

(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2020-509786

(P2020-509786A)

(43) 公表日 令和2年4月2日(2020.4.2)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/63 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)
C 12 N 15/864 (2006.01)
C 12 N 1/15 (2006.01)
C 12 N 1/19 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/63
C 12 N 5/10
C 12 N 15/864
C 12 N 1/15
C 12 N 1/19

Z
Z N A
1 O O Z
1/15
1/19

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5
4 C 0 8 4
4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-500024 (P2020-500024)
(86) (22) 出願日 平成30年3月16日 (2018.3.16)
(85) 翻訳文提出日 令和1年11月11日 (2019.11.11)
(86) 國際出願番号 PCT/US2018/022873
(87) 國際公開番号 WO2018/170402
(87) 國際公開日 平成30年9月20日 (2018.9.20)
(31) 優先権主張番号 62/531,522
(32) 優先日 平成29年7月12日 (2017.7.12)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/472,790
(32) 優先日 平成29年3月17日 (2017.3.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 519333642
レスキー ヒヤリング インコーポレイ
テッド
アメリカ合衆国 フロリダ州 32605
ゲインズビル ノースウェスト 29
アヴェニュー 2148
(74) 代理人 110000578
名古屋国際特許業務法人
(72) 発明者 スティカー ヘンリッチ
アメリカ合衆国 カンザス州 66209
リーウッド ウエスト ワンハンドレッド
ドウエンティフィフス ストリート 2
209

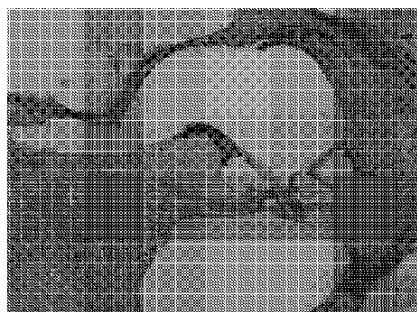
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】聴覚損失の治療のための遺伝子治療構成物および方法

(57) 【要約】

開示されるのは、T M P R S S 3 遺伝子またはL O X H D 1 遺伝子の遺伝的変異によって引き起こされる聴覚損失の治療および/または予防に有用な組成物および方法である。本願に開示される組成物および方法は、T M P R S S 3 遺伝子またはL O X H D 1 遺伝子それぞれの活性を回復させるために、有毛細胞の生存を促進するために、および聴覚損失に罹患する患者の聴力を回復させるために、内耳へのT M P R S S 3 またはL O X H D 1 のアデノ-関連ウイルス(A A V)ベクター遺伝子伝達を使用する。

FIGURE 5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

発現ベクターであって、

配列 ID NO : 1、配列 ID NO : 1 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列、配列 ID NO : 3、又は配列 ID NO : 3 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列からなる群から選択される核酸配列；および

前記核酸配列に作動可能に連結されるプロモーター、
を含む、発現ベクター。

【請求項 2】

前記発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクターである、

10

請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 3】

前記アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2、AAV2 / A nc 8 0、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV rh 8、AAV rh 10、AAV rh 3 9、AAV rh 4 3、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 又は A nc 8 0 からなる群から選択される、

請求項 2 に記載の発現ベクター。

【請求項 4】

前記プロモーターは、TMPRSS3 プロモーター、Myo7a プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) プロモーター、サイトメガロウイルス / チキンベータ - アクチン (CBA) プロモーター、又は Pou4f3 プロモーター、からなる群から選択される、

20

請求項 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 5】

聴覚損失の治療または予防のための方法において使用のための医薬組成物であって、

配列 ID NO : 1、配列 ID NO : 1 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列、配列 ID NO : 3、又は配列 ID NO : 3 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列からなる群から選択される核酸配列；および前記核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含む発現ベクターを含む、

医薬組成物。

30

【請求項 6】

前記発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクターである、

請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2、AAV2 / A nc 8 0、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV rh 8、AAV rh 10、AAV rh 3 9、AAV rh 4 3、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 又は A nc 8 0 からなる群から選択される、

請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記プロモーターは、TMPRSS3 プロモーター、Myo7a プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) プロモーター、サイトメガロウイルス / チキンベータ - アクチン (CBA) プロモーター、又は Pou4f3 プロモーター、からなる群から選択される、

40

請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

配列 ID NO : 1、配列 ID NO : 1 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列、配列 ID NO : 3、又は配列 ID NO : 3 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列からなる群から選択される核酸配列；および前記核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含む発現ベクターを用いてトランスフェクション

50

された細胞。

【請求項 10】

前記発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクターである、

請求項 9 に記載の細胞。

【請求項 11】

前記アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2、AAV2 / A n c 8 0、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV r h 8、AAV r h 1 0、AAV r h 3 9、AAV r h 4 3、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 又はA n c 8 0 からなる群から選択される、

請求項 10 に記載の細胞。

10

【請求項 12】

前記プロモーターは、T M P R S S 3 プロモーター、M y o 7 a プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) プロモーター、サイトメガロウイルス / チキンベータ - アクチン (C B A) プロモーター、又はP o u 4 f 3 プロモーター、からなる群から選択される、

請求項 9 に記載の細胞。

【請求項 13】

前記細胞は、幹細胞である、請求項 9 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記幹細胞は、人工多能性幹細胞である、請求項 13 に記載の細胞。

20

【請求項 15】

聴覚損失の治療または予防のための方法であって、

配列 I D N O : 1、配列 I D N O : 1 の核酸に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸配列、配列 I D N O : 3、又は配列 I D N O : 3 の核酸に少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸配列からなる群から選択される核酸配列；および前記核酸配列に作動可能に連結されるプロモーターを含む発現ベクターの有効量を必要な被検体に投与することを含む、方法。

【請求項 16】

前記発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクターである、

請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2、AAV2 / A n c 8 0、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV r h 8、AAV r h 1 0、AAV r h 3 9、AAV r h 4 3、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8 又はA n c 8 0 からなる群から選択される、

請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記プロモーターは、T M P R S S 3 プロモーター、M y o 7 a プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) プロモーター、サイトメガロウイルス / チキンベータ - アクチン (C B A) プロモーター、又はP o u 4 f 3 プロモーター、からなる群から選択される、

40

請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記発現ベクターは、被検体の内耳に注射によって投与される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記注射方法は、蝸牛開口術、蝸牛窓膜、内リンパ囊、中央階、半規管開口術 (c a n a l o s t o m y) 、内リンパ囊経由の中央階、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

50

前記被検体は、聴覚損失に関連する一つ以上の遺伝的危険因子を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項22】

前記遺伝的危険因子の一つは、TMPRSS3遺伝子の変異又はLOXHD1遺伝子の変異からなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記被検体は、聴覚損失の任意の臨床指標を示さない、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

ヒトLOXHD1遺伝子の変異又はヒトTMPRSS3遺伝子の変異からなる群から選択される聴覚損失を引き起こす変異を含む、遺伝子導入マウス。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2017年3月17日に提出された米国仮出願No. 62/472,790、および2017年7月12日に提出された米国仮出願No. 62/531,522に基づく利益を主張し、それらの各内容は、その全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

[本開示の分野]

開示されるのは、TMPRSS3遺伝子またはLOXHD1遺伝子の遺伝的変異によって引き起こされる聴覚損失および難聴の治療および/または予防に有用な組成物および方法である。

20

[本開示の背景]

聴覚損失は、ヒトにおいて最も一般的な感覚障害である。世界保健機関(WHO)によって公開された障害をもたらす聴覚損失の程度における2012年の推定によると、障害をもたらす聴覚損失を持って生きている人口は世界中で3億6千万人(3億2千800万人の成人、および3千200万人の子供)であり、それらの人口の89%(または3億2千200万人)は、低所得国に住む(聴覚損失の有病率におけるWHO全体の推定; Mortality and Burden of Diseases and Prevention of Blindness and Deafness, WHO 2012)。

30

【0002】

現在、聴覚損失または難聴を予防または治療するための未承認の治療薬がある。障害をもたらす聴覚損失を有する人々のための現在の治療選択は、人工内耳移植である。人工内耳移植は、関連する医療費が大きく、患者につき1,000,000ドルを超える生涯コストを伴なう常法である(Mohr PE, et al. (2000).米国における深刻な聴覚損失に対する重大な社会的費用(The societal costs of severe to profound hearing loss in the United States); Int J Technol Assess Health Care; 16(4): 1120-35)。

40

【0003】

人工内耳移植に対する現在の需要は、供給を超えている。生産される人工内耳ユニットの生産率は、毎年50,000ユニットである。現在の出生率、並びに新生児における障害をもたらす聴覚損失の発生率および有病率に基づいて、134,000個の人工内耳が、患っている子供それぞれに1個の人工内耳を提供するために毎年必要とされる。両側の(2個の)人工内耳を必要とする患者を含む場合、この数は増加する。

【0004】

人工内耳の生涯コストは、多くの人々にとって、および特に障害をもたらす聴覚損失を有する多数の人々が住んでいる先進国以外で生きている人々にとって、高額である。治療選択は、人工内耳移植に替わる費用効率の高い代替品を提供するために、特に先進国以外

50

で生きている人々にとって必要とされる。

【0005】

言語修得前難聴の50%超は、遺伝性、すなわち、先天的(hereditary)である(アメリカ疾病予防管理センター-Genetics of Hearing Loss)。先天的聴覚損失および難聴は、伝音性、感音性、またはそれらの両方の組み合わせ;症候性(外耳または他の器官の先天性異常と関連する、または他の器官システムが関与する医学的問題と関連する)または非症候性(外耳の関連する目に見える異常がない、または任意の関連する医学的問題がない);および言語習得前(言語発達前)または言語習得後(言語発達後)であってもよい(Richard JH Smith, MD, A Elliot Shearer, Michael S Hildebrand, PhD, and Guy Van Camp, PhD, 難聴および先天的聴覚損失概説(Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview), GeneReviews 最初の掲載:1999年2月14日;最後の修正:2014年1月9日。先天的聴覚損失の70%超は、非症候性である。非症候性難聴の種々の遺伝子座は、DFNと指定される(Deafnessのために)。遺伝子座は、遺伝的形質の様式:DFNA(常染色体優性)、DFNB(常染色体劣性)、およびDFNX(X連鎖性)に基づいて名付けられる。上記名称に続く数は、遺伝子地図および/または遺伝子発見の順番を反映する。一般集団において、聴覚損失の有病率は、年齢と共に増加する。この変化は、遺伝的特徴の影響および環境の影響、並びに環境要因と個々の遺伝性素因との間の相互作用を反映する。

10

20

30

【0006】

感音性聴覚損失(SNHL)は、ヒトにおいて最も一般的な神経変性疾患であり、現在、承認されている薬理学的介入はない。SNHLは、遺伝性疾患によって引き起こされ、並びに音感覚心的外傷および中毒性難聴のような損傷を介して得られる。遺伝子診断は、非症候性SNHLを引き起こす少なくとも100個の遺伝子があることを証明している。遺伝学的および遺伝子治療技術の最近の進歩は、多くの劣性型の難聴の救出は、遺伝子治療を通して可能であることを示している(Akil et al., 2012; Askew et al., 2015)。内耳への長期間にわたる遺伝子伝達は、アデノ関連ウイルスベクター(AAV)を用いて達成されている(Shu, Tao, Wang, et al., 2016)。数年前に記述されている最初のこれらの観察にかかわらず、ヒト臨床試験への移行は未だ起こっていない。この分野における移行研究のための理想的な疾患標的是、内耳の細胞の定義された群に影響を与え、生後、発話の発達後に起こる劣性型遺伝性聴覚損失である。

40

【0007】

本願に記述されるように、聴覚損失の一般的な劣性原因の発生率および遺伝子サイズを考慮することの両方を注意深く評価することによって、使用可能な公平な一般的患者集団を有する遺伝子治療プログラムを発展させることが可能である。例えば、他の変異ほど一般的でないけれども、TMPRSS3は、人工内耳移植を保証するほど重症である聴覚損失におけるかなり一般的な原因である。加えて、TMPRSS3に変異を有する患者は、他の変異を有する患者と同様に人工内耳移植に応答し得ない(Shearer et al., 2017)。このことは、この疾患の移植結果を改善するために、独立型の治療薬として、または他の治療薬および/または人工内耳移植と組み合わせて、TMPRSS3、またはLOXHD1のような他の遺伝子を標的とする機会を示す。表1(出典 Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016)は、TMPRSS3の変異が、遺伝子のサイズによって蝸牛にかなり限られた分布を有する言語習得後劣性聴覚損失の最も一般的な原因となり得、存在するAAVベクターに組み込まれ得る、ということを証明する。

【0008】

【表1】

MUTATION	ONSET			% OF TOTAL	GENESZ	HAIR CELL	DOM/REC	173
	PRE	POST	TOTAL					
GJB2	26	3	29	17%	2347	NO	BOTH	
CDH23	6	7	13	8%	4843	YES	REC	
SLC26A4	8	0	8	5%	4930	NO	REC	
MYO7A	3	4	7	4%	7465	YES	BOTH	
OTOF	4	0	4	2%	6973	YES	REC	
MYO15A	2	2	4	2%	11876	YES	REC	
WARDNB SYN	3	0	3	2%	1504	NO	DOM	
TMPRSS3	0	3	3	2%	2460	YES	REC	
ACTG1	0	2	2	1%	2123	YES	DOM	
USHER (1=CDH23, 1=PCDH15)					4843,			
Mit1555A>G	2	0	2	1%	7042	?	REC	
CYRM	0	2	2	1%	NA	?	?	
DFNA5	0	1	1	1%	1559	NO	DOM	
COCH	0	1	1	1%	2276	YES	DOM	
WHRN	0	1	1	1%	2882	NO	DOM	
LOXHD1	1	0	1	1%	2915	YES	REC	
Mit3243A>G	0	1	1	1%	3978	YES	REC	
					NA	?	?	

