

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6754361号
(P6754361)

(45) 発行日 令和2年9月9日 (2020.9.9)

(24) 登録日 令和2年8月25日 (2020.8.25)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 14 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-531531 (P2017-531531)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月16日 (2015.12.16)
 (65) 公表番号 特表2018-500311 (P2018-500311A)
 (43) 公表日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/066206
 (87) 国際公開番号 W02016/100575
 (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)
 審査請求日 平成30年12月12日 (2018.12.12)
 (31) 優先権主張番号 62/092,501
 (32) 優先日 平成26年12月16日 (2014.12.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/146,793
 (32) 優先日 平成27年4月13日 (2015.4.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 507282004
 ボード オブ リージェンツ オブ ザ
 ユニバーシティ オブ ネブラスカ
 アメリカ合衆国 ネブラスカ 68503
 , リンカーン, ホールドレージ スト
 リート 3835
 (73) 特許権者 514137997
 オハイオ・ステイト・イノベーション・フ
 ァウンデーション
 アメリカ合衆国オハイオ州43201, コ
 ロンバス, ノース・ハイ・ストリート 1
 524
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 若年型バッチン病のための遺伝子療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メチルー C P G 結合タンパク質 2 (Me C P 2) プロモーターに作動可能に連結された
ヒト C L N 3 をコードするポリヌクレオチドを含む組換え自己相補的アデノ随伴ウイルス
(s c A A V) ベクター。

【請求項 2】

前記 A A V ゲノムが、天然由来の血清型または分離株もしくはクレードの A A V に由来する、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

前記 A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 8
 または A A V 9 の群から選択される、請求項 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

S V 4 0 もしくは C B A - M V M から選択される 5' U T R / イントロン、または
 最小 S V 4 0 イントロン、または
 ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、S V 4 0 後期ポリアデニル化配列、S V 4 0 初
 期ポリアデニル化配列、A A T A A A (配列番号 3) ポリアデニル化シグナル、C A A T
 A A A (配列番号 4) ポリアデニル化シグナル、A T T A A A (配列番号 5) ポリアデニ
 ル化シグナルまたは T A N A (配列番号 6) ポリアデニル化シグナルから選択されるポリ
 アデニル化シグナル、または

転写後調節エレメント

をさらに含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5】

前記転写後調節エレメントが、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE)、最小ガンマエレメントおよび部分的アルファベータエレメントを含有する WPRE 2、または最小ガンマおよびアルファエレメントを含有する WPRE 3、または B 型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (HPRE) の群から選択される、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

AAV9 ベクターである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 7】

配列番号 2 のヌクレオチド 662～767 の配列を有する 5' AAV 逆方向末端反復 (ITR)、配列番号 2 のヌクレオチド 775～1511 の配列を有する MeCP2 プロモーター、配列番号 2 のヌクレオチド 1520～1616 の配列を有する modSV40 後期 16s インサート、配列番号 2 のヌクレオチド 1683～2999 の配列を有する CLN3 導入遺伝子、配列番号 2 のヌクレオチド 3052～3198 の配列を有する ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル (BGHPA)、及び配列番号 2 のヌクレオチド 3278～3418 の配列を有する 3' ITR を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載のベクターにより形質導入された宿主細胞。

【請求項 9】

細胞に形質導入するための組成物であって、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のベクターを含み、該組成物は、宿主細胞に導入されることを特徴とする、組成物。

【請求項 10】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載のベクターを含む、組換えアデノ随伴ウイルス。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の組換えアデノ随伴ウイルスと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬製剤。

【請求項 12】

若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCL) の処置および／または予防のための組成物であって、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 10 に記載のウイルス、または請求項 11 に記載の製剤を含む、組成物。

【請求項 13】

静脈内投与されることを特徴とする、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

体重 1 kg あたり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピー、または対象あたり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピーで投与されることを特徴とする、請求項 12 または 13 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、2014 年 12 月 16 日に出願された米国仮特許出願番号第 62/092,501 号、および 2015 年 4 月 13 日に出願された米国仮特許出願番号第 62/146,793 号の出願日の利益を主張している。これらの先行する仮特許出願は、それらの全体が参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

(背景)

リソソーム蓄積症は、リソソーム機能にとって重要なタンパク質における変異によって引き起こされる代謝障害の 1 クラスである。多くの種類のリソソーム蓄積症が存在し、各

10

20

30

40

50

々は相対的に珍しいが、それらを組み合わせた有病率は、出生数8, 000につき1例であると推定される (Schultzら (2011年) Trends Neurosci., 34巻: 401~410頁)。若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCLまたは若年型バッテン病) は、出生数100, 000につき約1例出現する致死的な神経変性リソソーム蓄積症であり、これは典型的には、年齢5~10歳の間の小児に見られる。JNCLは、失明として開始し、発作、運動性喪失およびその後の認知機能低下へと進行する (GettyおよびPearce (2011年) Cell. Mol. Life Sci. 68巻: 453~474頁)。

【0003】

若年型バッテン病は、最も一般的には、エクソン7および8における1.02kb欠失による、CLN3遺伝子における常染色体劣性変異によって引き起こされ (Int. Batten Dis. Consortium (1995年) Cell, 82巻: 949~957頁)、CLN3タンパク質は、リソソーム膜および他の膜区画に存することが示されてきたが、その機能は依然として未解明である。CLN3は、エンドサイトーシスおよび細胞内タンパク質輸送、リソソーム恒常性、オートファジー、ミトコンドリア機能、アミノ酸トランスポート、酸化ストレス、神経細胞興奮毒性および細胞周期調節をとりわけ含む、いくつかの細胞過程に関係付けられてきた。

若年型バッテン病は、不溶性封入体の発生をもたらす、リソソームにおける脂質およびタンパク質 (セロイドリポフスチン) の異常な細胞内蓄積によって特徴付けられる。リソソーム封入体は、身体のあらゆる細胞型において形成されるが、ニューロンが最も感受性が高く、進行性の細胞死を起こす (GettyおよびPearce (2011年) Cell. Mol. Life Sci. 68巻: 453~474頁)。この神経細胞死は、中枢神経系 (CNS) が再生できないという事実によってより深刻なものとなる。現在、一様に致死的であり、10代後半または20代前半への平均余命減少を伴う若年型バッテン病に対する処置はない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Schultzら (2011年) Trends Neurosci., 34巻: 401~410頁

【非特許文献2】GettyおよびPearce (2011年) Cell. Mol. Life Sci. 68巻: 453~474頁

【非特許文献3】Int. Batten Dis. Consortium (1995年) Cell, 82巻: 949~957頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(要旨)

若年型バッテン病としても公知の若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCL) ならびに関連する障害および症状の処置のための組成物および方法が、本明細書に提供されている。ある特定の実施形態では、本組成物は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 構築物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなり、この構築物は次いで、ヒトCLN3をコードする核酸 (ヒト遺伝子CLN3 (またはCLN3 cDNA)) を発現するアデノ随伴ウイルス構築物、例えば、自己相補的または非自己相補的アデノ随伴ウイルス (sc-AAV) 構築物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる。例示的であるが非限定的な一実施形態では、AAV-9構築物またはscAAV-9構築物が使用される。AAV構築物は、様々な実施形態では、AAV構築物内で使用できて、ヒトCLN3遺伝子もしくはCLN3 cDNAまたはこれらそれぞれの均等物の発現を駆動することができる種々のプロモーターおよび/またはプロモーター/エンハンサーの組合せを含む。AAV構築物内で使用することができるプロモーターの例として、 β -アクチンプロモーター (例えば、ニワトリ β -アクチンプロモーター)、MeCP2プロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない

。AAV-hCLN3構築物を使用して、脳および他の重大な組織または臓器における野生型CLN3の発現を回復させることができ、これはひいては、JNCLの処置および／またはJNCLに関連する症状の改善に役立ち得る。この遺伝子療法は、特に静脈内注射、頭蓋内注射、くも膜下腔内注射等を含む種々の経路により投与することができる。

【0006】

本明細書に企図されている様々な実施形態として、次のうち1種または複数を挙げることができるが、これらに限定される必要はない：

【0007】

一態様では、本開示は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムまたはその派生体と、CLN3、例えば、ヒトCLN3またはこれらそれぞれの均等物をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含むベクターを提供する。

10

【0008】

別の態様では、本開示は、自己相補的AAV9ゲノムまたはその派生体と、CLN3をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含むベクターであって、プロモーターが、低いCLN3発現を駆動するベクターを提供する。

【0009】

別の態様では、本開示は、哺乳動物における若年型神経セロイドリポフスチン症(JNCL)の処置および／または予防のための方法であって、前記方法が、CLN3を発現する構築物により哺乳動物の細胞を形質転換するステップを含むか、あるいはこれから本質的になるか、あるいはこれからなり、CLN3が、JNCLを処置および／または防止するための有効量で発現される方法を提供する。

20

【0010】

一部の実施形態では、CLN3は、ヒトCLN3である。他の実施形態では、CLN3は、非ヒトCLN3である。

【0011】

一部の実施形態では、AAVゲノムは、天然由来の血清型または分離株もしくはクレードのAAVに由来する。一部の実施形態では、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8またはAAV9の群から選択される。好ましい実施形態では、AAV血清型は、AAV9である。他の実施形態では、AAV血清型は、AAV2である。

30

【0012】

一部の実施形態では、ベクターは、AAV、例えば、一本鎖AAV(ss-AAV)ベクターの派生体である。他の実施形態では、派生体ベクターは、自己相補的AAV(sc-AAV)ベクターである。

【0013】

一部の実施形態では、プロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)、ニワトリβ-アクチン(CBA)、ユビキチンC(UBC)、B-グルクロニダーゼ(GUSB)、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、シナプシン、MeCP2(メチルーCPG結合タンパク質2)、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)、β-アクチン9(例えば、ニワトリベータアクチン)またはCBh(ハイブリッドCBA、またはCBAプロモーターを伴うMVMイントロン)から選択される。

40

【0014】

一部の実施形態では、プロモーターは、ニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト特異的またはニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト優先的プロモーター、例えば、NSE、シナプシン、MeCP2、オリゴデンドロサイト転写因子1(Olig1)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(Cspg4)、CNP(2', 3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ)またはGFAPプロモーターである。

【0015】

一部の実施形態では、ベクターは、SV40またはCBA-MVMから選択される5'

50

UTR／イントロンをさらに含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる。一部の実施形態では、ベクターは、最小SV40イントロンをさらに含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる。他の実施形態では、ベクターは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40後期ポリアデニル化配列、SV40初期ポリアデニル化配列、AATAAA（配列番号3）ポリアデニル化シグナル、CAATAAA（配列番号4）ポリアデニル化シグナル、ATTAAA（配列番号5）ポリアデニル化シグナルまたはTANA（配列番号6）ポリアデニル化シグナルから選択されるポリアデニル化シグナルをさらに含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる。なお他の実施形態では、ベクターは、翻訳後調節エレメントをさらに含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなり、そのようなものの非限定例として、例えば、ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）、最小ガンマエレメントおよび部分的アルファベータエレメントを含有するWPRE2、最小ガンマおよびアルファエレメントを含有するWPRE3、またはB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（HPRE）が挙げられる。

10

【0016】

一部の実施形態では、ベクターは、上述のエレメントのうち1種または複数を含み、ベクターは、自己相補的ゲノムを含むAAV9である。

【0017】

一部の実施形態では、CLN3、例えば、ヒトCLN3またはその均等物をコードするポリヌクレオチドは、MeCP2プロモーターに作動可能に連結されている。

20

【0018】

一部の実施形態では、ベクターは、低いCLN3発現またはその均等物を駆動する。

【0019】

さらなる態様では、本明細書に記載されているベクターは、検出可能な標識である遺伝子またはポリペプチドをさらに含む。そのようなものの例は、図1に例証されている。

【0020】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されているベクターの方法および使用であって、本明細書に記載されているベクターにより、哺乳動物の中樞神経系の細胞を形質転換するステップを含む方法を提供する。他の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されているベクターにより、非CNS組織（複数可）内に含有される細胞を形質転換するステップを含む。

30

【0021】

一部の実施形態では、本方法は、一態様では、ヒトである哺乳動物において行われ、CLN3は、ヒトCLN3またはその均等物である。

【0022】

一部の実施形態では、処置すべきヒトは、CLN3変異に関してホモ接合型である。さらなる態様では、CLN3変異は、ホモ接合型変異を有するヒトにおけるパッテン病の発症に関係する。

【0023】

一部の実施形態では、処置すべき哺乳動物は、ヒト新生児、ヒト乳児またはヒト青年である。他の実施形態では、処置すべき哺乳動物は、ヒト成人である。

40

【0024】

一部の実施形態では、処置すべきヒト患者等の哺乳動物は、JNCLに関して無症候性である。他の実施形態では、処置すべき哺乳動物は、JNCLに関して症候性である、例えば、この哺乳動物は、失明、発作、運動性喪失、認知機能低下またはこれらのいずれかの組合せを呈する。

【0025】

本明細書に開示されている方法は、斯かる処置および／または予防を必要とする哺乳動物に、本明細書に記載されている実施形態のいずれか一つの実施形態に記載のベクターおよび／またはrAAVおよび／またはベクターを含有する医薬製剤を有効量で投与するス

50

テップを含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる。

【0026】

一部の実施形態では、投与は、脳内投与、くも膜下腔内投与、静脈内、経口、エアロゾル投与、吸入による投与（鼻腔内および気管内送達を含む）、静脈内、筋肉内、皮下、皮内および直腸投与のうち1種または複数から選択される経路による。

【0027】

一部の実施形態では、処置レジメンは、単回投与、例えば、単回全身性投与を含む。他の実施形態では、処置レジメンは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10回の投与を含む。投与毎のベクターの投与は、処置している医師または専門家によって決定される通り、同じであっても異なってもよい。

【0028】

一部の実施形態では、各投与は、処置すべき哺乳動物の体重1kg当たり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピーのCLN3またはその均等物を含む。他の実施形態では、各投与は、対象当たり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピーのCLN3またはその均等物を含む。

【0029】

一態様では、本開示は、本明細書に記載されている実施形態のいずれか一実施形態に記載のベクターにより形質導入された宿主細胞を提供する。

【0030】

一態様では、本開示は、細胞に形質導入する方法であって、本明細書に記載されている実施形態のいずれか一実施形態に記載のAAVベクターを含む組成物を宿主細胞に導入するステップを含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなる方法を提供する。

【0031】

別の態様では、本開示は、ヒトCLN3またはその均等物をコードする核酸構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルスを提供する。一実施形態では、アデノ随伴ウイルスは、本明細書に記載されている実施形態のいずれか一実施形態に記載のベクターを含む。

【0032】

別の態様では、本開示は、上述の実施形態のいずれか一実施形態に記載の組換えアデノ随伴ウイルスと、薬学的に許容される担体または希釈剤等の担体とを提供する。一部の実施形態では、製剤は、脳内投与、くも膜下腔内投与、静脈内、経口、エアロゾル投与、吸入による投与（鼻腔内および気管内送達を含む）、静脈内、筋肉内、皮下、皮内および直腸投与からなる群から選択される経路による投与のために製剤化される。他の実施形態では、製剤は、滅菌注射液である。

【0033】

別の態様では、本開示は、若年型神経セロイドリポフスチン症（JNCL）の処置および／または予防のための、本明細書に記載されている実施形態のいずれか一実施形態に記載のベクターの使用を提供する。

特定の実施形態において、例えば、以下が提供される：

（項目1）

哺乳動物における若年型神経セロイドリポフスチン症（JNCL）の処置および／または予防のための方法であって、前記方法が、組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）ゲノムまたはその派生体と、CLN3またはその均等物をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含む組換えベクターにより前記哺乳動物の細胞を形質転換するステップを含み、前記CLN3が、有効量で発現される方法。

（項目2）

前記哺乳動物の中枢神経系の組織を構成する細胞を形質転換するステップを含む、項目1に記載の方法。

10

20

30

40

50

- (項目 3)
非 C N S 組織を構成する細胞を形質転換するステップを含む、項目 1 または 2 に記載の方法。
- (項目 4)
前記哺乳動物が、ヒトであり、前記 C L N 3 が、ヒト C L N 3 である、項目 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 5)
前記ヒトが、C L N 3 変異に関してホモ接合型である、項目 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 6)
前記哺乳動物が、ヒト新生児、ヒト乳児またはヒト青年期である、項目 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 7)
前記哺乳動物が、ヒト成人である、項目 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 8)
前記哺乳動物が、J N C L に関して無症候性である、項目 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 9)
前記哺乳動物が、J N C L に関して症候性である、項目 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 10)
前記哺乳動物が、失明を呈する、項目 9 に記載の方法。
- (項目 11)
前記哺乳動物が、発作を呈する、項目 9 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 12)
前記哺乳動物が、運動性喪失を呈する、項目 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 13)
前記哺乳動物が、認知機能低下を呈する、項目 9 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 14)
前記 C L N 3 が、ヒト C L N 3 である、項目 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 15)
前記 C L N 3 が、非ヒト C L N 3 である、項目 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 16)
前記 A A V ゲノムが、天然由来の血清型または分離株もしくはクレードの A A V に由来する、項目 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 17)
前記 A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 8 または A A V 9 の群から選択される、項目 16 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 18)
前記 A A V 血清型が、A A V 9 である、項目 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 19)
前記 A A V 血清型が、A A V 2 である、項目 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 20)
前記ベクターが、一本鎖 A A V (s s - A A V) ベクターである、項目 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 21)
前記ベクターが、自己相補的 A A V (s c - A A V) ベクターである、項目 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。
- (項目 22)
前記プロモーターが、サイトメガロウイルス (C M V)、ニフトリ β - アクチン (C B

10

20

30

40

50

A)、ユビキチンC (UBC)、B-グルクロニダーゼ (GUSB)、ニューロン特異的エノラーゼ (NSE)、シナプシン、MeCP2 (メチル-CPG結合タンパク質2)、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、 β -アクチン9 (例えば、ニワトリベータアクチン) またはCBh (ハイブリッドCBA、またはCBAプロモーターを伴うMVMイントロン) から選択される、項目1~21のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記プロモーターが、ニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト特異的またはニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト優先的プロモーターである、項目1~22のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

前記プロモーターが、NSE、シナプシン、MeCP2、オリゴデンドロサイト転写因子1 (Olig1)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Cspg4)、CNP (2', 3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ) またはGFAPプロモーターから選択される、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記ベクターが、SV40またはCBA-MVMから選択される5'UTR/イントロンをさらに含む、項目1~24のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記ベクターが、最小SV40イントロンをさらに含む、項目1~25のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

前記ベクターが、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40後期ポリアデニル化配列、SV40初期ポリアデニル化配列、AATAA (配列番号3) ポリアデニル化シグナル、CAATAA (配列番号4) ポリアデニル化シグナル、ATTA (配列番号5) ポリアデニル化シグナルまたはTANA (配列番号6) ポリアデニル化シグナルから選択されるポリアデニル化シグナルをさらに含む、項目1~26のいずれか一項に記載の方法。

(項目28)

前記ベクターが、翻訳後調節エレメントをさらに含む、項目1~27のいずれか一項に記載の方法。

(項目29)

前記転写後調節エレメントが、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE)、最小ガンマエレメントおよび部分的アルファベータエレメントを含有するWPRE2、または最小ガンマおよびアルファエレメントを含有するWPRE3の群から選択される、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記転写後調節エレメントが、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (HPRE) である、項目28に記載の方法。

(項目31)

前記ベクターが、自己相補的ゲノムを含むAAV9である、項目1~30のいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

前記ポリヌクレオチドCLN3が、MeCP2プロモーターに作動可能に連結されている、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記ベクターが、低いCLN3発現またはその均等物を駆動する、項目1~32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記投与が、脳内投与、くも膜下腔内投与、静脈内、経口、エアロゾル投与、吸入による投与 (鼻腔内および気管内送達を含む)、静脈内、筋肉内、皮下、皮内および直腸投与

