

(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.

**C 12 N** 7/01 (2006.01)  
**A 61 K** 35/76 (2015.01)  
**A 61 K** 48/00 (2006.01)  
**A 61 P** 27/16 (2006.01)  
**A 61 K** 9/08 (2006.01)

F 1

C 12 N 7/01  
A 61 K 35/76  
A 61 K 48/00  
A 61 P 27/16  
A 61 K 9/08

Z N A

4 B 0 6 5  
4 C 0 7 6  
4 C 0 8 4  
4 C 0 8 7  
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) 國際出願番号 PCT/US2018/017104  
(87) 國際公開番号 WO2018/145111  
(87) 國際公開日 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

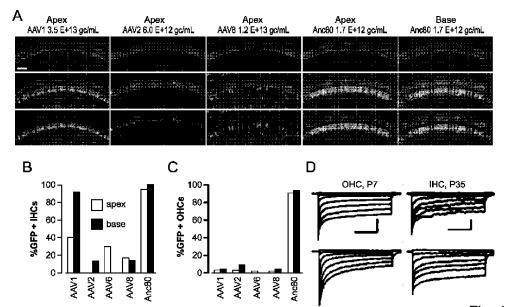


Fig. 1

**【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プシドをコードし、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有毛細胞および外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】**

外有毛細胞または内有毛細胞である、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

10

20

30

40

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、MY07A（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ッティングし、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）をターゲッティングし、関心対象のポリペプチド（たとえばTMC1、TMC2、MY07A、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ッティング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を効率的にターゲッティングする。

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。

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。

## 【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。

【 0 0 1 0 】

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。

【 0 0 1 1 】

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

【 0 0 1 2 】

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。

20

【 0 0 1 3 】

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ト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タクション障害を治療する方法を提供する。

20

【 0 0 1 4 】

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タクション障害を治療する方法を提供する。

30

【 0 0 1 5 】

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タクション障害を治療する方法を提供する。

30

【 0 0 1 6 】

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、感覚トランスタクション障害とは、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%以上の効率で内有毛細胞および外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、細胞は外有毛細胞または内有毛細胞である。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、プロトカドヘリン23、または、ミオシン7a、ハーモニン、カドヘリン23、プロトカドヘリン23である。

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、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、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）ベクターは、内有毛細胞および外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%の効率でターゲッティングする。上記局面の他の態様において、ヒトポリペプチドは、TMC1、TMC2、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、感覚トランスタ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、感覚トランスタ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】

30

「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。

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA  
 AALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP  
 GKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGNTMAAGGGAP  
 MADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT ALPTYNNHLYKQISSQSGGSTNDNTYFGYSTPW  
 GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLNFKLFNIVKVEVTTNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ  
 LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMI PQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPL  
 FHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLSRTQTTSGTAGNRTLQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVS  
 KTTNQNNNSNFATGATKYHLNGRDSLNVNPGPAMATHKDDEDKFFPMMSGVLIFGKQGAGNSNVLDNVMI  
 TNEEEIKTTNPVATEEYGTVATNLQSANPATGTVNSQGALPGMVWQDRDVYIQLGPIWAKIPTHDGHFH  
 PSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIE ELQKENSKRWNPEIQ  
 YTSNWKSTNVDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

【0020】

30

「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】

40

「血清陽性率」とは、血清学的（血清）検体に基づき、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。

【0022】

「内耳有毛細胞ターゲッティング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、少なくとも内有毛細胞の70%および外有毛細胞の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ッティングAAVは、蝸牛へのインビトロ注入ののち、少なくとも内有毛細胞の90%および外有毛細胞の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、マウスマodel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、「メカノトランスタクション」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。

#### 【0024】

「TMC1ポリペプチド」とは、メカノトランスタ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 klprrreslrv krkrtrdvin eddpepeped
61 eetrkareke rrrrlkrgae eeeideeeele rlaeldekr qiatvkckp wkmekkiele
121 keakkfvsen egalgkgkqk rwfafkmmma kkwakflrdf enfkaacvpw enkikaiessq
181 fgssvasyfl flrwmygvnm vlfiltfsli mlpeylwglp ygslprktvp raeeasaanf
241 gvlydfngla qysvlfygyy dnkrtigwmn frlplsyflv gimcigysfl vvlkamtkni
301 gddgggddnt fnfswkvfts wdyalignpet adnkfnstlm nfkeaitteek aqveenvh
361 irflrlflanf fvfltlggsg ylifwavkrs qefaqqdptd lgwwenkemn mvmsllgmfc
421 ptlfdflael edyhplialk wllgrifall lgnlyvfila lmdeinnkie eeklvkanit
481 lweanmikay nasfsenstg ppffvhpadv prgpcwetmv gqefvrltvsv dvltyvti
541 igdflracfv rfcnycwcwld leygypsye fdisgnvlal ifnqgmiwmg sffapslpgi
601 nilrlhtsmy fqcwavmccn vpearvfkas rsnnfylgml llilflstmp vlymivslpp
661 sfdcgpfsgk nrmfeviget lehdfpswma kilrqlsnpg lviaivilvmv laiyylnata
721 kgqkaanldl kkkkmkmqale nkmrnkkmaa araaaaagrq
```

10

20

#### 【0025】

「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 tgcgtttctt ttcacaagcc ctccaggagt  
 61 tgctgaaatt taggaatcat tgcccaaaaa agtggccctc ataatgatgc cagatggat  
 121 cttactctgt tgcccaggct ggagtgcagt ggtgcgatct cggctctctg caaccccg  
 181 ctcccagggtt caagtgattc tcctgcctcg gcctcctg tagctggat ttcaggccat  
 241 gaaagatcac tgcgtggc agtggAACAG atagacctcg gtttgaatct  
 301 cagctctact gttactaga catgaaatgg ggaaatctaa aatgagatgc cagaagcctc  
 361 aaaaatggaa aaccccgt gcttcacatc tgaaaatctc tgctggggc agcaacttt  
 421 agcctgtggg gaaggaactg tccacgtgga gtggctggtaa gaatgctaa ggagctgcag  
 481 aagggaaatgc cctctccaaa ctagccagcc actgagaccc tctgacagga caccggcagg  
 541 atgtcaccctt aaaaagtaca aatcaaagtg gaggaaaaaag aagacgagac tgaggaaagc  
 601 tcaagtgaag aggaagagga ggtggaaatg aagctaccc tgaagagagag cttgagacca  
 661 aagaggaaac ggaccagaga tggatcaat gaggatgacc cagaacctga accagaggat  
 721 gaagaaacaa ggaaggcaag agaaaaaagag aggaggagga ggctaaagag aggagcagaa  
 781 gaagaagaaa ttgatgaaga ggaattggaa agattgaagg cagagttaga tgagaaaaaga  
 841 caaataattt ctactgtcaa atgcaaacca tggaaatgtt agaagaaaat tgaagttctc  
 901 aaggaggca aaaaatttgtt gaggaaaaat gaaggggctc ttggaaagg aaaaaggaaaa  
 961 cgggtggttt catttaagat gatgtggcc aagaaatggg caaaattccctt cgggtgat  
 1021 gagaacttca aagctgcgtg tgccatgg gaaaataaaa tcaaggctat tgaaagtctc  
 1081 ttggctcctt cagtggccctc atacttcctc ttcttggat ggtgtatgg agtcaatatg  
 1141 ttctcttta tcctgacatt tagcctcattc atggttggcag agtacccctg gggtttgc  
 1201 tatggcagtt tacctaggaa aaccgttccc agagccaaag aggcatcgcc agcaaaactt  
 1261 ggtgtgttgtt acgacttcaa tggtttggca caatattccg ttctctttta tggctattat  
 1321 gacaataaacaa gacaatttgg atggatgaat ttccagggtgc cgctctccta ttttcttagt  
 1381 gggattatgt gcattggata cagcttctg gttgtcctca aagcaatgac caaaaacatt  
 1441 ggtgtatgtt gggatggaga tgacaacact ttcaatttca gctggaaatgtt ctttaccagc  
 1501 ttggactacc tgatcgccaa tcctgaaaca gcagacaaca aattttaattt tatcacaatg  
 1561 aactttaagg aagctatcac agaagaaaaa gcagcccaag tagaaagaaaa cgtccactt  
 1621 atcagattcc tgagggttttgc ggtcaacttc ttccgtgttca taacacttgg agggagtg  
 1681 tacctcatct ttgggtgttgc gacgcatttt tgctcttctt ttaggcaatt tatacgattt tattcttgc  
 1741 ttgggtgttgc gggaaaaaaa tgaaatgaaatgatgttcccttcccttgc gatgttctgt  
 1801 ccaacattttt ttgacttatt tgctgaatttta gaagactacc atcctctcat cgctttggaa  
 1861 tggctactgg gacgcatttt tgctcttctt ttaggcaatt tatacgattt tattcttgc  
 1921 ttaatggatg agattaacaa caagattgaa gaggagaagc tagtaaaggc caatattacc  
 1981 ttggggaaatg ccaatatgtt caaggccatcat aatgcatttgc tctctgaaaa tagcacttgg  
 2041 ccaccctttt ttgttcaccc tgcagatgtt cctcgaggac ctgtgggaa aacaatgg  
 2101 ggacaggagt ttgtgaggct gacgtctct gatgttctga ccacccatgtt cacaatcc  
 2161 attggggact ttctaaaggcc atgtttgtt ggttttgcatttatttgcgtt gtgtgg  
 2221 ttggagtatg gatatccctt atacaccgaa ttccgacatca gtggcaacgt cctcgctct  
 2281 atcttcaacc aaggcatgtatcccttgcgtggcc ttcccttttgc cccaggccatc  
 2341 aatacccttc gactccatac atccatgttcccttgcgttgc gggccgttat gtgtgc  
 2401 ttccctgagg ccagggtctt caaagcttcc agatcaaata acttcttcccttgc  
 2461 ctgtcatcc ttcccttgc cacaatgccttgcgttaca tgatcgatgc ccccccacca  
 2521 ttcccttgcgttgc cttcccttgcgttgc gggccgttat gtgtgc  
 2581 ctggagcactt atttcccaag ctggatggcg aagatcttgc gacagcttgc  
 2641 ctggatccatcc ttcccttgc cacaatgccttgcgttaca tgatcgatgc ccccccacca  
 2701 aaggccaga aggcagcgaa ttccgttgc aaaaagaaga tgaaaatgc  
 2761 aacaaaatgc gaaacaagaa aatggcagcttgc  
 2821 taataatgttgc cttcccttgcgttgc gggccgttat gtgtgc  
 2881 aatatgttgc cttcccttgcgttgc gggccgttat gtgtgc  
 2941 atggatccatcc ttcccttgc cttcccttgcgttaca tgatcgatgc  
 3001 aatctaaact ttatccaaatgc tccggatccatcc  
 3061 attcgttgc tttttttttt ttttaacaaatgc  
 3121 atacagtttgc tttttttttt ttttaacaaatgc  
 3181 atttatatgttgc cttcccttgcgttgc gggccgttat gtgtgc

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 mshqvkglke earggvkgrv ksgsphgtgdr lgrrssskra lkaegtpgrr gaqrsqkera
61 ggspspgspsr rkqtgrrrhr eelgegegege aertcegrk rderasfger taapkrek
121 prreekskrq kkprssslas sasggeselse eelaqileqv eekkkliatm rskpwpma
181 ltelreagef vekyegalgalgk gkqkqlyayk mlmakkwvtf krdfdnfktq cipwemkikd
241 ieshfgssva syfiflrlwmv gvnvlvfgli fglviipevl mgmpygsipr ktvpraeek
301 amdfsvlwdf egyikysalf ygyynnqrti gwlryrlpma yfmvgvsvfg ysliivirsm
361 asntqgstge gesdnftfsf kmftswdyli gnsetadnk y asittsfkes ivdeqesnke
421 enihltrflr vlanfliicc lcgsgyliyf vvkrssqfsk mgnvswyern eveivmsllg
481 mfcpplfeti aalenyhprt glkwqlgrif alflgnlytf llalmdvvhl klaneetikn
541 ithwtlfnyy nssgwnesvp rpplhpadvp rgscwetavg iefmrltvsd mlvtyitill
601 gdflracfvr fmnyccwcdl eagfpsyae disgnvlgli fnqgmiwmgs fyapglvgin
661 vrlrltsmyf qcwavmssnv phervfkasr snnfymglll l1lalmdvvhl aytimslpps
721 fdcpfsgkn rmydvlqeti endfptflgk ifaflanpgl iipaillmfl aiyylnsvsk
781 slsrananqlr kkiqvivre kshksvkgka tardsedtpk sssknatqlq ltkeettpp
841 asqsgqamdkk aqgpgtsnsa srttlpasgh lpisrppgig pdsgahapsqt 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a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
MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEKDYLVDLRLMYHQTMDVAVLVGDLKLVINEPSRLPLFD
AIRPLIPLKHQVEYDQLTPRRSRKLKEVRLDRLHPEGLGLSVRGGLEFGCGLFISHLIK
GQADSVGLQVGDEIVRINGYSISCTHEEVINLIRTKKTVSIKVRHIGLIPVKSSPDEPL
TWQYVDQFVSESGVVRGSLGSPGNRENKEKKVFIISLVSRLGCISSSGPIQKPGIFISH
VKPGSLSAEVGLEIGDQIVEVNGVDFSNLDHKEAVNVLKSSRSLTISIVAAAGRELFTD
RERLAEARQRELQRQELLMQKRLAMESNKILQEQQEMERQRRKEIAQKAAEENERYRKEM
EQIVEEEEKFKKQWEEDWGSKEQLLLPKTITAEVHPVPLRKPKYDQGVPELEPADDLDG
GTEEQGEQDFRKYEEGFDPYSMFTPEQIMGKDVRLRIKKEGSLLALEGGVDSPIGKVV
VSAVYERGAAERHGGIVKGDEIMAINGKIVTDYTLAEEAALQKAWNQGGDWIDLVVAVC
PPKEYDDELTFF

```

20

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 cggtecgcggt cgccggcttt tccagctcctt ggcagccggg  
 61 cacccgaagg aacgggtcggt gcaacgacgc agctggaccc ggcccagccca tggaccgaaa  
 121 agtggcccgaa gaattccggcataaggtgga ttttctgatt gaaaatgatg cagagaaggg  
 181 ctatcttat gatgtgtgc gaatgtacca ccagaccatg gacgtggccg tgctcggtgg  
 241 agacctgaag ctggtcatca atgaacccag ccgtctgcct ctgtttgatg ccattcggcc  
 301 gctgatccca ctgaagcacc aggtggaaata tgatcagctg accccccggc gctccaggaa  
 361 gctgaaggag gtgcgtctgg accgtctgca ccccgaaaggc ctcggcctgaa gtgtgcgtgg  
 421 tggcctggag tttggctgtg ggcttccat ctcccacccatc atcaaaggcg gtcaggcaga  
 481 cagcgtcggtt ctccaggttag gggacggat cgtccggatc aatggatatt ccatttcctc  
 541 ctgttacccat gaggaggatca tcaacccatc tcaaccaag aaaactgtgtt ccatcaaagt  
 601 gagacacatc ggcctgatcc ccgtgaaaatg ctctccatgatc gagccctca cttggcgt  
 661 tgtggatcag tttgtgtcgaa aatctggggc cgtgcgaggc agcctggctt cccctggaaa  
 721 tcgggaaaac aaggagaaga aggtttcat cagcctggta ggctcccgag gccttggctg  
 781 cagcatttcc agcggccccca tccagaagcc tggcatctt atcagccatg tgaaacctgg  
 841 ctccctgtct gctgagggtgg gatggagat aggggaccatg attgtcgaag tcaatggcgt  
 901 cgacttctct aacctggatc acaaggaggc tgtaaatgtg ctgaagagta gcccgcagcc  
 961 gaccatctcc attgttagctg cagctggccg ggagctgttc atgacagacc gggagcggct  
 1021 ggcagaggcg cggcagcgtg agctgcagcg gcaggagctt ctcatgcaga agcggctggc  
 1081 gatggagttcc aacaagatcc tccaggagca gcaggagatg gagcggcaaa ggagaaaaga  
 1141 aattggccag aaggcagcag agggaaaatga gagataccgg aaggagatgg aacagattgt  
 1201 agaggaggaa gagaagttt aagaagcaatg ggaagaagac tggggctcaa aggaacagct  
 1261 actcttgctt aaaaccatca ctgctgaggt acacccatgatc ccccttcgc aagccaaagt  
 1321 tgatcaggga gtggAACCTG agctcgagcc cgcagatgac ctggatggag gcacggagga  
 1381 gcagggagag caggatttcc gggaaatatga ggaaggcttt gaccctact ctatgttac  
 1441 cccagagcag atcatggggaa aggtatgtccg gtcctacgc atcaagaagg agggatccctt  
 1501 agacctggcc ctggaggcg gtgtggactc ccccttgggg aaggtggctg tttctgtgt  
 1561 gtatgagccgg ggagctgctg agcggcatgg tggcattgtg aaaggggacg agatcatggc  
 1621 aatcaacggc aagattgtga cagactacac cctggctgag gctgaggctg ccctgcagaa  
 1681 ggccttggaaat cagggcgcccccc actggatcga ctttggggat gccgtctgcc ccccaaaaggaa  
 1741 gtatgacgat gagctgacccat tcttctgttcaag tccaaaaggaa gaaaccaaat tcaccgttag  
 1801 gaaacagtga gtcggggccc cacctcgtga acacaaaagcc tcggatcagc cttgagagag  
 1861 gcccacactac acacaccaga tggcatcctt gggacctgaa tctatcaccc aggaatctca  
 1921 aactcccttt ggccttggaaat cagggccaga taagggaaatg ctggggccac tcttctgttca  
 1981 gccaacgtgg agggaaaaggga gcagccagcc atttgggaga agatctcaag gatccagact  
 2041 ctcattccctt tcctctggcc cagtgaattt ggtctctccc agctctgggg gactccttcc  
 2101 ttgaacccta ataagacccc actggagatct ctctctctcc atccctctcc tctgcccctt  
 2161 gctctaattt ctggccaggat tgcacttccaa aaccttactc tgagctcatt aataaaaatag  
 2221 atttatttttc cagtttca

【 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

10

20

30

40

AGCTCCGAGGGCGGCTGGCCGGTCGGCGCTCTTCCAGCTCCTGGCAGCCGGCACCCGAAGG  
 AACGGTCTGCAACGACGAGCTGGACCTGGCCAGCCATGGACCGAAAAGTGGCCGAGAATTCCGGC  
 ATAAGGTGGATTCTGATTGAAAATGATGAGAGAAGGACTATCTATGATGTGCTGCAATGTACCA  
 CCAGACCATGGACGTGGCGTCTGCTGGGAGACCTGAAGCTGGCATCAATGAACCCAGCCGCTGCC  
 CTGTTGATGCCATTGCGCGTGAATCCACTGAAGCACCAGGTTGAATATGATCAGCTGACCCCCCGC  
 GCTCCAGGAAGCTGAAGGAGGTGCGCTGGACCGCTGCAACCCGAAGGCCTGGCTGAGTGTGCGTGG  
 TGGCTGGAGTTGGCTGGGCTCTTCATCTCCACCTCATCAAGGCCTGAGGAGACAGCGTCGGG  
 CTCCAGGTAGGGGAGAGATCGTCCGGATCAATGGATATTCACTCCTCTGTACCCATGAGGAGGTCA  
 TCAACCTCATCGAACCAAGAAAATGTGTCATCAAAGTGAAGACACATCGGCGTATCCCCTGAAAAG  
 CTCTCCGTGAGGCCCTCACTTGGCAGTATGTGGATCAGTTGTGTCGAATCTGGGGCGTGCAGGC  
 AGCCTGGCTCCCTGGAAATCGGAAAACAAGGAGAAGAAGGTCTTCATCAGCCTGGTAGGCTCCCGAG  
 GCCTGGCTGCAGCATTCAGCGGCCCATCCAGAACGCGTGGCATTTATCAGCCATGTGAAAACCTGG  
 CTCCCTGCTGCTGAGGTGGGAGATTGGAGATAGGGAGCAGATTGTGCAAGTCAATGGCGTCACTCT  
 AACCTGGATCACAGGAGGCTGTAATGTGCTGAAGAGTAGCCGAGCCATCTCATTGTAGCTG  
 CAGCTGGCGGGAGCTGTTATGACAGACGGGAGCGGCTGGCAGAGGCGCAGCGTAGCTGCAGCG  
 GCAGGAGCTCTCATGAGAACGCGCTGGCAGTGGAGTCAACAAGATCCTCAGGAGCAGCAGGAGATG  
 GAGCGCAAAGGAGAAAAGAATTGCGGAGAACAGGAGAGGAAAATGAGAGATACCGGAAGGAGATGG  
 AACAGATTGTAGAGGAGGAGAAGATTAAAGAACATGGGAAAGAAGACTGGGCTCAAAGGAACAGCT  
 ACTCTGCCTAAACCATCAGCTGAGGTACACCGAGTACCCCTCGCAAGGCAAAGTATGATCAGGGA  
 GTGGAACCTGAGCTCGAGGCCAGATGACCTGGATGGAGGAGCGAGGAGAGCAGGAGAAAGGAA  
 AAGATAAGAAGAAAGCCAAGTATGGCAGCCTGCAGGACTTGGAGAAAGAATAAGAAAGAACTGGAGTTGA  
 GCAAAGCTTACAAAGAGAAAGAGGAAATGCTGGAGAAGGAAAGCAGCTAAAGATCAACCGGCTGCC  
 CAGGAGGATTCCGGAAATATGAGGAAGCTTGGACCCCTACTCTATGTTGACCCAGAGCAGATCATGG  
 GGAAGGATGTCGGGCTCTCGCATCAAGAAGGGAGTCCTAGACCTGGCCCTGGAGGGCGGTGAGG  
 CTCCCCCATTGGGAAGGTGGTCGTTCTGCTGTGATGAGCGGGAGCTGCTGAGCGGATGGCTGAGG  
 GTGAAAGGGAGCAGAGATCATGGCAATCAACGGCAAGATTGTGACAGACTACACCCCTGGCTGAGG  
 CTGCCCTGCAGAAGGCCGGACTGGATGACCTTGTGGTGTGCCCTGCCCTGGG  
 GGAGTATGACGATGAGCTGACCTCTCTGAGTCCAAAGGGAAACCAAATTACCGTTAGGAAACAG  
 TGAGCTCCGGCCACCTCGTAAGCACAAAGCGCTCGATCAGCCTGGAGAGAGGGCCACACTACACACACC  
 AGATGGCATCCTTGGGACCTGAATCTATCACCCAGGAATCTCAAACCTCCCTTGGCCCTGAACCCAGGGCC  
 AGATAAGAACAGCTGGGCCACTCTCTGAGGCAACGTGGAGGAAAGGGACCAGCCAGCCATTGGG  
 AGAAGATCTAAGGATCCAGACTCTCATTCCTTCCTGGCCAGTGAATTGGCTCTCCAGCTG  
 GGGGACTCCTCCTGAACCTAATAACCCCCACTGGAGTCTCTCTCATCCATCCCTCTGCC  
 TCTGCTCTAATTGCTGCCAGGATTGTCACTCCAAACCTACTGTGAGCTCATTAATAAAATAGATTATT  
 TTCCA