表1：176人の成人の人工内耳患者における種々の変異の発症率

【0009】

ヒト膜貫通プロテアーゼ、セリン3（TMPRSS3；DFNB10、DFNB8、ECHO51、TADG12；Acc：HGNc：11877とも称される）は、生まれつきの（出生時に見られる）および子供時代の両方で発病する常染色体劣性難聴との関連によって特定された。TMPRSS3遺伝子の変異は、常染色体劣性非症候性聴覚障害型DFNB8および10と関連する。TMPRSS3は1646塩基対遺伝子であり、セリンプロテアーゼをコードし、DFNA8/10と関連し、人工内耳移植を受ける聴覚損失患者の1～5%を示し得る（Weegerink et al., 2011）。この遺伝子の機能の損失は、変異の部位に依存して幅広い聽力表現型をもたらすように見える。生まれつき、および成人の両方で発症する進行性聴覚損失は、この遺伝子の損失と関連している。

【0010】

DFNB8聴覚損失の発症は、言語習得後（10～12年齢）であり、一方、DFNB10聴覚損失の発症は、言語習得前（生まれつき）である。この表現型の違いは、遺伝子型の違いを反映する。DFNB8原因変異は、スライス部位の変異であり、非効率的なスライシングは、言語習得前難聴を防ぐのには十分であるが、最終的な聴力損失を予防するのには十分でない減少した正常タンパク質の量と関連する（Richard J H Smith, MD, et al. (2014) 参照。常染色体劣性非症候性聴覚障害の原因となる公知の遺伝子：難聴および遺伝性聴力損失修正（Genes Known to Cause Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment: Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview）；GeneReviews）。

【0011】

聴覚損失の原因となる公知の21番目の染色体におけるTMPRSS3変異を、表2に記述する。

【0012】

10

20

30

40

【表2-1】

表2. TMPRSS3変異(21番目の染色体)		
#	変異名	参考文献
1	TM P R S S 3, IV S 4 A S, G-A, - 6	Scott HS, et al. (2001) ベーターサ テライト繰り返しの挿入は、生まれつきの、および子供 時代の両方で発症する常染色体劣性難聴の原因となる膜 貫通プロテアーゼを特定する (Insertion o f beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both c ongenital and childhood o nset autosomal recessive deafness). Nat Genet. 27 (1): 59-63.
2	TM P R S S 3, 8- BP DEL, サテラ イトリピート (SAT ELITE REP EAT) INS	Scott HS, et al. (2001) ベーターサ テライト繰り返しの挿入は、生まれつきの、および子供 時代の両方で発症する常染色体劣性難聴の原因となる膜 貫通プロテアーゼを特定する (Insertion o f beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both c ongenital and childhood o nset autosomal recessive deafness). Nat Genet. 27 (1): 5 9-63.

【0013】

【表2-2】

3	TMRSS3, 1-BP DEL, 207C	Wattenhofer M, et al. (2002) TMRSS3遺伝子の変異は白人患者において子供時代の非症候性難聴の稀な原因になる (Mutation s in the TMRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients). J Med (Berl). 80 (2): 124-31.	10
4	c. 753G>C (p. Trp251Cys)	Masmoudi S, et al. (2001) 非症候性常染色体劣性難聴を有する2つの血縁チュニジアン家族における新規のミスセンス変異 (Novel missense mutations of TMRSS3 in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness). Hum Mutat. 18 (2): 101-8.	20
5	c. 308A>G (p. Asp103Gly)	Wattenhofer M, et al. (2002) TMRSS3遺伝子の変異は白人患者において子供時代の非症候性難聴の稀な原因になる (Mutation s in the TMRSS3 gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients). J Med (Berl). 80 (2): 124-31.	30 40

【0014】

【表2-3】

6	c. 1211C>T (p. Pro404Leu)	Wattenhofer M, et al. (2005) DFNB8/10ファミリーの新規 TMPRSS3ミスセンス変異は、タンパク質のタンパク質分解活性を妨げる (A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein). Hum Genet. 117 (6): 528-35.	10
7	c. 647G>T (p. Arg216Leu)	Wattenhofer m, et al. (2005) DFNB8/10ファミリーの新規 TMPRSS3ミスセンス変異は、タンパク質のタンパク質分解活性を妨げる (A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein). Hum Genet. 117 (6): 528-35.	20
8	c. 579dupA (p. Cys194Metfs)	Duzkale H, et al. (2013) 遺伝的変異体の臨床的有意性を評価することへの体系的な取り組み (A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants). Clin Genet. 84 (5): 453-63.	30 40

【0015】

【表2-4】

9	c. 1192C>T (p. Gln398Ter)	Wattenhofer M, et al. (2005) DFNB8/10ファミリーの新規 TMPRSS3 ミスセンス変異は、タンパク質のタンパク質分解活性を妨げる (A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein). Hum Genet. 117 (6): 528-35.
10	c. 323-6G>A	Scott HS, et al. (2001) ベーターサテライト繰り返しの挿入は、生まれつきの、および子供時代の両方で発症する常染色体劣性難聴の原因となる膜貫通プロテアーゼを特定する (Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness). Nat Genet. 27 (1): 59-63.

10

20

30

【0016】

【表2-5】

11	c. 916G>A (p. Ala306Thr)	Chung J, et al. (2014) 韩国人の言語 習得後難聴における軽症聴覚表現型に関連する TMPRSS3 の新規変異：個別の聴覚リハビリテーションのために可能な将来に及ぼす影響 (A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation). J Mol Med (Berl). 92 (6): 651–63.
12	c. 208delC (p. His70Thr fs)	Battellino S, et al. (2015) 常染色体劣性非症候性聴力損失における TMPRSS3 変異 (TMPRSS3 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss). Eur Arch Otorhinolaryngol. 273 (5): 1151–4.
13	c. 1276G>A (p. Ala426Thr)	Weegink NJ, et al. (2011) TMPRSS3 変異を有する DFNB8/10 ファミリーの遺伝子型－表現型相互関係 (Genotype–phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations). J Assoc Res Otolaryngol. 12 (6): 753–66.

10

20

30

40

【0017】

【表2-6】

14	c. 413C>A (p. Ala138Glu))	Eppsteiner RW, et al. (2012) 遺伝的変異による人工内耳性能の予想：蝸牛神経節仮説 (Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: the spiral ganglion hypothesis). Hear Res. 292 (1-2): 51-8.
15	c. 325C>T (p. Arg109Trp))	Lee YJ, Park D, Kim SY, Park WJ (2003) 生まれつきの、および子供時代の両方で発症する常染色体劣性難聴の多型ではないが病因性突然変異は、TMPRSS3のタンパク質分解活性を妨げる (Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of TMPRSS3). J Med Genet. 40 (8): 629-31.

【0018】

【表2-7】

16	c. 346G>A (p. V116M)	Ganapathy A, et al. (2014) インドにおける非症候性聴力障害 : TMPRSS3、TMC1、USHIC、CDH23、およびTMEにおける変異間での高い対立遺伝子異質性 (Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TME). PLoS One. 9 (1): e84773.
17	c. 727G>A (p. G243R)	Ganapathy A, et al. (2014) インドにおける非症候性聴力障害 : TMPRSS3、TMC1、USHIC、CDH23、およびTMEにおける変異間での高い対立遺伝子異質性 (Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TME). PLoS One. 9 (1): e84773.

10

20

30

【0019】

【表2-8】

18	c. 1156T>C (p. G386R)	Ganapathy A, et al. (2014) インドにおける非症候性聴力障害: TMPRSS3、TMC1、USHIC、CDH23、およびTMEIにおける変異間での高い対立遺伝子異質性 (Non-syndromic hearing impairment in India: high allelic heterogeneity among mutations in TMPRSS3, TMC1, USHIC, CDH23 and TMEI). PLoS One. 9(1): e84773.
----	--------------------------	--

10

20

【0020】

リポキシゲナーゼホモロジードメイン1遺伝子 (LOXHD1 : LHD2D1、DFNB77、FLJ32670; OMIM : 613072; Acc : HGNC : 26521とも呼ばれる) は、PLAT (ポリスチン / リポキシゲナーゼ / アルファ - トキシン) ドメインだけからなる高く保存されたタンパク質をコードし、細胞膜に対する標的タンパク質に関与すると考えられる。マウスにおける研究は、この遺伝子が内耳の機械感覚性有毛細胞に発現され、この遺伝子の変異は聴覚欠損につながり、この遺伝子が正常な有毛細胞機能に必須である、ということを示す。ヒトファミリー分離難聴のスクリーニングは、DFNB77、進行型の常染色体劣性非症候性聴覚損失 (ARNSHL) の原因となるこの遺伝子の変異を特定した。種々のイソ型をコードする選択的スプライスによる転写物変異体は、この遺伝子で知られている。

LOXHD1の臨床的特徴 :

- ・常染色体劣性
- ・聴覚損失、感覚神経的、両側性 (低周波数での軽度聴覚損失)
- ・アシュケナージ系ユダヤ人ファミリーにおいて7歳～10歳で人工内耳移植につながる先天性発症
- ・血縁のイラン人ファミリーにおいて7歳～8歳で発症し、成人期に中間周波数および高周波数における中程度～重度の損失に進行する

常染色体劣性聴覚損失 - 77 (DFNB77) は、染色体 18q21 における LOXHD1 遺伝子 (613072) のホモ接合変異によって引き起こされるという証拠。

30

30

40

【0021】

原位置 (in situ) ハイブリッド形成において、任意の他の組織ではなく、胚性的 13.5 日および 16 日の成長中マウスの内耳において Loxhd1 発現を検出した。出産後 4 日で、発現は、蝸牛および前庭の有毛細胞において、その核内で最も高い濃度で検出された。Loxhd1 は、細胞質に進行的に局在化され、成人において、Loxhd1 は、不動毛の長さに沿って有毛細胞に発現された。

【0022】

N-エチル-N-ニトロソウレア (ENU) 突然変異誘発スクリーニングを用いて、Gribble et al. (2009) は、3 週齢で聴覚障害になる、および 8 週齢で聴覚障害になる「サンバ (samba)」マウス系列を成長させた。ホモ接合性サンバマ

50

ウスは、他の神経学的または前庭の異常は示さず、ヘテロ接合性サンバマウスは、完全に正常を示した。不動毛の発展には、ホモ接合性サンバマウスにおいて影響を与えたが、有毛細胞機能は混乱し、有毛細胞は最終的に変性した。

【0023】

G r i l l e t e t a l . (2 0 0 9) は、サンバには P L A T ドメイン 1 0 のベータ - サンドイッチ構造を不安定にするマウス L o x h d 1 遺伝子の変異があることを明らかにした。変異は、m R N A もしくはタンパク質の安定性、または不動毛に沿って L o x h d 1 タンパク質の局在化を変えなかった。しかしながら、出産後 2 1 日で、いくつかの有毛細胞は、融合した不動毛および頂端細胞表面での細胞膜の波打ち現象を伴う形態的異常を示した。有毛細胞の損失および螺旋神経節ニューロンの減少を含む深刻な変性変化を、出産後 9 0 日で観察した。G r i l l e t e t a l . (2 0 0 9) は、螺旋神経節ニューロンの変性が、有毛細胞の機能および維持の混乱に続発するようであるということを仮定した。

【0024】

聴覚損失の原因となる染色体 1 8 番目における L O X H D 1 変異を、表 3 に記述する。

【0025】

【表 3 - 1】

表 3. L O X H D 1 変異(1 8 番目の染色体)

#	変異名	参考文献
1	c. 2 0 0 8 C > T (p. A r g 6 7 0 T e r)	G r i l l e t N, e t a l . (2 0 0 9) L O X H D 1 の変異、進化的に保存された不動毛タンパク質、マウスにおける有毛細胞機能を混乱させ、ヒトにおける進行性聴覚損失の原因となる (M u t a t i o n s i n L O X H D 1 , a n e v o l u t i o n a r i l y c o n s e r v e d s t e r e o c i l l i a r y p r o t e i n , d i s r u p t h a i r c e l l f u n c t i o n i n m i c e a n d c a u s e p r o g r e s s i v e h e a r i n g l o s s i n h u m a n s) . A m J H u m G e n e t . 8 5 (3) : 3 2 8 - 3 7 .

