(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118510905 A
(43)申请公布日 2024.08.16

(21)申请号 202280080524.9
(22)申请日 2022.12.05
(30)优先权数据
2021-198101 2021.12.06 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/044701 2022.12.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/106256 JA 2023.06.15
(71)申请人 学校法人顺天堂
地址 日本
(72)发明人 神谷和作
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹
(51)Int.Cl.
C12N 15/864(2006.01)
A61K 35/768(2015.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 27/16(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/015(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12Q 1/6897(2018.01)
C12Q 1/70(2006.01)

权利要求书3页 说明书18页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

改变型腺伴随病毒载体

(57)摘要

提供改变型腺伴随病毒载体,其为野生腺伴随病毒的衣壳序列的一部分的氨基酸残基被其它氨基酸残基取代的改变型腺伴随病毒载体,其作为对以内耳上皮细胞为代表的上皮细胞的感染指向性优异的改变型AAV载体,其中,将选自序列编号1的AAV1的衣壳序列的(1)129位(Leu)、(2)268位(Ser)、(3)447位(Asn)、(4)470位(Gly)、(5)472位(Ser)、(6)473位(Thr)、(7)502位(Thr)和(8)531位(Glu)的1个以上的氨基酸残基或与其相当的位置的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基。

CN 118510905 A

1.对靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型腺伴随病毒载体,其在衣壳序列的氨基酸序列中导入有选自以下的(1)~(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代:

(1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为其它氨基酸残基、

(2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

(3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的447位的位置存在的天冬酰胺取代为其它氨基酸残基、

(4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为其它氨基酸残基、

(5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

(6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为其它氨基酸残基、

(7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为其它氨基酸残基、和

(8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为其它氨基酸残基。

2.权利要求1中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述氨基酸残基的取代是:

(1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为苯丙氨酸、

(2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为苏氨酸、

(3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的447位的位置存在的天冬酰胺取代为丝氨酸、

(4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为苏氨酸、

(5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为丙氨酸、

(6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为天冬酰胺、

(7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为丙氨酸、或

(8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为亮氨酸。

3.权利要求1或2中所述的改变型腺伴随病毒载体,其具有所述(2)~(7)的氨基酸残基的取代的组合。

4.权利要求3中所述的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号14或序列编号15的氨基酸序列组成的衣壳序列。

5.权利要求3中所述的改变型腺伴随病毒载体,其进一步具有所述(1)或(8)的氨基酸残基的取代。

6.权利要求5中所述的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号16或序列编号17的氨基酸序列组成的衣壳序列。

7.权利要求1或2中所述的改变型腺伴随病毒载体,其具有所述(3)～(7)的氨基酸残基的取代的组合。

8.权利要求7中所述的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号18的氨基酸序列组成的衣壳序列。

9.权利要求1-6的任一项中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述靶细胞是上皮细胞、间质细胞、晶状体细胞或癌细胞。

10.权利要求9中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述上皮细胞是内耳上皮细胞、肠上皮细胞、视网膜细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、神经细胞或子宫细胞。

11.权利要求9或10中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述靶细胞具有间隙连接、或表达成为间隙连接的构成要素的连接蛋白分子。

12.权利要求11中所述的改变型腺伴随病毒载体,其可表达地搭载导致遗传性疾病的基因、与细胞的分化和/或增殖有关的基因、或用于基因组编辑这些基因的基因。

13.权利要求12中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述导致遗传性疾病的基因选自连接蛋白26(GJB2)基因、潘蛋白(SLC26A4)基因、TMC1基因、TMC2基因、电位依赖性钾通道亚家族Q成员4(KCNQ4)基因、钙粘蛋白23(CHD23)基因、原钙粘蛋白15(PCDH15)基因和耳畸蛋白(OTOF)基因。

14.权利要求12中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,所述与细胞的分化和/或增殖有关的基因选自蛋白无调同源物1(Atoh1)基因、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1B(CDKN1B)基因和碱性螺旋环螺旋型转录因子(Hes1)基因。

15.权利要求13中所述的改变型腺伴随病毒载体,其中,在GJB2基因的上游,包含序列编号11～13的任一碱基序列而成的启动子任选地与序列编号19的增强子共同以可控制GJB2基因的表达的方式整合。

16.药物,其包含权利要求1-15的任一项中所述的改变型腺伴随病毒载体。

17.权利要求16中所述的药物,其用于在遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗、或基因组编辑中应用。

18.权利要求1-15的任一项中所述的改变型腺伴随病毒载体在制备用于遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗、或基因组编辑的药物中的应用。

19.遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗方法,其包括向具有遗传性疾病、组织损伤和/或癌的对象施用权利要求1-15的任一项中所述的改变型腺伴随病毒载体的治疗有效量的步骤。

20.基因组编辑方法,其包括向对象施用权利要求1-15的任一项中所述的改变型腺伴随病毒载体的有效量的步骤。

21.对靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型腺伴随病毒载体的制备方法,其包括在衣壳序列的氨基酸序列中导入选自下述的(1)～(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代的工序:

(1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为其它氨基酸残基、

(2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

(3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的447位的位置存在的天冬酰胺取代为其它氨基酸残基、

(4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为其它氨基酸残基、

(5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

(6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为其它氨基酸残基、

(7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为其它氨基酸残基、和

(8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为其它氨基酸残基。

22.权利要求21中所述的制备方法,其包括:

在基准腺伴随病毒载体的衣壳序列的氨基酸序列中导入选自所述(1)~(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代而制备候选腺伴随病毒载体的工序;

测定所述候选腺伴随病毒载体的所述靶细胞的感染量的工序;和

选择所述靶细胞的感染量比所述基准腺伴随病毒载体增加的候选腺伴随病毒载体的工序。

23.权利要求21中所述的制备方法,其中,所述基准腺伴随病毒载体是AAV1~AAV10,优选AAV1、AAV6、AAV7、AAV8,更优选AAV1或AAV6,特别优选AAV1。

改变型腺伴随病毒载体

技术领域

[0001] 本发明涉及改变型腺伴随病毒载体。

背景技术

[0002] 作为基因治疗载体应用的腺伴随病毒(AAV)存在各种血清型(AAV1-10等)。AAV根据血清型的种类感染指向性大大不同,需要根据作为对象的基因治疗、基因组编辑治疗的靶细胞选择最适的载体。但是,现存的AAV载体不一定显示出对靶细胞的最适感染指向性。由于AAV的感染指向性根据衣壳区的氨基酸序列变化,因此通过改变该序列,保有最适感染指向性的载体的开发成为可能。根据该观点,研究了针对各种疾病的基因治疗用和基因组编辑治疗用的改变型腺伴随病毒载体。

[0003] 迄今为止,作为对内耳的基因治疗的候选,应用AAV1、AAV2等野生血清型,但最近也开发了AAV-ANC80L65(专利文献1)等衣壳改变型载体。它们可向内耳导入基因,但感染指向性不同。例如AAV1保有对耳蜗外沟细胞(外螺旋沟细胞)的感染能力,但对其它上皮细胞的感染能力弱。AAV2对耳蜗内毛细胞的感染能力高,但对其它上皮细胞的感染能力弱。提高AAV2对内耳的感染能力的AAV-ANC80L65载体除了AAV2保有的对内毛细胞的感染能力还保有对外毛细胞的一部分的感染能力,但由于对保有间隙连接网络的耳蜗外沟细胞和耳蜗内沟细胞(内螺旋沟细胞)的感染能力低,难以适用于对遗传性耳聋中最多的GJB2突变型耳聋(以间隙连接的形成不全为特征)的基因治疗。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:国际公开第2007/019994号

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Journal of Virology,2016,90(11):5219-5230发明概述

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 如前所述,尚未开发出对以内耳细胞为代表的上皮细胞、间质细胞、神经细胞、视网膜细胞、晶状体细胞、癌细胞、皮肤细胞、以及表达间隙连接或构成要素的连接蛋白分子的细胞的感染指向性优异的改变型AAV载体。

[0011] 因此,本发明的问题是提供对以内耳细胞为代表的上皮细胞、间质细胞、神经细胞、视网膜细胞、晶状体细胞、癌细胞、皮肤细胞、以及表达间隙连接或连接蛋白分子的细胞的感染指向性优异的改变型AAV载体。

[0012] 用于解决问题的手段

[0013] 因此,本发明人首先关于AAV的血清型对内耳上皮细胞的感染指向性进行了研究,结果发现AAV1、AAV6、AAV7、AAV8对内耳上皮细胞,特别是对形成内耳间隙连接的支持细胞的感染指向性高。因此,对这些野生型AAV1、AAV6、AAV7、AAV8等进行了氨基酸序列的一部分的改变,结果发现如果将特定的位置的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基,则成为具有与专利文献1记载的AAV-ANC80L65载体或其它野生型AAV不同的感染指向性、对以内耳上皮细

胞为代表的上皮细胞的感染指向性高的载体,从而完成了本发明。

[0014] 即,本发明提供下述的发明[1]~[17]。

[0015] [1]腺伴随病毒的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型腺伴随病毒载体,其中,将在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中选自(1)129位(Leu)、(2)268位(Ser)、(3)447位(Asn)、(4)470位(Gly)、(5)472位(Ser)、(6)473位(Val)、(7)502位(Thr)和(8)531位(Glu)的1个以上的氨基酸残基或与其相当的位置的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基。

[0016] [2][1]记载的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述氨基酸残基的取代是选自Leu129Phe、Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn、Thr502Ala和Glu531Lys的1个以上。

[0017] [3][1]或[2]记载的改变型腺伴随病毒载体,其为提高了对上皮细胞的靶细胞的感染指向性的载体。

[0018] [4][3]记载的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述上皮细胞是选自内耳上皮细胞、肠上皮细胞、视网膜细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、神经细胞、心肌细胞、和连接蛋白(Connexin)表达相关癌细胞的上皮细胞。

[0019] [5][3]或[4]记载的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述上皮细胞是内耳上皮细胞。

[0020] [6][1]~[5]的任一中记载的改变型腺伴随病毒载体,其进一步整合了选自GJB2基因、SLC26A4基因、TMC1基因、TMC2基因和Atoh1基因的可适用于对遗传性疾病、组织损伤、癌的基因治疗或基因组编辑治疗的基因。

[0021] [7]用于靶细胞中的遗传性疾病、组织损伤、癌的治疗的基因治疗药或基因组编辑治疗药,其含有[6]记载的改变型腺伴随病毒载体。

[0022] [8][6]记载的改变型腺伴随病毒载体在制备用于靶细胞中的遗传性疾病、组织损伤、癌的治疗的基因治疗药或基因组编辑治疗药中的应用。

[0023] [9][6]记载的改变型腺伴随病毒载体,其用于在靶细胞中的遗传性疾病、组织损伤或癌的治疗中应用。

[0024] [10]靶细胞中的遗传性疾病、组织损伤或癌的治疗方法,其特征在于,施用[6]记载的改变型腺伴随病毒载体。

[0025] [11]改善对靶细胞的感染指向性的改变型腺伴随病毒载体的制备方法,其包括在衣壳序列的氨基酸序列中,将选自以下的(a)的任一以上的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的工序:

[0026] (a)在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中,相当于下列的位置的氨基酸残基:

[0027] (1)129位(Leu)、

[0028] (2)268位(Ser)、

[0029] (3)447位(Asn)、

[0030] (4)470位(Gly)、

[0031] (5)472位(Ser)、

[0032] (6)473位(Val)、

[0033] (7)502位(Thr)和

[0034] (8)531位(Glu)。

[0035] [12][11]记载的制备方法,其包括:

[0036] 在基准腺伴随病毒载体的衣壳序列的氨基酸序列中,将选自以下的(a)的任一以上的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基而制备候选改变腺伴随病毒载体的工序、

[0037] (a)在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中,相当于下列的位置的氨基酸残基:

[0038] (1)129位(Leu)、

[0039] (2)268位(Ser)、

[0040] (3)447位(Asn)、

[0041] (4)470位(Gly)、

[0042] (5)472位(Ser)、

[0043] (6)473位(Val)、

[0044] (7)502位(Thr)和

[0045] (8)531位(Glu);

[0046] 对于前述候选改变腺伴随病毒载体对前述靶细胞的感染量,通过报告基因的阳性细胞或表达蛋白的阳性细胞数而测定/评价感染细胞数或基因导入效率的工序;和

[0047] 选择对前述靶细胞的感染量与导入前述氨基酸取代前的前述基准腺伴随病毒载体相比增加的候选改变腺伴随病毒载体的工序。

[0048] [13][12]记载的制备方法。其中,前述基准腺伴随病毒载体是AAV1、AAV6、AAV7或AAV8。

[0049] [14][12]记载的制备方法,其中,前述氨基酸取代是选自下列的1个以上:

[0050] Leu129Phe、

[0051] Ser268Thr、

[0052] Asn447Ser、

[0053] Gly470Thr、

[0054] Ser472Ala、

[0055] Val473Asn、

[0056] Thr502Ala和

[0057] Glu531Lys。

[0058] [15][12]记载的制备方法,其中,靶细胞是内耳、皮肤、心脏、眼、脑、上消化道、下消化道或肾脏的细胞。

[0059] [16][12]记载的制备方法,其中,靶细胞是选自内耳上皮细胞、肠上皮细胞、气道上皮细胞、视网膜细胞、晶状体细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、神经细胞、心肌细胞、间质系细胞和连接蛋白(Connexin)表达相关癌细胞的细胞。

[0060] [17][12]记载的制备方法,其中,靶细胞是内耳上皮细胞。

[0061] 此外,本发明在另一方面也提供下述的发明[1]~[17]。

[0062] [1]对靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型腺伴随病毒载体,其在衣壳序列的氨基酸序列中导入有选自以下的(1)~(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代:

[0063] (1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0064] (2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0065] (3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的447位的位置存在的天冬酰胺取代为其它氨基酸残基、

[0066] (4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0067] (5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0068] (6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0069] (7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为其它氨基酸残基、和

[0070] (8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为其它氨基酸残基。

[0071] [2][1]中记载的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述氨基酸残基的取代是:

[0072] (1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为苯丙氨酸、

[0073] (2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为苏氨酸、

[0074] (3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的447位的位置存在的天冬酰胺取代为丝氨酸、

[0075] (4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为苏氨酸、

[0076] (5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为丙氨酸、

[0077] (6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为天冬酰胺、

[0078] (7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为丙氨酸、或

[0079] (8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为亮氨酸。

[0080] [3][1]或[2]的改变型腺伴随病毒载体,其具有前述(2)~(7)的氨基酸残基的取代的组合。

[0081] [3-2][3]的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号14或序列编号15的氨基酸序列组成的衣壳序列。

[0082] [4][3]的改变型腺伴随病毒载体,其进一步具有前述(1)或(8)的氨基酸残基的取代。

[0083] [4-2][4]的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号16或序列编号17的氨基酸序列组成的衣壳序列。

[0084] [4-3][1]或[2]的改变型腺伴随病毒载体,其具有前述(3)～(7)的氨基酸残基的取代的组合。

[0085] [4-4][4-3]的改变型腺伴随病毒载体,其具有由序列编号18的氨基酸序列组成的衣壳序列。

[0086] [5][1]-[4]的任一的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述靶细胞是上皮细胞、间质细胞、晶状体细胞或癌细胞。

[0087] [6][5]的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述上皮细胞是内耳上皮细胞、肠上皮细胞、视网膜细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、神经细胞或子宫细胞。

[0088] [7][5]或[6]的改变型腺伴随病毒载体,其中,前述靶细胞具有间隙连接或表达成为间隙连接的构成要素的连接蛋白分子。

[0089] [8][7]的改变型腺伴随病毒载体,其整合了选自连接蛋白26(GJB2)基因、潘蛋白(SLC26A4)基因、TMC1基因、TMC2基因、电位依赖性钾通道亚家族Q成员4(KCNQ4)、钙粘蛋白23(CHD23)基因、原钙粘蛋白15(PCDH15)基因和耳畸蛋白(OTOF)基因的遗传性疾病的原因基因,用于它们的基因组编辑的基因序列,选自蛋白无调同源物1(Atoh1)基因、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1B(CDKN1B)基因和碱性螺旋环螺旋型转录因子(Hes1)基因的用于细胞分化/增殖的基因。

[0090] [9][8]的改变型腺伴随病毒载体,其中,在GJB2基因的上游,包含序列编号11～13的任一碱基序列而成的启动子以可表达GJB2基因的方式整合。

[0091] [9-2][9]的改变型腺伴随病毒载体,其中,在GJB2基因的上游,包含序列编号19的碱基序列而成的增强子以可活化前述启动子的方式整合。

[0092] [10]药物,其包含[1]～[9]的任一的改变型腺伴随病毒载体。

[0093] [11][10]的药物,其在遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗、或基因组编辑中应用。

[0094] [12][1]～[9]的任一的改变型腺伴随病毒载体在制备用于遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗、或基因组编辑的药物中的应用。

[0095] [13]遗传性疾病、组织损伤和/或癌的治疗方法,其包括向具有遗传性疾病、组织损伤和/或癌的对象施用[1]～[9]的任一的改变型腺伴随病毒载体的治疗有效量的步骤。

[0096] [14]基因组编辑方法,其包括向对象施用[1]～[9]的任一的改变型腺伴随病毒载体的有效量的步骤。

[0097] [15]对靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型腺伴随病毒载体的制备方法,其包括在衣壳序列的氨基酸序列中导入选自下述的(1)～(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代的工序:

[0098] (1)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0099] (2)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的268位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0100] (3)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的

447位的位置存在的天冬酰胺取代为其它氨基酸残基、

[0101] (4)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的470位的位置存在的甘氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0102] (5)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的472位的位置存在的丝氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0103] (6)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的473位的位置存在的缬氨酸取代为其它氨基酸残基、

[0104] (7)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的502位的位置存在的苏氨酸取代为其它氨基酸残基、和

[0105] (8)在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,在相当于序列编号1的氨基酸序列的531位的位置存在的谷氨酸取代为其它氨基酸残基。

[0106] [16][15]的制备方法,其包括:

[0107] 在基准腺伴随病毒载体的衣壳序列的氨基酸序列中导入选自前述(1)~(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代而制备候选腺伴随病毒载体的工序;

[0108] 测定前述候选腺伴随病毒载体的前述靶细胞的感染量的工序;和

[0109] 选择前述靶细胞的感染量比前述基准腺伴随病毒载体增加的候选腺伴随病毒载体的工序。

[0110] [17][15]的制备方法,其中,前述基准腺伴随病毒载体是AAV1~AAV10,优选AAV1、AAV6、AAV7、AAV8,更优选AAV1或AAV6,特别优选AAV1。

[0111] 发明效果

[0112] 由于本发明的改变型AAV载体对以内耳上皮细胞为代表的上皮细胞的感染指向性高,因此作为起因于这些上皮细胞的异常的各种疾病的基因治疗药、基因组编辑治疗药、再生医疗用的载体是有用的。特别地,整合了GJB2基因的本发明的改变型AAV载体作为耳聋基因治疗药是有用的。

[0113] 附图简述

[0114] [图1-1]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0115] [图1-2]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0116] [图1-3]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0117] [图1-4]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0118] [图1-5]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0119] [图1-6]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0120] [图1-7]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0121] [图1-8]显示AAV1-10的衣壳序列的比对的图。

[0122] [图2]显示AAV的各种血清型对内耳细胞的感染指向性的图。

[0123] [图3]将AAV的各种血清型对内耳细胞的感染指向性数值化的图。

[0124] [图4]显示GJB2缺失小鼠的内耳上皮中导入用AAV-sia1.8导入GJB2的改变型腺伴随病毒载体的组织的染色像。红色显示导入的GJB2基因引起的连接蛋白26蛋白。绿色显示EGFP的报告蛋白。

[0125] [图5]显示GJB2缺失小鼠的内耳上皮中导入用AAV-sia6.8导入GJB2的改变型腺伴

随病毒载体的组织的染色像。红色显示导入的GJB2基因引起的间隙连接,绿色显示EGFP的报告蛋白。细胞间加入红线的部分是通过基因治疗形成的间隙连接。

[0126] [图6]感染了搭载GJB2基因和EGFP基因的野生型AAV6和AAV-sia6.8的GJB2缺失小鼠的培养耳蜗器官的染色像。红色显示GJB2基因的表达产物的连接蛋白26蛋白。绿色显示EGFP的报告蛋白。

[0127] [图7]显示构成耳蜗器官的细胞的模式图。

[0128] [图8]显示外螺旋沟细胞的区域(OSC)、和包含外毛细胞与Deiters细胞的区域(OHC+DC)中的EGFP阳性面积率。

[0129] [图9]显示在从耳聋患者的iPSC诱导的内耳上皮细胞中,感染搭载野生型GJB2基因的AAV-sia6.8,通过免疫染色检出连接蛋白26(CX26)蛋白和连接蛋白30(CX30)蛋白的表达的结果。

[0130] [图10]显示CX26蛋白相对于CX30蛋白的表达强度比。

[0131] [图11]显示感染了搭载蛋白无调同源物1(Atoh1)基因的AAV-sia6.8的小鼠的培养耳蜗器官。

[0132] [图12]显示通过搭载野生型GJB2基因的AAV-sia6.8治疗的GJB2缺失小鼠的术前、术后1周和2周的ABR的阈值。

[0133] [图13]显示通过搭载野生型GJB2基因的AAV-sia6.8治疗的GJB2缺失小鼠的术前、术后1周和2周的ABR的波形。

[0134] [图14]感染了导入启动子2、搭载GJB2基因与EGFP基因的AAV-sia6.8的GJB2缺失小鼠的培养耳蜗器官的染色像。红色显示导入的GJB2基因引起的间隙连接,绿色显示EGFP的报告蛋白。

[0135] [图15]感染了搭载EGFP基因的AAV-sia6.8及其Thr268Ser变体的小鼠的培养耳蜗器官的染色像。

[0136] [图16]显示外螺旋沟细胞的区域(OSC)、和包含外毛细胞与Deiters细胞的区域(OHC+DC)中的EGFP阳性面积率。

[0137] 用于实施发明的方式

[0138] 野生型AAV作为血清型存在AAV1～AAV10。

[0139] 作为氨基酸残基的取代导入对象的“基准AAV”不特别限定,优选应用AAV1、AAV6、AAV7、AAV8,更优选应用AAV1、AAV6或AAV8,进一步优选应用AAV1或AAV6,更进一步优选应用AAV1。

[0140] 如图2和3所示,通过本发明人的应用各种AAV载体的试验,判明AAV1、AAV6、AAV7和AAV8对内耳细胞、特别是形成间隙连接的支持细胞的感染指向性比其它血清型高。因此,优选为用于AAV1、AAV6、AAV7和AAV8改变的基准AAV。

[0141] 本发明的改变型AAV载体是野生腺伴随病毒的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型腺伴随病毒载体,优选AAV1、AAV6、AAV7或AAV8的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型AAV载体。此外,更优选AAV1、AAV6或AAV8的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型AAV载体,进一步优选AAV1或AAV6的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型AAV载体,更进一步优选AAV1的衣壳序列的一部分的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型

AAV载体。

[0142] 更具体地,优选将在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中选自(1)129位(Leu)、(2)268位(Ser)、(3)447位(Asn)、(4)470位(Gly)、(5)472位(Ser)、(6)473位(Thr)、(7)502位(Thr)和(8)531位(Gln)的1个以上的氨基酸残基或与其相当的位置的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基的改变型腺伴随病毒载体。

[0143] 明确了在上述(1)~(8)中规定的位置存在的氨基酸残基在AAV对靶细胞的感染性指向性的确定中具有重要的作用。因此,通过将在这些位置存在的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基,可以改变AAV对靶细胞的感染性指向性,可以期待得到对目标靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型AAV。

[0144] 因此,本发明提供对靶细胞显示改善的感染性指向性的改变型AAV的制备方法,其包括:

[0145] 在基准AAV的衣壳序列的氨基酸序列中,导入选自上述(1)~(8)的1或2个以上的氨基酸残基的取代而制备候选AAV的工序(候选AAV制备工序);

[0146] 测定前述候选AAV的前述靶细胞的感染量的工序(测定工序);和

[0147] 选择前述靶细胞的感染量比前述基准AAV增加的候选AAV的工序(选择工序)。

[0148] 此处,“在与序列编号1的氨基酸序列的比对中,相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置”意味着,在作为氨基酸残基的取代的导入对象的“基准AAV的衣壳序列”中,将该衣壳序列的氨基酸序列与序列编号1的氨基酸序列比对的情形中,对应于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置。如上述“基准AAV”不特别限定,可以是野生型AAV,也可以是血清型AAV1-10的野生型AAV。因此,“基准AAV的衣壳序列”是例如野生型AAV的衣壳序列,可以是血清型AAV1-10的野生型AAV的衣壳序列。