10

20

30

40

50

からなる群から選択される経路による、項目1～33のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

処置レジメンが、単回投与を含む、項目1～34のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

処置レジメンが、単回全身性投与を含む、項目1～34のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

処置レジメンが、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10回の投与を含む、項目1～34のいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

各投与が、1kg当たり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピーを含む、項目1～37のいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

各投与が、対象当たり約 10^{10} から最大約 10^{16} ゲノムコピーを含む、項目1～38のいずれか一項に記載の方法。

(項目40)

組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムまたはその派生体と、CLN3またはその均等物をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターとを含む組換えベクター。

(項目41)

前記CLN3が、ヒトCLN3である、項目40に記載のベクター。

(項目42)

前記CLN3が、非ヒトCLN3である、項目40に記載のベクター。

(項目43)

前記AAVゲノムが、天然由来の血清型または分離株もしくはクレードのAAVに由来する、項目40～42のいずれか一項に記載のベクター。

(項目44)

前記AAV血清型が、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8またはAAV9の群から選択される、項目43に記載のベクター。

(項目45)

前記AAV血清型が、AAV9である、項目40～44のいずれか一項に記載のベクター。

(項目46)

前記AAV血清型が、AAV2である、項目40～44のいずれか一項に記載のベクター。

(項目47)

一本鎖AAV(ss-AAV)ベクターである、項目40～44のいずれか一項に記載のベクター。

(項目48)

自己相補的AAV(sc-AAV)ベクターである、項目40～44のいずれか一項に記載のベクター。

(項目49)

前記プロモーターが、サイトメガロウイルス(CMV)、ニワトリβ-アクチン(CBA)、ユビキチンC(UBC)、B-グルクロニダーゼ(GUSB)、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、シナプシン、MeCP2(メチルーCPG結合タンパク質2)、グリアル線維酸性タンパク質(GFAP)、β-アクチン(例えば、ニワトリベータアクチン)またはCBh(ハイブリッドCBA、またはCBAプロモーターを伴うMVMイントロン)から選択される、項目40～48のいずれか一項に記載のベクター。

(項目50)

前記プロモーターが、ニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト特異

10

20

30

40

50

的またはニューロン、アストロサイトもしくはオリゴデンドロサイト優先的プロモーターである、項目40～49のいずれか一項に記載のベクター。

(項目51)

前記プロモーターが、NSE、シナプシン、MeCP2、オリゴデンドロサイト転写因子1 (Olig1)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Cspg4)、CNP (2', 3'-環状ヌクレオチド3'-ホスホジエステラーゼ) またはGFAPプロモーターから選択される、項目50に記載のベクター。

(項目52)

SV40またはCBA-MVMから選択される5' UTR/イントロンをさらに含む、項目40～51のいずれか一項に記載のベクター。

(項目53)

最小SV40イントロンをさらに含む、項目52に記載のベクター。

(項目54)

ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、SV40後期ポリアデニル化配列、SV40初期ポリアデニル化配列、AATAA (配列番号3) ポリアデニル化シグナル、CAATAA (配列番号4) ポリアデニル化シグナル、ATTAA (配列番号5) ポリアデニル化シグナルまたはTANA (配列番号6) ポリアデニル化シグナルから選択されるポリアデニル化シグナルをさらに含む、項目40～53のいずれか一項に記載のベクター。

(項目55)

翻訳後調節エレメントをさらに含む、項目40～54のいずれか一項に記載のベクター。

(項目56)

前記転写後調節エレメントが、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE)、最小ガンマエレメントおよび部分的アルファベータエレメントを含有するWPRE2、または最小ガンマおよびアルファエレメントを含有するWPRE3の群から選択される、項目55に記載のベクター。

(項目57)

前記転写後調節エレメントが、B型肝炎ウイルス転写後調節エレメント (HPRE) である、項目55に記載のベクター。

(項目58)

自己相補的ゲノムを含むAAV9である、項目40～57のいずれか一項に記載のベクター。

(項目59)

前記ポリヌクレオチドCLN3が、MeCP2プロモーターに作動可能に連結されている、項目58に記載のベクター。

(項目60)

低いCLN3発現またはその均等物を駆動する、項目40～59のいずれか一項に記載のベクター。

(項目61)

自己相補的AAV9ゲノムまたはその派生体と、CLN3をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターであって、前記プロモーターが、低いCLN3発現を駆動するベクター。

(項目62)

項目40～61のいずれか一項に記載のベクターにより形質導入された宿主細胞。

(項目63)

細胞に形質導入する方法であって、項目40～61のいずれか一項に記載のAAVベクターを含む組成物を宿主細胞に導入するステップを含む方法。

(項目64)

ヒトCLN3をコードする核酸構築物を含む組換えアデノ随伴ウイルス。

(項目65)

10

20

30

40

50

項目40～61のいずれか一項に記載のベクターを含む、項目64に記載のアデノ随伴ウイルス。

(項目66)

項目64～65のいずれか一項に記載の組換えアデノ随伴ウイルスと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬製剤。

(項目67)

脳内投与、くも膜下腔内投与、静脈内、経口、エアロゾル投与、吸入による投与（鼻腔内および気管内送達を含む）、静脈内、筋肉内、皮下、皮内および直腸投与からなる群から選択される経路による投与のために製剤化されている、項目66に記載の医薬製剤。

(項目68)

滅菌注射液である、項目67に記載の医薬製剤。

(項目69)

項目40～61のいずれか一項に記載のベクターおよび／または項目64～65のいずれか一項に記載のrAAVおよび／または項目66～68のいずれか一項に記載の医薬製剤を前記哺乳動物に投与するステップを含む、項目1～39のいずれか一項に記載の方法。

(項目70)

若年型神経セロイドリポフスチン症（JNCL）の処置および／または予防のための、項目40～61のいずれか一項に記載のベクターの使用。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、例証的なAAV9-hCLN3構築物を描写する。各構築物は、同一の最小SV40イントロン（「イントロン」と標識）、ヒトCLN3-cDNA、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル（「PA」）および自己相補的（sc）ウイルスをパッケージするためのウイルス末端逆位反復配列を含有する。第1の構築物は、高発現ニワトリβ-アクチンプロモーターを含有する一方、第2の構築物は、マウスMeCP2遺伝子由来の最小必須プロモーターを含有する。対照構築物は、ヒトCLN3-cDNAを、緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードするポリヌクレオチドに置き換える。

【0035】

【図2A】図2A～図2Fは、scAAV9/MeCP2-hCLN3を使用したCLN3補充（replacement）が、CLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動行為を改善することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（8匹／群）に、 2×10^{12} ウイルスゲノム（vg）のscAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3または対照としてのGFP発現ウイルスの1回のi.v.注射を与え、その上で、1ヶ月（図2A）、2ヶ月（図2B）、3ヶ月（図2C）、4ヶ月（図2D）および5ヶ月（図2E）目に、加速ロータロッドおよびポール降下（pole descent）検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図2Fは、図2A～図2Eに描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動行為改善を示す。

【図2B】図2A～図2Fは、scAAV9/MeCP2-hCLN3を使用したCLN3補充（replacement）が、CLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動行為を改善することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（8匹／群）に、 2×10^{12} ウイルスゲノム（vg）のscAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3または対照としてのGFP発現ウイルスの1回のi.v.注射を与え、その上で、1ヶ月（図2A）、2ヶ月（図2B）、3ヶ月（図2C）、4ヶ月（図2D）および5ヶ月（図2E）目に、加速ロータロッドおよびポール降下（pole descent）検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図2Fは、図2A～図2Eに描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動行為改善を示す。

【図2C】図2A～図2Fは、scAAV9/MeCP2-hCLN3を使用したCLN

10

20

30

40

50

3 補充 (replacement) が、CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為を改善することを示す。1 ヶ月齢 CLN3^{Δex7/8} マウス (8 匹/群) に、 $2 \times 10^{1.2}$ ウイルスゲノム (vg) の scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3 または対照としての GFP 発現ウイルスの 1 回の i. v. 注射を与え、その上で、1 ヶ月 (図 2 A)、2 ヶ月 (図 2 B)、3 ヶ月 (図 2 C)、4 ヶ月 (図 2 D) および 5 ヶ月 (図 2 E) 目に、加速ロータロッドおよびポール降下 (pole descent) 検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図 2 F は、図 2 A~図 2 E に描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を与えた CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為改善を示す。

【図 2 D】図 2 A~図 2 F は、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を使用した CLN3 3 補充 (replacement) が、CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為を改善することを示す。1 ヶ月齢 CLN3^{Δex7/8} マウス (8 匹/群) に、 $2 \times 10^{1.2}$ ウイルスゲノム (vg) の scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3 または対照としての GFP 発現ウイルスの 1 回の i. v. 注射を与え、その上で、1 ヶ月 (図 2 A)、2 ヶ月 (図 2 B)、3 ヶ月 (図 2 C)、4 ヶ月 (図 2 D) および 5 ヶ月 (図 2 E) 目に、加速ロータロッドおよびポール降下 (pole descent) 検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図 2 F は、図 2 A~図 2 E に描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を与えた CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為改善を示す。

【図 2 E】図 2 A~図 2 F は、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を使用した CLN3 3 補充 (replacement) が、CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為を改善することを示す。1 ヶ月齢 CLN3^{Δex7/8} マウス (8 匹/群) に、 $2 \times 10^{1.2}$ ウイルスゲノム (vg) の scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3 または対照としての GFP 発現ウイルスの 1 回の i. v. 注射を与え、その上で、1 ヶ月 (図 2 A)、2 ヶ月 (図 2 B)、3 ヶ月 (図 2 C)、4 ヶ月 (図 2 D) および 5 ヶ月 (図 2 E) 目に、加速ロータロッドおよびポール降下 (pole descent) 検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図 2 F は、図 2 A~図 2 E に描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を与えた CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為改善を示す。

【図 2 F】図 2 A~図 2 F は、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を使用した CLN3 3 補充 (replacement) が、CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為を改善することを示す。1 ヶ月齢 CLN3^{Δex7/8} マウス (8 匹/群) に、 $2 \times 10^{1.2}$ ウイルスゲノム (vg) の scAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3 または対照としての GFP 発現ウイルスの 1 回の i. v. 注射を与え、その上で、1 ヶ月 (図 2 A)、2 ヶ月 (図 2 B)、3 ヶ月 (図 2 C)、4 ヶ月 (図 2 D) および 5 ヶ月 (図 2 E) 目に、加速ロータロッドおよびポール降下 (pole descent) 検査を行った。*、 $p < 0.05$ 。図 2 F は、図 2 A~図 2 E に描写されているデータを要約し、scAAV9/MeCP2-hCLN3 を与えた CLN3^{Δex7/8} マウスにおける運動行為改善を示す。

【0036】

【図 3】図 3 は、scAAV9 形質導入後の脳における用量依存性 hCLN3 発現を例示する。1 ヶ月齢 CLN3^{Δex7/8} マウス (4 匹/群) に、 $2 \times 10^{1.2}$ vg の scAAV9/β-アクチン-hCLN3 または scAAV9/MeCP2-hCLN3 の 1 回の i. v. 注射を与え、その上で、5 ヶ月後に、qRT-PCR により表示の脳領域 (CB、小脳; TH、視床; HPC、海馬; STR、線条体; および VC、視覚皮質) における hCLN3 mRNA 発現を定量化した。結果は、scAAV9/MeCP2-hCLN3 と比較した、scAAV9/β-アクチン-hCLN3 を与えたマウスにおける hCLN3 発現の倍数増加として表現する。

【0037】

【図 4】図 4 は、scAAV9 形質導入後の脳における用量依存性 GFP 発現を例示する

。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（3匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPの1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、ローディング対照として β -アクチンを用いたウェスタンブロットにより、表示の脳領域（CB、小脳；TH、視床；HPC、海馬；STR、線条体；VC、視覚皮質；S1BF、体性感覚野バレル皮質（somatosensory barrel field cortex））におけるGFP発現を定量化した。

【0038】

【図5】図5A～図5Bは、それぞれ形質導入5ヶ月および13ヶ月後の、共焦点顕微鏡により可視化された、脳領域および網膜におけるscAAV9/ β -アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPの体内分布を示す。

10

【0039】

【図6】図6A～図6Bは、GFP⁺細胞の数によって描写される、投与5ヶ月後のCLN3^{Δex7/8}マウスの脳におけるscAAV9/ β -アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPの比較体内分布を示す。

【0040】

【図7A】図7A～図7Gは、CLN3補充が、リソソーム封入体を低下させることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（4匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはscAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質（S1BF）（図7A）、線条体（STR）（図7B）、視覚皮質（VC）（図7C）、視床（TH）（図7D）、海馬（HP）（図7E）、小脳（CB）（図7F）におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

20

【図7B】図7A～図7Gは、CLN3補充が、リソソーム封入体を低下させることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（4匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはscAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質（S1BF）（図7A）、線条体（STR）（図7B）、視覚皮質（VC）（図7C）、視床（TH）（図7D）、海馬（HP）（図7E）、小脳（CB）（図7F）におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

30

【図7C】図7A～図7Gは、CLN3補充が、リソソーム封入体を低下させることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（4匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはscAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質（S1BF）（図7A）、線条体（STR）（図7B）、視覚皮質（VC）（図7C）、視床（TH）（図7D）、海馬（HP）（図7E）、小脳（CB）（図7F）におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

【図7D】図7A～図7Gは、CLN3補充が、リソソーム封入体を低下させることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（4匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはscAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質（S1BF）（図7A）、線条体（STR）（図7B）、視覚皮質（VC）（図7C）、視床（TH）（図7D）、海馬（HP）（図7E）、小脳（CB）（図7F）におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

40

【図7E】図7A～図7Gは、CLN3補充が、リソソーム封入体を低下させることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス（4匹/群）に、 2×10^{12} vgのscAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはscAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi.v.注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質（S1BF）（図7A）、線条体（STR）（図7B）、視覚皮質（VC）（図7C）、視床（TH）（図7D）、海馬（HP）（図7E）、小脳（CB）（図7F）におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

50

i. v. 注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質 (S1BF) (図7A)、線条体 (STR) (図7B)、視覚皮質 (VC) (図7C)、視床 (TH) (図7D)、海馬 (HP) (図7E)、小脳 (CB) (図7F) におけるリソソーム封入体を定量化した。*、 $p < 0.05$ 。S1BF、VCおよびTHにおける媒体およびMeCP2-hCLN3の比較の概要を図7Gに示す。

【0041】

【図8A】図8A～図8Cは、脳組織の形質導入におけるscAAV9の全身性投与の効果を示す。図8Aは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるニューロンに形質導入することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス(4匹/群)に、 2×10^{12} vgのscAAV9/MeCP2-GFP、i. v. の1回の注射を与え、その上で、5ヶ月後に脳組織を収集し、共焦点顕微鏡で表示の脳領域におけるNeuN、GFPおよび核(DAPI)を染色した。挿入図は、より大きい拡大率で表示される領域を描写する。図8Bは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるアストロサイトに形質導入することを示す。図8Cは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるマイクログリアに形質導入しないことを示す。

【図8B】図8A～図8Cは、脳組織の形質導入におけるscAAV9の全身性投与の効果を示す。図8Aは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるニューロンに形質導入することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス(4匹/群)に、 2×10^{12} vgのscAAV9/MeCP2-GFP、i. v. の1回の注射を与え、その上で、5ヶ月後に脳組織を収集し、共焦点顕微鏡で表示の脳領域におけるNeuN、GFPおよび核(DAPI)を染色した。挿入図は、より大きい拡大率で表示される領域を描写する。図8Bは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるアストロサイトに形質導入することを示す。図8Cは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるマイクログリアに形質導入しないことを示す。

【図8C】図8A～図8Cは、脳組織の形質導入におけるscAAV9の全身性投与の効果を示す。図8Aは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるニューロンに形質導入することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス(4匹/群)に、 2×10^{12} vgのscAAV9/MeCP2-GFP、i. v. の1回の注射を与え、その上で、5ヶ月後に脳組織を収集し、共焦点顕微鏡で表示の脳領域におけるNeuN、GFPおよび核(DAPI)を染色した。挿入図は、より大きい拡大率で表示される領域を描写する。図8Bは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるアストロサイトに形質導入することを示す。図8Cは、scAAV9の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるマイクログリアに形質導入しないことを示す。

【0042】

【図9】図9は、ヒト若年型パッテン病の特徴であり、CLN3^{Δex7/8}脳にも観察されるGFAP⁺反応性アストロサイトが、scAAV9/MeCP2-hCLN3の全身性投与後のマウスにおいて有意に低下されることを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス(4匹/群)に、scAAV9/MeCP2-hCLN3の1回のi. v. 注射を与え、その上で、5ヶ月後に、定量的共焦点顕微鏡により、体性感覚野バレル皮質における反応性アストロサイト(GFAP⁺)を定量化した。***、 $p < 0.001$ 。

【0043】

【図10】図10は、scAAV9/MeCP2-hCLN3を使用したCLN3補充が、CLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動行為を改善することを示す。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウス(8匹/群)に、 2×10^{12} vgのscAAV9/MeCP2-hCLN3、scAAV9/β-アクチン-hCLN3または対照としてのGFP発現ウイルスの1回のi. v. 注射を与え、その上で、形質導入11ヶ月後に粘着テープ除去検査を行ったところ、scAAV9/MeCP2-hCLN3を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスにおいて、タッチするまでの時間の低下(左パネル)および除去するまでの時間の低下(右パネル)を示した。

【0044】

【図11】図11は、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFP、scAAV9/MeCP2-GFPの、CLN3^{Δex7/8}マウスへの全身性(system) AAV9導入遺伝子送達の効果を示す。結果は、毎週決定される体重のグラム数として表現する。

【0045】

【図12-1】図12は、感染1ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【図12-2】図12は、感染1ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

10

【図12-3】図12は、感染1ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【図12-4】図12は、感染1ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

20

【図12-5】図12は、感染1ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【0046】

【図13-1】図13は、感染10ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

30

【図13-2】図13は、感染10ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【図13-3】図13は、感染10ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【図13-4】図13は、感染10ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

40

【図13-5】図13は、感染10ヶ月後の、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスの正常血清化学プロファイルを実証する。

【0047】

【図14A-C】図14A~図14Fは、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスが、全身性炎症性変化の証

50

拠を示さないことを実証する。

【図14D-F】図14A~図14Fは、AAV9/β-アクチン-hCLN3、scAAV9/MeCP2-hCLN3、AAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPを投与したCLN3^{Δex7/8}マウスが、全身性炎症性変化の証拠を示さないことを実証する。

【発明を実施するための形態】

【0048】

(詳細な説明)

記載されている特定の実施形態は当然ながら変動し得るため、本発明が、記載されている特定の実施形態に限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書に使用されている用語法が、単に特定の実施形態を記載することを目的としており、限定することを目的としないことも理解されたい。

【0049】

本発明の詳細な説明は、単に読者に便宜を図るために様々なセクションに分割されており、いずれかのセクションに見出される開示は、別のセクションにおける開示と組み合わせることができる。他に規定がなければ、本明細書に使用されているあらゆる技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意義を有する。本発明の実施または検査において、本明細書に記載されているものと同様または均等ないかなる方法および材料を使用してもよいが、好まれる方法および材料をここに記載する。本明細書に言及されているあらゆる刊行物は、刊行物が引用されているものに関連して方法および/または材料を開示および記載するために、参照により本明細書に組み込まれている。

【0050】

あらゆる数値指定、例えば、範囲を含むpH、温度、時間、濃度および分子量は、必要に応じて増分0.1または1.0で(+)または(-)に変動する近似である。必ずしも明確に記述されているとは限らないが、あらゆる数値指定には、用語「約」が先行していることを理解されたい。必ずしも明確に記述されているとは限らないが、本明細書に記載されている試薬が、単に例証的なものであり、そのようなものの均等物が本技術分野で公知であることも理解されたい。