10

20

30

## 【 0 0 3 0 】

## ハーモニンBポリペプチド

MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEKDYLVDVLRMYHQTMDFAVLVG  
 DLKLVINEPSSLPLFDAIRPLIPLKHQVEYDQLTPRSRKLKEVRLDRLHPEGLGLSV  
 RGGLEFGCGLFISHLIKGGQADSVGLQVGDEIVRINGYISSCTHEEVNLIRTKKTV  
 SIKVRHIGLIPVKSSPDEPLTWQYVQDFVSESGVVRGSLGSPGNRENKEKKVFLVG  
 SRGLGCSISSGPIQKPGIFISHVKPGSLSAEVGLEIGDQIVEVNQVDFSNLDHKEAVN  
 VLKSSRSLTISIVAAAGRELFTDRERLAEARQRELQRQELLMQKRLAMESNKLQEQ  
 QEMERQRRKEIAQKAAEENERYRKEMEQIVEEEEKFKKQWEEDWGSKEQLLPLKTITA  
 EVHPVPLRKPKSFQFWYRYDGKFPTIRKKGDKKKAKYGSQDLRKNKKELEFEQKLY  
 KEKEEMLEKEKQLKINRLAQEVSETEREDLEESEKIQYWVERLCQTRLEQIASSDNEI  
 SEMTTGGPPPPPSVSPLAPPPLRRFAGGLHLHHTDDIPLDMFYPPKTPSALPVMPH  
 PPPSNPPHKVPAPPVPLPSGHVSASSSPVQRTPPPPIPPIPSSVPTQDLTPTRPLPS  
 ALEEALSNHFPRTGDTGNPVEDWEAKNHSGKPTNSPVPPEQSFPPTPKFCPSPOPPRG  
 PGVSTISKPVMVHQEPNFIYRPAVKSEVLPQEMLKRMVYQTAFRQDFRKYEEGFDPY  
 SMFTPEQIMGKDVRLLRICKEGSLDLALEGGVDSPIGKVVVSAYVERGAAERHGGIVK  
 GDEIMAINGKIVTDYTLAEAAALQKAWNQGGDWIDLVVAVCPPKEYDDELASLPSSV  
 AESPQPVRKLLEDRAAVHRHGFLLQLEPTDLLLKSKRGNQIHR"

## 【 0 0 3 1 】

## ハーモニンC

> NM 001297764.1 ハモサビエンス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3、mRNA

AGCTCCGAGGGCGGCTGGCCGGTCGCGGCTCTTCCAGCTCCTGGCAGCCGGCACCCGAAGAACGGTCTGCAACGACGAGCTGGACCTGGCCAGCCATGGACCGAAAAGTGGCCGAGAATTCCGGCATAAAGGTGGATTCTGATTGAAATGATGCAGAGAAGGACTATCTATGATGTGCTGCGAATGTACCA  
CCAGACCATGGACGTGGCGTGCCTGAGCTGGGAGACCTGAAGCTGGCATCAATGAACCCAGCCGTCTGCCTCTGTTGATGCCATTGGCCGCTGATCCCACTGAAGCACCAGGTGAATATGATCAGCTGACCCCCCGCGCTCCAGGAAGGCTGAGTGTGCGTGG  
GCTCCAGGAAGCTGAAGGAGGTGCGCTGGACCGTCTGACCCCGAAGGCCTCGGCCTGAGTGTGCGTGG  
TGGCCTGGAGTTGGCTGTGGGCTCTCATCTCCACCTCATCAAAGGCGGTAGGCAGACAGCGTCGG  
CTCCAGGTAGGGGAGAGATCGTCCGGATCAATGGATATTCCATCTCCCTGTACCCATGAGGAGGTCA  
TCAACCTCATCGAACCAAGAAAAGTGTCCATCAAAGTGAAGACACATCGGCCTGATCCCCGTAAAAG  
CTCTCCTGATGAGCCCTCACTTGGCAGTATGTGGATCAGTTGTGTCGGAATCTGGGGCGTGCAGG  
AGCCTGGGCTCCCTGGAAATCGGGAAAACAAGGAGAAGAAGGTCTTCATCAGCCTGGTAGGCTCCCGAG  
GCCTGGGCTGCAGCATTTCCAGCAGGCCCATCCAGAAGCCTGGCATTTATCAGCCATGTGAAACCTGG  
CTCCCTGCTGCTGAGGTGGAGATTGGAGATAGGGAGGACAGATTGTCGAAGTCAATGGCCTGAGCTCT  
AACCTGGATCACAGGAGGGCCGGAGCTGTTCATGACAGACGGGAGCGGCTGGCAGAGGCGCAGCAGC  
GTGAGCTGAGCAGGGCAGAGGCTCTCATGCAGAAGCGGCTGGCATGGAGTCAACAAGATCCTCCAGGA  
GCAGCAGGAGATGGAGCGGCAAAGGAGAAAAGAAATTGCCCAGAAGGCAGCAGAGGAAAATGAGAGATAC  
CGGAAGGAGATGGAACAGATTGTAGAGGAGGAAGGAAAGTTAAAGAAGCAATTGGGAAGAAGACTGGGCT  
CAAAGGAACAGCTACTCTGGCTTAAACCATCACTGCTGAGGTACACCCAGTACCCCTTGCAGGCAAAGCCAAA  
GTATGATCAGGGAGTGGAAACCTGAGCTGAGCAGGCCAGATGACCTGGATGGAGGACAGGAGGAGCAGGGA  
GAGCAGGATTCCGGAAATATGAGGAAGGCTTGTGACCCCTACTCTATGTTCAACCCAGAGCAGATCATGG  
GGAAGGATGTCCGGCTCCTACGCATCAAGAAGGAGGGATCCTAGACCTGGCCCTGGAAGGCGGTGTGGA  
CTCCCCCATTGGGAAGGTGGTGTGTTCTGCTGTGATGAGCGGGAGCTGCTGAGCAGCATGGTGGCATT  
GTGAAAGGGGACGAGATCATGCCAATCACGGCAAGATTGTGACAGACTACACCCCTGGCTGAGGCTGAGG  
CTGCCCTGAGAAGGGCTGGAAATCAGGGGGACTGGATCGACCTTGTGTTGGCTTGCCGCTGCCCCCCC  
GGAGATGACGATGAGCTGACCTTCTCTGAAGTCAAAGGGGAAACCAAAATTACCGTTAGGAAACAG  
TGAGCTCCGGCCCCACCTCGTAACACAAAGCCTGATCAGCCTTGAGAGAGGCCACACTACACACACC  
AGATGGCATCCTGGGACCTGAATCTATCACCCAGGAATCTCAAACCTCCATTGGCCCTGAAACCAGGGCC  
AGATAAGGAACAGCTGGGCAACTCTCTGAAGGCAACGTGGAGGAAGGGAGCAGCCAGCCATTGGG  
AGAAGATCTAAGGATCCAGACTCTCATCCCTCTGGCCAGTGTGAAATTGGCTCTCCAGCTCTG  
GGGGACTCCTCCCTGAACCCAATAAGACCCCACTGGAGTCTCTCTCATCCCTCTGCCCC  
TCTGCTCTAATTGCTGCCAGGATTGTCACTCCAAACCTTACTGTGAGCTCATTAATAAAATAGATTATT  
TTCCAGCTTA

【 0 0 3 2 】

10

20

## ハーモニンCポリペプチド

MDRKVAREFRHKVDFLIENDAEKDYLVDLVRMWHQTMDFAVLVG  
DLKLVINEPSRLPLFDAIRPLIPLKHQVEYDQLTPRSRKLKEVRDLRHP EGLGLSV  
RGGLEFGCLFISHLIKGGQADSVGLQVGDEIVR INGYSISSCTHEEVINLIRTKKTV  
SIKVRHIGLIPVKSSPDEPLTWQYVDQFVSESGGVRGSLGSPGNRENKEKKVFI SLVG  
SRGLGCSISSGPIQKPGI FISHVKPGSLSAEVGLFTGQDQIVEVNQDFSNLDKECRE  
LFMTDRERLAEARQRELQRELLMQKRLAMESNKLQEQQEMERQRRKEIAQKAAEEN  
ERYRKEMEQIVEEEFKKQWEEDWGSKEQLLPKTITAEVHPVPLRKPKYDQGVEPE  
LEPADDLDGGTEEQGEQDFRKYEEQFDPYSMFTPEQIMGKDVRLLRIKEGSDLALAE  
GGVDSPIGKVVVSAYVERGAERHGGIVKGDEIMAINGKIVTDYTLAEAAALQKAWN  
QGGDWIDLVVAVCPPKEYDDELTF

【 0 0 3 3 】

30

「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。

【 0 0 3 4 】

「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。

【 0 0 3 5 】

30

「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、PTPRQ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。

【 0 0 3 6 】

40

「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350、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タ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、M Y07A、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分をいう。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、フーファスティーン型または逆フーファ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の分離を指す。「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技術によって產生される場合、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產生された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、様々なストリンジエンシーの条件下、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を参考）。

20

【0058】

たとえば、ストリンジエ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。低ストリンジエ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、高ストリンジエ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。ストリンジエ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エ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、ストリンジエンシーにおいて異なる。洗浄ストリンジエンシー条件は、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、洗浄ストリンジエンシーは、塩濃度を下げるによって、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エントな塩濃度は、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エ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、作意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さることができる。

【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値でAAVストック溶液1μLを注入した。スケールバー=50μm。(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タクション電流の群。毛束を-0.1～1μmの間で0.1μm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タクション電流振幅。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±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±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値は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  $\mu$ 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囊。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的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  $\mu$ 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  $\mu$ m。（C）ヒト卵形囊の感覚上皮。組織を $10^{10}$ 個のGC Anc80.CMV.eGFP.WPRE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  $\mu$ 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囊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  $\mu$ 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  $\mu$ 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（赤色）で染色し、eGFP（緑）に関して画像化した。スケールバー = 100  $\mu$ m。（B）P1でAnc80-493 eGFP1  $\mu$ 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（赤色）で染色し、eGFP（緑）に関して画像化した。スケールバー = 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m（A～F）：高倍率：2  $\mu$ m（G）、3  $\mu$ m（H）、2  $\mu$ m（I～L）および1  $\mu$ 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タ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タ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

10

20

30

30

40

50

見えることに注目すること。左：DIC、右：FM1-43；スケールバー $10\text{ }\mu\text{m}$ 。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 $50\text{ }\mu\text{m}$ ）、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 $10\text{ }\mu\text{m}$ ）。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タ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）。代表的なトランスタクション電流（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タクション電流（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からトランスタ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タクション電流が誘発された（H）。平均ピークトランスタクションは、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、インピ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： $10\text{ }\mu\text{m}$ -上パネル； $5\text{ }\mu\text{m}$ -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： $10\text{ }\mu\text{m}$ ；C、スケールバー： $3\text{ }\mu\text{m}$ ）。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： $30\text{ }\mu\text{m}$ ）。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： $5\text{ }\mu\text{m}$ ）。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）と共に局在化していた。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タ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（ $0.8\text{ }\mu\text{L}$ 、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（ $0.5\text{ }\mu\text{l} + 0.5\text{ }\mu\text{l}$ 、n=7細胞、マウス1匹）のIHC中、メカノトランスタ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タ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タクション電流I<sub>max</sub>=12.1pA（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±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タクションの有意な回復（\*\*\*P<0.001）を示す。平均トランスタクション電流は、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、メカノトランスタ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

10

20

30

40

50

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、30dB 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。

【図12】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毛束が軽度に崩壊していた。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 μm；高倍率：1 μm。

【図13】図13A～13Jは、c.216AA変異体マウスにおけるメカノトランスタ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タクションの分析、P3～P6。～Po = 0.5からの代表的な電流トレースを二重指數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タクションの分析。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14】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 μl；4.11E^12gc/ml)およびAAV2/Anc80.CMV.eGFP::harmonin-b1(0.5 μl；2.99E^12gc/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 μm。

【図15】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16】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中のアカディアンG>A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c.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17】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.c.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

10

20

30

40

50

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、 $0.8 \mu\text{l}$  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( $6 \times 10^{12} \text{gc/ml}$ )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 $\mu\text{l}$ ( $6 \times 10^{12} \text{gc/ml}$ )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( $2.4 \times 10^{13} \text{gc/ml}$ )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( $2.4 \times 10^{13} \text{gc/ml}$ )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( $2.4 \times 10^{13} \text{gc/ml}$ )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タ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、MY07A、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ッ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、盲聴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：MY07A（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と関連している。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糸を形成する。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、有毛細胞の感覚糸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タ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>チャネルと会合して、ユビキチン依存性経路を介するチャネル利用可能性を制限する）を明らかにした。

## 【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。

## 【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タ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。

## 【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。

## 【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

10

20

30

40

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。

#### 【0083】

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

#### 【0084】

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

#### 【0085】

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。

#### 【0086】

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マルクス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靈長類において類似した安全性プロフィー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

#### 【0087】

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、MY07A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、C1B2、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

40

50

細胞をいう。支持細胞の一例がシュワン細胞である。

【0088】

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。

【0089】

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、MY07A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、C1B2、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ッティング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。

【0090】

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、MY07A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、C1B2、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) を対象の内耳に送達する内耳有毛細胞ターゲッティング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、ウイルスはエクソーム関連AAV1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。

【0091】

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、MY07A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、C1B2、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ッティング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、MY07A、USCH1C、CDH23、PCDH15、SANS、C1B2、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

10

20

30

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、ATOH1、ATP6V1B1、BDNF、BDP1、BSND、DATSPER2、CABP2、CD164、CDC14A、CDH23、CEACAM16、CHD7、CCDC50、C1B2、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、C1B2、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。

10

20

30

40

50

#### 【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ある。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ある。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Atoh1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。

30

40

50

#### 【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、C1B2、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。

#### 【0095】

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

#### 【0096】

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が理解されよう。

20

#### 【0097】

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とする。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ス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；ウインドウサイズ：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ス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；ウインドウサイズ：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 substitution 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ウェブサイトで実行することができる。

30

#### 【0098】

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

40

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

20

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、MY07A、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ッティング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ッティング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。

## 【0101】

30

対象に投与される内耳有毛細胞ターゲッティング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ッティングAAVの治療有効用量は、概して、AAVのゲノムコピー（GC）約 $1 \times 10^1$ ～ $1 \times 10^{12}$ 個（たとえばGC約 $1 \times 10^3$ ～ $1 \times 10^9$ 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ができる）をインビ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 $10^8$ ～約 $10^{12}$ 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 $10 \mu\text{L}$ 、 $50 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $500 \mu\text{L}$ 、または $1000 \mu\text{L}$ ）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）、MY07A、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、導入遺伝子を含有する、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有する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有する）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、MY07A、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ッティング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、Arno Id 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、内有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の発現または外有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有するAAVを使用して送達された導入遺伝子の発現は、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、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。

30

#### 【0108】

WO2015/054653に記載されるように、Anc80カプシドタンパク質を含有する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有しない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ます。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に比較して50%以上感染を中和する抗体濃度を含むところの力値を計測する。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、MY07A、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

50

有毛細胞ターゲッティング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、MY07A、USH1C(ハーモニンa、b、c)、CDH23、PCDH15、SANS、およびC1B2の1つまたは複数であるボリヌクレオチドとを含む内耳有毛細胞ターゲッティング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。

10

20

30

#### 【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。

30

#### 【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。

40

#### 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。インピトロおよびインピ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

50

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 インビポ注入

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EM LAクリーム（リドカイン2.5%およびブリロカイン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／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, Wyoming, 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をターゲッティングし、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ターゲッ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ターゲッティング（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、前庭シユ

10

20

30

40

50

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事を示唆した。

#### 【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プティクスを備えた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) 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タ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、残留ピ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 μm、IHCの場合には直径4~5 μm)。> 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GutaMAXTM-I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

10

20

30

40

50

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、卵形囊（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囊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、卵形囊を取り出した。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対の細いガラス纖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のいずれかであった。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）またはイヤーパンチ（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

10

20

30

40

50

イムは適用しなかった。

【 0 1 2 6 】

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-harmonin.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-harmonin.hGH、1.92 E14gc/ml、BCH) によって駆動した。

【 0 1 2 7 】

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 10^13gc/ml (BCH) ; AAV2/1.CMV.EGFP::harmonin-b1 2.73 564 10^14gc/ml (BCH) ; AAV2/1.CMV.EGFP-harmonin-a1 : 2.81 10^12gc/ml (MEEI) ; AAV2/1.CMV.EGFP-trunc-harmonin ; 1.92 10^14gc/ml (BCH) ; AAV2/Anc80.CMV.harmonin-a1 : 1.93 10^12gc/ml (MEEI) ; AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1 : 1.74 10^12gc/ml (MEEI) ; AAV2/Anc80.CMV.trunc-harm.WPRE : 9.02 567 10^12gc/ml (MEEI)。インビトロ実験のために、濃縮ベクター10 μl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。

【 0 1 2 8 】

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#1 5-01-2878R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 μl ~ 1ul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 μl / 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、インビトロ実験のための試料サイズを連続的に測定した。

【 0 1 2 9 】

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

ンパ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オプティクスを備えた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<sup>-1</sup>) をホ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 K2 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±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±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<sup>°</sup>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に崩壊していた (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

10

20

30

30

40

50

、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】

ハーモニン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、ハーモニン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)。ハーモニン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)。

10

20

30

40

### 【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 Axioscope 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。

30

### 【0135】

より早期に有毛細胞機能を評価するために、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タ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IH C中で減少した(データ示さず)。また、変異体マウスの卵形囊有毛細胞において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)。

40

### 【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, Waldbronn

50

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  $\pm 2 \mu\text{m}$  で較正した。軸外れの動きの非存在を確認し、プローブ動を較正するために、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 ( $\pm 2 \mu\text{m}$ ) に較正した。

## 【0138】

20

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毛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  $31 \sim 292 \text{pA}$  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崩壊しているように見えたが、P6でトランスタ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タ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)。

30

## 【0139】

40

また、順応 (一定の束偏向の存在下でのトランスタ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、二重指數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、 $P_{open} = 0.5$  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;  $p < 0.001$ )。合わせば、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】

50

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タクション電流の減少

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、ターゲッティングされるが、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、ハーモニン発現を駆動するAAVベクターに曝露されたc.216AA有毛細胞における機能を評価した。外因性ハーモニ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ハーモニンa1またはハーモニン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、インビオで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、ハーモニン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 ( $> P10$ ) はエクスビオ記録パラダイムを生き延びないが、P14～P16相当時にロバスト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でハーモニン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。ハーモニン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、ハーモニンb1とハーモニン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注入による外因性ハーモニンb1の送達が、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

#### 【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、安樂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 (IDRC 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。

