的な導入遺伝子は、ACTG1、ADCY1、ATOHI、ATP6V1B1、BDNF、BDP1、BSND、DATSPER2、CABP2、CD164、CDC14A、CDH23、CEACAM16、CHD7、CCDC50、CIB2、CLDN14、CLIC5、CLPP、CLRN1、COCH、COL2A1、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL9A1、COL9A2、COL11A1、COL11A2、CRYM、DCDC2、DFNA5、DFNB31、DFNB59、DIAPH1、EDN3、EDNRB、ELMOD3、EMOD3、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESRRB、EYA1、EYA4、FAM65B、FOXI1、GIPC3、GJB2、GJB3、GJB6、GPR98、GRHL2、GPSM2、GRXCR1、GRXCR2、HARS2、HGF、HOMER2、HSD17B4、ILDR1、KARS、KCNE1、KCNJ10、KCNQ1、KCNQ4、KITLG、LARS2、LHFPL5、LOXHD1、LRTOMT、MARVELD2、MCM2、MET、MIR183、MIRN96、MITF、MSRB3、MT-RNR1、MT-TS1、MYH14、MYH9、MYO15A、MYO1A、MYO3A、MYO6、MYO7A、NARS2、NDP、NF2、NT3、OSBPL2、OTOA、OTOF、OTOG、OTOGL、P2RX2、PAX3、PCDH15、PDZD7、PJVK、PNPT1、POLR1D、POLR1C、POU3F4、POU4F3、PRPS1、PTPRQ、RDX、S1PR2、SANS、SEMA3E、SERPINB6、SLC17A8、SLC22A4、SLC26A4、SLC26A5、SIX1、SIX5、SMAC/DIABLO、SNAI2、SOX10、STRC、SYNE4、TBC1D24、TCOF1、TECTA、TIMM8A、TJP2、TNC、TMC1、TMC2、TMIE、TMEM132E、TMPRSS3、TRPN、TRIOBP、TSPEAR、USH1C、USH1G、USH2A、USH2D、VLGR1、WFS1、WHRN、およびXIAと指定された核酸を含む。特定の態様において、導入遺伝子は、MYO7A、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7、USH1C（たとえばハーモニンa、b、またはc）の1つまたは複数である。

#### 【0092】

導入遺伝子の発現は、導入遺伝子の天然のプロモーター（すなわち、トランスジェニックコード配列とともに天然に見られるプロモーター）によって、または異種プロモーター（たとえばCMVプロモーター、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS（LHFPL5）プロモーター）によって誘導され得る。たとえば、本明細書に記載される導入遺伝子はいずれも、その天然のプロモーターとともに使用されることができる。または、本明細書に記載される導入遺伝子はいずれも異種プロモーターとともに使用されることができる。本明細書において使用される異種プロモーターとは、その配列の発現を天然において誘導しない（すなわち、自然界においてその配列とともに見られない）プロモーターをいう。本明細書に示される導入遺伝子のいずれかの発現を誘導するために使用することができる代表的な異種プロモーターは、たとえば、CMVプロモーター、CBAプロモーター、CASIプロモーター、Pプロモーター、およびEF-1プロモーター、アルファ9ニコチン受容体プロモーター、プレスチンプロモーター、Gfi1プロモーター、およびVglut3プロモーターを含む。加えて、上記導入遺伝子の1つの発現を自然に誘導するプロモーター（たとえばKCNQ4プロモーター、Myo7aプロモーター、Myo6プロモーター、またはAt oh1プロモーター）を、導入遺伝子の発現を誘導するための異種プロモーターとして使用することができる。他の態様において、プロモーターは、Espinプロモーター、PCDH15プロモーター、PTPRQプロモーター、およびTMHS（LHFPL5）プロモーターである。

#### 【0093】

Anc80カプシドタンパク質を含有するウイルス中にパッケージングするための導入遺伝子（たとえばTMC1、TMC2、USH1C（たとえばハーモニンa、b、またはc）、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7）を作製する方法は当技術分野において公知であり、従来の分子生物学および組換え核酸技術を利用する。1つの態様において、Anc80カプシドタンパク質をコードする核酸配列を含む構築物および適当な逆位末端反復（ITR）が隣接する導入遺伝子を保有する構築物が提供され、これが、導入遺伝子がAnc80カプシドタンパク質内にパッケージングされることを可能にする。

#### 【0094】

導入遺伝子は、たとえば、パッケージング宿主細胞を使用して、Anc80カプシドタンパク質を含有するAAV中にパッケージングすることができる。本明細書に記載される1つまたは複数の構築物を使用して、ウイルス粒子の構成要素（たとえばrep配列、cap配列、逆位

末端反復 ( ITR ) 配列 ) を一時的または安定的にパッケージング宿主細胞に導入することができる。本明細書に記載されるウイルスは、少なくともAnc80カプシドタンパク質を含有し；ウイルス粒子の他の構成要素（たとえばrep配列、ITR配列）は祖先配列または現代の配列に基づくことができる。いくつかの例において、たとえば、ウイルス粒子全体が祖先配列に基づくことができる。そのようなウイルスは、慣例的方法を使用して精製することができる。

#### 【 0 0 9 5 】

概して、本明細書において使用される「核酸」は、DNAおよびRNAを含むことができ、1つまたは複数のヌクレオチド類似体または骨格修飾を含む核酸をも含むことができる。核酸は、通常はその所期の用途に依存して、一本鎖または二本鎖であることができる。本明細書に記載される方法に使用することができる核酸は、既知の核酸配列と同一であることもできるし、そのような既知の配列とは配列において異なることもできる。単に実例として、核酸（またはコードされるポリペプチド）は、既知の配列に対して少なくとも75%の配列同一性（たとえば、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有することができる。

10

#### 【 0 0 9 6 】

配列同一性%値を計算する際、2つの配列をアラインメントし、2つの配列の間でのヌクレオチドまたはアミノ酸残基の完全な一致の数を決定する。完全な一致の数をアラインメントされた領域の長さ（すなわち、アラインメントされたヌクレオチドまたはアミノ酸残基の数）で割り、100を掛けて、配列同一性%値を求める。アラインメントされた領域の長さが、最短の配列の完全長サイズまでの、一方または両方の配列の部分であることができることが理解されよう。また、1つの配列を、1よりも多い他の配列に対してアラインメントすることができ、したがって、アラインメントされた各領域の間で異なる配列同一性%値を有することができることが理解されよう。

20

#### 【 0 0 9 7 】

配列同一性%値を決定するための2つ以上の配列のアラインメントは、コンピュータプログラムClustalWおよびデフォルトパラメータを使用して実施され、これは、核酸またはポリペプチド配列のアラインメントをその長さ全体で実施することを可能にする（グローバルアラインメント）。Chenna et al., 2003, Nucleic Acids Res., 31(13):3497-500。ClustalWは、クエリーと1つまたは複数の対象配列との間のベストマッチを計算し、それらをアラインメントして、同一性、類似性、および差が決定されるようにする。配列アラインメントを最大化するために、1つまたは複数の残基のギャップをクエリー配列、対象配列または両方に挿入することができる。核酸配列のペアワイズアラインメントの場合には、デフォルトパラメータを使用し（すなわち、ワードサイズ：2；ウィンドウサイズ：4；スコアリング法：%値；トップダイアゴナルの数：4；およびギャップペナルティ：5）；多重核酸配列のアラインメントの場合には、以下のパラメータ：ギャップ開始ペナルティ：10.0；ギャップ伸長ペナルティ：5.0；およびウエイトトランジション：あり、を使用する。ポリペプチド配列のペアワイズアラインメントの場合には、以下のパラメータ：ワードサイズ：1；ウィンドウサイズ：5；スコアリング法：%値；トップダイアゴナルの数：5およびギャップペナルティ：3、を使用する。ポリペプチド配列の多重アラインメントの場合には、以下のパラメータ：ウエイトマトリックス：BLOSUM ( blocks substitutio n matrix ) ；ギャップ開始ペナルティ：10.0；ギャップ伸長ペナルティ：0.05；親水性ギャップ：オン；疎水性残基：Gly、Pro、Ser、Asn、Asp、Gln、Glu、ArgおよびLys；ならびに残基特異的ギャップペナルティ：オン、を使用する。ClustalWは、たとえば、World Wide Web上、Baylor College of Medicine Search LauncherウェブサイトまたはEuropean Bioinformatics Instituteウェブサイトで行うことができる。

30

40

#### 【 0 0 9 8 】

核酸配列に変更を導入することができ、それが、その核酸配列がコード配列である場合には、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列の変更をもたらすことができる。たとえ

50

ば、変更は、変異誘発（たとえば部位特異的変異誘発、PCR媒介変異誘発）を使用することによって、またはそのような変更を有する核酸分子を化学合成することによって、核酸コード配列に導入することができる。そのような核酸変更は、1つまたは複数のアミノ酸残基における保存的および/または非保存的アミノ酸置換を招くことができる。「保存的アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基が、類似する側鎖を有する異なるアミノ酸残基で置換されることであり（たとえば、アミノ酸置換の頻度表を提供する、Dayhoffら（1978, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(Suppl. 3):345-352）を参照）、非保存的置換とは、アミノ酸残基が、類似する側鎖を有しないアミノ酸残基で置換されることである。

#### 【0099】

10

核酸は、ベクターまたはプラスミドとも呼ばれ得る構築物内に含めることができる。構築物は、市販されてもいるし、当技術分野において慣例的な組換え技術によって作製することもできる。核酸を含有する構築物は、そのような核酸の発現を誘導および/または調節する発現エレメントを有することができ、また、構築物を維持するための配列（たとえば複製起点、選択マーカー）などの配列を含むこともできる。発現エレメントは、当技術分野において公知であり、たとえば、プロモーター、イントロン、エンハンサー配列、応答エレメントまたは誘導エレメントを含む。

#### 【0100】

##### 医薬組成物

通常は生理学的に適合性の賦形剤中に懸濁した、プロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5））と、USH1、MYO7A、USH1C（ハーモニンa、b、c）、CDH23、PCDH15、SANS、およびCIB2の1つまたは複数であるポリヌクレオチドを含む内耳有毛細胞ターゲティングAAV（たとえばAnc805ベクター）は、正円窓を通して対象の内耳に注入することにより、対象（たとえばヒトまたは非ヒト哺乳動物）に投与することができる。適当な担体は、多様な緩衝溶液（たとえばリン酸緩衝生理食塩水）、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、および水で調合され得る生理食塩水を含む。内耳有毛細胞ターゲティングAAVは、細胞に形質導入し、または感染させ、過度な有害作用なしで治療的利益を提供するのに十分なレベルの遺伝子導入および発現を提供するのに十分な量で投与される。

20

#### 【0101】

30

対象に投与される内耳有毛細胞ターゲティングAAVの用量は、主に、治療される状態ならびに対象の年齢、体重および健康状態などの要因に依存する。たとえば、ヒト対象に投与される内耳有毛細胞ターゲティングAAVの治療有効用量は、概して、AAVのゲノムコピー（GC）約 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{12}$ 個（たとえばGC約 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ 個）の濃度を含む溶液約0.1ml～約10mlの範囲である。

#### 【0102】

##### 核酸を内耳細胞に送達する方法

核酸を細胞に送達する方法は概して当技術分野において公知であり、導入遺伝子を含有するウイルス（ウイルス粒子と呼ぶこともできる）をインピボで内耳細胞に送達する方法は本明細書に記載されている。本明細書に記載されるように、約 $10^8 \sim 10^{12}$ 個のウイルス粒子を対象に投与することができ、ウイルスは、適当な量（たとえば10 $\mu$ L、50 $\mu$ L、100 $\mu$ L、500 $\mu$ L、または1000 $\mu$ L）の、たとえば人工外リンパ液内に懸濁させることができる。

40

#### 【0103】

本明細書に記載される、プロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5））と導入遺伝子（たとえばTMC1、TMC2、USH1C（たとえばハーモニンa、b、またはc）、MYO7A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、CIB2、USH2A、VLGR1、WHRN、CLRN1、PDZD7）とを含有するウイルスは、任意の数の手段を使用して内耳細胞（たとえば蝸牛中の細胞）に送達することができる。たとえば、本明細書に記載される1つまたは複数の異なるタイプの導入遺伝子を含有するウイルス粒子を含む治療有効量の組成物は、正円窓または卵

50

円窓を通して、概して比較的簡単な（たとえば外来）手順で注入することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される、導入遺伝子を含む、または異なるウイルス粒子の1つまたは複数のセットを含む治療有効数のウイルス粒子を含む組成物（セット中の各粒子は同じタイプの導入遺伝子を含むことができるが、粒子の各セットは他のセットとは異なるタイプの導入遺伝子を含む）は、外科手術（たとえばコクレオストミーまたはカナロストミー）中に耳内の適切な位置に送達することができる。

#### 【0104】

1つの態様において、プロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5））と、USH1、MYO7A、USH1C（ハーモニンa、b、c）、CDH23、PCDH15、SANS、およびCIB2の1つまたは複数であるポリヌクレオチドを含む内耳有毛細胞ターゲティングAAV（たとえばAnc80ベクター）は、それを必要とする対象の正円窓を通して注入される。 10

#### 【0105】

加えて、鼓膜を通過する、および/または正円窓を通る作用物質の移入を容易にする送達ビヒクル（たとえばポリマー）が利用可能であり、任意のそのような送達ビヒクルを、本明細書に記載されるウイルスを送達するために使用することができる。たとえば、Arnold et al., 2005, *Audiol. Neurotol.*, 10:53-63を参照すること。

#### 【0106】

本明細書に記載される組成物および方法は、内耳細胞、たとえば蝸牛細胞への核酸の高効率送達を可能にする。たとえば、本明細書に記載される組成物および方法は、内毛細胞の少なくとも80%（たとえば少なくとも85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%）への導入遺伝子の送達およびその中での発現または外毛細胞の少なくとも80%（たとえば少なくとも85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%）への導入遺伝子の送達およびその中での発現を可能にする。 20

#### 【0107】

本明細書において実証されるように、Anc80カプシドタンパク質を含むAAVを使用して送達された導入遺伝子の発現は、内毛細胞（IHC）、外毛細胞（OHC）、らせん神経節ニューロン、血管条、前庭有毛細胞、および/または前庭神経節ニューロン（たとえばAtoh1、NF2）の再生を生じさせて、聴覚または前庭機能が長期間（たとえば数ヶ月、数年、数十年間、一生涯）回復されるようにすることができる。

#### 【0108】

WO2015/054653に記載されるように、Anc80カプシドタンパク質を含むAAVは、その血清陽性率および/または従来のAAV（すなわち、Anc80カプシドタンパク質を含まないAAV）と比較してそれが中和される程度を特徴とすることができる。当技術分野において、血清陽性率とは、血清陽性である（すなわち、特定の病原体または免疫原に曝露されていた）集団中の対象の割合をいうものと理解され、特定の病原体または免疫原に対して抗体を産生する集団中の対象の数を、検査された集団中の個体の総数で割ったものとして計算される。ウイルスの血清陽性率の決定は、当技術分野において慣例的に実施され、一般的に、イムノアッセイを使用して、特定の個体集団からの試料（たとえば血液試料）中の1つまたは複数の抗体の陽性率を決定することを含む。加えて、血清試料中の中和抗体の程度を決定する方法がいくつか利用可能である。たとえば、中和抗体アッセイは、実験試料が、抗体を含まない対照試料と比較して50%以上感染を中和する抗体濃度を含むところの力価を計測する。Fisherら（1997, *Nature Med.*, 3:306-12）およびManningら（1998, *Human Gene Ther.*, 9:477-85）をも参照すること。代表的な従来のAAVは、非限定的に、AAV8（または、AAV8カプシドタンパク質を含むウイルス）および/またはAAV2（または、AAV2カプシドタンパク質を含むウイルス）を含む。 40

#### 【0109】

キット

本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分（たとえば、プロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5））とUSH1、MYO7A、USH1C（ハーモニンa、b、c）、CDH23、PCDH15、SANS、およびCIB2の1つまたは複数であるポリヌクレオチドを含む内耳 50

有毛細胞ターゲティングAAV（たとえばAnc80ベクター）の1つまたは複数で満たされた1つまたは複数の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。このような容器には、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知（ヒトへの投与に関する製造、使用または販売の、当該機関による承認を反映する）が添付されることができる。

#### 【0110】

本発明はまた、聴覚および/または前庭メカノセンセーションの異常と関連する疾患または障害（またはそれらの症状）の治療または予防のためのキットを提供する。1つの態様において、キットは、プロモーター（たとえばCMV、Espin、PCDH15、PTPRQ、TMHS（LHFPL5））と、USH1、MYO7A、USH1C（ハーモニンa、b、c）、CDH23、PCDH15、SANS、およびCIB2の1つまたは複数であるポリヌクレオチドとを含む内耳有毛細胞ターゲティングAAV（たとえばAnc80ベクター）の有効量を単位剤形で、血管新生と関連する疾患または障害もしくはその症状を病む、またはそれを罹患しやすい対象に血管新生阻害化合物を投与するための指示書とともに含み、血管新生阻害化合物の有効量は500mg未満である。好ましい態様において、キットは、血管新生阻害化合物を収容する無菌容器を含み；そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、プリスタパックまたは当技術分野において公知の他の適当な容器であることができる。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔または薬剤を保持するのに適した他の材料でできていることができる。指示書は概して、血管新生と関連する疾患または障害もしくはその症状の治療のための血管新生阻害化合物の使用に関する情報を含み；好ましい態様において、指示書は、以下：血管新生阻害化合物の詳細な説明；血管新生と関連する疾患または障害もしくはその症状の治療のための投与スケジュールおよび投与；注意事項；警告；適応症；カウンタ表示；過量投与情報；副作用；動物薬理学；臨床試験および/または参照の少なくとも1つを含む。指示書は、容器（存在する場合）に直接印刷されてもよいし、容器に貼り付けられるラベルとして提供されてもよいし、容器中に提供される、または容器とともに提供される別個のシート、パンフレット、カードまたはフォルダとして提供されてもよい。

#### 【0111】

当業者の技能の範囲内の従来の分子生物学、微生物学、生化学および組換えDNA技術を本開示にしたがって使用することができる。そのような技術は文献において十分に説明されている。本発明は、請求の範囲に記載される方法および物質組成の範囲を限定しない以下の実施例においてさらに説明される。

#### 【実施例】

#### 【0112】

実施例1 祖先AAVカプシドタンパク質を含有するアデノ随伴ウイルス（AAV）は安全かつ効率的な蝸牛遺伝子導入を生じさせる

以下の方法および材料を実施例1において使用した。

ウイルスベクター

CMV駆動eGFP導入遺伝子を含むAAV2/1、2/2、2/6、2/8、2/9およびAAV2/Anc80ならびにウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子（WPRE）カセットを、前記のように、Massachusetts Eye and EarのGene Transfer Vector Core（vector.meei.harvard.edu）において調製した。AAV2/Anc80プラスミド試薬はaddgene.comから入手可能である。

#### 【0113】

動物モデルおよび一般的方法

すべての実験は、ボストン小児病院（プロトコル#12-02-2146）およびInstitutional Biosafety Committee（プロトコル#IBC-P00000447）によって承認されたものである。野生型C57BL/6JおよびCBA/CaJマウスをJackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から入手し、両性別のマウスを推定50/50の比で実験に使用した。インビトロおよびインビボ形質転換アッセイならびに後続のエンドポイントのための実験あたりのグループサイズは、検体へのアクセスおよび技術的実現可能性によって決定した。Anc80形質転換に関して報告され

た観察結果を、様々なベクターロットを用いる後続の実験において定性的に確認した（検体への特有かつ限られたアクセス性のため、ヒト前庭組織形質転換は除く）。検体への限られたアクセスおよび報告された知見の定性的性質のため、血清型形質転換効率間の統計的解析は実施しなかった。

#### 【0114】

##### 実施例1A インビボ注入

仔マウス（P0～P2）に対し、斜角研磨したガラスマイクロインジェクションピペットを使用して、正円窓膜（RWM）を介して注入を実施した。P-2000ピペットブラー（Sutter Instrument, Novato, CA）上、ガラス毛管（WPI）からピペットを引き、マイクロピペットベベラ（Sutter Instrument, Novato, CA）を使用して斜角研磨した（先端径約20 μm、角度28°）。手術部位（左乳様突起）を覆うために無菌スワブを使用して、鎮痛のためにEMLAクリーム（リドカイン2.5%およびプリロカイン2.5%）を外部から塗布した。術前、加温パッド上で体温を38℃に維持した。仔マウスを、氷ノ水中で2～3分間、急速な低体温誘導によって麻酔して意識消失させ、手術中、この状態を冷却プラットフォーム上で5～10分間維持した。ベタジンでスクラブし、70%エタノールで拭くことを3回繰り返すことにより、手術部位を消毒した。耳後部の切開を実施して透明な耳胞を露出させ、マイクロピペットを手で耳胞およびその上の筋膜に通し、マイクロピペットの先端をRWMに通した。ウイルス約1 μLを、1分以内に、5匹（AAV1）、4匹（AAV2）、2匹（AAV8）、1匹（AAV6）、3匹（Anc80）のC57BL/6マウスの左耳だけに手で注入した。質および純度などの特定のベクター調製物に関する因子を制御するために、本明細書に提示される本発明者らの定性的知見を確認する、独立した標本からの異なるベクターロットを用いる後続の試験においてAnc80結果を確認した（データは示さず）。グループごとに非盲検的に注入を実施した。時折、注射針を深く挿入しすぎたり、浅く挿入しすぎたり、誤った角度で挿入したりすることがあった。中耳構造または内耳構造に目に見える損傷があった場合、試料をさらなる分析から除外した。注入の成功率は、注入者の経験レベルに依存して、約50%～約80%の範囲であった。注入後、6-0黒色モノフィラメント縫合糸（Surgical Specialties, Wyomissing, PA）を使用して皮膚切開創を閉じた。その後、仔マウスを38℃の加温パッドに戻して5～10分おき、次いで、飼育のために母マウスに戻した。

#### 【0115】

以前の報告と一致して、AAV1は中～高効率でIHCに形質導入した（図1A、1B）。これらの実験は、AAV2、6および8が少数のIHCをターゲティングし、AAV8だけが頂端および基底においておよそ同等の形質転換を実証することを示す（図1B）。また、以前の報告と一致して、試験した従来のAAV血清型すべてでOHC形質導入は最小限であった（<5%）。しかし、Anc80は、20倍（AAV1の場合）～3倍（AAV2の場合）低い用量で、IHCのほぼ100%およびOHCの約90%に形質導入した（図2A～2C）。落射蛍光顕微鏡検査による生細胞画像化によって観察されたように、すべての血清型で等しく $1.36 \times 10^{12}$  GCの用量における形質転換は、Anc80の場合には実質的なIHCおよびOHC形質転換を生じさせたが、AAV1、2および8の場合にはIHCターゲティングは最小限であり、OHC中では認められなかった（図8C、8D）。

#### 【0116】

続いて、Anc80形質転換試料を固定し、染色し、共焦点顕微鏡検査によって画像化して、有毛細胞形質転換の用量依存性を明らかにした（図1E）。比類のないOHCターゲティング（図1C、図3）は、他のAAVに比較して定性的に異なるAnc80の形質転換生物学を示す。類似レベルのAnc80形質転換が、全部で3匹のAnc80注入マウスの蝸牛の基底から頂端までの至る所で見いだされた（図1A、B、C）。蝸牛頂端の低倍率図（図3A）は、注入部位から遠いところで強いeGFP発現を示した。基底の高倍率画像は、100% IHCおよび95% OHC形質転換を明らかにする（図3B）。

#### 【0117】

遺伝性難聴のいくつかの形態は前庭機能不全をも生じさせるため、Anc80は、ヒト前庭器官への遺伝子送達に有用なベクターであり得る。この可能性を調べるために、前庭シュ

ワン細胞腫の切除を受ける成人患者4名からヒト前庭上皮を採取し；前記のように感覚上皮を培養した。AAV形質転換試料の場合、図3Cは、ヒト前庭上皮全体で、有毛細胞および支持細胞の両方における強いeGFP蛍光を明らかにする。図3D中、Myo7Aで対比染色された上皮の高倍率図は、Myo7A陽性有毛細胞の83%（19/23）がeGFP陽性でもあったことを明らかにし、Anc80がマウスおよびヒト両方の有毛細胞を効率的に形質転換することができることを示唆した。

#### 【0118】

##### 実施例1B 有毛細胞電気生理学

蝸牛を切除し、カバーガラスに載せ、63×水浸対物レンズおよび微分干渉コントラストオブティクスを備えたAxio Examiner.A1正立顕微鏡（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）で観察した。MEM（Life Technologies, Carlsbad, CA）のように、137 NaCl、5.8 KCl、10 HEPES、0.7 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.3 CaCl<sub>2</sub>、0.9 MgCl<sub>2</sub>および5.6 D-グルコース（mM単位）、ビタミン（1：100）およびアミノ酸（1：50）を含有する標準液（pH7.4；約310mOsm/kg）中、室温（22～24）で電気生理学的記録を実施した。記録電極（3～4M $\Omega$ ）をR-6ガラス（King Precision Glass, Claremont, CA）から引き、140CsCl、5EGTA-KOH、5HEPES、2.5Na<sub>2</sub>ATP、3.5MgCl<sub>2</sub>および0.1CaCl<sub>2</sub>（mM単位）を含有する細胞内液（pH7.4；約280mOsm/kg）で満たした。ホールセルタイトシール技術を使用して、Axopatch 200B（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）を使用してメカノトランスダクション電流を記録した。有毛細胞を-84mVに維持した。ローパスBesselフィルタによって電流を5kHzでフィルタリングし、12ビット収集ボード（Digidata 1440A、Molecular Devices, Sunnyvale, CA）によって20kHzでデジタル化し、pCLAMP10ソフトウェア（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）を使用して記録した。LVPZT増幅器（E-500.00、Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany）によって駆動されるPICMAチップピエゾアクチュエータ（Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany）に取り付けた堅いガラスプローブを使用して、IHCおよびOHCからの毛束を偏向させ、8ポールBesselフィルタ（Model 3384フィルタ、Krohn-Hite Corporation, Brockton, MA）によって40kHzでフィルタリングして、残留ビペット共振を除去した。堅いガラスプローブは、全束記録のために有毛細胞不動毛の列の凹側面に嵌まるように設計されたものであった（OHCの場合には直径3～4 $\mu$ m、IHCの場合には直径4～5 $\mu$ m）。>P10での全細胞電気生理学記録のために、P5～7で蝸牛組織を解体し、MEM（1×）+1%FBSを含むGluT<sub>1</sub>MAXTM-1培地中、37℃、5%CO<sub>2</sub>で30日間までインキュベートした。

#### 【0119】

P7のOHCおよびP35のIHCから毛束偏向によって誘発された代表的な電流は、eGFP陽性細胞とeGFP陰性対照細胞との間に振幅、感度、または動態の差がないことを明らかにした（図1D）。Anc80への曝露後、1週齢～5週齢の蝸牛のすべての領域から51のeGFP陽性有毛細胞および52のeGFP陰性有毛細胞を記録した。すべての場合において、反応は野生型から区別不可能であり（図1E）、Anc80形質導入が感覚細胞機能に有害な効果を及ぼさないことを確認させた。