【0051】

本明細書において使用される場合、また、添付の特許請求の範囲において、文脈が明らかにそれ以外を指示しない限り、単数形「a」、「an」および「the」が、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。よって、例えば、「1個の細胞(a cell)」の参照は、複数の細胞を含む。

【0052】

I. 定義

本明細書において使用される場合、次の用語は、次の意義を有する。

用語「約」は、数値指定、例えば、範囲を含む温度、時間、量、濃度およびその他の前に使用される場合、(+)または(-)10%、5%または1%変動し得る近似を示す。

【0053】

「を含んでいる(comprising)」または「を含む(comprises)」は、組成物、例えば、培地および方法が、列挙されている要素を含む(include)が、それ以外を除外しないことを意味することを目的とする。「から本質的になる」は、組成物および方法の定義に使用される場合、記述されている目的のために、組合せにとって少しでも本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものである。よって、本明細書に定義されている要素から本質的になる組成物は、請求されている発明の基本および新規の特徴(複数可)に大幅な影響を与えない他の材料またはステップを除外しないであろう。「からなる」は、他の成分および実質的な方法ステップの微量な要素を超えるものを除外することを意味するものである。これらの移行句のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内

にある。

【0054】

本明細書において使用される場合、用語「ベクター」は、宿主細胞への遺伝子材料の伝達に使用されるポリヌクレオチド構築物、典型的にはプラスミドまたはウイルスを指す。ベクターは、例えば、ウイルス、プラスミド、コスミドまたはファージであることができる。本明細書において使用されるベクターは、DNAまたはRNAのどちらかで構成される。一部の実施形態では、ベクターは、DNAで構成される。「発現ベクター」は、適切な環境中に存在する場合、ベクターによって運搬される1種または複数の遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を導くことができるベクターである。ベクターは、好ましくは、自律的に複製することができる。典型的には、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は、通常、プロモーターの制御下に置かれ、遺伝子は、プロモーター「に作動可能に連結された」と言われる。

10

【0055】

本明細書において使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、調節エレメントおよび遺伝子またはそのコード領域の間の接続を記載するために使用されている。典型的には、遺伝子発現は、1種または複数の調節エレメント、例えば、限定することなく、構成的または誘導性プロモーター、組織特異的調節エレメントおよびエンハンサーの制御下に置かれる。遺伝子またはコード領域は、調節エレメント「に作動可能に連結された」または「に操作可能に連結された」または「と作動可能に会合された」と言われ、これは、遺伝子またはコード領域が、調節エレメントによって制御または影響されていることを意味する。例えば、プロモーターが、コード配列の転写または発現をもたらす場合、プロモーターは、コード配列に作動可能に連結されている。

20

【0056】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、本明細書において、互換的に使用されている。一部の実施形態では、核酸は、共有結合により一体に連結された少なくとも2個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、本発明の核酸は、一本鎖である。一部の実施形態では、核酸は、二本鎖である。一部の実施形態では、核酸は、三本鎖である。一部の実施形態では、核酸は、ホスホジエステル結合を含む。一部の実施形態では、核酸は、一本鎖もしくは二本鎖のデオキシリボ核酸（DNA）または一本鎖もしくは二本鎖のリボ核酸（RNA）を含む。一部の実施形態では、核酸は、核酸アナログを含む。一部の実施形態では、核酸アナログは、非限定例により、ホスホラミド、ホスホロチオエート、ジチオリン酸またはO-メチルホスホラミダイト（methylphosphoroamidite）結合等、ホスホジエステル結合以外のおよび／またはそれに加えた結合を含む骨格を有する。一部の実施形態では、核酸アナログは、正の（positive）骨格；非イオン性骨格および非リボース骨格から選択される骨格を備える核酸アナログから選択される。一部の実施形態では、核酸は、1個または複数の炭素環式糖を含有する。一部の実施形態では、核酸は、そのリボース-リン酸骨格の修飾を含む。一部の実施形態では、そのような修飾は、標識等、追加的な部分の付加を容易にするために行われる。一部の実施形態では、そのような修飾は、生理学的環境における斯かる分子の安定性および半減期を増加させるために行われる。

30

【0057】

用語「調節エレメント」および「発現制御エレメント」は、互換的に使用されており、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に影響を与えることができる核酸分子を指す。これらの用語は、広く使用されており、転写を促進または調節するあらゆるエレメントを網羅し、プロモーター、RNAポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要とされるコアエレメント、上流エレメント、エンハンサーおよび応答エレメントを含む（例えば、Lewin「Genes V」（Oxford University Press, Oxford）847～873頁を参照）。原核生物における例示的であるが非限定的な調節エレメントは、宿主細胞におけるコード配列の発現および／またはコードされたポリペプチドの産生をもたらす、そして／または調節するプロモーター、オペレーター配列、リボソーム結合部位、プロモーター等の転写および翻訳制御配列、エンハンサー、スプライシングシグナ

40

50

ル、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナル、配列内リボソーム進入エレメント（IRES）、2A配列等を含む。

【0058】

本明細書において使用される場合、用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を可能にし、遺伝子の転写を導くヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、遺伝子の5'非コード領域中に、遺伝子の転写開始部位に対して近位に位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは多くの場合、コンセンサスヌクレオチド配列によって特徴付けられる。プロモーターの例として、細菌、酵母、植物、ウイルスおよび哺乳動物（ヒトを含む）由来のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。プロモーターは、誘導性、抑圧可能および／または構成的であってよい。誘導性プロモーターは、その制御下において、温度変化等、培養条件におけるある変化に回答して、DNAからの増加したレベルの転写を惹起する。

10

【0059】

本明細書において使用される場合、用語「エンハンサー」は、転写の効率を増加させることができる調節エレメントの種類を指す。ある特定の実施形態では、エンハンサーは、転写の開始部位に対するエンハンサーの距離または配向性に関係なく、転写を増加させるように作用する。

【0060】

本明細書において使用される場合、用語「トランスフェクション」は、「形質導入」と同義であり、宿主細胞への外来性核酸等の核酸の導入を指す。ある特定の実施形態では、この導入は、導入しようとする核酸（例えば、発現カセット）を含む組換えAAVウイルスまたはベクターと細胞との接触によって為される。AAVゲノムは、ヒトおよび他の霊長類に感染するアデノ随伴ウイルスに全体的にまたは部分的に由来するゲノムである。AAVゲノムは、ポジティブまたはネガティブ・センスのいずれかの一本鎖DNA（ssDNA）で構成される。ゲノムは、DNAの両端における末端逆位反復配列（ITR）および2個のオープンリーディングフレームを含む。自己相補的AAV（scAAV）は、野生型AAVから作製されたウイルスベクターである。自己相補的AAVは、AAV派生体の例であり、分子内二本鎖DNA鋳型を形成するように設計された、AAVに由来する遺伝子操作されたウイルスベクターである。

20

【0061】

本明細書において使用される場合、用語「導入遺伝子」は、標的細胞にトランスフェクトされる、任意のヌクレオチドまたはDNA配列を指す。導入遺伝子を含む構築物は、安定的エピソームとして存在することができるか、または標的細胞の1本もしくは複数の染色体に組み込むことができる。一部の実施形態では、導入遺伝子は、目的のタンパク質（例えば、CLN3）をコードするポリヌクレオチドを含む。所望のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは一般に、プロモーター、エンハンサー、転写調節配列等、目的の遺伝子の所望の発現を得るために有用な他の配列に操作可能に連結されている。

30

【0062】

本明細書において使用される場合、セロイドーリポフスチン沈着症、ニューロナル3遺伝子（または「CLN3遺伝子」）は、リソソーム機能に関与するタンパク質をコードする核酸を意図する。この遺伝子における変異は、神経変性疾患を引き起こす。ヒトタンパク質をコードする核酸およびヒトタンパク質は、本技術分野で公知であり、GenBank受託番号NM_001042432（最終アクセス2015年12月15日）に提供されており、非ヒトCLN3遺伝子の例は、ウェブサイトgenenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:2074、最終アクセス2015年12月15日で入手できるラットおよびマウスホモログである。

40

【0063】

本明細書において使用される用語「処置、処置する、処置している等」としては、疾患もしくは状態（例えば、若年型神経セロイドリポフスチン症（JNCLまたは若年型パッテン病））の症状の軽減、ならびに／または疾患もしくは状態の進行、重症度および／も

50

しくは範囲の低下、抑制、阻害、和らげる、緩和もしくは影響が挙げられるがこれらに限定されない。「処置」は、治療的処置および予防的または防止的方策の一方または両方を指す。処置を必要とする対象は、疾患または障害または望まれない生理学的状態に既に罹患した対象と共に、疾患または障害または望まれない生理学的状態が防止されるべき対象を含む。

【0064】

用語「有効量」は、本明細書において使用される場合、疾患もしくは状態を処置もしくは緩和することができるか、または他の仕方で意図される治療効果を生じることができる量を指す。ある特定の実施形態では、有効量は、J N C L の 1 種または複数の症状の発病の低下、防止または遅延に十分な量である。斯かる症状として、視覚障害または失明、発作、パーソナリティおよび／または行動変化、学習の遅さ (slow learning)、不器用、口ごもり (stumbling)、精神的機能障害ならびに運動技能の喪失を挙げることができるがこれらに限定されない。

10

【0065】

用語「患者」、「対象」または「哺乳動物対象」は、本明細書において、互換的に使用されており、本明細書に記載されている処置または予防的方法（例えば、J N C L の処置または予防のための方法）を必要とするいずれかの哺乳動物を含む。斯かる哺乳動物は、特にヒト（例えば、胎児期ヒト、ヒト乳児、ヒト十代、ヒト成人等）を含む。斯かる処置または予防を必要とする他の哺乳動物は、イヌ、ネコまたは他の飼育慣らされた動物、ウマ、家畜、実験動物（例えば、ウサギ類、非ヒト霊長類等）等、非ヒト哺乳動物を含むことができる。対象は、雄であっても雌であってもよい。ある特定の実施形態では、対象は、J N C L のリスクがあるが、無症候性である（例えば、臨床徴候が明らかになる前に J N C L の遺伝子診断がある小児（これは滅多に起きない）、または臨床症状が発症する前の年齢（すなわち、出生から 4 ～ 5 歳前後）の J N C L の遺伝子診断がある小児、例えば、J N C L の確認された診断がある兄または姉によって遺伝子検査が為される場合）。ある特定の実施形態では、対象は、J N C L の症状を発現する。

20

【0066】

用語、対象にベクターを「投与すること」または対象へのベクターの「投与」は、その意図される機能を行わせるために、ベクターを対象に導入または送達する任意の経路を含む。投与は、経口、鼻腔内、非経口的（静脈内、筋肉内、腹腔内または皮下）、頭蓋内または局所的を含む任意の適した経路によって行うことができる。投与は、自己投与および他者による投与を含む。

30

【0067】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用されており、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらのアナログのいずれかの、いずれかの長さのヌクレオチドのポリマー型を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を行うことができる。次に、ポリヌクレオチドの非限定例を挙げる：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、E S T または S A G E タグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャー RNA (mRNA)、トランスファー RNA、リボソーム RNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された DNA、任意の配列の単離された RNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ等、修飾されたヌクレオチドを含むことができる。存在するのであれば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成成分で中断することができる。ポリヌクレオチドは、標識構成成分とのコンジュゲーションによるもののよう、重合後にさらに修飾することができる。この用語は、二本および一本鎖分子の両方も指す。他に指定または要求がなければ、ポリヌクレオチドである、本発明のいずれかの実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知のまたは予測される 2 本の相補的一本鎖形態のそれぞれの

40

50

両方を包含する。

【0068】

ポリヌクレオチドは、4種のヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAの場合はチミンの代わりにウラシル（U）の特異的な配列で構成される。よって、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理ユニットを有するコンピュータ内のデータベースに入力し、機能ゲノミクスおよび相同性検索等、バイオインフォマティクス適用に使用することができる。

【0069】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2個のペプチドの間または2個の核酸分子の間の配列類似性を指す。相同性は、比較目的のために整列され得る各配列におけるポジションを比較することにより決定することができる。比較されている配列中のポジションが、同じ塩基またはアミノ酸によって占められている場合、これらの分子は、該ポジションにおいて相同である。配列間の相同性の程度は、これらの配列によって共有されるマッチするか、または相同なポジションの数の関数である。「無関係」または「非相同」な配列は、本発明の配列のうち1種と40%未満の同一性、あるいは25%未満の同一性を共有する。

【0070】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、別の配列に対しある特定のパーセンテージ（例えば、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%）の「配列同一性」を有するとは、整列された場合、該パーセンテージの塩基（またはアミノ酸）が、2配列の比較において同じであることを意味する。この整列およびパーセント相同性または配列同一性は、本技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ausubelら編（2007年）Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。好ましくは、整列のためにデフォルトパラメータが使用される。整列プログラムの一例は、デフォルトパラメータを使用したBLASTである。特に、プログラムは、次のデフォルトパラメータを使用したBLASTNおよびBLASTPである：遺伝暗号＝標準；フィルター＝なし；ストランド＝両方；カットオフ＝60；予想＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝50配列；選別＝HIGH SCOREによる；データベース＝非重複性、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳+SwissProtein+SPupdate+PIR。これらのプログラムに関する詳細は、次のインターネットアドレスに見出すことができる：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>。

【0071】

均等または生物学的に均等な核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドまたはペプチドは、参照核酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたはペプチドに対して、少なくとも70%配列同一性、あるいは少なくとも80%配列同一性、あるいは少なくとも85%配列同一性、あるいは少なくとも90%配列同一性、あるいは少なくとも92%配列同一性、あるいは少なくとも95%配列同一性、あるいは少なくとも97%配列同一性、あるいは少なくとも98%配列同一性を有するものである。代替的な均等なポリペプチドは、高ストリンジェンシーの条件下で、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドである。代替的な均等なポリヌクレオチドは、高ストリンジェンシーの条件下で、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

【0072】

「ハイブリダイゼーション」は、1本または複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対形成、フーグスティーン（Hoogsteen）結合により、または他の何らかの配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本

10

20

30

40

50

の鎖、複数本 (multi) の鎖の複合体を形成する 3 本またはそれ超の鎖、単一の自己ハイブリダイズする鎖、またはこれらのいずれかの組合せを含むことができる。ハイブリダイゼーション反応は、PCR 反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断等、より広範なプロセスにおけるステップを構成することができる。

【0073】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行うことができる。一般に、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、約 40℃、10×SSC または均等なイオン強度／温度の溶液中で行われる。中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、典型的には、約 50℃、6×SSC で行われ、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、一般に、約 60℃、1×SSC で行われる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の追加的な例として、次のものが挙げられる：低ストリンジェンシーのインキュベーション温度、約 25℃～約 37℃；ハイブリダイゼーションバッファー濃度、約 6×SSC～約 10×SSC；ホルムアミド濃度、約 0%～約 25%；および洗浄溶液、約 4×SSC～約 8×SSC。中等度ハイブリダイゼーション条件の例として、次のものが挙げられる：インキュベーション温度、約 40℃～約 50℃；バッファー濃度、約 9×SSC～約 2×SSC；ホルムアミド濃度、約 30%～約 50%；および洗浄溶液、約 5×SSC～約 2×SSC。高ストリンジェンシー条件の例として、次のものが挙げられる：インキュベーション温度、約 55℃～約 68℃；バッファー濃度、約 1×SSC～約 0.1×SSC；ホルムアミド濃度、約 55%～約 75%；および洗浄溶液、約 1×SSC、0.1×SSC または脱イオン水。一般に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は、5 分間～24 時間であり、1、2 回またはそれ超の洗浄ステップであり、洗浄インキュベーション時間は、約 1、2 または 15 分間である。SSC は、0.15M NaCl および 15mM クエン酸塩のバッファーである。他の緩衝系を使用した SSC の均等物を用いてよいことが理解される。ハイブリダイゼーション反応は、当業者に周知の「生理学的条件」下で行うこともできる。生理学的条件の非限定例は、細胞内で通常に見出される温度、イオン強度、pH および Mg^{2+} 濃度である。

【0074】

本明細書において使用される場合、用語「低発現」は、ネイティブプロモーターよりも高く遺伝子発現を駆動することが本技術分野で公知である β -アクチンまたは CMV プロモーター等、「高発現」プロモーターを使用して発現されるもの未満を意図する。低発現プロモーターの非限定的例は、MeCP2 プロモーターである。

【0075】

本開示を実施するためのモード

若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCL) または若年型バッテン病は、CLN3 における常染色体劣性変異によって引き起こされるリソソーム蓄積障害である。JNCL は、5～10 歳の間に、進行性視力喪失、発作、認知および運動機能減退を呈し、10 代後半～20 代前半までに死亡する。JNCL に治癒はなく、このことは、この致命的な疾患を患う小児の寿命およびクオリティ・オブ・ライフを改善するための新規治療法を識別することの意義を強調する。

【0076】

JNCL の現在の治療アプローチは、病的続発症を標的とする。しかし、持続性の保護を提供するために、代替的な戦略が必要とされている。斯かるアプローチの 1 種は、遺伝子療法である。遺伝子療法は、一部には、隣接する形質導入されていない細胞の相互是正 (cross-correction) により、可溶性酵素における変異が関与する一部の形態のバッテン病の是正においては見込みを示した。しかし、CLN3 は、膜貫通タンパク質であるため、遺伝子療法アプローチは、JNCL に対して実用性が低いと考えられてきた。このような事実にもかかわらず、近年の証拠は、JNCL のための遺伝子療法が実行可能となり得ることを示唆し、それによると、ヒト CLN3 を持つアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの頭蓋内送達、リソソーム封入体を低下させることができたが、行動的欠損に変化

は報告されなかった。

【0077】

本明細書の実施例に例示されている通り、AAV9/hCLN3構築物は、それぞれhCLN3の高い発現対低い発現を駆動するために、 β -アクチンまたはMeCP2プロモーターを使用して遺伝子操作された。1ヶ月齢CLN3 ^{Δ ex7/8}マウスに、 2×10^{12} ウイルスゲノム (vg) のAAV9/ β -アクチン-hCLN3またはAAV9/MeCP2-hCLN3を静脈内注射し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現を駆動するウイルス (AAV9/ β -アクチン-GFPおよびAAV9/MeCP2-GFP) を対照とした。

【0078】

重要なことに、海馬 (HPC)、線条体 (STR)、視床 (TH)、視覚皮質 (VC) および小脳 (CB) を含む、JNCLにおいてニューロンが死ぬように運命付けられたいくつかの脳領域においてhCLN3のプロモーター遺伝子投与量 (dosage) 効果が確認され、AAV9/MeCP2-hCLN3と比べ、高発現AAV9/ β -アクチン-hCLN3を与えたCLN3 ^{Δ ex7/8}マウスにおいて、hCLN3発現が3~8倍上昇していた。AAV9/GFP構築物を与えた動物では、ウイルスが、NeuN⁺ニューロンに主に形質導入し、少量のGFAP⁺アストロサイトも観察された一方、マイクログリアにおいてGFP発現が検出されなかったことが明らかになった。体性感覚野バレル皮質 (S1BF)、VC、STR、TH、HPC、SCNおよびCBにおけるGFP発現によって明らかな通り、脳におけるウイルス形質導入の程度は広汎であった。