【0026】

10

20

30

40

【表3-2】

2	<p>c. 3169 C>T (p. Arg1057Ter)</p>	<p>Edvardson S, et al. (2011) LOXHD1遺伝子の有害な変異は、アシュケナージ系ユダヤ人の常染色体劣性聴覚損失の原因となる (A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews). Am J Med Genet A. 155A(5): 1170–2.</p> <p>Grillet N, et al. (2009) LOXHD1の変異、進化的に保存された不動毛タンパク質、マウスにおける有毛細胞機能を混乱させ、ヒトにおける進行性聴覚損失の原因となる (Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans). Am J Hum Genet. 85(3): 328–37.</p>	10 20 30
---	---------------------------------------	---	----------------

【0027】

【表3-3】

3	<p>c. 2303delG (p. Gly768Alafs)</p>	<p>Edvardson S, et al. (2011) LOXHD1遺伝子の有害な変異は、アシュケナージ系ユダヤ人の常染色体劣性聴覚損失の原因となる (A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews). Am J Med Genet A. 155A(5): 1170–2.</p> <p>Grillet N, et al. (2009) LOXHD1の変異、進化的に保存された不動毛タンパク質、マウスにおける有毛細胞機能を混乱させ、ヒトにおける進行性聴覚損失の原因となる (Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans). Am J Hum Genet. 85(3): 328–37.</p>	10 20 30
---	---	---	----------------

【0028】

【表3-4】

4	c. 4099G>T (p. Glu1367Ter)	<p>Edvardson S, et al. (2011) LOXHD1遺伝子の有害な変異は、アシュケナージ系ユダヤ人の常染色体劣性聴覚損失の原因となる (A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews). Am J Med Genet A. 155A(5): 1170-2.</p> <p>Grillet N, et al. (2009) LOXHD1の変異、進化的に保存された不動毛タンパク質、マウスにおける有毛細胞機能を混乱させ、ヒトにおける進行性聴覚損失の原因となる (Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans). Am J Hum Genet. 85(3): 328-37.</p>	10 20 30
---	----------------------------	---	----------------

【0029】

【表3-5】

5	<p>c. 2497C>T (p. Arg833Ter)</p>	<p>Edvardson S, et al. (2011) LOXHD1遺伝子の有害な変異は、アシュケナージ系ユダヤ人の常染色体劣性聴覚損失の原因となる (A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews). Am J Med Genet A. 155A (5): 1170–2.</p> <p>Grillet N, et al. (2009) LOXHD1の変異、進化的に保存された不動毛タンパク質、マウスにおける有毛細胞機能を混乱させ、ヒトにおける進行性聴覚損失の原因となる (Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans). Am J Hum Genet. 85 (3): 328–37.</p>	10 20 30
---	-------------------------------------	---	----------------

【0030】

【表3-6】

6	c. 4714 C>T	<p>Edvardson S, et al. (2011) LOXHD1遺伝子の有害な変異は、アシュケナージ系ユダヤ人の常染色体劣性聴覚損失の原因となる (A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews). Am J Med Genet A. 155A (5): 1170-2.</p>
---	-------------	---

10

20

30

40

50

【0031】

米国出願公開No. 2013 / 0095071は、その全体が本明細書に参照によって組み込まれ、アポトーシスタンパク質のX連鎖性阻害剤(XIAP)を内耳の蝸牛窓膜へ伝達するために変異されたチロシンアデノ-関連ウイルスベクターを用いて、加齢に関連した聴覚損失を回復させるための遺伝子治療方法を記述する。しかしながら、米国出願公開No. 2013 / 0095071は、本願に開示されるような、TMPRSS3またはLOXHD1遺伝子の遺伝的変異が原因となる聴覚損失または難聴の発症を防ぐ、もしくは遅らせる、または聴覚損失または難聴を回復させるために、機能的TMPRSS3またはLOXHD1をコードする核酸配列の伝達については熟慮していない。

【0032】

加えて、聴覚障害のための臨床的遺伝子療法を発展させるために、現在の最先端において重要な落とし穴は、ヒトの聴覚損失を正確に映し出す動物モデルの欠損である。ヒトの成人発症を伴なう遺伝的聴覚損失のためのいくつかの利用可能なマウスモデルは、伝達研究を複雑にする生まれつきの聴覚損失を示す。聴覚の発達後の遺伝的聴覚損失の発症モデルは少ない。新生児マウスにおけるベクター伝達は、成人マウスにおける伝達より種々のトランスフェクションパターンをもたらす(Shu, Tao, Li, et al., 2016)。種々のベクターシステムおよび遺伝子標的を用いて聴覚の救出を評価するために使用されることがある新規な動物モデルが必要である。

【0033】

現在、聴覚損失または難聴を予防する、または治療するための承認されている治療方法はなく、当該治療を試験するために有用な臨床前動物モデルを欠いている。本発明は、変異したTMPRSS3またはLOXHD1遺伝子の活性を回復させ、有毛細胞の生存を促進し、聴覚損失または難聴で苦しむ患者の聴覚を回復させるために、内耳にTMPRSS3またはLOXHD1のウイルスベクター遺伝子を伝達する組成物および方法、並びに当該組成物および方法を試験するための細胞に基づくモデル、および動物に基づくモデルを記述する。

【発明の概要】

【0034】

[簡潔な要約]

本願に開示されるのは、配列ID No: 1もしくは配列ID No: 2の核酸配列を含む、または配列ID NO: 1もしくは配列ID No: 2の核酸に少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列を含む発現ベクターであり、ここで、核酸配列は、プロモ

ーターに作動可能に連結される。さらに本願に開示されるのは、聴覚損失の治療または予防のための方法に使用するための医薬組成物であり、配列 ID No : 1 もしくは配列 ID No : 2 の核酸配列を有する、または配列 ID NO : 1 もしくは配列 ID NO : 2 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列を有する発現ベクターを含み、ここで、核酸配列はプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、核酸配列は、配列 ID NO : 1 または配列 ID NO : 2 の核酸配列に少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルバー依存的アデノウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターから選択される。いくつかの実施形態において、ベクターは、AAV2、AAV2 / An c 80、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAVr h 8、AAVr h 10、AAVr h 39、AAVr h 43、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、およびAn c 80 から選択されるアデノ - 関連ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2 または An c 80 である。いくつかの実施形態において、プロモーターは、任意の有毛細胞プロモーターから選択され、発達初期に作動可能に連結される核酸の発現を誘導し、例えば、TMPRSS3 プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) プロモーター、サイトメガロウイルス / チキンベータ - アクチン (CBA) プロモーター、Myo 7a プロモーター、または Pou 4f3 プロモーター等の発現を生涯にわたって維持する。

10

20

30

40

50

【0035】

本願に開示されるのは、配列 ID No : 1 もしくは配列 ID No : 2 の核酸配列を含む、または配列 ID NO : 1 もしくは配列 ID NO : 2 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列を含む発現ベクターを有する細胞であり、ここで、核酸配列はプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、核酸配列は、配列 ID NO : 1 または配列 ID NO : 2 の核酸配列に少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、細胞は幹細胞である。いくつかの実施形態において、幹細胞は、人工多能性幹細胞である。

【0036】

本願に開示されるのは、配列 ID No : 1 もしくは配列 ID No : 2 の核酸配列を含む、または配列 ID NO : 1 もしくは配列 ID NO : 2 の核酸に少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列を含む発現ベクターの有効量を必要な被検体に投与することを含む、聴覚損失を治療する、または予防する方法であり、ここで、核酸配列はプロモーターに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、核酸配列は、配列 ID NO : 1 または配列 ID NO : 2 の核酸配列に少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、アデノ - 関連ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルバー依存的アデノウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターから選択される。いくつかの実施形態において、ベクターは、AAV2、AAV2 / An c 80、AAV5、AAV6、AAV6 . 2、AAV7、AAV8、AAV9、AAVr h 8、AAVr h 10、AAVr h 39、AAVr h 43、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、およびAn c 80 から選択されるアデノ - 関連ウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、アデノ - 関連ウイルスベクターは、AAV2 または An c 80 である。いくつかの実施形態において、プロモーターは、任意の有毛

細胞プロモーターから選択され、発達初期に作動可能に連結される核酸の発現を誘導し、例えば、TMPRSS3プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)プロモーター、サイトメガロウイルス/チキンベータ-アクチン(CBA)プロモーター、Myo7aプロモーター、またはPou4f3プロモーター等の発現を生涯にわたって維持する。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、被検体の内耳に、例えば、注射によって投与される。いくつかの実施形態において、伝達方法は、蝸牛開口術、蝸牛窓膜、半規管開口術(canalostomy)、およびそれらの任意の組み合わせから選択される(Erin E. Leary Swan, et al. (2008) 聴覚適用のための内耳薬物伝達(Inner Ear Drug Delivery for Auditory Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 60 (15) : 1583 - 1599)。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、内リンパ囊を介して中央階に伝達される(Colletti V, et al. (2010) ヒト内耳における内リンパ囊から内リンパ部分へのガドリニウム分布の証拠(Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear). *Audiol Neurootol.* 15 (6) : 353 - 63; Marco Mandala, MD, et al. (2010) メニエール病における内リンパ囊から蝸牛への誘導された内リンパ流入(Induced endolymphatic flow from the endolymphatic sac to the cochlea in Meniere's disease). *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 143, 673 - 679; Yamashita T, et al. (1999) 内リンパ囊でのアデノウイルスベクター接種後の内耳導入遺伝子発現(Inner ear transgene expression after adenoviral vector inoculation in the endolymphatic sac). *Hum Gene Ther.* 10 (5) : 769 - 74)。いくつかの実施形態において、被検体は、聴覚損失と関連する一つ以上の遺伝的危険因子を有する。いくつかの実施形態において、遺伝的危険因子の一つは、TMPRSS3遺伝子の変異である。いくつかの実施形態において、TMPRSS3遺伝子の変異は、聴覚損失の原因となる公知の任意の一つ以上のTMPRSS3変異から選択される(例えば、表2参照)。いくつかの実施形態において、遺伝的危険因子の一つは、LOXHD1遺伝子の変異である。いくつかの実施形態において、LOXHD1遺伝子の変異は、聴覚損失の原因となる公知の任意の一つ以上のLOXHD1変異から選択される(例えば、表3参照)。いくつかの実施形態において、被検体は、聴覚損失の任意の臨床指標を示さない。

【0037】

いくつかの実施形態において、本願に記述される発現ベクターは、他の核酸配列を含む一つ以上の発現ベクターと、および/または聴覚損失を治療するための一つ以上の他の活性薬剤との組み合わせ療法として投与される。例えば、組み合わせ療法は、配列ID NO:1の核酸配列を有する第一の発現ベクター、および配列ID NO:2の核酸配列を有する第二の発現ベクターを含んでもよく、ここで両方の発現ベクターは、聴覚損失を治療するための組み合わせ療法の一部として被検体に投与される。

【0038】

本願に記述されるのは、聴覚損失の原因となる公知の任意の一つ以上のTMPRSS3変異から選択される変異を有するヒトTMPRSS3遺伝子を有する遺伝子導入マウスである(例えば、表2参照)。本願に記述されるのは、聴覚損失の原因となる公知の任意の一つ以上のLOXHD1変異から選択される変異を有するヒトLOXHD1遺伝子を有する遺伝子導入マウスである(例えば、表3参照)。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、野生型ヒトTMPRSS3(ゲンバンク(GenBank)登録番号N

10

20

30

40

50

o . B C 0 7 4 8 4 7 . 2) をコードする c D N A 配列を示す。

【図2】図2は、図1におけるc D N Aによってコードされる野生型ヒトT M P R S S 3アミノ酸配列を示す。

【図3】図3は、野生型ヒトL O X H D 1 (ゲンバンク (G e n B a n k) 登録番号No . A K 0 5 7 2 3 2 . 1) をコードするc D N A配列を示す。

【図4】図4は、図3におけるc D N Aによってコードされる野生型ヒトL O X H D 1アミノ酸配列を示す。

【図5】図5は、成人マウス蝸牛におけるT m p r s s 3 免疫組織化学を示す (F a s q u e l l e , L . , S c o t t , H . S . , L e n o i r , M . , W a n g , J . , R e b i l l a r d , G . , G a b o y a r d , S . , . . . D e l p r a t , B . (2 0 1 1)) . ヒトD F N B 8 / 1 0 難聴における、T m p r s s 3 、膜貫通セリンプロテアーゼ欠損は聴覚の発症における蝸牛有毛細胞の生存に重要である。 (J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 8 6 (1 9) , 1 7 3 8 3 - 1 7 3 9 7) 。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 0】

[詳細な説明]

本発明として考えられる主題は、明細書の結論における特許請求の範囲に特に指摘され、明確にクレームされる。本発明における前述のおよび他の目的、特徴、並びに利点は、添付図面と併用されて続く詳細な説明から明らかになるだろう。

【0 0 4 1】

本願に使用される用語「治療する (t r e a t) 」、「治療する (t r e a t i n g) 」、および「治療 (t r e a t m e n t) 」は、臨床転帰において所望の変化を目的としている様々な活動を包含する。例えば、本願に使用される用語「治療する (t r e a t) 」は、本願に記述されるような、聴覚損失の一つ以上の臨床指標または徵候において検出可能な改善を達成すること、または本当に達成するということを目的としている任意の活動を包含する。

【0 0 4 2】

T M P R S S 3 変異またはL O X H D 1 変異に起因する聴覚損失は、一般的に2つの集団：(i) 聽覚損失を持って生まれる被検体である生まれつきの集団、および(i i) 出生時の測定可能な聴覚損失は有さないが、ある期間にわたって進行性の聴覚損失を示す進行性の集団を示す。したがって、いくつかの例において、被検体は(例えば、遺伝子診断試験で検出されるように) T M P R S S 3 遺伝子、またはL O X H D 1 遺伝子の変異を有してもよいが、聴覚損失の臨床指標または徵候を未だ示さないので、治療的介入を開始することができる期間を提供する。結果的に、いくつかの実施形態において、本発明は、聴覚が徐々に退行する期間に治療的介入をするための方法を提供する。本発明の方法を、当該期間より前に開始することができる。本発明によって提供される聴覚損失を治療する方法は、制限されないが、聴覚損失の発症または聴覚損失の臨床指標もしくは徵候の進行を予防する、または遅らせる方法を含む。