#### 【0120】

##### 実施例1E 聴力検査

前記のように、聴性脳幹反応（ABR）および歪成分耳音響放射（DPOAE）データを収集した。DPOAEは、正しい蝸牛増幅および同調のためのアッセイであり、外有毛細胞の生存可能性の高感度な尺度である。麻酔したマウスにおいて試験した刺激は、5.6、8、11.3、16、22.6および32kHzの周波数で音圧レベル10から90dBまで変化させた。4つのAnc80注入耳および4つの非注入耳ならびに注入損傷を有するeGFP蛍光なしの1つの陰性対照耳をP28～P30で分析した。

#### 【0121】

ABRを誘発するために必要な最小限の音閾値をプロットし（図1F）、注入耳と非注入耳との間で閾値の差がないことを明らかにした。組織学的分析が、4つの注入耳すべてにおいて強いeGFP蛍光を明らかにした（データは示さず）。一例においては、eGFP陽性細胞がなく、ABR閾値が上昇し（図1F）、注入が失敗し、針が蝸牛管を破り、永久的な損傷を加



えたおそれがあることを示唆した。Anc80-eGFPによるロバストな外有毛細胞の形質導入にもかかわらず、非注入対照耳と比べ、DPOAE閾値に差は見られなかった（図1G）。したがって、ABRおよびDPOAEからのデータは、RWM注入、Anc80形質導入ならびにIHCおよびOHC中の導入遺伝子発現がすべて聴覚機能にとって安全であることを示す。

#### 【0122】

##### 実施例1F ロータロッド試験

ロータロッド装置上での平衡行動に関して5匹のC57BL/6マウスを試験した。前庭機能が損傷したマウスは、ロータロッド装置上でのパフォーマンスが良くないことが知られている。以前の研究が、一方の耳のみが障害を有する場合に平衡機能不全を検出する、このロータロッド試験の能力を強調している。3匹のマウスに対し、P1で注入を実施し、P36で試験し、2匹の非注入対照マウスをP79で試験した。以下のロータロッドプロトコルを使用してすべてのマウスを試験した。1日目、マウスを、4RPMで回転するロッド上で5分間の平衡を保つよう、訓練した。2日目、マウスを5回の試行（5分間隔）で試験した。試行ごとに、ロッドを2RPMの開始速度から1RPMずつ加速した。マウスが装置から落ちるまでの時間（秒単位）を記録した。

#### 【0123】

蝸牛の外リンパ液は前庭迷路の外リンパ液と連続しているため、蝸牛RWMを介して注入されたAnc80-eGFPが前庭感覚器官に形質導入するかどうかを評価した。実際、前庭上皮の全組織標本は、卵形嚢（重力および直線的な頭の動きに対して敏感な前庭器官）のI型およびII型有毛細胞ならびに回転性の頭の動きに対して敏感である半規管におけるロバストなeGFP発現を明らかにした（図2A、2B）。したがって、Anc80形質導入が平衡に影響し得るという安全性の懸念に対処するために、前庭発現を確認された注入マウスは、前庭機能に関するロータロッド試験に関し、非注入対照と同程度のパフォーマンスを見せた（図4）。

#### 【0124】

パート2：遺伝子療法はアッシャー症候群1c型のマウスモデルにおいて聴覚および前庭機能を回復させる

##### 実施例2 アッシャー症候群のマウスモデル

以下の方法および材料を実施例2において使用した。

##### 組織標本

電気生理学的研究のために、Ush1c c.216G>Aヘテロ接合型またはホモ接合型変異体マウスからの卵形嚢およびコルチ器を出生後0～8日（P0～P8）で採取した。出生後の仔マウスを迅速な断頭によって屠殺した。側頭骨を切除し、10mM HEPES（pH7.4）を添加したMEM（Invitrogen, Carlsbad, CA）に浸漬した。前記（53）のように、酵素を使用せずにコルチ器を切り出した。0.1mg/mlのプロテアーゼ（Protease XXIV, Sigma）による10分間の処理ののち、卵形嚢を取り出した。切除した器官を丸いカバーガラスに載せた。事前にカバーガラスに接着しておいた一對の細いガラス繊維を組織の縁に配置して、組織をフラットな位置で安定させた。組織は、すぐに使用するか、1%ウシ胎仔血清の存在下で培養するかどちらかであった。インビトロでのウイルスベクター感染を伴う実験のために、培養を7～8日間維持し、培地を2～3日ごとに交換した。

#### 【0125】

##### 動物

Ush1c c.216G>Aノックインマウスをルイジアナ州立大学Health Science Centerから入手した。C57BL6バックグラウンド上のインポートされた株を事前にCdh23（Ahl）変異から育種して、加齢性聴力喪失を生じさせた（48、49）。この研究に使用したすべての手順は、実験動物の管理と使用に関するNIH指針に適合し、ボストン小児病院のInstitutional Animal Care and Use Committees（プロトコル#12-02-2146、#14-03-2659Rおよび#15-01-2878R）によって承認されたものであった。トウクリップ（P8の前）またはイヤープンチ（P8の後）を使用してマウスの遺伝子型を決定し、前記（32）のようにPCRを実施した。すべての試験に関し、雄雌マウスをほぼ等しい割合で使用した。他の点では無作為化パラダ

イムは適用しなかった。

#### 【0126】

ウイルスベクター生成

c.216AA変異体マウスの蝸牛から全RNAを単離し(RNAqueous micro kit, Ambion)、QuantiTect Reverse Transcriptionキット(Qiagen)を使用して逆転写した。Trunc-harmoninのcDNAを、Platinum TaqDNAポリメラーゼHigh Fidelity(Invitrogen)およびプライマー: Trunc-harmonin.F(KpnI)

GAG GTA CCA TGG ACC GGA AGG TGG CCC GAG

; Trunc-harmomin.RV(BamHI)

CAG GAT CCG GAC AAT TTC ATC CCC TAC

10

を用いるPCRによって増幅した。387bpのPCR産物を、TAクローニングキット(Invitrogen)によってクローニングし、シーケンシングによって確認した。GFP融合構築物を生成するために、KpnIおよびBamHIを用いて、切断型ハーモニン断片をpEGFP-C1中にサブクローニングした。NheI-XbaI EGFP::trunc-harmonin cDNAをAAVシャトルベクターに導入した。カスタムベクターをAAV2逆位末端反復(ITR)とともにAAV1カプシド中にパッケージングし、その中で、導入遺伝子カセットをCMVプロモーター(AAV2/1.CMV.EGFP::trunc-harmomin.hGH、1.92 E14gc/m、BCH)によって駆動した。

#### 【0127】

ハーモニンa1およびハーモニンb1プラスミドを、Lily ZhengおよびJames Bartles(52)(Department of Cell and Molecular Biology, Northwestern University, Feinberg School of medicine, Chicago, IL)からご厚意で提供されたEGFPタグ付き標識構築物から、本発明者らの研究室において調製した。元々、ハーモニンa1は、マウス腎臓から、ハーモニンb1は、単離されたマウス蝸牛感覚上皮から、それぞれ得られたものであった。本発明者らはさらに、ハーモニンa1構築物を修飾して、そのN末端のEGFPタグをtdTomatoで置換した。蛍光標識された構築物および非標識構築物をAAVベクター中にパッケージングした。ウイルスベクターは、ボストン小児病院のウイルスコア施設およびMassachusetts Eye and Ear InfirmaryのGene Transfer Vector Coreによって生成されたものであった。以下のベクターを生成した: AAV2/1.CMV.tdTomato::harmonin-a1 4.33  $10^{13}$ gc/ml(BCH); AAV2/1.CMV.EGFP::harmonin-b1 2.73 564  $10^{14}$ gc/ml(BCH); AAV2/1.CMV.EGFP-harmonin-a1: 2.81  $10^{12}$ gc/ml(MEEI); AAV2/1.CMV.EGFP-trunc-harmonin; 1.92  $10^{14}$ gc/ml(BCH); AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1: 1.93  $10^{12}$ gc/ml(MEEI); AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1: 1.74  $10^{12}$ gc/ml(MEEI); AAV2/Anc80.CMV.trunc-harm.WPRE: 9.02 567  $10^{12}$ gc/ml(MEEI)。インビトロ実験のために、濃縮ベクター $10\mu\text{l}$ を、1%ウシ胎仔血清の存在下、迅速に解体した組織上、MEM添加培地1mlに24時間適用した。その後、培養を10日間維持した。

20

30

#### 【0128】

正円窓膜(RWM)注入

ボストン小児病院のInstitutional Animal Care and Use Committees動物プロトコル#15-01-2878Rによって承認されたようにRWM注入を実施した。AAVベクター $0.8\mu\text{l}$ ~ $1\mu\text{l}$ をP0~P1およびP10~P12の新生仔マウスに注入した。最初に、P0~P1マウスを低体温曝露によって麻酔し、P10~P12マウスをイソフルランによって麻酔した。麻酔中、耳後部切開を実施して耳胞を露出させ、蝸牛を可視化した。マイクロマニピュレータ(Askew et al., 2015)によって制御されるガラスマイクロピペットを用いて、RWMを通して注入を実施した。10分間、注入物質の量をおよそ $0.02\mu\text{l}$ /分に制御した。標準的な術後ケアを適用した。試料サイズを最適化し、分散を減らすために、インビボ実験のための試料サイズを連続的に測定した。

40

#### 【0129】

電気生理学的記録

144 NaCl、0.7 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5.8 KCl、1.3 CaCl<sub>2</sub>、0.9 MgCl<sub>2</sub>、5.6 D-グルコースおよび10 HEPES-NaOH(mM単位)を含有する、pH7.4および320mOsmol/kgに調節された標準人工外リ

50

ンバ液中で記録を実施した。濃縮物 (Invitrogen, Carlsbad, CA) からビタミン (1:50) およびアミノ酸 (1:100) を添加した。63×水浸対物レンズおよび微分干渉コントラスト光学を備えたAxioskop FS正立顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用して、頂端面から有毛細胞を観察した。記録ピペット (3~5M $\Omega$ ) をハウケイ酸ガラス毛管 (Garner Glass, Claremont, CA) から引き、135 KCl、5 EGTA-KOH、10 HEPES、2.5 K<sub>2</sub>ATP、3.5 MgCl<sub>2</sub>、0.1 CaCl<sub>2</sub> (mM単位) を含有するpH7.4の細胞内液で満たした。全細胞電圧固定下、室温で -64mVの保持電位で電流を記録した。Axopatch Multiclamp 700AまたはAxopatch 200A (Molecular Devices, Palo Alto, CA) を使用してデータを取得し、ローパスBesselフィルタによって10kHzでフィルタリングし、12ビット収集ボード (Digidata 1322) ならびにpClamp8.2および10.5 (Molecular Devices, Palo Alto, CA) を用いて 20kHzでデジタル化した。OriginLabソフトウェアによってデータをオフラインで分析した。別段の記載がない限り、平均値 $\pm$ 標準偏差として表す。

#### 【0130】

##### 統計的解析

再現性を保証するために、各時点で、1グループあたり少なくとも3匹のマウスにおいて試験および対照ベクターを評価した。試料サイズは図の凡例に記されている。RWM注入が成功したすべてのマウスを試験分析に含めた。注入が不成功であったマウスは、平均からは除外したが、完全な開示のために、凡例には含めた。閾値 >90dB SPLのABR回復をもって注入成功と判定した。Origin 2016 (OriginLab Corporation) を用いて統計的解析を実施した。本文および図の凡例に記すように、データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D) または標準誤差 (S.E.M) として表す。一元配置分散分析 (ANOVA) を使用して、平均値間の有意差を決定した。

#### 【0131】

##### 実施例2A 走査電子顕微鏡検査 (SEM)

対照および変異体マウスのコルチ器に沿ってP7、P18および約P42 (6週) でSEMを実施した。P18のSEMは、ワシントン大学のDr. Edwin Rubelとの共同で実施した。内耳を、0.1Mリン酸ナトリウム中4%のグルタルアルデヒド中、4 $^{\circ}$ Cで一晩固定した。翌日、検体を0.1Mリン酸ナトリウムバッファ (PB) で3回すすぎ、氷槽中、0.1M PB中1%の四酸化オスミウム中で30分間後固定した。次いで、検体を0.1M PBですすぎ、段階的な一連のエタノール:35%、70%、95%および100% (×2) に通して脱水した。試料を臨界点乾燥させ、SEMスタブに取り付け、Au/Pdでスパッタ被覆した。JEOL JSM-840A走査電子顕微鏡を使用してSEMを実施した。類似の調製がDr. GeleocおよびDr. IndzhykulianによってP8および6週期で実施されている。コルチ器外植片を、2mM CaCl<sub>2</sub>を添加した0.1Mカコジル酸バッファ (Electron Microscopy Sciences) 中2.5%のグルタルアルデヒド中、室温で1時間固定した。段階的な一連のアセトン中で検体を脱水し、液体CO<sub>2</sub>から臨界点乾燥させ、4~5nmの白金 (Q150T, Quorum Technologies, United Kingdom) でスパッタ被覆し、電界放出走査電子顕微鏡 (S-4800, Hitachi, Japan) で観察した。

#### 【0132】

ホモ接合型c.216AA変異体マウスは難聴であり、前庭機能不全に特徴的な旋回およびヘッドトッシング行動を示す。Lentzらの以前の研究 (34) が、P30で蝸牛基底における顕著な内有毛細胞および外有毛細胞の縮退を記載している。縮退および有毛細胞死は中回転においても認められ、器官の頂端部分は1月齢でより良く保存されていた。有毛細胞縮退は内耳器官の発達中に漸進的に起こると仮定し、より早期での有毛細胞生存を評価するために、P8およびP18でコルチ器に沿ってSEM分析を実施した。ヘテロ接合型c.216GAマウスの外有毛細胞 (OHC) および内有毛細胞 (IHC) は保存され、それらの束はこれらの齢では正しく配向していた (図5A~5C、5G、5Iおよび図12A~12C、12K)。しかし、分析した両齢で、ホモ接合型c.216AAマウスのコルチ器の全長に沿って崩壊した毛束が明白であった (図12D~12F、12H、12J~12Lおよび図19D~19J、19L)。P8で、IHC束は基底、中間および頂端領域において軽度崩壊していた (図12D~12F、12J)。数多くのIHC束が波状のパターンおよび軽度の不動毛列崩壊を示した (図12J)。c.216AA変異体マウスの多くのOHCが

、良く保存された毛束を有したが（図12H、12K）、断片化され、崩壊した毛束が器官に沿って散在することが明白であった（図12D～12F、12L）。P18で、崩壊はより顕著であったが、有毛細胞の大多数は、以前の報告（35）のようになおも存在していた（図12D～12F）。

#### 【0133】

ホルモンb1による遺伝子治療を受けたマウスにおける毛束形態を評価するために、6週齢の未処置（または非注入）および処置（または注入）マウスの側頭骨をSEM分析のために調製した。未処置c.216AAマウスは、器官の基底および中間領域で重度の有毛細胞損失を示した（図11）。基底領域において、OHCは、第一の列にはほぼ存在せず、第二および第三の列に散在していた。器官の中間領域においても、第一の列のOHCはほぼ存在しなかった。頂端で、より軽度な表現型が認められた。高倍率SEMはまた、c.216AA変異体マウスの器官の全長に沿って重度に崩壊した毛束を明らかにした。顕著には、6週齢c.216AAマウスにおいて、3列すべての不動毛を有する一般的な階段状構造を保持する毛束は認められなかった。代わりに、c.216AAマウスからの有毛細胞は崩壊した毛束を示し、第一の列、異常な第二の列およびきれいに保存された最高列に沿って収縮した不動毛が見られた。対照的に、ホルモンb1による処置後のc.216AAマウスにおいては、有毛細胞損失の減少および正常な毛束が認められた。有毛細胞数は、代表的な視野中の毛束の存在または非存在から推定した。データは、注入マウスにおける、器官の基底から頂端までの有毛細胞数の顕著な保存率 基底では40～79%、中間では68～95%および頂端では93～99% を明らかにした（c.216AAマウスn=4の耳からの細胞n=1824およびレスキューされたc.216AAマウスn=2の耳のから細胞n=792）。ホルモンb1注入マウスにおいても異常な毛束は明白であったが、大部分の毛束は、3列の不動毛を有し、それらのヘテロ接合型対照からほとんど区別不可能な形態を示した（図11）。

#### 【0134】

##### 実施例2B FM1-43画像化

5マイクロモルFM1-43（Invitrogen）を細胞外記録液中に希釈し、組織に10秒間適用し、次いで、細胞外記録液中で3回洗浄して過剰の色素を除去し、エンドサイトーシスによる取り込みを防止した。5分後、水浸20×、40×および63×対物レンズを有するZeiss Axio scope FS plus上、落射蛍光光源、微分干渉コントラストオブティクスおよびFM1-43フィルタセット（Chroma Technologies）を使用して、細胞内FM1-43を画像化した。CCDカメラおよびArgus-20イメージプロセッサ（Hamamatsu）を用い、バックグラウンド蛍光サブトラクションを使用して画像を16ビットで取り込んだ。すべての画像の取得に同じゲインおよびコントラスト設定を維持し、Adobe PhotoshopまたはImage-Jソフトウェアを用いてオフラインで分析した。

#### 【0135】

より早期に有毛細胞機能の評価するために、速やかに解体した内耳器官におけるFM1-43取り込みをP4で分析した。短時間（＜10秒）の適用で、FM1-43は、機能的機械感受性チャネルを有する有毛細胞に浸透した（36、37、38）。均一なFM1-43取り込みがc.216GAマウスの有毛細胞中で認められたが（図6A）、c.216AAマウスのOHCの間で取り込みのレベルは異なり、すべてではないがいくつかの細胞が機能的トランスダクションチャネルを保持することを示唆した（図6B）。同様の観察を蝸牛の全長に沿って実施した。周波数特定性の差は認められなかった。FM1-43取り込みはまた、出生後最初の1週間、c.216AAマウスのIHC中で減少した（データ示さず）。また、変異体マウスの卵形嚢有毛細胞においてFM1-43取り込みを評価した。興味深いことに、c.216AA変異体マウスにおいて、P6で、取り込みはストリオーラ外領域に限定され、ストリオーラ領域の有毛細胞が、安静時に開口した機械感受性チャネルを有しないことを示唆した（図6C、6D）。

#### 【0136】

##### 実施例2C 機械的刺激

OHCおよびIHC：400mA ENV400 Amplifier（Piezosystem Jena Germany, 54）によって駆動されるone-524次元PICMAチップピエゾアクチュエータ（Physik Instruments, Waldbron

n, Germany)に取り付けた硬質ガラスプローブを介して機械的刺激を伝達した。プローブの先端は、不動毛束にフィットするよう、ファイヤポリッシュ加工 (Fire polisher, H602, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL) されたものであった (51)。残留ピペット共振を除去するために、8ポールBesselフィルタ (Khron-Hite, 528 Brockton, MA) によって50kHzでフィルタリングされた電圧ステップを印加することにより、偏向を誘発した。C2400 CCDカメラ (Hamamatsu, Japan) を使用して毛束偏向をモニタした。電圧ステップを使用して、刺激プローブの動きをその静止位置から  $\pm 2 \mu\text{m}$  で校正した。軸外れの動きの非存在を確認し、プローブ動を校正するために、プローブのビデオ画像を記録した (空間分解能約4nm)。プローブの10~90%立ち上がり時間は約20  $\mu\text{sec}$  であった。

【0137】

10

VHC: 圧電バイモルフ要素に取り付けた硬質ガラスプローブを介して機械的刺激を伝達した。刺激ピペット中への動毛の穏やかな吸引によってカップリングを実施した。直列に取り付けられ、刺激プローブに直結された2つのバイモルフからなる圧電装置に電圧ステップを印加することにより、偏向を誘発した。電圧ステップを、pClamp 8.0ソフトウェアによって制御し、8ポールBesselフィルタによって1kHzでフィルタリングした (Khron-Hite, Brockton, MA)。C2400 CCDカメラ (Hamamatsu, Japan) を使用して毛束偏向をモニタした。実験の前に、刺激プローブの動きをその静止位置近辺 ( $\pm 2 \mu\text{m}$ ) に校正した。

【0138】

出生後最初の1週間、聴覚および前庭上皮は、比較的正常な形態を有するものを含め、機械感受性有毛細胞を保持する (図5)。コルチ器において、P3~P6のc.216AAマウスの蝸牛の中および頂回転から、正常に見える束を有する有毛細胞およびより重度に崩壊した束を有する有毛細胞から記録を得た。c.216AA変異体において、OHCは機械感受性を保持したが、反応の振幅は  $170 \pm 80\text{pA}$  まで有意に約63%減少した ( $n=24$ ;  $p<0.001$ 、図6E、6F、6G)。c.216AAマウスにおいて、OHC中で31~292pAの広範な反応振幅が認められた。毛束形態にしたがってデータを分類すると、有意差 ( $p<0.01$ ) が認められ：重度に崩壊した束を有する変異体有毛細胞中に誘発された電流は、毛束がより保存された変異体細胞中に誘発された電流よりも小さく、それぞれ  $120 \pm 65\text{pA}$  ( $n=9$ ) および  $201 \pm 74\text{pA}$  ( $n=15$ ) であった。電流振幅の減少にもかかわらず、機械的変位に対する有毛細胞反応は、ヘテロ接合型c.216GAマウスの性質に類似した性質を保持した。二次ボルツマン方程式を使用して刺激反応  $[I(X)]$  曲線を当てはめ (図6F)、この当てはめを使用して10~90%作動範囲を決定した (図13B)。c.216GAおよびc.216AAから記録されたOHCの間で作動範囲の有意差は認められなかった ( $p=0.054$ )。同様に、c.216AA変異体マウスのIHCからの毛束は、DIC顕微鏡下では軽度にも崩壊しているように見えたが、P6でトランスダクション電流は有意に減少した (図13E、13F、13G)。-64mVの保持電位で、ヘテロ接合型c.216GAのIHC (P6~P7) における最大トランスダクション電流は平均  $587 \pm 96\text{pA}$  ( $n=21$ ) であったが、c.216AAのIHC中では  $316 \pm 127\text{pA}$  へと46%減少した ( $n=19$ ;  $p<0.001$ )。c.216AA変異体マウスのIHC中で作動範囲の有意な ( $p<0.01$ ) 減少が計測された (図13G)。

【0139】

また、順応 (一定の束偏向の存在下でのトランスダクション電流の低下と定義される) が、c.216AA変異体マウスに存在した。高速および低速成分を決定するために、二重指数関数当てはめを使用して順応動態を分析した。両成分は、c.216AA変異体マウスからのIHCおよびOHC中でより低速であったが、その差は、低速成分に関してのみ有意であった (OHC中で  $p<0.05$  および IHC中で  $p<0.001$ ; 図13C、13D、13H、13I)。他方、 $\text{Popen}=0.5$  で計測された順応の程度は、c.216GA有毛細胞よりもc.216AAの有毛細胞のOHCおよびIHC中で有意に低かった (図20E、20J;  $p<0.001$ )。合わせて、これらの結果は、機械感受性がc.216AAマウスの内有毛細胞および外有毛細胞において軽度に損なわれ、重要なことに、両細胞型が出生後最初の1週間にわたり生存すること (遺伝子治療および細胞機能回復のための前提条件) を実証する。

【0140】

また、前庭有毛細胞中、c.216AAマウスにおけるメカノトランスダクション電流の減少

50

が認められた。ストリオーラ外領域において、c.216AAの電流は、 $109 \pm 30\text{pA}$  ( $n = 9$ 、P5 ~ P7)まで有意に減少し( $p < 0.001$ )、対して、c.216GAの電流の場合、 $231 \pm 53\text{pA}$  ( $n = 8$ 、P6 ~ P7)であった(図6E、6F、6H)。ストリオーラ領域におけるFM1-43取り込みの非存在と一致して、ストリオーラ領域中の有毛細胞からは非常に小さな電流またはゼロ電流しか記録されなかった( $6 \pm 13\text{pA}$ 、 $n = 6$ 、P5 ~ P7)(以下を参照; 図6C、6D)。DIC顕微鏡検査により、卵形囊毛束は全体的によく保存されているように見えたが、トランスダクション電流は、ストリオーラ外およびストリオーラそれぞれ中の有毛細胞から有意に減少していた、または存在しなかった。したがって、ストリオーラ領域を除くと、これらの結果は、変異体マウスにおいてトランスダクション器官は正しくアセンブルされ、ターゲティングされるが、機能的複合体の数は新生仔マウスにおいて減少することを示唆する。

10

#### 【0141】

次に、ホルモン発現を駆動するAAVベクターに曝露されたc.216AA有毛細胞における機能の評価した。外因性ホルモンによる機能的レスキューの可能性を高めるために、CMVプロモーターによって駆動されるタグなしホルモンa1またはホルモンb1コード配列を、Anc80として知られるAAVカプシド中にパッケージングした(39)。最近、Anc80カプシドは、インビボでIHCの100%およびOHCの80~90%に形質導入することが示された(40)。本発明者らは、ホルモンbがIHCおよびOHCの両方におけるメカノトランスダクションに必要であり、両細胞型における聴覚機能に必要であると仮定する。AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1( $0.8 \mu\text{l}$ 、 $1.9 \times 10^{12}\text{gc/ml}$ )のRWM注入と、別に、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1( $1.7 \times 10^{12}\text{gc/ml}$ ) + AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1の混合物( $0.5 \mu\text{l} + 0.5 \mu\text{l}$ )のRWM注入とを実施し、処置から2週後にメカノトランスダクション反応を評価した。蝸牛が骨化する前にP5~P6で組織を抽出し、培養状態で10日間維持した。成熟OHC(>P10)はエクスビボ記録パラダイムを生き延びないが、P14~P16相当時にロバスタな電気生理学的記録がIHCから得られた。結果を図8に提示する。非注入マウスからのIHCは、P16でひどく減少したトランスダクション電流を示したが( $79 \pm 43\text{pA}$ 、 $n = 8$ )、AAV処置を受けたマウスにおいては感覚トランスダクションの回復は明白であった。P1でホルモンb1またはb1とa1との組み合わせを注入されたマウスにおいて有意な回復( $***P < 0.001$ )が認められ、それぞれの平均最大トランスダクション電流は $388 \pm 66\text{pA}$  ( $n = 15$ )および $352 \pm 28\text{pA}$  ( $n = 7$ ; 図8C)であった。ホルモンb1による処置後のIHC中のトランスダクション電流振幅は、対照c.216GAマウスとで有意に異ならなかった。回復のレベルは、ホルモンb1とホルモンa1の同時注入によって有意に変化しなかった。これらの結果は、早期でのRWM注入による外因性ホルモンb1の送達、IHC中のメカノトランスダクションを回復させることができることを示唆する。