【0079】

重要なことに、低いhCLN3発現を駆動するAAV9構築物 (AAV9/MeCP2-hCLN3) のみが、WT動物に典型的な成績レベルまで、CLN3 ^{Δ ex7/8}マウスの運動欠損を回復させることができ (加速ロータロッドおよびボールよじ登り)、脳における高いCLN3発現が、運動協調性の改善に有利ではなかったことを実証する。AAV9/MeCP2-hCLN3を与えた動物のS1BF、VCおよびTHにおいて有意に低下したリソソーム蓄積物質についても、同様の利益が観察された。CLN3 ^{Δ ex7/8}マウスの運動行為におけるAAV9/MeCP2-hCLN3の有益な効果は、GFP対照構築物により観察されず、これから、hCLN3の作用の特異性が確認される。これらの観察に基づき、理論に制約されることなく、AAV/hCLN3 (例えば、AAV9/hCLN3) 媒介性遺伝子療法は、十分な数のCNS細胞を標的として、JNCL転帰を有意に改善するであろうと考えられる。これに関して、CLN3変異のヘテロ接合性キャリア (すなわち、1/2 遺伝子投与量) は、疾患または病理のいかなる証拠もないことが認められ、このような「低下したレベルのCLN3発現」が、健康な細胞の産生に十分であることを示す。本明細書に記載されているscAAV9/MeCP2-GFPウイルスを使用して、CNSにおける形質導入細胞の頻度を識別した。中程度の頻度にもかかわらず、ウイルス構築物により形質導入された細胞の識別に使用された方法 (すなわち、GFP抗体による免疫蛍光染色) は、感度が限られており、形質導入された脳内細胞数が過小評価された可能性があることを示唆する。それにもかかわらず、本明細書に記載されている疾患リードアウトにおける劇的な改善は、本明細書に記載されているAAV遺伝子療法アプローチ (複数可) が有効であることを示す。

【0080】

したがって、様々な実施形態では、hCLN3を発現するrAAVであるAAV/hCLN3構築物、ならびにAAV/hCLN3構築物を利用した処置および/または予防方法が提供される。

【0081】

AAVベクターおよび組成物

ある特定の実施形態では、CLN3タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、その多くが本技術分野で公知かつ利用できるウイルスベクターによって、中枢神経系 (CNS) の1種または複数の組織内のまたはこれを構成する細胞へと送達される。その上、様々

10

20

30

40

50

な実施形態では、CLN3は、全身の組織にも送達され、若年型パッチン病の小児は全身性疾患症状（すなわち、心臓の欠損）も有することから、このような送達が重要である。これに関して、CLN3が、身体のあらゆる細胞型において遍在性に発現されることが認められる。ウイルスベクター（複数可）は、望ましくは無毒、非免疫原性であり、産生が容易であり、DNAの保護および標的細胞への送達において効率的である。例示的であるが非限定的な一実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターまたはその派生体であり、CLN3ポリペプチドをコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルスベクターまたはその派生体を含む治療組成物は、適したプロモーターの制御下にある。

【0082】

AAVの30種を超える天然に存在する血清型を利用することができ、本明細書に記載されている構築物および方法において有用である。AAVカプシドにおける多くの天然バリエーションが存在し、神経細胞および他の細胞型に特に適する特性を備えるAAVの識別および使用を可能にする。AAVウイルスは、従来の分子生物学技法によって遺伝子操作することができ、所望の核酸配列の細胞特異的送達、免疫原性の最小化、安定性および粒子寿命の調整、効率的な分解、核への正確な送達等に関するこのような粒子の最適化を可能にする。

【0083】

AAVの使用は、相対的に無毒であり、効率的な遺伝子移入をもたらす、特異的な目的に容易に最適化することができるため、DNAの外来性送達の共通モードである。ヒトまたは非ヒト霊長類（NHP）から単離され、十分に特徴付けられたAAVの血清型のうち、ヒト血清型2が、遺伝子移入ベクターとして開発された最初のAAVである。この血清型は、異なる標的組織および動物モデルにおける効率的な遺伝子移入実験に広く使用されてきた。本開示のベクターおよび方法において有用な他のAAV血清型として、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43、CSP3等（例えば、様々なAAV血清型の考察に関して、WO2005/033321および米国特許第7,198,951号を参照）が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、血清型は、所望の送達機序を最適化するために選択される。例えば、AAV1、AAV5およびAAV9は、優れたベクター伝播および高効率の形質導入をもたらす。AAV1およびAAV9は、ほぼ排他的にニューロン指向性をもたらす一方、AAV5は、ニューロンおよびグリアの混合型をもたらす、大部分はアストロサイトを標的とする（例えば、Davisonら（2000年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97巻：3428～3432頁；Burgerら（2004年）Mol. Ther. 10巻：302～317頁；CearleyおよびWolfe（2006年）Mol. Ther. 13巻：528～537頁を参照）。AAV1およびAAV6は、末梢注射後に優れた逆行性軸索輸送能力を有する（Hollisら（2008年）Mol. Ther. 16巻：296～301頁）一方、AAV9は、脳内で効率的な軸索輸送を起こす（CearleyおよびWolfe（2006年）上記参照）。AAV6、AAV8およびAAV9は、くも膜下腔内投与後に脊髄および後根神経節への効率的な送達を実証し、特異的な血清型に依存して異なるサブセットの細胞を標的とする（Storekら（2008年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、105巻：1055～1060頁；Towneら（2009年）Mol. Pain、5巻：52頁；Snyderら（2011年）Hum. Gene Ther.、22巻：1129～1135頁）。AAV4の脳内脳室（ventricular）注射は、上皮細胞に効率的に形質導入する（Liuら（2005年）Gene Ther. 12巻：1503～1508頁）。本明細書に実証される通り、AAV9は、静脈内投与後に血液脳関門（BBB）を通過して、脳内のニューロンおよびグリアに形質導入することができる。ある特定の実施形態では、rh.10血清型は明確に除外される。よって、異なるAAV血清型の投与量を同時発生的におよび／または逐次的に患者に投与して標的化送達をもたらす、疾患の症状および進行に基づき治療法を個別化することができることは、本開示の範囲内である。

【0084】

ベクターへのアセンブリのために望ましいAAV断片は、vp1（例えば、配列番号12および13）、vp2（例えば、配列番号14および15）、vp3（例えば、配列番号16および17）および高度可変領域を含む、本技術分野で公知のcapタンパク質、rep78（例えば、配列番号18）、rep68（例えば、配列番号19）、rep52（例えば、配列番号20）およびrep40（例えば、配列番号21）を含むrepタンパク質、ならびにこれらのタンパク質およびその均等物をコードする配列を含む。これらの断片は、種々のベクター系および宿主細胞において容易に利用することができる。斯かる断片は、単独で、他のAAV血清型配列もしくは断片と組み合わせて、または他のAAVもしくは非AAVウイルス配列由来の要素と組み合わせて使用することができる。本明細書において使用される場合、人工AAV血清型は、天然に存在しないカプシドタンパク質を有するAAVを限定することなく含む。斯かる人工カプシドは、選択されたAAV配列（例えば、vp1カプシドタンパク質の断片）を、異なる選択されたAAV血清型、同じAAV血清型の非連続部分、非AAVウイルス供給源由来または非ウイルス供給源由来から得ることができる異種配列と組み合わせて使用し、いずれかの適した技法によって生成することができる。人工AAV血清型は、限定することなく、シュードタイプ化AAV、キメラAAVカプシド、組換えAAVカプシドまたは「ヒト化」AAVカプシドであることができる。あるAAVのカプシドが異種カプシドタンパク質に置き換えられたシュードタイプ化ベクターも有用である（例えば、Asokan A. (2010年) Discov. Med. 9巻(48号): 399~403頁を参照）。

【0085】

例示的であるが非限定的な一実施形態では、本明細書に記載されている組成物および方法において有用なベクターは、最低でも、選択されたAAV血清型カプシド、例えば、AAV9カプシド（例えば、配列番号13）またはその断片もしくは均等物をコードする配列を含有する。別の実施形態では、有用なベクターは、最低でも、選択されたAAV血清型repタンパク質、例えば、AAV9 repタンパク質またはその断片をコードする配列を含有する。任意選択で、斯かるベクターは、AAV capおよびrepタンパク質の両方を含有することができる。AAV repおよびcapの両方を加えたベクターにおいて、AAV repおよびAAV cap配列は両者共に、1種の血清型起源、例えば、全てAAV9起源とすることができる（例えば、Balakrishnanら (2014年) Curr. Gene. Therap. 14巻: 1~15頁; 米国特許第8,962,330号; 米国特許第7,198,951号を参照）。

【0086】

あるいは、cap配列を提供しているAAV血清型とは異なるAAV血清型にrep配列が由来するベクターを使用することができる。一実施形態では、repおよびcap配列は、別々の供給源（例えば、別々のベクター、または宿主細胞およびベクター）から発現される。別の実施形態では、これらのrep配列は、異なるAAV血清型のcap配列にインフレームで融合されて、米国特許第7,282,199号に記載されているAAV2/8等、キメラAAVベクターを形成する。一部の実施形態では、AAV1 repタンパク質は、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレームで融合される。一部の実施形態では、AAV2 repタンパク質は、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレームで融合される。一部の実施形態では、AAV3 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレームで融合される。一部の実施形態では、AAV4 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3か

らなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一部の
 実施形態では、AAV5 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV
 4、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39
 、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にイン
 フレーションで融合される。一部の実施形態では、AAV6 repタンパク質は、AAV1
 、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV7、AAV8、AA
 V9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるA
 A V血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一部の実施形態では、AAV6.
 2 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV
 6、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP
 3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一
 部の実施形態では、AAV7 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、A
 A V4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV8、AAV9、rh.10、r
 h.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配
 列にインフレーションで融合される。一部の実施形態では、AAV8 repタンパク質は、
 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、A
 A V7、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から
 選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一部の実施形態では
 、AAV9 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5
 、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、rh.10、rh.39、rh.
 43およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーション
 で融合される。一部の実施形態では、AAVrh.10 repタンパク質は、AAV1
 、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、
 AAV8、AAV9、rh.39、rh.43およびCSP3からなる群から選択される
 AAV血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一部の実施形態では、AAVr
 h.39 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、
 AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.43
 およびCSP3からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーションで融
 合される。一部の実施形態では、AAVrh.43 repタンパク質は、AAV1、A
 A V2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6.2、AAV6.2、AAV7、AA
 V8、AAV9、rh.10、rh.39およびCSP3からなる群から選択されるAA
 V血清型のcap配列にインフレーションで融合される。一部の実施形態では、AAVCSP
 3 repタンパク質は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV
 6.2、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39および
 rh.43からなる群から選択されるAAV血清型のcap配列にインフレーションで融合さ
 れる。

【0087】

典型的には、ベクターは、最低でも、導入遺伝子およびその必要な調節配列、ならびに
 5'および3' AAV末端逆位反復配列(ITR)で構成される。ITRの非限定例とし
 て、配列番号2のヌクレオチド662~767およびヌクレオチド3278~3418、
 ならびにこれらそれぞれの均等物が挙げられる。組換えAAVベクターは、カプシドタン
 パク質にパッケージされ、選択された標的細胞へと送達される。よって、一態様では、カ
 プシドおよび／または標的細胞内に含有されるベクターは、本開示の態様である。本明細
 書に企図される通り、導入遺伝子は、CLN3遺伝子産物(例えば、CLN3ポリペプチ
 ド(例えば、International Batten Disease Consortium(1995年) Cell、82巻
 :949~957頁、ならびにGenBank受託番号AAC05337(配列番号1)
 、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号2のヌクレオチド16
 83~2999およびこれらそれぞれの均等物を参照))をコードする導入遺伝子である
 。CLN3遺伝子産物の核酸コード配列(例えば、配列番号11)およびその均等物は、
 標的組織の細胞における導入遺伝子の転写、翻訳および発現を可能にする様式で、調節構

10

20

30

40

50

成分に操作可能に連結される。

【0088】

ベクターのAAV配列は、典型的には、シス作用性5'および3'末端逆位反復配列を含む（例えば、Carter（1990年）In Handbook of Parvoviruses、P. Tijsser編、CRC Press、155～168頁を参照）。ITR配列は、典型的には、約145bpの長さである。ある特定の実施形態では、ベクターにおいて、ITRをコードする実質的に配列全体が使用されるが、これらの配列のある程度の修飾が許容できる。このようなITR配列を修飾する能力は、当業者の技能範囲内である（例えば、Sambrookら（1989年）Molecular Cloning. A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、New York；およびFisherら（1996年）J. Virol.、70巻：520～532頁等を参照）。斯かる分子の一例は、導入遺伝子を含有する「シス作用性」プラスミドであり、このプラスミドでは、選択された導入遺伝子配列および関連する調節エレメントが、5'および3'AAV ITR配列に挟まれている。AAV ITR配列は、現在識別されている哺乳動物AAV型を含むいずれかの公知のAAVから得ることができる。***

10

【0089】

組換えAAVベクターのための上で識別された主要なエレメントに加えて、ある特定の実施形態では、ベクターは、典型的には、プラスミドベクターをトランスフェクトされたまたはAAVウイルスに感染した細胞におけるその転写、翻訳および発現を可能にする様式で、導入遺伝子に作動可能に連結された従来の制御エレメントを含むこともできる。発現制御配列は、例えば、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化（ポリA）シグナル等、効率的RNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質安定性を増強する配列；ならびに所望であれば、コードされた産物の分泌を増強する配列を含む。ネイティブ、構成的、誘導性および／または組織特異的なプロモーターを含む多数の発現制御配列は、本技術分野で公知であり、利用することができる。

20

【0090】

タンパク質をコードする核酸のため、導入遺伝子配列の後かつ3'AAV ITR配列の前に、ポリアデニル化配列が一般に挿入される。適したポリアデニル化配列として、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（例えば、配列番号2のヌクレオチド（nucleotide）3052～3198）、SV40後期ポリアデニル化配列、SV40初期ポリアデニル化配列、AATAAA（配列番号3）ポリアデニル化シグナル、CAATAAA（配列番号4）ポリアデニル化シグナル、ATTAAA（配列番号5）ポリアデニル化シグナル、TANA（配列番号6）ポリアデニル化シグナルが挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0091】

ある特定の実施形態では、AAVベクターは、望ましくは、プロモーター／エンハンサー配列および導入遺伝子の間に位置するイントロンも含有する。例示的だが非限定的な可能なイントロン配列の1種は、SV-40に由来し、SV-40 Tイントロン配列と称される。他のイントロン配列は、当業者に公知であり、とりわけ、CBAおよびCBAMVMを含む（例えば、Grayら（2011年）Hum. Gene Ther. 22巻（9号）：1143～1153頁およびその中に引用されている参考文献を参照）。

40

【0092】

任意選択で存在し得る別のエレメントは、翻訳後調節エレメントである。例示的な翻訳後調節エレメントとして、ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）、最小ガンマエレメントおよび部分的アルファベータエレメントを含有するWPRE2、最小ガンマおよびアルファエレメントを含有するWPRE3（例えば、Choiら（2014年）Molecular Brain 7巻：17～26頁を参照）が挙げられるがこれらに限定されない。非限定的な例を添付の配列表に提示し、参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

50

宿主細胞における遺伝子発現に必要とされる調節配列の正確な性質は、種、組織または細胞型の間で変動し得るが、一般に、必要に応じて、T A T Aボックス、キャッピング配列、C A A T配列、エンハンサーエレメント等、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する5'非転写および5'非翻訳配列を含む。特に、斯かる5'非転写調節配列は、作動可能に接続された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含み得る。調節配列は、所望に応じてエンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含むこともできる。ベクターは、5'リーダーまたはシグナル配列を任意選択で含むことができる。斯かるシグナルペプチドの例として、アルブミン、β-グルクロニダーゼ、アルカリプロテアーゼまたはフィブロンectin分泌シグナルペプチドが挙げられる。一態様では、エンハンサーは、ウッドチャック転写後(post)調節エレメント(「WPRE」)である(例えば、Zufferey, R.ら(1999年)J. Virol. 73巻(4号): 2886~2992頁を参照)。WPREの非限定的な例として、配列番号37または配列番号38が挙げられる。エンハンサーエレメントは、プロモーターおよびCLN3遺伝子の下流に存在し得る。しかし、エンハンサーは、いかなる位置にあってもよい。非限定例を添付の配列表に提示し、参照により本明細書に組み込まれる。

【0094】

適したプロモーターの例として、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(任意選択でRSVエンハンサーと共に)(例えば、配列番号28およびその均等物)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(任意選択でCMVエンハンサーと共に)(例えば、Boshartら(1985年)Cell, 41巻: 521~530頁を参照、例えば、配列番号27およびその均等物)、SV40プロモーター(例えば、配列番号29)、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、β-アクチンプロモーター(例えば、ニワトリβ-アクチンプロモーター)(例えば、配列番号22、配列番号23およびそれらの均等物)、ホスホグリセロール(phosphoglycerol)キナーゼ(PGK)プロモーター(例えば、配列番号30およびその均等物)、EF1αプロモーター(例えば、配列番号31およびその均等物)、CBAプロモーター(例えば、配列番号24およびその均等物)、UBCプロモーター(例えば、配列番号34およびその均等物)、GUSBプロモーター、NSEプロモーター(例えば、配列番号33およびその均等物)、シナプシンプロモーター(例えば、配列番号32およびその均等物)、MeCP2(メチルーCPG結合タンパク質2)プロモーター(例えば、配列番号22、配列番号23およびそれらの均等物)、GFAP、CBhプロモーター等が挙げられるがこれらに限定されない。異なるプロモーターを使用して、導入遺伝子(例えば、CLN3)の発現レベルを増大させることができることが企図される。例えば、ニワトリβ-アクチンプロモーター(CBA)は、導入遺伝子の強い遍在性の発現をもたらすことができる一方、MeCP2プロモーターは、別のプロモーターと比較して、導入遺伝子のより低い発現をもたらすことができる。一部の実施形態では、プロモーターは、組織依存性様式で導入遺伝子発現を制御することができる。例えば、プロモーター活性は、グリアと比較してニューロンにおいてより高くなることができる。一部の実施形態では、プロモーターは、発生段階依存性様式で導入遺伝子発現を制御することができる。例えば、プロモーターに駆動される発現は、出生後に上昇し、成人期を通して必須であってもよい。

【0095】

ある特定の実施形態では、導入遺伝子のためのネイティブプロモーターまたはその断片を使用することができる。導入遺伝子の発現が、ネイティブな発現を模倣することが望まれる場合、ネイティブプロモーターが好まれる場合がある。ある特定の実施形態では、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位またはコザックコンセンサス配列等、他のネイティブ発現制御エレメントを使用して、ネイティブな発現を模倣することもできる。

【0096】

一部の実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。場合によっては、組織特異的調節配列は、組織特異的様式で転写を誘導する組織特異的転写因子と結合する。斯かる組織特異的調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー等)は、本技

10

20

30

40

50

術分野で周知である。例証的な組織特異的調節配列として、次の組織特異的プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない：ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）プロモーター（Andersonら（1993年）Cell. Mol. Neurobiol.、13巻：503～515頁）、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター（Piccioliら（1991年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻：5611～5615頁および例えば、GenBank受託番号L04147.1（配列番号25））およびニューロン特異的vgf遺伝子プロモーター（Piccioliら（1995年）Neuron、15巻：373～384頁およびGenBank受託番号Y09938.1（配列番号26））等の、ニューロンのプロモーター。一部の実施形態では、組織特異的プロモーターは、神経核（NeuN）、グリア線維酸性タンパク質（GFAP）（Brennerら（1994年）J. Neurosci. 14巻（3号）：1030～1037頁）、大腸腺腫症（APC）およびイオン化カルシウム結合アダプター分子1（Iba-1）から選択される遺伝子のプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ニワトリベーターアクチンプロモーター（例えば、配列番号24またはその均等物）またはMeCP2プロモーター（例えば、配列番号2のヌクレオチド775～1511、配列番号22、配列番号23またはそれらの均等物）である。