【0 0 4 3】

本願に使用される用語「聴覚損失」は、音を聞くための能力の減少を記述するために使用され、難聴および音を聞くための能力がないことを含む。

本願に使用される用語「有効量」または「治療的有効量」は、本願に記述されるような活性剤の量に関し、上記の「治療 (t r e a t m e n t) 」の説明において記述されるような、一つ以上の所望の臨床成績を達成するために、または達成する方向に貢献するために十分である量に関する。任意の個々の場合において適切な「有効」量は、用量漸増試験のような当該技術分野において公知の標準技術を用いて決定されてもよい。

【0 0 4 4】

本願に使用される用語「活性剤」は、本願に記述される組成物および方法において使用されることを目的とする、および例えば聴覚損失を治療する目的のために生物学的に活性

10

20

30

40

50

化することを目的とする分子（例えば、本願に記述されるAAVベクター）に関する。

【0045】

本願に使用される用語「医薬組成物」は、本願に記述される少なくとも一つの活性剤または二つ以上の活性剤の組み合わせ、または、例えば担体、安定化剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、賦形剤などのような薬物伝達において使用のために適している一つ以上の成分、を含む組成物に関する。

【0046】

本願において同じ意味で使用される用語「被検体（subject）」または「患者（patient）」は、ヒト、非-ヒト患者、齧歯動物（ラット、マウスおよびモルモットのような）などを含む哺乳類を包含するが限定されない。本発明のいくつかの実施形態において、被検体はヒトである。10

【0047】

本発明における活性剤の用量は、活性剤の有効性および／または有効量を決定するために行われるヒトまたは他の哺乳類における試験に基づいて算出されてもよい。投与量、および投与頻度または投与時期は、当該技術分野において公知の方法によって決定されてもよく、活性剤の医薬品形態、投与経路、単一の活性剤が使用されるのか複数の活性剤が使用されるのか（例えば、必要とされる第一の活性剤の用量は、当該活性剤が第二の活性剤と組み合わせて使用される場合より低くなってもよい）、および年齢、体重または薬物代謝に影響を及ぼす任意の医学的状態の存在を含む患者の特徴、などの要因に依存してもよい。20

【0048】

一実施形態において、単回投与で投与されてもよい。他の実施形態において、複数回投与は、ある期間にわたって、例えば1日4回、1日2回、1日1回、週に1回、月に1回などの特定の間隔で、投与されてもよい。

[聴覚損失における臨床的特徴] 遺伝性聴覚損失および難聴は、伝音性、感音性、またはその両方の組み合わせ；症候性（外耳または他の器官の先天性異常と、または他の器官システムを含む医学的問題と関連する）または非症候性（外耳の関連する可視できる異常、または任意の関連する医学的問題はない）；および言語習得前（言語が発達する前）または言語習得後（言語が発達する後）、であってもよい（Richard JH Smith, M.D., et al. (2104) 難聴および遺伝性聴覚損失修正（Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview）. (GeneReviews)。30

[診断／試験] 聴覚損失の遺伝型は、聴覚損失の後天的（非-遺伝性）原因とは区別されなければならない。聴覚損失の遺伝型は、耳鼻科的、聴覚的、および身体検査、家族歴、付随的試験（例えば、側頭骨におけるCT検査）、および分子遺伝学的試験によって診断される。分子遺伝学的試験は、様々な型の症候性および非症候性難聴で可能であり、診断および遺伝相談に大きな役割を果たす。

【0049】

聴覚損失を測定するために使用される選択試験：

[1. 歪成分耳音響放射（DPOAE）] 歪成分耳音響放射（DPOAE）は、蝸牛が比率1.1～1.3の2つの純粋な音質周波数によって同時に刺激される場合に発生される応答である。DPOAEの発生メカニズムにおける最近の研究は、DPOAE応答において2つの重要な要素が存在すること、一つは、相互変調「ひずみ」によって発生される、一つは「反射」によって発生される、ことを明確に示している。40

【0050】

DPOAEの有病率は、正常な成人の耳で100%である。左耳および右耳からの応答は、非常に相関性がある（すなわち、左耳および右耳からの応答は非常に類似している）。正常な被検体では、女性がより高い振幅DPOAEを有する。老化過程は、DPOAE振幅を低くする、およびDPOAE応答スペクトルを狭くすることによってDPOAE応答へ影響を与える（すなわち、より高い周波数での応答が徐々に減少する）。DPOAE50

を、臨床研究において使用される他の動物種、例えば、トカゲ、マウス、ラット、モルモット、チンチラ、チキン、犬および猿のような動物種からも記録することができる。（耳音響放射ウェブサイト）。

[2 . 聴性脳幹反応 (A B R)] 聴性脳幹反応 (A B R) 試験は、聴覚のための内耳（蝸牛）および脳経路についての情報を与える。この試験は、時々、聴性誘発反応 (A E P) とも称される。試験は、子供や聴覚スクリーニングにおける従来の行動論的方法では難しい他の患者で使用されることができる。A B R は、脳または脳経路における聴覚損失の型を示す兆候、症状、病気を有する人々に適応される。試験は、ヒトおよび動物の両方に使用される。A B R は、頭に電極（心電図が動作される場合に心臓周囲に置かれる電極に類似する）を貼り付け、および音に応答して脳波活性を記録することによって行われる。試験される人は、試験が行われる間、静かに休んでいる、または眠っている。応答は必須ではない。A B R を、新生児の聴覚スクリーニングプログラムにおけるスクリーニング試験としても使用することができる。スクリーニング試験として使用される場合、強さのレベル、または大きさのレベルの一つが検査され、乳児は検査に合格するか不合格であるかである。（アメリカ言語聴覚協会ウェブサイト）。

[聴覚損失の臨床症状] 聴覚損失は、次の型および発症によって記述される：

[型]

- ・伝音性聴覚損失は、外耳および / または中耳の耳小骨の異常に起因する。
- ・感音性聴覚損失は、内耳構造（すなわち、蝸牛）の機能異常に起因する。
- ・混合聴覚損失は、伝音性および感音性聴覚損失の組み合わせである。
- ・中枢聴覚機能障害は、第 8 脳神経、聴性脳幹、または大脳皮質レベルでの損傷または機能障害に起因する。

[発症]

- ・言語習得前聴覚損失は、発話の発達前に存在する。全ての生まれつきの（出生時の）聴覚損失は、言語習得前であるが、全ての言語習得前聴覚損失は生まれつきではない。
- ・言語習得後聴覚損失は、正常な発話の発達後に起こる。

(Richard J H Smith , MD , et al . ; 難聴および遺伝性聴覚損失概説 (Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview) ; GeneReviews ; 最初の掲載：1999年2月14日；最後の修正：2014年1月9日)

[聴覚損失の重症度] 聴覚は、デシベル (d B) で測定される。各周波数のための閾値または0 dB マークは、正常な若い成人が、ある時間におけるトーンバースト 50 % を認識するレベルに関する。聴覚は、個々の閾値が正常な閾値の 15 d B 以内である場合に正常と考えられる。聴覚損失の重症度は、表 4 に示されるように等級付けられる。

【 0051 】

10

20

30

【表4】

表4. デシベル (dB) での聴覚損失の重症度	
重症度	デシベルでの聴覚閾値
軽度	26 - 40 dB
中等度	41 - 55 dB
やや重度 (Moderate Severe)	56 - 70 dB
重度	71 - 90 dB
深刻	90 dB

10

20

30

40

【0052】

[聴覚障害率] 聴覚障害率を算出するために、25 dBを、500 Hz、1000 Hz、2000 Hz、3000 Hzの純粋な音質平均から減算する。結果に、耳特異的レベルを得るために1.5乗じる。障害は、良い耳に5倍悪い耳を重みづけすることによって決定される(表5参照)。会話音声は、約50~60 dB HL(聴覚レベル)であるので、純粋な音質平均に基づく機能障害の算出は、誤解を招く恐れがある。例えば、45 dB聴覚損失は、30%が示すより機能的にはるかに重大である。異なる評定尺度は、若い子供には適切であり、若い子供にとって一定の制限された聴覚損失は、言語の発達において重大な影響を及ぼし得る[Northern & Downs 2002]。

【0053】

【表5】

表5. 聴覚障害率		
%障害	純粋な音質平均 (dB) *	%残聴
100%	91 dB	0%
80%	78 dB	20%
60%	65 dB	40%
30%	45 dB	70%

* 500 Hz、1000 Hz、2000 Hz、3000 Hzの純粋な音質平均

【0054】

[聴覚損失の周波数] 聴覚損失の周波数は、下記のように指定される:

- ・低い(< 500 Hz)
- ・中間(501 ~ 2000 Hz)

50

・高い(>2000Hz)

[遺伝子治療] 遺伝子治療は、DNAが遺伝病を治療するために患者に導入される場合である。新しいDNAは、通常、既存遺伝子において疾患原因変異の影響を修正するための機能性遺伝子を含む。遺伝子導入は、実験的目的または治療的目的のいずれかのために、遺伝情報を標的細胞に動かすベクターまたはベクターシステムに依存する。ベクターまたはベクターシステムは、遺伝子導入反応の効率、特異性、宿主応答、薬理学、および寿命における重要な決定因と考えられる。最近、遺伝子導入を達成するための最も効率的かつ効果的方法は、複製-欠損を作成しているウイルスに基づかれるベクターまたはベクターシステムの使用を介する(PCT公開No.WO2015/054653;祖先ウイルス配列を予測する方法およびその使用(Methods of Predicting Ancestral Virus Sequences and Uses Thereof))。

[ベクター] 今まで、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルパー依存的アデノウイルス、およびレンチウイルスは、蝸牛遺伝子伝達のために全て試験されている。もちろん、最も潜在性を示しているものは、アデノ関連ウイルス(AAV)であり、アデノ関連ウイルスは、複製せず、内耳に導入遺伝子を効率的に伝達することができ、中毒性難聴の原因とならない。特に、AAVは、内耳有毛細胞に効果的に伝達することができ、このことは、有毛細胞特異的変異のために遺伝子異常を修正することを望む場合に重要な特徴である。今まで、多くの異なるAAVサブタイプが、コルチ器官への任意の損傷をほとんど示すことなく、蝸牛遺伝子伝達のために用いられて成功してきた。AAV血清型1、2、5、6、および8を研究する最近の報告では、有毛細胞、支持細胞、聴覚神経、および螺旋韌帯での成功した遺伝子発現を証明し、最も効果的に遺伝子導入されるのは有毛細胞であることを証明した(Lawrence R. Lustig, MD and Omar Akil, PhD(2012)蝸牛遺伝子治療(Cochlear Gene Therapy). Curr Opin Neurol. 25(1):57-60)。内耳に投与可能なAAVベクターの例は、米国特許出願No.2013/0095071にさらに記述されており、その全体が本明細書に参照によって組み込まれる。

【0055】

修正ができる標的遺伝子のサイズは、AAVの伝達能力に基づいて制限される(Wu, Yang, & Colosio, 2010)。翻訳の目的のために、このことは、劣性聴覚損失を引き起こす比較的小さい遺伝子(<4.6kB)が原因となるこれらの遺伝性疾患に対する潜在的標的を制限する。遺伝子治療薬を発展させるための初期治療として、標的遺伝子変異は比較的よく起こるべきであり、聴覚損失は言語の発達後に起こるべきである。これらの特徴に適合する進行性の聴覚損失を有する患者を特定することは、聴覚損失の進行に介入する、および中断する、またはもしかすると聴覚損失の進行を逆転する機会を提供する。内耳遺伝子治療試験は、後天性難聴のヒトにおいて開始されているので、多くの安全性問題および伝達問題が取り組まれている(臨床試験識別番号NCT02132130)。遺伝子試験の利用可能性および正確性の向上は、これらの型の治療介入から利益を得ることができる患者の同定をもたらすだろう(Preciado et al., 2005)。

[遺伝子治療のマウスモデル]：劣性型遺伝的難聴の様々な異なるマウスモデルは、遺伝子治療を介して救出されている。例えば、聴覚損失を誘導するVGLUT3変異、TLC1変異、フィルリン(whirlin)変異、クラリン(clarin)1変異の修正を含む(Akil et al., 2012; Askew et al., 2015; Chien et al., 2016; Geng et al., 2017; Isgrig et al., 2017)。全てのこれらのモデルは、聴覚の成熟前および内耳有毛細胞の変性前に、新生児のマウス内耳へのベクターの伝達を必要とする。このことは、遺伝子治療戦略を用いて聴覚の救出に作用するために、標的疾患が、聴覚の損失および標的細胞の変性より前に遺伝子治療における伝達を可能にするように、少なくとも人において緩徐