[0149] 比对通过以应比较的2个氨基酸序列的氨基酸残基尽可能多地一致的方式排列两个氨基酸序列而进行。排列时,按需要在比较的2个氨基酸序列的一者或两者中适当插入间隙。这样的氨基酸序列的排列化可以应用例如BLAST、FASTA、CLUSTALW等公知的程序进行。

[0150] 此外,相当于前述特定的位置的氨基酸残基的位置的氨基酸残基是AAV1~AAV10中相当于序列编号1的前述(1)~(8)的位置的氨基酸残基即可,优选AAV6、AAV7、AAV8中相当于序列编号1的前述(1)~(8)的位置的氨基酸残基,更优选AAV6、AAV8中相当于序列编号1的前述(1)~(8)的位置的氨基酸残基。AAV1的衣壳序列示于序列编号1。AAV2-10的衣壳序列示于序列编号2-10。此外,AAV1-10的衣壳序列的比对示于图1-1~图1-8。

[0151] 如图1所示,(1)在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸、(2)在相当于268位的位置存在的丝氨酸、(3)在相当于447位的位置存在的天冬酰胺、(4)在相当于470位的位置存在的甘氨酸、(5)在相当于472位的位置存在的丝氨酸、(6)在相当于473位的位置存在的缬氨酸、(7)在相当于502位的位置存在的苏氨酸、(8)在相当于531位的位置存在的谷氨酸在AAV2的衣壳序列(序列编号2)中,分别是(2-1)129位的亮氨酸、(2-2)在268位存在的天冬酰胺、(2-3)在446位存在的丝氨酸、(2-4)在469位存在的天冬氨酸、(2-5)在471位存在的精氨酸、(2-6)在472位存在的天冬氨酸、(2-7)在501位存在的丝氨酸、(2-8)在530位存在的谷氨酸。

[0152] 此外,在AAV3的衣壳序列(序列编号3)中,分别是(3-1)129位的亮氨酸、(3-2)在268位存在的天冬酰胺、(3-3)在446位存在的天冬酰胺、(3-4)在470位存在的丝氨酸、(3-5)

在472位存在的丝氨酸、(3-6)在473位存在的亮氨酸、(3-7)在502位存在的脯氨酸、(3-8)在531位存在的谷氨酸。

[0153] 在AAV4的衣壳序列(序列编号4)中,分别是(4-1)128位的亮氨酸、(4-2)在257位存在的丝氨酸、(4-3)在450位存在的谷氨酰胺、(4-4)在464位存在的天冬酰胺、(4-5)在466位存在的丝氨酸、(4-6)在467位存在的天冬酰胺、(4-7)在503位存在的赖氨酸、(4-8)在530位存在的天冬氨酸。

[0154] 在AAV5的衣壳序列(序列编号5)中,分别是(5-1)128位的苯丙氨酸、(5-2)在258位存在的丝氨酸、(5-3)在439位存在的缬氨酸、(5-4)相当于AAV1的470位的氨基酸不存在、(5-5)相当于AAV1的472位的氨基酸不存在、(5-6)相当于AAV1的473位的氨基酸不存在、(5-7)在488位存在的丙氨酸、(5-8)在518位存在的丝氨酸。

[0155] 在AAV6的衣壳序列(序列编号6)中,分别是(6-1)129位的苯丙氨酸、(6-2)在268位存在的丝氨酸、(6-3)在447位存在的天冬酰胺、(6-4)在470位存在的甘氨酸、(6-5)在472位存在的丝氨酸、(6-6)在473位存在的缬氨酸、(6-7)在502位存在的苏氨酸、(6-8)在531位存在的赖氨酸。

[0156] 在AAV7的衣壳序列(序列编号7)中,分别是(7-1)129位的亮氨酸、(7-2)在269位存在的苏氨酸、(7-3)在448位存在的丙氨酸、(7-4)在472存在的苏氨酸、(7-5)在474存在的丙氨酸、(7-6)在475存在的谷氨酸、(7-7)在504位存在的丙氨酸、(7-8)在533位存在的谷氨酸。

[0157] 在AAV8的衣壳序列(序列编号8)中,分别是(8-1)129位的亮氨酸、(8-2)在268位存在的丝氨酸、(8-3)在448位存在的缬氨酸、(8-4)在470位存在的丝氨酸、(8-5)在472位存在的丙氨酸、(8-6)在473位存在的天冬酰胺、(8-7)在502位存在的丙氨酸、(8-8)在531位存在的谷氨酸。

[0158] 在AAV9的衣壳序列(序列编号9)中,分别是(9-1)129位的亮氨酸、(9-2)在268位存在的丝氨酸、(9-3)在448位存在的丝氨酸、(9-4)在470位存在的天冬酰胺、(9-5)在472位存在的丙氨酸、(9-6)在473位存在的缬氨酸、(9-7)在502位存在的丙氨酸、(9-8)在531位存在的谷氨酸。

[0159] 在AAV10的衣壳序列(序列编号10)中,分别是(10-1)129位的亮氨酸、(10-2)在269位存在的丝氨酸、(10-3)在449位存在的丝氨酸、(10-4)在472位存在的天冬酰胺、(10-5)在474位存在的丝氨酸、(10-6)在475位存在的丙氨酸、(10-7)在504位存在的丙氨酸、(10-8)在533位存在的谷氨酸。

[0160] 在作为“基准AAV”应用AAV1-10以外的AAV的情形中,也同样地通过进行将该AAV的衣壳序列的氨基酸序列与序列编号1的氨基酸序列的比对,可以确定(1)在相当于序列编号1的氨基酸序列的129位的位置存在的亮氨酸、(2)在相当于268位的位置存在的丝氨酸、(3)在相当于447位的位置存在的天冬酰胺、(4)在相当于470位的位置存在的甘氨酸、(5)在相当于472位的位置存在的丝氨酸、(6)在相当于473位的位置存在的缬氨酸、(7)在相当于502位的位置存在的苏氨酸、(8)在相当于531位的位置存在的谷氨酸。

[0161] 进一步优选的本发明的改变型AAV载体是,序列编号1的前述(1)~(8)的位置或与其相当的位置的氨基酸残基的取代为选自Leu129Phe、Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn、Thr502Ala和Glu531Lys的1个以上的载体。

[0162] 本发明的改变型AAV载体对毛细胞(内毛细胞、外毛细胞)的感染能力高。特别地,具有Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的取代的组合的改变型AAV载体对毛细胞的感染能力高。此外,组合这些取代进一步具有Leu129Phe或Glu531Lys的取代的改变型AAV载体对毛细胞的感染能力也高。进一步,具有Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的取代的组合的改变型AAV载体具有对毛细胞的进一步高的感染能力、和对外螺旋沟细胞的显著高的感染能力。

[0163] 作为前述改变(重组)手段,可以应用通常的基因靶向手段。具体地,可以采用在如Nat Methods 6,343-345(2009)中记载的PCR引物中加入突变的基因靶向手段。

[0164] 改善对本发明的靶细胞的感染指向性的改变型腺伴随病毒载体的制备方法优选包含下列工序的方法:在衣壳序列的氨基酸序列中,将选自以下的(a)的任一以上的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基。

[0165] (a)在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中,相当于下列的位置的氨基酸残基:

[0166] (1)129位(Leu)、

[0167] (2)268位(Ser)、

[0168] (3)447位(Asn)、

[0169] (4)470位(Gly)、

[0170] (5)472位(Ser)、

[0171] (6)473位(Val)、

[0172] (7)502位(Thr)和

[0173] (8)531位(Glu)。

[0174] 更具体地,优选包括下列的制备方法:

[0175] 在基准腺伴随病毒载体的衣壳序列的氨基酸序列中,将选自以下的(a)的任一以上的氨基酸残基取代为其它氨基酸残基而制备候选改变腺伴随病毒载体的工序(候选AAV制备工序)、

[0176] (a)在与序列编号1的AAV1的衣壳序列的氨基酸序列的比对中,相当于下列的位置的氨基酸残基:

[0177] (1)129位(Leu)、

[0178] (2)268位(Ser)、

[0179] (3)447位(Asn)、

[0180] (4)470位(Gly)、

[0181] (5)472位(Ser)、

[0182] (6)473位(Val)、

[0183] (7)502位(Thr)和

[0184] (8)531位(Glu);

[0185] 测定前述候选改变腺伴随病毒载体对前述靶细胞的感染量的工序(测定工序);和

[0186] 选择对前述靶细胞的感染量比导入前述氨基酸取代前的前述基准腺伴随病毒载体增加的候选改变腺伴随病毒载体的工序(选择工序)。

[0187] 作为前述基准腺伴随病毒载体,优选AAV1、AAV6、AAV7或AAV8,更优选AAV1、AAV6或

AAV8。

[0188] 前述氨基酸取代更优选选自Leu129Phe、Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn、Thr502Ala和Glu531Lys的1个以上。

[0189] 测定工序中对靶细胞的感染量的测定可以通过计测表达候选改变AAV中搭载的基因(编码报告蛋白等蛋白的基因)的细胞的数目或该细胞中蛋白的表达强度而进行。

[0190] 前述靶细胞可以是上皮细胞、间质细胞、晶状体细胞、角膜细胞、视网膜细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、胰腺细胞、肝细胞、神经细胞、神经胶质细胞、血液细胞、软骨细胞、骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、或癌细胞。

[0191] 上皮细胞可以是内耳上皮细胞、肠上皮细胞、视网膜细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、口腔粘膜细胞、鼻粘膜细胞、肾小球细胞、膀胱细胞、或子宫细胞。

[0192] 进一步,前述靶细胞特别地可以是具有间隙连接、或表达成为间隙连接的构成要素的连接蛋白分子的细胞。

[0193] 得到的改变型AAV载体对靶细胞、例如前述上皮细胞的感染指向性显著提高。

[0194] 例如,相对于AAV1的衣壳序列具有选自Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的1或2个以上取代的改变型AAV载体与野生型AAV1几乎不感染毛细胞(内毛细胞、外毛细胞)相比,对外毛细胞的特异性高,在内耳上皮细胞群中对外毛细胞的感染能力最高,为80～100%的感染效率。

[0195] 通过任意组合这些氨基酸取代,具有可创建对各种靶细胞具有感染指向性的改变AAV的可能性。

[0196] 作为这样的改变型AAV载体的具体实例,列举具有序列编号15的氨基酸序列的衣壳序列的AAV载体(本公开中称为“AAV-sia1.8”)。

[0197] 此外,为同一改变型AAV载体的进一步的变体的、具有序列编号16的氨基酸序列的衣壳序列的AAV载体(AAV-sia1.8的Glu531Lys变体)和具有序列编号17的氨基酸序列的衣壳序列的AAV载体(AAV-sia1.8的Leu129Phe变体)与AAV1相比对外毛细胞和支持细胞的感染性强,在支持细胞中形成多个面积大的间隙连接复合物。也感染一部分的内毛细胞。

[0198] 此外,相对于AAV6的衣壳序列具有选自Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的1或2个以上取代的改变型AAV载体与对AAV1的衣壳序列进行同样取代的改变型AAV载体同样,保有对外毛细胞的高感染能力。对外毛细胞的特异性、感染指向性比AAV1的改变型弱,但保有比AAV1的改变型更广范围地感染的能力。

[0199] 通过任意组合这些氨基酸取代,具有可创建对各种靶细胞具有感染指向性的改变AAV的可能性。

[0200] 作为这样的改变型AAV载体的具体实例,列举具有序列编号14的氨基酸序列的衣壳序列的AAV载体(AAV-sia6.8)。

[0201] 此外,为同一改变型AAV载体的进一步变体的、具有序列编号18的氨基酸序列的衣壳序列的AAV载体(AAV-sia6.8的Thr268Ser变体)与AAV-sia6.8相比具有对毛细胞的进一步高的感染能力、和对外螺旋沟细胞的显著高的感染能力。

[0202] 本发明的改变型AAV载体对各种上皮细胞、特别是形成间隙连接的的上皮细胞的感染指向性提高。作为具体的上皮细胞,列举选自内耳上皮细胞、肠上皮细胞、视网膜细胞、皮肤细胞、肾细胞、气道上皮细胞、神经细胞、心肌细胞、和连接蛋白(Connexin)表达相关癌