30

#### 【0143】

以前の研究が、感覚有毛細胞中のハーモニンの2つのオルタナティブプライスフォームの発現を明らかにしている。外因性ハーモニ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

40

50

の卵形囊およびコルチ器を、ハーモニンb1のN末端に融合したeGFP ( eGFP::harmonin-b1 ) またはハーモニンa1の181N末端に融合したtdTomato ( tdTomato::harmonin-a1 ) をコードするAAV2/1ベクターに曝露した。ベクターは、P1で、RWM注入 ( 1  $\mu$  l ) によってインビトロまたはインビボで適用した。インビトロで適用したとき、ベクターの存在下でP0～P1組織を24時間インキュベートし、培養状態で1週間維持した。共焦点画像は、野生型c.216GAおよびc.216AAマウスの有毛細胞にうまく形質導入されたことを示す ( 図7A～7C, 7E ) 。VHC ( 図7A ) 、IHCおよびOHC ( 図7B, 7C ) 中の不動毛の先端においてEGFP::harmonin-b1シグナルが明白であった。また、EGFPシグナルは、P1で注入を受けたマウスの蝸牛の基底部分のOHCおよびIHC中でもP60で検出された ( 図14D ) 。tdTomato::harmonin-a1は聴覚有毛細胞の基底で検出された ( 図14E ) 。リボンシナプスマーカーCTBP2との共染色は、高頻度で、P7のIHC中では共局在化を明らかにしたが ( 図14E ) 、P7の卵形囊においてはそうでなかった ( データは示さず ) 。外因性融合構築物の局在化は、ハーモニンbを感覚糸挿入の近くの不動毛の遠位端へ局在化させ ( 26, 27, 28 ) 、ハーモニンaをシナプスへ局在化させた ( 30, 31 ) 先の研究と一致していた。

#### 【 0 1 4 4 】

##### 実施例2E 聴性脳幹反応 ( ABR ) および歪成分耳音響放射 ( DPOAE )

キシラジン ( 腹腔内5～10mg/kg) およびケタミン ( 腹腔内60～100mg/kg ) で麻酔したマウスからABRおよびDPOAEを記録した。皮下針電極を、a) 2つの耳の間で背側から ( 参照電極 ) ; b) 左耳介の後から ( 記録電極 ) ; およびc) マウスの臀部で背側から ( 接地電極 ) 皮膚に挿入した。耳介基底部の通路をトリミングして外耳道を露出させた。ABR記録の場合、外耳道および聴覚装置 ( EPL Acoustic system, MEEI, Boston ) に5ミリ秒トーンピップを提示した。反応を増幅し ( 10,000倍 ) 、フィルタリングし ( 0.1～3kHz ) 、PCベースのデータ取得システム ( EPL, Cochlear function test suite, MEEI, Boston ) のアナログ・デジタルボードによって平均した。音レベルを、音圧レベル0から110dB ( デシベルSPL ) まで5～10dBステップで上げた。各レベルで、「アーチファクト拒絶」後、512～1024の反応を平均した ( 刺激の極性を交番させながら ) 。目視検査によって閾値を決定した。データを分析し、Origin-2015 ( OriginLab Corporation, MA ) を使用してプロットした。別段述べない限り、閾値平均値  $\pm$  標準偏差を提示する。DPOAEの場合、f1およびf2プライマリトーン (  $f_2/f_1 = 1.2$  ) を提示した (  $f_2$  は5.6と45.2kHzとの間で半オクターブステップで変化させ、 $L_1 - L_2 = 10$ dB SPL ) 。各f2において、 $L_2$ を10～80dB SPLの間で10dB SPLきざみで変化させた。DPOAE閾値は、ノイズフロアを5dB SPL上回る大きさのDPOAEを誘発するL2レベルとして、平均スペクトルから決定した。平均ノイズフロアレベルは、すべての周波数で0dB SPL未満であった。刺激を、PXI-1042Qシャシ中の24ビットデジタルI-Oカード ( National Instruments PXI-4461 ) によって生成し、SA-1スピーカードライバ ( Tucker-Davis Technologies, Inc. ) によって増幅し、本発明者らのカスタム音響システム中の2つの静電ドライバ ( CUI CDMG15008-03A ) から送達した。小さなプローブチューブの端部のエレクトレットマイク ( Knowles FG-23329-P07 ) を使用して外耳道内音圧をモニタした。これらの実験の大部分は、盲検条件下で実施されたものではない。

#### 【 0 1 4 5 】

切断型ハーモニンが正常な聴覚機能を妨げるかどうかを決定するために、切断型タンパク質を過剰発現させるためのAnc80.CMV.trunc-harmベクターを生成した。ベクターを、RWMを介してc.216GAマウスの内耳に注入した。4、6および12週でABRおよびDPOAESを計測すると、注入および非注入c.216GAマウスの間で閾値の差は見られなかった ( 図16C～16Dに示す6週齢マウスからの記録 ) 。このデータは、注入技術、すなわちベクターのための対照として働き、重要なことに、外因性の切断型ハーモニンが内在性の完全長ハーモニンと競合しないことを立証して、c.216AA有毛細胞中の内在性切断形態が、遺伝子治療ベクターを介して発現する外因性の完全長ハーモニンに干渉する可能性が低いことを暗示する。

#### 【 0 1 4 6 】

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<sup>10</sup> ) を介してc.216GAマウスの内耳に注入した。注入後4週でABRおよびDPOAESを計測すると、注入マウスと非注入マウスの間で閾値の差は見られなかった ( 図17C～17Dに示す6週齢マウスからの記録 ) 。

10

20

30

40

50

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 (5.6～16kHz) で、AAV2/Anc80.CMV.harmonin-b1を注入された耳の最良のABR閾値は25～30dB 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22.6kHzで認められたが、32kHz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8～11.3kHzの場合に<45dB 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10dB SPLのABR閾値シフトが低周波数範囲で認められ、約30dB 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) 。

#### 【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.tdTOMO::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.tdTOMO::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)。

#### 【0148】

レスキューの程度をさらに評価するために、閾値 45dB 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。8～11.3kHzおよび16kHzでの反応の分析は、正常波1振幅 (非有意差、P > 0.2、スチュードント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11.3kHzで20dB SPLの低さであった (ハーモニンb1: 平均59.7 ± 5.3dB SPL、n = 15/25; ハーモニンa1 + b1: 平均76.2 ± 10.3dB SPL、n = 4～6)。AAVベクターの反対側耳への拡散は以前にも認められおり (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。

#### 【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。

10

20

30

40

50

## 【0150】

## 実施例2F アッシャーマウスモデルにおけるRT-PCR

QuantiTect Revese 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'

、リバース

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 / 切断型のハーモニン (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 ホスホイメージヤ (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 μl; 1.93 10^12gc/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) 。

10

20

30

40

50

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 × 10cm × 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、10 10dB SPL強度が60 ~ 120db SPLの範囲である1つのノイズパルスを平均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-1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

10

20

30

40

50

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】

10

実施例3 聴力喪失に関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）。ストリオーラ領域中の形質導入およびFM1-43取り込みの非存在は、ストリオー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】

20

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ターゲッティングは、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】

30

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、ヒトベータグロビ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-80で保存し、使用直前に解凍した。

【0161】

40

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樂死させ、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。

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纖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ポ注入

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ベラ(Sutter Instruments)を使用して斜角研磨した(チップ直径約20μm、角度28°)。手術部位(左乳様突起)を覆うために無菌スワップを使用して、鎮痛のためにEMLAクリーム(リドカイン2.5%およびブリロカイン2.5%)を外部から適用した。術前の30~60分間、37°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1μl(ウイルス粒子総数10<sup>9</sup>~10<sup>11</sup>)を0.1μl/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°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°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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5.8mM KCl、1.3mM CaCl<sub>2</sub>、0.9mM MgCl<sub>2</sub>、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メグオーム)をR6ガラス毛管(King Precision Glass)から引き、135mM CsCl、5mM Hepes、5mM EGTA、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、2.5mM Na<sub>2</sub>-アデノシン三リン酸および0.1mM CaCl<sub>2</sub>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タクション電流を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較正した。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)からなるカスタムプ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トーンバースト( $\cos^2$ 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。

30

【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が、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。

40

【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相當時に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

10

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。

20

【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、ガラス底チャンバー上、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 μM 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 × 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。

30

【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タクションをインビオ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。2f1-f2でのDPOAEの生成のために、周波数比1.2 (f2/f1) でプライマリトーンを生成した (f2レベルは各f2/f1対のf1レベルよりも10dB低い音圧レベルであった)。f2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。2f1-f2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f2レベルと定義した。

40

【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

50

を実証する。

【 0 1 8 1 】

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。

【 0 1 8 2 】

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。

【 0 1 8 3 】

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。

【 0 1 8 4 】

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、これらの方針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々の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な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、こ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。

【 0 1 8 5 】

配列リスト

Anc80カプシドタンパク質 (SEQ ID NO: 1)

MAADGYLPDPWEDNLSEGIREWWDLKPGAKPKANOOQKQDDGRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPV  
NAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLG  
LVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQOPAX,KRLLNFGQTGDSESPDPQPLGEPPAAP  
SGVGSNTMX,AGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQI  
SSQSGX,STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFTRPKX,LNFKLFNIQVKEV  
TTNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYOLPYVLGSAHOGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVG  
RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF,FSYTFEDVPFHSSYAHQSLSDRLLMNPLIDQYLYYLSRTQTSG  
TAGNRX,LQFSQAGPSSMANQAKNWLPGPCYRQQRVSCTX,NQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL  
NPGPAMATHKDDEDKFFPMMSGVLIFGKQGAGNSNVDLNVMITX,EEEIKTTNPVATEX,YGTVAT  
NLQSX,NTAPATGTVNSQGALPGMVWQX,1, RDVYLQGP1WAK1PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP  
QILIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSTN  
VDFAVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

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

【 0 1 8 6 】

Anc80-L0065カプシドタンパク質 (SEQ ID NO: 2)

10

20

30

40

MAADGVLPLDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPV  
NAADAAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEGFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLG  
LVEEGAKTAPGKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAP  
SGVGSNTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLDRVITSTRTWALPTYNNHLYKOI  
SSQSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDPDQRLINNNNWGFREPKKLNFKLNFNIQVKEV  
TNDGTTIANNLTSTVOVFTDSEYQLPYVLGSAHQGLCPFPFADVFMIQPYGYLTLNNGSQAVGR  
SSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLLNMPPLQYLYLSRTQTTSGT  
AGNRTLQFSQAGPSSMANQANWLPGPCYRQRQRVSKTTNQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLWNP  
GPAMATHKDKFFPMGSVLF1GKQAGNSVLDNVMTNEEEIKTTNPVATEEYGTATNLQ  
SANTAPATGTVNSQGALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKIPTDGHFHPSPPLMGGFGLKHPQQILIK  
NTPVVPANPPITFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIWELOKENSKRWNPEIQYTSYNKSTNVDFAV  
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRLN

【 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

WPRE ( 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

ctgcgcgcgtcgctcgactgaggccgcccggcaagccggcgtcgccgcaccttggcgc  
ccggcctcagtgagcggcggcggcggcaactccatcaactagggttct  
tgtatgtttaatgatatacccgccatgtacttattctacgttagccatgtctaggaagatcgaaatt  
cgcccttaagctagctaggatataatcaattacggggcttaggttcatagccatata  
tggagttccgcgttacataacttacgttaatggccgcgtgtacggcccaacgccccgc  
ccatgtacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaataggactttccatgtacgtca  
atgggtggagtttacgttaactgcccacttggcagtagtacatcaagtgtatcatatgccaagta  
cgccccctattgacgtcaatgacgttaatggccgcgtggcattatgcccagtagtacatgaccta  
tgggacttctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggatcgccgtt

ttggcagttacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacgggatctccaaagtctccacccca  
ttgacgtcaatgggagtttttgcaccaaatcaacggacttccaaatgtcgtaacaac  
tccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacggggaggtctatataagcagactgg  
tttagtgaaccgtcagatctgcagaagttggctgaggactggcaggtaaagtatcaaggtt  
acaagacaggtaaggagaccaatagaactggcttgcagacagagaagactcttcgctt  
ctgataggcacctattggcttactgcacatccacttgccttctccacagggttccaggcgg  
cccggtATGCCACCCAAAAAAGTCAAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAG  
CTCAAGTGAAGAAGAAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGGCTTGAGACCAAAAGAGGAAACCGA  
CCAGAGATGTCATCAATGGGATGACCCGAACCCGGAGCCGGAGGGATGAGAAGAAGAAAGGCA  
AGAGAAAAAAGGGAGGGAGGGCTCGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGG  
GGAATTAGAACGGTTAAAGCACTGCTCGATGAGAATAGACAATGATCGTACTGTCAAATGTA  
AACCTGGAAAATGGAGAAGAAAATTGAGTTCTCAAGGAGCAAAGAAATTGTGAGTGAGAAT  
GAAGGCCCTTGGGAAAGGGAAAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGG  
ATGGGAAATTCTCGAGATTTGAGAACTTCAAAGCGCTTGCCTCCATGGGAAACAAAA  
TCAAGGCAATTGAAAGTCAGTTGGTCTCTAGTGGCTCGTACTCTCTGGTCTCAGGTGGATG  
TACGGCTCAACATGGTCTTGTGTTGACCTTCAGGCTCATCTGTAACGGAGTACCTCTG  
GGGTTACCGTACGGCAGTTACCTAGGAAAACAGTCCAAAGAGCTGAAGAAGCATTGAGCCA  
ACTTTGCTGTTGATGACTTCAATGGCTGGCGACTACTCTGCTCTTTATGGCTTAC  
GACAATAAACCGCACGATCGGATGGCTGAATTCCGGTACCTCTTCTACTCTCTGGTGGGAT  
TATGTCGATGGATACAGCTCTGGTCTCCTGGTACAGGCGATGAGCAAAATATTGGTACGATG  
GTGGTGGGATCACACACTTCAACTTCACTTCAGCTGGAGGTGTTCTGTAACGGACTATCTGATT  
GGTAACCTGAAACAGCGCACAAAGTTAACCTACGATGAACTTAAAGGAAGCCATCAT  
AGAAGAGAGCGCACAGGTGGAGGAGAACATCCACCTCATCAGATTCTGAGGTTCTCGCTA  
ACTTCTTGTGTTCTCACACTGGTCAAGTGGATACTCATCTTGGGCTGTAAGCGATCC  
CAGGAGTTGCCAGCAAGATCCTGACACCTTGGTGGGGAAAAATGAAATGAAACATGGT  
AATGTCCTCTGGGATGTTCTGTCCTGGGACTTGTGACTTATGGTGAACGGAGATTAC  
ATCCCTCATGGCTGAGTGGCTCTGGGCGATTTTCTCTCTAGGCAACTTGTAT  
GTATTCACTTCGGCTTGATGGATGAGATTAAACAACAGATTCAAGAGGAGAAGCTTGTGAGGC  
CAATTACCCCTGGGAAAGCCAACATGATTAAGGCTTACAATGAAATCTCTGGGCTCTG  
GGAACACCAACAGGAGCACCCCTTCTGGTCACTCTGAGATCTCTGGGCTCTGGGAA  
ACAATGGCCAGGAGAACCTGGCTCTGGGCTGTTGACTTATGGTGAACGGAGATTAC  
CCTCATGGGACTTCTCAGAGCATGGTCTGGGACTTCTGAGCTCTGGGACT  
TAGAAATATGGATATCTTCATACACAGAATTGACATCAGTGGCAACGCTCTGCTCTGATCTC  
AACCAGGCATGATCTGGATGGGCTCTCTCGCTCTAGCCTCCGGCATCAACATCTCCG  
TCTCCACACATCCATGATTTCCAGTGTGCTGGGCTGTGATGTGCTGCAATTGTCGGGAGGG  
TGTCAAAAGCTTCCAGATCCAACAACCTTACCTCGGCATGCTGACTCATCTCTCTGGTCC  
ACCATGCCGGTCTGTACATGATCGTCTCCCTCCGGCATCTTGTGAGGGCCCTCAGTGG  
TAAAAAACAGGATTTGAAGTCATCGGTGAGACCTCTGGAAACATGACTTCCAAAGCTGGATGGCGA  
AGATCTGAGGAGCTTCAACCCGGCTTGTGATGCTGCTCTGGGACTTCTGGTCAAAAGAGAT  
ATCTATTATCTCACTGACTGCAAGGGGAGAACAAATGCGAAACAAAGAAATTGGCAGGGCTCGAGCAGCTGAG  
GAAACAGCAAGCTTGGAGAACAAATGCGAAACAAAGAAATTGGCAGGGCTCGAGCAGCTGAG  
CTGCTGGTGGCCAGTAAGatccaaatcaacctctggattacaaaattttgtgaaagatgtactgg  
atcttaactatgtgtccctttacgtatgtggatacgtgtttatgcctttatcatgc  
tattgttcccgatggcttcatttctcccttgcattaaatctgggtgtctctttat  
aggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggctgtgactgtgtttgtgacgcaccc  
actgggtggcattggccaccacccgtcagctcttccggacttccgtttccctccat  
tgccacggcgaactcatggccctggctggccgtctggacaggggtcggttgg  
ctgacaattccgtgggttgcggaaatcatgtccttgcattgtgttgc  
acctggattctgcgcggacgtccctctgtacgtcccttcggccctcatcc  
ttcccgccgctgtccggctctggcccttcccggttgcggatctgcctcgactgtgg  
ttcttagtggccggccatctgtgttgcggccctcccccgtgttgcattgtgttgc  
ctcccaactgtctttcaataaaatgagggaaattgcattgtgttgc  
attctgggggtggggggcaggacagcaagggggaggattggaaqacaatagcaggcatgc  
tggggactcgagtaaaggcgaattcccgataaggatcttcagagcatggctacgttagataag  
tagcatggcggttaatcattaaactacaaggaaacccttagtgcattgtgg  
tggcgactccctct

10

20

30

ggcgcgctcgctcgctactgaggccggcgaccaaaggctcgcccgcacgcggccggcttgcgggg  
 cggcctcagtgagcgagcgcgacgccttaattaaacttaattactggccgtctttacaa  
 cgtcgactggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgcttgcagcacatcccccttcgc  
 cagctgcgtaaatagcgaagaggccgcaccgatgcgccttccaaacagttgcgcagcctgaatg  
 gcaatgggacgcgcctgtgcggcgttacgcgcgggtgtgggttacgcgcagcgt  
 accgctacacttgcgcagcgccttagcgcgccttgccttcttcccttcttcgcac  
 gttcgccgcttccccgtcaagctctaaatcggggctccctttaggttgcatttagtgc  
 tacggcacccgcacccaaaaacttgcatttaggttgcgttgcacgtactggccatgcgc  
 tagacgggtttccgccttgcgttgcgttgcacgttgcatttgcatttgcatttgc  
 tggaaacaacactcaacccatctcggttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 cctattggtaaaaaatgagctgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 tttataatttcagggttgcatttgcgggaaatgtgcgcggaaacccctatttgcatttgc  
 aatacattcaaatatgtatccgcctcatgagacaataacccgtataatgcattcaataatattgaa  
 aaaggaagagatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 cttcctgttttgcacccagaaacgcgtgttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 acgagtgggttacatcgactgtcaatagtgttgcatttgcatttgcatttgc  
 aacgtttccaatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 gccggcaagagcaactcggtgcgcgcataacttgcatttgcatttgcatttgc  
 agtcacagaaaacatcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ttagtgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ggtgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 tttaaaacttcatttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 aaatccctaacgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 tcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ggtgggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 cgcagataccaaactgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 gcaccgcctacatactcgctctgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 gtgttaccgggttggactcaagacgttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ggggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 gagctatgagaaaagcgccacgcgttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ggtcgaaacaggagacgcgcacgcgggatcttgcatttgcatttgcatttgc  
 tcgggttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 tggaaaaacgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 gtttttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 ccgctcgccgcggcaacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 atacgcaacccgcctccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 cgactggaaacgcgggcgttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 aggcttacatgttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc  
 acaggaaaacagctatgaccatgattacgcgcatttgcatttgcatttgc