10

20

30

40

50

進行性であるべきである、ということを示す。

[TMPRSS3 遺伝子変異は聴覚損失を誘導する] : TMPRSS3 (DFNA8/10) の変異に関連する聴覚損失は、様々な異なる表現型で存在することができる。生まれつき深刻な聴覚損失、および成人で発症する進行性聴覚損失が記述されている (Weegerink et al., 2011)。現在のところ、Tmprss3 機能障害によるメカニズムは知られていない。出生時の聴覚損失マウス、および少し遅い時期であるがまだ聴覚の成熟前に聴覚損失を発症するマウス、の 2 つのマウスマルクが、今まで発展されている。Fasquelle et al. は、Tmprss3 におけるタンパク質 - 短縮型ナントセンス変異を有するエチル - ニトロソウレア - 誘導変異マウスを生成した。これは、出生後 12 日、聴覚の成熟の前後における有毛細胞の損失および聴覚の悪化を示した。加えて、囊状の有毛細胞に影響を及ぼし、螺旋神経節の遅延型変性が観察された (Fasquelle et al. 2011)。螺旋神経節の変性が、コルチ器官の変性に関連するのか、螺旋神経節における Tmprss3 の機能障害に起因するのかはマウスマルクから明確でない。多くの研究では、マウス内耳における Tmprss3 の分布を評価しており、有毛細胞および螺旋神経節細胞における Tmprss3 の存在を証明している (Fan, Zhu, Li, Ji, & Wang, 2014; Fasquelle et al., 2011)。マウス Tmprss3 の発現を、抗体抗 - TMPRSS3 を用いて 1 月齢の C57BL/10J マウスで評価した (1:100, ab167160, アブカム社 (Abcam), ケンブリッジ、マサチューセッツ)。標識は、内有毛細胞および外有毛細胞、血管条、並びに螺旋神経節細胞の約 50% において観察された (図 5)。このことは、蝸牛内電位の変化がないことが Fasquelle マウスマルクにおいて観察されたけれども (Fasquelle et al., 2011)、Tmprss3 機能の損失は、さらに、strial 機能の損失をもたらす恐れがあることを示す。

【0056】

Tmprss3 遺伝型 - 表現型研究は、生まれつき ~ 成人に発症する深刻な進行性聴覚損失に至るまでの聴覚損失における広範な異なる型を証明する (Chung et al., 2014; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011)。研究では、Tmprss3 変異に起因する聴覚損失は、成人の人工内耳移植を受けている患者の 2% ~ 5% を構成し得ることを示す (Jolly et al., 2012; Miyagawa, Nishio, & Usami, 2016; Sloan-Heggen et al., 2016)。これらの変異を有する多くの患者は、かなりの量の残聴を有する。このことは、治療可能な細胞の基質があることになるので、可能性のある救援治療のために魅力的な標的になるだろう。この変異を有する患者の人工内耳移植の成功についてのいくつかの異なる研究がある。Tmprss3 の損失によって誘導される少なくともいくつかの聴覚損失の形態は、遺伝的難聴の他の形態より、人工内耳移植を伴なう聴覚損失を有する形態と同様に研究できない (Shearer et al. 2017)。このことは、Tmprss3 遺伝子が有毛細胞および最大 50% のらせん神経節細胞の両方に発現されるという事実に潜在的に関する (図 5 参照)。これらの相違は、伝達のためのベクターシステムを選択する場合に考慮される必要がある。ベクターは、強い有毛細胞指向性、並びに有毛細胞と、らせん神経節との組み合わされた指向性を用いて試験されるだろう。ベクター指向性における相違は、新生児の内耳伝達および成人の内耳伝達を比較する場合にも見られている (Shu, Tao, Li, et al., 2016; Shu, Tao, Wang, et al., 2016a)。標的的臨床集団は成熟した聴覚システムを有するヒトであるので、本願に開示されるのは、聴覚の成熟後に聴覚損失の発症を有するマウスマルクであり、病気の進行 (実施例 1 参照) および成人の蝸牛への救援治療のモデル伝達 (実施例 2 参照) の両方のためのモデルとして使用されることがある。

[内耳への伝達のための AA V 血清型] : 広範囲の異なる AA V 血清型は、内耳組織へトランسفェクションするのに有用であることが証明されている (Gyorgy et al., 2017; Shu, Tao, Wang, et al., 2016b; Xia, Yi

10

20

30

40

50

n, & Wang, 2012)。新生児の、および成人の動物においてベクター伝達導入遺伝子の分布に明らかな違いがあり、さらに、有毛細胞へのトランスフェクションを評価する場合、内リンパ、対、内リンパへの伝達に違いがある (Kilpatrick et al., 2011; Wang et al., 2013)。マウスモデルにおいて、内リンパへのベクター伝達は、有毛細胞における向上したトランスフェクションをもたらすが、残聴の損失をもたらし、このことは、進行性聴覚損失のモデルを作ることを難しくする。潜在的に多くの動物またはヒトにおいて、ベクターは、聴覚損失を引き起こすことなく内リンパ囊へ伝達することが可能であるので、トランスフェクション効率を上昇させることができ可能である (Colletti et al., 2010)。プラスミド研究のために、外リンパへの伝達は、マウスの聴覚を評価することを可能にするだろう。AAV2は、成人動物における有毛細胞、および螺旋神経節への伝達を示している (Tao et al., 2017)。AAV2の付加的利点は、ヒト遺伝子治療臨床試験において、すでに広範囲の実績および安全性データを有していることである (Santiago-Ortiz & Schaffter, 2016)。最近、様々な研究は、合成AAV (AAV2/Anc80) が有毛細胞への伝達を向上させるが、天然の (native) AAV2と同等の螺旋神経節への伝達を提供しないことを示している (Landegger et al., 2017; Suzuki, Hashimoto, Xiao, Vandenberghe, & Liberman, 2017)。本発明は、聴覚損失を成人で発症し、およびAAV2またはAAV2/Anc80 TMPRSS3遺伝子治療が聴覚および螺旋神経節機能におけるより良い救出をもたらすかどうかを比較するためのマウスモデルを提供する。
10

[人工多能性幹細胞 (iPSCs)]。人工多能性幹細胞 (iPSまたはiPSCs) は、皮膚、肝臓、胃または他の成熟細胞のような成人細胞から遺伝子の導入を介して作成されている幹細胞であり、細胞を再プログラム化し、細胞を胚性幹細胞の全ての特徴を有する細胞に転換する幹細胞である。多能性という用語は、体の器官、神経システム、皮膚、筋肉、および骨格を形成する全ての3つの胚性系統を含む複数の細胞型を生じさせる細胞の能力を含意する。

[CRISPR/Cas9 遺伝子編集]。本願に記述される方法は、TMPRSS3遺伝子変異、またはLOXHD1遺伝子変異を編集することによって聴覚を救うためのCRISPR/Cas9ゲノム編集の使用も熟慮する。この技術は、2つの遺伝性聴覚損失マウスモデル (Tmc1 and Pmc2) において聴覚をうまく救出するために使用されている (Askev, C et al. (2015))。Tmc遺伝治療は、聴覚障害のあるマウスにおいて聴覚機能を回復させる (Sci Transl Med. 7 (295): 295ra108)。技術は、顕性聴覚損失を標的にするために主に使用されている一方、TMPRSS3ノックーインマウスモデル、および最終的にTMPRSS3遺伝子またはLOXHD1遺伝子における変異によって引き起こされる聴覚損失を有するヒトにおいて、劣性聴覚損失を標的にし、聴覚を回復させるために発展することができる。欠陥遺伝子配列を修復するためのCRISPR/Cas9遺伝子編集の使用は、PCT公開No. WO2016/069910、PCT公開No. WO2015/048577、および米国出願公開No. 2015/0291966にさらに記述されており、それらの全体が本明細書に参照によって組み込まれる。
20
30
40

【実施例】

【0057】

[実施例1 - 患者に見られる出生後に発症する進行性聴覚損失を正確に映し出すTMPRSS3変異のマウスモデル]

[マウスにおけるCRISPR/Cas9システムを有するヒトTMPRSS3変異 [c. 916G>A (p. Ala306Thr)] の標的化変異] : 存在するマウスモデルは、TMPRSS3遺伝子の完全なノックアウトを有し、生まれつきの聴覚損失、または出生後12日で聴覚の発症時の有毛細胞の変性をもたらす (Fasqueille et al., 2011)。この例は、ヒトTMPRSS3変異を有するノックインマウスの発展
50

を記述する。T M P R S S 3におけるc . 9 1 6 G > A (p . A l a 3 0 6 T h r)は、最も一般的な変異であり、中国、ドイツ、オランダ、および韓国からの10以上の様々な民族の聴覚障害のある患者で同定されており、この変異がD F N B 8 / D F N B 1 0表現型の主な原因になることを示す(Chung et al., 2014; Elbracht et al., 2007; Gao et al., 2017; Weegerink et al., 2011)。ヒト変異を有するマウスモデルは、Harms et al.の以前の研究において詳細に記述されるようにC R I S P R / C a s 9技術を用いて生成されるだろう(Harms et al., 2014)。簡潔に、ガイドRNA(gRNA)設計ツールは、遺伝子および対象の変異のための適切なgRNAを選択するために使用され；最小限の予測されたオフ-ターゲットゲノム部位編集を有するgRNAが選択され、対象のゲノム遺伝子座および他の予測されたオフ-ターゲットゲノム部位を増幅するためのプライマーと共に、サービスバイダーによって合成されるだろう。

【0058】

一旦設定されると、マウスは遺伝子型が同定され、A B RおよびD P O A Eを用いて2週齢、4週齢、および12週齢での聴覚損失を評価されるだろう。遅れて発症する聴覚損失において、A B R試験およびD P O A E試験の比較は、T m p r s s 3機能の減少が有毛細胞機能または螺旋神経節機能に非対称に影響を与えるかどうかを証明し得る。このことは、Shearer et al.の観察で与えられた臨床発展のためのベクターの選択に影響を及ぼすだろう(Shearer et al., 2017)。ヒトにおける顕著な表現型はないけれども、マウス変異は、囊状有毛細胞のわずかな変性を示している。前庭系の組織学的評価およびロータロッド試験は、平衡機能障害を検査するために使用されるだろう。蝸牛における変異T m p r s s 3の発現は、定量的R T P C Rによって決定されるだろう。結果は、野生型マウスおよびホモ接合体T m p r s s 3 c . 9 1 6 G > Aのために分析されるだろう。出生後3日齢、並びに2週齢、4週齢および12週齢の蝸牛における組織学的および免疫組織化学的分析は、有毛細胞損失のパターンを特定するために行われるだろう。組織化学的データに基づいて、選択された時点は、有毛細胞生存における基礎頂端勾配があるかどうか決定するための有毛細胞生存における全載分析のために選択されるだろう。示された試料は、不動毛束形態を評価するために走査型電子顕微鏡法によって評価されてもよい。統計学的分析は、反復測定のためにA N O V Aを用いてグラフバッド(Graphpad)ブリズム(Prism)第7版によって行われるだろう。推定された動物は、変異体では時点につきn = 10を使用し、対照では時点につきn = 3を使用する。

【0059】

[c . 9 1 6 G > A (p . A l a 3 0 6 T h r)]によって誘導される聴覚損失の経時変化の確立は、救出研究を行うための時点を設定するだろう。うまくいく場合には、側音(lateral)臨床前安全性研究の経時変化を定義することにもなるだろう。

【0060】

標的変異が、マウスにおいて完全な生まれつきの聴覚損失をもたらす場合、誘導型ノックアウトマウスが設計されてもよい。ヒトは非常に様々な表現型を示すので、このことはマウスにおいて観察されてもよく、統計学的分析を難しくする。このことは、救出実験のために対照として反対側未処理耳を用いることによって対処されることが可能である。交互に、T m p r s s 3の役割を、ヒトiPSCモデルにおいて評価してもよい(実施例4に記述されるように)。聴覚損失の進行は、実験的観察が6月齢にまで拡大される場合に遅延されるかもしれない。

[実施例2 - マウスモデルにおける聴覚損失は、T M P R S S 3遺伝子治療によって阻害される、または回復ことができるかどうかの評価]

様々なベクターが内耳へ遺伝子を伝達するために提案されている。より小さい遺伝子の長期伝達のために、A A Vベクターは広範囲に研究されており、安全であり、広範囲の細胞への伝達を提供する。しかしながら、外有毛細胞へのA A V伝達は、より高力価のベクターでさえ不完全であることが示されている。最近、合成アデノ関連ウイルスベクターA

10

20

30

40

50

A V 2 / A n c 8 0 が開発されており、内有毛細胞および外有毛細胞への優れた伝達を提供する。2つの異なるベクターシステムが試験され、T m p r s s 3 機能が螺旋神経節の救出にも必要とされ得るという潜在性に基づかれるものである。聴覚の救出は、これらの2つのベクターシステムを用いるマウスモデルで比較されるだろう。潜在性結果は、A A V 2 / A n c 8 0 の場合においてより悪いA B R を伴なうD P O A E の救出を含み、このことは有毛細胞に加えて螺旋神経節を治療することの必要性を示すだろう。簡潔にベクターは、実施例1の結果に基づいて聴覚損失の発症を確認される前の1~2週間で後半規管に半規管開口術で伝達されるだろう。対数倍異なる3つの濃度のベクターはマイクロポンプを用いて注入されるだろう。動物の聴覚は、実施例1で決定された時点で一連のA B R およびD P O E A を用いて評価されるだろう。3~6月齢の動物において、蝸牛における組織学的、免疫組織化学的および全載評価によって有毛細胞生存が評価されるだろう。対照は、ベクター(A A V 2 . h C M V . G F P 、またはA A V 2 / A n c 8 0 . h C M V . G F P)を発現するG F P のみで処理された動物からなる。マウスは、任意の前庭システムをさらに示す場合、前庭システム組織学およびロータロッド試験によって評価もされるだろう。加えて、T m p r s s 3 治療の毒性は、T m p r s s 3 発現する両ベクターを用いてトランスフェクションする野生型マウスによって評価されるだろう。統計学的分析は、反復測定のためにA N O V A を用いてグラフバッド(G r a p h p a d)プリズム(P r i s m)第7版によって行われるだろう。結果は、ベクター力価当たりの聴覚に基づいて評価されるだろう。推測される動物は、変異体では時点当たりn = 6 0 (2つのベクター、3つの濃度のベクター、組織学的および全載評価)を使用し、対照では時点当たりn = 3 を使用する。過剰発現研究は、2つのベクターを用いてn = 5 を使用するだろう。