20

30

#### 【0142】

##### 実施例2D 共焦点画像化

出生後マウスP0~P8から共焦点画像化のための組織を調製するために、4%パラホルムアルデヒド(PFA)による15分間の固定を実施した。0.01%トリトンによる透過処理およびAlexa Fluorファロイジン(Invitrogen、1/200)による対比染色を使用して、アクチンフィラメントを標識した。LSM700 Zeiss共焦点顕微鏡上で画像を得た。比較的高齢のマウス(4~8週齢)において、安楽死処分後に側頭骨を取り出し、4%PFA中に1時間おき、次いで、120mM EDTAによって24~36時間カルシウム除去した。次いで、感覚上皮を切り出し、免疫染色のために上記のように注入を実施した。マウス抗CTBP2(BD Bioscience #612044、1/200)を48時間適用し、Alexa Fluorヤギ抗マウス抗体(1/200)によって4で一晩対比染色して、リボンシナプスを標識した。Zeiss LSM 710レーザ共焦点顕微鏡(IDDRC Imaging Core grant P30 HD18655)上で画像を取得し、Zeiss LSMイメージビューワ4.2で加工した。

40

#### 【0143】

以前の研究が、感覚有毛細胞中のホルモンの2つのオルタナティブスプライスフォームの発現を明らかにしている。外因性ホルモンスプライスフォームの発現を駆動するAAVベクターの能力を評価するために、新生仔c.216AAおよび野生型(C57BL/6J)マウスから

50

0

## 20

30

40

## 50

50

## 50

ハーモニン遺伝子の増強がUsh1cマウスにおける聴覚および平衡機能をレスキューすることができるかどうかを決定するために、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1 (0.8  $\mu$ l,  $1.7 \times 10^8$  copies/ml) を内耳に注射した。図 10-10 に示すように、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1 を注射したマウスは、Ush1c マウスと比較して聴覚および平衡機能が正常化された。

0<sup>12</sup>gc/ml) または AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 (0.8 μl、1.9 × 10<sup>12</sup>gc/ml) の RWM 注入を P0 ~ P1 で実施し、聴性脳幹反応 (ABR)、歪成分耳音響放射 (DPOAE)、聴覚性驚愕反射、オープンフィールドおよびロータロッド行動を評価した。c.216AA マウスが深刻な聴力喪失および前庭機能不全をこうむる時期である 6 週でマウスを評価した。マウスの何匹かは 3 および 6 月でさらに試験した。AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1 を注入された 12 匹のマウスのうち、6 週で聴覚機能を回復したものはなく (図 9A ~ 9C)、ハーモニン a1 の外因性発現が聴覚レスキューには不十分であることを示唆した。しかし、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 を注入された 25 匹のマウスのうち 19 匹は 6 週で有意な聴覚機能を回復した。低周波数 (5.6 ~ 16 kHz) で、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 を注入された耳の最良の ABR 閾値は 25 ~ 30 dB SPL であり、野生型マウスの閾値に著しく類似していた (図 16A ~ 16B)。部分的なレスキューが 22.6 kHz で認められたが、32 kHz ではほとんどないし全く認められなかった。また、OHC 中の機能のレスキューと一致して、DPOAE 閾値のレスキューが明白であった (図 16C)。刺激 8 ~ 11.3 kHz の場合に < 45 dB SPL の聴覚閾値を有したマウスのうち 8 匹をその後の時期で試験して、レスキューの寿命を評価した。6 週から 3 月まで、約 10 dB SPL の ABR 閾値シフトが低周波数範囲で認められ、約 30 dB SPL の ABR 閾値シフトが高周波数範囲で認められた (図 16D)。類似のシフトが DPOAE 閾値にも認められた (図 16E)。この時点ののち、ABR 閾値および DPOAE は、最後の試験時点である 6 月齢まで安定なままであった (図 16D ~ 16E)。

10

#### 【0147】

特に高周波数端でのより完全な聴覚レスキューのためにハーモニン a1 およびハーモニン b1 の両方が必要であるかどうかを評価するために、AAV2/Anc80.CMV.tdTomato::harmonin-a1 (0.5 μl; 238 4.1E<sup>12</sup>gc/ml) および AAV2/Anc80.CMV.eGFP::harmonin-b1 (0.5 μl; 3.0E<sup>12</sup>gc/ml) を同時注入した。両蛍光タグに関して陽性の細胞から明白であるように、有毛細胞の 65% がハーモニン a1 およびハーモニン b1 の両方を発現させた (図 14)。蛍光標識されたハーモニン a1 は、おそらく過剰発現のせいで、AAV2/Anc80.CMV.tdTomato::harmonin-a1 に曝露されたマウスの不動毛中に時おり認められた。非標識ハーモニン a1 およびハーモニン b1 ベクターを同時注入されたマウスにおける ABR および DPOAE 閾値 (図 9) は、ハーモニン b1 だけを注入されたマウスのそれに類似し、さらなる改善を提供せず、ハーモニン a1 が聴覚機能にとってなくてもよいことを示唆した。重要なことに、データは、ハーモニン b1 だけでも、低周波数における聴覚閾値の有意な回復に十分であることを実証する (図 9)。

20

30

#### 【0148】

レスキューの程度をさらに評価するために、閾値 45 dB SPL のマウスからの ABR 波形を分析し、8 匹の対照 c.216GA マウスと、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 を注入された 5 匹の c.216AA マウスとの間で比較した。8 ~ 11.3 kHz および 16 kHz での反応の分析は、正常波 1 振幅 (非有意差、 $P > 0.2$ 、スチューデント t 検定) およびより長いピーク 1 潜時 ( $P > 0.001$ ) を明らかにして (図 15)、シナプスにおける神経伝達の起こり得る遅れを示唆した。多くのマウスにおいて、聴覚レスキューは反対側耳でも認められ、ABR 閾値は 11.3 kHz で 20 dB SPL の低さであった (ハーモニン b1: 平均  $59.7 \pm 5.3$  dB SPL、 $n = 15/25$ ; ハーモニン a1 + b1: 平均  $76.2 \pm 10.3$  dB SPL、 $n = 4 \sim 6$ )。AAV ベクターの反対側耳への拡散は以前にも認められており (37)、おそらくは、新生仔マウスのクモ膜下腔と連続したままである外リンパ管を介して起こる。

40

#### 【0149】

本発明者らはまた、後期発育段階での注入が部分的聴覚レスキューをもたらし得るかどうかに興味をもった。AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 (0.8 μl) の RWM 注入を P10 ~ P12 で実施し、聴覚閾値を 6 週で評価した。P10 ~ P12 で注入を受けたマウスはいずれも検出可能な DPOAE を示さず、それらの ABR 閾値は非注入 c.216AA 対照マウスとで異ならず ( $n = 10$ ; データは示さず)、おそらくは、より古い組織中の低いウイルス形質導入効率または後期発育段階におけるコルチ器の縮退のせいで、治療介入の機会が出生後早期に限られ得ることを示唆した。

50



## 【0150】

## 実施例2F アッシャーマウスモデルにおけるRT-PCR

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を使用して、P2~P3の野生型、ヘテロ接合型およびホモ接合型Ush1c c.216G>Aマウスの6つの聴覚器官からcDNAを調製した。完全長(450bp)または切断型ハーモニン(-35bp)をコードするcDNAを以下のプライマーによって増幅した：フォワードプライマー

mUsh1c\_Ex2F: 5' CTC ATT GAA AAT GAC GCA GAG AAG G 3'

、リバー

mUsh1c\_Ex5R: 5' TCT CAC TTT GAT GGA CAC GGT CTT 3'

。これらのプライマーは、マウスUsh1c配列に特異的であり、標的配列はUsh1c c.216Aアレルのヒトノックイン部分の領域の外にあるため、内在性Ush1cおよびAAV2由来Ush1cの両方を増幅する。また、治療後6週で採取したマウス組織からDNAおよびRNAレベルを評価した。TRIzol試薬(Life Technologies, Carlsbad, CA)を製造者のプロトコルにしたがって使用して、蝸牛からDNAおよびRNAを単離した。GoScript逆転写システム(Promega, Madison, WI)を使用してRNAを逆転写した。GoTaq Green Master Mix(Promega, Madison, WI)を使用して放射能標識PCRを実施した。ウイルスDNA増幅の場合、マウスUsh1cに特異的なプライマー：

mUsh1c\_Ex3F (5'-GAA CCC AAC CGC CTG CCG)

および

mUsh1c\_Ex4WTR (5'-TGC AGA CGG TCC AAG CGT-3')

を使用した。ホモ接合型Ush1 c.216AAマウスは、エクソン3および4にノックインされたヒトUSH1C c.216A遺伝子を有してマウス配列に取って代わるため(32)、これらのプライマーはウイルスUsh1c DNAだけを増幅する。完全長(450bp)および異常にスプライシングされたノックイン型のハーモニン(415bp)のcDNA増幅の場合、上記と同じプライマーを使用した(mUsh1c\_Ex2FおよびmUsh1c\_Ex5R)。Gapdhプライマーは

mGapdh\_Ex3F (5'-611 GTG AGG CCG GTG CTG AGT ATG-3')

および

mGapdh\_Ex4R (5'-GCC AAA GTT GTC ATG GAT GAC-3')

であった。産物を、6%非変性ポリアクリルアミドゲル上で分離し、Typhoon 9400ホスホイメージャ(GE Healthcare)を使用して定量した。

## 【0151】

以前の研究が、切断型ハーモニンが内在性結合パートナーを求めて完全長ハーモニンと競合することによって機能を害し得る可能性を提起していたため(34、35)、本発明者らは、切断型タンパク質の持続的発現が、外因性完全長ハーモニンを発現するベクターを注入されたc.216AAマウスにおける回復を制限し得るかどうかに興味をもった(図16A)。この懸念に対処するために、RT-PCRアッセイを使用して、c.216GAおよびc.216AAマウスにおけるUsh1c転写産物の発現を試験した。以前の報告と一致して、c.216GA蝸牛においては完全長および切断型ハーモニンをコードするUsh1c転写産物が検出され、c.216AA蝸牛においては切断型ハーモニンのみをコードする転写産物が検出された(図16B)。

## 【0152】

AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1の発現を確認し、ウイルス発現レベルとABR閾値との関係を調査するために、DNAおよびRNAを、注入を受けた蝸牛および反対側蝸牛から単離し、それぞれPCRおよびRT-PCRによって定量した。6週齢のc.216GAマウスならびにAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1注入(0.8  $\mu$ l;  $1.93 \times 10^{12}$  gc/ml)および非注入c.216AAマウスにおいて発現を評価した。試料は、ABRレスキューが良好な2匹の注入マウス(11.3kHzで閾値 35dB SPL)およびABRレスキューが不十分な2匹のマウス(11.3kHzで閾値 90dB SPL)を含むものであった。ハーモニン(図18A)およびAAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 DNA(図18B)の正しいスプライスフォームをコードするRNAが、注入を受けた蝸牛のすべてにおいて検出され、試験された全マウスの反対側蝸牛においてはより低い程度に検出された。ABRの閾値ならびに発現したDNAおよびRNAの量においてマウス間でばらつきが見られた(図18C)。

しかし、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 DNAレベルと、ハーモニンの正しいスプライスフォームをコードするRNAの量と、ABR閾値レベルとの間に強い相関が見いだされ、これは、ABRデータのばらつきがAAV発現の直接的な結果であり得ることを示唆する。ABR閾値の回復に成功したマウスにおける長期有毛細胞生存を評価するために、5匹のマウスから6月齢で組織を調製し、IHCおよびOHCを計数した（図17）。IHCの数は2つのコホートにおいて異ならなかったが、長期ABRレスキューを示した3匹のマウスには50%以上のOHCが残存していた。OHCの生存は、基底回転を除く器官全体に沿って認められた（図17）。

#### 【0153】

##### 実施例2G 聴覚性驚愕反応

Startle Monitor (Kinder Scientific) を使用して聴覚性驚愕反応 (ASR) を計測した。マウスを、圧電/プレキシガラス感知アセンブリに固定された小型の非制限的な立方体プレキシガラス記録チャンバ (27cm x 10cm x 652 12.5cm) に入れ、60dB SPLバックグラウンドホワイトノイズで5分間順化させた。各セッションは35回の試行からなり、その間、10dB SPL強度が60~120db SPLの範囲である1つのノイズパルス（平均30秒（25~35秒範囲））の試行間隔で印加した。外部ノイズ干渉を制限するために、パルスは、一定の60dB SPLバックグラウンドノイズ上、擬似ランダムな順序で並べた。Startle Monitorシステムが、ピーク驚愕反応 (ASR振幅) および刺激からピーク驚愕反応までの時間 (ASR潜時) の計算のために、各パルスへの反応を第一N、最大Nおよび反応の最大時間 (ms) の計測値へと換算した。ASRはすべて盲検的に実施した。

#### 【0154】

ABR/DPOAE回復が聴覚機能の行動的に関連する回復を生じさせるかどうかを評価するために、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1を注入されたマウス、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたマウスおよび両ベクターを注入されたマウスにおいて聴覚性驚愕反応を計測した。ホワイトノイズに対する驚愕反応の分析は、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入された6週齢マウスおよび両ベクターを同時注入されたマウスにおける反応の部分的レスキューを示した（図10A）。ハーモニンa1のみを投与されたマウスは、非注入c.216AAマウスに類似し、驚愕反応を回復させなかった。

#### 【0155】

##### 実施例2H 前庭評価

オープンフィールドおよびロータロッド平衡試験を使用して前庭機能を評価した。オープンフィールド試験は、薄暗い部屋の中、中心で30ルクスにセットされたオーバヘッドLED照明を備えたサウンドチャンバ内に配置された直径42cmの円形フレームを使用して実施した。マウスを一度に1匹ずつ円形のオープンフィールドの中に配置し、5分間探索させた。Ethovision XTを使用して行動を記録し、追跡して、移動距離および速度の計測を可能にした。オープンフィールド評価はすべて盲検的に実施した。ロータロッドパフォーマンスは、4rpmで回転し始め、0.1rpm s<sup>-1</sup>の率で加速する密閉ハウジング中、ロッドの上にマウスを配置することを含むものであった。1日目、マウスをロッド上に5分間配置して、機器に慣れさせた。翌日、全部で5回の試行でマウスをロッド上に配置した。試行の間に5分の休憩期間を課した。マウスがハウジングの機器を装備した床に落ちる前に装置上に留まることができた時間の長さをタイマに表示し、各試行後に記録した。

#### 【0156】

外リンパ腔は蝸牛と前庭迷路との間で連続するため、RWMを介して注入されたAAVベクターは前庭感覚器官にも形質導入し得る。前庭行動を評価するため、マウスをロータロッド上でのパフォーマンスに関して試験した。c.216AAマウスおよびAAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1を注入されたc.216AAマウスにおいて低いロータロッドパフォーマンスが認められたが（落下までの潜期平均<22秒）、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入されたc.216AAマウスおよびハーモニンa1およびb1ベクターを同時注入されたマウスは、対照c.216GAマウスと一致して、ロータロッド上で60~120秒間平衡機能を維持した（図10B）。

#### 【0157】

また、オープンフィールド行動の回復は、ハーモニンb1を注入されたc.216AAマウスお

よびハーモニンa1とb1を二重に注入されたc.216AAマウスにおいても認められた。代表的なオープンフィールド探索トレースが図17Cにプロットされている。c.216GAマウスはフィールドの境界を探索し、最小の全身回転を示したが、c.216AAマウスはチャンバ全体でより多くの活動を示し、回転/分として定量化された全身回転の増加を示した(図10D~10E)。驚くべきことに、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1を注入されたマウスにおいてABRレスキューは認められなかったが、オープンフィールドデータは、対照マウスのレベルまでの前庭機能の回復を実証した。AAV2/Anc80.CMV.trunc-harmoninを注入されたc.216GAマウスの行動は対照c.216GAマウスとは異ならず、ここでもまた、切断型ハーモニンと野生型ハーモニンとの間に干渉がないことを示した(図10C~10E)。

【0158】

実施例3 聴力喪失に関与するさらなる変異のポリヌクレオチド治療

実施例3A インビボ実験

旋回行動は回避されたが、ハーモニンa1を注入されたマウスはロータロッド試験に不合格であったため、行動アッセイはハーモニンa1による部分的な前庭レスキューを実証した。他方、ハーモニンb1を注入されたマウスは両試験において機能回復を示した(図10)。ストリオラ領域中の形質導入およびFM1-43取り込みの非存在は、ストリオラ領域の有毛細胞およびおそらくはI型細胞機能が正しいハーモニン発現に依存することを示す(図6)。

【0159】

聴覚レスキューは、低周波数で顕著であったが、高周波数ではそうではなく(図9)、6週で毛束形態の保存が器官全体に沿って認められた(図11)。高周波数でのレスキューの非存在が、注入によって生じた損傷による可能性は低い。AAVベクターを注入されたc.216GAのいずれにも高周波数聴力喪失は認められなかった(図16C~16D)。蝸牛の全長に沿ったAAVターゲティングは、説明として基底における形質導入効率の欠如に反論する。1つの可能性は、短いハーモニンcなどの他のハーモニンアイソフォームが蝸牛の基底高周波数端における機能のレスキューに必要になり得ることである。または、蝸牛発育は基底端から始まるため、P0までに、基底高周波数端からの有毛細胞が修復点を超えて成熟したということがあり得る。これが当てはまる場合、胚性介入が、高周波数領域における、より良好なレスキューを可能にし得る。

【0160】

以前に記載されているヘルパーウイルスフリーシステムおよびダブルトランスフェクション法(Grimm et al., 2003, Mol. Ther., 7:839:50)を使用して、修飾CMVプロモーターによって駆動されるマウスTMC1のコード配列を保持するAnc80ベクターを生成した。発現したタンパク質の可視化を可能にするために、トリプルフラグタグ(FLAG)配列をTMCコード配列のC末端に融合した。Anc80-CMV-Tmcベクターを、イオジキサノールステップグラジエント、次いでイオン交換クロマトグラフィーを使用して精製した。力価は、ヒトベータグロブリンイントロンエレメントに特異的なプライマーセットを使用する定量的PCRによって計測して、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$  gc/mlの範囲であった。ウイルスアリコートをして-80で保存し、使用直前に解凍した。

【0161】

ボストン小児病院のInstitutional Animal Care and Use Committeeによって承認されたプロトコル(プロトコル#2659、#2146)にしたがって、以下に記すようにマウス(P0~P2)をウイルスベクターのインビボ送達に使用した。C57BL/6J(Jackson Laboratories)またはSwiss Websterマウス系統(Taconic)を野生型対照マウスとして使用し、TMC1変異体アレルを保有するマウス(TMC1 / またはTmc1-/-)は、前述(Kawashima et al., 2011, J. Clin. Invest., 121:4796-809)のようにC57BL/6Jバックグラウンド上にあった。

【0162】

評価のために組織を調製するために、P0~P10の仔マウスから側頭骨を採取した。仔マウスを迅速な断頭によって安楽死させ、10mM HEPES、0.05mg/mlアンピシリンおよび0.01mg/mlシプロフロキサシンを添加したMEM(Invitrogen)中、pH7.40で側頭骨を解体した。

10

20

30

40

50

膜迷路を解剖スコープ下で単離し、ライスナー膜を剥離させ、蓋膜および血管条を機械的に取り出した。コルチ器培養物を、一端がSylgardによって18mmの丸いカバーガラスに接着された一対の細いガラス繊維の下に平らに固定した。電気生理学的実験のために組織を速やかに使用した。P10を過ぎたマウスの場合、吸入CO<sub>2</sub>によって安楽死させたのち側頭骨を採取し、蝸牛の全組織標本を生成した。

#### 【0163】

図示されるすべての平均値およびエラーバーは平均値 ± SDを表す。両側対応ありt検定を使用して、注入耳と非注入耳との間で統計的有意性の比較を実施した。P < 0.05を有意とみなした。

#### 【0164】

実施例3B ウイルスベクターのインビボ注入

仔マウス (P0 ~ P2) に対し、斜角研磨したガラスマイクロインジェクションピペットを使用して正円窓膜 (RWM) を介して注入を実施した。P-2000ピペットブラー (Sutter Instruments) 上でガラス毛管からピペットを引き、マイクロピペットベラ (Sutter Instruments) を使用して斜角研磨した (チップ直径約20 μm、角度28°)。手術部位 (左乳様突起) を覆うために無菌スワブを使用して、鎮痛のためにEMLAクリーム (リドカイン2.5% およびプリロカイン2.5%) を外部から適用した。術前の30 ~ 60分間、37 °Cの加温パッド上で体温を維持した。

#### 【0165】

仔マウスを、意識がなくなるまで2 ~ 3分間の急速な低体温誘導によって麻酔し、手術中、この状態を冷却プラットフォーム上で10 ~ 15分間維持した。ベタジンでスクラブし、70%エタノールで拭くことを3回繰り返すことにより、手術部位を消毒した。耳介後部切開を実施して透明な耳胞を露出させ、マイクロマニピュレータ (MP-30、Sutter Instrument Company) によってマイクロピペットを耳胞およびその上の筋膜に通し、マイクロピペットの先端をRWMに通した。

#### 【0166】

空気式マイクロインジェクタ (WPI Nanoliter 2010) を使用して、力価10<sup>12</sup> ~ 10<sup>14</sup> gc/mLのウイルス約1 μl (ウイルス粒子総数10<sup>9</sup> ~ 10<sup>11</sup>) を0.1 μl / 分で左耳だけに注入した。6-0モノフィラメント縫合糸 (Ethicon) を使用して皮膚切開部を閉じた。その後、回復のために仔マウスを加温パッドに戻した。

#### 【0167】

実施例3C 免疫蛍光検査

ウイルスベクターによって送達された導入遺伝子の発現の分布を決定するために免疫染色を実施した。そうするために、解体したばかりのコルチ器を、PBS中に希釈した4%パラホルムアルデヒドによって室温で1時間浸漬固定して、免疫染色を実施した。次いで、組織をPBS中で洗浄し、0.01 ~ 0.1% Triton X-100で30分間透過処理し、AlexaFluor546ファロイジン (Molecular Probes、1 : 200希釈) で1時間対比染色して、フィラメント状アクチンを標識した。

#### 【0168】

外因的に発現したTMC::FLAG融合タンパク質の局在化のために、2% BSAおよび5% ヤギ正常血清を使用して組織を1時間ブロックし、FLAGモチーフに対する抗体 (BD Biosciences、1 : 200希釈) とともに4 °Cで一晩インキュベートした。有毛細胞計数のために、組織をヤギ正常血清中で1時間ブロックし、ウサギ抗ミオシンVIIa一次抗体 (Proteus Biosciences、1 : 1000希釈) で4 °Cで一晩染色し、AlexaFluor488 (Life Technologies、1 : 200希釈) にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体で1時間標識した。試料をVectashield封入剤 (Vector Laboratories) によってカバーガラスに封入し、Zeiss LSM700共焦点顕微鏡を使用して10 × ~ 63 × の倍率で画像化した。

#### 【0169】

図13は、Ush1c変異体マウスへのハーモニンの均一なAnc80送達を実証する免疫蛍光検査結果を示し、図28は、KCNQ4変異体マウス中の細胞へのKCNQ4のAnc80送達を実証する免疫

10

20

30

40

50

蛍光検査結果を示す。

【0170】

#### 実施例3D 有毛細胞電気生理学

器官型蝸牛培養物を、137mM NaCl、0.7mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、5.8mM KCl、1.3mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.9mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mM Hepesおよび5.6mM D-グルコースを含む標準人工外リンパに浸漬した。ビタミン(1:50)およびアミノ酸(1:100)を濃縮物(Invitrogen)から溶液に加え、NaOHを使用して最終pHを7.40(310mosmol/kg)に調節した。記録ピペット(3~5メガオーム)をR6ガラス毛管(King Precision Glass)から引き、135mM CsCl、5mM Hepes、5mM EGTA、2.5mM  $\text{MgCl}_2$ 、2.5mM  $\text{Na}_2$ -アデノシン三リン酸および0.1mM  $\text{CaCl}_2$ を含む細胞内溶液(CsOHを使用して最終pHを7.40(285mosmol/kg)に調節した)で満たした。Axopatch 200B増幅器(Molecular Devices)を使用して、室温(22~24℃)で、ホールセルタイトシール電圧クランプ記録を-84mVで実施した。ローパスBesselフィルタによって感覚トランスダクション電流を10kHzでフィルタリングし、16ビット収集ボード(Digidata 1440A)およびpCLAMP10ソフトウェア(Molecular Devices)によって20kHzでデジタル化した。OriginPro 8(OriginLab)を使用するオフライン分析のためにデータを保存した。

10

【0171】

図23は、変異体マウス(図23B)と比較して、Anc80-KCNQ4をトランスフェクトされたKCNQ4-/-細胞における、野生型レベル近くへのカリウム電流の回復(図23A)を示す。

【0172】

#### 実施例3E 聴性脳幹反応(ABR)

以前に記載されているようにして(Maison et al., 2010, J. Neurosci., 30:6751-62)、ABRの記録を実施した。簡潔にいうと、P25~P30のマウスを、0.9%生理食塩水5ml中に希釈したケタミン50mgおよびキシラジン5mgの腹腔内注射(0.1ml/体重10g)によって麻酔した。ABR実験を防音チャンバ中32℃で実施した。聴覚機能を試験するために、マウスに対し、5.6kHz、8kHz、11.3kHz、16kHz、22.6kHzまたは32kHzの純音刺激を音圧レベル10から115dBまで5dBステップで提示して、再現性のABR波形(ピークI~IV)を誘発する閾値強度を検出した。交番する極性の刺激を使用して、512~1024の反応を収集し、音圧レベルごとに平均した。振幅が15μVよりも大きい波形(ピーク-トラフ)は、「アーチファクト拒絶」機能によって破棄した。ABR試験の開始前に、通常は外耳道の入口を覆い隠す皮膚および軟骨のフラップを解剖用ハサミでトリミングし、外耳道の入口における音圧を個々の試験対象ごとにすべての刺激周波数で校正した。プライマリトーンを生成するための2つの静電型イヤホン(CUI Miniature Dynamics)からなるカスタムブローブチューブスピーカ/マイクアセンブリ(EPL PXI Systems)および外耳道音圧を記録するためのKnowlesミニチュアマイク(Electret Condenser)を通して音響刺激を試験対象の耳に直接印加した。音刺激は、5msトーンパースト( $\cos^2$ オンセットで0.5ms立ち上がり-立ち下がり、40/sで印加)からなるものであった。耳介(活性電極)、頂点(参照電極)および臀部(接地電極)に挿入された皮下針電極を使用してABR信号を収集した。ABR電位を増幅し(10,000×)、パスフィルタリングし(0.3~10kHz)、カスタムデータ収集ソフトウェア(LabVIEW)を使用してデジタル化した。デジタルI/Oボード(National Instruments)を使用して音刺激および電極電圧を40μs間隔でサンプリングし、オフライン分析のために保存した。閾値は、任意の波(I~IV)を検出し、音強度を増しながら再現することができる最低デシベルレベルとして視覚的に定義した。ABR閾値を各実験グループ内で平均し、統計的解析に使用した。