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  
 WPRE : 3,256 ~ 3,809  
 bGH ポリ A シグナル : 3,810 ~ 4,074  
 R-ITR : 4,112 ~ 4,241

ctgcgcgcgtcgcgtcactgaggccgcccgggaaagccggcgtcgggcgacccttggc  
ccggcctcagtggcgagcgagcgcagagggaggatggccaactccatcactagggttct  
tgttagttatgatatacccgccatgtacttatctacgttagccatgtcttaggaagatcgaatt  
cgcccttaagctagtagttataatagtaatcaattacgggtcattagttcatagccatata  
tggagtccgcgttacataacttacggtaatggccgcctggctgaccggccaaacgaccccg  
ccattgaectaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccatgtacgtca  
atgggtggaggatattacggtaatggccacttggcgtatcatcaatgtatcatatgccaatgt  
cgcccccttgcgtcaatgacgttaatggccgcctggcattatgcccagtagatcatgacccta  
tgggacttcttgcgttagcgtatcatgtattagtcgttattaccatgtatcgggtt  
ttggcagtagatcatcaatggcgtggatagcggttactcaggggatttcaagtcgttccacccca  
ttgacgtcaatggagggttggatggcggatggcgtgtacgggtggaggctatataaagcagactgg  
tttagtgaaccgtcagatcctgcagaagttggcgtgaggactggcaggtaaatcaaggtt  
acaagacaggtaaggagaccaatagaaactggcgtgtcagacagagaagactttcggtt  
ctgtataggcaccttattgttactacatccacttgccttctccacagggttccaggcgg  
ccgcggATGTGCAAATCCAAGTGGAGGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTCAAGA  
AGAAGAAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGGAGGAAACGGACCAGAGATGTCA  
TCAATGAGGATCACCGAGAACCGGAGCCGGAGGATGAAGAACAGAAGAGGAAAGAGAAA  
AGGCGGAGGAGGCTGGAGAGGAGCGGAAGAAGAACAAATTGATGAAGAGGAATTAGAACG  
GTTAAAACCACTGTCGATGAGAAATAGACAAATGATCGTACTGTCAATGTAAACCTGGAAA  
TGGAGAAGAAAATTGAGTTCTCAAGGAAGCAAAGAAATTGTGAGTGAAGATGAAGGCGCTT  
GGGAAAGGAAAGGAAAGAAGTGGTTGCAATTAGATGATGCCAGAAATGGCAAAATT  
CCTCGAGATTGAGAACTCAAAAGGGCTTGCCTCCATGGAAAACAAAATCAAGGCAATTG  
AAAGTCAGTTGGTTCTCAGTGGCTCGTACTCCTGTTCTCAGGTGGATGTCGGCCTCAAC  
ATGGTTCTTGTGTTGACCTCGAGGATCATGTTACCGGAGTACCTCTGGGTTTACCGTA  
CGGAGCTTACCTAGGAAAACAGTCCCAAGAGCTGAAGAACATCTGCAGGCAACTTGGTGT  
TGTATGACTTCAATGGCCTGGCGCAGTACTCTGTCCTCTTTATGGCTATTACGACAATAACGC  
ACGATGGATGGCTGAATTGGCTACCTCTTCTACTTCTGGTGGGGATTATGTCATTGG  
ATACAGCTTCTGGTTGCTCAAAAGCGATGACCAAAAATATTGGTGAACGATGGTGGCGATG  
ACAACACTTCAACTTCAAGCTGGAGGTGTTCTGTAGCTGGGACTATCTGATTGGTAACCCGTGAA  
ACAGCCGACAACAAGTTAACTCTACGATGAACCTTAAGGAAGGCCATCATAGAAGAGAGGCG  
CGCACAGGGAGGAGAACATCCACCTCATAGAATTCTCGAGGTTCTCGCTAACCTCTCGTGT  
TCCTCACACTTGTGCAAGTGGGATACCTCATCTTGTGGCTGTGAAGCGATCCCGAGGACTTCGCC  
CAGCAAGATCTGACACCCCTGGGGGGAAAATGAAATGGAACATGTTAATGTCCTCT  
GGGGATGTTCTGTCACCTGGTGTACTTATGCTGAACCTGGAGATACCATCTCTCATGG  
CTCTGAAGTGGCTCTGGGCGATTGGCTCTCTCTAGGCAACTTGTATGATTCTATTCTC  
GCCTTGATGGATGAGATTAACAACAAGATTGAAGAGGAGAACCTTGTGAAGGCCAATATTACCC  
GTGGGAAGCCAACATGATTAAGGCTTACAATGAATCTCTCTGGGCTCTGGGAACACCACAG  
GAGCACCCCTTTCTGTCATCTGCAGATGTCCCTCGCGGCTCTGGGAACAAATGGTGGGG  
CAGGAATTCTGCGCTCACCCTGTTCTGACGTCTGCCACCTACGTCACGATCTCATGGCGA  
CTTCTCACAGACATGTTCTGAGGTTCTGCAATTACTGCTCTGCTGGGACTTAGAATATGGAT  
ATCTCTCATACACAGAATTGACATGACTGGCAACGTCCTCTGCTGTACTTCAACCAAGGCATG  
ATCTGGATGGGCTCTCTGCTCTGCTCTGAGGCTCCGGCATCACACATCTCGTCTCACACATC  
CATGTTATTCCAGTGTGGGCTGTGATGTGCTGCAATGTTCCGAGGCCAGGGTGTCAAAGCTT  
CCAGATCCAACAACTCTACCTCGGATGCTGCTACTCATCTCTCTGTCACCATGCCGGTC  
CTGTACATGATCGTCTCCCTCCGCCATCTTGATTGTGGGCCCTCAGTGGTAAAACAGGAT  
GTTTGAAGTCATCGGTGAGACCTGGAACATGACTTCCAAAGCTGGATGCCAGGATCTGAGGC  
AGCTTTCTAACCCGGCTTGTCAATTGCTGTCAATTCTGGTGTGTTCTGACCATCTATTATCTC  
AATGCTACTGCAAGGGCCAGAAAGCAGCGAATCTGGACCTCAAAAGAAGATGAAACAGCG  
TTGGAGAACAAATCGGAAACAAGAAAATGCCAGCGGCTCGACCGCTGAGCTGCTGGTGGGG  
AGTAAggatccaatcaacactctggattacaattttgtgaaagatgtactggattttcaactat  
gttgcgttctttacgtatggatagcgtctttatgcctttatgcctttatgccttattatgt  
tattggcttcattttcccttgcgttgcattttatgccttgcgttgcattttatgccttgc  
ccattatcaaggcaacttggccgttgcactgtttgtgtgcacgtttgtgtgcacgcaccc  
actgtttgtgtggcc

10

20

30

〔 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

WPRE : 3,655 ~ 4,208

bGHポリAシグナル : 4,209 ~ 4,473

R-ITR : 4,511 ~ 4,640

ctgcgcgctcgctcaactgaggcccccggcaaagccggcgtcgccgcaccccttggcgc  
ccggcctcagtgagcgagcgagcgcagagagggagtgccacttccatcaactagggttct  
tgtatgttataatgatccatccatgtacttatctacgtacccatgtcttaggaagatcgaaatt  
cgcccttaagctagctagttataatagtaatcaattacgggtcattagttcatagccatata  
tggagttccgcgttacataacttacggtaatggccgcctggctgaccgcacccgc  
ccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgcaataggacttccattgacgtca  
atgggtgagttacggtaaactgcccacttgcagttacatcaagtgtatcatatgccaagta  
cgccccctattgacgtcaatgacggtaatggccgcctggcattatgcccagttacatgaccc  
tggacttccacttgcagttacatctacgtattgtcatcgctattaccatggatgcggtt  
ttggcagttacatcaatggcgtggatagcgggttgcactacggggatccaaacttccaccc  
ttgacgtcaatggagtttttgcacccaaatcaacggacttccaaatgtcgtaacac  
tccgccccattgacgtcaatggcgtggatggcgttacgggttgcacggactgggaggttctat  
tttagtgaaccgtcaagatccgtcagaagttgtcgtgaggactggcaggtaaagtatcaagg  
acaagacaggttaaggagaccaatagaaactggcgttgcagacagagaagactttgcgtt  
ctgatagcaccattggctactgacatccacttgccttctccacagggttccaggcgg  
ccgcccATGAGCCCCAGTTAAAGAGCTGGACGAGGAAGGTGACAAGTCAGCAAGAAGACCCACA  
AGGAAACAAACCTCAGAGCTGCATGTCACAGACGGGACCGAGCCAATCTAGCCGGAAAGGA  
TCCTGCTAAGGGTAGCCCAAGACCAAGGGTCTCCCGGAAGAACAGATGGAACATGGAAGCTATC  
ACAAGGGGTTGCAGGGACAGAAACCACGAAAGGTGGAGAGGTCTCTACAAGGGAGGAAGAAGGAT  
CGGAGAACCTCCCTTAAGGAGCAGAGAGCATCTCAAAGAAGGAGAGGGAGGCTCTGAGGAAGGA  
GGCAGGCAAGCAGCTGAGAAAACCAGGTCCACTTCTGGGCTCCAGTGTCTACTGGAGACT  
CCCTGCTGAGGAGGAGCTGGCTCAGATCTGGAACAGGTAGAAGAAAAAGAGCTCATCCT  
ACCGTGAGGAACAAACCTGGGACATGGCAAGAAGCTGAGGGAACTCAGGGAAAGCCAAAGCCTT  
TGTGGAGAAGTATGAGGGCTTGGGAAAGGCAAGGGAAACACCTCTACGCCCTACAGGATG  
TGATGGCTAAAGAAATGGGTCAAGTTAAAGGGAGCTTGTGATAATTCTCAAGACTCAATG  
TGGGAAATGAAGATCAAGGACATGAAAGTCACTTGGTTCTTCTGGCATCTTACTTCATCTT  
TCTCCGATGGATGTTGGAGTTAACCTGCTTTGGCTtaATATTGGTCTAGTCATCATCC  
CAGAGGGTGTGATGGCATGCCATGGAAAGTATACCCAGAAAGACGGTGCCTGGGCTAGGGAA  
GAGCGAGGCATGGACTTCTGTGCTCTGGGATTTGAGGGCTACATCAAATATTCTGCTCTCT  
CTATGGCTACTACAACACCAGGGACATTGGATGGTGGAGGTACAGGCTGCCCATGGCTACT  
TTATGGGGGGTCAGCGTCTGGCTACAGCTGATGCGTCTAGGTCGATGCCAGCAAT  
ACCCAGGGTAGCACCAGTGAGGGGACAGTGACAGCTCACGTTCAGCTCAAGATGTTCCAG  
CTGGGACTACCTCATGGGAAATTCAGAGACAGCAGACAACAAATATGTCCTCATCACTACCAG  
TCAAGGAGTCTATAGTGGACGAACAAGAGAGTAACAAAGAAGGGAAATATCCACCTGACAAGATC  
CTCCGGCTGGCAACTTCTCATTCTGCTGTCTGGAGGGTACCTCATTTCAT  
TGTGGTAAACGGTCCAGGAGTTCTCCAAAATGCAAAATGTCAGCTGGTATGAAAGGAATGAGG  
TGGACATCGTGTGCTCTGCTAGGGATGTTTGCCCCCTGTTGAAACCATCGCTGCCCTGG  
GAGAATTATCACCCACGAACTGGGCTGAAGTGGCAGCTGGGCGCATTGGCTTCTGGG  
AAACCTCTACACGGTTCTCTGGGCTCATGGACGATGTCACCTTAAGCTTCTAATGAGGAA  
AAATCAAGAACATCCTACACTGGACCCGTTAACTTACAAATTCCTCAGGTGGAAATGAGG  
GTGCCCCGGCACCACACCCCTGCAAGATGTGCCAGAGGTTCTGCTGGGAGACAGCTGTGG  
CATTGAGTTATGAGGCTCACCGTGTCTGACATGCTGGTAACATACCTCACCACCTGGTGG  
ATTTCCTCGAGCTTGTGTCGGTTCATGAATCACTGCTGGTGTGGGACCTCGAGGCTGGT  
TTTCCCTCATATGCCAGTTGATATTAGTGGAAATGTTGGGTTGATCTTCAACCAAGGAAT

10

20

30

【 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

10

20

30

40

50

TMC1ex1 : 1,425 ~ 3,710

bGHポリAシグナル : 3,745 ~ 4,225

R-ITR : 4,262 ~ 4,402

cctgcaggcagctgcgcgtcgctcactgaggcccccggcaaagccccggcgtcgccg  
 accttggtcgccccgcctcaagtgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 taggggttcctgcggccgcacgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 ATTTGGTCTCATTTAACCTTTCTAGTAAAGGAGATGTTGCTCTCAAATTGCACTGG  
 AATGTAATATTAAATTAAAGATGACCCACATGACCTTATAAGGACAGTAAAATTAAACAA  
 CCGGAAAGATAAAAGCGGGCCAGTTGGCTCAGTTCTATAAAACCAGCCCACAAGGATTGCACTAT  
 TCTTAGGCTTGCCTGGGGCTACATGATGAGTTCCAGGACTGCCTGGTTACAGACCGAGACTCTCTC  
 AAGAGTCCAGATAAAACAACAACAAAGGGGGCGAGGTGAAATACAGGGCTGTAAGAAGTAAATA  
 TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGAGAAGAAAAATTTCCTCCGTGGTTCAATCCTCCAAGG  
 GCTGAACAGGAAGTTGACGCAGGCAGGTGAGGAGCAGGCTAGATGGGCTGCCACCCCT  
 TAATCCCCACAAGCGAGTTCTCCGCAATCGCCTGCCCCACTCTCAACTTTCTCAACTGACT  
 CTTTGCCTGTTGGTCCCTCGCTGTTGGCAGTGGAAACAACTACCAACTGCAGGTAGGAAATGTCATGA  
 GGGGCTACCTGCAGCCCTTGGCTTGAGGGATGCGAGGGATGCGGGTGGAAACCTGAGGCCCCGCC  
 TTCTCTGCCCCACGCCATTAGGCCACGCCCTACCCAGCACTCCCTCAACCACCCCCCTTCCCCG  
 GCGCCCTCATGAGGTCCCCGCCCTCTCAACCCCTAGCTCTGAGGCCCTCGAGGCCGCCCCG  
 GCGTTCTGACTGAGGCCACGCCCTCTGCTCTCATTCAGGCCCCAGACCCCTACGCTTGCAGT  
 CCTCCCTGCTCTGCTGCCCTAGGCCCCGCCCTCTAGGCCCCCTCTGCCCCAAGACCCGCCCT  
 AGGCTGTTCCCCCCCCTGGCCAATGAAGACCCGCCCTTCTTAGCCGCCCGCCCCGGTCCCA  
 CAAAATCCC GCCCTCCGGCCCCCTCCGCCCTTGGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
 CTGGGCACTCTGAGGGCTCTGGCGGGGGTGGAGACCGATCCGGATCTGCCCCAGCAGGA  
 AGCGTATCCGGCGCCGTCGCTGCTCCGGTGTGCTCTCGCTCTCGCCGGTGTGCGCTT  
 GCCCTCGCGCCCGCAGCCGGCAGCCTCTCAGCTCAAGCTTCGAATTCTGAGCAGGATGCCA  
 CCCAAAAAGTCAAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTGAAGA  
 AGAAGAAGATAAGCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGAGACCAAAGAGGAAACGGACCAGAGATGTCA  
 TCAATGAGGATGACCCAGAACCGGAGGCCAGGATGAAGAAACAAGAAAGGCAAGAGAAAAAGAA  
 AGGCGGAGGAGGCTGCGGAGAGGGAGCGGAAGAAGAAGAAGGAAATTGATGAAGAGGAATTAGAACG  
 GTTAAAAGCACTGCTCGATGAGAATAGACAAATGATCGCTACTGTCAAATGTAACCTTGGAAAAA  
 TGGAGAAGAAAATTGAGTTCTCAAGGAAGCAAAGAAATTGAGTGAAGTGAAGAATGAAGGCGCTTT  
 GGGAAAGGAAAGGAAAAGAAGTGGTTTGCAATTAAAGATGATGATGCCAGAAATGGGAAAATT  
 CCTCCGAGATTGAGAACTTCAAGCGGCTGCGTCCATGGAAAACAAAATCAAGGCAATTG

10

20

10

20

30

tttaaagttctgtatgtggcgccgtattatcccgattatgcgcggcaagagcaactcggtcg  
 ccgcatacactattctcagaatgacttggtgagtaactcaccagtacagaaaagcatcttacgg  
 atggcatgacagtaagagaattatgcagtgcgcataaccatgagtgataacactgcggccac  
 ttacttgcacaacgatcgaggagccaggactaacccttttgcacaacatggggatca  
 tgtaactcgccctgatcggtggaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgaca  
 ccacgatgcgttagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcaactacttactcta  
 gcttccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagtgcaggaccacttgcgctc  
 ggcgcctccggctggctggattatgcgtgataatctggagccgtgagcgtgggtctcgccgt  
 tcattgcgactggggccagatggtaagccctccgtatcgtagttatctacacgacggggagt  
 cggcaactatggatgaaacgaaatagacagatcgctgagatggcgtactgatggattaaac  
 gtaactgtcagaccaacttactatatacttttagattgtgatggattaaacttcattttaat  
 aaaggatctaggtaagatcctttgataatctcatgacccaaatcccttaacgtgagtttcg  
 ttccactgagcgtcagacccctgtagaaaagatcaaaggatcttgcgatccttttctgc  
 cgtaatctgtgctgcaaaacaaaaaccaccgttaccaggcggtgtttgttgcggatcaag  
 agctaccaactctttccgaaaggtaactgcgtcagcagacccatccatgtcct  
 ctagtgtacccgttagtttaggcaccacttcaagaactctgtacgcaccgcctacatccgc  
 gtaatctgttacccgttagtttaggcaccacttcaagaactctgtacgcaccgcctacatccgc  
 gacgatagttagccgataaggccggcgtgacgggggttcgtgcacacagccac  
 ttggagcgaacgactacaccgaaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccac  
 tcccaaggagaaaggccgacaggatccgttaagcggcagggtcgaaacaggagagcgc  
 gggagctccaggggaaacgcctgttatctttatagtccgtcggttcgcacactctgact  
 gagcgtcgtatccgttatctttatagtccgtcggttcgcacactctgact  
 cttttacgggtccgttatctttatagtccgtcggttcgcacactctgact

10

【 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

20

hGH ポリ A シグナル : 4,474 ~ 4,954

R-ITR : 4,991 ~ 5,131

cctgcaggcagctgcgcgtcgcgtcactgaggccgcggcaagccggcgtcgcc  
 acctttggtcgcggccgtcactgaggcgagcgccgaggaggatggccactccatcac  
 taggggttccgtcgccgcacgcgtGCAAGAACCTCACTGCTGAACATATCTTGCAGCCCTT  
 ATTTGTTTCACTATTAACCTCTTTCTAGTAAAGGAGATGTTGCTCTCAAATTGCTAGG  
 AATGTAATTTAAAGGAGATGACCCACATATGACCTTATAAGGACAGTAAATTAAACAA  
 CCGGAAAGATAAACCGGGCCAGTGGCTCAGTTCTATAAACCCAGCCACAAGGATTGCACTAT  
 TCTTAGGCCTGGCGGTACATGATGAGTCCAGGACTCCGTACAGACCGAGACTCTCTC  
 AAGAGTCCAGATAAACACAACAAAGGGGGGAGGTGAAATACAGGGGTGTAAGAAGTAAATA  
 TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGAGAAGAAAAATTCTCCGTGGTTCAATCCTCCAAGG  
 GCTGAACAGGAAGTGCAGCAGGCAGGTGAGGAGCACGAGCCTAGATGGCTGCGGTGCCACCC  
 TAATCCCCACAAGCAGTCTCCCGCAATTGCGCTGTCCTACTCTCAACTTTCTCAACTGACT  
 CTTTGTGTTGGCTCCCTCGTGGCAGTGGAAACAACCTACCAACTGCAGGGTAGGAAATGTCATGA  
 GGGGCTACCTGCAGCCCCCTGGCTTGAGGGATGCGGGTGGAAACCTGAGGCCCCGCCC  
 TTCTCTGCCCCACCCATTAGGCCACGCCCTACCCAGACTCTCAACCACCCCTTCCCCG  
 GCGCCTCATGAGGCCCCCTCTCAACCCTAGCTCTGCTCTTCACTCCCAAGACCCCTACGCTTGCAGT  
 CCTCCCTGCTCTGCTAGGACCCGCCCTCTCAGGCCCTCTGCCCCAAGACCCGCCCT  
 AGGCTGTTCCCGCCACTGGCAATGAAGACCCGCCCTTCTTCTGCCCCGCCCCGGTCCA  
 CAAATCCGCCCTCCGGCCCCGCCCTCCGCCCCCTTGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
 CTGGGCACTCTGCAAGGCTCTCTGGCCGGGGTGGAGACCCGATCCGGGATCTGTCCTCAGCAGGA  
 AGCGTATCCCGGCCGCGTCGCTGCTCGTCTCCGGTGTCTGGCCGGGGTGTGCGCCTT  
 GCCCTCGCGCCCCCAGCCCCGGCAGCCCTCTCAGCTCAAGCTCGAATTGCTGAGAAGAAGATAA  
 CAAATCCAAGTGGAGGAGAAAGAAGAGGATACAGAGGAAAGCTCAAGTGAAGAAGAAGATAA