细胞的上皮细胞。

[0203] 因此,本发明的改变型AAV载体在对这些上皮细胞中疾病的基因治疗、基因组编辑治疗中是有用的。

[0204] 由于本发明的改变型AAV载体对前述靶细胞的感染指向性提高,因此优选在改变型AAV载体中整合可适用于靶细胞中的遗传性疾病、组织损伤、癌的基因治疗、基因组编辑治疗的基因。作为这样的基因,例如,列举GJB2基因、SLC26A4基因、TMC1基因、TMC2基因、KCNQ4基因、CHD23基因、原钙粘蛋白15(PCDH15)基因、耳畸蛋白(OTOF)基因等遗传性疾病的原因基因;Atoh1基因、CDKN1B基因和Hes1基因等作为转录因子的与细胞的分化、增殖有关的基因等。

[0205] 特别地,作为与遗传性耳聋有关的基因的进一步实例,列举以下。

[0206] ACTG1、ADCY1、ADGRV1、AIFM1、BDP1、BSND、BTD、CABP2、CCDC50、CD164、CDC14A、CDH23、CEACAM16、CIB2、CLDN14、CLIC5、CLRN1、COCH、COL11A1、COL11A2、COL2A1、COL4A3、COL4A4、COL4A5、COL4A6、COL9A1、COL9A2、COL9A3、DCDC2、DIAPH1、DMXL2、DSPP、EDN3、EDNRB、ELMOD3、EPS8、EPS8L2、ESPN、ESRRB、EYA1、EYA4、FAM189A2、GIPC3、GJB3、GJB6、GPSM2、GRHL2、GRXCR1、GRXCR2、GSDME、HARS1、HGF、HOMER2、ILDR1、KARS1、KCNE1、KCNQ1、LHFPL5、LOXHD1、LRTOMT、MARVELD2、MCM2、MET、MIR96、MITF、MSRB3、MT-CO1、MT-RNR1、MT-TS1、MYH14、MYH9、MYO15A、MYO1A、MYO3A、MYO6、MYO7A、MYO7A、NARS2、NF2、OSBPL2、OTOA、OTOG、OTOGL、P2RX2、PAX3、PEX7、PHYH、PJVK、PNPT1、POU3F4、POU4F3、PRPS1、PTPRQ、RDX、RIPOR2、ROR1、S1PR2、SERPINB6、SIX1、SIX5、SLC17A8、SLC22A4、SLC26A5、SMPX、SOX10、STRC、SYNE4、TBC1D24、TECTA、TIMM8A、TJP2、TMEM132E、TMIE、TMPRSS3、TPRN、TRIO、TSPEAR、USH1C、USH1G、USH2A、WBP2、WFS1、和WHRN。

[0207] 本发明的改变型AAV载体可整合用于上述的基因的表达的启动子。启动子可以应用CMV、CAG等已知启动子,用于内耳支持细胞等GJB2表达细胞中的基因的启动子特别可优选应用包含序列编号11～13的任一碱基序列而成的启动子。启动子可以将1个多次连续重复排列(单一启动子的串联),可以组合2个以上将任一或所有启动子连续或不连续多次重复排列(多个启动子的串联)。

[0208] 此外,本发明的改变型AAV载体可整合用于增强启动子的活性的增强子。增强子可以应用已知的增强子,作为与包含序列编号11～13的碱基序列而成的启动子适当组合的增强子,例如,列举包含序列编号19的碱基序列而成的增强子(“Characterization of GJB2cis regulatory elements in the DFNB1locus”,Human Genetics(2019)138:1275-1286)。增强子可以将1个多次连续重复排列(单一增强子的串联),可以组合2个以上将任一或所有增强子连续或不连续多次重复排列(多个增强子的串联)。

[0209] 作为应用本发明的改变型AAV载体的基因治疗的优选具体实例,列举对遗传性耳聋中最多的GJB2突变型耳聋的基因治疗。即,遗传性耳聋中最多的是GJB突变型耳聋,占先天性耳聋的全部病例的约45%。可以制备在本发明的改变型AAV载体中整合正常GJB基因的耳聋基因治疗药。该基因治疗药通过从内耳镫骨底板向内耳淋巴液局部施用、向静脉施用等施用而施用,通过使靶标基因对靶细胞高效表达,将异常的基因功能正常化。

[0210] 施用可为静脉内、脑室内、耳蜗内、髓腔内、肌肉内、皮下、或它们的组合。特别地,施用可以是向耳蜗或前庭系的施用,其递送可以经由正圆窗膜(RWM)、卵圆窗、或半规管注

射到耳蜗或前庭系统。

[0211] 本发明的基因治疗药、基因组编辑治疗药可以通过将前述改变型AAV载体与本技术领域中公知的药学可容许的载体共同混合、溶解、乳化、封入胶囊、冷冻干燥等而制剂化。

[0212] 用于经口施用的合适制剂是将本发明的改变型AAV载体有效量溶解于如水、生理盐水的稀释剂的液剂,作为固体或颗粒含有有效量的胶囊剂、颗粒剂、散剂或锭剂,将有效量悬浮于适当的分散介质中的悬浮液剂,将溶解有效量的溶液分散于适当的分散介质中使其乳化的乳剂等。

[0213] 用于非经口施用中,可以将本发明的改变型AAV载体与药学可容许的溶剂、赋形剂、粘合剂、稳定剂、分散剂等共同制剂化为注射用溶液、悬浮液、乳剂、乳膏剂、软膏剂、吸入剂、栓剂等剂型。在注射用的处方中,可以将本发明的改变型AAV载体溶解于水性溶液、优选汉克斯溶液、林格溶液、或生理盐水缓冲液等生理学适合性缓冲液中。进一步,本发明的药物可以在油性或水性载体中采取悬浮液、溶液、或乳浊液等形式。或者,可以以粉体的形式制备本发明的改变型AAV载体,使用前应用灭菌水等配制水溶液或悬浮液。在用于通过吸入施用中,可以将本发明的改变型AAV载体粉末化,与乳糖或淀粉等适当的基剂一起制成粉末混合物。栓剂处方可以通过将本发明改变型AAV载体与可可脂等常用栓剂基剂混合而制备。进一步,本发明的治疗剂可以封入聚合物基质等,作为持续释放用制剂处方。

[0214] 本发明的改变型AAV载体的施用量根据患者的症状、施用途径、体重、年龄等不同,例如,优选成人每1日0.5μg～100mg。

实施例

[0215] 随后列举实施例进一步详细说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0216] 实施例1:基准AAV的感染指向性的评价(培养内耳上皮组织)

[0217] 应用各种血清型的AAV载体(GeneCapoeia公司、AAVPrime™ Adeno-associated virus(AAV)Serotype Testing Kit Plus,目录号AA321),通过羊土社实验医学附册决定版、根据病毒载体的基因导入实验指南、应用AAV载体向内耳的基因治疗、Page159-166(2020.11)中记载的方法,关于对内耳上皮细胞的感染指向性进行研究。

[0218] 在AAV载体中,将编码连接蛋白26的GJB2基因在包含序列编号11-13的任一碱基序列而成的启动子(分别称为启动子1、启动子2、启动子3)的控制下整合。

[0219] 从出生后4日龄的小鼠(C57BL/6J系)摘出内耳,在8孔室载玻片(Matsunami,目录号SCS-N38)上在DMEM培养基中培养包含感觉上皮的组织过夜。次日添加各血清型AAV(AAV1-10、5×10^{8}-5×10^{9}GC)。培养4-6日,用4%低聚甲醛固定后通过抗连接蛋白26抗体(Thermofisher Scientific.目录号51-2800)进行免疫荧光染色,与作为AAV的报告基因的EGFP的绿色荧光共同用荧光显微镜观察,计测EGFP阳性细胞和通过连接蛋白26形成间隙连接的细胞。

[0220] 其结果,如图2和图3所示,判明AAV1、AAV6、AAV7和AAV8对内耳细胞、特别是形成间隙连接的支持细胞的感染指向性比其它血清型高。

[0221] 此外,启动子1(从人GJB2基因的转录起始点上游的1065bp的基因序列)、启动子2(从人GJB2基因的转录起始点上游的760bp的基因序列)和启动子3(从人GJB2基因的转录起始点上游的260bp的基因序列)适于内耳支持细胞和内耳纤维细胞中的各种蛋白表达。基于

连接蛋白26的表达强度评价启动子活性时,以活性高至低的顺序为启动子1、启动子2、启动子3。

[0222] 实施例2:通过对基准AAV导入氨基酸取代制备改变型AAV和评价感染指向性(培养内耳上皮组织)

[0223] 在Nat Methods 6,343-345(2009)中记载的PCR引物中加入突变,应用基因靶向手段,制备在衣壳序列的氨基酸序列中导入各种氨基酸取代的载体。另外,在改变载体中也导入GJB2基因和报告基因(EGFP基因)。

[0224] 得到的改变载体的转导效率、感染指向性的变化示于表1。

[0225] 其结果知晓,相对于AAV1的衣壳序列具有Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的取代的改变型AAV载体(AAV-sia1.8:序列编号15)与AAV1几乎不感染毛细胞(内毛细胞、外毛细胞)相对,对外毛细胞的特异性高,在内耳上皮细胞群中对外毛细胞的感染能力最高,为80~100%的感染效率。

[0226] 此外,在相对于AAV6的衣壳序列具有Ser268Thr、Asn447Ser、Gly470Thr、Ser472Ala、Val473Asn和Thr502Ala的取代的改变型AAV载体(AAV-sia6.8:序列编号14)中,与前述AAV-sia1.8同样地保有对外毛细胞高的感染能力。知晓对外毛细胞的特异性、感染指向性比AAV-sia1.8弱,但保有在比前述AAV-sia1.8更广范围的内耳上皮细胞群中感染的能力。

[0227] [表1]

[0228]

改变 AAV	基准 AAV	取代	导入效率	感染指向性的变化
AAV-Sia1.8	AAV1	Ser268Thr, Asn447Ser, Gly470Thr, Ser472Ala, Val473Asn, Thr502Ala	·	OSC 至 OHC
AAV-Sia.6.8	AAV6	Ser268Thr, Asn447Ser, Gly470Thr, Ser472Ala, Val473Asn, Thr502Ala	↑↑	OSC 至 OHC/IHC/OSC

[0229] “↑↑”:50%以上增加

[0230] “↑”:不足1-50%增加

[0231] “↓”:不足1-50%减少

[0232] “↓↓”:50%以上增加

[0233] “OSC”:外螺旋沟细胞(Outer Sulcus Cell)

[0234] “OHC”:外毛细胞(Outer Hair Cell)

[0235] “IHC”:内毛细胞((Inner Hair Cell)

[0236] 实施例3:对改变型AAV的进一步氨基酸取代的导入和感染指向性的评价

[0237] 与实施例2同样,制备AAV-sia1.8的Glu531Lys变体、和AAV-sia1.8的Leu129Phe变体。

[0238] AAV-sia1.8的Glu531Lys变体(序列编号16)与AAV1相比对外毛细胞和支持细胞的感染性强,在支持细胞中形成多个面积大的间隙连接复合物。也感染一部分的内毛细胞。

[0239] 此外,AAV-sia1.8的Leu129Phe变体(序列编号17)也同样与AAV1相比对外毛细胞和支持细胞的感染性强,在支持细胞中形成多个面积大的间隙连接复合物。也感染一部分的内毛细胞。

[0240] 实施例4:对耳聋模型动物来源的培养内耳上皮组织的基因导入

[0241] 在耳聋模型动物(GJB2缺失小鼠)的内耳上皮中用AAV sia1.8导入GJB2(GJB2和EGFP已导入)的染色像示于图4。红色显示导入的GJB2基因引起的连接蛋白26蛋白。绿色显示EGFP的报告蛋白。外毛细胞中显示感染的EGFP表达特异性强,显示对其它内毛细胞、支持细胞等的感染的EGFP表达和连接蛋白26的表达少。

[0242] 此外,在GJB2缺失小鼠的内耳上皮中用AAV-sia6.8导入GJB2(GJB2和EGFP已导入)的染色像示于图5。红色显示包含导入的GJB2基因引起的连接蛋白26的间隙连接。绿色显示EGFP的报告蛋白。细胞间加入红线的部分是通过基因治疗形成的间隙连接。