20

30

40

【0173】

図20は、ハーモニンをコードし、発現するAnc80ウイルスベクターの送達、特に低めの周波数(たとえば約5~約22kHz)で、聴覚機能のほぼ完全な回復を提供することができることをグラフで示す。

【0174】

#### 実施例3F 定量的RT-PCR分析

インビボ投与後に蝸牛中に存在するウイルスの量を評価するための実験を実施した。P1

50

のTMC1-/-マウス2匹の左耳に注入を実施した。左右の耳から蝸牛を切除し、P10相当時に3日間、培養状態に維持した。RNAを抽出し、Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies) を使用して質を確認し、以前に記載されているようにして (Kawashima et al., 2011, J. Clin. Invest., 121:4796-809)、SYBR GreenER qPCR試薬 (Invitrogen) を用いて、TMC1に特異的な効率的なプライマーセットを用いる定量的RT-PCR分析のためにcDNA中に逆転写した

【0175】

TMC1の断片を増幅するために、以下のプライマーを使用した：  
5'-CAT CTG

CAG CCA ACT TTG GTG TGT-3' (SEQ ID NO:9)および5'-AGA GGT AGC CGG AAA

TTC AGC CAT-3' (SEQ ID NO:10)

。発現レベルを、

5'-TGA GCG CAA GTA CTC TGT GTG GAT-

3' (SEQ ID NO:11)および5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC TGA-3' (SEQ ID NO:12)

で増幅されたActb (アクチンをコードする) のレベルに正規化した。すべてのプライマーは、イントロンを挟むように設計されたものであり、融解曲線分析および陰性対照を使用して確認した。Actbに対するCT法および注入耳と非注入耳との間の差を使用してデータを分析した。注入耳において、TMC1 mRNA発現は非注入耳よりも12倍高かった。

【0176】

実施例3G FM1-43標識

以前に記載されているようにして (Gale et al., 2001, J. Neurosci., 21:7013-25; Meyers et al., 2003, J. Neurosci., 23:4054-65およびGeleoc & Holt, 2003, Nat. Neurosci., 10:1019-20)、FM1-43ダイローディング実験を実施した。蝸牛培養物を付着させたカバーガラスを、ガラス底チャンバ上、正立顕微鏡 (Zeiss Axioscope FS Plus) の下に配置した。人工外リンパ中に希釈した5  $\mu$ M FM1-43FX (Invitrogen) を10秒間適用し、組織を人工外リンパ中で3回洗浄して、細胞膜の外葉から色素を除去した。5分後、FM1-43フィルタセットと、63 $\times$ 水浸対物レンズを備えた落射蛍光光源とを使用して、細胞内FM1-43を画像化した。上記のように、組織を固定し、免疫蛍光のために処理した。

【0177】

図23は、本明細書に記載されるAnc80ウイルスベクターに曝露された細胞によるFM1-43色素の取り込みを示す免疫染色画像であり、図28は、本明細書に記載されるAnc80ウイルスベクターによって送達されたTMC1がTmc1欠損有毛細胞の感覚トランスダクションをインビボで回復させることをグラフで実証する。

【0178】

実施例3H 歪成分耳音響放射 (DPOAE)

DPOAEデータは、ABRデータと同じ条件下、ABRデータと同じ記録セッション中に収集した。2f<sub>1</sub>-f<sub>2</sub>でのDPOAEの生成のために、周波数比1.2 (f<sub>2</sub>/f<sub>1</sub>) でプライマリトーンを生成した (f<sub>2</sub>レベルは各f<sub>2</sub>/f<sub>1</sub>対のf<sub>1</sub>レベルよりも10dB低い音圧レベルであった)。f<sub>2</sub>レベルを20から80dBまで5dBステップで掃引した。各レベルにおける波形およびスペクトルの平均化を使用して、記録された外耳道音圧の信号対雑音比を高めた。2f<sub>1</sub>-f<sub>2</sub>でのDPOAEの振幅を、スペクトル中の近傍点におけるノイズフロアとともに、平均されたスペクトルから抽出した。DPOAE振幅対音レベルのプロットから等反応曲線を補間した。閾値は、0dBでDPOAEを生成するために必要なf<sub>2</sub>レベルと定義した。

【0179】

図25は、本明細書に記載されるAnc80ウイルスベクターを使用して送達されたTMC1が、特に低めの周波数 (たとえば約5~約16kHz) で、TMC1-/-マウスにおける外有毛細胞機能をレスキューすることをグラフで実証する。

【0180】

図26は、有毛細胞中のGFP発現に対するプロモーターPcdh15、Myo6、およびKCNQ4の効果

10

20

30

40

50

を実証する。

【0181】

他の態様

本明細書において、方法および物質組成はいくつかの異なる局面に関連して説明されたが、様々な局面の前記説明は、方法および物質組成を例示することを意図したものであり、方法および物質組成の範囲を限定することを意図したものではないことが理解されよう。他の局面、利点および変形が以下の請求項の範囲内である。

【0182】

本明細書における変数の任意の定義における要素のリストの記載は、任意の1つの要素またはリストされた要素の組み合わせ（またはサブコンビネーション）としての当該変数の定義を含む。本明細書における態様の記載は、任意の1つの態様としての当該態様または任意の他の態様もしくはその部分との組み合わせとしての当該態様を含む。

10

【0183】

本明細書において挙げられるすべての特許および刊行物は、各個の特許および刊行物が参照により組み入れられることが明確かつ個別に示される場合と同じ程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0184】

開示されるものは、開示される方法および組成物のために使用することができる、開示される方法および組成物とともに使用することができる、開示される方法および組成物の調製において使用することができる、または開示される方法および組成物の産物である、方法および組成物である。これらおよび他の物質が本明細書に開示され、これらの方法および組成物の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などが開示されるということが理解されよう。すなわち、これらの組成物および方法の各様々な個々のおよび集合的な組み合わせおよび置換への具体的言及が明示的に開示されていないとしても、それぞれは本明細書において具体的に考慮され、記載されている。たとえば、特定の物質組成または特定の方法が開示され、記載され、多数の組成物または方法が述べられているならば、別段の指示がない限り、それらの組成物および方法の各組み合わせおよび置換が具体的に考慮されている。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせが同じく具体的に考慮され、開示されている。

20

【0185】

配列リスト

30

Anc80カプシドタンパク質 (SEQ ID NO: 1)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFFNGLDKGEPV  
NAADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAQERLQEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLG  
LVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQOPAX<sub>1</sub>KRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAP  
SGVGSNTMX<sub>2</sub>AGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDVRITTSRTWALPTYNNHLYKQI  
SSQSGX<sub>3</sub>STNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRDRWQRLNNNWGFRPKX<sub>4</sub>LNFKLFNIQVKEV  
TTNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVG  
RSSFYCLEYFPPSQMLRTGNFX<sub>5</sub>FSYTFEDVPPHSSYHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTS  
TAGNRX<sub>6</sub>LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTX<sub>7</sub>NQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL  
NPGPAMATHKDDKFFPMSGVLIFGKQAGNSNVDLDNVMITX<sub>8</sub>EEEIKTTNPVATEX<sub>9</sub>YGT  
VATNLQX<sub>10</sub>NTAPATGTVNSQGALPGMVWQX<sub>11</sub>RDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPP  
QILIKNTVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRWNPEIQYTSNYNKSTN  
VDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

40

$X_1 = K/R$  ;  $X_2 = A/S$  ;  $X_3 = A/G$  ;  $X_4 = R/K$  ;  $X_5 = E/Q$  ;  $X_6 = T/E$  ;  $X_7 = A/T$  ;  $X_8 = S/N$  ;  $X_9 = Q/E$  ;  $X_{10} = S/A$  ;  $X_{11} = N/D$

【0186】

Anc80-L0065カプシドタンパク質 (SEQ ID NO: 2)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPKPGAPKPKANQQKODDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPV  
 NAADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAFAEFQERLOEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLG  
 LVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKQOPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAP  
 SGVGSNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQI  
 SSQSGGSTNDNTYFCYSTPWGYFDFNRHCHFSRWDQRLINNNWGFPRPKKLNFKLFNIQVKEVT  
 TNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVEMIPOYGYLTLNNGSQAVGR  
 SSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQTTSGT  
 AGNRTLQFSQAGPSSMANOAKNWLPGPCYRQORVSKTTNQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVP  
 GPAMATHKDDDEKFFPMSGVLIFGKQGAGNSNVDLDNVMITNEEEIKTTNPVATEEYGTVATNLQ  
 SANTAPATGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLQGPWIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK  
 NTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNKNSTNVDFAV  
 DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

【 0 1 8 7 】

pAAV-TMC2 ( SEQ ID NO: 3 )

10

左逆位末端反復 ( L-ITR ) : 1 ~ 130nt

サイトメガロウイルス ( CMV ) プロモーター : 206 ~ 799nt

シアミンウイルス40 ( SV40 ) miscイントロン : 831 ~ 963nt

TMC1ex1 ( Transmembrane channel-like 1 ) : 982 ~ 3,267nt

WPRES ( Post-transcriptional regulatory element from Woodchuck hepatitis virus ) :  
 3,268 ~ 3,821nt

ウシ成長ホルモン ( bGH ) ポリAシグナル : 3,822 ~ 4,086nt

右逆位末端反復 ( R-ITR ) : 4,124 ~ 4,253nt

ctgCGCGCTCGCTCGCTCAGTgagggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttgggtcg  
 cccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggccaactccatcactaggggttcct  
 tgtagttaatgattaaccgcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaatt  
 cgcccttaagctagctagttattaatagtaataattacggggtcattagttcatagcccatata  
 tggagttccgcttacataacttacggtaaatggcccgcttgctgacggcccaacgaccccgcc  
 ccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca  
 atgggtggagttattacggtaaaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaagta  
 cgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgcccagtagcatgacctta  
 tgggactttctacttggcagtagcatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcggtt

20



ttggcagtacatcaatgggctggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccca  
ttgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaac  
tccgccccattgacgcaaatggcggttagcggtgtacggtgggaggtctataataagcagagctgg  
tttagtgaaacgtcagatcctgcagaagtgggtcgtaggcactgggaggttaagtatcaagggt  
acaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgctcgagacagagaagactcttgctgtt  
ctgataggcacctattgggtcttactgacatccactttgcctttctctccacaggtgtccaggcg  
ccgctggATGCCACCCAAAAAGTGCAAATFCAAAGTGGAGGAGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAG  
CTCAAGTGAAGAAGAAGAAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGAGACCAAAGAGGAAACGGA  
CCAGAGATGTCATCAATGAGGATGACCCAGAACCGGAGCCGGAGGATGAAGAAAACAAGAAAGGCA  
AGAGAAAAAGAAAGGCGGAGGAGGCTGCGGAGAGGAGCGGAAGAAGAAGAATTTGATGAAGA  
GGAATTAGAACGGTTAAAAGCACTGCTCGATGAGAATAGACAAATGATCGCTACTGTCAAATGTA  
AACCTTGGAAAATGGAGAAGAAAATTGAAGTTCTCAAGCAAGCAAGAAAATTTGTAGTGAGAAAT  
GAAGGCGCTCTTGGGAAAGGAAAGGGAAGAAAGTGGTTTGCATTAAAGATGATGATGGCCAAAGAA  
ATGGGCAAAAATTCCTCCGAGATTTTGAAGAACTTCAAGCGGCTTGCCTCCCATGGGAAAACAAAA  
TCAAGGCAATTGAAAGTCAGTTTGGTTCCCTCAGTGGCTCGTACTTCCTGTTCCTCAGGTGGATG  
TACGGCGTCAACATGGTTCTCTTGTGTGACCTTCAGCCTCATCATGTTACCGGAGTACCTCTG  
GGGTTTACCGTACGGCAGCTTACCTAGGAAAACAGTCCCAAGAGCTGAAGAAGCATCTGCAGCCA  
AGTTTGGTGTGTTGTATGACTTCAATGGCCTGGCGCAGTACTCTGTCTCTTTATGGCTATTAC  
GACAATAAACGCACGATCGGATGGCTGAATTTCCGGCTACCTCTTCTCTACTTCTGTGGGGAT  
TATGTGCATTTGGATACAGCTTCTCGTTGCTCAAAGCGATGACCAAAAATATTGGTGACGATG  
GTGGTGGCGATGACAACACTTTCAACTTCAGCTGGAAGGTGTTCTGTAGCTGGGACTATCTGATT  
GTTAACCTGAAACAGCCGACCAAGTTTAACTCTATCACGATGAACTTTAAAGGAAGCCATCAT  
AGAAGAGAGAGCCGCACAGGTGGAGGAGAACATCCACCTCATCAGATTTCTGAGGTTTCTCGCTA  
ACTTCTTCGTGTTTCTCACACTTGGTGCAAGTGGATACCTCATCTTTTGGGCTGTGAAGGATCC  
CAGGAGTTTCGCCCAGCAAGATCCTGACACCTTGGGTGGTGGGAAAAAATGAAATGAACATGGT  
AATGTCCTCTCTGGGATGTTCTGTCCCACCCTGTTTGAAGTTTCTGTGACTTATTTGCTGAAGTACC  
ATCCTCTCATTGCTCTGAAGTGGCTCCTGGGCGCATTTTGTCTCTCTCTTAGGCAACTGTAT  
GTATTCATTCTCGCCTTGATGGATGAGATTAACAACAAGATTGAAGAGGAGAAGCTTGTGAAGGC  
CAATATTACCCTGTGGGAAGCCAAATGATTAAGGCTTACAATGAATCTCTCTCTGGGCTCTCTG  
GGAACACCACAGGAGCACCTTTTTCGTTTCATCCTGACAGATGTCCCTCGCGGTCCCTGCTGGGAA  
ACAATGGTGGGGCAGGAATTCGTGCGTCTCACCGTTTCTGACGTCCTGACCACTTACGTACAGAT  
CCTCATTTGGCGACTTCCCTCAGACATGTTTTCGTGAGGTTCTGCAATTACTGTGGTGTGGGACT  
TAGAATATGGATATCCTTCATACACAGAATTCGACATCAGTGGCAACGTCCTCGCTCTGATCTTC  
AACCAAGGATGATCTGGATGGCTCCTTCTCGCTCCTAGCCTCCCGGGCATCAACATCCTCCG  
TCTCCACACATCCATGTATTTCCAGTGTGGGCTGTGATGTGCTGCAATGTTCCCGAGGCCAGGG  
TGTTCAAAGCTTCCAGATCCAAACACTTCTACCTCGGCATGCTGCTACTCATCTCTCTCTGTCC  
ACCATGCGGCTCCTGTACATGATCGTCTCCTTCCCGCCATCTTTTGATTGTGGGCCCTTCAGTGG  
TAAAAACAGGATGTTTGAAGTCATCGGTGAGACCTGGAACATGACTTCCCAAGCTGGATGGCGA  
AGATCCTGAGGCAGCTTTCTAACCCCGGCTTGTCAATTGCTGTCAATTCTGGTGTGTTCTGACC  
ATCTATTATCTCAATGCTACTGCCAAGGGCCAGAAAGCAGCGAATCTGGACCTCAAAAAGAAGAT  
GAAACAGCAAGCTTTGGAGAACAATAAGCGAAACAAGAAAATGGCAGCGGCTCGAGCAGCTGCAG  
CTGCTGGTGGCCAGTAAggatccaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggt  
attcttaactatgtgtgctcttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgc  
tattgcttcccgatggctttcatcttctcctctgtataaatcctgggtgctgtctctttatg  
aggagttgtggccggtgtgacggaacgtggcggtgtgactgtgtttgtgacgcaaccccc  
actggttggggcatttggcaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctat  
tgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgctggacaggggctcggtgttgggca  
ctgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctcctttccttggtgctcgctgtgttggc  
acctgattctcgcggggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaaccttcc  
ttcccgcgccctgctgcccgtctgcccctcttccggtcttccgagatctgctcgactgtgccc  
ttctagttgccagccatctgtgtttggccctccccctgccttcttgacctggaaggtgcca  
ctcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattct  
attctggggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgc  
tggggactcgagttaaaggcgcaattcccgataaggatcttccctagagcatggctacgtagataag  
tagcatggcggggttaatcattaactacaaggaacccctagtgtatggagttggccactccctctct

10

20

30

gcgcgctcgctcgctcactgagggccggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccggg  
cggcctcagtgagcgagcgagcgcgagccttaattaacctaatcactggccgctgcttttaca  
cgctcgtagctgggaaaccctggcggtaccacaacttaatcgcccttgacgacacatccccctttcgc  
cagctggcgtaataagcgaagaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatg  
gcgaatgggacgcgccctgtagcgggcgcattaagcgcgcggtgtggtggttacgcgcagcgtg  
accgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttctcccttccctttctcgccac  
gttcgcgggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttaggggtccgatttagtgctt  
tacggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatgggttcacgtagtgggccatcgccctga  
tagacgggtttttcgccctttgacgttgaggtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaac  
tggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgattataagggattttgcccatttcgg  
cctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacg  
tttataatttcaggtggcatcttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttggttatttttcta  
aatacatctcaaatatgataccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaa  
aaaggaaagagttagattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgccgcattttg  
cttccgtgtttttgctcaccagaaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgc  
acgagtggtgttacatcgaactggatctcaatagtggtaagatccttgagagttttcgccccgaag  
aacgttttccaatgagtgagcatttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgac  
gcccgggaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcacc  
agtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcccataacca  
tgagtataaactgcccgaacttacttctgacaacgatcgaggagaccgaaggagctaaccgct  
tttttgacacaactgggggaatctgtaactcgcccttgatcggttggaacccgagctgaatgaagc  
cataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagtaattggaacacgttgcgcaactat  
taactggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggatggagcgagataaa  
gttgacaggaccacttctgcgctcgcccttccggctggctgggtttattgctgataaatctggagc  
cggtgagcggtgggtctcgcggtatcatgtcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcg  
tagttatctacagcaggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagata  
gggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattga  
tttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacca  
aaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgctcagaccccgtagaaaagatcaaaggatct  
cttgagatccttttttctgcgctaattctgctgcttgcacacaaaaaaccacgctaccagc  
gggtggtttgtttgcccgaatcaagagctaccaactccttttccgaaggtaactggcttcagcagag  
cgcagataccaaaactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccactcaagaactctgta  
gcaccgctacataacctcgctctgctaactcctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtc  
gtgtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccggataaggcgagcggtcgggctgaacgg  
gggggttcgtgcacacagccagcttgagcggaacgacctaaccgaactgagatacctacagcgt  
gagctatgagaaaagcgccacgcttcccggaaggagaaaggcggaacaggtatccggtaagcggcag  
ggtcggaacaggagagcgacgagggagcttccagggggaacgcctggtatctttatagtcctg  
tcgggttctcgccacctctgacttgagcgctgattttgtgatgctcgtcagggggggcgagccta  
tggaaaaaacgcccagcaacgcggcctttttacggttcttgcccttttgctgcggttttgctcacat  
gttcttctctgcttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgata  
ccgctcgccgcagccgaacgacgagcgagcagtgtagtgagcaggaagcgaagagcgccca  
atagcgaacccgctctccccgcgcttgccgattcattaaatgcagctggcacgacaggtttcc  
cgactggaaaagcgggagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattagggacccc  
aggctttacactttatgcttccggctcgatgttggtggaattgtgagcggataacaatttcac  
acaggaaacagctatgacctgattacgcagatttaattaaagg

10

20

30

【 0 1 8 8 】

pAAV-TMC1ex2 ( SEQ ID NO: 4 )

L- ITR : 1 ~ 130

CMVプロモーター : 206 ~ 799

SV40 miscイントロン : 831 ~ 963

TMC1ex2 : 982 ~ 3,255

WPRES : 3,256 ~ 3,809

bGHポリAシグナル : 3,810 ~ 4,074

R- ITR : 4,112 ~ 4,241

ctgcgcgctcgctcgctcactgagggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttggtcg  
cccggcctcagtgagcgagcgagcgagagagggagtgcccaactccatcactaggggttcct  
tgtagtttaattgataaccgcatgtacttacctacgtagccatgctcttaggaagatcggaatt  
cgcccttaagctagctagttatttaataagtaatacaattacgggggtcattagttcatagccatata  
tggagttccgcttacataaacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgc  
ccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca  
atgggtggagttacgtgtaaaactgcccacttggcagtagacatcaagtgtatcatatgccaaagta  
cgccccctattgacgtcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctgg  
tgggacttttctacttggcagtagacatctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcggtt  
ttggcagtagacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggattttccaagtctccacccca  
ttgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaac  
tccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctgg  
tttagtgaaccgtcagatcctgcagaagttggtcgtgagggactgggcaggttaagtatcaaggtt  
acaagacaggtttaaggagaccaatagaaaactgggcttgcgagacagagaagactcttgcggtt  
ctgataggcacctattggcttactgacatccactttgcctttctctccacaggtgtccaggcgg  
ccgcggtATGTTGCAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTGAAGA  
AGAAGAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGAGACCAAAGAGGAAACGGACCAGAGATGTCA  
TCAATGAGGATGACCCAGAACCGGAGCCGGAGGATGAAGAAACAAGAAAGCAAGAGAAAAAGAA  
AGGCGGAGGAGGCTGCGGAGAGGAGCGGAAGAAGAAGAAATTTGATGAAGAGGAATTAGAAGC  
GTTAAAGCACTGCTCGATGAGAAATAGACAAATGATCGCTACTGTCAAATGTAAACCTTGGAAGA  
TGGAGAAAGAAAATTGAAGTTCTCAAGGAAGCAAGAAATTTGTGAGTGAGAATGAAGGCGCTCTT  
GGGAAAGGAAAGGAAAGAGTGGTTTGCATTAAAGATGATGATGGCCAAGAAATGGGCAAAATTT  
CCTCCGAGATTTTGAAGCTTCAAAGCGGCTTGCCTCCCATGGGAAAACAAAATCAAGGCAATTG  
AAAGTCAGTTTGGTTCTCAGTGGCCTCGTACTTCTCTCAGGTGGATGTACGGCGCTCAAC  
ATGGTTCTCTTTGTGTTGAGCTTACGCTCATCATGTTACCGGAGTACCTCTGGGGTTTACCGTA  
CGGCAGCTTACCTAGGAAAACAGTCCCAAGAGCTGAAGAAGCATCTGCAGCCAACCTTTGGTGTGT  
TGTATGACTTCAATGGCCTGGCGCAGTACTCTGCTCTTTTATGGCTATTACGACATAAAGCG  
ACGATCGGATGGCTGAATTTCCGGCTACCTCTTCTCTACTTCTGGTGGGATTTATGTGCTATGG  
ATACAGCTTCTTGGTTGTCTTCAAGCGATGACCAAAAATATTGGTGACGATGGTGGTGGCGATG  
ACAACACTTTCAACTTCAGCTGGAAGGTGTTCTGTAGCTGGGACTATCTGATTGGTAACCTTGAA  
ACAGCCGACAACAGTTTAACTCTATCAGATGAACCTTAAGGAAGCCATCATAGAAGAGAGAGC  
CGCACAGGTGGAGGAGAATCCACCTCATCAGATTTCTGAGGTTTCTCGCTAACTTCTTCGTGT  
TCCTCACACTTGTGCAAGTGGATACCTCATCTTTTGGGCTGTGAAGCGATCCAGGAGTTCCGC  
CAGCAAGATCCTGACACCCTTGGGTGGTGGGAAAAAATGAAATGAACATGGTAATGTCCCTCCT  
GGGGATGTTCTGTCCACCTGTTTGACTTATTGCTGAACTGGAAGATTACCATCCTCTCATTTG  
CTCTGAAGTGGCTCCTGGGGCGATTTTGTCTTCTCTAGGCAACTTGTATGTATTCTATCTC  
GCCTTGATGGATGAGATTAAACAAGATTGAAGAGGAGAAGCTTGTGAAGGCCAATATTACCTT  
GTGGGAAGCCAACATGATTAAAGCTTACAATGAATCTCTCTCTGGGCTCTCTGGGAACACCACAG  
GAGCACCTTTTTCTGTTTCATCTGCAGATGTCCCTCGCGGTCCCTGCTGGGAAACAATGGTGGGG  
CAGGAATTCGTGCGTCTCACCGTTTCTGACGTCTGACCACTTACGTCACGATCCTCATTTGGCGA  
CTTCTCAGAGCATGTTTCTGTGAGGTTCTGCAATTACTGCTGGTGGTGGGACTTAGAATATGGAT  
ATCCTTCATACACAGAATTTCGACATCAGTGGCAACGTCTCTGCTGATCTTCAACCAAGGCATG  
ATCTGGATGGGCTCCTTCTCTGCTCTAGCCTCCCGGCATCAACATCCTCCGTCTCCACACATC  
CATGTATTTCCAGTGTGCTGGGCTGTGATGTGCTGCAATGTCCCGAGGCCAGGGTGTTCAAAGCTT  
CCAGATCCAACAACCTTCTACCTCGGCATGCTGCTACTCATCCTCTTCTGTCCACCATGCCGGTC  
CTGTACATGATCGTCTCCCTCCCGCATCTTTTGGATTGTGGGCCCTTCAGTGGTAAACAGGAT  
GTTTGAAGTCATCGGTGAGACCTGGAACATGACTTCCCAAGCTGGATGGCGAAGATCCTGAGGC  
AGCTTTCTAACCCCGGCTTGTCTATGCTGTCTTCTGGTATGGTCTTGACCATCTATTATCTC  
AATGCTACTGCCAAGGGCCAGAAAGCAGCGAATCTGGACCTCAAAAAGAAGATGAAACAGCAAGC  
TTTGGAGAACAAAATGCCAAACAGAAAATGGCAGCGGCTCGAGCAGCTGCAGCTGCTGGTGGCC  
AGTAAggtatccaatcaacctctggattacaaaatttgtgaagattgactggtattcttaactat  
gttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttccc  
tatggcttccattttctcctccttgataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggc  
ccgtgtgcaggcaacgtggcggtgtgtgcactgtgtttgtgacgcaacccccactgggtggggc