30

GCTACCCAGAAGAGAGAGCTTGAGACCAAAGAGGAAACGGACCAGAGATGTCATCAATGAGGATG  
 ACCCAGAACCGGAGCGGAGGATGAAGAACAAAGAAAGGCAAGAGAAAAAGAAAGCGGAGGAGG  
 CTGCGGAGAGGAGCGGAAGAAGAAGAACAAATTGATGAAGAGGAATTAGAACGGTAAAGCACT  
 GCTCGATGAGAATAGACAAATGATCGTACTGTCAAATGTAACCTTGGAAAATGGAGAAGAAAA  
 TTGAAGTTCTCAAGGAAGCAAAGAAATTGAGTGAAGAGGAATTAGAACGGTAAAGCACT  
 GGAAAGAACAGTGGTTGCATTTAAGATGATGATGGCCAAGAAATGGGAAAATCTCCGAGATTT  
 TGAGAACCTCAAAGCGGCTTGCCTCCATGGAAAACAAATCAAGCAATTGAAAGTCAGTTG  
 GTTCCCTAGTGGCTCGTACTTCTCTCAGGTGGATGTAACCGCTCAACATGGTCTCTT  
 GTGTTGACCTCAGCCTCATCGTGTACCTCTGGGTTACCGTACGGCAGCTTAC  
 TAGGAAAACAGTCCAAGAGCTGAAGAACATCTGCAGCCAACCTGGTGTGTTATGACTTCA  
 ATGGCCTGGCGCAGTACTCTGTCCTCTTATGGCTATTAGACAAATAACGCACGATGGATGG  
 CTGAATTTCGGCTACCTCTTCTACTTCTGGTGGGATTATGTCATGGATACAGCTCCT  
 GGTTGTCCTCAAAGCGATGACCAAAATATTGGTGAACGATGGTGGCGATGACACACACTTCA  
 ACTTCAGCTGAAGGTGTTCTGAGCTGGACTATCTGATTGGTAACCTGAAACAGCGACAAAC  
 AAGTTTACTCTATCACGATGAACTTAAAGGAAGGCCATCATAGAACAGAGGCGCACAGGTGGA  
 GGAGAACATCCACCTCATCAGATTCTCGCTCATCGTGTACTTCTGGGATGTTCTCAGACTTG  
 GTGCAAGTGGATACCTCATCTTGGTGGGAAAAAAATGAAATGAACATGTTAATGTCCTCTGGGATGTTCTG  
 TCCCACCCCTGTTGACTTATTGCTGAACTGGAAGATTACCATCCTCTCATGCTCTGAAGTGGC  
 TCCTGGGGCGCATTTCCTCTTAGGCAACTTGTATGTTATTCTCGCCTTGATGGAT  
 GAGATTAAACAACAAGATTGAAGAGGAGAACGCTGTGAAGGCCAATTACCCCTGTGGGAGGCCA  
 CATGATTAAGGCTTACAATGAATCTCTCTGGGCTCTGGGAACACACAGGAGCACCTT  
 TCGTTCATCCTGCAAGATGTCCTCGCGTCCCTGCTGGGAAACATGGTGGGAGGAATTCTG  
 CGTCTCACCGTCTGACGTCCTGACCATCTACGTCACGATCCTCATGGGACTTCTCAGAGC  
 ATGTTCTGAGGTCTGCAATTACTGCTGGTGTGGACTTAGAATATGGATATCTTCATACA  
 CAGAATTGACATCAGTGGCAACGTCCTCGCTGTGATCTCAACCAAGGCATGATCTGGATGGC  
 TCCTCTTCGCTCTAGCCTCCGGCATCAACATCCTCGTCTCCACACATCCATGTTTCCA  
 GTGCTGGGCTGTGATGTCATGCAATGTTCCGAGGCCAGGGTGTCAAAGCTTCCAGATCCAACA  
 ACTTCACCTCGGATGCTGCTACTCATCTCTTCTGTCACGATGTCACATGATGTC  
 GTCTCCCTCCCGCATCTTGATTGTTGGGCTCTCAGTGGTAAAAACAGGATGTTGAAGTCAT  
 CGGTGAGACCTGGAACATGACTTCCAAAGCTGGATGGCAAGAGTCTGAGGCAGCTTCTAAC  
 CCGGCTTGTGATTGCTGATCTGGTGTGGTCTGACCATATTATCTCAATGCTACTGCC  
 AAGGGCCAGAAGCAGCAATCTGGACCTCAAAAGAAGATGAAACAGCAAGCTTGGAGAACAA  
 AATGCGAAACAAGAAAATGGCAGCGGCTCGAGCAGCTGAGCTGCTGGTGGCCAGTGGATCCACC  
 GGCGGCGTGCACCACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTACCCGGTGGCCATCCTGGTC  
 GAGCTGGACGCCAGTAAACGCCACAAGTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGATGCCAC  
 CTACGCCAACGCTGACCTGAAAGTTCATCTGACCCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCC  
 TCGTGACCCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCCAGCGTACCCGACCACATGAAGCAGCAC  
 GACTTCTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCAGGCGACCATCTTCAAGGACGA  
 CGGCAACTACAAGACCCCGCGCCAGGTGAAGTCTGAGGGCGACACCCCTGTGAACCGCAGTCAGC  
 TGAAGGGCATGCACTTCAAGGAGGACGCCACATCCTGGGCAACAGCTGGAGTACAACACTAAC  
 AGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCG  
 CCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCAACTACCAGCAGAACACCCCCCATGGCG  
 ACGGCCCCGCTCTGTCCTGGGACAACCAACTACCTGAGCAGCACCCAGTCCCTGAGCAAAGACCCC  
 AACGAGAACGCCGATCACATGGCTCTGAGGAGTGTGACCCGGCGGGGATCACTCTGGCAT  
 GGACGAGCTGACAGTAAAGCGCCGCTCGAGCTAAGCTCTAGAAGatctacgggtggcatcc  
 ctgtgaccctcccaactgtgcctctctggccctggactgtccactccactgtgcccaccagcctt  
 tcctaataaaaattaaatgtgcataatgtgacttaggtgtccttctataatattatgggtgg  
 aggggggtgtatggagcaagggcaagttggaaagacaacctgttagggctcggggtctattg  
 ggaaccaagctggagtgcaactggcacaatctggctactgcaatctccgcctctgggttcaag  
 cgatttctcctgcctcgcctcccgactgtgggattccaggcatgaccaggctcagctaa  
 ttt  
 tcaggtgatctaccacccaccttggccctccaaattgtggattacaggcgtgaaccactgtccct  
 tccctgtccctgtatggtaaccacgtgcggacggcggccgcaggaaacccctagtga  
 tggagttggccactccctctgcgcgctcgctactgaggccggcgaccaaaggctgccc

10

20

30

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

cctgcaggcagctgcgcgctgcgtcaactgaggccgccccggcaaaaggccggcgtccggcg  
acccctttggtcgcggccggctcagtgcggcggcgcggcgcggcggcggactggccaaactccatcac  
taggggttctgcggccgcacgcgtGCAGAACCTCTACTGGGTGAACATATCTTGGCAGCCCTT  
ATTTGGTTTCTATTAACCTTTTCTAGTAAAGGAGATGTTGCTCTCAAATTGGCATAGG  
AATGTAATTTAATTAAAGGAGTACCCACATATGACCTTATAAGGACAGTAAAATTAAACAA

CCGGAAAGATAAAGCGGGGCCAGTTGGCTCAGTTCTATAAAACCAGCCCACAAGGATTGTCACTAT  
 TCTTAGGCTTGCAGGGCTACATGATGAGTCCAGGACTGCCTGGTTACAGACCGAGACTCTCTC  
 AAGACTCCAGATAAACAAACAACAAAGGGGGCAGGTGAAATACAGGGCTGTAAGAAGTAATA  
 TGATATCTGCATGGGAGGCTAGCCAGGCAGGTGAGGAGCACGAGCCTAGATGGCTGGGTGCCACCC  
 GCTGAACAGGAAGTTGACCCAGGCAGGTGAGGAGCACGAGCCTAGATGGCTGGGTGCCACCC  
 TAATCCCCACAAGCGAGTTCTCCGCATTCGCTGTGGCAGTGGAAACAACCTACCACTGCGAGGTAGGGAAATGTCATGA  
 GGGGCACCTGCAGCCCTGGCTTGAGGATGCAGGGATGCAGGTGAGGACCTGAGGGCCCCGCC  
 TTCTCTTGCCCCACGCCATTAGGCCACGCCCTACCCAGCACTCCCTCAACCACCCCTTCCCC  
 GCGCCCTCATGAGGTCCCACCTCTCAACCCCTAGCTCTGAGGCCCTCCCTCACAGGCCCG  
 GCGTCTCTTGACTTGAGGCCACGTCCCTCTGCTCTTCACTCCAAAGACCCCTACGCTTGTGAGT  
 CCTCCCTGTCTTGCTGCCTAGGCCACGCCCTCTCAGGCCCTCTGCCCAAGACCCCGCCCTT  
 AGGCTTCTCCGCCACTGGCAATGAAGACCCCTTCTTCTTACGCCCTGGCGCTCCGTAGCAGTGACGTGCGCAGG  
 CTGGGCACTCTGCAGGGCTCTGGCCGGGGTGGAGACCGATCCGGATCTGTCAGGCCAGGA  
 AGCGTATCCCGCCGCGCCTGCTGTGCTCCGGTGCCTCGCTCGCCGCGGTGTCGCGCTT  
 GCGCTCGGCCCGCAGCCGCGCAGCTCTCAGCTGAGGAGACGGATCCGGATCTGTCAGGCCAGGA  
 CCCCAGTTAAAGAGCTTGAGGAGGAAGGTGACAAGTCAGCAAGAAGACCCACAAGGAAACAAAC  
 CTCCAGAGCTGCATGTCCTCAAGGGCACCCAGGCCAATCTAGCCGGAGGATCTGCTAAGG  
 GTAGCCAAGACCAAGGGCTTCCCGGAAGAACACAGATGGAACATGGAAAGCTATCACAAAGGGTTG  
 CAGGGACAGAAACACAGGAAGGGCTCTACAGGGAGGAAGAGGATCGGAGAACCTTC  
 CCTTAAGGAGCAGAGACATCTCAAAGAGGGAGGGCTCTGAGGAAGGAGGCAGGCAAGC  
 AGCTGAGAAAACCAGGTCCACFTCCFTGGCTCAGTGTCTACTGGAGACTCCCTGTGAG  
 GAGGAGCTGGCTCAGATCTGGAACAGGTTAGAAGAAAAAGAGCTCATCACTACCGTGAGGA  
 CAAACCTGGCCCATGGAAAGAGCTGACGGAACTCAGGGAAAGCCAAGCCTTGTGAGGAAGT  
 ATGAAGGAGCCTGGGAAAGGCAAGGGCAAACACCTCTACGGCTACAGGATGATGGCTAAG  
 AAATGGGTCAAGTTAAAGAGGGACTTTGATAATTTCAAGACTCAATGTTCTGGGAAATGAA  
 GATCAAGGACATTGAAAGTCACCTCGGTTCTGTGCACTTACTTCATCTTCTCCGATGGA  
 TGTATGGAGTTAACCTTGTCTTGTGCTTATTTGCTTATTTGCTCTAGTCATCATCCAGGGTCTG  
 ATGGGATGCCCTATGGAAGTATACCCAGAAAGACGGTGCCTGGGCTGAGGAAGAGGAGCCAT  
 GGACTCTCTGCTCTTGGGATTTGAGGGCTACATCAAATATTCTGCTCTCTATGGCTACT  
 ACAACAAACCAGCGGACCATGGATGGCTGAGGTACAGGCTGCCATGGCTACTTTATGGGG  
 GTCAGCGTGTGGCTACAGCTTGTGATCGTCACTGGCTGATGGCCAGCAATACCCAGGGTAG  
 CACCAAGTGGGGGAGAGTGCAGCGTTCAGCTCAAGATGTTCACTGGGACTTCAAGGAGT  
 TCATCGGGAAATTCAAGAGACAGCAGACAACAAATATGTCCTCATCACTACCGCTCAAGGAGTCT  
 ATAGTGGACGAACAAGAGAGTAACAAAGAAGGAATATCCACCTGACAAGATTCCCTCCGCTCCT  
 GGCCAACTTTCTCATTCTCTGCTGTGCTGGAAGCGGGTACCTCATTTACTTTGTTGGTGAAC  
 GGTCCCAAGGAGTTCTCCAAATGCAAATGTCAGCTGCTATGAAAGGAATGAGGTGGAGATCGT  
 ATGTCCTGCTAGGGATTTGTCCTCTGTTGAAACCATCGCTGGGAGGATTTCTCCATA  
 CCCACGAATGGGCTGAAGTGGCAGCTGGGCTGATCTTGGGATTTCTGGGAAACCTCTACA  
 CGTTCTCCTGGCCCTCATGGGACATGTCACCTTAAGCTTCTAATGAGGAAAAAAATCAAGAAC  
 ATCACTCACTGGGACCCCTGTTAACATTACAATTCTCAGGTGGGATGAGAGTGTGCCCCGGCC  
 ACCACACACCTGCAAGATGTGCCAGGGTCTTGCTGGGAGACAGCTGTGGGATTGAGTTA  
 TGAGGCTACCGCTGCTGACATGCTGGTAACATACCTACCATCTTGGCTGGAGATTCCCTCGA  
 GCTTGGTTTGTCCGGTCATGAATCACTGCTGGTGGGACCTCGAGGCTGGTTTCCCTCATA  
 TGCCGAGTTGATATTAGTGGAAATGTTGCTGGGTTGATCTTCAACCAAGGAATGATCTGGATGG  
 GCTCCCTCTATGCTCCAGGACTGGTGGGACATCAATGCTCTGCGCTTGTGACCTCCATGACTTC  
 CAGTGCCTGGGCAGTGTGAGCAGCAACGTTCCCATGAGCGTCTGTTAAAGCCCTCCGATCCAA  
 CAAACTCTACATGGGCTGCTGCTGTTGCTCTCCCTCAGGCTCTGCGCTGTTGGGCTACACTG  
 TCATGTCCTCTCCACCCCTGTTGACTGTGCCCCCTTCAGTGGGAAACAGAAATGACGATGTC  
 CTCCATGAGACCATGCAAGAACGATTTCCCTAAGTCTGGGCAAGATCTTGTGCTCTGCCAA  
 CCCAGGCCATTCAGGCTCATCTGCTTAATGTTCTGGGCAATTACTACCTGAACCTAGTT  
 CAAAAGTCTTCCAGAGCTAATGCCAGGTGCGAAAGAAGATCCAAGCGCTCCGTGAAGTGG  
 AAGAACCATAAATCCATCAAGGGAAAGCCATAGTCACATATTCAAGAGGACACAATCAAGAACAG  
 CTCCAAAAATGCCACCCAGATACCTTACTAAAGAACAGGCCACATCTCACTCTTCCAGCCAAA