[0243] 实施例5:对耳聋模型动物来源的培养耳蜗器官的基因导入

[0244] 应用GJB2缺失小鼠的培养耳蜗器官,进行搭载GJB2基因和EGFP基因的野生型AAV6和AAV-sia6.8的感染实验。

[0245] 在麻醉下实验杀死生后4日的小鼠,从颞骨取出耳蜗。从耳蜗中取出耳蜗轴,从Corti器官剥下血管条。将Corti器官转移到8孔室载玻片,在Dulbecco改良的Eagle培养基(添加高葡萄糖、丙酮酸钠、GlutaMAXTM Supplement、胎牛血清、N2Supplement、青霉素G钾)中培养过夜(5% CO_2气氛、37℃)。其后,将培养基交换为每100μl包含4μl的AAV溶液(2.05×10^{13}GC/mL)的培养基。进一步进行5日培养后,用4%低聚甲醛处理固定Corti器官。

[0246] 结果示于图6。野生型AAV6中,EGFP信号主要在外螺旋沟细胞(OSC)中检出。另一方面,AAV-sia6.8中,在内耳上皮全体(OSC,OHC,IHC,DC,ISC)广范围地检出EGFP信号(也参考图7)。

[0247] 图像分析外螺旋沟细胞的区域(OSC)、和包含外毛细胞与Deiters细胞的区域(OHC+DC)中的EGFP阳性面积率的结果示于图8。AAV-sia6.8与野生型AAV6相比,外螺旋沟细胞的区域(OSC)、和包含外毛细胞与Deiters细胞的区域(OHC+DC)的任一中,阳性面积率都高,显示在内耳上皮细胞的广范围的细胞中可高效率基因导入。

[0248] 实施例6:基因治疗(从耳聋患者来源的iPSC细胞诱导的内耳上皮细胞中间隙连接的修复)

[0249] 从由GJB2基因的异常引起的重度耳聋患者和听力正常者建立的人工多能性干细

胞(iPSC)分化诱导内耳上皮细胞。对内耳上皮细胞,感染搭载野生型GJB2基因的AAV-sia6.8,通过连接蛋白26(CX26)的表达进行间隙连接的修复。

[0250] 听力正常者来源的iPSC株(201B7)从理化学研究所生物资源中心细胞库获得。

[0251] 耳聋患者来源的iPSC株(细胞株名:JUFMDOi005-A)通过本发明人等的学术论文(“Generation of two induced pluripotent stem cell lines from PBMCs of siblings carrying c.235delC mutation in the GJB2gene associated with sensorineural hearing loss”,Stem Cell Research,Volume 47,August 2020,101910)中记载的方法制备。

[0252] 将iPSC悬浮于添加20μm Y27632的Stem Fit培养基,以9000细胞/孔接种于96孔板。温育2日(37℃、5% CO_2)后,将细胞聚集体转移到加入添加2%Matrigel的gfCDM培养基(Ham's F12GlutaMax/IMDM GlutaMax(1:1)(Gibco),1%化学成分确定的脂质浓缩物(Gibco),0.5% BSA(Sigma),15μg/ml转铁蛋白(Sigma),450μM 1-硫代甘油(Sigma))100μl的96孔板,进一步温育。7-11日后,使用钳子将细胞聚集体半分割。将分割的细胞凝集体转移到DFNB培养基(DMEM/F12(1:1)(Gibco),1% N2supplement(Gibco),1% B27supplement(Gibco))中的丝裂霉素C处理的内耳来源饲养细胞(胰蛋白酶抗性内耳细胞:TRIC)上。自在TRIC上转移细胞凝集体20-25日后,内耳上皮细胞被分化诱导。

[0253] TRIC从由10周龄的小鼠采集的耳蜗组织配制。耳蜗组织由Corti器官、基底膜、侧壁组成,主要由支持细胞、毛细胞、耳蜗神经纤维细胞、其它基底膜的细胞构成。将耳蜗组织暴露于胰蛋白酶,通过筛选胰蛋白酶抗性细胞得到TRIC。将这些细胞在增殖培养基(DMEM-GlutaMax(Gibco),10% FBS(Gibco))下维持。

[0254] 通过免疫染色检出连接蛋白26(CX26)和比较对象的连接蛋白30(CX30:GJB6基因产物)的内耳上皮细胞中的表达。此外,图像分析CX30和CX26的表达强度,计算CX26相对于CX30的表达强度比。结果示于图9和图10。在听力正常者(201B7)的内耳上皮细胞中,清楚地观察到CX30和CX26阳性的间隙连接,CX26以相对于CX30为40%左右的强度表达。在耳聋患者(GJB2-235delC)的内耳上皮细胞中,内耳间隙连接不清楚,形成不充分,CX26相对于CX30的表达强度也降低25%左右。在通过AAV-sia6.8导入野生型GJB2基因的耳聋患者的内耳上皮细胞中,CX26相对于CX30的表达强度恢复到50%左右(GJB2-235delC+AAV-GJB2WT),可以确认间隙连接被修复。

[0255] 实施例7:基因治疗(毛细胞的再生)

[0256] 应用小鼠的培养耳蜗器官,进行搭载蛋白无调同源物1(Atoh1)基因的AAV-sia6.8的感染实验。已知转录因子Atoh1在支持细胞中基因导入时将支持细胞分化诱导成毛细胞。如图11所示,在与毛细胞(Hair cells)区域不同的区域(图11(A)中用虚线包围的区域)中,出现毛细胞样细胞(参考图11(B)(C)的箭头)。图11(B)是图11(A)中用虚线包围的区域的放大图。显示为了在噪音性耳聋等引起的毛细胞缺失的情形中再生毛细胞,可以有效利用AAV-sia6.8的可能性。

[0257] 实施例8:基因治疗(耳聋模型动物的听力恢复)

[0258] 基于听性脑干反应(ABR)测定GJB2缺失小鼠(3-4周龄)的听力(术前听力)。麻醉下在小鼠的外侧半规管(lateral semicircular canal)的两处应用牙科用钻头设置小孔。在一个孔中插入毛细管,向外淋巴液(endolymph)以3μl/min的速度注入10-12μl搭载野生型

GJB2基因的AAV-sia6.8溶液(约1×10^{13}GC/ml)。手术后1周和2周后,基于听性脑干反应(ABR)测定听力(术后听力)。

[0259] 对于ABR的测定,将不锈钢的针电极配置在左右耳的顶点和腹外侧,使用Power Laboratory系统(PowerLab 4/25;AD Instruments)的Scope软件的波形保存和刺激控制测定。脑波记录用细胞外放大器AC PreAmplifier(模型P-55;Astro-Med)进行。音响刺激通过耦合器型扬声器(模型ES1spc;Bio Research Center)进行。阈值在8、20、和40kHz的频率以5dB的间隔改变强度同时基于一系列响应来确定。

[0260] 术前和术后的ABR的阈值和波形分别示于图12和图13。在术后2周(AAV-Sia6.8-CX26 2W),与术前(Pre-operation)相比高波长(20kHz,40kHz)的ABR的阈值降低,见到听力的显著改善(参考图12)。此外,在术后2周(2W post-infection),对术前(CX26cKO pre-injection)无反应的弱音压也可以确认反应(参考图13)。

[0261] 实施例9:应用启动子的细胞靶向基因导入

[0262] 将启动子2(自人GJB2基因的转录起始点上游的760bp的基因序列、序列编号12)导入AAV-sia6.8,搭载GJB2基因和EGFP基因,感染GJB2缺失小鼠的培养耳蜗器官。如图14所示,可以确认作为支持细胞的外螺旋沟细胞(OSC)中EGPF的表达(绿色)、和伴随连接蛋白26的表达(红色)的间隙连接的形成。未见对外毛细胞和内毛细胞(OHC和IHC)的感染。根据该结果显示,AAV-sia6.8通过导入适当启动子可在细胞靶向基因导入(本实施例中以支持细胞为靶标的基因导入)中有效应用。

[0263] 实施例10:向改变型AAV进一步导入氨基酸取代和感染指向性的评价2

[0264] 与实施例2同样,制备AAV-sia6.8的Thr268Ser变体。

[0265] AAV-sia6.8的268位的氨基酸在野生型AAV6中的Ser被Thr取代。因此,AAV-sia6.8的Thr268Ser变体将268位的氨基酸改变回野生型的Ser。

[0266] 应用小鼠的培养耳蜗器官,进行搭载EGFP基因的AAV-sia6.8的Thr268Ser变体的感染实验。EGFP的荧光像、和通过图像分析计算EGFP阳性面积率的结果分别示于图15和图16。AAV-sia6.8的Thr268Ser变体(AAV-Sia-T268S)中,与AAV-sia6.8相比,对内耳细胞的感染指向性提高,特别是外螺旋沟细胞(OSC)中感染效率的提高显著。

[0267] [序列表自由文本]

[0268] 序列编号1:AAV1的衣壳序列的氨基酸序列

[0269] 序列编号2:AAV2的衣壳序列的氨基酸序列

[0270] 序列编号3:AAV3的衣壳序列的氨基酸序列

[0271] 序列编号4:AAV4的衣壳序列的氨基酸序列

[0272] 序列编号5:AAV5的衣壳序列的氨基酸序列

[0273] 序列编号6:AAV6的衣壳序列的氨基酸序列

[0274] 序列编号7:AAV7的衣壳序列的氨基酸序列

[0275] 序列编号8:AAV8的衣壳序列的氨基酸序列

[0276] 序列编号9:AAV9的衣壳序列的氨基酸序列

[0277] 序列编号10:AAV10的衣壳序列的氨基酸序列

[0278] 序列编号11:启动子1的核酸序列

[0279] 序列编号12:启动子2的核酸序列

[0280] 序列编号13:启动子3的核酸序列

[0281] 序列编号14:AAV-sia6.8的衣壳序列的氨基酸序列

[0282] 序列编号15:AAV-sia1.8的衣壳序列的氨基酸序列序列编号16:AAV-sia1.8的Glu531Lys变体的衣壳序列的氨基酸序列序列编号17:AAV-sia1.8的Leu129Phe变体的衣壳序列的氨基酸序列序列编号18:AAV-sia6.8的Thr268Ser变体的衣壳序列的氨基酸序列序列编号19:增强子1的核酸序列

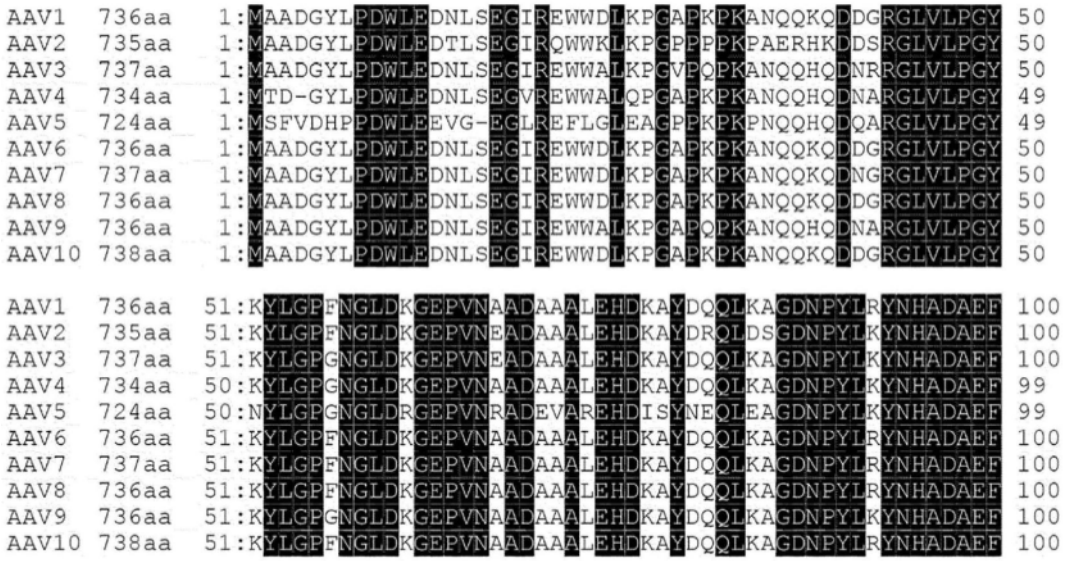

AAV1 736aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGY 50
AAV2 735aa 1:MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGY 50
AAV3 737aa 1:MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGY 50
AAV4 734aa 1:MTD-GYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGY 49
AAV5 724aa 1:MSFVDHPPDWLEEVG-EGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGY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