10

20

30

attgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcgga  
actcatcgccgctgccttgcccgcgtgctggacaggggctcgctgttgggactgacaattccg  
tgggttgtcggggaaatcatcgctcctttccttgctgctcgctgtgttggcactggattctg  
cgcgggagctccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcgccct  
gctgcggctctcgccgctccttcgcgctcttcgagatcgctcgactgtgccttctagtgtcca  
gccatctgttgtttggccctccccgctgcttcccttgaccctggaagtgccactcccactgtcc  
tttccctaataaaatgaggaattgcctgcctattgtctgagtaggtgtcatctattctgggggt  
gggttggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggactcgag  
ttaaggggcaattcccgataaggaatcttccctagagcatggctacgtagataagtagcatggcg  
ttaatcatttaactacaagggaaccccttagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgcctc  
gctcactgagggcgggcgaccaaaggctcgcccgacgcccgggtttgcccggcgccctcagtga  
gcgagcgagcgcgagccttaattaacctaatcactggcgtcgcttttacaacgtcgtagctgg  
gaaaacccctggcgttaccacacttaatcgcttgccagcacatcccccttccgagctggcgtaa  
tagcgaagaggcccgacacgctcgcccttcccaacagttgcccagcctgaatggcgaatgggacg  
cgccctgtagcggcgcatgaagcgcggggtgtggtggttacgcccagcgtgaccgctacactt  
gccagcgccctagcgccgctcctttcgctttcttcccttcttctcgccagcttcgcccggct  
tccccgtcaagcttaaaatcgggggtcctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcg  
accccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggtttt  
cgccctttgacgttgagtcacgcttctttaaagtggactcttgttccaaactggaacaacact  
caaccctatctcggtctattctttgattataagggattttgcgatttcggcctattggttaa  
aaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttaacaaaaatttaacgtttataattca  
gggtggcatctttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaataacattcaaa  
tatgtatccgctcatgagcaaatccctgataaagtcttaataatattgaaaaaggaagagta  
tgagtattcaacatttccgtgctgccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtttt  
gtcaccacgaaacgtggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtta  
catcgaaactggatctcaatagtggttaagatccttgagagttttcgcccgaagaaacttttccaa  
tgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgattgacgcgggcaagag  
caactcggtcgccgcatatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaa  
gcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacatgagtgataaca  
atgcccgaacttacttctgaacacgatcggaggacgaagagctaaccgcttttttgacaaac  
atgggggagcatgtaactcgcttgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacga  
cgagcgtgacaccagatgctgtagtaattggttaaacacgttgcgcaaacatttaactggcgaac  
tacttactcttagcttcccgcaacaattaatagactggatggaggcgataaagttagcaggacca  
cttctgcgctcgcccttccggctgggtgttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgg  
gtctcggtatcatctagtgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctaca  
cgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagataggtgcctcactg  
attaaagcattggtaactgtcagaccaagttaactcataatacttttagattgatttaaaacttca  
tttttaattaaagatctagggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaac  
gtaggttttgcgttccacttagcgctcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatcttcttgagatcct  
tttttctgcgctaatctgctgttgcaaaacaaaaaacacccgctaccagcggtgtgtttt  
gccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataccaa  
atactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctaca  
tacctcgctctgctaatctgttaccagtggtgctgcccagtgccgataagtcgtgtcttaccgg  
gttggactcaagacgatagttaccggataaggcgacggtcggggtgaacggggggttctgtgca  
cacagcccagcttggagcgaacgaacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaa  
agcgccacgcttccgaagggaagaaaggcggaacaggtatccggtaagcgcgagggtcggaacagg  
agagcgacagggagcttccagggggaacgcctggtatctttatagtcctgtcggttttcgccc  
accttgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgctcagggggcgagcctatggaaaaacgcc  
agcaacgcggcctttttagcgttccctggccttttgcgtcggttttgcacatgttcttctcgtc  
gttatccccctgattctgtggataaccgattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgca  
gccgaacgacggcgagcagcagtgatgagcaggaagcggaagagcgcccaatagcgaacccg  
cctctccccgcggttggccgattcattaatgcagctggcagcaggtttcccgactggaaagc  
gggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagtagctcactcattaggcaccacggctttacact  
ttatgcttccggctcgatgtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagc  
tatgaccatgattacgacagatttaattaagg

10

20

30

40

【 0 1 8 9 】

pAAV-TMC2 ( SEQ ID NO: 5 )

L- ITR : 1 ~ 130

CMVプロモーター : 206 ~ 799

SV40 miscイントロン : 831 ~ 963

TMC2 : 981 ~ 3,647

WPRES : 3,655 ~ 4,208

bGHポリAシグナル : 4,209 ~ 4,473

R- ITR : 4,511 ~ 4,640

ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggcgacctttgggtcg  
cccggcctcagtgagcgagcgagcgagagagggagtgccaaactccatcactaggggttcct  
tgtagttaatgattaacccgcatgtacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaatt  
cgcccttaagctagctagttatttaataagtaaatcaattacgggggtcattagttcatagccatata  
tggagttccgctgtacataacttacggtaaatggcccgctgggtgaccgccaacgacccccgc  
ccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca  
atgggtggagtattttacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagta  
cgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgcccagttacatgaccta  
tgggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatgcggtt  
ttggcagttacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccca  
ttgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaac  
tccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctgg  
tttagtgaaccgtcagatcctgcagaagtgggtcgtgagggcactgggcaggttaagtaacaggtt  
acaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgtcgagacagagaagactcttgcggtt  
ctgataggcacctatttggtcttactgacatccactttgcctttctctccacaggtgtccaggcg  
ccgccATGAGCCCCAGTTAAAGAGCTTGGACGAGGAAGGTGACAAGTCAGCAAGAAGACCCACA  
AGGAAACAAACCTCCAGAGCTGCATGTCCCAAGACGGGCACCGAGCCCAATCTAGCCGGAAGGA  
TCCTGCTAAGGGTAGCCCAAGACCAGGGTCTTCCCGAAGAAACAGATGGAACATGGAAGCTATC  
ACAAGGGGTTGCAGGGACAGAAACCACGAAAGGTGGAGAGGTCTCTACAAGGGAGGAAGAAGGAT  
CGGAGAACCTCCCTTAAGGAGCAGAGAGCATCTCCAAAGAGGAGAGGAGGCTCTGAGGAAGGA  
GGCAGGCAAGCAGCTGAGAAAACCCAGGTCCACTTCTTGGGCTCCAGTGTCTCTACTGGAGACT  
CCCTGTCTGAGGAGGAGCTGGCTCAGATCCTGGAACAGGTAGAAGAAAAAAGAAGCTCATCACT  
ACCGTGAGGAACAAACCTTGGCCCATGGCAAAGAAGCTGAGGGAACCTCAGGGAAGCCCAAGCCTT  
TGTGGAGAAGTATGAAGGAGCCTTGGGGAAAGGCAAGGGCAACACCTCTACGCCCTACAGGATGA  
TGATGGCTAAGAAATGGGTCAAGTTTAAAGAGGACTTTGATAATTTCAAGACTCAATGTATTCCC  
TGGGAAATGAAGATCAAGGACATTGAAAGTCACTTCGGTTCTTCTGTGGCATCTTACTTCATCTT  
TCTCCGATGGATGTATGGAGTTAACCTTGTCTTTTGGCTTaATATTTGGTCTAGTCATCATCC  
CAGAGGTGCTGATGGGCATGCCCTATGGAAGTATACCCAGAAAGACGGTGCCTCGGGCTGAGGAA  
GAGCGAGCCATGGACTTCTCTGTCTTTTGGGATTTTGGGGCTACATCAAATATTCTGCTCTCTT  
CTATGGCTACTACAACAACCAGCGGACCATTGGATGGCTGAGGTACAGGCTGCCCATGGCTTACT  
TTATGGTGGGGGTGAGCGTGTCTTGGCTACAGCTTGATGATCGTCATTAGGTGATGGCCAGCAAT  
ACCCAGGGTAGCACCAAGTGGGGGGACAGTGACAGCTTCAGCTTCAGCTTCAAGATGTTACCCAG  
CTGGGACTACCTCATCGGGAATTCAGAGACAGCAGACAACAAATATGTCTCCATCACTACCAGCT  
TCAAGGAGTCTATAGTGGACGAACAAGAGAGTAACAAAGAGGGAATATCCACCTGACAAGATTC  
CTCCGCGTCTCGGCAACTTCTCATTTCTCTGCTGTCTGTGTGGAAGCGGGTACCTCATTTACTT  
TGTGGTGAAACGGTCCCAGGAGTTCTCCAAATGCAAAATGTCAGCTGGTATGAAAGGAATGAGG  
TGGAGATCGTGATGTCTCTGCTAGGGATGTTTTGTCCCCCTCTGTTTGAACCATCGCTGCCTTG  
GAGAATTATCACCCACGAACFGGGCTGAAGTGGCAGCTGGGCCGCATCTTTGCCCTTTTCTGGG  
AAACCTCTACAGCTTTCTCTCGGCCCTCATGGACGATGTCCACCTTAAGCTTTCTAATGAGGAAA  
AAATCAAGAACATCACTCACTGGACCCTGTTTAACTATTACAATTCCTCAGGTGGGAATGAGAGT  
GTGCCCCGGCCACCACACCCCTGCAGATGTGCCAGAGGTCTTGTGCTGGGAGACAGCTGTGGG  
CATTGAGTTTATGAGGCTCACCGTGTCTGACATGCTGGTAACATACCTCACCATCTTGGTCGGAG  
ATTTCTCCGAGCTTGTCTTGTCCGGTTTCAATGAATCACTGCTGGTGTGGGACCTCGAGGCTGGT  
TTTCCCTCATATGCCGAGTTTGATATTAGTGGAATGTGTTGGGTTTGATCTTCAACCAAGGAAT

10

20

30

GATCTGGATGGGCTCCTTCTATGCTCCAGGACTGGTGGGCATCAATGTCTGCGCCTGTTGACCT  
 CCATGTACTTCCAGTGTGGGACAGTATGAGCAGCAACGTTCCCATGAGCGTGTGTTAAAGCC  
 TCCCGATCCAACAACCTTCTACATGGGCGCTGCTGCTGTTGGTGTCTTCCCTCAGCCTCCTGCGTGT  
 GGCCTACACTGTCTATGCTCTCTCCACCCCTCGTTTACTGTGGCCCCCTCAGTGGGAAAAACAGAA  
 TGTACGATGTCTCCATGAGACCATCGAGAACGATTTCCCTAAGTTCCTGGGCAAGATCTTTGCG  
 TTCCTTGCCAACCCAGGCGTATCATTCAGCCATCTCTGCTAATGTTTCTGGCCATTTACTACCT  
 GAATCAGTTCCTCAAAAAGTCTTCCAGAGCTAATGCCAGCTGCGAAAGAAGATCCAAGCGCTCC  
 TGTAAAGTTGAGAAACCATATAATCCATCAAGGGAAGCCATAGTCACATATTCAGAGGACACA  
 ATCAAGAACAGCTCCAAAAATGCCACCCAGATACATCTTACTAAAGAAGAGCCACATCTCAGTC  
 TTCCAGCCAAATCCAGACCTGGACAAGAAAGCGCAGGGCCCCACACCTCCAGTACTGAGGGTG  
 GGGCCTCGCCGTCTACCTCCTGGCACCATTGTTGGGTCTCAACCACCGAGAGGCAGACGAGATTCT  
 GGCCAACCCAGTCTCAGACTTATACAGGCAAGTCACCTTCTGGAAAGAGAACCAGAGGCTCA  
 CAACTGATAagcttggatccaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattt  
 ctttaactatgttgctccttttacgctatgttgatacgtctgcttaatgcctttgtatcatgctat  
 tgcttcccggtatggctttcattttctcctccttgataaaatcctgggtgctgtctctttatgagg  
 agttgtgcccgttgtcaggcaacgtggcggtgggtgctgctgtttgtgacgcaacccccact  
 ggttggggcattggcaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgc  
 cagggggaactcatcgccgctgcttgcgcgtgctggacaggggctcggtgttgggactg  
 acaatccggtggtgtgtcggggaatcatcgctcctttccttggtgctcgctgctgttgcacc  
 tggattctgcgcggaactccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaacttccctc  
 ccgcggtcgtgctgggctctgcgccctcctccggtccttcgagatctgctcgactgtgcttcc  
 tagttgcagccatctgtgttggccctccccgctgcttccctgacctggaaggtgacctc  
 ccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgactgtctgagtaggtgtcattctatt  
 ctggggggtgggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgtgtg  
 ggactcgagttaaagggcgaaattcccgataaggatcttctctagagcatggctacgtagataagtag  
 catggcggtttaatcattaaactacaaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcg  
 cgctcgctcgctcactgagggcgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcg  
 cctcagtgagcgagcgagcgcgagccttaataacctaattcactggcgctgcttttacaacgt  
 cgtgactgggaaacacccctggcggttaacccaacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccag  
 ctggcgtaataagcgaagagggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgagcctgaatggcg  
 aatgggaacgcccctgtagcgggcgcattaagcgcgggcggtgtgtggtggttacgcgagcggtgacc  
 gctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcttcttctcgccagtt  
 cgccgctttccccgctcaagctcctaaatcgggggtcctttaggggtccgatttagtgctttac  
 ggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatgggttcacgtagtgggccatcgccctgatag  
 acgggtttttcgccctttgacgttggaagtcacgttctttaaatagtggaactctgttccaaactgg  
 aacaacactcaacccctatctcggtctattcttttgattataagggattttgcccatttcggcct  
 attggttaaaaaatgatctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaaatattaacgttt  
 ataatttcaggtggcatctttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggtttattttctaaat  
 acattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacccctgataaaatgcttcaataatattgaaaaa  
 ggaagagtagtagtattcaacatttccggtgtcgcccttattcccttttttgccgcattttgccct  
 cctgtttttgctcacccgaaacgctgggtgaaagttaaagtagctgaagatcagttgggtgacg  
 agtgggttacatcgaaactggatctcaatagtggttaagatccttgagagttttcgccccgaagaac  
 gtttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgatttgacgcc  
 gggcaagagcaactcggtcgccgcatcacactattctcagaatgactgggtgagtagtactcaccagt  
 cacagaaaagcatctcaggtatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatga  
 gtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacgatcgaggagaccgaaggagctaacgctttt  
 ttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccctgatcgttgggaaccgagctgaatgaagccat  
 accaaacgagcgagctgacaccagatgcctgtagtaattggttaacaacgttgccgaaactattaa  
 ctggcgaaactacttacttagcttccgggcaacaattatagactggatggaggcggaataaagt  
 gcaggaccacttctgcgctcgcccttccgggtgggtgtttattgctgataaatctggagccgg  
 tgagcggtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatctgtag  
 ttatctacacgaggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggt  
 gcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgattt  
 aaaacttcatttttaatttaaaagatctagggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaa  
 tcccttaacgtgagttttcggtccactgagcgctcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttct  
 tgagatccttttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaaaacaaaaaaaccacgctaccagcggt  
 ggtttgtttgcccgtatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcg  
 agataccaataactgtccttctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagca  
 ccgctacataactcgtctgctaactcctgttaccagtggtgctgcccagtggtgataagtcgtg  
 tcttaccgggttggtactcaagacgatagttaccgggataagggcgagcggtcggtgtaacggggg  
 gttcgtgcacacagcccagcttggagcgaaacgacctacaccgaaactgagatacctacagcgtag  
 ctatgagaaagcgccacgcttcccgaaaggagaaaggcgagaggtatccggtaagcggcaggggt  
 cggaacagggagagcgacagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcg  
 ggtttcgccacctgactgtagcgctgattttgtgtagctcgtagggggcgagcctatgg  
 aaaaacggcagcaacgcgccctttttacggttctggtccttggcctttgtcggtttgtgctcacatgtt  
 ctttctcggttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccg  
 ctcgccgagcggaacgagcgagcgagtcagtgagcgagggaagcggaagagcgcccaata  
 cgcaaacgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcaggtttcccg  
 ctggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattatgtgagttagctcactcattaggcaccacg  
 ctttacactttatgcttccggctcgatgtgtgtggaattgtgagcggaatacaatttcacaca  
 ggaacagctatgacctgattagccagatttaattaagg

10

20

30

40

50

【 0 1 9 0 】

pAAV-Pmyo6-TMC1ex1 ( SEQ ID NO: 6 )

L- ITR : 1 ~ 141

ミオシン6 ( myo6 ) プロモーター : 155 ~ 1,396

TMC1ex1 : 1,425 ~ 3,710

bGHポリAシグナル : 3,745 ~ 4,225

R-ITR : 4,262 ~ 4,402

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgagggccgcccgggcaaaagcccgggcgctcgggcg  
accttttggtcgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgcccaactccatcac  
taggggttcctgcgggccgcaacgctgcaagaaccctcactggctgaactatcttgccagccccctt  
atTTTGTTTTCATATTAACCTCTTTTCTAGTAAAGGAGATGTTTGCTCTCAAATTTGCATAGG  
AATGTAATATTTAATTTAAAAAGATGACCCACATATGACCTTATAAGGACAGTAAAAATAAACAA  
CCGGAAAGATAAAGCGGGCCAGTTGGCTCAGTTCTATAAAACCAGCCCACAAGGATTGTCATAT  
TCTTAGGCTTGCGCGGGCTACATGATGAGTTCCAGGACTGCCTGGTTACAGACCGAGACTCTCTC  
AAGAGTCCAGATAAACAAACAAGGGGGCGAGGTGGAATACAGGGGCTGTAAGAAGTAAATA  
TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGAGAAGAAAAATTTCTTCCGTGGTTCAATCTCCAAGG  
GCTGAACAGGAAGTTGAGCGCAGGCAGGTGAGGAGCACGAGCCTAGATGGGCTGCGGTGCCACCC  
TAATCCCCACAAGCGAGTTCCCTCCGCAATTCGCCTGTCCCACTCTCAACTTTTCTTCAACTGACT  
CTTTGCTGTGGTCCCTCGCTGTGGCAGTGGAACAACCTACCACTGCGAGGTAGGGAATGTCATGA  
GGGGCTACCTGCAGCCCTTGGCTTGCAGGGATGCAGGGATGCGGTGCGAACCTGAGGCCCCGCCC  
TTCTCTTGCCCCACGCCATTAGGCCACGCCCCTACCCAGCACTCCTTCAACCACCCCTTCCCCG  
GCGCCTCATGAGGTCCCGCCCCCTCTCAACCCTAGCTCTTGAGGCCTCCCTTCACAGCCGCCCCG  
GCGTTCCCTTGACTTGAGGCCACGTCCCTCTGCTCCTTCATTCCCAAGACCCTACGCTTTGCGAGT  
CCTCCCTGTCTGTGCTAGGACCCCGCCCCCTCTCAGCCCTTCTGCCCCAAGACCCCGCCCCCT  
AGGCTGTTCCCCCCACTGGCCAATGAAGACCCGCCCCCTTCTTTAGCCGCCCGCCCCGGTCCCA  
CAAAATCCCGCCTCCGCCCCGCCCTCCCGCCCCCTTGGGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
CTGGGCACCTCTGCAGGGCTCTCTGGCCGGCGGGTGGAGACCGATCCGGGATCTGTCCCAGCAGGA  
AGCGTATCCCGGCCCGCGTCTGCTGCTGCTCCTCGGTGCTCGCTCTCGGCCGCGGTGTCGCGCTT  
GCCCTTCGCGCCCCGAGCCCCGGCAGCCTCTCgagCTCAAGCTTCGAATTcgtcgacaggATGCCA  
CCCCAAAAAGTGCAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTGAAGA  
AGAAGAAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGAGACCAAGAGGAAACGGACCAGAGATGTCA  
TCAATGAGGATGACCCAGAACCGGAGCCGGAGGATGAAGAAACAAGAAAGGCAAGAGAAAAAGAA  
AGGCGGAGGAGGCTGCGGAGAGGAGCGGAAGAAGAAGAAATTGATGAAGAGGAATTAGAACG  
GTTAAAAAGCACTGCTCGATGAGAATAGACAAATGATCGCTACTGTCAAATGTAAACCTTGGAAAA  
TGGAGAAGAAAATTGAAGTTCTCAAGGAAGCAAGAAATTTGTGAGTGAGAATGAAGGCGCTCTT  
GGGAAAGGAAAGGGAAGAAGTGGTTTGCATTTAAGATGATGATGGCCAAGAAATGGGCAAAAT  
CCTCCGAGATTTTGAAGACTTCAAGCGGCTTGCGTCCCATGGGAAAACAAAATCAAGGCAATTG

10

20

AAAGTCAGTTTGGTTCTCAGTGGCCTCGTACTTCTGTTCTCTCAGGTGGATGTACGGCGTCAAC  
ATGGTTCTCTTTGTGTTGACCTTCAGCCTCATCATGTTACCGGAGTACCTCTGGGGTTTACCGTA  
CGGCAGCTTACCTAGGAAAACAGTCCCAAGAGCTGAAGAAGCATCTGCAGCCAACCTTGGTGTGT  
TGTATGACTTCAATGGCCTGGCGCAGTACTCTGTCTCTTTTATGGCTATTACGACAATAAACGC  
ACGATCGGATGGCTGAATTTCCGGCTACCTCTTTCTACTTCTGGTGGGGATTATGTGCATTGG  
ATACAGCTTCTGGTTGTCTCAAGCGATGACCAAAAATATTGGTGACGATGGTGGTGGCGATG  
ACAACACTTTCACCTCAGCTGGAAGGTGTCTGTAGCTGGGACTATCTGATTGGTAACCTGAA  
ACAGCCGACAACAAGTTAACTCTATCACGATGAACCTTAAGGAAGCCATCATAGAAGAGAGAGC  
CGCACAGGTGGAGGAGAACATCCACCTCATCAGATTTCTGAGGTTTCTCGCTAACTTCTTCGTGT  
TCCTCACACTTGGTGCAAGTGGATACCTCATCTTTGGGCTGTGAAGCGATCCCAGGAGTTCCGC  
CAGCAAGATCCTGACACCTTGGGTGGTGGGAAAAAATGAAATGAACATGGTAATGTCCCTCCT  
GGGGATGTCTGTCCACCTGTGTTGACTTATTTGCTGAACTGGAAGATTACCATCCTCTCATTG  
CTCTGAAGTGGCTCCTGGGGCGCATTTTGTCTCTTCTTAGGCAACTGTATGTATTCTATTCTC  
GCCTTGATGGATGAGATTAAACAACAAGATTGAAGAGGAGAAGCTTGTGAAGGCCAATATTACCT  
GTGGGAAGCCAACATGATTAAAGCTTACAATGAATCTCTCTCTGGGCTCTCTGGGAACACCACAG  
GAGCACCTTTTTTCGTTTCATCTCGAGATGTCCCTCGCGGTCCCTGCTGGGAAACAATGGTGGGG  
CAGGAATTCGTGCGTCTCACCGTTCTGACGTCCTGACCACTTACGTCACGATCCTCATTTGGCGA  
CTTCTCAGAGCATGTTTCGTGAGGTTCTGCAATTACTGCTGGTGGTGGGACTTAGAATATGGAT  
ATCCTTCATACACAGAATTCGACATCAGTGGCAACGTCCTCGCTCTGATCTTCAACCAAGGCATG  
ATCTGGATGGGCTCCTTCTTCGCTCCTAGCCTCCCGGGCATCAACATCCTCCGTCTCCACACATC  
CATGTATTTCAGTGTGGGCTGTGATGTGCTGCAATGTTCCCGAGGCCAGGGTGTCAAAGCTT  
CCAGATCCAACAACCTTACCTCGGCATGCTGCTACTCATCTCTTCTGTCCACCATGCGGGTCT  
CTGTACATGATCGTCTCCCTCCCGCCATCTTTGATTGTGGGCCCTTCAGTGGTAAAAACAGGAT  
GTTTGAAGTCATCGGTGAGACCTGGAACATGACTTCCCAAGCTGGATGGCGAAGATCCTGAGGC  
AGCTTTCTAACCCCGGCTTGTCAATTGCTGTCAATTCTGGTGTGAGTCTGACCATCTATTATCTC  
AATGCTACTGCCAAGGGCCAGAAAGCAGCGAATCTGGACCTCAAAAAGAAGATGAAACAGCAAGC  
TTTGGAGAAAATGCGAAACAAGAAAATGGCAGCGGCTCGAGCAGCTGACGCTGCTGGTGGCC  
AGTAAGCGGCCCTCGAGCCTAAGCTTCTAGAagatctacgggtggcatccctgtgacccctccc  
cagtgcctctcctggccctggaagtigccactccagtgcaccagcctgtcctaataaaatta  
agttgcatcatTTTTgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatg  
gagcaaggggcaagtTgggaagacaacctgtagggcctgcgggtctattgggaaccaagctgga  
gtgcagtggcacaatcttggtcactgcaatctcgcctcctgggttcaagcgaattctcctgcct  
cagcctcccgagttgtgggatccagcagcatgaccaggctcagctaattttgttttttg  
gtagagacggggtttcaccataattggccaggctgggtctccaactcctaattctcaggtgatctacc  
caccttgccctcccaaatgtctgggattacaggcgtgaaccaactgctcccttccctgtccttctg  
atTTTgtaggttaaccacgtgcggaccgagcgccgcaggaacccctagtgtgaggtggccact  
ccctctctgcgcgtcgtctgctcactgaggccggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggtt  
tgcccgggcgccctcagtgcgcgagcgagcgagcgtcctgcaggggcgccctgatgcgggtatt  
ttctccttacgcattctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagtacgcgcct  
gtagcggcgcatTAAGCGCGCGGGTGTGTTGTTacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagc  
gccctagcgccgctcctttcgtttcttcccttcttctcgcacggttcgcgggtttcccg  
tcaagctctaaatcgggggctcccttttagggttccgatttagtgctttagcgacacctcgacccca  
aaaaacttgattTgggtgatggttcacgttagggccatcgccctgatagacggtttttcgccct  
ttgacgtlygagtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccc  
tatctcgggtattcttttgattataagggattttgcgatttcggcctattggttaaaaaatg  
agctgatttaacaaaaatTTAACCGCAATTTAACAAAATATTACGTTTACAATTTATGgtgc  
actctcagtacaatctgctctgtatgccgcatagttaagccagccccgacacccgcaacacccgc  
tgacgcgccttgacgggcttctgctcctccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccg  
ggagctgcatgtgtcagaggTTTTcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtg  
atacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttt  
tcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgc  
tcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaa  
catttccgtgtgcgccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccaga  
aacgctggtgaaagttaaagatgtgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgg  
atctcaacagcggttaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagca:f

10

20

30



tttaaagtctctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgcccgggcaagagcaactcggctcg  
ccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacgg  
atggcatgacagtaagagaattatgcaagtgcctgataaaccatgagtgataaactgcggccaac  
ttactcttgacaaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcgttttttgacaaacatgggggatca  
tgtaactcgccttgatcgttgggaaacggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgaca  
ccacgatgcctgtagcaatggcaaacacgttgcgcaaacatttaactggcgaactacttactcta  
gcttcccgggaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctc  
ggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagcgggtgagcgtgggtctcgcggtta  
tcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagt  
caggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattg  
gtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaattta  
aaaggatctaggtgaagatcccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcg  
ttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcccttttttctgcg  
cgtaactcgtgcttgcaaaacaaaaaaccacgcgtaccagcgggtggtttgtttgcccggatcaag  
agctaccaactctttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtcctt  
ctagtgtagcagtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacataacctcgctct  
gctaactcctgttaccagtggtgctgctgccagtggcgataaagtcgtgtcttaccgggttggaactca  
gacgatagttaccggataaaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagc  
ttggagcgaacgacctacaccgaactgagataacctacagcgtgagctatgagaagcgccacgct  
tcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaacaggagagcgacga  
gggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttccgccacctgactt  
gagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcggc  
ctttttacgggttccgtggccttttgctggccttttgctcacatgt