10

20

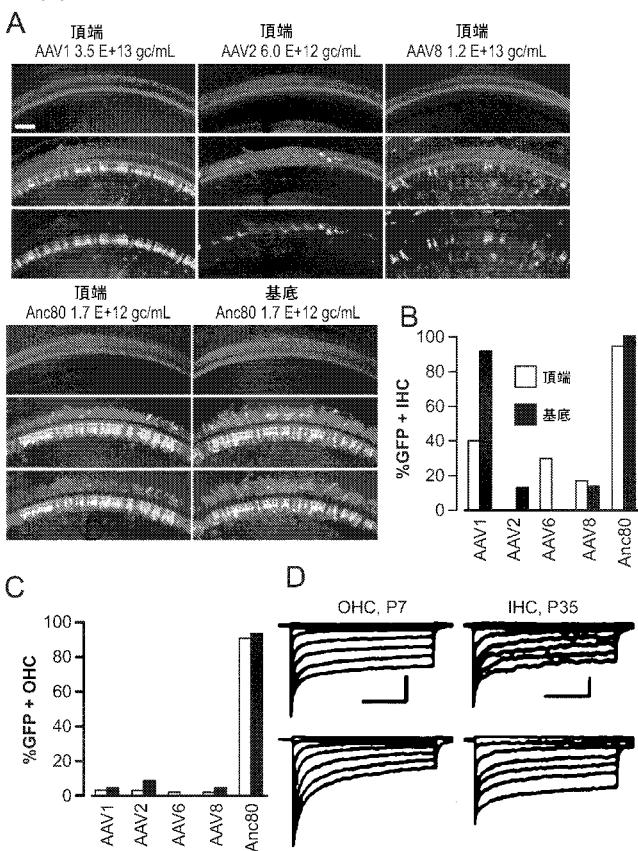
30

10

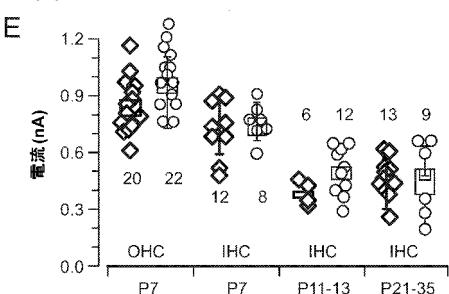
20

30

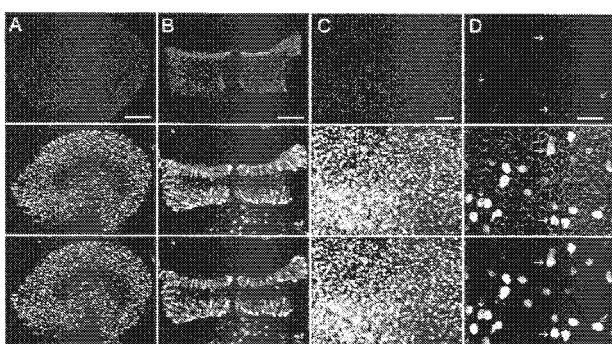
【図 1 - 1】



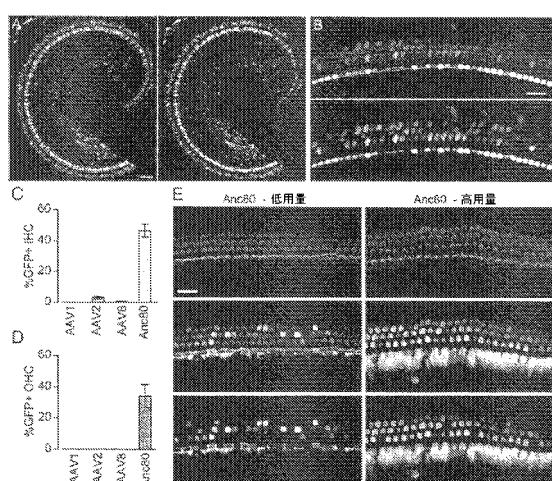
【図 1 - 2】



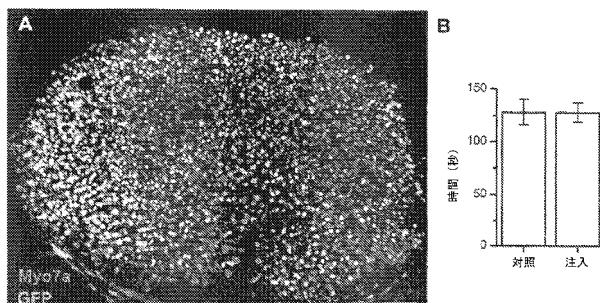
【図 2】



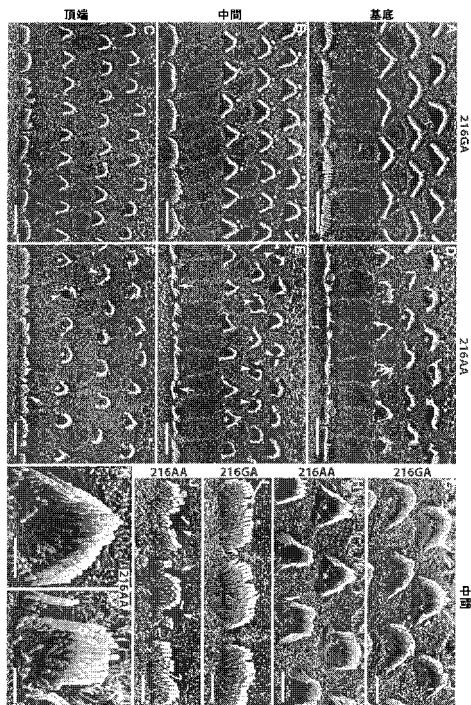
【図 3】



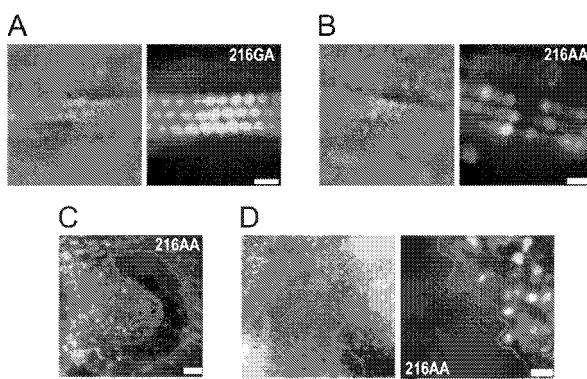
【図 4】



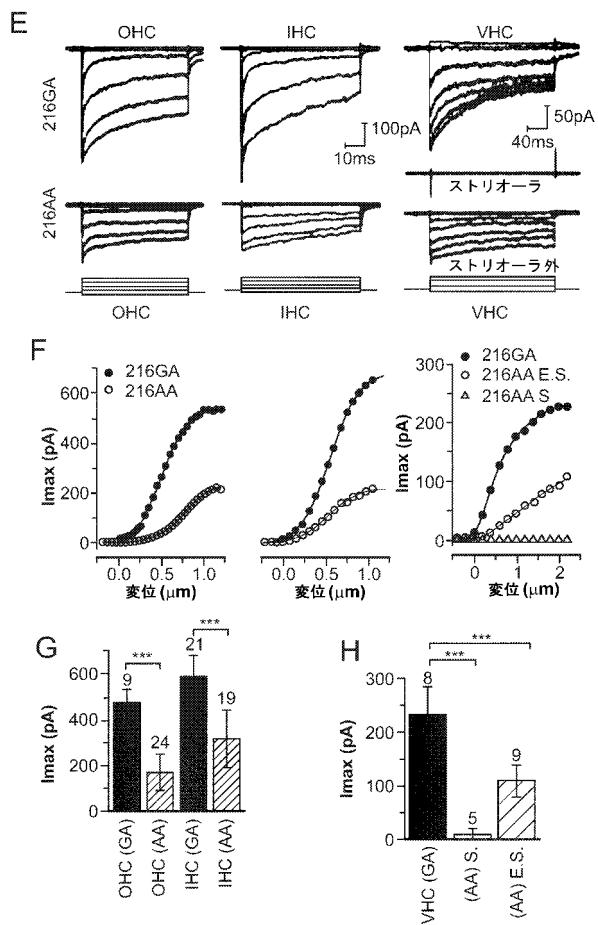
【図5】



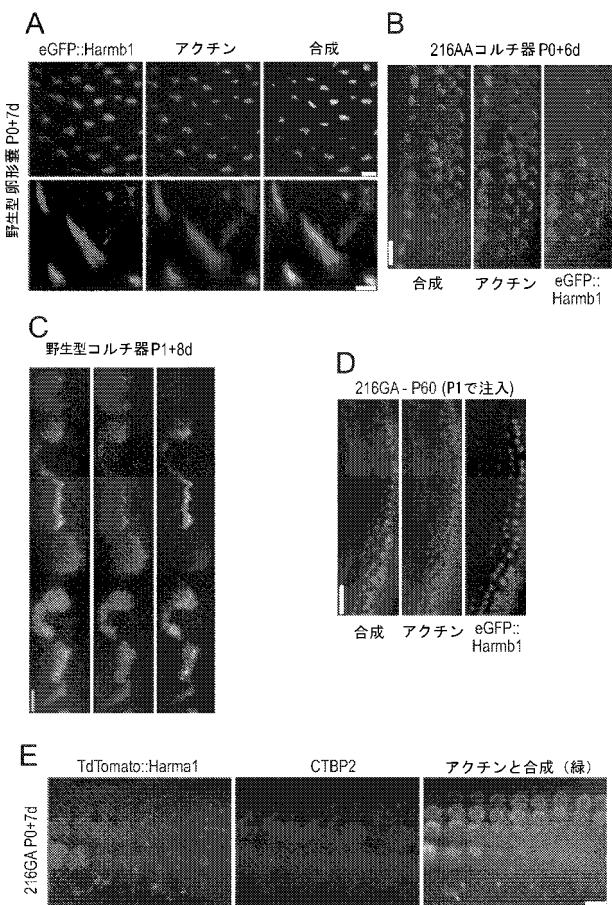
【図6-1】



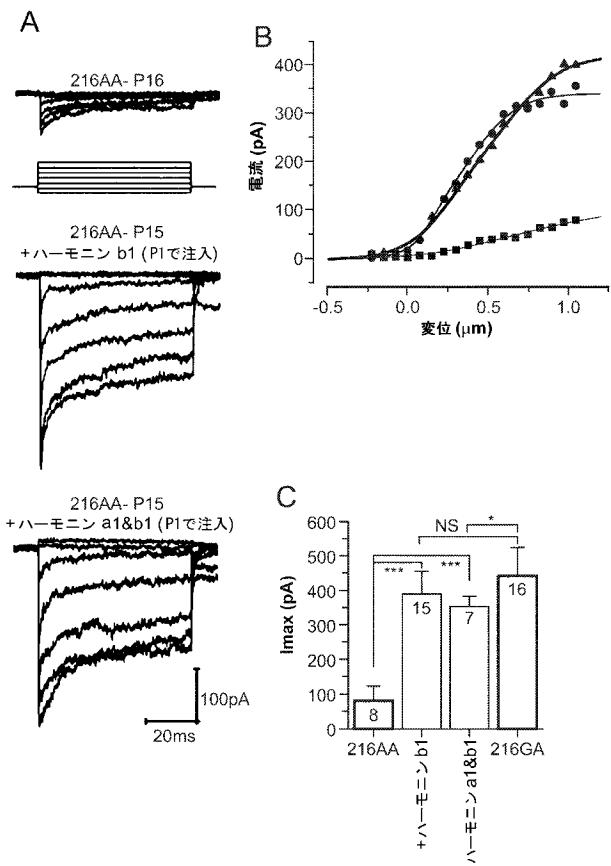
【図6-2】



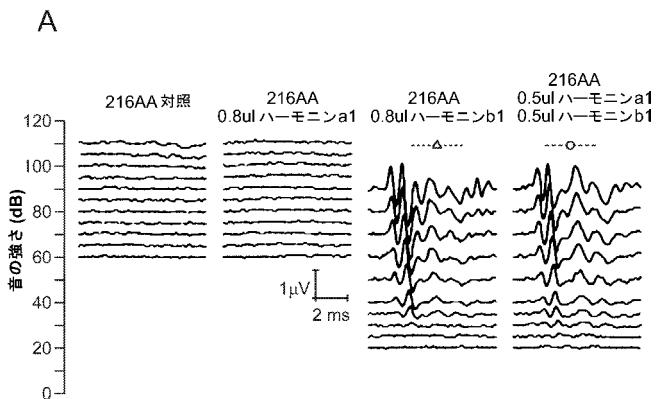
【図7】



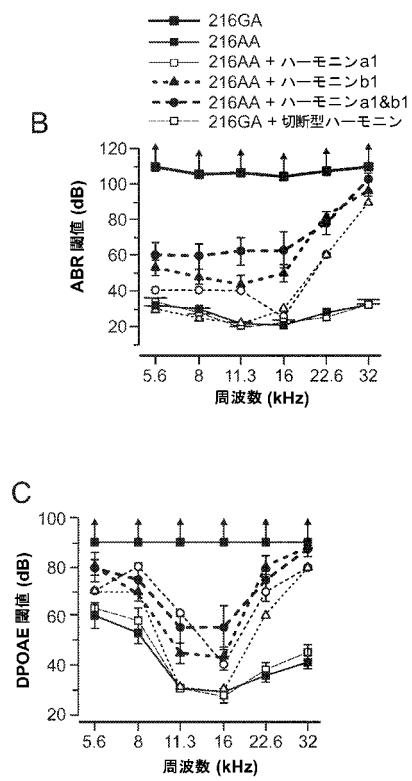
【図8】



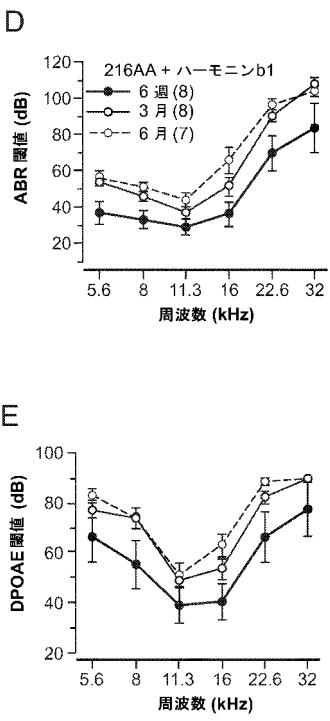
【図9-1】



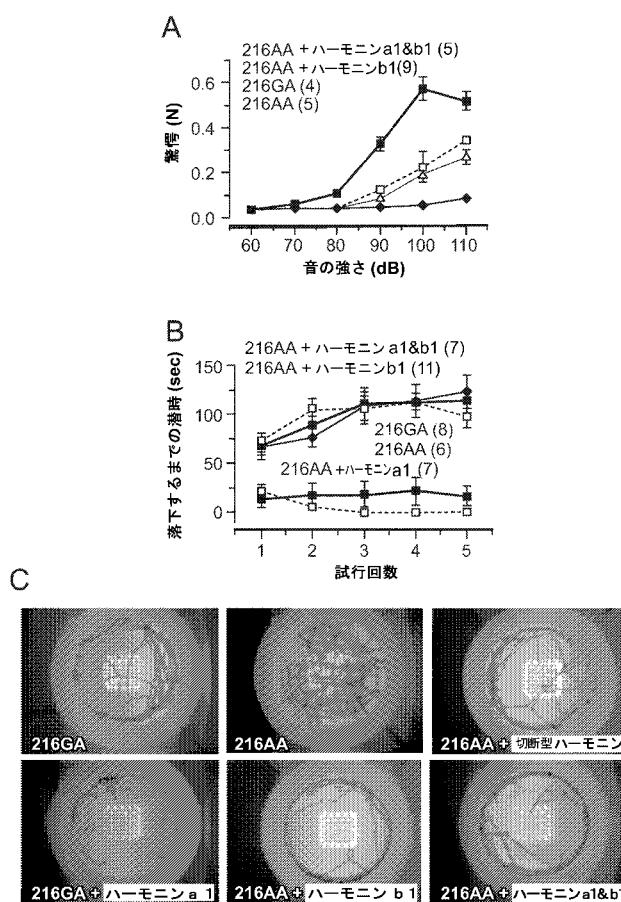
【図9-2】



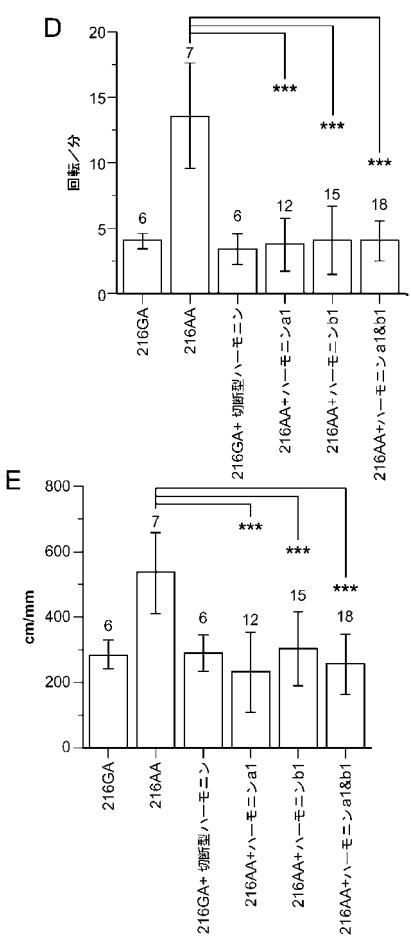
【図9-3】



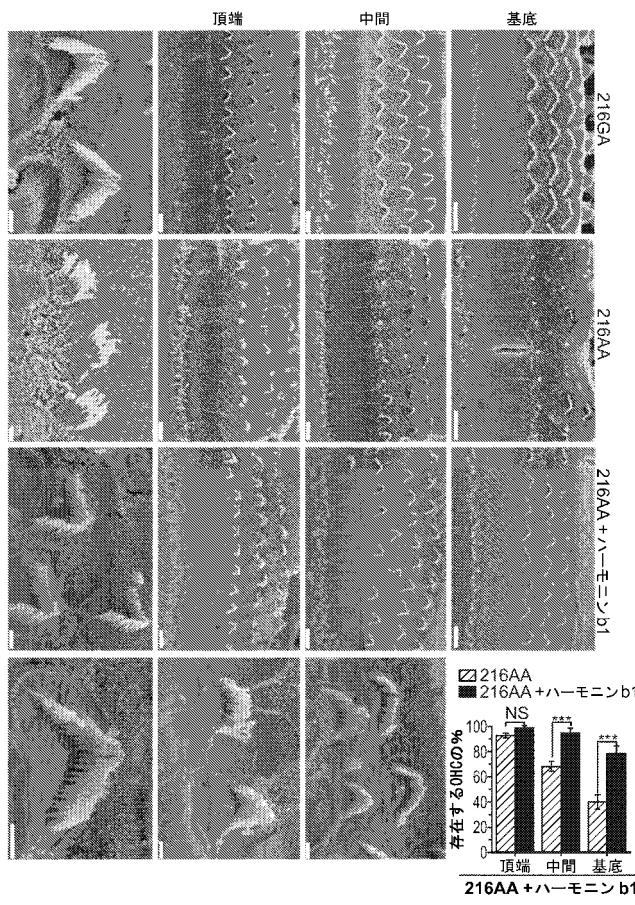
【図 10-1】



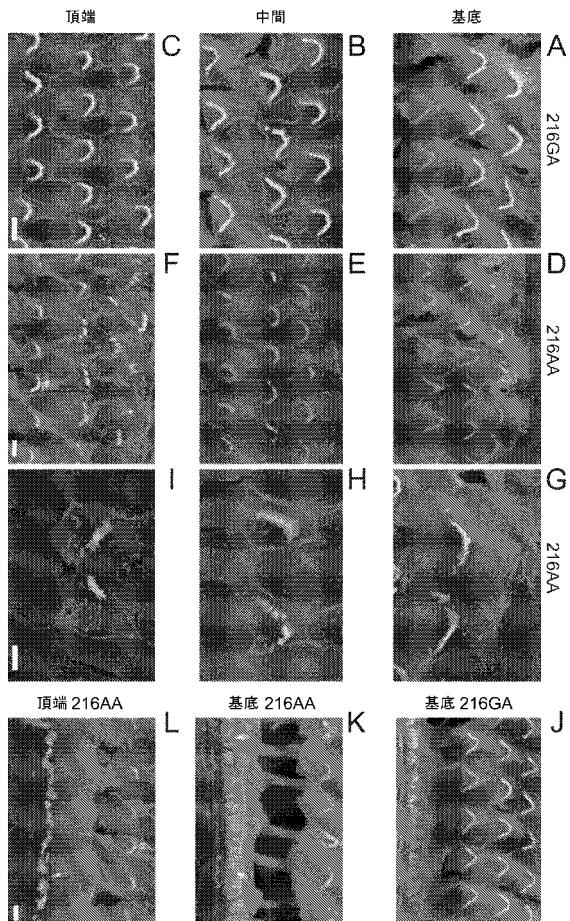
【図 10-2】



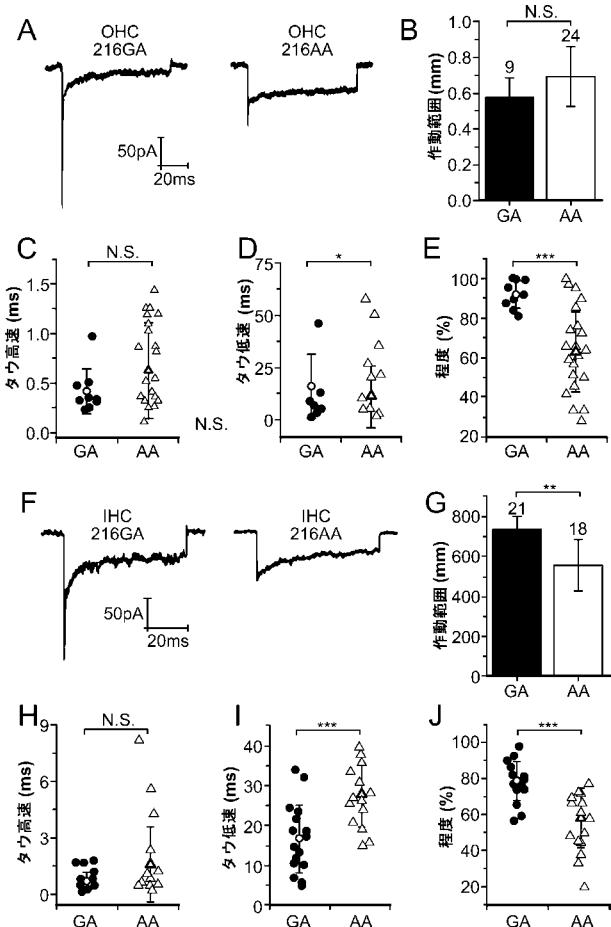
【図 11】



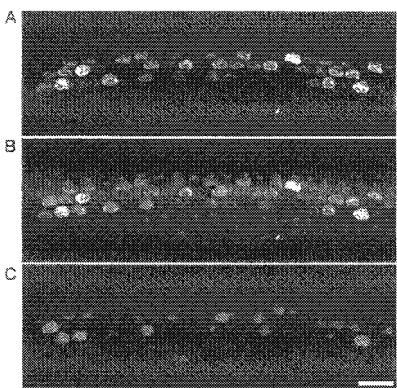
【図 12】



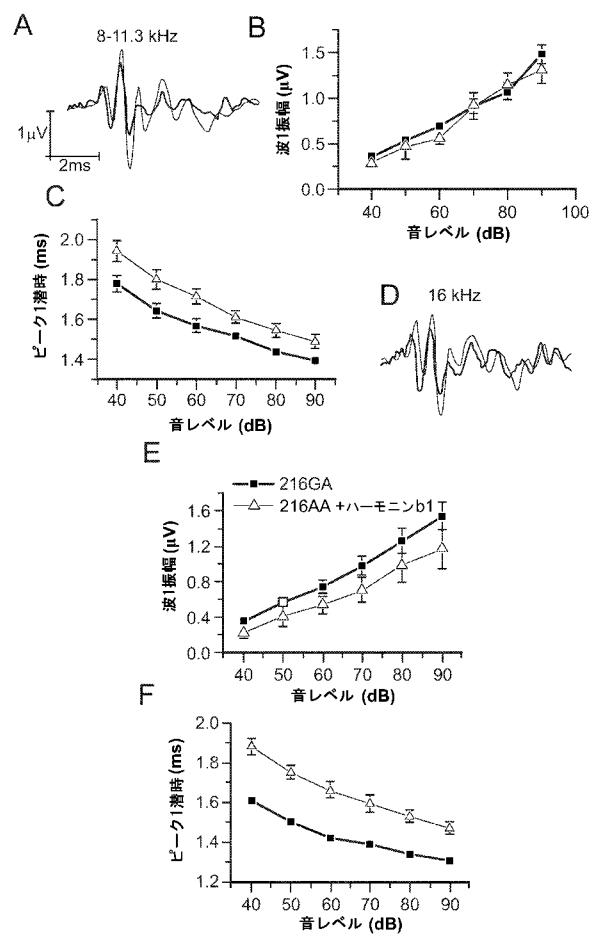
【 図 1 3 】



【図14】



【 図 15 】



【図 16A-1】

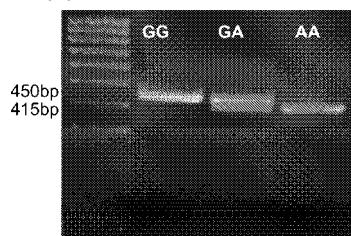
Sequence\_1: (HarmB1, xprt) と Sequence\_2: (mTruncated, xprt) とのアライメント

Seq_1	1	MDRKVAREERHKVDELIENDAEKDLYDVLRMHQTMIVAVLGDYKIVINENPRPLED	60
Seq_2	1	-----	-----
Seq_2	1	MDRKVAREERHKVDELIENDAEKDLYDVLRMHQTMIVAVLGDYKIVINENPRPLED	60
Seq_2	1	-----	-----
Seq_1	61	ARPLPLKIQK---EYDQLTERRSRKKEVDRDLHREGLGSVYRGGLFEGGGLFISH	116
Seq_2	61	-----	-----
Seq_2	61	ARPLPLKIQK---EYDQLTERRSRKKEVDRDLHREGLGSVYRGGLFEGGGLFISH	116
Seq_2	61	-----	-----
Seq_1	117	LIGKQGQADSTGQGLQVGELIVRNGYSSCTHEEVINLRTKTVSIKVHGLIIVKSSP	176
Seq_2	121	-----	-----
Seq_1	177	EESLKQWQIVQCVSESGGVRGGLGSFGNRTTERKVFSLVGSGLGCCISSGPIQPKGI	236
Seq_2	121	-----	-----
Seq_1	237	FVSHYKPGSISAEVGLETGDOIIVEVNGIDFTNDHKAEAVNLVKSSRSLSITISIVAGREL	286
Seq_2	121	-----	-----
Seq_1	297	FMTBTERLLEEARQEQRQEQMOKRMLAMESNKILOEQCMEQMRKELAQKAAENERY	356
Seq_2	121	-----	-----
Seq_2	357	RKEMQISEERKPKQWEMGSKQILPKITAEHPVPLPKPSIGRQYRDKP	416
Seq_2	121	-----	-----
Seq_2	417	TIRKAKREKKAKYQSIQDKNKELEFOQYKEKEEMLEKEKOLKINRRAOFVSETE	476
Seq_2	121	-----	-----
Seq_1	477	REDIESESEKIQYQWVRLCQTRLEQIQAENAELPEMTIGGPPPPPSVSPAPLPRFAGGI	536