图1-1


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

图1-2


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

图1-3

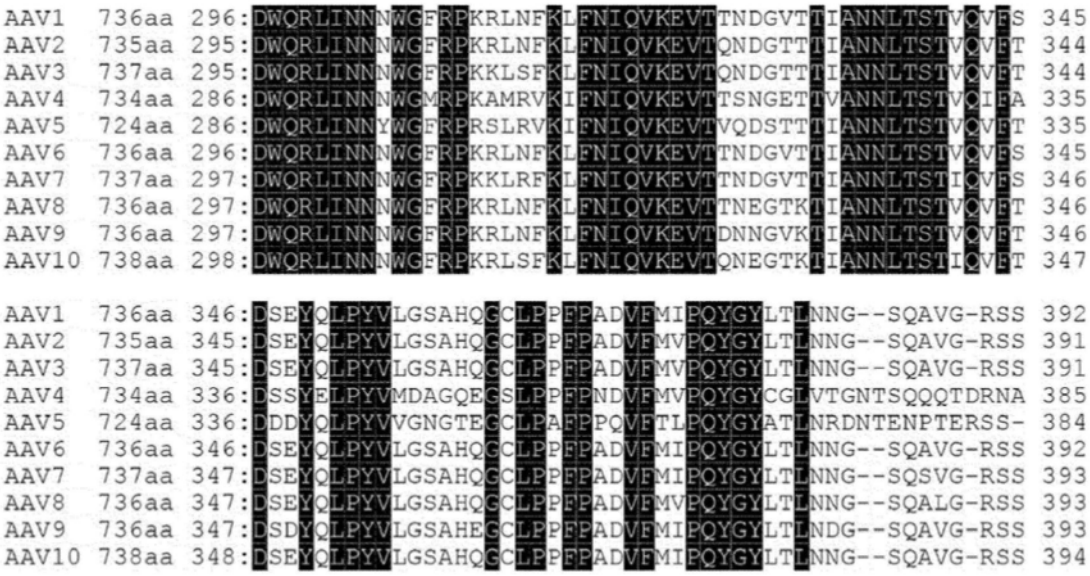

AAV1 736aa 296:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS 345
AAV2 735aa 295:DWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT 344
AAV3 737aa 295:DWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT 344
AAV4 734aa 286:DWQRLINNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFA 335
AAV5 724aa 286:DWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFT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

图1-4


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

图1-5

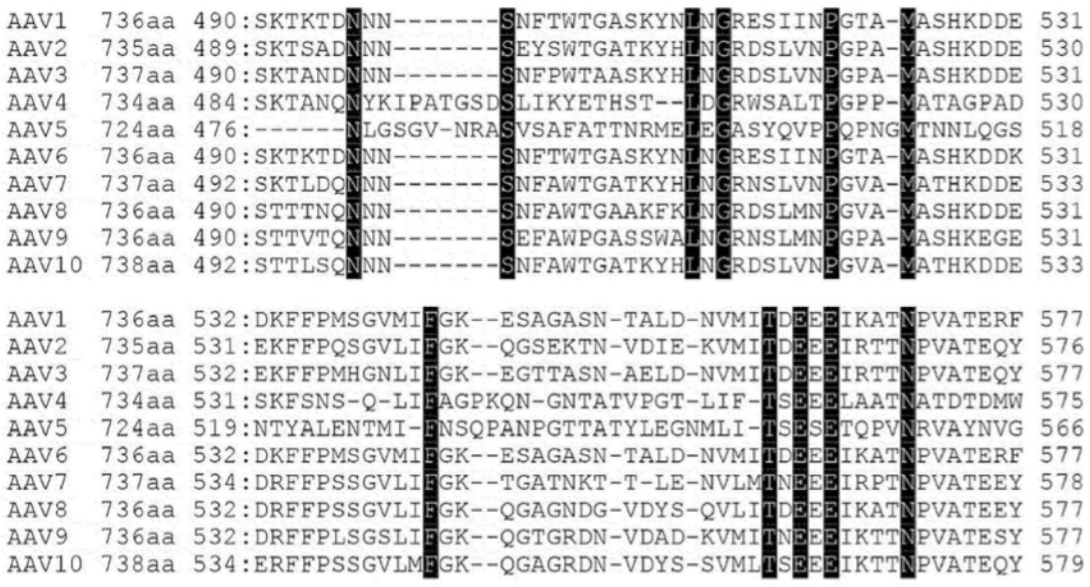

AAV1 736aa 490:SKTKTDNNN-------SNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTA-MASHKDDE 531
AAV2 735aa 489:SKTSADNNN-------SEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPA-MASHKDDE 530
AAV3 737aa 490:SKTANDNNN-------SNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPA-MASHKDDE 531
AAV4 734aa 484:SKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHST--LDGRWSALTPGPP-MATAGPAD 530
AAV5 724aa 476:------NLGSGV-NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGS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

图1-6

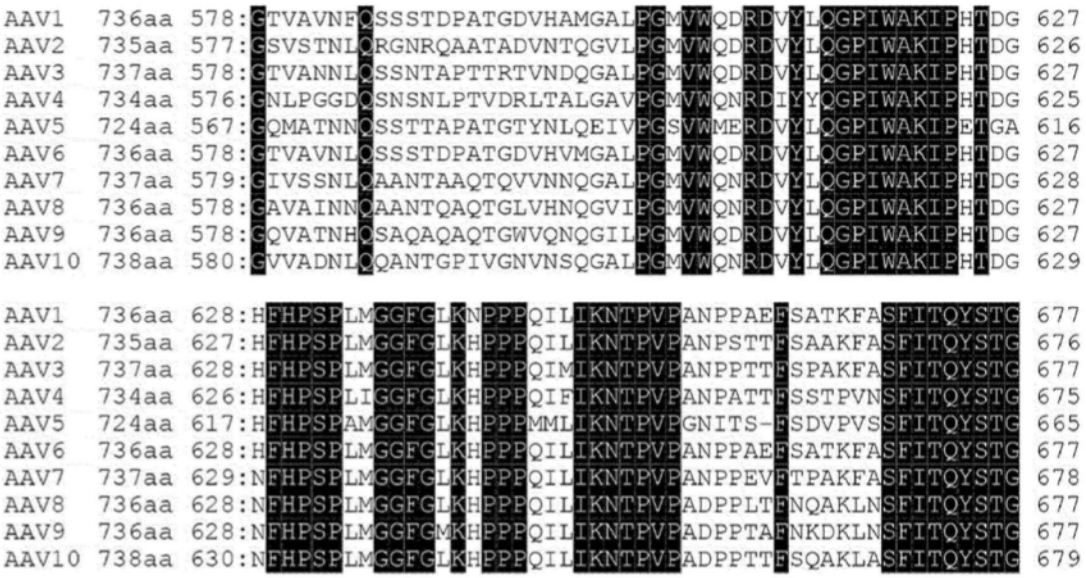

AAV1 736aa 578:GTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV2 735aa 577:GSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 626
AAV3 737aa 578:GTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDG 627
AAV4 734aa 576:GNLPGGDQSNSNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDG 625
AAV5 724aa 567:GQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGA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

图1-7

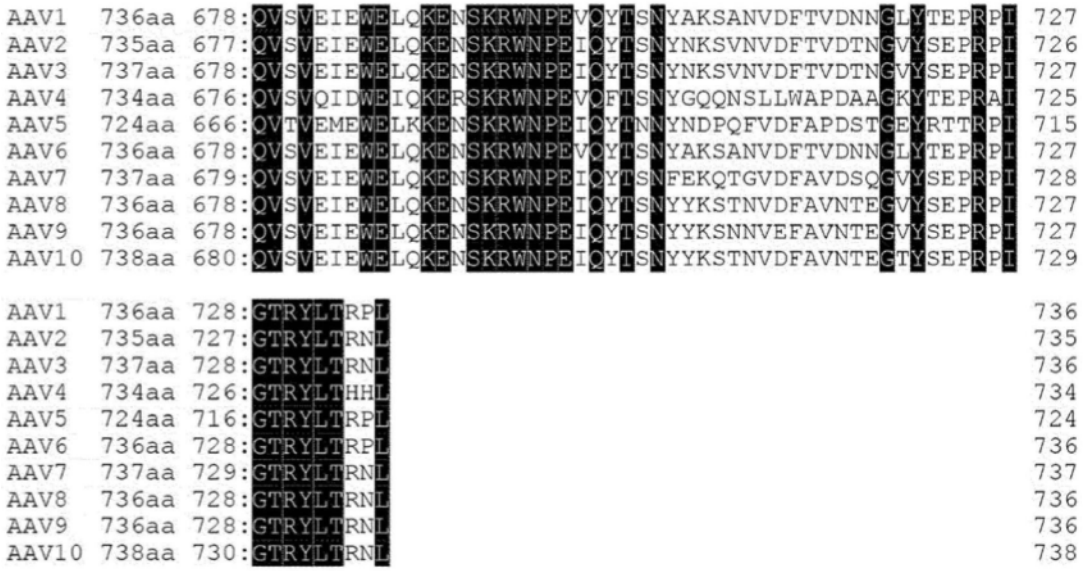

AAV1 736aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPI 727
AAV2 735aa 677:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI 726
AAV3 737aa 678:QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI 727
AAV4 734aa 676:QVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAI 725
AAV5 724aa 666:QVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPI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

图1-8

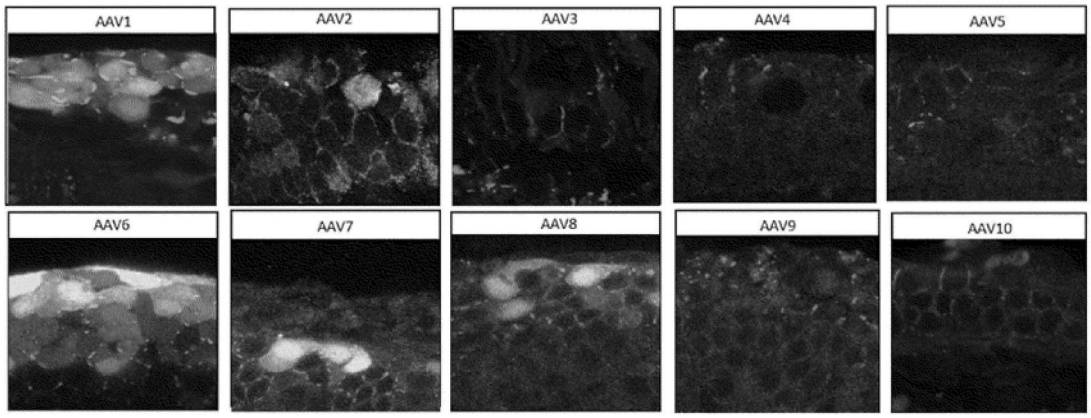

AAV1
AAV2
AAV3
AAV4
AAV5
AAV6
AAV7
AAV8
AAV9
AAV10

图2

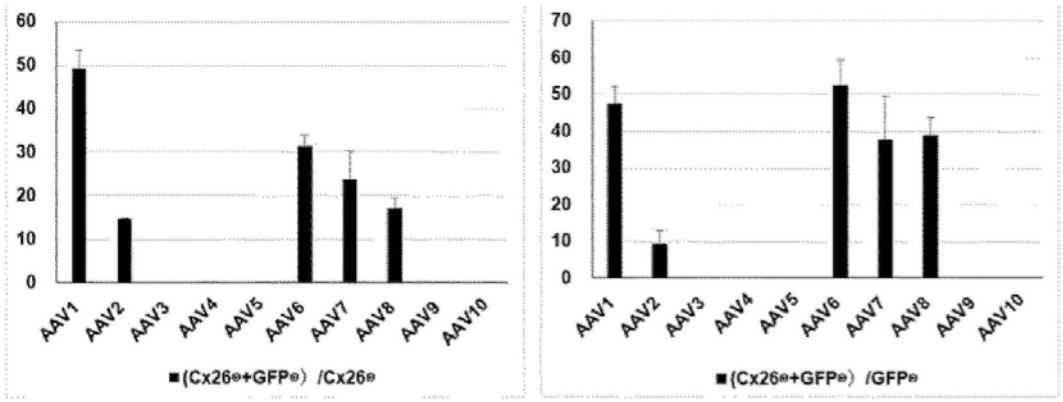

60
50
40
30
20
10
0
AAV1 AAV2 AAV3 AAV4 AAV5 AAV6 AAV7 AAV8 AAV9 AAV10
■(Cx26⊕+GFP⊕) /Cx26⊕
70
60
50
40
30
20
10
0
AAV1 AAV2 AAV3 AAV4 AAV5 AAV6 AAV7 AAV8 AAV9 AAV10
■(Cx26⊕+GFP⊕) /GFP⊕