10

20

30

【 0 1 9 1 】

pAAV-Pmyo6-TMC1ex1 ( SEQ ID NO: 7 )

L- ITR : 1 ~ 141

myo6 プロモーター : 155 ~ 1,396

TMC1ex2 : 1,425 ~ 4,439

hGH ポリA シグナル : 4,474 ~ 4,954

R- ITR : 4,991 ~ 5,131

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggcg  
acctttgggtcgcccgccctcagtgagcgagcgcgcagagagggagtgccaaactccatcac  
taggggttccctgcggccgcagcgcgTGCAAGAACCTCACTGGCTGAATATCTTGCCAGCCCCCTT  
ATTTTGTTTTCATATTAACCTCTTTTTTCTAGTAAAGGAGATGTTTGCTCTCAAATTTGCATAGG  
AATGTAATATTTAATTTAAAAAGATGACCCACATATGACCTTATAAGGACAGTAAATTAACAA  
CCGGAAGATAAAAGCGGGCCAGTTGGCTCAGTTCTATAAAACAGCCACAGGATTGCTACTAT  
TCTTAGGCTTGCGCGGGCTACATGATGAGTTCAGGACTGCCTGGTTACAGACCGAGACTCTCTC  
AAGAGTCCAGATAAACAACAACAAAGGGGGCGAGGTGGAATACAGGGGCTGTAAGAAGTAAATA  
TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGAGAAGAAAAATTTCTTCCGTGGTTCAATCCTCCAAGG  
GCTGAACAGGAAGTTGACGCAGGCAGGTGAGGAGCACGAGCCTAGATGGGCTGCGGTGCCACCCCT  
TAATCCCCACAAGCGAGTTCTCTCGCAATTCGCCTGTCCCACTCTCAACTTTTCTTCAACTGACT  
CTTTGCTGTGGTCCCTCGCTGTGGCAGTGGAACAACCTACCACTGCGAGGTAGGGAATGTCATGA  
GGGGCTACCTGCAGCCCTTGCTTGAGGGATGCAGGGATGCGGTGCGGAACCTGAGGCCCCGCCC  
TTCTCTTGCCCCACGCCATTAGGCCACGCCCCCTACCCAGCACTCCTTCAACCAACCCCTTCCCCG  
GCGCCCTCATGAGGTCCCGCCCCCTCTCAACCTAGCTCTTGAGGCCTCCCTTCACAGCCGCCCCG  
GCGTTCTTGACTTGAGGCCACGTCCCTCTGCTCCTTCAATCCCAAGACCTACGCTTTGCGAGT  
CCTCCCTGTCTGCTGCTAGGACCCCGCCCCCTCTCAGCCCTTCTGCCCAAGACCCCGCCCCCTT  
AGGCTGTTCCCGCCCACTGGCCAATGAAGACCCGCCCCCTTCTTTAGCCGCCCCGCCCCGTTCCA  
CAAAATCCCGCCTCCGGCCCCGCTCCCGCCCCCTTGGGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
CTGGGCACTCTGCAGGGCTCTCTGGCCGGGGTGGAGACCGATCCGGGATCTGTCCAGCAGGA  
AGCGTATCCCGCCCGCGCTGCTGCTGCTCGGTGCTCGCTCTCGGCCCGGGTGTGCGGCTT  
GCCCCTCGCGCCCGCAGCCCGGCAGCTCTCgagCTCAAGCTTCGAATTCgtcgacaggATGTTG  
CAAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTGAAGAAGAAGATAA



cgacgccccgggctttgccccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgagcgagctgcctgcaggggcg  
 cctgatgcgggtatcttctccttacgcatctgtgcgggtatctcacaccgcatacgtcaaagcaacc  
 atagtacgcgccctgtagcggcgcatataagcgcgcggggtgtgggtgttacgcgcagcgtagaccg  
 ctacacttgccagcgccctagcgcggcgtcctttcgctttcttcccttcttctcgccacggttc  
 gccggctttcccgctcaagctctaaatcgggggctcccttttaggggttcggatttagtgctttacg  
 gcacctcgacccccaaaaaacttgatttgggtgatgggttcacgtagtgggcatcgccctgataga  
 cggtttttcgcccctttgacgttggagttccacgttctttaaagtggaactcttgttccaaactgga  
 acaacactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggtatgttgcgatttcggccta  
 ttgggttaaaaaatgagctgattttaaataaaatttaacgcgaatttttaacaaaataattaacgttta  
 caattttatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgcgcgcatagtttaagccagccccgacac  
 ccgccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctccggcatccgcttacagacaagc  
 tgtgacgctctcgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgctcatcacgaaacgcgcgagac  
 gaaagggcctcgtagacgcctatttttaggttaagtgtcatgataataatgggtttcttagacg  
 tcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattc  
 aaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaaga  
 gtatgatttcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtt  
 tttgctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgagg  
 ttacatcgaaactggatctcaacagcggttaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttc  
 caatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgattgacgcgggcaa  
 gagcaactcgtgac  
 aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacatgagtgata  
 acactcgggcaacttacttctgacaacgacgcggaaggacggaaggagctaacgcttttttgac  
 aacatgggggatcatgtaactcgcccttgatcgttgggaacggagctgaatgaagccataccaaa  
 cgaragcgtgac  
 aactacttactctagcttcccggaac  
 ccacttctgctcgctcgcccttcccgctggctgggtttattgctgataaatctggagcgggtgagcg  
 tgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtattct  
 acacgacggggtgctcgac  
 ctgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatataacttttagattgattttaaact  
 tcatttttaaatttaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatccctt  
 aacgtgagtttctgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagat  
 ccttttttctgctcgctaatctgtgcttgcacacacacacacacacacacacacacacacacac  
 tttgcccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagatac  
 caaatactgtccttctagtgtagcgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcacgcct  
 acatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggtgctgctgccagtgggcgataagtcgtgttac  
 cggttggactcaagcagatagttaccgataaaggcgagcggtcgggctgaacggggggttcgt  
 gcacacagccagcttgagcggaacgac  
 gaaagcgccacgcttcccgagggaagggcggaaggtatccggttaagcgcgagggtcggaac  
 aggagagcgacaggggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcggtttc  
 gccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggagcctatgaaaaaac  
 gccagcaacgcggcctttttacggttcttgcccttttgccttttgcctcacatgt

10

20

30

【 0 1 9 2 】

pAAV-Pmyo6-TMC2 ( SEQ ID NO: 8 )

L- ITR : 1 ~ 141

myo6 プロモーター : 155 ~ 1,396

TMC2 : 1,425 ~ 4,091

hGHポリAシグナル : 4,126 ~ 4,606

R- ITR : 4,643 ~ 4,783

cctgcagcgagctgcgcgctcgctcgctcactgagggcgcccggggcaagcccgggcgctggggcg  
 acctttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgagcgagagggagtgggccaactccatcac  
 taggggttctcgcggcgacgcgTGCAAGAACCCTCACTGGCTGAACATCTTGCCAGCCCCCTT  
 ATTTTGTTTTCATATTAACCTCTTTTTCAGTAAAGGAGATGTTTGTCTCAAATTTGCATAGG  
 AATGTAATATTTAATTTAAAAAGATGACCACATATGACCTTATAAGGACAGTAAATTTAAACAA

CCGGAAAGATAAAGCGGGCCAGTTGGCTCAGTTCCTATAAAACCAGCCCACAAGGATTGTCACTAT  
TCTTAGGCTTGCGCGGGCTACATGATGAGTTCAGGACTGCCTGGTTACAGACCGAGACTCTCTC  
AAGAGTCCAGATAAACAACAAGGGGGCGAGGTGGAAATACAGGGGCTGTAAGAAAGTAAATA  
TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGAGAGAAATTTCTTCCGTGGTTCAATCCTCCAAGG  
GCTGAACAGGAAGTTGACGACAGGAGGTGAGGAGCAGAGCCTAGATGGGCTGCGGTGCCACCT  
TAATCCCCACAAGCGAGTTCCCTCCGCAATTCGCCTGTCCCACTCTCAACTTTCTTCAACTGACT  
CTTTGCTGTGGTCCCTCGCTGTGGCAGTGGAAACAATACTACCACTGCGAGGTAGGGAATGTCATGA  
GGGGCTACCTGCAGCCCTTGGCTTGACGGGATGCAGGGATGCGGTGCGAACCTGAGGCCCGCCCC  
TTCTCTTGGCCACGCCATTAGGCCACGCCCCCTACCCAGCACTCCTTCAACCACCCCCCTTCCCCG  
GCGCTCATGAGGTCCCGCCCCCTCTCAACCTAGCTCTTGAGGCTCCTTTCACAGCCGCCCCG  
GCGTTCTTGACTTGAGGCCACGTCCCTCTGCTCCTTCATTCCCAAGACCTTACGCTTTGCGAGT  
CCTCCCTGTCTGTGCTTAGGACCCCGCCCCCTCTCAGCCCTTCTGCCCCAAGACCCCGCCCCCT  
AGGCTGTTTCCCGCCCACTGGCCAATGAAGACCCGCCCCCTTCTTTAGCCGCCCCGCCCCGGTCCCA  
CAAAATCCCGCCTCCGGCCCCGCTCCCGCCCCCTTGGGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
CTGGGCACTCTGCAGGGCTCTTGCGCCGGCGGGTGGAGACCGATCCGGGATCTGTCCCAGCAGGA  
AGCGTATCCCGCCCGCGCTCGTGTCTCCTCGGTGCTCGCTCTCGGCCGCGGTGTCGCGCTT  
GCCCTTCGCGCCCGCAGCCCGGAGCCTCTCgagCTCAAGCTTCGAATTCgtcgacaggATGAGC  
CCCCAGTTAAAGAGCTTGACGAGGAAGGTGACAAGTCAGCAAGAAGACCCACAAGGAACAAAC  
CTCCAGAGCTGCATGTCCCCAAGACGGGCACCGAGCCCAATCTAGCCGGAAGGATCCTGCTAAGG  
GTAGCCCCAAGACCAGGGTCTTCCCGGAAGAAACAGATGGAACATGGAAGCTATCACAAGGGGTTG  
CAGGGACAGAAACCACGAAAGGTGGAGAGGTCTCTACAAGGGAGGAAGAAGGATCGGAGAATTC  
CCTTAAGGAGCAGAGAGCATCTCCAAAGAAGGAGAGGGAGGCTCTGAGGAAGGAGGCAAGCAAGC  
AGCTGAGAAAACCCAGGTCCACTTCTTGGGCTCCAGTGTCTCTACTGGAGACTCCCTGTCTGAG  
GAGGAGCTGGCTCAGATCCTGGAACAGGTAGAAGAAAAAAGAAGCTCATCACTACCGTGAGGAA  
CAAACCCCTGGCCCATGGCAAAGAGCTGAGGGAACCTCAGGGAAGCCCAAGCCTTTGTGGAGAAGT  
ATGAAGGAGCCTTGGGGAAGGCAAGGGCAACACCTCTACGCCCTACAGGATGATGATGGCTAAG  
AAATGGGTCAAGTTTAAAGAGGACTTTGATAAATTTCAAGACTCAATGTATTCCCTGGGAATGAA  
GATCAAGGACATTGAAAGTCACCTCGGTTCTTCTGTGGCATCTTACTTCATCTTCTCCGATGGA  
TGTATGGAGTTAACCCTGTCTTTTGGCTTaATATTTGGTCTAGTCATCATCCAGAGGTGCTG  
ATGGGCATGCCCTATGGAAGTATACCCAGAAAGACGGTGCCCTCGGGCTGAGGAAGAGCGAGCCAT  
GGACTTCTCTGTCTTTGGGATTTTGGGGCTACATCAAAATATTCTGCTCTCTCTATGGCTACT  
ACAACAACCCAGCGGACCATTTGATGGCTGAGGTACAGGCTGCCCATGGCTTACTTTATGGTGGG  
GTCAGCGTGTGGCTACAGCTTGATGATCGTCATTAGGTGATGGCCAGCAATACCCAGGGTAG  
CACCAGTGAGGGGGACAGTGACAGCTTACGTTTACGTTCAAGATGTTTACCAGCTGGGACTACC  
TATCTGGGAATTCAGAGACAGCAGACAACAAATATGTCTCCATCACTACCAGCTTCAAGGAGTCT  
TCAGTGGAGCAACAAGAGAGTAACAAAGAAGGGAATATCCACCTGACAAGATTCCCTCCGCTCCT  
GGCCAACCTTCTCATCTCTGCTGTCTGTGTGGAAGCGGGTACCTCATTTACTTTGTGGTGAAC  
GGTCCCAGGAGTTCTCCAAAATGCAAAATGTCAGCTGGTATGAAAGGAATGAGGTGGAGATCGTG  
ATGTCTCTGCTAGGGATGTTTTGTCCCCCTCTGTTTGAACCATCGCTGCCTTGGAGAATTATCA  
CCCACGAACCTGGGCTGAAGTGGCAGCTGGGCCGCTCTTTGCCCTTTCTTGGGAAACCTCTACA  
CGTTTCTCCTGGCCCTCATGGACGATGTCCACCTTAAGCTTTCTAATGAGGAAAAATCAAGAAC  
ATCACTCACTGGACCTGTTTAACTATTACAATTCTCAGGTGGGAATGAGAGTGTGCCCCGGCC  
ACCACCACACCTGACAGATGTGCCAGAGGTTCTTGTCTGGGAGACAGCTGTGGGCATTGAGTTTA  
TGAGGCTCACCGTGTCTGACATGCTGGTAACATACCTCACCATCTTGGTTCGGAGATTTCTCCGA  
GCTTGTTTTGTCCGGTTCATGAATCACTGCTGGTGTGGGACCTCGAGGCTGGTTTTCTCCCTCATA  
TGCCGAGTTTGATATTAGTGGAATGTGTTGGGTTTGATCTTCAACCAAGGAATGATCTGGATGG  
GCTCCTTCTATGCTCCAGGACTGGTGGGCATCAATGTCTGCGCTGTGACCTCCATGTACTTTC  
CAGTGCTGGGCAGTGATGAGCAGCAACGTTCCCATGAGCGTGTGTTAAAGCCTCCCGATCCAA  
CAACTTCTACATGGGCTGTGCTGTGTTGGTCTTCTCTCAGCCTCCTGCCTGTGGCCTACACTG  
TCATGTCTCTCCACCCCTCGTTTGACTGTGGCCCCCTTCAGTGGGAAAAACAGAAATGTACGATGTC  
CTCCATGAGACCATCGAGAACGATTTCCCTAAGTTCTTGGGCAAGATCTTTCGCTTCCTTGCCAA  
CCCAGGCTGATCATTCAGCCATCCTGCTAATGTTTCTGGCCATTTACTACCTGAACCTCAGTTT  
CAAAAAGTCTTTCAGAGCTAATGCCAGCTGCGAAAGAAGATCCAAGCGCTCCGTGAAGTTGAG  
AAGAACCATAAATCCATCAAGGGAAGCCATAGTCACATATTCAAGGACACAATCAAGAACAG  
TCCAAAAATGCCACCCAGATACATCTTACTAAAGAAGAGCCACATCTCACTCTTCCAGCCAAA

10

20

30

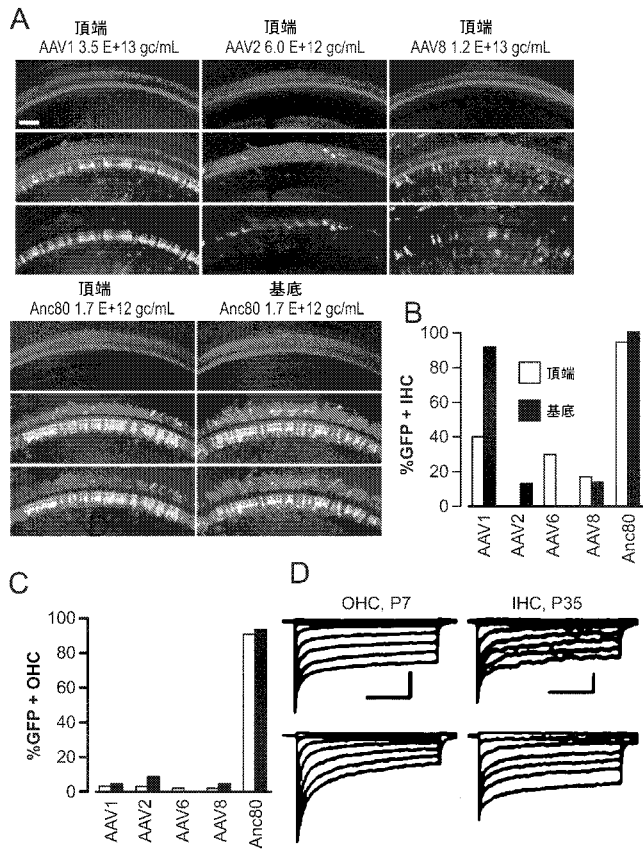
TCCAGACCCTGGACAAGAAAGCGCAGGGCCCCACACCTCCAGTACTGAGGGTGGGGCCTCGCCG  
TCTACCTCCTGGCACCATGTTGGGTCTCAACCACCGAGAGGCAGACGAGATTCTGGCCAACCCCA  
GTCTCAGACTTATACAGGCAGGTACCTTCTGGAAAGAGAACCCAGAGGCCTCACAACGAGCGG  
CCGCTCGAGCCTAAGCTTCTAGAAGatctacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccct  
tcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaaattaagttgcatc  
atthttgtctgactaggtgtcccttctataatattatgggggtggaggggggtggtatggagcaaggg  
gcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgagtg  
cacaatcttggtcactgcaatctccgctcctgggttcaagcgattctcctgctcagcctccc  
gagttgttgggattccaggtcatgaccaggtcagctaatttttgttttttttggtagagacg  
gggtttcaccataattggccaggtggtctccaactcctaattctcaggtgatctacccacctggc  
ctcccaaatgtctgggattacagggctgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtag  
gtaaccacgtgcggaaccgagcgccgcaggaacccctagtgtgagtggtggccactccctctctg  
cgcgctcgctcgctcactgagggcggcgaccaaaggctcgccgacgcccgggctttgcccggg  
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagctgctgcagggcgccctgatgcggtattttctcctta  
cgcatctgtgcggtatttcacacgcgcatagctcaaaagcaaccatagtagcgccctgtagcggg  
cattaagcgcggggggtgtggtggttacgcgcagcgtagccgctacacttgccagcgccctagcg  
cccgtcctttcgcttttcttcccttcccttctcgcacggttcgcccggctttccccgtcaagctct  
aaatcgggggctcccttttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaaactg  
atthgggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagacgggttttgccttttgacgttg  
gagtcacgttctttaaagtgtgactcttgttccaaactggaacaaactcaaccctattctcggg  
ctattcttttgattataagggtatthggcgtatthggcctattggttaaaaaatgagctgattt  
aacaataatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaattttatggtgactctcagt  
acaatctgctctgatgcccgtatgtaagccagccccgacaccccgcaacacccgctgacgcgcc  
ctgacgggcttgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgacggtctccgggagctgca  
tgtgtcagaggtttttcacgcgtcatcacgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgctta  
tttttatagggttaattgtcatgataataatgggttcttagacgtcaggtggcacttttccgggaaa  
tgtgcgcggaacccctatttggttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagac  
aataacccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttccgt  
gtcgcccttattcccttttttggcgcatthttgccttccctgtttttgctcaccagaaacgctggt  
gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatctcaaca  
gcggtaagatcccttgagagtttgcgccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaaagt  
ctgctatgtggcgcggtattatcccgctattgacgcggggcaagagcaactcggtcgccgcataca  
ctattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatga  
cagtaagagaattatgcagtgtgcccataaccatgagtgaataactgcgggcaacttacttctg  
acaacgatcgggagaccgaaggagctaaccgcttttttgcaacatgggggatcatgtaactcg  
ccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgc  
ctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacatttaactggcgaactacttactctagcttcccgg  
caacaattaatagactggtgagggcgataaagtgcaggaccacttctgcgctcgcccttcc  
ggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgacg  
cactggggccagatggtaagccctcccgctatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaact  
atggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgctcactgattaaagcattggtaactgtc  
agaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatthtttaatttaaaggatct  
aggtgaagatcccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactga  
gcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgctaatctg  
ctgcttgcaaaaaaaaccacgctaccagcggtggtttgtttgcccgatcaagagctaccaa  
ctctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataacaaatactgtccttctagtgtag  
ccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactct  
gttaccagtggtgctgctccagtgggcataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgatagt  
taccgataaaggcgagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggaagca  
acgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaaagcgccacgcttcccgaagg  
gagaaaggcgagaggtatccggtaagcggcaggggtcggaacaggagagcgacagggagcttc  
cagggggaaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggtttcgccacctctgacttgagcgtcga  
ttttgtgtatgctcgtcagggggggcgagcctatggaaaaacgacagcaacgcggcctttttacg  
gttccctggccttttgcgtqgccttttgcctcanatgt