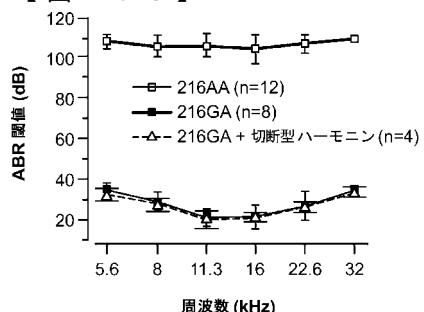
【図 16 A - 2】

Seq\_1 537 HLHTTDDIDPDMYYPKTPSAIPVNFMPSPVNSPSKVKAPVPISSCHVSSSPWV 596  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 597 QRTPEPIP+PPPSIPTQDITPTEIPSALDEALGNHPERGCDGCDPADDKENTHCKP 656  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 657 SSSPPTIERSPPAKPTFCFCSPQPPGPGVSTISKFVNQPHNFPVRAVKSEVLIQEML 716  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 717 KRMVYVOTATPDRFVYEGDPYKNSPDLAGKVRLLRKKESSIDLAEGGYDSPV 776  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 777 GKVYVSSAVYEGGAERHGKVYKGDELMIAKGIVVYTLAEEAKQAMNGGGDIDLV 836  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 837 VAVCFKEYDELSSIPSSAKSPQIARKQLEAYEVCRHGFQLOEPTNLILKSERNQ 896  
 Seq\_2 121  
 Seq\_1 897 TDPSSMSPASSAASP 910  
 Seq\_2 120

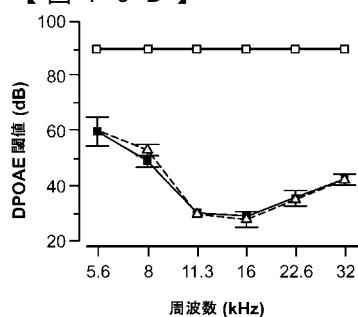
【図 16 B】



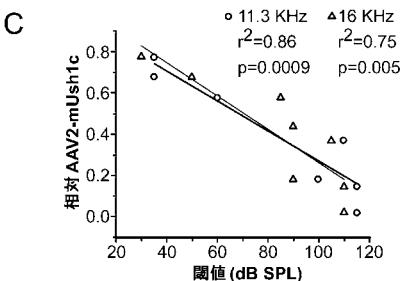
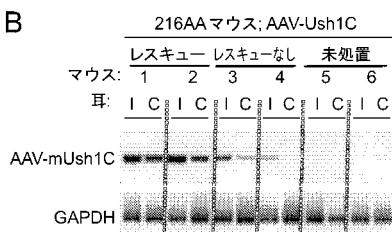
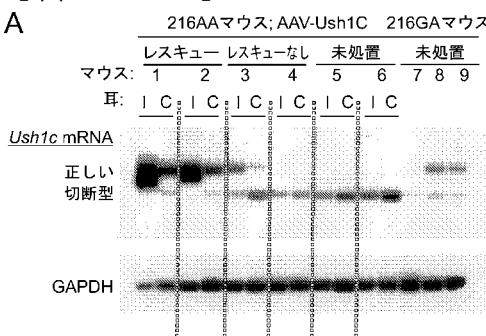
【図 16 C】



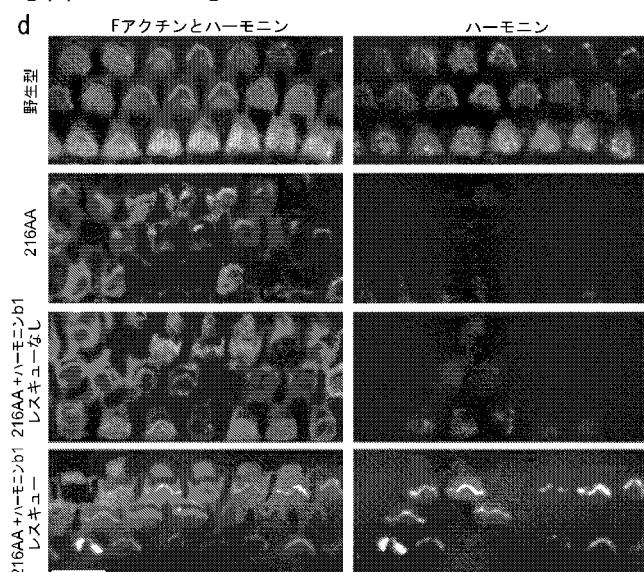
【図 16 D】



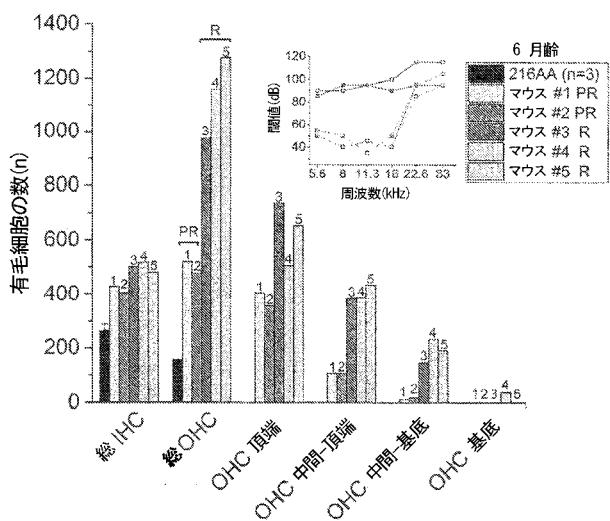
【図 17 - 1】



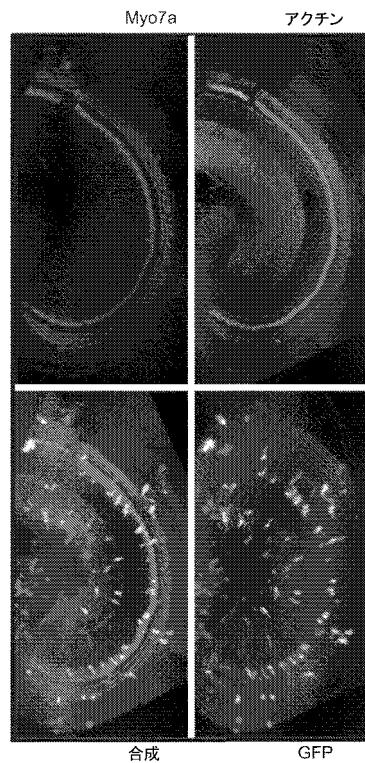
【図 17 - 2】



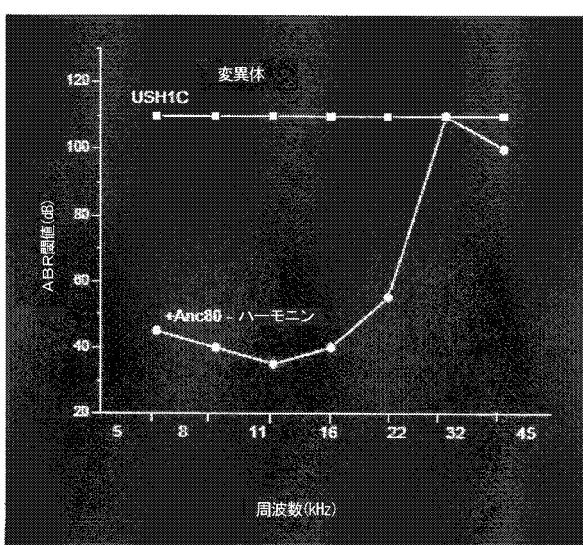
【図18】



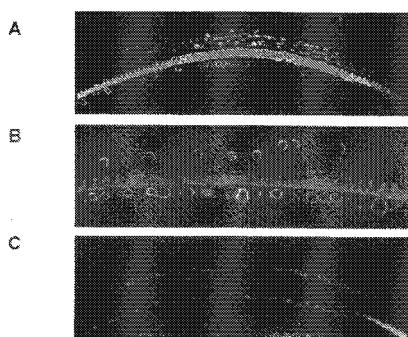
【図19】



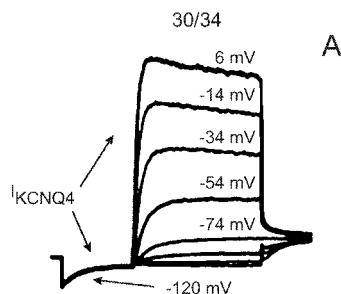
【図20】



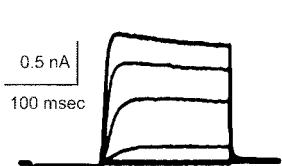
【図21】



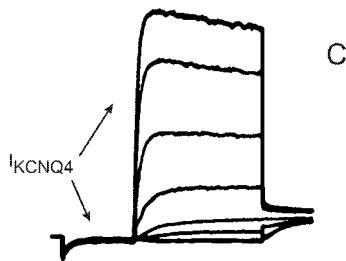
【図22】



A

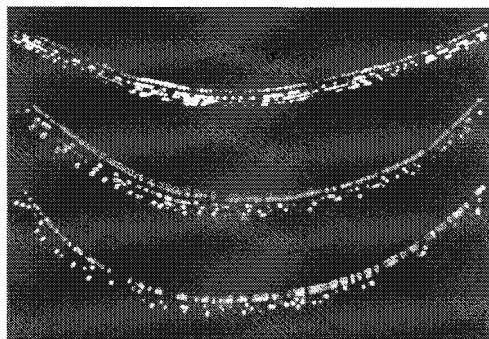


B

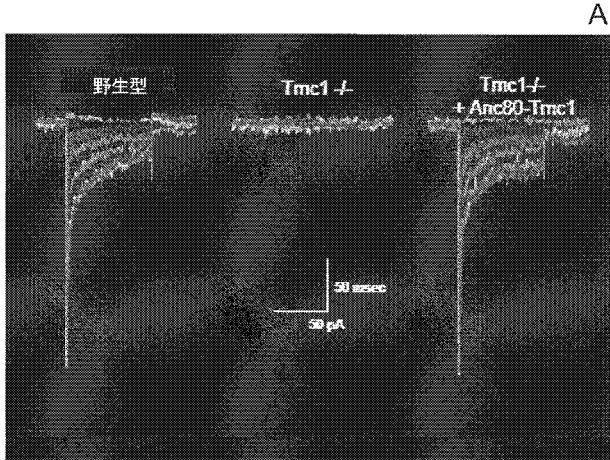


C

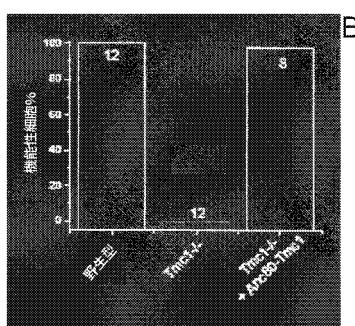
【図23】



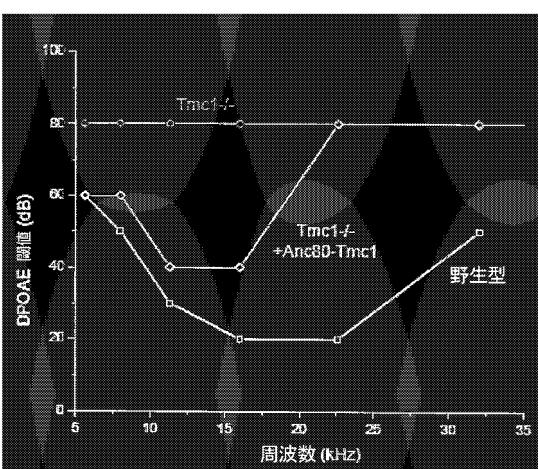
【図24】



A



【図25】



B

【図 2 6】

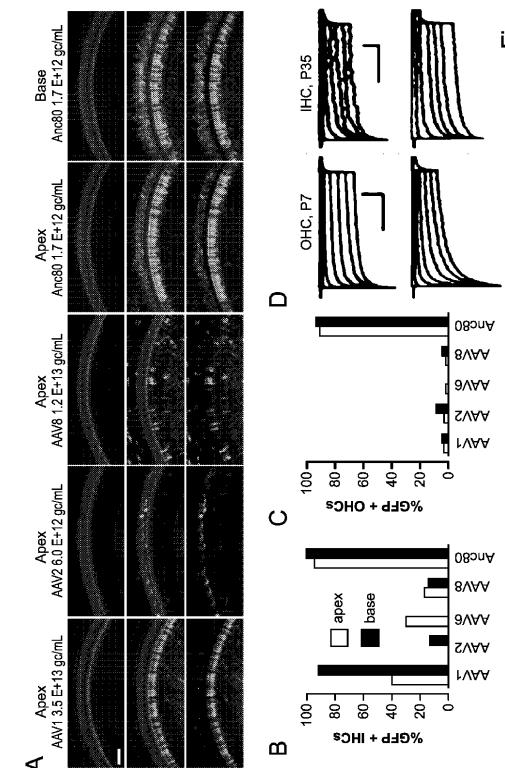
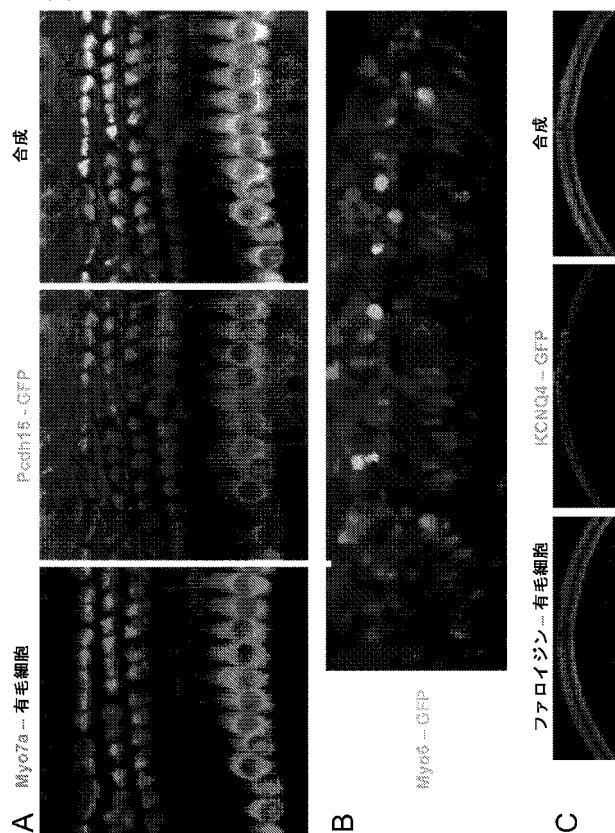


Fig. 1

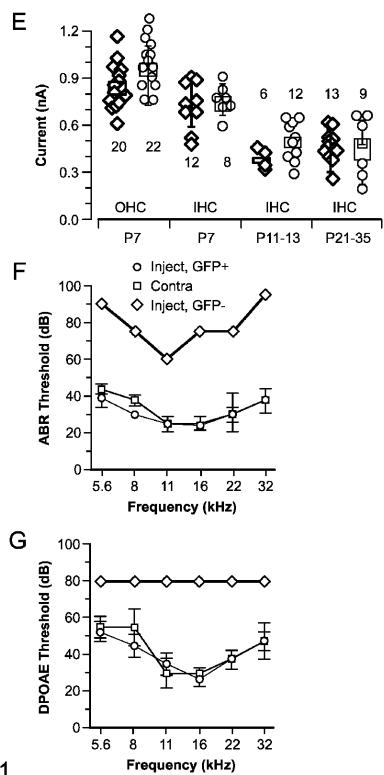


Fig. 1

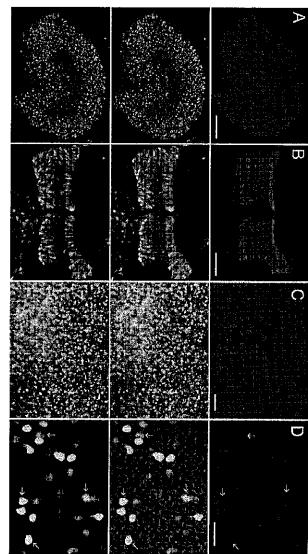


Fig. 2

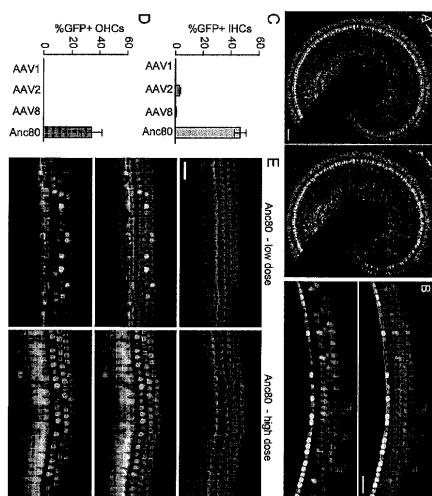


Fig. 3

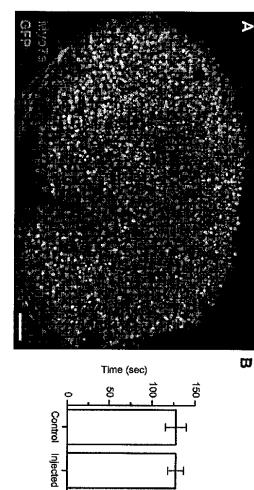


Fig. 4

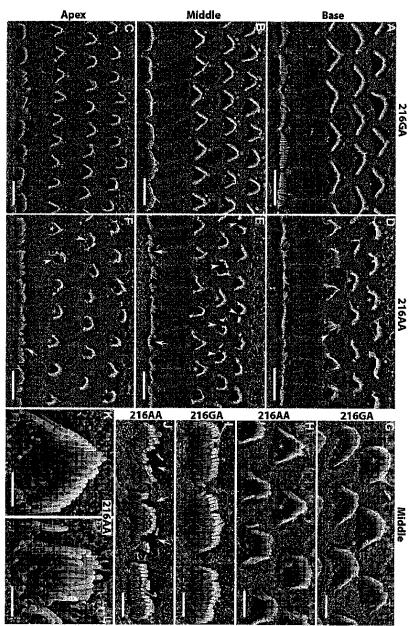


Fig. 5

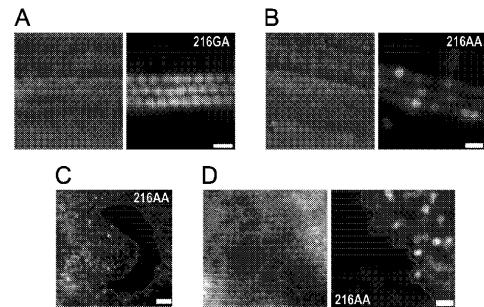


Fig. 6

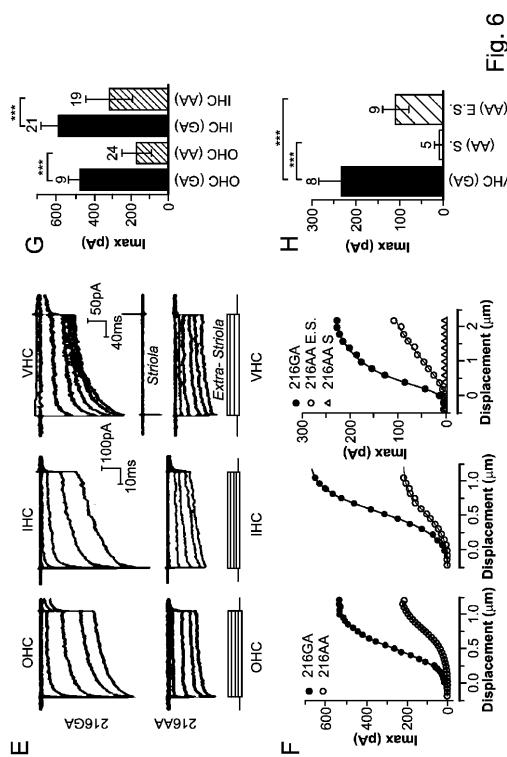


Fig. 7

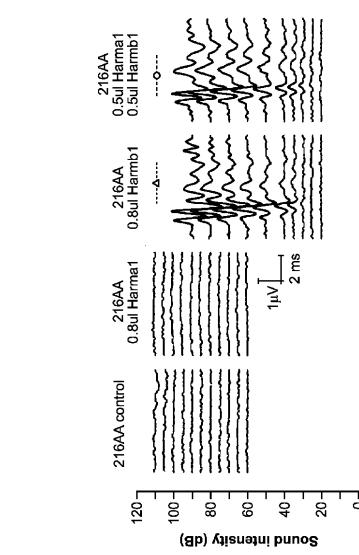
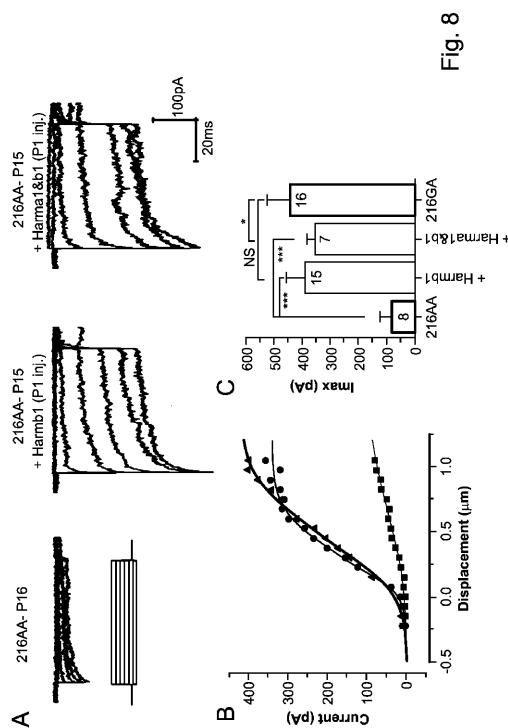
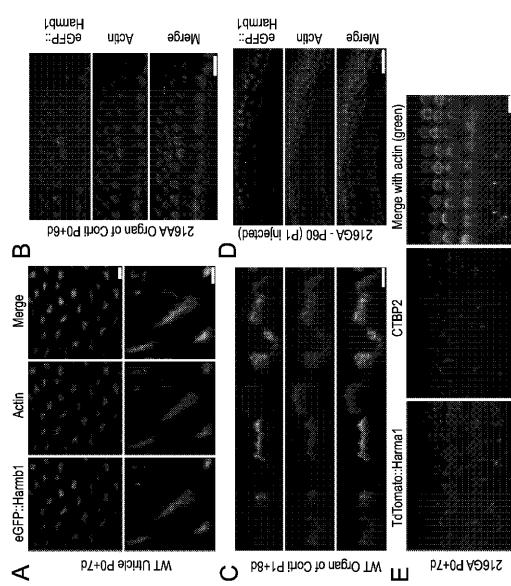