【0097】

一部の実施形態では、1種または複数のmiRNAのための1種または複数の結合部位が、AAVベクターの導入遺伝子中に取り込まれて、導入遺伝子を持つ対象の1種または複数の組織、例えば、非CNS組織における導入遺伝子の発現を阻害する。当業者であれば、結合部位を選択して、組織特異的様式で導入遺伝子の発現を制御することができることを認識し得る。例えば、導入遺伝子から発現されるmRNAが、肝臓におけるmiR-122に結合し、これにより阻害されるように、肝臓における導入遺伝子の発現は、miR-122の結合部位を取り込むことにより阻害することができる。導入遺伝子から発現されるmRNAが、心臓においてmiR-133aまたはmiR-1に結合し、これにより阻害されるように、心臓における導入遺伝子の発現は、miR-133aまたはmiR-1の結合部位を取り込むことにより阻害することができる。mRNAにおけるmiRNA標的部位は、5'UTR、3'UTRまたはコード領域に存在することができる。典型的には、標的部位は、mRNAの3'UTRに存在する。さらに、複数のmiRNAが、同じか、または複数の部位を認識することによりmRNAを調節するように、導入遺伝子を設計することができる。複数のmiRNA結合部位の存在は、複数のRISCの協調作用をもたらし、高度に効率的な発現阻害を生じることができる。ある特定の実施形態では、標的部位配列は、合計5～100、10～60またはそれ超のヌクレオチドを含むことができる。ある特定の実施形態では、標的部位配列は、少なくとも5ヌクレオチドの標的遺伝子結合部位配列を含むことができる。

【0098】

CLN3導入遺伝子

セロイドーリポフスチン沈着症ニューロナル3（CLN3）は、リソソーム膜を含む複数の細胞構造の細胞膜に見出される疎水性の膜貫通タンパク質であるが、CLN3の分子機能は未知である。CLN3は、エンドサイトーシスおよび細胞内タンパク質輸送、リソソーム恒常性、オートファジー、ミトコンドリア機能、アミノ酸トランスポート、酸化ストレス、神経細胞興奮毒性および細胞周期調節を含むいくつかの細胞過程に関係付けられてきた。CLN3は、有毒物質を正常に分解し、再利用可能な構成成分があればそれを再利用する細胞内の区画であるリソソームの正常機能に重要であることが公知である。

【0099】

CLN3遺伝子における60種を超える変異がバッテン病を有する人々において識別された。若年型バッテン病の最も一般的な変異は、CLN3遺伝子におけるおよそ1kbヌクレオチド欠失である。若年型バッテン病個体の90%超が、斯かる変異を有することが推定される。この疾患を研究するために、CLN3ノックアウト（KO）マウスおよびCLN3^{Δex7/8}マウス（小児に観察される主要変異を再現）を含むいくつかの動物モデルが派生された。

【0100】

上に記す通り、本明細書に企図されている構築物は、ヒトCLN3（例えば、International Batten Disease Consortium（1995年）Cell、82巻：949～957頁およびGenBank受託番号AAC05337（配列番号1）を参照）およびその均等物をコードするポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、CLN3 cDNAである。しかし、CLN3をコードする核酸配列を改変して、例えば、発現カセットの構築を容易にし、発現を増強すること等ができる（例えば、コード最適化により）が認識され得る。ある特定の実施形態では、コードされたCLN3ペプチドを改変して、例えば、膜挿入を改善、活性および／または安定性を改善、免疫原性を低下させること等ができる。ある特定の実施形態では、特に、処置または研究目的での非ヒト対象へのAAVの適用のために、非ヒトCLN3を利用することができる。CLN3配列が、Canis lupus（例えば、GenBank受託番号AAB05546.1（配列番号7））、Mus musculus（例えば、GenBank受託番号AAB69983（配列番号8））、Ovis aries（例えば、GenBank受託番号XP_011959725（配列番号9））、Felis catus（例えば、GenBank受託番号BAM42890（配列番号10））等が挙げられるがこれらに限定されない、いくつかの哺乳動物で公知であることが注記される。

10

【0101】

一部の実施形態では、適したCLN3核酸配列は、CLN3ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなり、このCLN3ポリペプチドは、配列番号1または均等物ポリペプチドを含み、均等物は、配列番号1に対し、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%または100%アミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。追加的な非限定例を、参照により本明細書に組み込まれている添付の配列表に提示する。

20

【0102】

CLN3またはその均等物をコードする核酸は、配列番号11またはその生物学的均等物のポリヌクレオチドを含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなることができる。CLN3核酸の生物学的均等物の一例は、高ストリンジェンシーの条件下で、配列番号11の相補体にハイブリダイズし、CLN3生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸を含む。別の例として、配列番号11またはその相補体に対し少なくとも80%配列同一性を有し、CLN3生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸が挙げられる。ヒトCLN3バリエーションが、本技術分野で公知であることが注記される。非限定例として、GenBank受託番号NM_001042432.1（CLN3、転写物バリエーション1）；GenBank受託番号NM_001286104.1（CLN3、転写物バリエーション3）；GenBank受託番号NM_001286105.1（CLN3、転写物バリエーション4）；GenBank受託番号NM_001286109.1（CLN3、転写物バリエーション5）；GenBank受託番号NM_001286110.1（CLN3、転写物バリエーション6）、または上に挙げた例のうちいずれか一例もしくはその相補体に対し少なくとも80%配列同一性を有し、CLN3の生物学的活性を有するタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

30

40

【0103】

一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の発現は、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意選択でRSVエンハンサーと共に）によって駆動される。一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の発現は、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（任意選択でCMVエンハンサーと共に）によって駆動される。一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の発現は、SV40プロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の発現は、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の発現は、 β -アクチンプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、CLN3導入遺伝子の

50

発現は、P G Kプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、E F 1 α プロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、U B Cプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、G U S Bプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、N S Eプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、シナプシンプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、M e C P 2プロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、G F A Pプロモーターによって駆動される。一部の実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、C B hプロモーターによって駆動される。好ましい実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、C B Aプロモーター（例えば、配列番号24）またはその均等物によって駆動される。より好ましい実施形態では、C L N 3 導入遺伝子の発現は、M e C P 2プロモーター（例えば、配列番号2のヌクレオチド775～1511、配列番号22または配列番号23）またはこれらそれぞれの均等物によって駆動される。一部の実施形態では、上述のプロモーターのうちいずれか1種は、C L N 3 導入遺伝子の発現の駆動から明確に除外され得る。

10

【0104】

組換えAAV（rAAV）の産生

一部の実施形態では、AAVゲノムは、天然由来の血清型または分離株もしくはクレードのAAVに由来する。一部の実施形態では、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8またはAAV9の群から選択される。一部の実施形態では、AAV血清型は、AAV9である。他の実施形態では、AAV血清型は、AAV2である。

20

【0105】

非限定例として、GenBank受託番号AF063497.1（AAV1、全ゲノム）のポリヌクレオチド；GenBank受託番号NC_001401.2（AAV2、全ゲノム）のポリヌクレオチド；GenBank受託番号NC_001829（AAV4、全ゲノム）のポリヌクレオチド；GenBank受託番号AX256321.1（AAV5、合成構築物）のポリヌクレオチド；GenBank受託番号AF028704.1（AAV6、全ゲノム）のポリヌクレオチド；配列番号35のポリペプチド、配列番号36のポリヌクレオチド、またはこれらの生物学的均等物を含むか、あるいはこれから本質的になるか、またはなお、さらにはこれからなることができる組換えAAVが挙げられる。別の例として、上に参照されるポリヌクレオチドに対し少なくとも80%配列同一性を有する核酸が挙げられる。

30

【0106】

適した組換えアデノ随伴ウイルス（AAV）は、アデノ随伴ウイルス（AAV）血清型カプシドタンパク質またはその断片、機能的rep遺伝子；最低でもAAV末端逆位反復配列（ITR）およびC L N 3ポリペプチド（または本明細書に記載されているそのバリエーションもしくは均等物）をコードする核酸配列で構成されたミニ遺伝子、ならびにAAVカプシドタンパク質へのミニ遺伝子のパッケージングを可能にするのに十分なヘルパー機能をコードする核酸配列を含有する宿主細胞を培養することにより生成することができる。

40

【0107】

AAVカプシドにAAVベクターをパッケージするために宿主細胞において培養すべき構成成分は、宿主細胞にトランスで提供することができる。あるいは、要求される構成成分（例えば、組換えAAVベクター、rep配列、cap配列および／またはヘルパー機能）のうちいずれか1種または複数は、当業者に公知の方法を使用して、要求される構成成分のうち1種または複数を含むように遺伝子操作された安定的宿主細胞によって提供することができる。最も適切には、斯かる安定的宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下において要求される構成成分（複数可）を含有し得る。しかし、ある特定の実施形態では、要求される構成成分（複数可）は、構成的プロモーターの制御下に置くことがで

50

きる。

【0108】

さらに別の代替法では、選択された安定的宿主細胞は、構成的プロモーターの制御下における選択された構成成分（複数可）、および1種または複数の誘導性プロモーターの制御下における他の選択された構成成分（複数可）を含有することができる。例えば、293細胞（構成的プロモーターの制御下においてE1ヘルパー機能を含む）に由来するが、誘導性プロモーターの制御下においてrepおよび／またはcapタンパク質を含有する安定的宿主細胞を生成することができる。当業者によって、さらに他の安定的宿主細胞を生成することができる。

【0109】

rAAVの産生に必要とされる組換えAAVベクター、rep配列、cap配列およびヘルパー機能は、いずれか適切な遺伝的エレメント（ベクター）を使用して、パッケージング宿主細胞に送達することができる。選択された遺伝的エレメントは、本明細書に記載されている方法を含むいずれか適した方法によって送達することができる。斯かる方法は、当業者に公知である（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Y.を参照）。同様に、rAAVビリオンを生成する方法も周知である（例えば、Fisherら（1993年）J. Virol.、70巻：520～532頁；米国特許第5,478,745号；等を参照）。

【0110】

例示的であるが非限定的な一実施形態では、rAAVは、トリプルトランスフェクション方法を使用して産生することができる（例えば、米国特許第6,001,650号に詳細に記載）。典型的には、組換えAAVは、AAV粒子にパッケージしようとする組換えAAVベクター（導入遺伝子を含む）、AAVヘルパー機能ベクターおよびアクセサリ機能ベクターを宿主細胞にトランスフェクトすることにより産生される。AAVヘルパー機能ベクターは、増殖性AAV複製およびカプシド形成のためにトランスで機能する「AAVヘルパー機能」配列（すなわち、repおよびcap）をコードする。典型的には、AAVヘルパー機能ベクターは、いかなる検出可能な野生型AAVビリオン（すなわち、機能的repおよびcap遺伝子を含むAAVビリオン）も生成することがない効率的なAAVベクター産生を支持する。ベクターの例示的だが非限定的な例として、pHLP19（米国特許第6,001,650号を参照）、pRep6cap6ベクター（例えば、米国特許第6,156,303号を参照）等が挙げられる。アクセサリ機能ベクターは、非AAV由来ウイルスおよび／または細胞機能のためのヌクレオチド配列をコードすることができ、これにより、AAVは複製に依存性となる（すなわち、「アクセサリ機能」）。アクセサリ機能は、AAV遺伝子転写、ステージ特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現産物の合成およびAAVカプシドアセンブリの活性化に関与する部分を限定することなく含む、AAV複製に必要とされる機能を含むことができる。ウイルスに基づくアクセサリ機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外の）およびワクシニアウイルス等、公知ヘルパーウイルスのいずれかに由来することができる。

【0111】

組換えAAV投与

rAAVは、典型的には、所望の組織の細胞をトランスフェクトし、過度の有害効果を伴うことなく十分なレベルの遺伝子移入および発現をもたらすのに十分な量で投与される。従来の薬学的に許容される投与経路として、選択された組織への直接的送達（例えば、脳内投与、くも膜下腔内投与）、静脈内、経口、エアロゾル投与、吸入による投与（鼻腔内および気管内送達を含む）、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、直腸および他の非経口の投与経路が挙げられるがこれらに限定されない。投与経路は、所望であれば組み合わせることができる。

【0112】

ある特定の実施形態では、対象へのある特定のrAAVの送達は、例えば、対象の血流

10

20

30

40

50

への投与により行うことができる。血流への投与は、静脈、動脈または他のいずれかの導血管 (vascular conduit) への注射により行うことができる。さらに、ある特定の事例において、脳組織、髄膜、神経細胞、グリア細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、脳脊髄液 (CSF)、間質内空隙等へと rAAV を送達することが望ましいことがある。一部の実施形態では、組換え AAV は、脳室領域への注射により脊髄または脳へと、また、定位的注射による等の本技術分野で公知の神経外科的技法を使用して、針、カテーテルまたは関連するデバイスにより、線条体 (例えば、線条体の尾状核または被殻) および神経筋接合部または小脳小葉へと直接的に送達することができる (例えば、Steinら (1999年) J Virol. 73 巻: 3424~3429 頁; Davidsonら (2000年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Davidsonら (1993年) Nat. Genet. 3 巻: 219~223 頁; Alisky および Davidson (2000年) Hum. Gene Ther. 11 巻: 2315~2329 頁等を参照)。

10

【0113】

対象における中枢神経系 (CNS) 組織へと導入遺伝子を送達するための方法は、本明細書に提供されている。本方法は、典型的には、対象において導入遺伝子 (例えば、CLN3) を発現させるための核酸ベクターを含む有効量の rAAV を対象に投与するステップが関与する。有効量は、若年型神経セロイドリポフスチン症 (JNCL または若年型パッテン病) を処置もしくは緩和する、ならびに／またはこの疾患もしくは状態の進行、重症度および／もしくは範囲を低下、抑制、阻害、和らげる、緩和もしくは影響することができる量を指す。

20

【0114】

有効量は、例えば、対象の種、年齢、体重、健康および標的とされる CNS 組織等、種々の因子に依存するため、対象および組織の間で変動し得る。有効量は、投与機序に依存する場合もある。例えば、血管内注射による CNS 組織の標的化は、場合によっては、くも膜下腔内または脳内注射による CNS 組織の標的化とは異なる (例えば、それよりも高い) 用量を必要とすることがある。場合によっては、複数用量の rAAV が投与される一方、他の場合では、本明細書の実施例に例示される通り、単一用量で十分となることがある。有効量は、使用される rAAV に依存する場合もある。例えば、CNS 組織を標的化するための投薬量は、rAAV の血清型 (例えば、カプシドタンパク質) に依存し得る。例えば、rAAV は、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh.10、rh.39、rh.43 および CSp3 からなる群から選択される AAV 血清型のカプシドタンパク質を有することができる。ある特定の実施形態では、rAAV の有効量は、1 kg 当たり 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} または 10^{14} または 10^{15} または 10^{16} ゲノムコピーである。ある特定の実施形態では、rAAV の有効量は、対象当たり 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} または 10^{14} または 10^{15} または 10^{16} ゲノムコピーである。複数用量が投与される場合、治療法のために同じまたは異なる血清型を組み合わせることができる。

30

【0115】

対象における CNS 組織に導入遺伝子を送達するための方法は、単一の経路または複数の経路により rAAV を投与するステップを含むことができる。例えば、対象における CNS 組織への導入遺伝子の送達は、静脈内投与により、血液脳関門を通過する有効量の rAAV を対象に投与するステップを含むことができる。対象における CNS 組織への導入遺伝子の送達は、くも膜下腔内投与または脳内投与、例えば、脳室内注射により、有効量の rAAV を対象に投与するステップを含むことができる。対象における CNS 組織に導入遺伝子を送達するための方法は、2 種の異なる投与経路、例えば、くも膜下腔内投与および脳内投与により、有効量の rAAV を同時投与するステップを含むことができる。同時投与は、およそ同じ時点でまたは異なる時点で行うことができる。

40

【0116】

ある特定の実施形態では、標的とされる CNS 組織は、例えば、皮質、海馬、視床、視床下部、小脳、脳幹、頸髄、胸髄および腰髄から選択することができる。CNS 組織を標

50

的化するための投与経路は、典型的には、上述の通り A A V 血清型に依存する。

【0117】

ある特定の実施形態では、対象において導入遺伝子（例えば、C L N 3）を発現させるための核酸ベクターを含む有効量の A A V を対象に投与する前に、推定される対象の診断による確認（またはキャリアもしくは出生前検査）を先ず行って、C L N 3 遺伝子における変異を識別することが望ましいことがある。斯かる検査は、例えば、共通 1 k b 欠失の P C R 増幅およびサイズ分類解析により、または C L N 3 遺伝子の 15 エクソンと隣接するイントロン領域を網羅する完全配列決定解析により行うことができる。配列決定は、C L N 3 遺伝子において全て報告されたいずれかのナンセンス、ミスセンス、スプライシング変異、小型の挿入および欠失変異を明らかにすることができる。

10

【0118】

ある特定の状況下で、皮下、臍内、鼻腔内、非経口的、静脈内、筋肉内、脳内、くも膜下腔内、脳内、経口、腹腔内または吸入のいずれかにより、本明細書に開示されている適切に製剤化された医薬組成物として、r A A V に基づく治療構築物を送達することが望ましいであろう。一部の実施形態では、米国特許第 5, 543, 158 号；同第 5, 641, 515 号および同第 5, 399, 363 号に記載されている投与モダリティを使用して、r A A V を送達することができる。

【0119】

一部の実施形態では、本明細書に記載されているベクター、組換えアデノ随伴ウイルス、医薬製剤等は、追加的な治療薬と共に投与することができる。追加的な治療薬の非限定例として、ミコフェノール酸モフェチル、カルベノキソロン (carbenoxolene)、グリチルレチン酸、グリチルリジン酸、シャペロン療法、酵素補充療法、幹細胞療法、抗癌薬物療法、抗酸化剤補給（例えば、ビタミン C、ビタミン E、メチオニン、B6）、オメガ-3 脂肪酸が挙げられる（例えば、Hobert ら（2006 年）*Biochimica et Biophysica Acta* 1762 巻（10 号）：945～953 頁を参照）。追加的な治療薬の投与量、処置プロトコールおよび投与経路は、本技術分野で公知であるおよび／または処置の種類等に基づき決定する熟練した臨床医の技能範囲内である。

20

【0120】

一実施形態では、本明細書に記載されているベクター、組換えアデノ随伴ウイルス、医薬製剤等と、追加的な治療薬は、逐次に投与される。別の実施形態では、本明細書に記載されているベクター、組換えアデノ随伴ウイルス、医薬製剤等と、追加的な治療薬は、同時に投与される。一実施形態では、本明細書に記載されているベクター、組換えアデノ随伴ウイルス、医薬製剤等は、追加的な治療薬の投与期間の後に投与される。さらなる態様では、r A A V 治療法は、他の相補的 (complimentary) 治療法と同時投与されて、疾患の症状を軽減または処置する。

30

【0121】

組換え A A V 組成物

ある特定の実施形態では、r A A V は、本技術分野で公知のいずれか適切な方法に従って、組成物中において対象へと送達することができる。例えば、生理学的に適合性の担体（例えば、組成物における）に懸濁された r A A V は、対象、例えば、ヒト、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、モルモット、ハムスター、ニワトリ、シチメンチョウまたは非ヒト霊長類（例えば、マカク）に投与することができる。組成物は、r A A V を単独で、または 1 種もしくは複数の他のウイルス（例えば、1 種または複数の異なる導入遺伝子をコードするか、またはこれを有する第 2 の r A A V）と組み合わせて含むことができる。一部の実施形態では、組成物は、1 種または複数の異なる導入遺伝子をそれぞれ有する、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 種またはそれ超の異なる r A A V を含む。

40

【0122】

適した担体は、当業者であれば、r A A V が対象とする適応症を考慮して容易に選択することができる。例えば、適した担体の 1 つとしては、種々の緩衝溶液（例えば、リン酸

50

緩衝食塩水)と共に製剤化することができる生理食塩水が挙げられる。他の例示的な担体として、滅菌生理食塩水、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油および水が挙げられるがこれらに限定されない。