图3

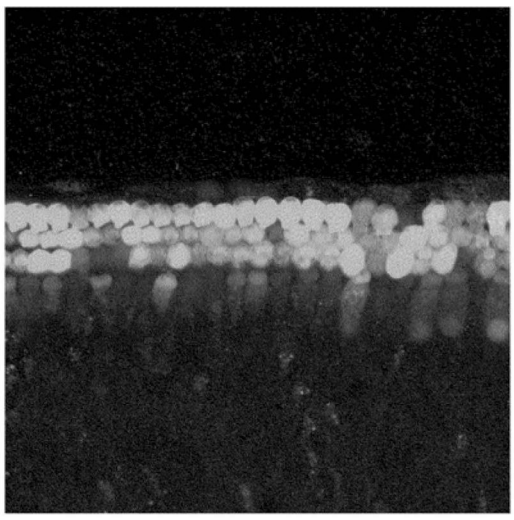


图4

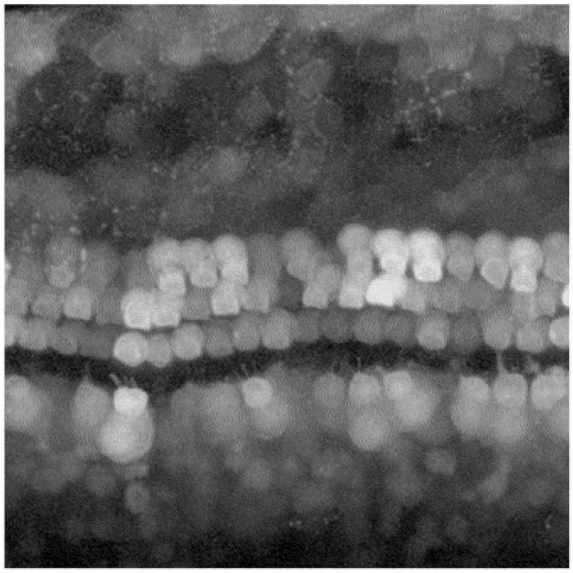


图5

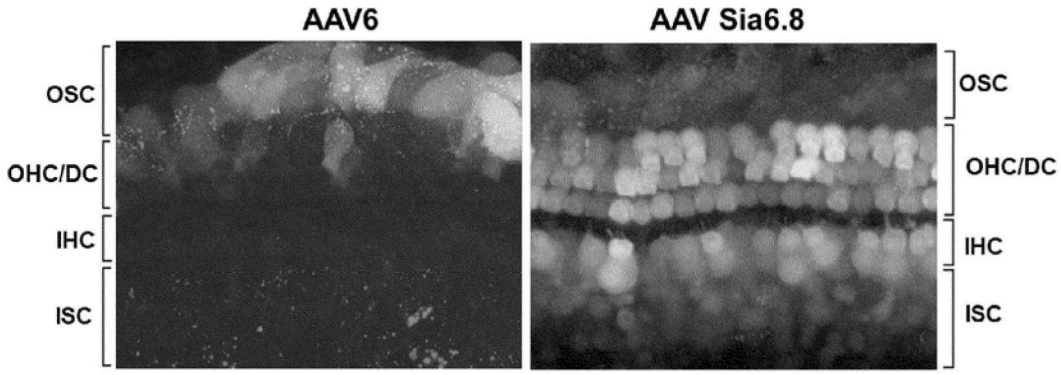
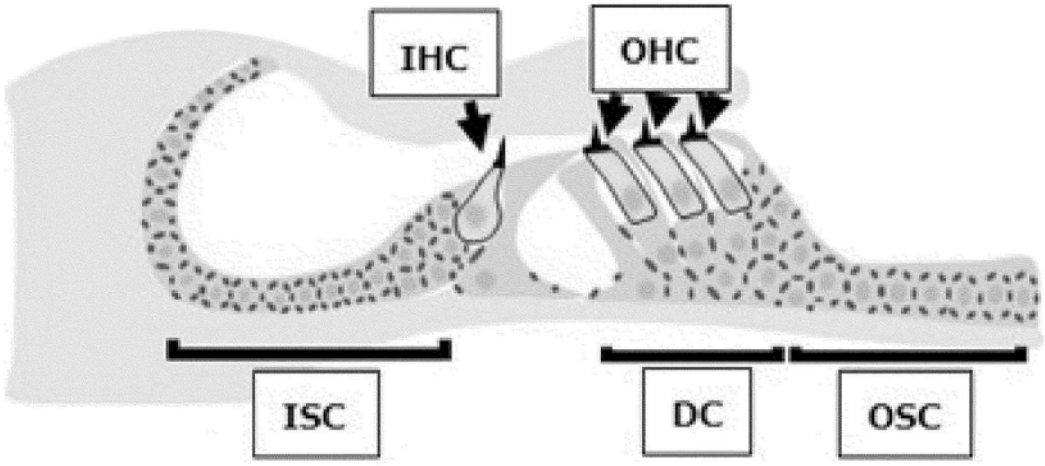


图6



OSC:外螺旋沟细胞(Outer Sulcus Cell)

OHC:外毛细胞(Outer Hair Cell)

DC:Deiters细胞(Deiters Cell)

IHC:内毛细胞(Inner Hair Cell)

ISC:内螺旋沟细胞(Inner Sulcus Cell)

图7

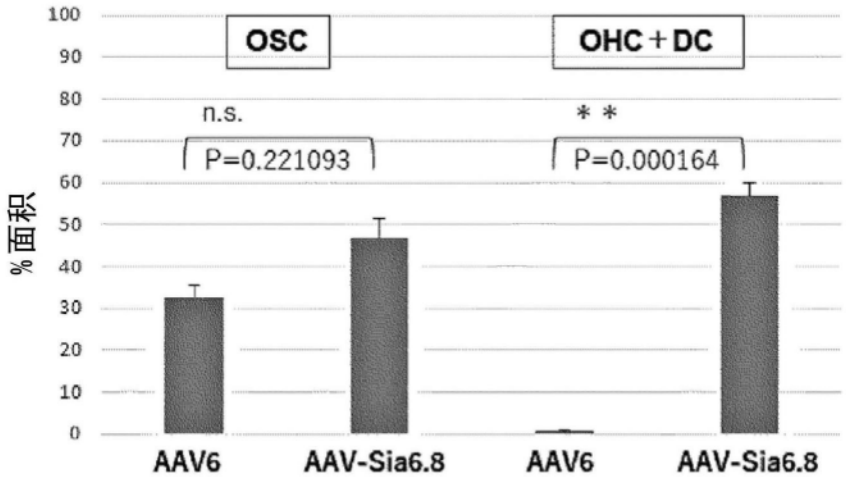


图8

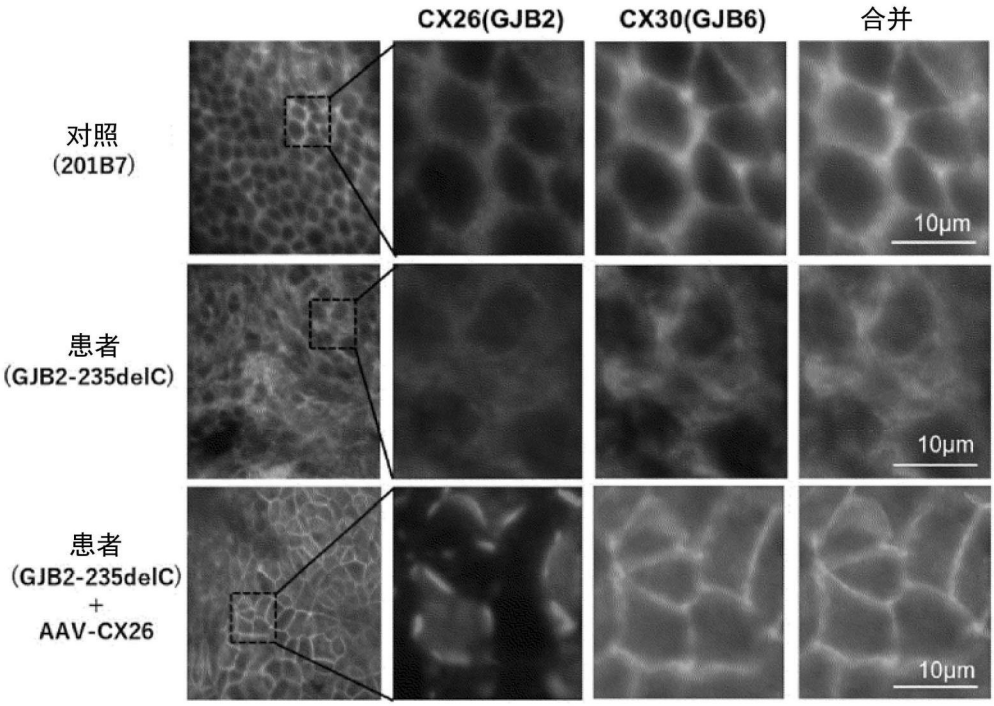

CX26(GJB2)
CX30(GJB6)
合并
对照
(201B7)
患者
(GJB2-235delC)
患者
(GJB2-235delC)
+
AAV-CX26
10μm
10μm
10μm