Fig. 9

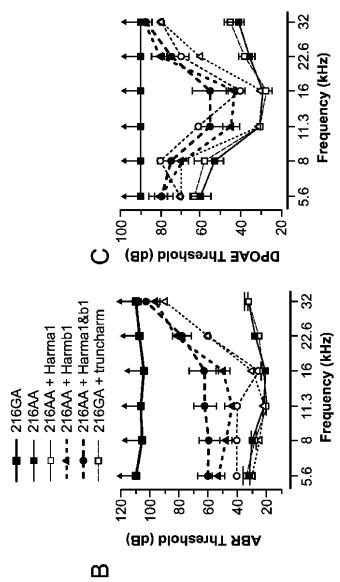


Fig. 9

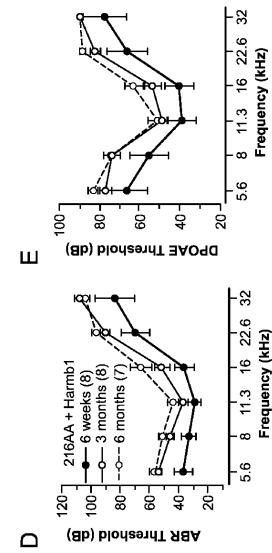


Fig. 10

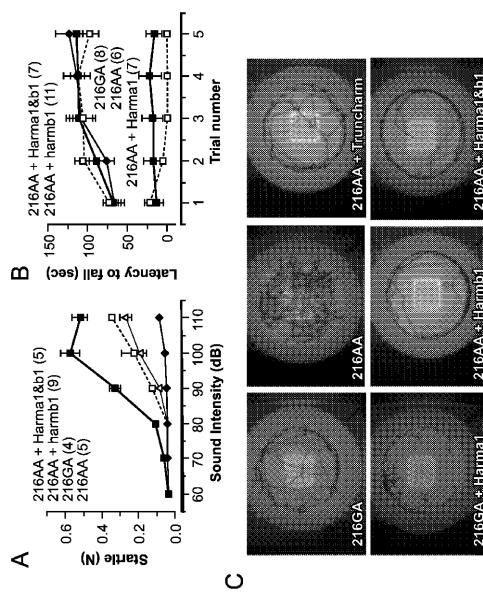
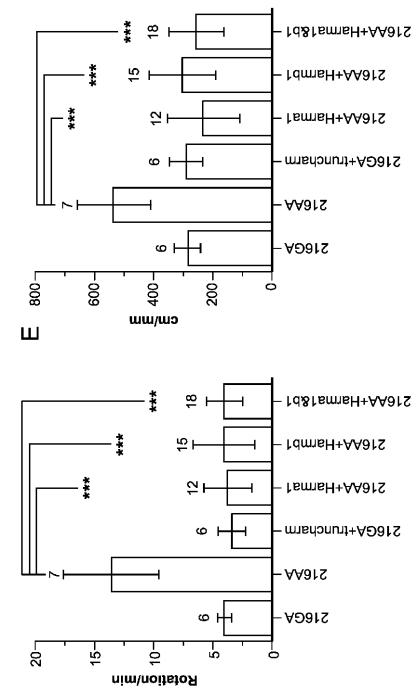
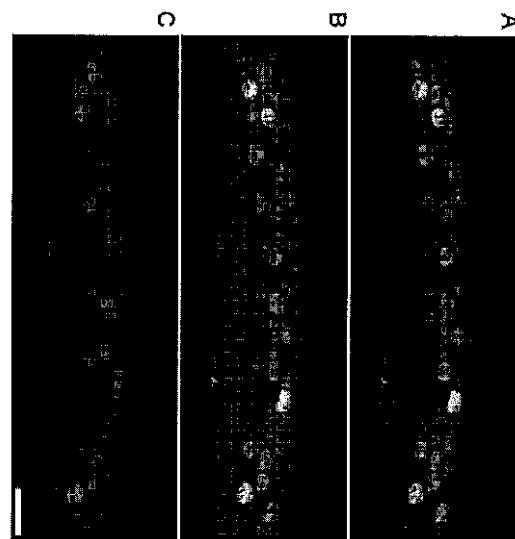
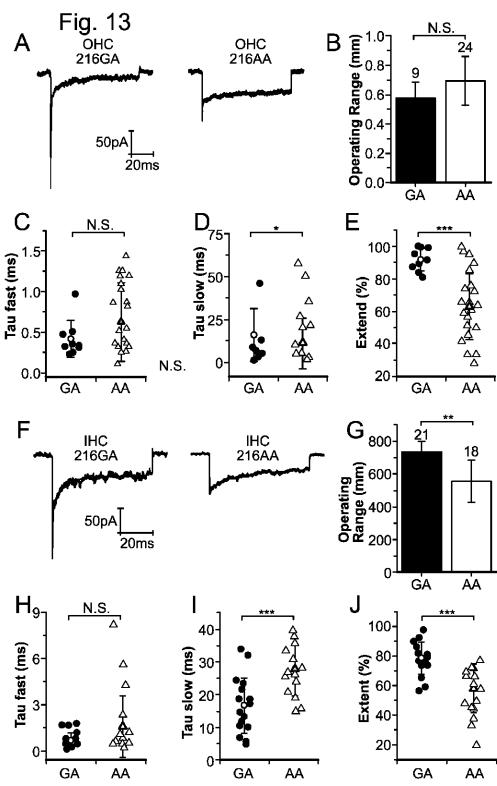
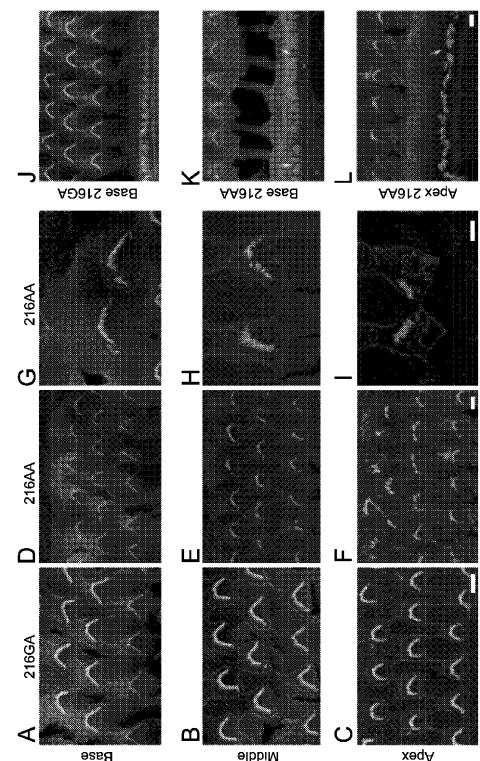
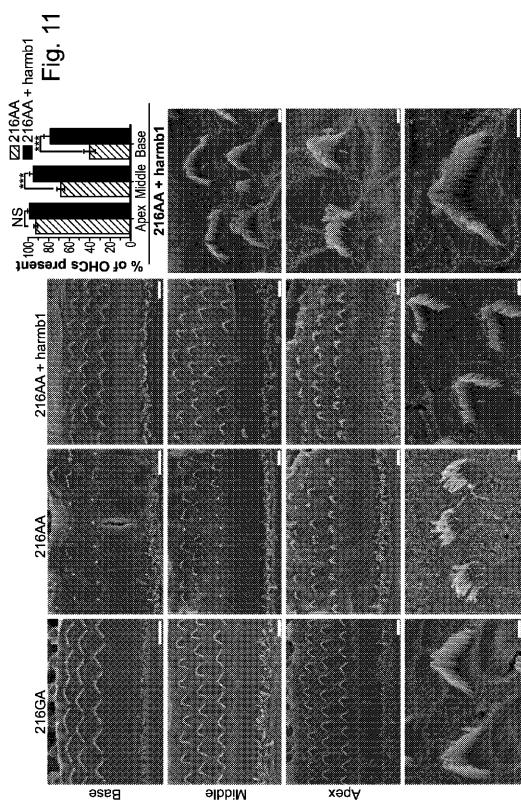


Fig. 10





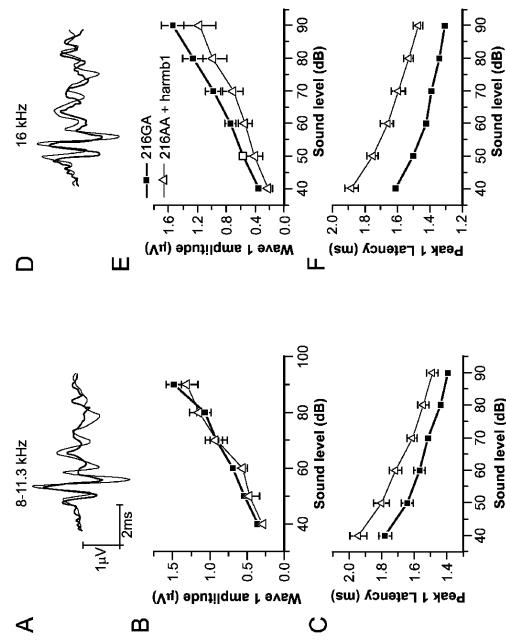


Fig. 15

Seq_1	537	HLHTDLDIPLDMEYYPKPTPSALPWNMPMSVNSPKVPPPPVPPSSGGHVVSSSSPW	596
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	597	QRTPPPIPPPPSPTQIITTRPLSALEALGNHPTCDGHPADDMEANTHSGKP	656
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	657	SSSPPTTSESPFPKPTFCSPQPPPGVSTSKVYMHQENFEVYPRAVSEVLPQEMI	716
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	717	KRMVTVQTAFRQDFKRYEGEPYPSMSEPTQAGDVLLRKKEGSDLAEGYDSPV	776
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	777	GRVVSAYEGGAARHGGVVGDBIMAINGRIVDVTIAEEAALQAFAWNGGMWILIV	836
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	837	VAVCPKETYDDELSSPSSAAASPOLARKOLEAYAVPCRHHGFIGLEPTNLLKRSRNN	896
Seq_2	121	-----	120
Seq_1	897	TDPSPRPARSSAESP	910
Seq_2	121	-----	120

Fig. 16A-2



## Alignment of Sequence 1: (HarmB1 ynt) with Sequence 2: (mTruncated ynt)

卷之三

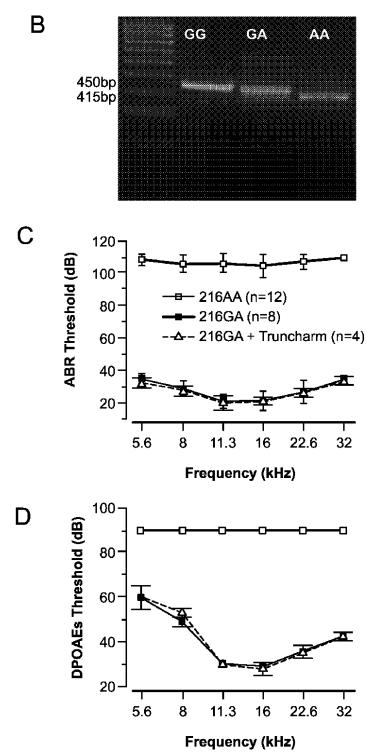


FIG. 16

FIG. 17 A

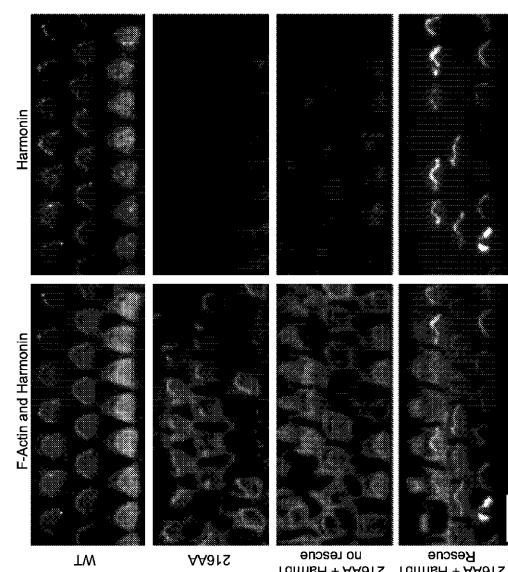
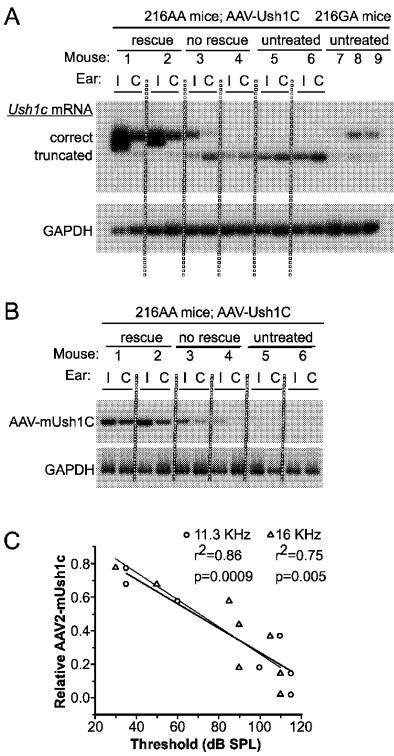


FIG. 18 d

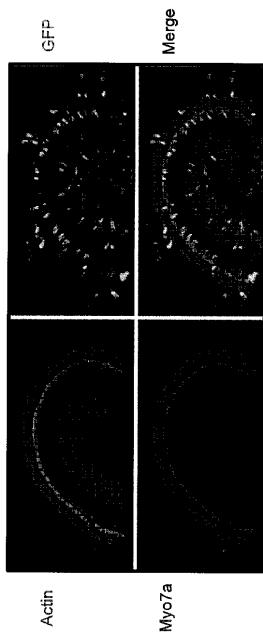


Figure 19

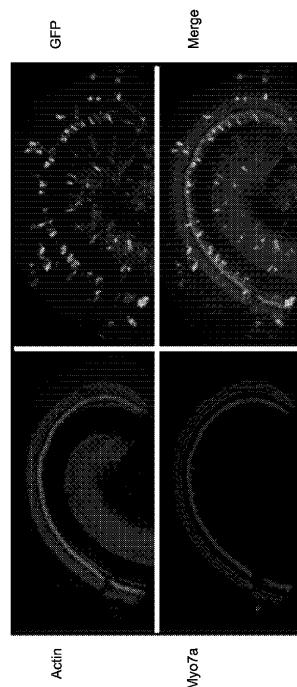


FIG. 20

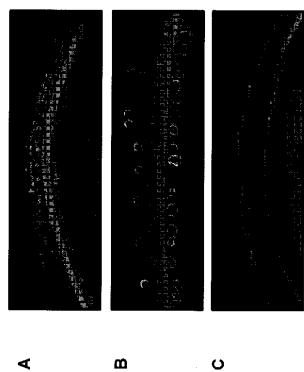


Figure 21

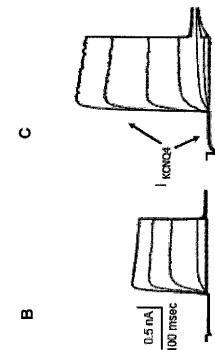


Figure 22

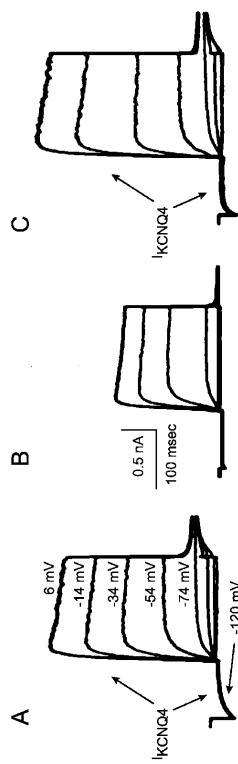


FIG. 23

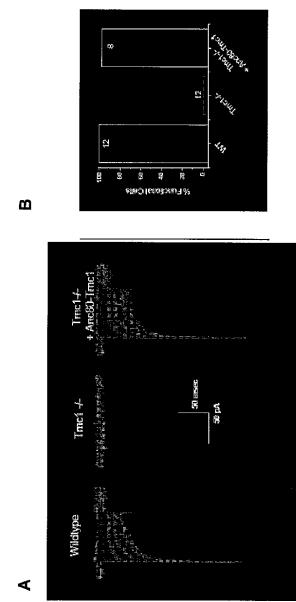


Figure 24

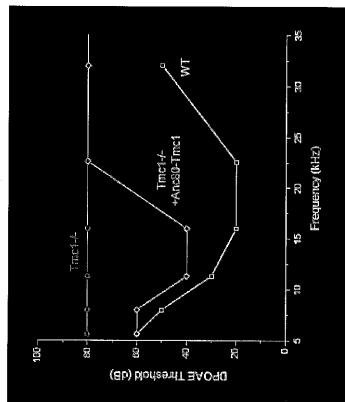


Figure 25

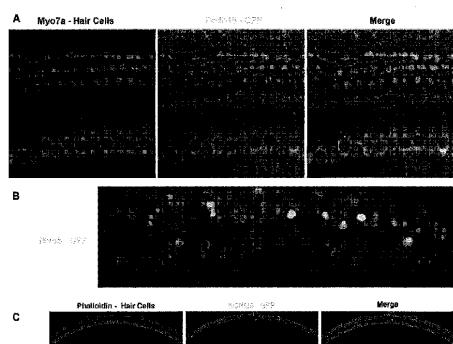


FIGURE 26

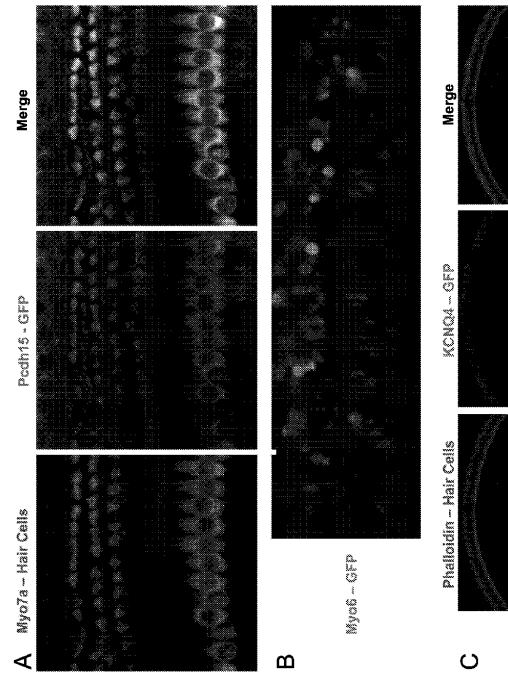


FIG. 27

## 【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) 18 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		
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 <b>Blaine R. Copenheaver</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

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

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	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, T, J, 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, R, O, 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, G, T, 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. TRITON

(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 02115 ボストン シャタック ストリート 55 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 02115 ボストン シャタック ストリート 55 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 02115 ボストン シャタック ストリート 55 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