【0123】

任意選択で、本発明の組成物は、r A A Vおよび担体（複数可）に加えて、保存剤または化学的安定剤等の他の従来の医薬品成分を含有することができる。適した例示的な保存剤として、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルパニリン、グリセリン、フェノールおよびパラクロロフェノールが挙げられるがこれらに限定されない。適した化学的安定剤は、ゼラチンおよびアルブミンを含む。

10

【0124】

一部の実施形態では、r A A V組成物は、特に、高r A A V濃度が存在する場合（例えば、約 10^{-13} v g / m lまたはそれ超）、組成物におけるA A V粒子の凝集を低下させるように製剤化される。r A A Vの凝集を低下させるための方法は、本技術分野で周知であり、例えば、界面活性物質の添加、p H調整、塩濃度調整等を含む（例えば、Wrightら（2005年）Mol. Ther. 12巻：171～178頁等を参照）。

【0125】

種々の処置レジメンにおいて本明細書に記載されている特定の組成物を使用するために適した投薬および処置レジメンの開発と同様に、薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は、当業者に周知である。典型的には、このような製剤は、少なくとも約0.1%の活性成分またはそれ超を含有することができるが、活性成分（複数可）のパーセンテージは、当然ながら変更することができ、便宜上、例えば、総製剤の重量または容量の約1または2%～約70%または80%またはそれ超の間とすることができる。当然だが、治療上有用な組成物のそれぞれにおける活性成分の量は、化合物のいずれか所定の単位用量において適した投薬量が得られるような仕方で調製することができる。溶解性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品有効期間および他の薬理学的考察等の因子が、斯かる医薬製剤を調製する当業者によって考慮され、したがって、種々の投薬量および処置レジメンが望ましいことがある。

20

【0126】

注射使用に適した医薬品形態は、典型的には、滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌水溶液または分散液および滅菌粉末を含む。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物ならびに油において調製することもできる。貯蔵および使用の通常条件下で、このような調製物は、微生物が殖えるのを防止するための保存剤を含有する。多くの場合、形態は、滅菌されており、容易な注射器使用能（syringability）が存在する程度まで流動的である。製剤は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で安定的であり、細菌および真菌等の微生物の汚染作用から保存される。ある特定の実施形態では、担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）、これらの適した混合物および／または植物油を含有する溶媒または分散媒とすることができる。ある特定の実施形態では、適切な流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用により、分散液の場合は要求される粒子径の維持により、また、界面活性物質の使用により維持することができる。様々な実施形態では、微生物の作用の防止は、様々な抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが望ましいであろう。注射用組成物の延長された吸収は、組成物における、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらすことができる。

30

40

【0127】

ある特定の実施形態では、注射用水溶液の投与のために、例えば、溶液は、必要であれ

50

ば、適切に緩衝することができ、十分な生理食塩水またはグルコースにより液体希釈剤を先ず等張性にする事ができる。このような特定の水溶液が、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることができる滅菌水性培地は、当業者には公知であろう。例えば、1投薬量を1mlの等張性NaCl溶液に溶解し、1000mlの皮下点滴療法液に添加する、または提案される注入部位に注射することができる（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035～1038および1570～1580頁を参照）。宿主の状態に応じて、投薬量にある程度の変動が生じ得る。一部の実施形態では、投与責任者は、いずれにせよ、個々の宿主に適切な用量を決定するであろう。

【0128】

10

ある特定の実施形態では、滅菌注射用溶液は、必要に応じて本明細書に列挙されている様々な他の成分を有する適切な溶媒において要求される量の活性rAAVを取り込み、続いて濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒および上に列挙されたもののうち要求される他の成分を含有する滅菌媒体に様々な滅菌された活性成分を取り込むことにより調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、例示的な調製方法として、以前に滅菌濾過されたその溶液から活性成分プラスいずれか追加的な所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライ技法が挙げられるがこれらに限定されない。

【0129】

20

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されているrAAV組成物は、中性または塩形態で製剤化することもできる。薬学的に許容される塩は、例えば、塩酸もしくはリン酸等の無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸により形成される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成）を含む。遊離カルボキシル基により形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄等の無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基に由来してもよい。製剤化により、溶液は、投薬製剤と適合性の様式で、治療上有効となるような量で投与されるであろう。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル等、種々の剤形で容易に投与される。

【0130】

30

本明細書において使用される場合、「担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、媒体、コーティング、希釈剤、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、バッファー、担体溶液、懸濁液、コロイド等を含む。医薬品活性物質のための斯かる培地および薬剤の使用は、本技術分野で周知である。補足的活性成分を組成物に取り込むこともできる。語句「薬学的に許容される」は、宿主に投与される際にアレルギー性または同様の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【0131】

リポソーム、ナノカプセル、マイクロ粒子、マイクロスフェア、脂質粒子、小胞等、送達媒体を、適した宿主細胞への本発明の組成物の導入のために使用することができる。特に、rAAVベクターにより送達される導入遺伝子は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェアまたはナノ粒子等のいずれかの中に被包して、送達のために製剤化することができる。

40

【0132】

ある特定の実施形態では、斯かる製剤は、本明細書に開示されている核酸またはrAAV構築物の薬学的に許容される製剤とすることができる。リポソームの形成および使用は一般に、当業者に公知である（例えば、米国特許第5,741,516号；同第5,567,434号；同第5,552,157号；同第5,565,213号；同第5,738,868号；同第5,795,587号等を参照）。

【0133】

リポソームの使用は、他の手順によるトランスフェクションに対して通常であれば抵抗性であるいくつかの細胞型を用いて成功してきた。加えて、リポソームは、ウイルスに基

50

づく送達系には典型的なDNAの長さの制約がない。リポソームは、種々の培養細胞株および動物への遺伝子、薬物、放射線療法剤、ウイルス、転写因子およびアロステリックエフェクターの導入に有効に使用されてきた。加えて、リポソーム媒介性薬物送達の有効性を試験するいくつかの成功した臨床治験が完了した。

【0134】

リポソームは、水性培地中に分散したリン脂質から形成され、多層状同心円状二重層小胞（多層状小胞（MLV）とも呼ばれる）を自発的に形成する。MLVは一般に、25 nm～4 μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、200～500 オングストロームの範囲内の直径を有し、コアに水溶液を含有する小型の単層小胞（SUV）の形成をもたらす。

10

【0135】

あるいは、rAAVのナノカプセル製剤を使用することができる。ナノカプセルは一般に、安定的かつ再現性のある仕方で物質を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷による副作用を回避するために、斯かる超微細粒子（0.1 μm前後のサイズ）は、*in vivo*で分解され得るポリマーを使用して設計することができる。ある特定の実施形態では、このような要件を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子が使用に企図される。

【0136】

上述の送達方法に加えて、宿主にrAAV組成物を送達する代替法として次の技法も企図される。ソノフォレーシス（すなわち、超音波）が、循環器系へのおよびそれを介した薬物浸透の速度および有効性を増強するためのデバイスとして使用され、米国特許第5,656,016号に記載された。企図される他の薬物送達代替法は、骨内注射（米国特許第5,779,708号）、マイクロチップデバイス（米国特許第5,797,898号）、点眼用製剤、経皮マトリックス（米国特許第5,770,219号および同第5,783,208号）およびフィードバック制御送達（米国特許第5,697,899号）である。

20

【0137】

キットおよび関連する組成物

本明細書に記載されている薬剤は、一部の実施形態では、医薬品または診断もしくは研究用キットへと集合させて、治療、診断または研究適用におけるその使用を容易にすることができる。キットは、本発明の構成成分を収容する1個または複数の容器と、使用説明書とを含むことができる。特に、斯かるキットは、本明細書に記載されている1種または複数の薬剤を、このような薬剤の意図される適用および適切な使用について記載する説明書と共に含むことができる。ある特定の実施形態では、キットにおける薬剤は、薬剤の特定の適用および投与方法に適した医薬製剤および投薬量中に存在することができる。研究目的のキットは、様々な実験を行うのに適切な濃度または含量の構成成分を含有することができる。

30

【0138】

キットは、本明細書に記載されている方法の使用を容易にするように設計することができる、多くの形態をとることができる。キットの組成物のそれぞれは、適用可能であれば、液体形態（例えば、溶液）または固体形態（例えば、乾燥粉末）で提供することができる。ある特定の事例において、組成物のいくつかは、例えば、キットに備わっていても備わってなくてもよい適した溶媒または他の化学種（例えば、水または細胞培養培地）の添加により、構成可能（*constitutible*）または他の仕方で加工可能（例えば、活性形態に）であってもよい。

40

【0139】

本明細書において使用される場合、「説明書」は、説明および／または促進の構成成分を定義することができ、典型的には、本発明のパッケージング上のまたはそれに添えた書面の説明書が関与する。説明書は、キットに説明書が添えられていることを使用者が明らかに認識できるような、いずれかの様式で提供されたいずれかの口頭または電子の説明書

50

、例えば、視聴覚（例えば、ビデオテープ、DVD等）、インターネットおよび／またはウェブに基づくコミュニケーション等を含むこともできる。書面の説明書は、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する行政機関によって規定された形態とすることができ、この説明書は、動物投与のための製造、使用または販売の機関による承認が反映されたものであってもよい。

【0140】

キットは、1個または複数の容器中に、本明細書に記載されている構成成分のうちいずれか1種または複数を含むことができる。一例として、一実施形態では、キットは、キットの1種もしくは複数の構成成分を混合するため、および／または試料を単離し混合し、対象に適用するための説明書を含むことができる。キットは、本明細書に記載されている薬剤を収容する容器を含むことができる。薬剤は、液体、ゲルまたは固体（粉末）の形態とすることができる。薬剤は、滅菌的に調製し、注射器内にパッケージし、冷蔵して輸送することができる。あるいは、薬剤は、貯蔵のためのバイアルまたは他の容器内に収容することができる。第2の容器は、滅菌的に調製された他の薬剤を有することができる。あるいは、キットは、予め混合された活性薬剤を含み、注射器、バイアル、チューブまたは他の容器内において輸送することができる。キットは、注射器、局所的適用デバイスまたはIV針チューブおよびバッグ等、対象への薬剤の投与に要求される構成成分のうち1種もしくは複数または全種を有することができる。

10

【0141】

本明細書に記載されている治療法は、適切な診断技法と組み合わせて、この治療法のための患者を識別および選択することができる。例えば、患者から試料を単離し、若年型バッテン病の発症に相関した変異（ホモ接合型またはヘテロ接合型）に関してこの試料を検査する。よって、症状出現に先立ちまたは疾患の前進前に、変異を持つ患者を識別することができる。

20

【実施例】

【0142】

以下の実施例は、請求されている発明を限定するのではなく例示するために提供されている。

【0143】

（実施例1）

若年型バッテン病の処置のための遺伝子療法

本実施例は、若年型バッテン病の処置のための遺伝子療法の初期試験について記載する。遺伝子療法は、一部には、隣接する形質導入されていない細胞の相互是正に起因して、可溶性酵素における変異が関与するバッテン病の形態の是正においては見込みを示したが（Passiniら（2006年）J. Neurosci. 26巻（5号）：1334～1342頁；Sondhiら（2012年）Hum. Gene Ther. Meth. 23巻（5号）：324～335頁；Macauleyら（2014年）J. Neurosci. 34巻（39号）：13077～13082頁）、CLN3は、膜貫通タンパク質であり（Cotmanら（2012年）Clin. Lipidol. 7巻（1号）：79～91頁）、表現型効果を生じるにはより多くの細胞に形質導入する必要があることを意味するため、斯かるアプローチは、JNCLの処置には難しいと考えられた。しかし、本明細書に提供されているデータは、JNCLのマウスモデルにおける運動行為を改善するのに十分な細胞にCLN3を送達することが可能であることを実証する。

30

40

【0144】

自閉症スペクトラム症であるレット症候群（Gargら（2013年）J. Neurosci. 33巻（34号）：13612～13620頁）の遺伝子投与量依存性モデルにおいて以前に有効であったメチルーCpG結合タンパク質2（MeCP2）のプロモーターにより、低いCLN3発現レベルが駆動され、別個の構築物が、 β -アクチンプロモーターにより高レベルのCLN3を駆動した。このアプローチの理論的根拠は、出生後CLN3発現は限定されているため（Eliasonら（2007年）J. Neurosci. 27巻（37号）：9826～9834頁）、低CLN3レベルが、正常な細胞機能に要求されるという予測に基づい

50

た。本試験は、*in vivo*でのCLN3遺伝子投与量効果の最初の実証となり、驚くべきことに、高レベルのCLN3過剰発現が、治療利益を遮蔽することが観察された。

【0145】

後述する通り、原理証明試験のため、1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウスに、自己相補的(s c)AAV9/β-アクチン-hCLN3(高発現)またはs cAAV9/MeCP2-hCLN3(低発現)の1用量の 2×10^{12} ウイルスゲノム(v g)を静脈内に与え、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現を駆動するウイルス(s cAAV9/β-アクチン-GFPおよびs cAAV9/MeCP2-GFP)を対照とした(図1を参照)。重要なことに、海馬(HPC)、線条体(STR)、視床(TH)、視覚皮質(VC)および小脳(CB)を含む、JNCLにおいてニューロンが死ぬように運命付けられたいくつかの脳領域において、hCLN3発現のプロモーター遺伝子投与量効果が確認され、hCLN3レベルは、s cAAV9/MeCP2-hCLN3と比べ、s cAAV9/β-アクチン-hCLN3を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスにおいて3~8倍上昇していた。

10

【0146】

しかし、低いhCLN3発現を駆動するs cAAV9構築物(s cAAV9/MeCP2-hCLN3)のみが、CLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動欠損を是正することができたため(加速ロータロッドおよびポール降下)、hCLN3レベルと神経保護の間には断絶があり、脳における高いCLN3発現が、運動協調性の改善には有利ではないという驚くべき結果を実証する(図2A~図2Eを参照)。リソソーム蓄積物質についても同様の利益が観察され、この物質は、s cAAV9/MeCP2-hCLN3を与えた動物の体性感覚野バレル皮質(S1BF)(図7Aを参照)、VC(図7Cを参照)およびTH(図7Dを参照)において有意に低下した。

20

【0147】

CLN3^{Δex7/8}マウスの運動行為におけるs cAAV9/MeCP2-hCLN3の有益な効果は、s cAAV9/GFP対照構築物では観察されず、これから、hCLN3の作用の特異性が確認される(図2A~図2Eを参照)。S1BF、VC、STR、TH、HPCおよびCBにおけるGFP発現により明らかな通り(図4を参照)、脳におけるウイルス形質導入の程度は広汎であった。s cAAV9/MeCP2-hCLN3は、1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウスにおけるNeuN⁺ニューロンおよびGFAP⁺アストロサイトに形質導入した一方、マイクログリアにおいては限定的な発現が検出された(図6A~図6Cを参照)。野生型CLN3発現は、ニューロンおよびグリアのサブセットにおいてのみ回復されたが、これは、CLN3^{Δex7/8}動物における疾患関連の病理の是正に十分であった(運動機能改善およびリソソーム蓄積物質減少として測定される)。理論に制約されることは望まないが、これは、行動回路における細胞の重複性もしくは不十分なニューロン/グリアCLN3によって衰弱した回路に取って代わる他の機構による代償を反映し得る、および/または形質導入された細胞の数の過小評価を反映し得ることが想定される。

30

【0148】

これらの観察に基づき、s cAAV9/MeCP2-hCLN3遺伝子療法が、JNCL転帰を有意に改善するのに十分な数のCNS細胞を標的とするであろうと考えられる。

40

【0149】

方法および結果

自己相補的AAV9(s cAAV9)は、非分裂細胞において安定的エピソームとして存続し、多くの研究は、数年間の安定的導入遺伝子発現を報告している。s cAAV9ベクターは、伝統的な一本鎖(ss)AAVベクターよりも10~100倍効率的である(McCartyら(2003年) Gene Ther. 10巻(26号): 2112~2118頁; McCartyら(2001年) Gene Ther. 8巻(16号): 1248~1254頁)が、外来性DNA<2.2 kbしかパッケージできない。hCLN3 cDNAは僅か1.3 kbであるため、このことは、本明細書に記載されているアプローチにとっての制約とならない。s

50

cAAV9構築物は、hCLN3を持つように遺伝子操作して、その翻訳潜在力を促進した（例えば、図1を参照）。ある特定の構築物において、メチルCpG結合タンパク質2（MeCP2）プロモーターが、hCLN3発現の駆動用を選択された。

【0150】

JNCLの遺伝子療法アプローチの実現可能性は、1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウスへのscAAV9/MeCP2-hCLN3（単一用量）の全身性i.v.送達、運動行為を有意に改善したが、これは、GFPを持つ対照ウイルスでは観察されなかったことを示すデータによって支持される（図2A）。運動行為改善は、形質導入2ヶ月後（図2B）、形質導入3ヶ月後（図2C）、形質導入4ヶ月後（図2D）および形質導入5ヶ月後（図2E）に観察され続けた。1ヶ月および3ヶ月目の血液化学プロファイルの解析は、いずれの処置群における異常も明らかにしなかった（データ図示せず）。

10

【0151】

scAAV9構築物は、それぞれβ-アクチンおよびMeCP2プロモーターを使用して、形質導入細胞における高対低のhCLN3発現を達成するように遺伝子操作した。1ヶ月齢CLN3^{Δex7/8}マウスを後眼窩洞経路でウイルスにより形質導入した。形質導入5ヶ月および13ヶ月後にマウスを屠殺し、その際マウスはそれぞれ6ヶ月および14ヶ月齢であった。ピラトーム切片（300μm厚）から脳領域を解剖した。両方のhCLN3に対してプロモーター遺伝子投与量効果が確認され、発現は、低発現scAAV9/MeCP2-hCLN3（図3）およびGFPタンパク質（図4）と比較して、scAAV9/β-アクチン-hCLN3で処置したCLN3^{Δex7/8}マウスの小脳（CB）、視床（TH）、海馬（HPC）、線条体（STR）、視覚皮質（VC）、体性感覚野バレル皮質（S1BF）および眼においておよそ3～8倍上昇していた。

20

【0152】

加えて、形質導入5ヶ月後のマウスから収集された脳横断面から共焦点画像を取得して、分布および発現レベルをさらに可視化および確認した。同じ共焦点設定を使用して画像を取得して、発現の差を強調した。結果は、scAAV9/β-アクチン-hCLN3およびscAAV9/MeCP2-hCLN3で処置したCLN3^{Δex7/8}マウスの両方における広い体内分布を示し、GFP強度は、scAAV9/β-アクチン-hCLN3で処置したマウスにおいてより大きかった。図5A。結果は、形質導入13ヶ月後のマウスの網膜領域におけるscAAV9/β-アクチン-hCLN3およびscAAV9/MeCP2-hCLN3の両方の分布も示した。図5B。

30

【0153】

scAAV9/β-アクチン-hCLN3およびscAAV9/MeCP2-hCLN3の投与5ヶ月後のCLN3^{Δex7/8}マウスの脳におけるscAAV9/β-アクチン-GFPまたはscAAV9/MeCP2-GFPの比較体内分布は、GFP⁺細胞および総細胞数（DAPI⁺）を計数することにより決定した。図6A。図6Bにおいて要約される通り、scAAV9/MeCP2-hCLN3で処置したマウスは、脳のS1BF、VPM/VPLおよびVC領域におけるGFP⁺細胞のパーセンテージの有意な増加を呈した。

【0154】

プロモーター遺伝子投与量効果に関する驚くべき知見は、両方のプロモーター構築物によって形質導入されたNeuN⁺およびGFAP⁺細胞のパーセンテージにおける類似性によってさらに実証された（データ図示せず）。重要なことに、データは、低発現構築物（scAAV9/MeCP2-hCLN3）の単一の注射を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスが、形質導入5ヶ月間後まで（現在までに試験した最新間隔）運動協調性における一貫した改善を呈した一方、高発現構築物（scAAV9/β-アクチン-hCLN3）が、有効ではなかったことを示す（図2A～図2E）。