图9

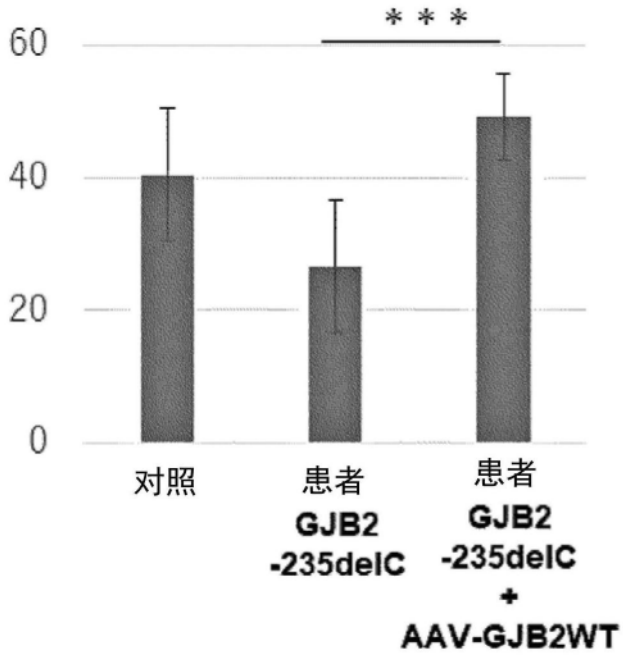

* * *
60
40
20
0
对照
患者
GJB2
-235delC
患者
GJB2
-235delC
+
AAV-GJB2WT

图10

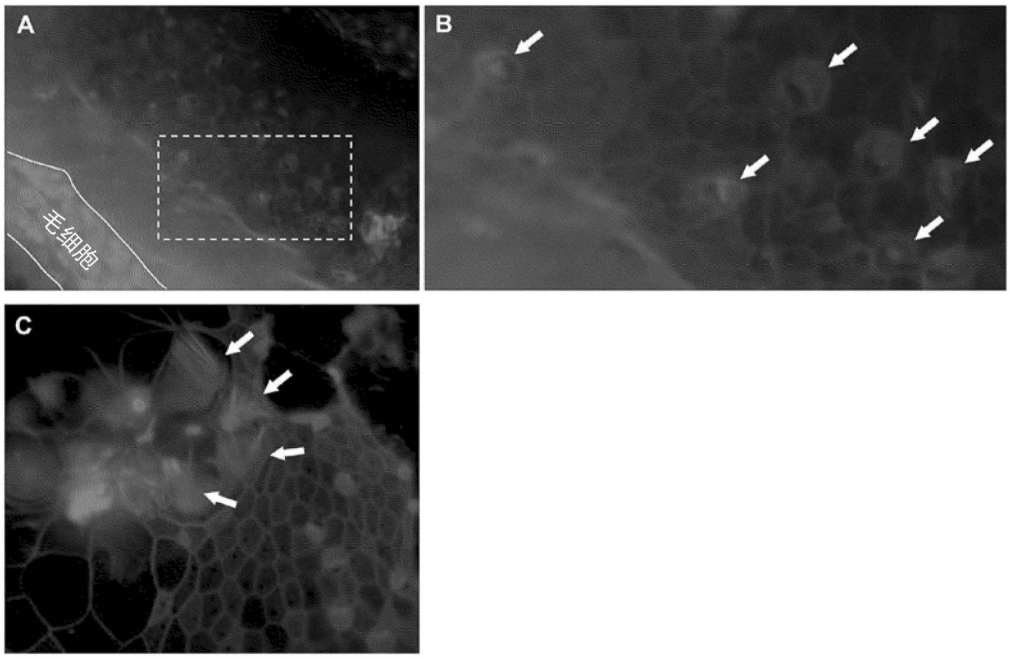

A
毛细胞
B
C

图11

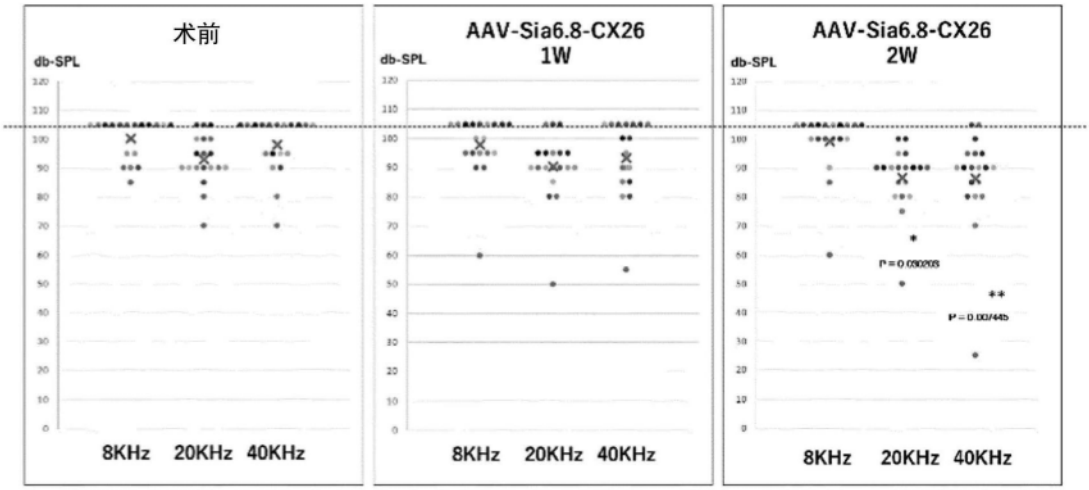

术前
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz
AAV-Sia6.8-CX26
1W
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz
AAV-Sia6.8-CX26
2W
db-SPL
8KHz 20KHz 40KHz

图12

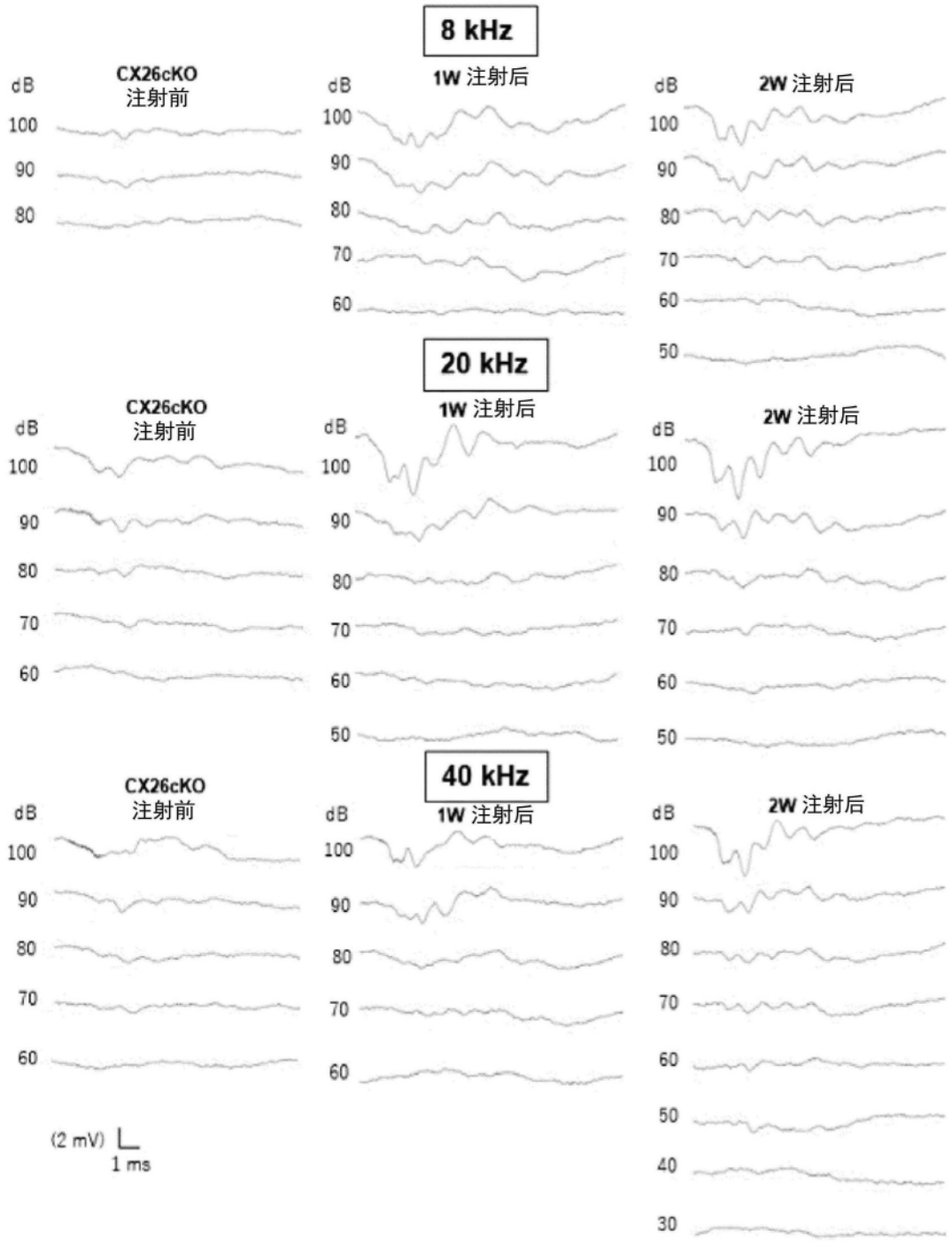

8 kHz
CX26cKO
注射前
1W 注射后
2W 注射后
dB
100
90
80
70
60
50
20 kHz
CX26cKO
注射前
1W 注射后
2W 注射后
40 kHz
CX26cKO
注射前
1W 注射后
2W 注射后
40
30
(2 mV)
1 ms

图13

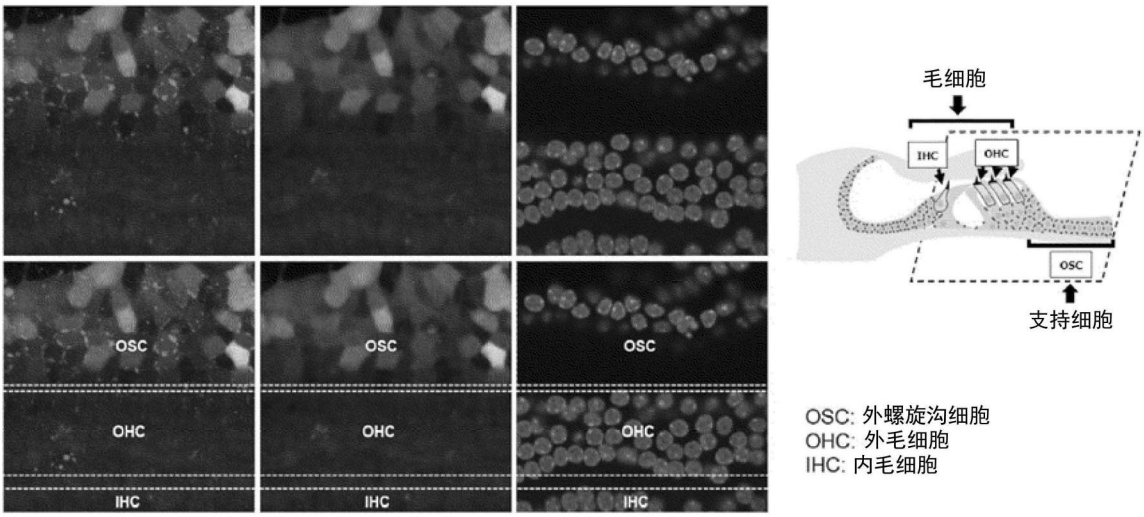

OSC
OHC
IHC
毛细胞
IHC
OHC
OSC
支持细胞
OSC: 外螺旋沟细胞
OHC: 外毛细胞
IHC: 内毛细胞

图14

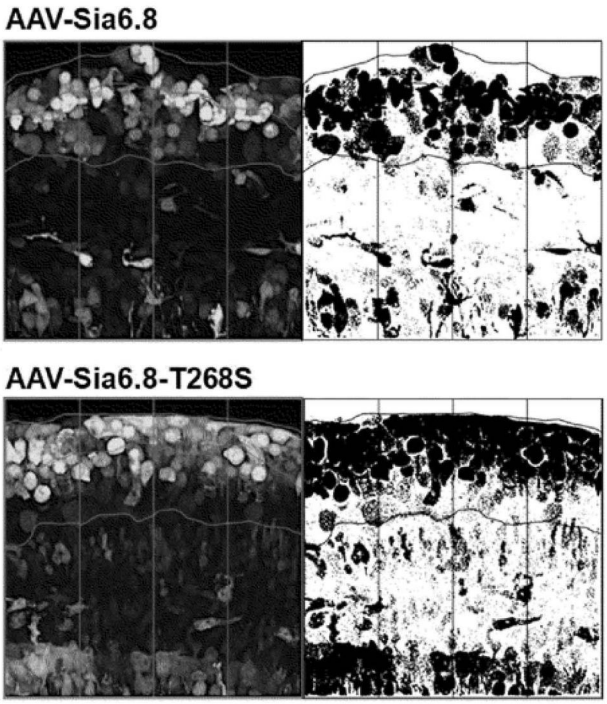

AAV-Sia6.8
AAV-Sia6.8-T268S

图15

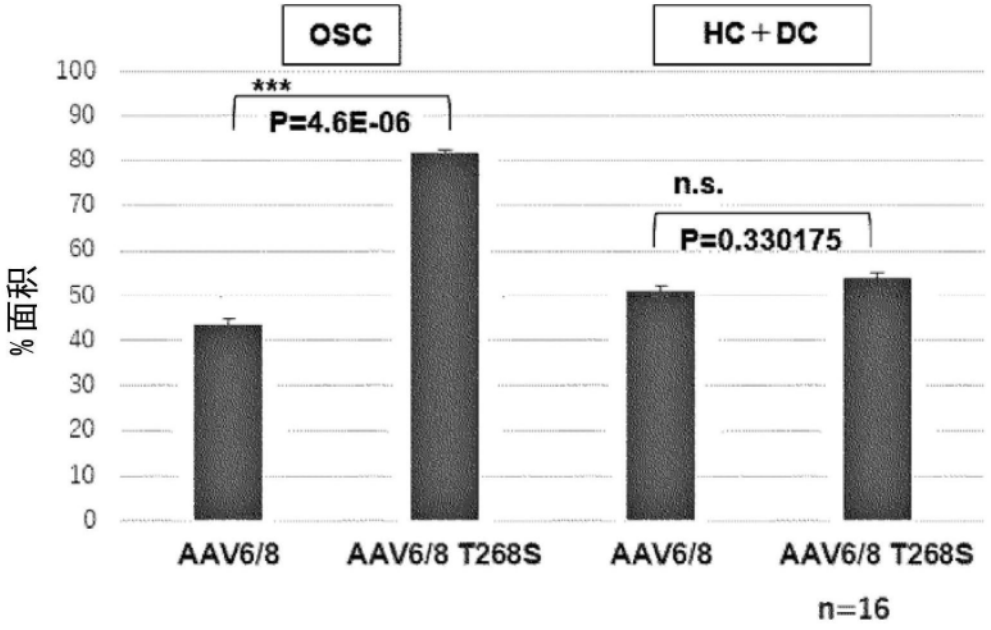

OSC
HC+DC
***
P=4.6E-06
n.s.
P=0.330175
% 面积
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
AAV6/8
AAV6/8 T268S
AAV6/8
AAV6/8 T268S
n=16

图16