10

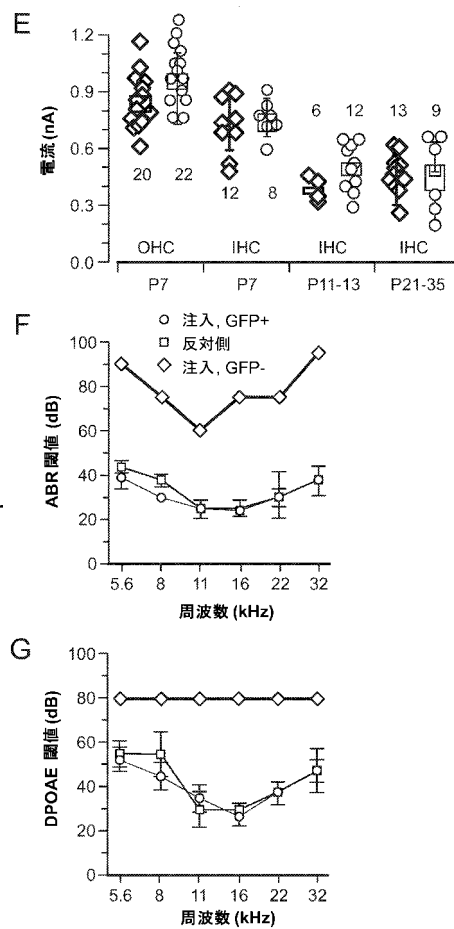
20

30

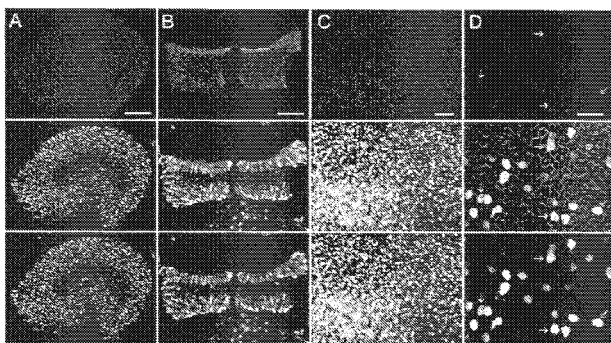
【 図 1 - 1 】



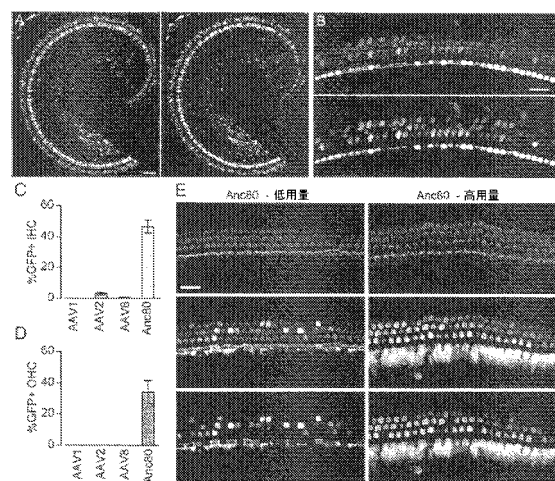
【 図 1 - 2 】



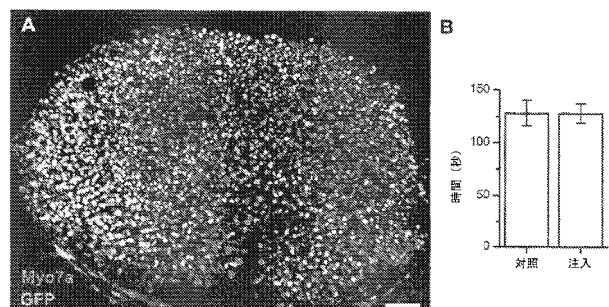
【 図 2 】



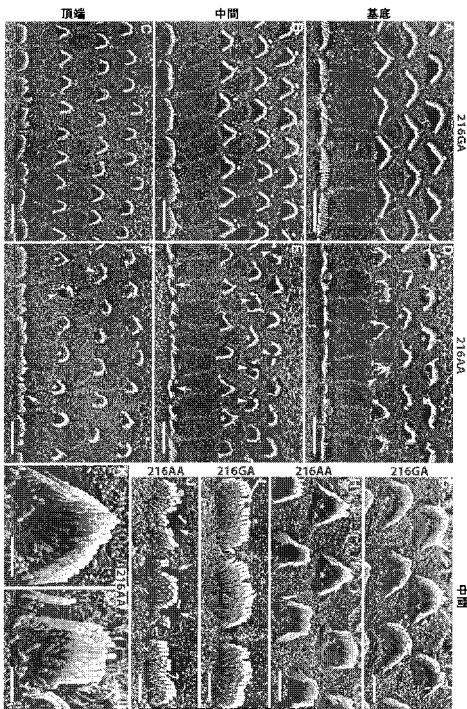
【 図 3 】



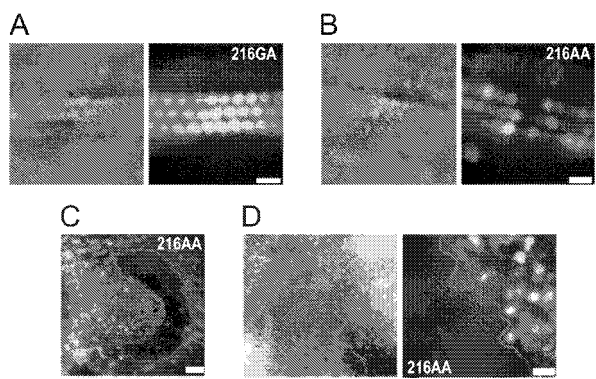
【 図 4 】



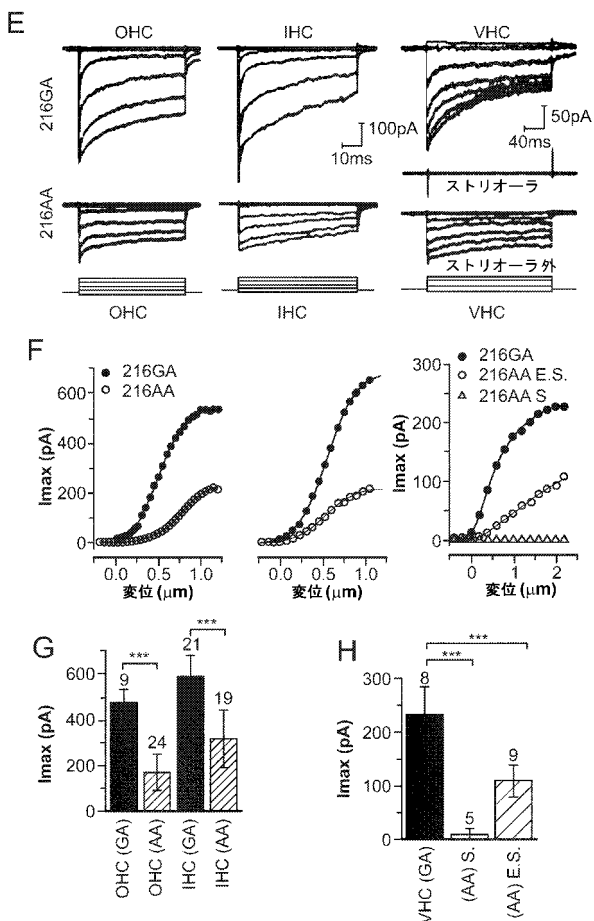
【図 5】



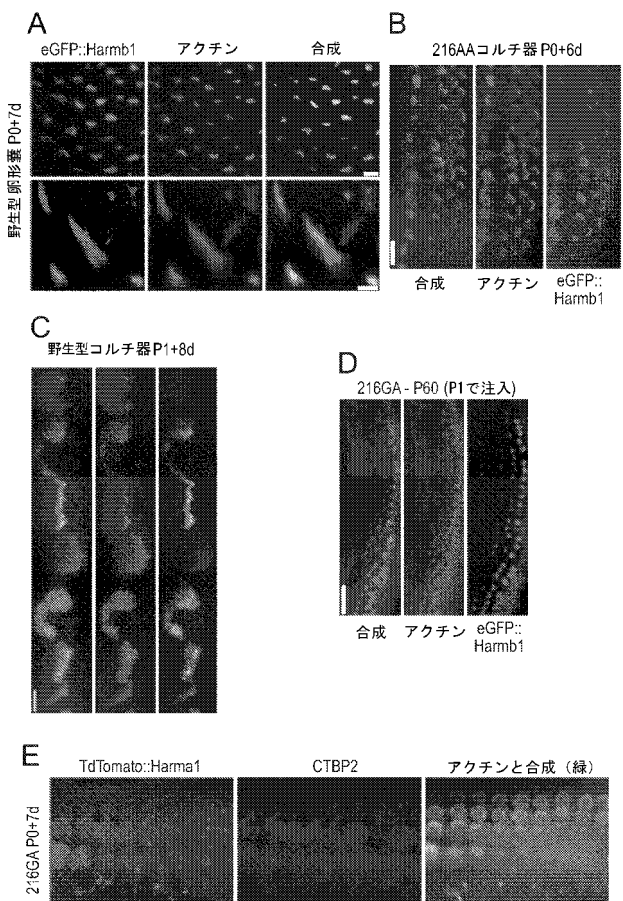
【図 6 - 1】



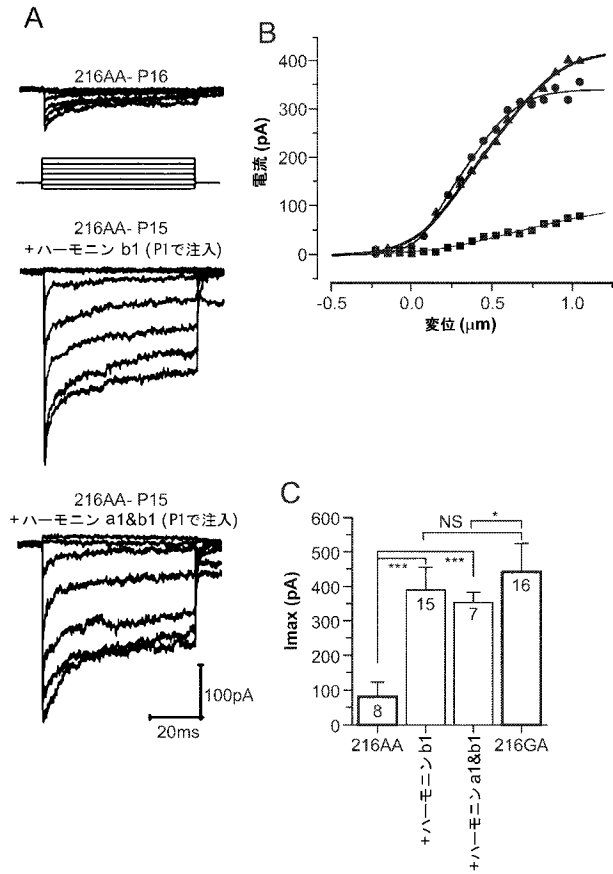
【図 6 - 2】



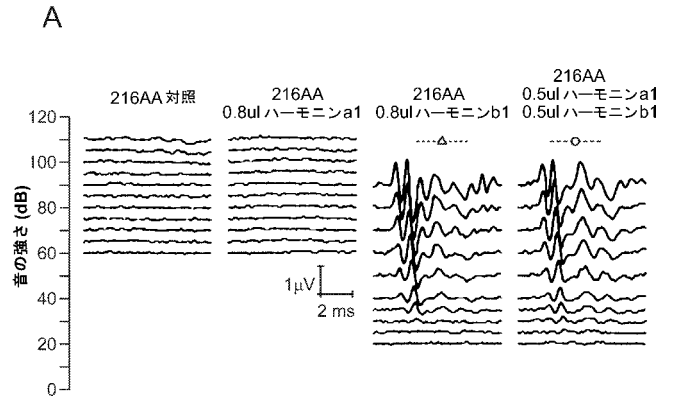
【図 7】



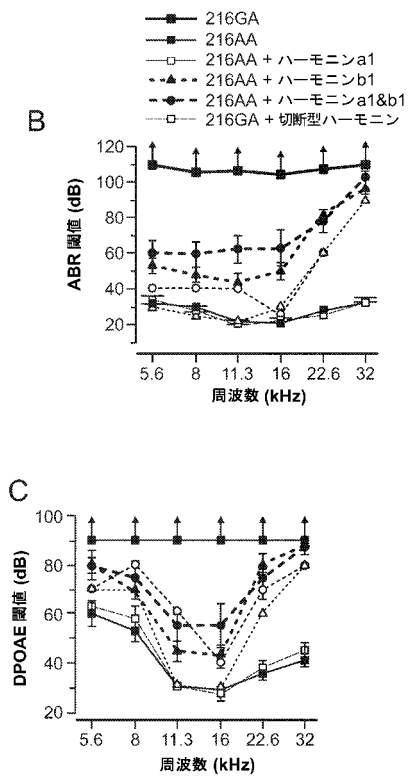
【図 8】



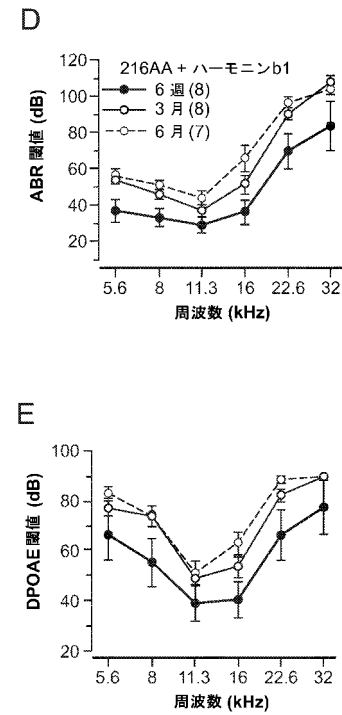
【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

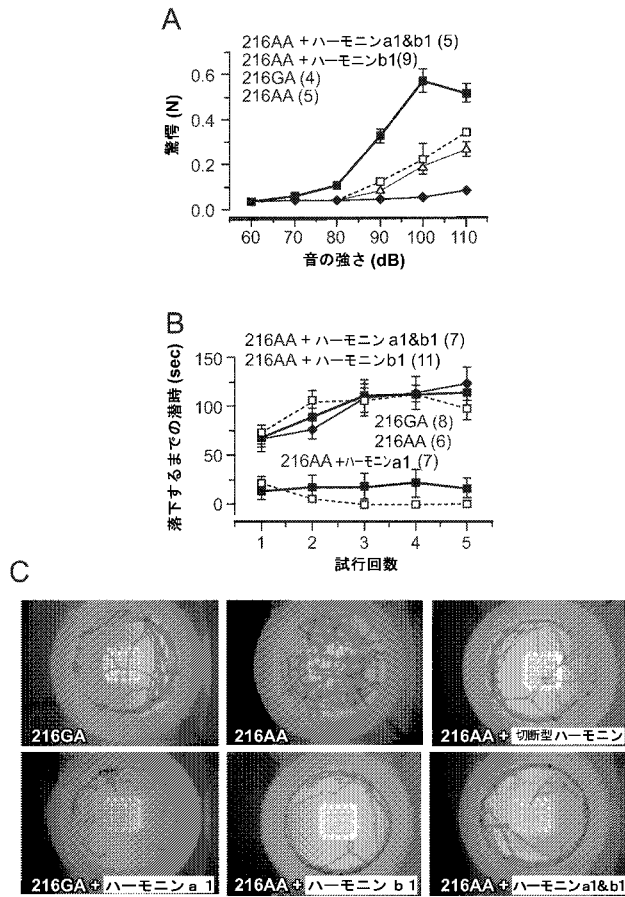


【図 9 - 3】

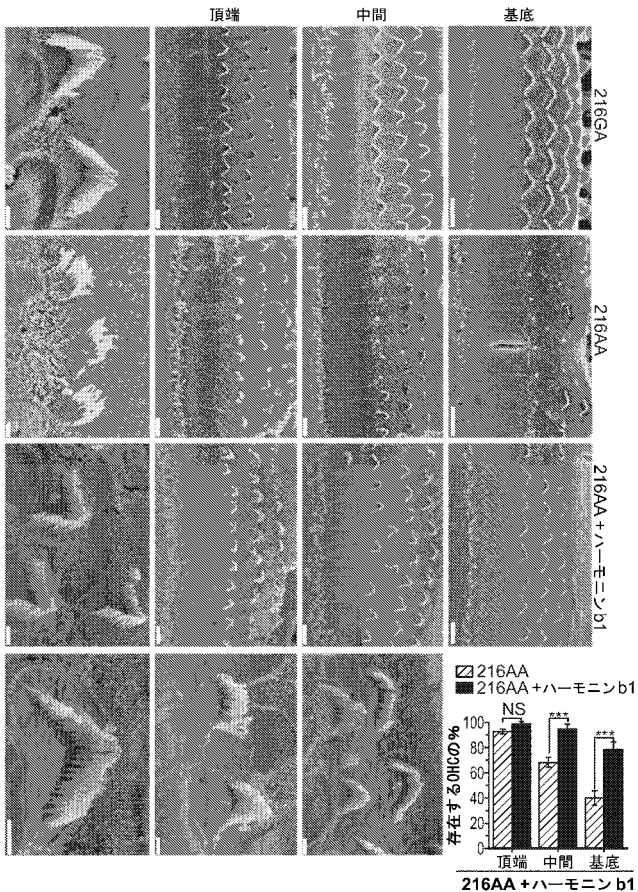




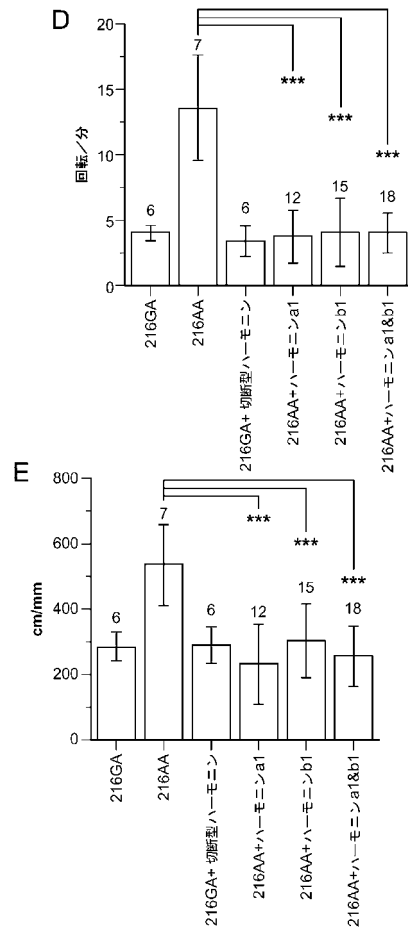
【図 10 - 1】



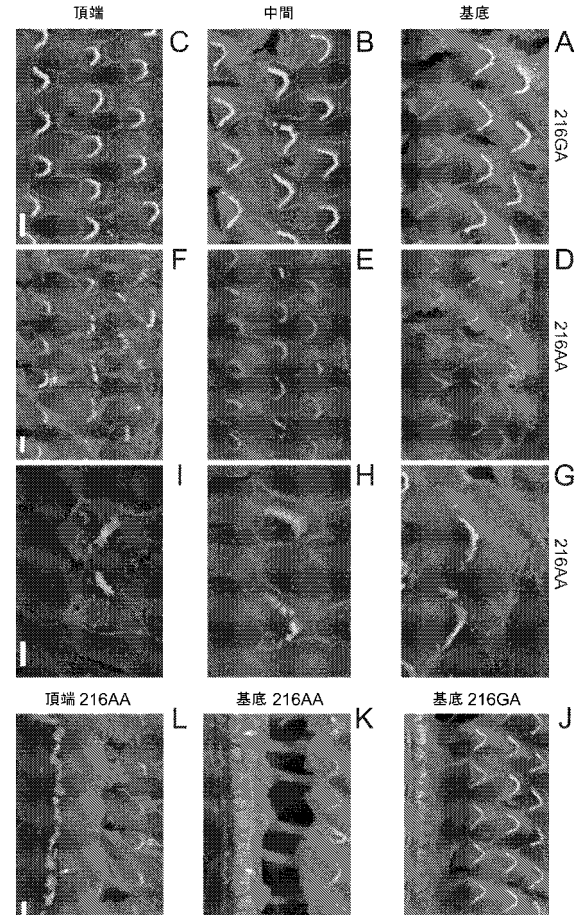
【図 11】



【図 10 - 2】



【図 12】

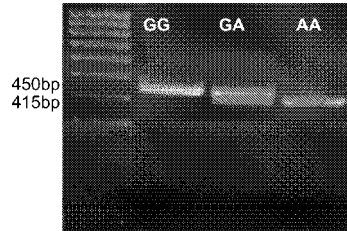




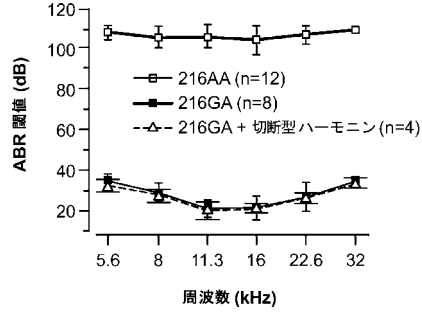
【図 1 6 A - 2】

Seq_1	537	HLHTDLDIPLDMFYPRKPSALFVMMPPSVNSPSKVAPPVLPSSGCHVSSSSSPWV	596
Seq_2	121	QRTPPPIPIPPPSIPTQDITPRPLPSALIEALGNHPERTQDQCHPADWEANTHSGKP	656
Seq_1	597	SSPTTERSPPAKFTCSQPPRGVSTISKPMVHQENHFVYRPAVKSIVLPQML	716
Seq_2	121	KRMVYQIAFRQDFRYEGEDYSMSPEQIGKDVRLIRIKESGLDIALGGVDSFV	776
Seq_1	667	GKVVSAVVEGGAERHGGVKGDEIMAINGIIVTITLAELAALQKAMNQGWDIVL	836
Seq_2	121	VAVCPPEYDDELSTLPSAASQOLARQLEAYEVCHGFTLQLEPTNLLKSRNQ	896
Seq_1	777	TDFSMRPAASAPSE	910
Seq_2	121		120
Seq_1	897		120
Seq_2	121		120

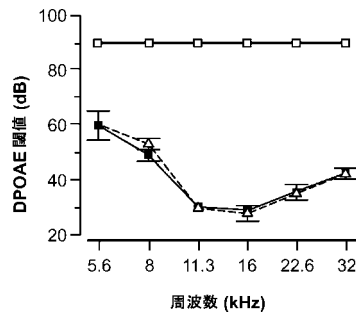
【図 1 6 B】



【図 1 6 C】

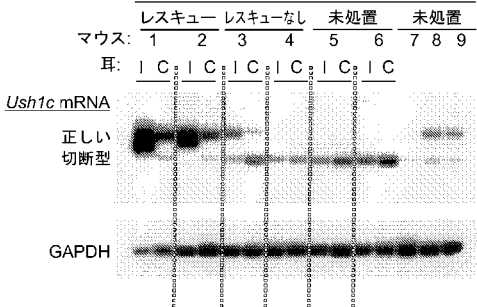


【図 1 6 D】

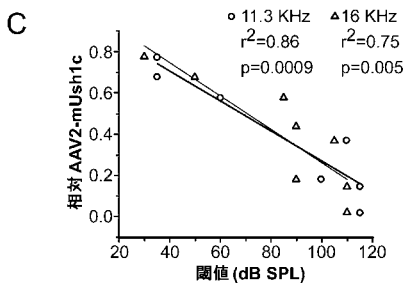
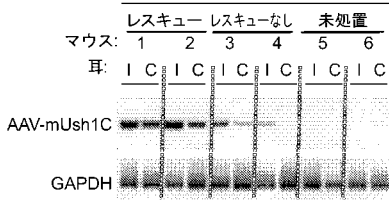


【図 1 7 - 1】

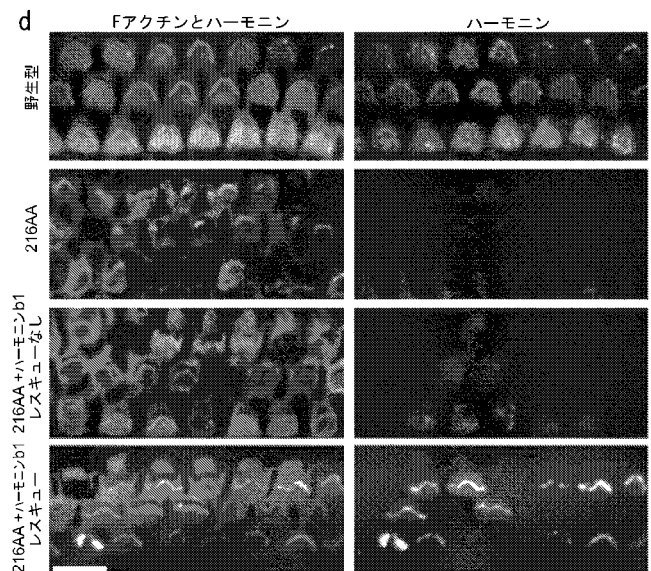
A 216AAマウス; AAV-Ush1C 216GAマウス



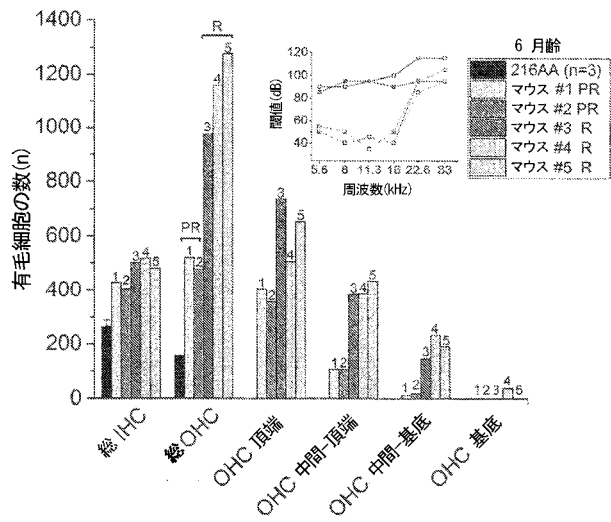
B 216AAマウス; AAV-Ush1C



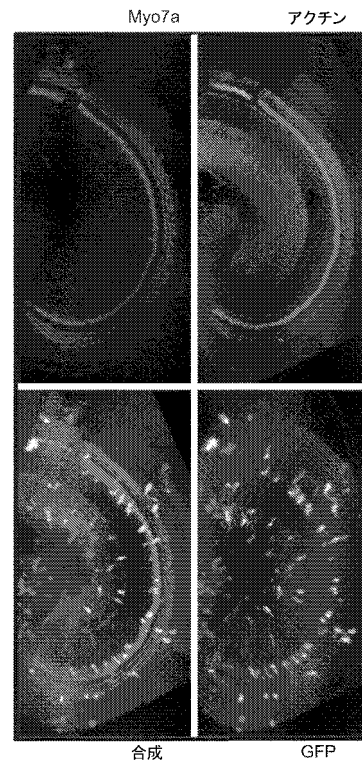
【図 1 7 - 2】



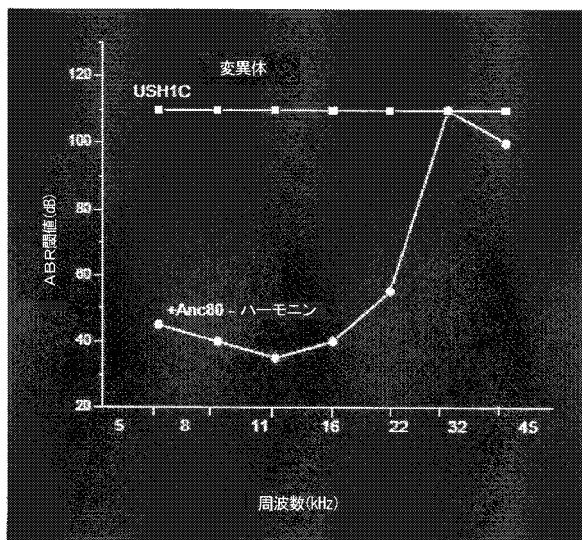
【図 18】



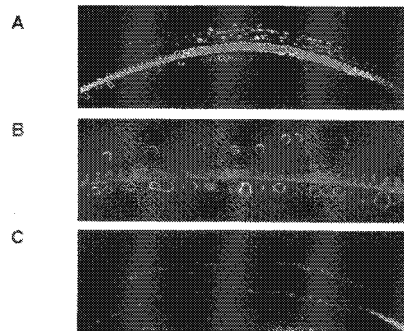
【図 19】



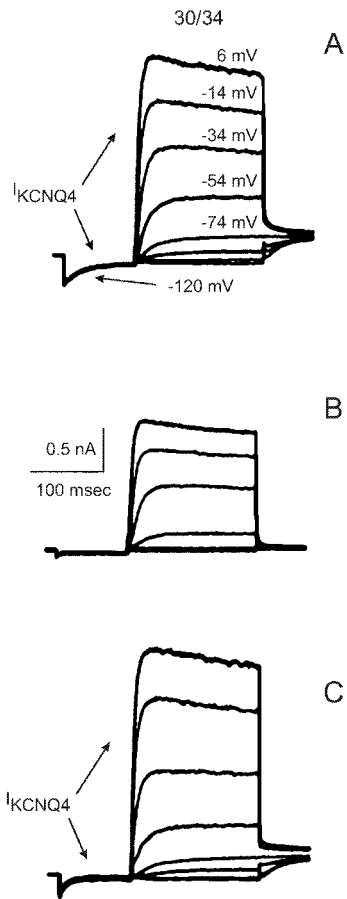
【図 20】



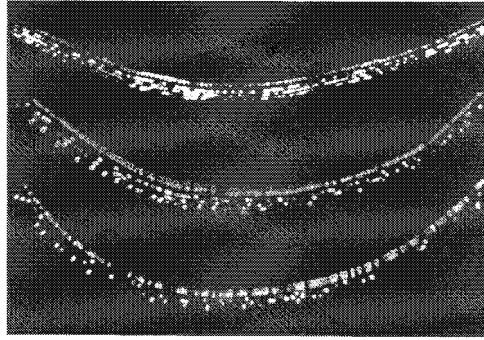
【図 21】



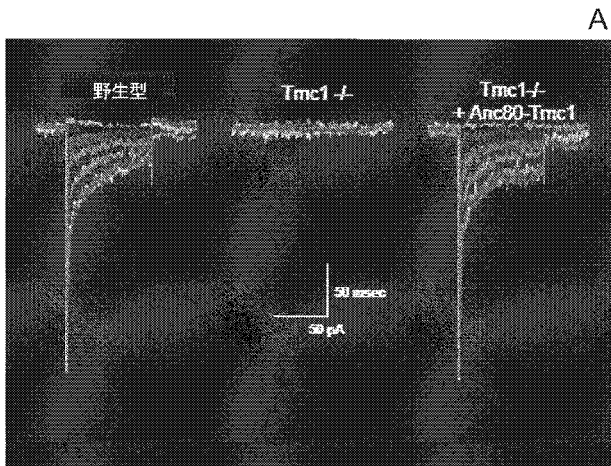
【図 2 2】



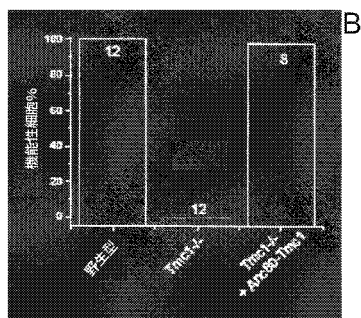
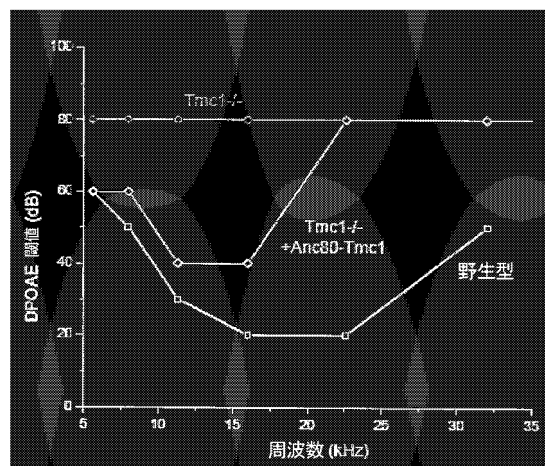
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【 図 2 6 】