【0061】

T m p r s s 3 遺伝子治療は、聴覚損失の進行を防ぐことを予期される。T m p r s s 3 遺伝子治療では、量的効果と同じように聴覚を救出するための種々のベクターで違いがあつてもよい。

【0062】

聴覚の救出が不完全であることが明らかにされる場合、異なるベクターを設計してもよい。潜在的にT m p r s s 3 の発現は、異なる長さのプロモーターを使用することによって、またはT m p r s s 3 の調節領域を含むことによって最適化される必要があるかもしれない。潜在的にT m p r s s 3 遺伝子治療は、非常に早い時点で内耳に提供されなければならないかもしれない。

[A A V 2 T M P R S S 3 伝達システムの評価] : ヒトC M V (h C M V) プロモーターによって引き起こされるヒトT M P R S S 3 (B C 0 7 4 8 4 7) は、A A V 2 ベクターシステムにおいてクローン化された。ベクターは、塩化セシウム勾配で精製された。力価はp P C R によって決定された(1.1 × 1 0 ^{1 3} G C / m l)。合成および精製後、ベクターを20 μ l 体積にアリコートし、5 % グリセロールを有するP B S 中に80 °で保存した。

[T M P R S S 3 伝達のためのアッセイシステムの発展] : ベクター機能の効率性を評価するために、我々はT M P S S 3 産生を分析するためのシステムを発展させたかった。これは、異なるプロモーターを用いるベクター設計を後に評価するために、およびベクター安全性を評価するためにも役立つだろう。細胞系列は、異なるA A V 血清型を用いるトランスフェクション効率について様々である(E l l i s e t a l . , 2 0 1 3)。様々な細胞系列は、A A V 2 を用いてトランスフェクションされる能力の検査を受けた。残念ながら、A A V 2 を用いてトランスフェクションすることができるいくつかの一般的に使用される細胞系列は、天然の(n a t i v e) T M P R S S 3 を発現する。様々なヒト癌細胞系列が検査され、T M P R S S 3 を発現することがないR N A s e q が確認されている。原発性若年性鼻咽頭血管線維腫(J N A)細胞は、A A V 2 h c m v . g f p を用いてトランスフェクションすることが明らかになった。細胞を、D M E M および10 % 熱不活性化ウシ胎児血清(F B S)(インビトロジェン(I n v i t r o g e n)、カールスバッド、カリフォルニア)を補充されたT - 7 5 フラスコに、37 °で5 % C O ₂ を維持しな

10

20

30

30

40

50

がらプレートに置いた。培地交換は48時間ごとに行つた。細胞がP4に達し90~100%密集になった時、3mlの0.05%トリプシンを洗浄のために加え、吸引し、その後、細胞を除去するために3mlのトリプシンを加えた。インキュベーションを37度で3~5分間行つた。トリプシンを10%FBS/DMEMを用いて中和した。細胞溶液を15mlの円すい状の瓶に集め、1200rpmで5分間、4度で回転した。細胞を、その後、10mlの10%FBS/DMEMで懸濁し、プレートに置き、24時間付着させた。AAV2-TMPrSS3の導入は、細胞を4ウェルチャンバーミリセル(Millicycle EZ)スライド(PEZGS0416、ミリポアシグマ社、バーリントン、マサチューセッツ)に置き、500μLの培地に2μl/ml濃度のAAV2.hcmv.TMPrSS3を有する培地に細胞を播種することによって行つた。細胞培地を24時間後に交換し、その後、トランスフェクション後48時間ごとに細胞が分析されるまで交換した。

[AAV2-TMPrSS3トランスフェクション細胞の免疫細胞化学]：トランスフェクションされたJNA細胞を、PBSを用いて最初に洗浄し、その後PBS中に4%パラホルムアルデヒドを有する溶液を用いて室温で10分間固定化した。細胞を、1%トリトン-X100/1%ウシ胎児血清/10%正常血清を用いて、1時間室温でブロッキングし透過処理した。一次抗体(1:100、ab167160、アブカム社(Abcam)、ケンブリッジ、マサチューセッツ/1:50、GTX81644、ジェーンテックス(GeneTex)社、アーバイン、カリフォルニア)を、4℃で一晩インキュベーションした。次の日、細胞を、PBSを用いてリノンスし、その後、アレクサ(Alexa)フルオロ(Fluor)488(1:500、インビトロジエン(Invitrogen)社、カールスバッド、カリフォルニア)を用いて標識化した。これらの細胞を、PBSを用いてさらに洗浄し、その後、プロロング(ProLong)ゴールド(Gold)退色防止封入培地(インビトロジエン(Invitrogen)社、カールスバッド、カリフォルニア)を用いて0.2μg/ml 4°, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドールと共に染色した。

【0063】

[AAV/Anc80-TMPrSS3-IRES-GFPの構築]我々は、ヒトTMPrSS3全長cDNAをAAV/Anc80ベクターにeGFPマーカーと共にクローニングするだろう。このため、ウイルス感染した細胞をGFP発現によって確認することができる。我々は証明された配列を有するヒトTMPrSS3全長cDNAを得る。我々は、クローニングするためにAAV/Anc80ベクターを使用するだろう。以前に、ヒトISL1遺伝子を同じベクターにクローニングし、新生児のマイスの内耳および成人のマウスの内耳に、蝸牛開口術および半規管開口術それぞれによって、AAV/Anc80-ISL1-IRES-GFPを注入した。AAV/Anc80は、有毛細胞損傷または聴覚損失を引き起こすことなく、新生児の有毛細胞および成人の有毛細胞に効率的に遺伝子伝達を仲介する。導入遺伝子の更なる発現は経時的に維持され、このことは、遺伝子発現を修復するために、および聴覚を回復させるために、Tmprss3^{-/-}有毛細胞におけるTMPrSS3遺伝子を発現するという我々の目標に理想的である(Shuet al., 2016; Tao et al., 2017)。

【0064】

TMPrSS3をAAV/Anc80-TMPrSS3-IRES-GFPベクターにクローニング後、ベクターは10¹²のウイルス価を達成する目的で増幅され、パッケージ化されるだろう。我々は、感染ヒト細胞によってAAV/Anc80-TMPrSS3-IRES-GFPを最初に試験するだろう。我々は、TMPrSS3およびGFPが同じ細胞に発現したかどうか試験するために、抗-TMPrSS3抗体と共に免疫標識を行い、GFPと共に局在化するだろう。インビボ(in vivo)研究のために、我々は、蝸牛開口術によって野生型新生児内耳に、半規管開口術によって成人の内耳にそれぞれ、注入することによってベクターを試験するだろう。注入後2週間、GFP信号が有毛細胞に限定されるかどうか試験するために、マウスの蝸牛を採取するだろう。我々の以前の研究に

10

20

30

40

50

おいて、我々は 100 % の内有毛細胞で強い GFP 発現、および 95 % を超える外有毛細胞で減速した発現を観察した。したがって、我々は TMPRSS3 遺伝子と同様の発現パターンを観察することを期待する。

【0065】

AAV / A n c 8 0 - T M P R S S 3 - G F P を、続いて、聴覚研究された 1 月後に蝸牛開口術によって T m p r s s 3 - / - 蝸牛に注入するだろう。我々は、注入されていない対照内耳と比較して注入された内耳がより良い聴覚を観察することを期待する。このことは、特に T m p r s s 3 - / - マウスが深刻な早期に発症する聴覚損失を患う場合に明白になるだろう。T m p r s s 3 - / - における聴覚損失が、遅発型の進行性である場合に、我々は、例えば 2 月齢および 3 月齢などの後の段階で聴覚救出を観察し始めるかもしれない。聴覚研究は A B R および D P O A E によって行われるだろう。A B R および D P O A E 閾値が、注入された耳において任意の周波数で重大に低い場合に、T m p r s s 3 - / - マウスにおける A A V - 介在聴覚救出の兆候である。我々は、聴覚回復が維持されるかどうか決定するために、6 月間、聴覚救出の進行を観察するだろう。

10

【0066】

T m p r s s 3 - / - マウスにおいて、有毛細胞は最終的に死亡するだろう。AAV - 介在遺伝子伝達を用いて、有毛細胞機能の回復は、経時的に有毛細胞生存につながるようであり、経時的に有毛細胞を蝸牛の長さに沿って数えることによって確認されるだろう。我々は、注入されていない対照の蝸牛と比較して、注入された蝸牛において著しく有毛細胞を観察することを期待する。聴覚結果と細胞生存との比較は、救出治療のために最適なベクターおよびベクター量を決定するだろう。

20

[実施例 3 - T M P R S S 3]

[T M P R S S 3 - 変異マウスモデルの発展] ヒトの状態とできる限り近く似ているマウスマodelの発展は、更なる治療への鍵となる。ノックアウト T m p r s s 3 マウスマodelは、商業業者から入手でき、これらの実施例に記述される実験において使用されてもよい。しかしながら、上述されるような聴覚損失を引き起こす公知のヒト変異体を心にとどめることは、マウスマodelを発展させることに、より関連性があるだろう。モデルは、ヒト変異がヒトと同様にマウスにおいても聴覚損失を引き起こすことを示すことを期待され、このことは、そのモデルを治療のために研究されるのに役立つものにする。遺伝子導入マウスマodelを産生する方法は、当該技術分野において日常的に使用され、当業者に公知であるだろう。重要なことに、マウスマodelを生成する時間は、わずか数年前では平均 2 年であり近頃では C R I S P R / C a s 9 技術を用いると数か月になり著しく短くなっている。したがって、マウスマodelを産生するのにかかる時間は、もはや速度制限因子ではない。我々は、我々の研究のためにヒト変異を有する T M P R S S 3 マウスマodelを作成することを提案している。T M P R S S 3 ノックアウトマウスにおいて、有毛細胞は死に、マウスは深刻な聴覚損失を示す。T m p r s s 3 ノックインマウスマodelの作成後、我々は A B R および D P O A E によって有毛細胞の生存および聴覚損失を研究するだろう。マウスマodelが有毛細胞の損失における進行性聴覚損失を示す場合、そのことは我々がヒト D F N B 8 のための T m p r s s 3 マウスマodelを生成しているという証明である。

30

[遺伝子治療用の A A V - T M P R S S 3 を産生するために] 我々は、T m p r s s 3 変異マウスを治療するために A A V - 介在遺伝子治療を使用するだろう。我々は、研究用に 2 つの A A V ベクター (A n c 8 0 および A A V 2) を同定しているが、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルパー依存的アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、または例えば、A A V 5 、 A A V 6 、 A A V 6 . 2 、 A A V 7 、 A A V 8 、 A A V 9 、 A A V r h 8 、 A A V r h 1 0 、 A A V r h 3 9 、 A A V r h 4 3 、 A A V 1 、 A A V 2 、 A A V 3 、 A A V 4 、 A A V 5 、 A A V 6 、 A A V 7 、もしくは A A V 8 のような他のアデノ関連ウイルスベクターのような、他の発現ベクターを試験してもよい。A n c 8 0 および A A V 2 は共に、正常な聴覚に副作用を及ぼすことなく哺乳類の新生児有毛細胞に遺伝子を高効率的に伝達する。さらに最近、A n c 8 0 および A A V 2 は共に、正常な聴覚に影響を及ぼすことなく成人のマ

40

50

ウス有毛細胞に遺伝子を伝達するために使用されることを示す (Zinn, E. et al., ウィルス進化系統におけるインシリコ再構築は、潜在的な遺伝子治療ベクターを生成する (In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector), Cell Rep. 2015 Aug 11; 12(6): 1056-68; および Askew, C. et al., Tmc遺伝子治療は、聴覚障害マウスにおける聴覚機能を回復させる (Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice), Sci Transl Med. 2015 Jul 8; 7(295): 295ra108)。我々は、AAV-TMPRSS3ウイルスを産生するためにヒトTMPRSS3 cDNAをベクターにクローニングするだろう。我々は、TMPRSS3がインビトロ (in Vitro) 培養システムにおいて使用するために産生されるということを示すために研究を行うだろう。その確認に続いて、AAV-TMPRSS3が、内耳の細胞分析によって、および聴覚研究 (ABR および DPOAE) によって示されるように副作用を有さないことを示すために、AAV-TMPRSS3を新生児の野生型マウス内耳に注入するだろう。