40

【0155】

加えて、scAAV9/MeCP2-hCLN3を与えたCLN3^{Δex7/8}マウスの脳において、リソソーム蓄積物質の有意な低下が観察された（図7A～図7G）。レッ

50

ト症候群および脊髄性筋萎縮症 (SMA) のモデルにおける s c A A V 9 を使用した他の報告と合致して (Gargら (2013年) J. Neurosci. 33巻 (34号) : 13612~13620頁; Foustら (2010年) Nat. Biotechnol. 28巻 (3号) : 271~274頁)、s c A A V 9 の体内分布は広汎であり、NeuN⁺ニューロンおよびGFAP⁺アストロサイトが、S1BF、VC、HPC、STR、TH、CBおよび視交叉上核 (SCN; 図8Aおよびデータ図示せず) において形質導入された。図8Bに示す通り、s c A A V 9 の全身性投与は、CLN3^{Δex7/8}脳におけるアストロサイトに形質導入する。図8Cは、s c A A V 9 の全身性投与が、CLN3^{Δex7/8}脳におけるマイクログリアに形質導入しないことを示す。

【0156】

ごく一部のCNS細胞が、ウイルスによって形質導入されたと思われるが、CLN3^{Δex7/8}動物における行動改善は、ニューロンにおけるhCLN3の有益な内因性効果およびおそらくhCLN3形質導入グリアからの非細胞自律的寄与を示唆する。後者は、グルタミン酸塩レベルおよび三者間シナプスでのニューロン活性の調節におけるアストロサイトの十分に認められた役割に基づきニューロン生存を促進することが予想されるであろう (Pereaら (2009年) Trends Neurosci. 32巻 (8号) : 421~431頁)。

【0157】

JNCLに対する別の共通症状は、体重減少である。CLN3^{Δex7/8}マウスの体重増加におけるs c A A V 9 /MeCP2-hCLN3の有益な効果は、s c A A V 9 /β-アクチン-hCLN3またはs c A A V 9 /GFP対照構築物では観察されず、これから、hCLN3の作用の特異性が確認される (図11)。

【0158】

本明細書に記載されているアプローチは、全身性送達経路を用いてウイルス体内分布を増強し、予備的データは高CLN3レベルが無効であることを示すことから、特有のプロモーター (MeCP2) を用いて低いCLN3発現を駆動することができるという点において、従来の治療法よりも有利であることが注記される。要約すると、s c A A V 9 /MeCP2-hCLN3のいくつかの性状が、JNCL転帰改善の成功の見込みを支える、すなわち; 1) このアプローチは、疾患の根本的原因において遺伝的欠損を是正し得る; 2) ウイルスは、若年および成体動物におけるCNS細胞に効率的に形質導入することができ、JNCLは5~10歳まで診断されないため、これが重大な意味を持つ; 3) MeCP2プロモーターは、低レベルhCLN3発現を駆動し、これは、本明細書に提示するデータが示す通り、CLN3^{Δex7/8}マウスにおける運動機能の改善に必須である; ならびに4) hCLN3を持つウイルスの構築は、その臨床治験への移行を加速し得る。

【0159】

(実施例2)

安全性、毒性および炎症評価

異なる実験マウスコホートにおいて血清化学パネル (Abaxis、Union City、CA、USA) を実施して、AAV処置の安全性および毒性を評価した。測定したメディエータは、アルブミン (ALB)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アミラーゼ (AMY)、ビリルビン (TBIL)、血中尿素窒素 (BUN)、カルシウム (CA)、リン (PHOS)、グルコース (GLU)、ナトリウム (Na⁺)、カリウム (K⁺)、総タンパク質 (TP)、グロブリン (GLOB) およびクレアチニン (CRE) を含んだ。1ヶ月齢マウスにウイルスを投与し、感染後1ヶ月目 (図12)、3ヶ月目 (データ図示せず)、5ヶ月目 (データ図示せず)、7ヶ月目 (データ図示せず) および10ヶ月目 (図13) に検査を行った。データは、ある特定の分析物レベルの差、例えば、他の実験コホートと比較したAAV9/β-アクチン-hCLN3を与えたマウスにおけるアラニンアミノトランスフェラーゼレベルの増加を明らかにしたが、これらは、分析物毎の正常範囲に関して統計的に有意ではなかった。

【0160】

MILLIPLEX (登録商標) パネル (EMD Millipore、Billerica、MA、USA) を使用して、血清炎症メディエータ解析も行った。測定したメディエータは、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターフェロンガンマ (IFN- γ)、インターロイキン-1アルファ (IL-1 α)、インターロイキン-1ベータ (IL-1 β)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-12p70 (IL-12p70)、インターロイキン-13 (IL-13)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-17 (IL-17)、ケモカイン (C-C) リガンド2 (CCL2)、ケモカイン (C-C) リガンド3 (CCL3)、ケモカイン (C-C) リガンド5 (CCL5/RANTES)、ケモカイン (C-X-C) リガンド2 (CXCL2)、ケモカイン (C-X-C) リガンド9 (CXCL9/MIG)、ケモカイン (C-X-C) リガンド10 (CXCL10)、腫瘍壊死因子-アルファ (TNF- α) および血管内皮増殖因子 (VEGF) を含んだ。1ヶ月齢マウスにウイルスを投与した。形質導入2および4ヶ月後に試料を収集して、AAV9が、全身性炎症の証拠を誘発したか評価した。検出されたメディエータのみを図14A~図14Fに示す。先の試験と一貫して、媒体処置したCLN3^{Δex7/8}マウスにおける全身性炎症の証拠は殆どなかったが、その理由として、このようなマウスは典型的には、およそ1歳まで顕性の全身性またはCNS炎症を呈さないことが挙げられる。加えて、AAV9ウイルスは、全身性炎症性変化の証拠を示さなかった。まとめると、これらのデータは、JNC Lの処置のためのAAV9の安全性を示唆する。

【0161】

(実施例3)

AAV製造

293細胞において、アデノウイルスヘルパープラスミドpHelper (Stratagene) と共にRep2Cap9配列をコードするプラスミドを備える二本鎖AAV2-ITRに基づくCB-GFPベクターを使用した一過性トランスフェクション手順により、AAV9を産生した。血清型9配列を配列決定により検証したところ、以前に記載されたものと同一であった (Gaoら (2002年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99巻: 11854~11859頁)。ウイルスを2回の塩化セシウム密度勾配精製ステップにより精製し、PBSに対して透析し、0.001% Pluronic-F68と共に製剤化してウイルス凝集を防止し、4℃で貯蔵した。Taq-Man技術を使用した定量的PCRにより、全ベクター調製物を力価決定した。

【0162】

AAV構築物は、遺伝子発現カセットを挟んで2個の末端逆位反復配列を含有する。左末端逆位反復配列に対する修飾は、Repニッキングの部位を除去し、これにより、自己相補的AAVゲノムを作製した。発現カセットは、導入遺伝子発現を駆動するために、以前に記載された (Gargら (2013年) J. Neurosci. 33巻: 13612~13620頁; Adachiら (2005年) Hum Mol Genet. 14巻: 3709~3722頁) マウスMeCP2プロモーターの断片を含有する。発現カセットは、SV40イントロンおよびヒトCLN3バリエーション2 cDNA (GenBank受託番号NM_000086.2; 配列番号11) と、続くウシ成長ホルモンポリアデニル化配列を含有する。

【0163】

本明細書に記載されている実施例および実施形態が、単に例示を目的としており、それに照らした様々な修正または変更が当業者に示唆され、本願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。本明細書に引用されているあらゆる刊行物、特許および特許出願は、その中の配列表を含めて、あらゆる目的のため、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0164】

【表 1 - 1】

配列表

配列番号 1

位置 AAC05337 438 aa 直鎖状 PRI 30-OCT-2002
 定義 CLN3 [Homo sapiens]

MGGCAGSRRRFSDSEGEETVPEPRLPLLDHQGAHWKNAVGFWLLGLCNNFSYVV
 MLSAAHDILSHKRTSGNQSHVDPGPTPIPHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLVK
 LLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICAAGSFVLVAFSHSVGTSLCGVVVFASISSGLGEVTF
 SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLLGALSYLEGLTQAGLSPQQTLLSMLGIPALLAS
 YFLLLTSPQAQDPGGEEEAESAARQPLIRTEAPESKPGSSSSLSLRERWTVFKGLLW
 YIVPLVVVYFAEYFINQGLFELLFFWNTSLSHAQQYRWYQMLYQAGVFASRSSLRC
 CRIRFTWALALLQCLNLVFLFLLADVWFGFLPSIYLVFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNI
 ALETSDHEHREFAMAATCISDTLGLSLGSLALPLHDFLCQLS

10

配列番号 2

位置 scAAV_MP_CLN3 6055 bp DNA 環状 SYN 31-OCT-2014

フィーチャー 位置/クオリファイア

20

misc_feature 662..767
 /gene="mutated ITR"
 /SECDrawAs="Region"
 /SECStyleId=1
 misc_feature 775..1511
 /gene="Promoter"
 /product="mecp2 promoter--mouse"
 /SECDrawAs="Region"
 /SECStyleId=1
 misc_feature 1520..1550
 /gene="SV40_late_19s_int"
 /SECDrawAs="Region"
 /SECStyleId=1
 misc_feature 1520..1616
 /gene="modSV40_late_16s_int"
 /SECDrawAs="Region"
 /SECStyleId=1
 misc_feature 1589..1610
 /gene="seq primer"
 /SECDrawAs="Region"
 /SECStyleId=1
 CDS 1683..2999
 /gene="CLN3"
 /SECDrawAs="Gene"
 /SECStyleId=1
 misc_feature 3052..3198
 /gene="BGHpA"
 /SECDrawAs="Region"

30

40

【表 1 - 2】

```

/SECStyleId=1
misc_feature 3278..3418
/gene="ITR"
/SECDrawAs="Region"
/SECStyleId=1

```

起源

```

1 gcccaatacg caaacgcct cccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
61 aacgagggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
121 cgcattaagc gcggcgggtg tgggtgttac gcgcagcgtg accgtacac ttgccagcgc
181 cctagcgcgc gctccttcg cttcttccc ttcttttc gccacgttcg ccggcttcc
241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctccctt aggggtccga ttagtgctt tacggcacct
301 cgaccccaaa aaactgatt aggggtgatg ttacgtagt ggccalcgc cctgatagac
361 ggtttttcgc cttttgactg tggagtccac gtctttaat agtggactct tgtccaaac
421 tggacaaca ctcaacccta tctcggcta tcttttgat ttataaggga tttgccgat
481 ttggcctat tggtaaaaa atgagctgat ttaacaaaa tttaacgca atttaacaa
541 aatattaacg cttaaatgtt aaatattgc ttataacat ttctgttt tggggctttt
601 ctgattatca accgggggtac atatgattga catgctagt ttacgattac cgttcacgc
661 cctgcgcgtc cgtcgtcga ctgagggcgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt
721 tggtcgcccgc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggat tctatcaaac
781 caictgattc aacaatgaca gaccgatctc ttatgggctt ggcacacacc atctgcccat
841 tataaacgtc tgcaaacacc aagggttgat atgttgatt tactgtcgc cttaagagt
901 cgacatctgc taatttagt taataataca atcagtagac cctttaaag aagtccttg
961 gcttggaca accgccaggc cctcaacagg caactttgt actttacag aaaatgataa
1021 taaagaaatg ctggtgaagt caaatgtta tcacaatgtt gaactactca gcaggggaggc
1081 tctaataagg gccaaagacc tagacttct taagcgccag agtcacaaag ggcccagtta
1141 atctcaaca ttcaaatgtt gccacaaaa ccagccctc tgtccctag ccgctcttt
1201 ttccaagtgc acagtagaac tccaccaatc cgcagctgaa tgggtccgc ctctttccc
1261 tgctaaaca gacaggaact cctgccaatt gagggcgta ccgtaagge tccgcccag
1321 cctgggctcc acaaccaatg aagggtaatc tcgacaaaga gcaaggggtg gggcgccggc
1381 gcgcagggtc agcagcacac aggcgtgctg ggagggcggg gcgcgacgtc tggcgtcgg
1441 ggtcccgga tgggtgcgc gcgcgtccc tctctcga gagagggctg tggtaaac
1501 cgtccgaaa agttaactg taagttagt cttttgtc ttatttcag gtcccggatc
1561 cgtgtgtgtt gcaaatcaa gaactgtcc tcaaggatg ttgccttac tttaggctt
1621 gtacggaagt gttacttcg ctctaaaagc tgcggaatg taccgcggc cgateccag
1681 gtatgggagg ctgtgcaggc tgcggcggc gctttcga ttccgagggg gaggagaccg
1741 tcccggagcc ccggctcct ctgttgacc atcagggcgc gcattggaag aacgcggtg
1801 gcttctggtc gctgggctt tgcaacaact tctctatgt ggtgatgtg agtgccgcc
1861 acgacatct tagccacaag aggacatcg gaaaccagag ccatgtggac ccaggccaa
1921 cgcgatccc ccacaacgc tcatcagat ttactgcaa ctctctct acggctgtg
1981 tctctctgc ggacatctc ccacactcg tcatcaaat gttggctct ctggcctc
2041 acctgctgcc ctacagccc cgggttctc tcaaggatg ttgtgtgtt ggaagcttcg
2101 tctgtgtgc cttttctat tctgtggga ccagcctgt tgggtgtg ttgctagca
2161 tctcatcagg cttggggag gtcacctcc tctcctcac tgcctctac ccaggggcg
2221 tgatctctg gtgtctca gggactggg gagctgggt gctggggcc ctgtctacc
2281 tgggctcac ccaggccgc ctctccctc agcagacct gctgtcatg ctgggtacc
2341 ctgcctgct gctggccagc tatttctgt tctcacatc tctgaggcc caggacctg
2401 gaggggaaga agaagcagag agcgagccc ggcagccct cataagaacc gagggcccg
2461 agtcgaagcc aggtccagc tccagcctc ccttcggga aaggtggaca gtttcaagg
2521 gctgtgtg gtacattgt ccttggtc tagttact tccgagat ttcataac
2581 agggacttt tgaactctc ttttctga acattccct gactacgt cagcaatac
2641 gctgttaca gatgtgtac caggctggc ttttgctc ccgtctct ctcgctgt

```

【表 1 - 3】

2701	gtcgcatccg ttacacctgg gccctggccc tgcctcagtg cctcaacctg gtgttcctgc	
2761	tggcagacgt gtggttcggc ttctgcca gcatctacct cgtcttcctg atcattctgt	
2821	atgaggggct cctgggaggg gcagcctacg tgaacacctt ccacaacatc gccctggaga	
2881	ccagtgtatga gcaccgggag ttgcaatgg cggccacctg catctctgac aacctgggga	
2941	tctccctgtc ggggctcctg gctttgcctc tgcattgactt cctctgccag ctctcctgac	
3001	ctgcagggtc agaaagctta tcgataccgt cgactagagc tcgctgatca gccctgactg	
3061	tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg	
3121	aagggtccac tccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga	
3181	gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg	
3241	aagacaatag caggcatgct ggggagagat cgtctgagg aaccttagt gatggagtg	10
3301	gccactccct ctctgcgcgc tcgtcgtc actgaggccg ggcgaccaa ggtcggccga	
3361	cggccgggtt ttgcccgggc ggctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc	
3421	ccccccccc cccccggc gattctctt ttgtctccag acctcaggc aatgacctga	
3481	tagcctttgt agagacctt caaaaatagc taccctctc ggcatgaatt tatcagctag	
3541	aacgggtgaa tatcatatg atggtgattt gactgtctc ggctttctc acctgttga	
3601	atctttacct acacattact caggcatgac attlaaata tatgagggtt ctaaaaattt	
3661	ttatccttgc gttgaataa aggcctctc cgcaaaagta ttacagggtc ataattgtt	
3721	tgtacaacc gatttagctt tatgtctga ggctttatt cttaatttt cttaattctt	
3781	gccttgcctg tatgattat tggatgttg aatcgctga tgcggtattt tctccttacg	
3841	catctgtcgc gtatttcaca ccgcatatgg tgcacttca gtacaatctg ctctgatgcc	
3901	gcatagttaa gccagcccc acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt	20
3961	ctgtcccggt catccgctta cagacaagct gtgacctct ccgggagctg catgtgtcag	
4021	aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgc agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt	
4081	ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt cagggtggcact ttctcgggga	
4141	aatgtgcgcg gaacctctat ttgtttatt ttctaaatc attcaaatat gtatccgctc	
4201	atgagacaat aacctgata aatgctcaa taatatgaa aaaggaagag tatgagtatt	
4261	caacatttcc gtgtgccctt tatcccttt ttgcggcat ttgccttcc tgttttgc	
4321	caccagaaa cgtcggtaga agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt	
4381	tacatcgaa tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt	
4441	ttccaatga tgagcactt taaagtctg ctatgtggcg cgttattat ccgtattgac	
4501	gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac	
4561	tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt	
4621	gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttactt tgacaacgat cggaggaccg	30
4681	aaggagctaa ccgtttttt gcacaacatg ggggatcatg taactgcct tgatcgttg	
4741	gaaccggagc tgaatgaagc catacacaac gacgagcgtg acaccagat gcctgtagca	
4801	atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttacttagc ttcccgcaa	
4861	caattaatag actggatgga ggcgataaaa gtgcaggac cactctcgc ctccggcctt	
4921	ccggtcggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc	
4981	attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tccgtatcg tagttatcta cagcagggg	
5041	agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agatagggtc ctacatgatt	
5101	aagcatttgt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt	
5161	catttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg ataattctat gaccaaactc	
5221	ccttaacgtg agtttctgt cactgagcg tcagacccc tagaaaagat caaaggatct	
5281	tcttgagatc cttttttct gcgcgtaac tgctgcttc aaacaaaaa accaccgcta	
5341	ccagcgggtg ttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttctccgaa ggttaactggc	40
5401	ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc ctctagtgt agccgtagt aggccaccac	
5461	tcaagaact cttagcacc gcctacatac ctgctctgc taatcctgt accagtggct	
5521	gctgccagt ggcataagtc gtgtcttacc ggggtggact caagacgata gttaccggat	
5581	aaggcgcagc ggtcgggtc aacgggggg tctgtcacac agcccagctt ggagcgaacg	
5641	acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac gcttccgaa	
5701	gggagaaagg cggacaggt tccggtgaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg	
5761	gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggttctg ccacctctga	

【表 1 - 4】

5821 cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc
 5881 aacgcggcct ttltacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttcttctc
 5941 gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct
 6001 cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagc
 //

ポリアデニル化シグナル
 [配列番号 3]

10

AATAAA

ポリアデニル化シグナル
 [配列番号 4]

CAATAAA

ポリアデニル化シグナル
 [配列番号 5]

20

ATTAAA

ポリアデニル化シグナル
 [配列番号 6]

TANA

CLN3 [Canis lupus]
 配列番号 7

30

MGGCAGSRRRLDSEEEETAPEPRPPRSYHKGALWKNVMGFWLLGLCNNFSYVV
 MLSAAHDILSHQRASGNQSHVDPDPPPTAHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLIK
 LLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICAAGSFILVAFSHSVGTSLCGVVLASISSGVGEVTF
 SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLMGALSYLGLTQAGLSPQHITLLSMLGIPALMLAS
 YFFLLTSPEPQDPGGEEEAETSARQPLIDSETPESKPDSSSNLSLQERWTVFKGLLWY
 IVPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLNHAQQYRWYQMLYQAGVFVSRSSLHCC
 RIRFTWVLALLQCLNLAFLLDVWFSLPSIYLVFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNIAL
 ETSDQHREFAMAAACISDTLGLSLGSLALPLHDFLCHLS