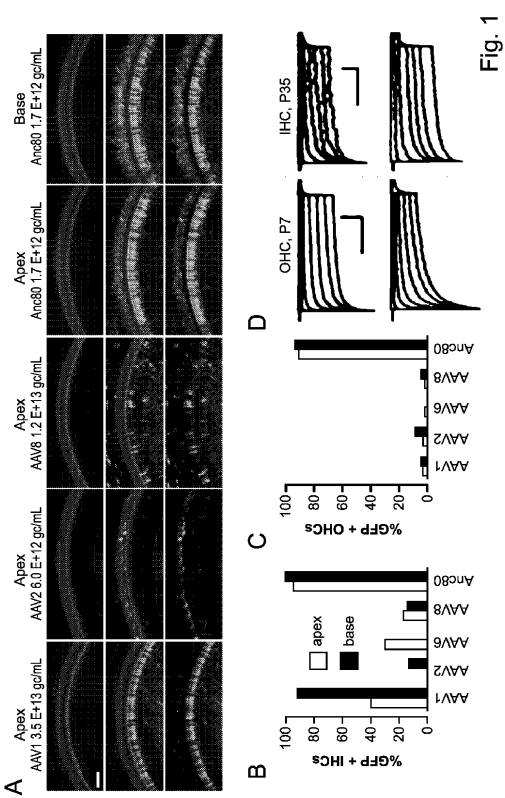
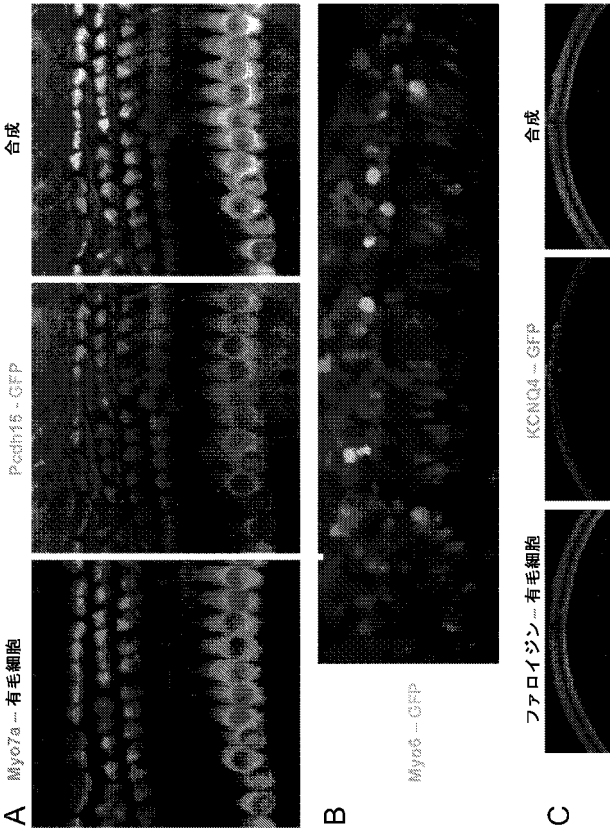


Fig. 1

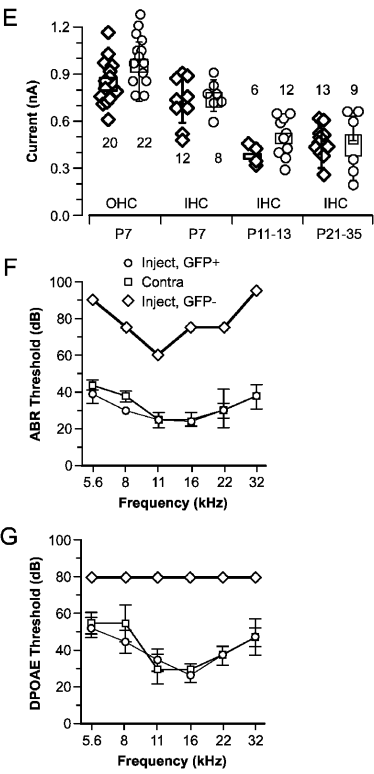


Fig. 1

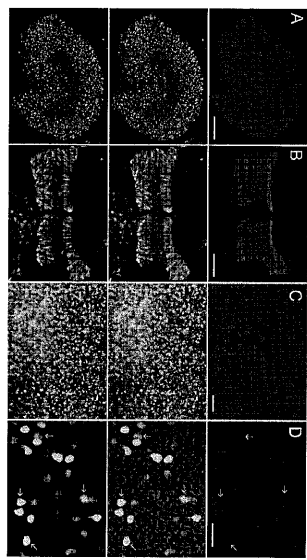


Fig. 2







Fig. 9

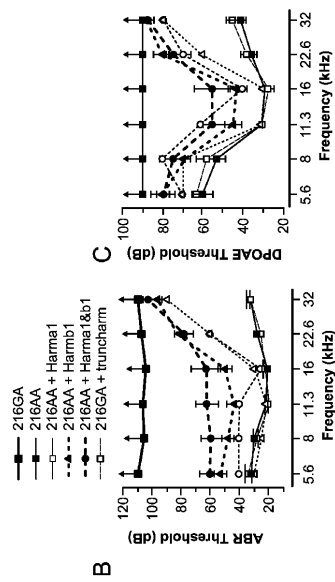


Fig. 9

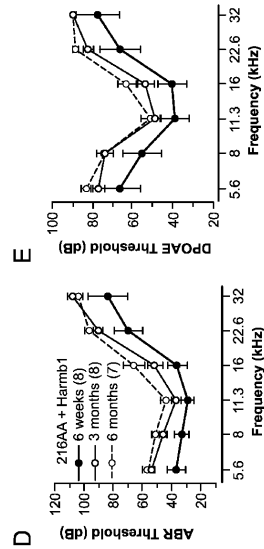


Fig. 10

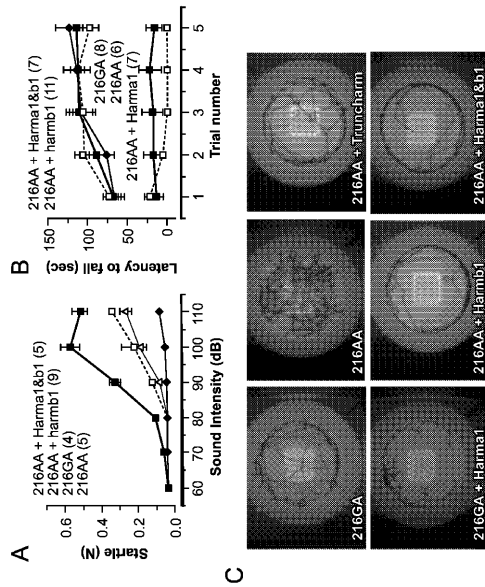
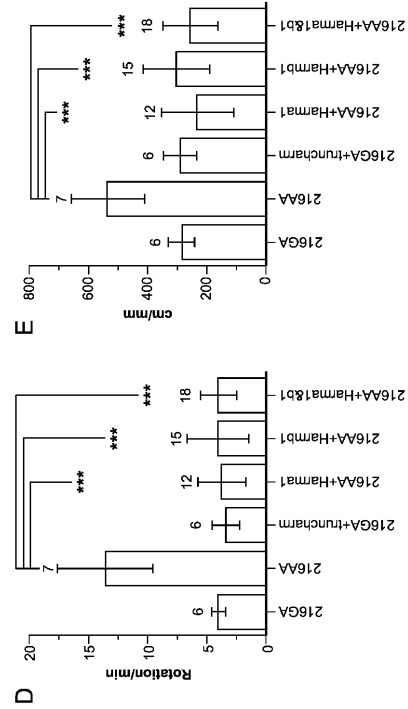


Fig. 10



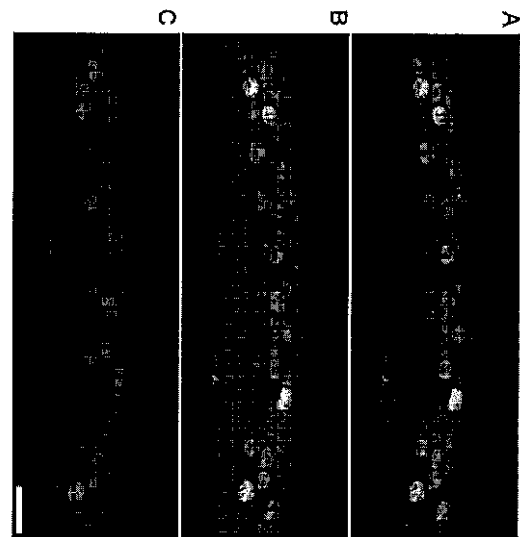
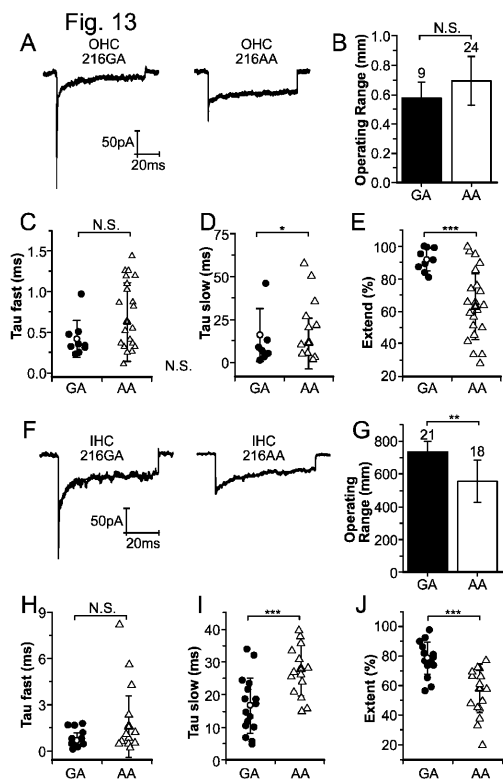
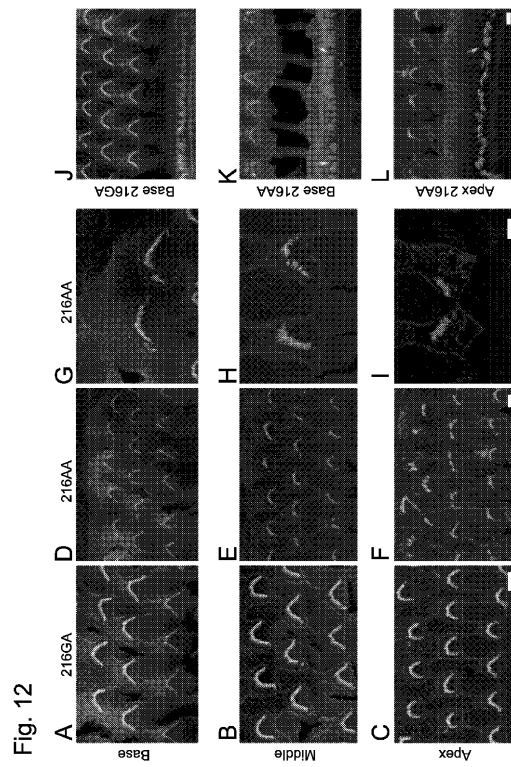
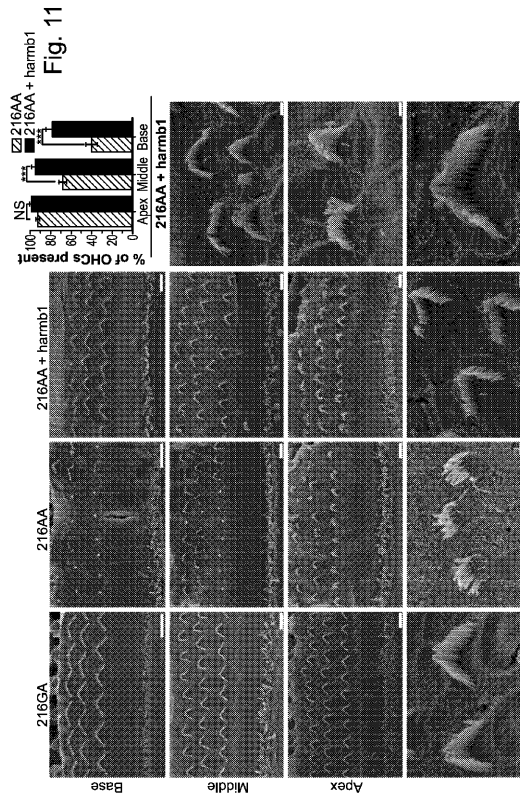


Fig. 16A-2

Seq_1	537	HLHTTDLDDIPLDMEFYPPKATPSALPVMPPSPVNSKVPAPPYLPSSGHVSSSSSPWV	596
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	597	QRTPPPIPIPPPPSIPTQDLTTRPLPSALEALGNHFFXTGDPGHADDWEANTHCKP	656
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	657	SSSPTTTSSFPAPKTFPCSPQPPRGPGVSTISKPMVHQEHNFYRPAVKSEVLPQEML	716
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	717	KRMVYQTAERQDFRKYEEGDFPSMFSPQIAGKDVRLIRIKKESLDIALEGGVDSPV	776
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	777	GKVVVSAYEGGAERHGGVVGDEIMAINGIIVTDYTLAEAAALQKAWNQGWDIDLIV	836
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	837	VACPPKDYDELSSLPSAASKPOLARKQLEAYEPVCRHGFFLOEFTNLLIKSRERNQ	896
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	897	TDPSWRPASPASP	910
Seq_2	121	-----	120

Fig. 15

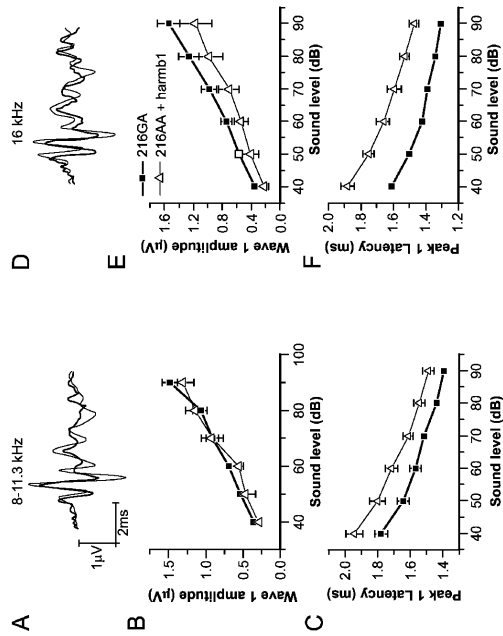


FIG. 16

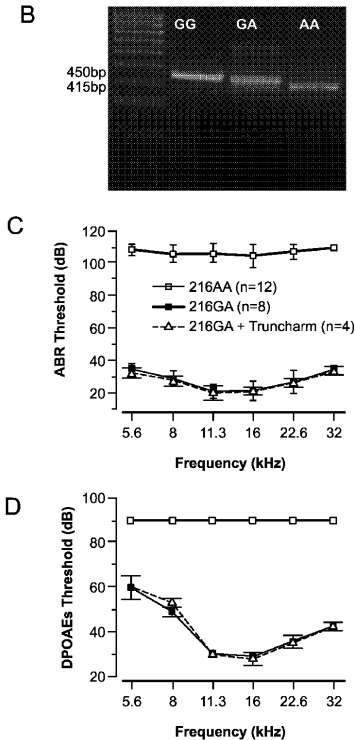
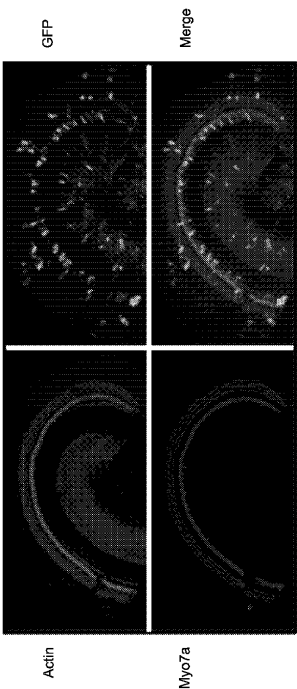
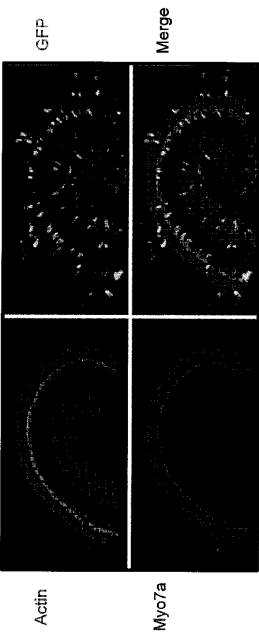
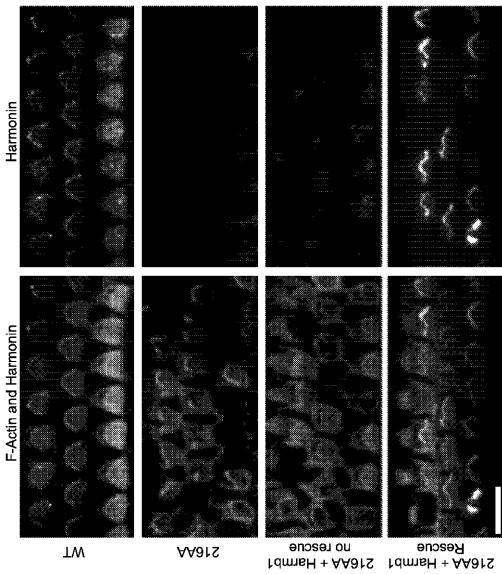
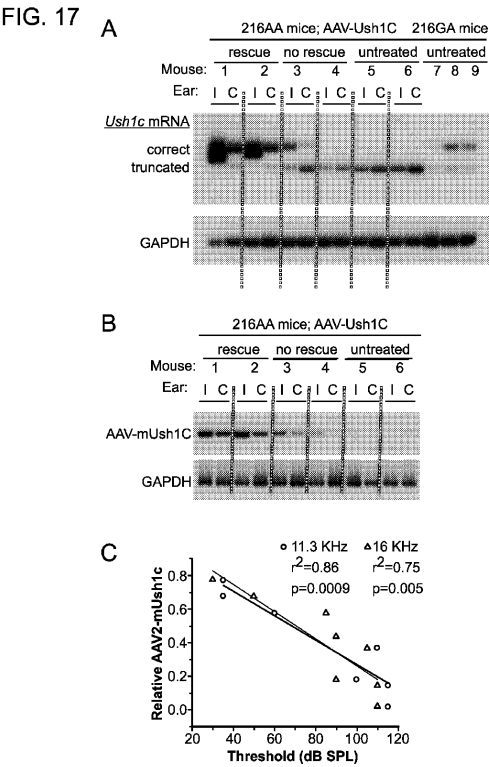


Fig. 16A-1

Alignment of Sequence\_1: (HarmB1\_xprt) with Sequence\_2: (mTruncated\_xprt)

Seq_1	1	MDRKVARBFRKVDFTLIENDAEKDYLDVLRVHQTMVDVAVLVGDLKLVINEPNRLPLFD	60
Seq_2	1		120
Seq_1	61	MDRKVARBFRKVDFTLIENDAEKDYLDVLRVHQTMVDVAVLVGDLKLVINEPNRLPLFD	60
Seq_2	1		120
Seq_1	61	AIRPLPLKHQ---EYQLTPRRSRKLKVRDLRHLPEGLSVRGGLGEGGLFISH	116
Seq_2	61		120
Seq_1	61	AIRPLPLKHQTEGGLGPSAPRRSRQRARPGIWLWTLYLPPHQRPCGRQMSGRG	120
Seq_2	117		120
Seq_1	117	LKGGQDSVGLQVGEIVRINGYSISSCTHEEVINLRTAKTVSKVRHIGLIPVKSPP	176
Seq_2	121		120
Seq_1	177	EESLKWQYVDQVSESGVGRGLGSPNRTTKKKVFTSLVSGRGLGCSISSGPIQKPGI	236
Seq_2	121		120
Seq_1	237	FVSHVPGSLSAEVLGTGDIQIVEVNGIDFTNLQKAEAVNYLKSRSUTISIVAGAGREL	296
Seq_2	121		120
Seq_1	297	FMTDRLEEARQRELQRELMLQKELAMESNKILQEQQEMERQRKETAQKAAENERY	356
Seq_2	121		120
Seq_1	357	RKMEQISEEEEFKQWEEEDWGSEQLILEKTTITAEVHPVPLRKFKSGFMFRYDGFEP	416
Seq_2	121		120
Seq_1	417	TIRKKAKEKKAKYDSIQDLRKNKLEFEQKLYKEKEBEMLEKEKLNLAQVSETE	476
Seq_2	121		120
Seq_1	477	REDLESEKTYWVERLCQLELQISSAENEIPMTTGPPTPPSPVPIAPPLRRFAGGI	536
Seq_2	121		120



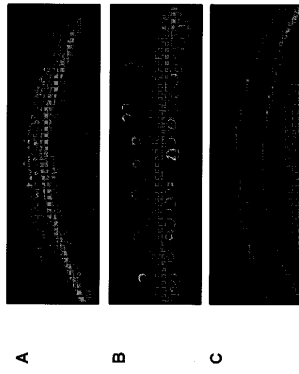


Figure 21

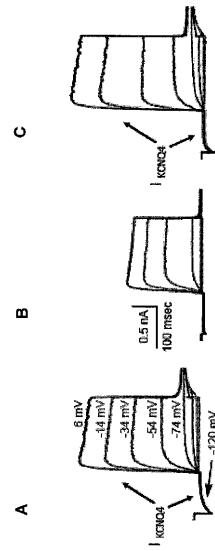


Figure 22

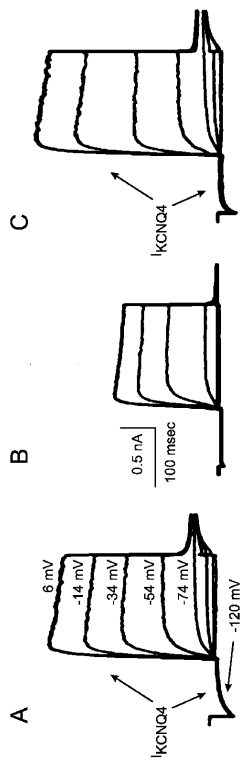


FIG. 23

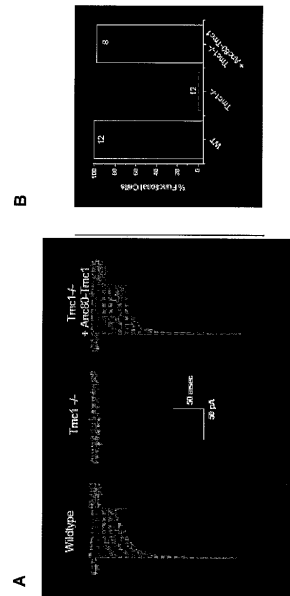


Figure 24

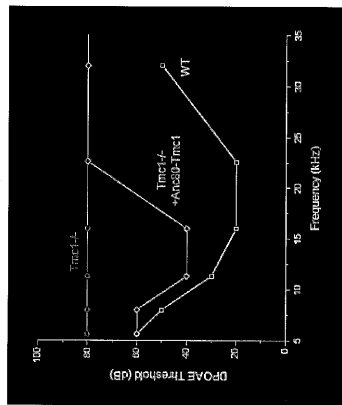


Figure 25

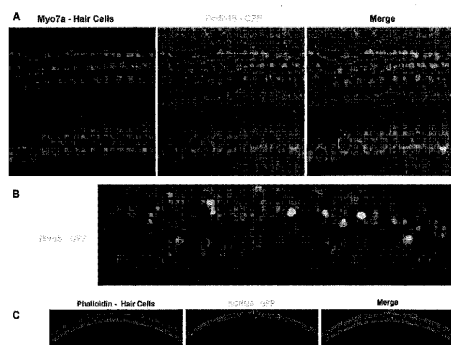


FIGURE 26

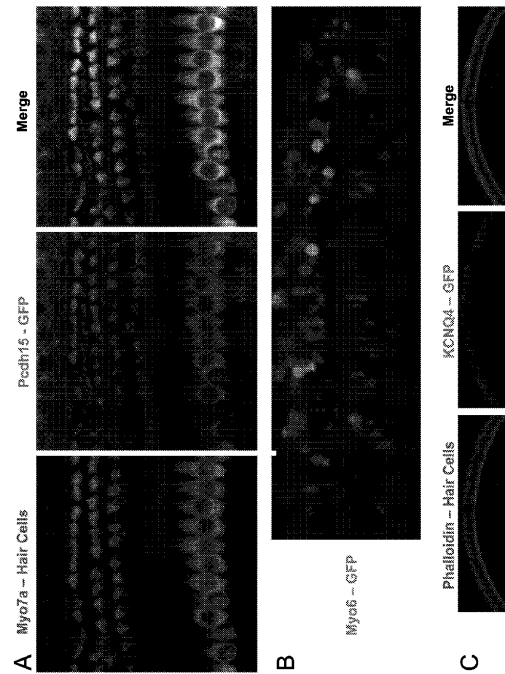


FIG. 27

## 【配列表】

[2020508648000001.xml](#)

## 【手続補正書】

【提出日】令和1年10月11日(2019.10.11)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

## 【配列表】

[2020508648000001.app](#)

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/017104

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61F 11/00; A61K 35/76; A61K 39/235; A61K 47/42; A61K 48/00; C12N 7/01 (2018.01) CPC - A61K 9/0046; A61K 48/005; A61K 2039/525; A61K 2039/6075; C12N 15/86; C12N 2750/14143 (2018.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/93.2; 435/462; 435/235.1; 536/23.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/054653 A2 (MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY) 16 April 2015 (16.04.2015) entire document	1-6
Y	US 2005/0287127 A1 (Li et al) 29 December 2005 (29.12.2005) entire document	1-11
Y	US 2013/0095071 A1 (BANCE et al) 18 April 2013 (18.04.2013) entire document	7-11
P, X	WO 2017/100791 A1 (MASSACHUSETTS EYE AND EAR INFIRMARY et al) 15 June 2017 (15.06.2017) entire document	1-11
A	WO 2015/089462 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 16 June 2015 (18.06.2015) entire document	1-11
A	GYÖRGY et al. "Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV," Molecular Therapy, 09 January 2017 (08.01.2017), Vol. 25, No. 2, Pgs. 379-391. entire document	1-11
A	SHU et al. "Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes," Human Gene Therapy, 01 September 2016 (01.09.2016), Vol. 27, Iss. 9, Pgs. 687-99. entire document	1-11
P, A	WO 2017/136764 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al) 10 August 2017 (10.08.2017) entire document	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 17 April 2018		Date of mailing of the international search report <b>10 MAY 2018</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/017104

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2018/017834 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 25 January 2018 (25.01.2018) entire document	1-11



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/40	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	

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

( 特許庁注 : 以下のものは登録商標 )

1 . T R I T O N

- (74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ホルト ジェフリー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 5 ポストン シャタック ストリート 5 5  
ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション内
- (72)発明者 ゲレオク グウェナエル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 5 ポストン シャタック ストリート 5 5  
ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション内
- (72)発明者 浅井 友香子  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 5 ポストン シャタック ストリート 5 5  
ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション内

F ターム(参考) 4B065 AA95X AA95Y AB01 BA02 CA23 CA24 CA44  
4C076 AA11 AA16 BB11 CC10 FF11 FF68  
4C084 AA13 MA16 MA66 NA14 ZA34  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA20 MA16 MA66 NA14 ZA34

4H045 AA10 AA30 CA40 DA50 EA20 FA74