[聴覚の回復におけるAAV-TMPRSS3の研究] 我々は、AAV-TMPRSS3を新生児のTmprss3ノックイン変異マウス内耳に注入するだろう。分析は、AAV-TMPRSS3注入マウスおよびAAV-GFPを注入された対照マウスで行われ、分析には聴覚試験、細胞分子生物学研究、および長期効果を含むだろう。細胞レベルにおいて、我々は、AAV-TMPRSS3が1月齢で有毛細胞生存を促進するかどうか決定するだろう。AAV-GFPを注入された対照変異耳において、我々はこの時点における有毛細胞の損失を観察することを期待する。対照的に、我々はAAV-TMPRSS3を注入されると有毛細胞の生存が観察されることを期待する。我々は、注入工程 (蝸牛開口術、蝸牛窓膜、半規管開口術) および聴覚回復をより良くするための用量を最適化するだろう。重要なことに、我々は、成人 (1月~6月齢) マウスに注入を行い、聴覚回復を評価するだろう。成人への注入結果は、新生児への注入結果と比較され、そのことは、介入が未だ効果的である時間窓について我々に情報を与えるだろう。

[実施例4 - 患者の人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞から生成された有毛細胞の研究]

本研究の一つの重要な態様は、ヒト有毛細胞を用いて我々の作業戦略を証明することである。ヒトの側頭骨は本研究で利用することはできないので、我々は、代わりに患者の線維芽細胞、および対照の家族線維芽細胞を用いて患者のiPS細胞系列を設立するだろう。線維芽細胞は最も頻度の高い変異を有する患者から採取され、iPS細胞系列を設立するだろう。iPS細胞系列は、有毛細胞を含む内耳細胞に分化するだろう。培養システムと共に、AAV-TMPRSS3をiPS誘導有毛細胞に感染するために使用するだろう。感染された有毛細胞は、パッチクランピング (patchy clamping) によって生存および有毛細胞形質導入を研究されるだろう。我々は、未感染および未処理の対照有毛細胞と比較して、有毛細胞生存および有毛細胞機能の向上を観察することを期待する。本研究は、ヒト有毛細胞におけるAAV-TMPRSS3インフェクションおよびTMPRSS3遺伝子発現の効率を評価するための機会を提供するだろう。当該成果は、正常に機能しないヒト有毛細胞がAAV-TMPRSS3で治療できることを証明し、そのことは、AAV-TMPRSS3を未来の臨床研究に向かう主な一歩とする。

[実施例5 - LOXHD1]

[LOXHD1 - 変異マウスモデルの発展] ヒトの状態とできる限り近く似ているマウスマodelの発展は、更なる治療への鍵となる。ノックアウトLOXHD1マウスマodelは、上述されるような聴覚損失を引き起こす公知のヒト変異体を心に抱くモデルを発展させることに関連があるだろう。モデルは、ヒト変異がヒトと同様にマウスにおいても聴覚損失を引き起こすことを示すことを期待され、このことは、そのモデルを治療のために研究されるのに役立つものにする。遺伝子導入マウスマodelを産生する方法は、当該技術分野にお

10

20

30

40

50

いて日常的に使用され、当業者に公知であるだろう。重要なことに、マウスモデルを生成する時間は、わずか数年前では平均2年であり近頃ではC R I S P R / C a s 9技術を用いると数か月になり著しく短くなっている。したがって、マウスモデルを产生するためにかかる時間は、もはや速度制限因子ではない。我々は、我々の研究のためにヒト変異を有するL O X H D 1マウスモデルを作成することを提案している。L O X H D 1ノックアウトマウスにおいて、有毛細胞は死に、マウスは深刻な聴覚損失を示す。L O X H D 1ノックインマウスモデルの作成後、我々はA B RおよびD P O A Eによって有毛細胞の生存および聴覚損失を研究するだろう。マウスモデルが有毛細胞の損失における進行性聴覚損失を示す場合、そのことは我々がヒトD F N B 7 7のためのL O X H D 1マウスモデルを生成しているという証明である。

[遺伝子治療用のA A V - L O X H D 1を产生するために] 我々は、L O X H D 1変異マウスを治療するためにA A V - 介在遺伝子治療を使用するだろう。我々は、研究用に2つのA A Vベクター(A n c 8 0およびA A V 2)を同定しているが、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルバー依存的アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、または例えば、A A V 5、A A V 6、A A V 6 . 2、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V r h 8、A A V r h 1 0、A A V r h 3 9、A A V r h 4 3、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、もしくはA A V 8のような他のアデノ関連ウイルスベクター、のような他の発現ベクターを試験してもよい。A n c 8 0およびA A V 2は共に、正常な聴覚に副作用を及ぼすことなく哺乳類の新生児有毛細胞に遺伝子を高効率的に伝達する。さらに、A n c 8 0およびA A V 2は共に、正常な聴覚に影響を及ぼすことなく成人のマウス有毛細胞に遺伝子を伝達するために使用されることができる(Z i n n , E . e t a l . , ウィルス進化系においてのインシリコ再構築は、潜在的な遺伝子治療ベクターを生成する(I n S i l i c o R e c o n s t r u c t i o n o f t h e V i r a l E v o l u t i o n a r y L i n e a g e Y i e l d s a P o t e n t G e n e T h e r a p y V e c t o r) , C e l l R e p . 1 1 ; 1 2 (6) : 1 0 5 6 - 6 8; およびA s k e w , C . e t a l . , T m c 遺伝子治療は、聴覚障害マウスにおける聴覚機能を回復させる(T m c g e n e t h e r a p y r e s t o r e s a u d i t o r y f u n c t i o n i n d e a f m i c e) , S c i T r a n s l M e d . 7 (2 9 5) : 2 9 5 r a 1 0 8)。我々は、A A V - L O X H D 1ウイルスを产生するためにヒトL O X H D 1c D N Aをベクターにクローン化するだろう。我々は、L O X H D 1がインビトロ(in V i t r o)培養システムにおいて使用するために産生されるということを示すために研究を行うだろう。その確認に続いて、A A V - L O X H D 1が、内耳の細胞分析によって、および聴覚研究(A B RおよびD P O A E)によって副作用を有さないことを示すために、A A V - L O X H D 1を新生児の野生型マウス内耳に注入するだろう。

[聴覚の回復におけるA A V - L O X H D 1の研究] 我々は、A A V - L O X H D 1を新生児のL O X H D 1ノックイン変異マウス内耳に注入するだろう。分析は、A A V - L O X H D 1注入マウスおよびA A V - G F Pを注入された対照マウスで行われ、分析には聴覚試験、細胞分子生物学研究、および長期効果を含むだろう。細胞レベルにおいて、我々は、A A V - L O X H D 1が1月齢で有毛細胞生存を促進するかどうか決定するだろう。A A V - G F Pを注入された対照変異耳において、我々はこの時点における有毛細胞の損失を観察することを期待する。対照的に、我々はA A V - L O X H D 1を注入されると有毛細胞の生存が観察されることを期待する。我々は、注入工程(蝸牛開口術、蝸牛窓膜、半規管開口術)および聴覚回復をより良くするための用量を最適化するだろう。重要なことに、我々は、成人(1月~6月齢)マウスに注入を行い、聴覚回復を評価するだろう。成人への注入結果は、新生児への注入結果と比較され、そのことは、介入が未だ効果的である時間窓についての情報を我々に与えるだろう。

[患者の人工多能性幹細胞(i P S)細胞から生成された有毛細胞の研究]

本研究の一つの重要な態様は、ヒト有毛細胞を用いて我々の作業戦略を証明することで

10

20

30

40

50

ある。ヒトの側頭骨は本研究で利用することはできないので、我々は、代わりに患者の線維芽細胞、および対照の家族線維芽細胞を用いて患者の i P S 細胞系列を設立するだろう。線維芽細胞は最も頻度の高い変異を有する患者から採取され、 i P S 細胞系列を設立するだろう。 i P S 細胞系列は、有毛細胞を含む内耳細胞に分化するだろう。培養システムと共に、 A A V - L O X H D 1 を i P S 誘導有毛細胞に感染するために使用するだろう。感染された有毛細胞は、パッチクランピング (p a t c h y c l a m p i n g) によって生存および有毛細胞形質導入を研究されるだろう。我々は、未感染および未処理の対照有毛細胞と比較して、有毛細胞生存および有毛細胞機能の向上を観察することを期待する。本研究は、ヒト有毛細胞における A A V - L O X H D 1 インフェクションおよび L O X H D 1 遺伝子発現の効率を評価するための機会を提供するだろう。当該成果は、正常に機能しないヒト有毛細胞が A A V - L O X H D 1 で治療されることを証明し、そのことは、 A A V - L O X H D 1 を未来の臨床研究に向かう主な一歩とする。

10

[実施例 6 - 実験方法]

[A B R 測定] : A B R 閾値を知的聴覚システムスマート E P プログラム (I n t e l l i g e n t H e a r i n g S y s t e m s S m a r t E P p r o g r a m) (I H S 社、マイアミ、フロリダ、米国) を用いて記録した。動物は上述されるように麻酔され、温熱パッドで保温した (37) 。針電極を、頂点 (+) 、左耳の後ろ (-) 、反対の耳の後ろ (グランド) に置いた。トーンバーストを、高周波数変換器を用いて 500 μ s の期間で、 4 k H z 、 8 k H z 、 16 k H z 、および 32 k H z において示した。記録は、 100 K と等しい総ゲインを用いて、高周波および低周波通過フィルターのための 100 H z 設定および 15 k H z 設定を用いて行われた。最小の 128 スイープを 90 d B S P L で示した。 S P L は 10 d B ステップで減少した。閾値レベルに近い、最大 1024 プレゼンテーションまで用いて 5 d B S P L ステップを各周波数で行った。閾値は、少なくとも一つの波が 2 以上の反復記録で同定されることが可能である S P L として定義された。術前閾値は最初の操作前に測定され、最後の術後閾値は動物を犠牲にする前に測定された。我々は、各ベクター伝達前および最後のベクター伝達後 3 日にマウスを試験した。

20

[D P O A E 測定] : O H C における機能的損傷を評価するために、歪成分耳音響放射 (D P O A E) および入 / 出力関数 (I / O 関数) を上述の I H S プログラムを用いて両側で記録した。歪成分を、 I H S 高周波数変換器を用いて 2 k H z ~ 32 k H z の純音のために測定した。エティモティック (E t y m o t i c) 10 B + プローブを外耳管に挿入した。 L 1 レベルを 65 d B に設定し、 L 2 レベルを 55 d B に設定した。周波数は、 16 スイープを用いて F 2 - F 1 比が 1.22 と得られた。 I / O 関数は、 16 k H z の周波数で得られた。 65 d B S P L ~ 31 d B S P L の範囲の 9 つの刺激レベルを 5 d B ステップで使用した。マウスは、各ベクター伝達前および最後のベクター伝達後 3 日に試験された。

30

[内耳への T M P R S S 3 発現 A A V の伝達] 全ての手順は、適切な動物実験委員会によって検査され承認された。成人マウスを、 0.9 % 塩化ナトリウム液中にケタミン (150 m g / k g) 、キシロカイン (6 m g / k g) 、およびアセプロマジン (2 m g / k g) の混合物を有する溶液の i . p . 注射で麻酔した。ベクターは、後部半規管にいずれも伝達された。背面耳介後部切開を行って、後部または外側半規管を露出した。マイクロドリルを用いて、蝸牛開口術によって、外リンパ空間を作成し露出した。続いて、 0.5 μ l のベクターを、 0.1 μ l 目盛りを有するハミルトンマイクロシリング、および 36 ゲージ針を用いて注射した。蝸牛開口術は、骨ろうを用いて密封され、動物を回復させることができた。

40

[マウスのロータロッド (R R) 訓練および試験のためのプロトコル] : 訓練のために、マウスを R R ロータロッド (E N V - 575 M 、メド アソシエイティッド インク . (M e d A s s o c i a t e d I n c .) 、ジョージア、米国) に置き、一度に一匹ずつ、プログラムを 4 ~ 40 r p m の速度に初期化した。マウスは落ちる / ジャンプする / 止まる、および最初のスロットで回転すると、マウスは捕らえられ、プログラムを停止す

50

ることなく連続的なスロットに置かれる。処置後、マウスをRRに置き、各スロットに一匹のマウスでプログラムを開始する。マウスが落ちると、マウスは捕らえら、他のマウスがプログラムを終えるのを待つために動物小屋に置かれる。

[参考文献]

Akil, O., Seal, R. P., Burke, K., Wang, C., Alemany, A., During, M., . . . Lustig, L. R. (2012). ウイルス介在遺伝子治療を用いてVGLUT3ノックアウトマウスにおける聴覚の回復 (Restoration of Hearing in the VGLUT3 Knockout Mouse Using Virally Mediated Gene Therapy. *Neuron*), 75(2), 283-293.

10

Askew, C., Rochat, C., Pan, B., Asai, Y., Ahmed, H., Child, E., . . . Holt, J. R. (2015). Tmc遺伝子治療は、聴覚障害マウスの聴覚機能を回復させる (Tmc gene therapy restores auditory function in deaf mice). *Science Translational Medicine*, 7(295), 295ra108.

Chien, W. W., Isgrig, K., Roy, S., Belyantseva, I. A., Drummond, M. C., May, L. A., . . . Cunningham, L. L. (2016). 遺伝子治療は、聴覚障害フィルラーマウスの内耳における有毛細胞不動毛形態を回復させる (Gene Therapy Restores Hair Cell Stereocilia Morphology in Inner Ears of Deaf Whirler Mice). *Molecular Therapy*, 24(1), 17-25.

20

Chung, J., Park, S. M., Chang, S. O., Chung, T., Lee, K. Y., Kim, A. R., . . . Choi, B. Y. (2014). 韓国人の言語習得後難聴において軽度の聴覚表現型に関連する新規TMPRSS3変異：個々の聴覚リハビリテーションのための可能な将来に及ぼす影響 (A novel mutation of TMPRSS3 related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. *Journal of Molecular Medicine*, 92(6), 651-663.

30

Colletti, V., Mandala, M., Carner, M., Barilliari, M., Cerini, R., Pozzi Mucelli, R., & Colletti, L. (2010). ヒト内耳の内リンパ囊から内リンパ部分へのガドリニウム分布の証拠 (Evidence of gadolinium distribution from the endolymphatic sac to the endolymphatic compartments of the human inner ear. *Audiology & Neuro-Otology*, 15(6), 353-63).

40

Elbracht, M., Sendererek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., & Zerres, K. (2007). 常染色体劣性言語習得後聴覚損失 (DFNB) : ドイツ人兄弟における2つの新規TMPRSS3変異のための化合物ヘテロ接合性 (Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel TMPRSS3 mutations in German siblings). *Journal of Medical Genetics*, 44(6), e81.

Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Barker, J. C., Connolly, J. P., Steininger, R. J., & Porteus, M. H. (50

2013). 9つの天然のアデノ関連ウイルス (AAV1-9) および1つの改変されたアデノ関連ウイルス血清型を用いての初代細胞および細胞系列のエキソビボ / インビトロ導入効率の調査 (A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype). *Virology Journal*, 10(1), 74.

Fan, D., Zhu, W., Li, D., Ji, D., & Wang, P. (2014). 常染色体劣性非症候性聴覚損失を有するチベット人家族における新規ホモ接合変異、TMPRSS3 : C. 535G > A の同定 (Identification of a novel homozygous mutation, TMPRSS3 : C. 535G > A, in a tibetan family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss). *PLoS ONE*, 9(12), 1-13.

Fasquelle, L., Scott, H. S., Lenoir, M., Wang, J., Rebillard, G., Gaboyad, S., . . . Delprat, B. (2011). ヒトDFNB8/10難聴における、Tmprss3、膜貫通セリンプロテーゼ欠損は聴覚の発症における蝸牛有毛細胞の生存に重要である (Tmprss3, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing). *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383-17397.

Gao, X., Yuan, Y. Y., Wang, G. J., Xu, J. C., Su, Y., Lin, X., & Dai, P. (2017). TMPRSS3 の新規変異および変異の組み合わせは、常染色体劣性聴覚障害を有する中国人家族において様々な表現型を引き起こす (Novel mutations and mutation combinations of TMPRSS3 cause various phenotype in one Chinese family with autosomal recessive hearing impairment). *Bio Med Research International*, 2017.

Geng, R., Omar, A., Gopal, S. R., Chen, D. H. - C., Stepanyan, R., Basch, M. L., . . . Alagramam, K. N. (2017). アッシャー症候群 III における進行性聴覚損失のモデリングおよび防止 (Modeling and Preventing Progressive Hearing Loss in Usher Syndrome III). *Scientific Reports*, 7(1), 13480.

Gyorgy, B., Sage, C., Indzhykulian, A. A., Scheffer, D. I., Brisson, A. R., Tan, S., . . . Maguire, C. A. (2017). エキソーム関連AAVを用いて内耳有毛細胞への遺伝子伝達による聴覚の救出 (Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV). *Molecular Therapy*, 25(2), 379-391.

Harms, D. W., Quadros, R. M., Seruggia, D., Ohtsuka, M., Takahashi, G., Montoliu, L., . . . Gurumurthy, C. B. (2014). CRISPR/Casシステムを用いてのマウスゲノム編集 (Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System). In *Current Protocols in*

10

20

30

40

50

Human Genetics (p. 15.7.1 - 15.7.27). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Isgriig, K., Shhteamer, J.W., Belyantseva, I.A., Drummond, M.C., Fitzgerald, T.S., Vijayakumar, S., . . . Chien, W.W. (2017). 遺伝子治療は、アッシャー症候群のマウスモデルにおける平衡機能および聴覚機能を回復させる (Gene Therapy Restores Balance and Auditory Functions in a Mouse Model of Usher Syndrome). Molecular Therapy, 25(3), 780 - 791.

Jolly, C., Mistrik, P., Rajan, G., Green, K., Staeker, H., Helbig, S., & Usami, S.-I. (2012). 人工内耳の新しい傾向、並びに深い挿入電極および聴覚保護によって証明された無外傷性 (New trends with cochlear implants and a traumaticity demonstrated by deep electrode insertion and hearing preservation). Practica Oto-Rhino-Laryngologica, (SUPPL. 132).

Kilpatrick, L.A., Li, Q., Yang, J., Goddard, J.C., Fekete, D.M., & Lang, H. (2011). 正常および聴覚障害のある成人のマウスの耳における中央階へのアデノ関連ウイルス介在遺伝子伝達 (Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear). Gene Therapy, 18(6), 569 - 578.

Landegger, L.D., Pan, B., Askew, C., Wassmer, S.J., Gluck, S.D., Galvin, A., . . . Vandenberghe, L.H. (2017). 合成AAVベクターは、哺乳類内耳への安全および効率的な遺伝子伝達を可能にする (A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear). Nature Biotechnology, 35(3), 280 - 284.

Miyagawa, M., Nishio, S.-Y., & Usami, S.-I. (2016). 遺伝疫学を特に重視することを伴なう人工内耳移植を受けている患者の病因における包括的研究 (A Comprehensive Study on the Etiology of Patients Receiving Cochlear Implantation With Special Emphasis on Genetic Epidemiology). Otology & Neurotology, 37(2), e126 - e134.

Preciado, D.a, Lawson, L., Madden, C., Meyer, D., Ngo, C., Bradshaw, J.K., . . . Greinwald, J.H. (2005). 特発性小児感音性聴覚損失における一連の診断的パラダイムを有する向上した診断有効性 (Improved diagnostic effectiveness with a sequential diagnostic paradigm in idiopathic pediatric sensorineural hearing loss). Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology, 26(4), 610 - 5.

Santiago-Ortiz, J.L., & Schaffer, D.V. (2016) 50

) . 癌遺伝子治療におけるアデノ関連ウイルス (AAV) ベクター (Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy .

Shearer, A. E., Eppsteiner, R. W., Frees, K., Tejani, V., Sloan-Heggen, C. M., Brown, C., . . . Smith, R. J. H. (2017) . 末梢の聴覚システムにおける遺伝的変異体は、成人の人工内耳性能に重大に影響を及ぼす (Genetic variants in the peripheral auditory system significantly affect adult cochlear implant performance) . Hearing Research, 348, 138 - 142 .

10

Shu, Y., Tao, Y., Li, W., Shen, J., Wang, Z., & Chen, Z.-Y. (2016) . アデノウイルスベクターは、インビボにおいて哺乳類内耳の様々な細胞サブタイプを標的にする (Adenovirus Vectors Target Several Cell Subtypes of Mammalian Inner Ear In Vivo) . Neural Plasticity, 2016, 1 - 8 .

Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., . . . Chen, Z.-Y. (2016a) . 新生児および成人の哺乳類内耳細胞サブタイプを標的にするアデノ関連ウイルスベクターの同定 (Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes) . Human Gene Therapy, 27(9), 687 - 699 .

20

Shu, Y., Tao, Y., Wang, Z., Tang, Y., Li, H., Dai, P., . . . Chen, Z.-Y. (2016b) . 新生児および成人の哺乳類内耳細胞サブタイプを標的にするアデノ関連ウイルスベクターの同定 (Identification of Adeno-Associated Viral Vectors That Target Neonatal and Adult Mammalian Inner Ear Cell Subtypes) . Human Gene Therapy, 27(9), 687 - 699 .

30

Sloan-Heggen, C. M., Bierer, A. O., Shearer, A. E., Kolbe, D. L., Nishimura, C. J., Frees, K. L., . . . Smith, R. J. H. (2016) . 聴覚損失を有する1119人の患者の臨床評価における包括的な遺伝的試験 (Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss) . Human Genetics, 135(4), 441 - 450 .

Suzuki, J., Hashimoto, K., Xiao, R., Vandenberghe, L. H., & Liberman, M. C. (2017) . 成人マウスにおける祖先AAVを用いての蝸牛遺伝子治療：蝸牛機能障害を起こさない内耳有毛細胞における完全な形質導入 (Cochlear gene therapy with ancestral AAV in adult mice: complete transduction of inner hair cells without cochlear dysfunction) . Scientific Reports, 7, 45524 .

40

Tao, Y., Huang, M., Shu, Y., Ruprecht, A., Wang, H., Tang, Y., . . . Chen, Z.-Y. (2017) . 聴覚機能障害を起こさない成人哺乳類内耳細胞サブタイプにおけるアデノ関連ウイルスベクターの伝達 (Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors in Adult Mammalian Inner Ear Cell Subt

50

ypes without Auditory Dysfunction). Human Gene Therapy, hum. 2017. 120.

Wang, Y., Sun, Y., Chang, Q., Ahmad, S., Zhou, B., Kim, Y., . . . Lin, X. (2013). 出生後早期の中央階へのウイルス接種は、内耳において外因性の緑色蛍光タンパク質の過剰発現を達成し、聴覚脳幹応答閾値を保護した (Early postnatal virus inoculation into the scala media achieved extensive expression of exogenous green fluorescent protein in the inner ear and preserved auditory brainstem response thresholds). The Journal of Gene Medicine, 15 (3 - 4), 123 - 133.

Weegerink, N. J. D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P. L. M., Strom, T. M., Granneman, S., . . . Kunst, H. P. M. (2011). TMPRSS3変異を有するDFNB8 / 10 ファミリーの遺伝型 - 表現型相関 (Genotype - phenotype correlation in DFNB8 / 10 families with TMPRSS3 mutations). J A R O - Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 12 (6), 753 - 766.

Wu, Z., Yang, H., & Coloski, P. (2010). AAVベクター・パッケージングにおける遺伝子サイズの影響 (Effect of genome size on AAV vector packaging). Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy, 18 (1), 80 - 6.

Xia, L., Yin, S., & Wang, J. (2012). アデノ関連ウイルスベクターを用いて新生児マウスにおける内耳遺伝子トランスフェクション: 2つの方法の比較 (Inner Ear Gene Transfection in Neonatal Mice Using Adeno-Associated Viral Vector: A Comparison of Two Approaches). PLoS ONE, 7 (8), e43218.

本発明の一つ以上の実施形態を記述している。それにもかかわらず、様々な修飾が本発明の精神および範囲から逸脱することなく行われてもよい。したがって、他の実施形態は次の特許請求の範囲の範囲内である。

10

20

30

〔 図 1 〕

FIGURE 1

〔 义 2 〕

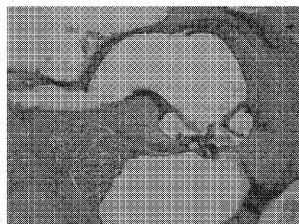
FIGURE 2

〔 図 4 〕

FIGURE 4

【 四 5 】

FIGURE 5



【 図 3 】

FIGURE 3

【配列表】

2020509786000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/022873
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 9/00; A61K 48/00; C12N 9/64; C12N 15/63 (2018.01) CPC - A61K 9/0046; A61K 48/0066; A61K 48/0075; C12N 9/6424; C12N 9/6427 (2018.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/437; 424/94.64; 435/455; 514/44 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7,071,004 B1 (MEYERS et al) 04 July 2006 (04.07.2006) entire document	1, 2, 5, 6, 9, 10, 13
-		3, 4, 7, 8, 11, 12, 14
Y	WO 2004/099779 A1 (BAYER HEALTHCARE AG et al) 18 November 2004 (18.11.2004) entire document	24
Y	US 2013/0095071 A1 (BANCE et al) 18 April 2013 (18.04.2013) entire document	3, 4, 7, 8, 11, 12, 15-23
Y	US 2015/0050354 A1 (MODERNA THERAPEUTICS, INC.) 19 February 2015 (19.02.2015) entire document	14, 23
Y	SCOTT et al. "Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness," Nature Genetics, 31 January 2001 (31.01.2001), Vol. 27, No. 1, Pgs. 59-63. entire document	15-23
P, X	WO 2017/100791 A1 (MASSACHUSETTS EYE AND EAR INFIRMARY et al) 15 June 2017 (15.06.2017) entire document	1-24
<input 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 19 June 2018		Date of mailing of the international search report 06 JUL 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F	I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 リュー シュエ ゾン

アメリカ合衆国 フロリダ州 33156 マイアミ サウスウェスト ワンハンドレッドトゥエンティエイス ストリート 7920

(72)発明者 チェン チャン - イー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02143 サマービル ハドソン ストリート 22

(72)発明者 アヤラ シーザー ジェイムズ

アメリカ合衆国 フロリダ州 32605 ゲインズビル ノースウェスト トゥエンティナインス アヴェニュー 2148

F ターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA02 CA44

4C084 AA13 MA66 MA70 NA14 ZA341 ZB212

4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 MA70 NA14 ZA34 ZB21