40

CLN3 [Mus musculus]
 配列番号 8

MGSSAGSWRRLEDSEEREETDSEPQAPRLDSRSVLWKNVAVGFWILGLCNNFSYVVM
 LSAAHDIKQEASGNQSHVEPGPTPTPHNSSSRFDCNSISTA VLLADILPTLVIKL
 LAPLGLHLLPYSPRVLVSGVCSAGSFVLVAFSQQSVGLSLCGVVLASISSGLGEVTF
 LTAFYPSAVISWWSSGTGGAGLLGSLSYLGLTQAGLSPQHITLLSMLGIPVLLLAS

【表 1 - 5】

LLTSPEPLDPGGENEAEATAARQPLIGTETPESKPGASWDLSLQERWTVFKGLLWYI
 IPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLSHAQQYRWYQMLYQAGVFASRSSLQCCRI
 RFTWVLALLQCLNLALLADVCLNFLPSIYLIFIIILYEGLLGGAAYVNTFHNIALETS
 DKHREFAMEAACISDTLGLISLSGVLALPLHDFLCHLP

CLN3 [*Ovis aries*]

配列番号 9

MGGCAGSPRRLSDSEGEETDPAPRPPLQDSQGAHWKNAVGFWLLGLCENNFSYVV
 MLSAAHDILSHQRTAGNQSHVDPDPTPTSHNSSSRFDCNPVSTAAVLLADILPTLIK
 LLAPLGLHLLPYSPRVLTSGICAAGSFLLVAFSHSVMSLSCGVVLASISSGLGEVTFLS
 LTAFYPRAVISCWSSGTGGAGLLGALS YLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPTLLLAS YF
 LLLTSPGPQDPRGEEDSDTAARQPLINNEASESKPGSGSPLSLQERWTVFKGLLHYI
 VPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTFLTHAEQYRWYQMLYQAGVFASRSSLRCCPI
 RHTWVLALLQCLNLAFLLVDVWLSFLPSIYLIFLIIVFEGLLGGAAYVNTFHNIALET
 SDEHREFAMATACISDTLGLISLSGLLALPLHDFLCQLT

10

CLN3 [*Felis catus*]

配列番号 10

MGGCAGSRRRLDSEGEETAPEPRPRLDRQGALWKNAMGFWLLGLCENNFSYVV
 MLSAAHDILSHQRASGNQSHVDPDPAPTTHNSSSRFDCNSVSTAAVLLADILPTLVI
 KLLAPLGLHLLPYSPRVLVSGICSAGSFILVAFSHSVGTSLCGVVLASISSGLGEVTFL
 SLTAFYPRAVISWWSSGTGGAGLLGALS YLGLTQAGLSPQHTLLSMLGIPALLAS
 YFFLLTSPEPQDPGGEEEAETSARQPLINSEAPEAKPDSSSNLSLQERWTVFKGLLW
 YIVPLVLVYFAEYFINQGLFELLFFRNTSLTHAQYRWYQMLYQAGVFVSRSSLRC
 CRIRFTWVLALLQCFNLAFLLVDVWLSFLPSIYLIFLIILYEGLLGGAAYVNTFHNIA
 LETSDEHREFAMAXACISDTLGLISLSGLLALPLHDFLCRLS

20

CLN3, バリアント2 mRNA

[配列番号 11]

ATGGGAGGCTGTGCAGGCTCGCGGCGGCGCTTTTCGGATTCCGAGGGGGAGGA
 GACCGTCCCGGAGCCCCGGCTCCCTCTGTTGGACCATCAGGGCGCGCATTTGGAA
 GAACGCGGTGGGCTTCTGGCTGCTGGGCCTTTGCAACAACCTTCTCTTATGTGGT
 GATGCTGAGTGCCGCCACGACATCCTTAGCCACAAGAGGACATCGGGAAACC
 AGAGCCATGTGGACCCAGGCCCAACGCCGATCCCCACAACAGCTCATCACGA
 TTTGACTGCAACTCTGTCTCTACGGCTGCTGTGCTCCTGGCGGACATCCTCCCCA
 CACTCGTCATCAAATTGTTGGCTCCTCTTGGCCTTCACCTGCTGCCCTACAGCCC
 CCGGGTTCTCGTCAGTGGGATTTGTGCTGCTGGAAGCTTCGTCCTGGTTGCCTTT
 TCTCATTTCTGTGGGGACCAGCCTGTGTGGTGTGGTCTTCGCTAGCATCTCATCAG
 GCCTTGGGGAGGTCACCTTCCTCTCCCTCACTGCCTTCTACCCCAGGGCCGTGAT
 CTCCTGGTGGTCCTCAGGGACTGGGGGAGCTGGGCTGCTGGGGGCCCTGTCTTA
 CCTGGGCCTCACCCAGGCCCGGCCTCTCCCCTCAGCAGACCCTGCTGTCCATGCT
 GGGTATCCCTGCCCTGCTGCTGGCCAGCTATTCTTGTGCTCACATCTCCTGAG
 GCCCAGGACCCTGGAGGGGAAGAAGAAGCAGAGAGCGCAGCCCGGCAGCCCC
 TCATAAGAACCGAGGCCCGGAGTCAAGCCAGGCTCCAGCTCCAGCCTCTCCC
 TTCGGGAAAGGTGGACAGTGTTCAGGGTCTGCTGTGGTACATTGTTCCCTTGG
 TCGTAGTTTACTTTGCCGAGTATTTCAATTAACCAGGGACTTTTGAACCTCCTCTT

30

40

【表 1 - 6】

TTTCTGGAACACTTCCCTGAGTCACGCTCAGCAATACCGCTGGTACCAGATGCT
GTACCAGGCTGGCGTCTTTGCCTCCCGCTCTTCTCTCCGCTGCTGTTCGCATCCGT
TTCACCTGGGCCCTGGCCCTGCTGCAGTGCCTCAACCTGGTGTTCCTGCTGGCA
GACGTGTGGTTCGGCTTTCTGCCAAGCATCTACCTCGTCTTCCTGATCATTCTGT
ATGAGGGGCTCCTGGGAGGGCGCAGCCTACGTGAACACCTTCCACAACATCGCC
CTGGAGACCAGTGATGAGCACCGGGAGTTTGCAATGGCGGCCACCTGCATCTCT
GACACACTGGGGATCTCCCTGTCGGGGCTCCTGGCTTTGCCTCTGCATGACTTCC
TCTGCCAGCTCTCCTGA

AAV2 VP1

[配列番号 12]

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGP
FNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTS
FGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQ
QPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGA
DGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNH
FGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQND
GTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG
SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ
YLYLSRTNTPSGTTTQSRLOFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNN
NSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN
VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVW
QDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSVNVDFTVDTNGV
YSEPRPIGTRYLTRNL

AAV9 VP1

[配列番号 13]

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYL
GPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKE
DTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKS
GAQPAKKRLNFGQTGDTE SVDPDQPIGEPPAAPSGVGS LTMASSGGAPVADNNEG
ADGVGSSSGNWHCDSQWLGD RVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDN
AYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTD
NNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN
DGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI
DQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQ
NNNSEFAWP GASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGR
DNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQGGQRGNYSRGVDAQAAQTGW
VQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKN
TPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKS
NNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

AAV2 VP2

[配列番号 14]

【表 1 - 7】

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLGQPP
 AAPSGGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRT
 WALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLIN
 NNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSA
 HQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSY
 TFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDI
 RDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMA
 SHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVST
 NLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMG
 GFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
 WNPEIQYTSNYNKSVDFTVDNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

AAV9 VP2

[配列番号 15]

DGVGSSSGNWHCDSDQLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNA
 YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDN
 NGVKTIANNTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLND
 GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLID
 QYLYLSKTINGSGQNQQTTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQN
 NNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRD
 NVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGM
 VWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTA
 FNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSNVFEAVNT
 EGVYSEPRPIGTRYLTRNL

20

AAV2 VP3

[配列番号 16]

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKR
 LNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPA
 DVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSS
 YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLP
 GPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEK
 FPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQA
 ATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMGFGGLKHPP
 QILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTS
 NYNKSVDFTVDNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

30

AAV9 VP3

[配列番号 17]

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDLWQRLINNNWGFPRKR
 LNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPA
 DVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSS
 YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLP
 GPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEK

40

【表 1 - 8】

FPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQA
ATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP
QILIKNTPVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTS
NYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

AAV2 Rep78

[配列番号 18]

MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSMDLNLIEQAPLTVAE
KLQRDFLTEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIR
EKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIPNYLLPKTQPELQWAW
TNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARY
MELVGWLVDKGITSEKQWQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA
PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA
TTGKTNIAEAIHTVPPFYGCVNWTNENFPFNDCCVDMVWWEWGKMTAKVVESA
KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF
KFELTRRLDHDGKVTQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA
DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVGMNLMFLPCRQCERMNQ
NSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVN
VDLDDCIFEQ

10

20

AAV2 Rep68

[配列番号 19]

MPGFYEIVIKVPSDLDEHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSMDLNLIEQAPLTVAE
KLQRDFLTEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHVLVETTGVKSMVLGRFLSQIR
EKLIQRIYRGIEPTLPNWFAVTKTRNGAGGGNKVVDECYIPNYLLPKTQPELQWAW
TNMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQEQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARY
MELVGWLVDKGITSEKQWQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA
PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA
TTGKTNIAEAIHTVPPFYGCVNWTNENFPFNDCCVDMVWWEWGKMTAKVVESA
KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF
KFELTRRLDHDGKVTQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA
DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRLARGHSL

30

AAV2 Rep52

[配列番号 20]

MELVGWLVDKGITSEKQWQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA
PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA
TTGKTNIAEAIHTVPPFYGCVNWTNENFPFNDCCVDMVWWEWGKMTAKVVESA
KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCAVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF
KFELTRRLDHDGKVTQEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPAPSDA
DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRYQNKCSRHVGMNLMFLPCRQCERMNQ
NSNICFTHGQKDCLECFPVSESQPVSVVKKAYQKLCYIHHIMGKVPDACTACDLVN
VDLDDCIFEQ

40

【表 1 - 9】

AAV2 Rep40

[配列番号 21]

MELVGWLVDKGITSEKQWIQEDQASYISFNAASNSRSQIKAALDNAGKIMSLTKTA
PDYLVGQQPVEDISSNRIYKILELNGYDPQYAASVFLGWATKKFGKRNTIWLFGPA
TTGKTNIAEIAIAHTVPFYGCVNWTNENFPFNDCCVDMVIWWEKGMTAKVVESA
KAILGGSKVRVDQKCKSSAQIDPTPVIVTSNTNMCVIDGNSTTFEHQQPLQDRMF
KFELTRRLDHDHFGKVTKEVKDFFRWAKDHVVEVEHEFYVKKGGAKKRPPAPSDA
DISEPKRVRESVAQPSTSDAEASINYADRLARGHSL

10

マウス MeCP2 可変プロモーター配列

[配列番号 22]

GAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGGCAACTTTGCTACTTCTACAGAAAA
TGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAATGCTTATCACAATGGTGAAGTACT
CAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGAGCCTAGACTTCCTTAAGCGCCAGA
GTCCACAAGGGCCCAGTTAATCCTCAACATTCAAATGCTGCCCACAAAACCAG
CCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCCAAGTGACAGTAGAACTCCACCAAT
CCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAAGTCTCT
GCCAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCA
ATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTG
CAGCAGCACACAGGCTGGTTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGG
TCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGT
AAAACCCGTCCGGAAAA

20

マウス MeCP2 可変プロモーター配列

[配列番号 23]

TCAAACCATCTGATTCAACAATGCACGACCGATCTCTTATGGGCTTGGCACACA
CCATCTGCCCATTATAAACGTCTGCAAAGACCAAGGTTTGATATGTTGATTTTA
CTGTCAGCCTTAAGAGTGCGACATCTGCTAATTTAGTGTAATAATACAATCAGT
AGACCCTTTAAACAAGTCCCTTGGCTTGGAAACAACGCCAGGCTCCTCAACAGG
CAACTTTGCTACTTCTACAGAAAATGATAATAAAGAAATGCTGGTGAAGTCAAA
TGCTTATCACAATGGTGAAGTACTCAGCAGGGAGGCTCTAATAGGCGCCAAGA
GCCTAGACTTCCTTAAGCGCCAGAGTCCACAAGGGCCCAGTTAATCCTCAACAT
TCAAATGCTGCCCACAAAACCAGCCCCTCTGTGCCCTAGCCGCCTCTTTTTTCCA
AGTGACAGTAGAACTCCACCAATCCGCAGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCC
TGCCTAAACAGACAGGAAGTCTTGCCTAATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCC
GCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGG
GGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTTCGGGAGGGCG
GGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCCTC
CTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAA

30

40

CMVエンハンサーを有するCBAプロモーター

[配列番号 24]

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA

【表 1 - 1 0】

TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
 GCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
 GTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCC
 CACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGC
 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGGCGGGGGCGAGGGGCGG
 GGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC
 GAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA
 AGCGCGCGGGCGGGCGGGAG

ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター
 [配列番号 25]

GTAAATACTAAGAGTGTTTTATGCAGACTCACACACACTAAGTGTGGAACAATG
 AGGTTTGCAGGGAGCAGGTTAACAAAATAATCCATTCTGCCATGCTTCATCTAC
 ATATGGGTAATTGGGAGGAGACAACCTCTATGGCTTATCTGGGTCCTTGTTCAC
 CCTCCGCTCCAGAGAAGCCTATTCCACCCCTGAATTCATGAGTGAAAAGACC
 AAGGATAGCTAGGCTATGAAAAGTCAACAGAGTAAGTACCCTACCAAACCTGC
 CAGGGACAAACAATATTCAGGACAGCCTCATGACCTTAGGCTTAAATCTACA
 ATATTTGGGCATGGATGGTCTCTGAGATCACTTAGTCTTGATAGATTTAACT
 ACTAATTTCAATATTTGTGAATTTGCATTATTTGCGACAACAGACATTGTTAG
 AAACCTGAGGAAAGTTATCTGCTGCAGTCTATCATGAGGACGGTGGGCTATCAC
 AATCACAGGTATTTTTTTTGGGGGGGGGATGAGAAAGGGCCTCTGAAGATAA
 GCCTCACCCCATCCTTTCCTCGGGAGAGAGTGAAATGTCTCCAGAAGCAACTGC
 ACCACTGCAAATACTTCACCCTCCAAGTATCACAGGGGAAGCCATTCCGGGCTT
 CTCTATTTGAAAACAATTACCATATTCCCCCTCAGTTTGCCTCTTAAAAAACA
 TAAGTTGCACAATCAAATGCTGCGATATACAAATAAAACAAAACTAAATGCT
 TGCTCAGATAAATCTTAGGTGTTTCGTGTAAATCTCTGCAATCCCTCCATGAAAC
 CTGGGGGACTCCTAACATCATGCGTGTGAAAATGCCCTGCAAACCGTAGGGTTG
 TATCCACGTGCGCTACCGCGTGCGCCAGTTTCAAGCATCTGGGTGCTTCCTGAA
 GGAAATCCATGCATTCTGACTGCATCTGTTTTCGGGTTATTACATTGTATCGGG
 GAAGAGTCACGCGGCTATGGCTATTTCTATCCGTTCTGAAGAAGCCTGGGTG
 CCGAGTTCTCTCCCCAGAGACCACACCCAGCGCTTAGGGCTGGCCGCAGCGGC
 TTCCCTGAAAATCAGCCAACCTGCAAGGCTTATCGAAATCATCAGGTCGTGTGCT
 ACACATGTGTAAAAAGAGGAAAGCGGACTTTAAATGTGCTGCGGTTGGTGGTA
 GCAAGCAGGAATTTAGCTTGGTGAGGATCCAGGCAGCTTGAAGCTCCCGGCTG
 CGGACGCGCGGCTCCCTCAGCAAGTCAGTCTCTGTGTTTCCAACCTTTCTCTGC
 CCTCACCACCCACACACTGCAACACGTTAAAGCCATCTGCGGCTTCATTCTCAG
 TTAAGAAATGTGAAAATCTAGAAACACTAACAGGCGGATTAAGTGTGTAAGG
 GTTTAAAAATGCTAAACCAATACCTGCAGTAGTGCCGCAGTTTCACGAGTGTGT
 GTGTGTGTGTGTGTGTGCGCGCGCGCGCATCGCGCGACACTCCCTATGTGTAA
 GCAGCTCATTAAAGAAAAAGAAAAATAATCAGGAGAAAGGAAGATGAATTAC
 AGAAAGTGCCAGAAAGCTAGAAAGAAATTAATACTCTTCTCCATACATACTGC
 ATACACATAACCTAGCCTATTTATTTGTATCTAAAATTCCTAGCCGCACCATCA
 CCGTAAACACCAAGGGAAAAAATTAAGGAGGTTCCCTGGTGGGAAAAGGGCGA
 GTTGGGGGGACAGGGTGTCTGCGAGGTGACGGGATACACAAAAGTGGGTGTC
 AAAAGGGAGCAAGAACCTGTTTTGAGGGCAACTTAAGGATCCAAGTGTACGG
 GGTCTGGGCAATGAAGGACGGGAGGGGCTGCGTGAGTGAGTACAGAAGGGAA
 ATGAGTGAGGGGGCATGGGATCTCAGAGAAAATCAGGGCCCTCTGAGCAAAGT
 GGAAAGGACGACCGCGCAGCTCCTCGGGCCGTAGCCCGACCCCGCCTTCCCTT
 TTGCGCAGAATCCTCGCCTTGGCTGCAGCAGCGCGCTGCCCCACTGGCCGGCG
 TGCCGTGATCGATCGCAGGCTGCGTCAGGACCTCCCGGCGTATAAATAGGGGTG

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

GCAGAACGGCGCCGAGCCGCACACAACCATCCATCCTCCCCCTTCCCTCTCTCC
 CCTGTCTCTCTCTCCGGGCTCCCACCGCCGCCGCGGGCCGGGAGCACCGGCC
 GCCACCATGAGTTCTTCAGCTACGAGCCGTACTACTCGACCTCCTACAAGCGG
 CGCTACGTGGAGACGCCCCGGGT

ニューロン特異的vgf遺伝子プロモーター
 [配列番号 26]

CTCGAGGATCTGATTAAATACACAATTGCTTCCCCCATTCCTTTTCTTTTCTC
 CCCGCCCCGGCCATGTATCTCATTCTCCATACACACATAAACACACATGCA
 CAAGCCATGTACATGTACACGCAGGTGTGTGTGCATACACAAGCCAACAGGCA
 AATACAGTTTCTCCAGGTGCCTGTCTTCTCTCATCTTGCAACTTGGTCTCTGATC
 CCCATCAGCCACTCAGTCAGCCCCCTTGGCTCCCTCCCTCCCTCTCCCTTCTCT
 CTTGGATGGGTTCCCCCTCCCCCTCTCCAGATGTCTGAGCCATCTTCTCTCTGATT
 CATCTCTCTCAGGAAGGAACGTGACCCCCCTCCCCATCCCACTGCCTCTGTATCA
 GGCTGGGAAGATGAAGGGGACATGGGGGCGGGGAGAGGAAGGAGGGGAGGCC
 GTGGTTAGTTGTGCGTGGGGATGGGAGGCATTGCCTGGGGTCTCCTACCCCCCTC
 TTTTCCCCCTCCCTTTTCTTTGGAATCTCCACTGTACCTTGGTTCTCAGTTTTTTTTT
 CTCTTTAGCCTGCTCCTTCTACCTGTTCCAGATCCCTTCATTCTTCTCTCTCCC
 CTGCCCCCATCTCTTCTCTCTTTTCTCCCTCTCCACTCCTCCCCATTTCTTTCCCG
 CCAAGAGCTGATGGGCTTTCTTCTGGGAAAGTCGAGCCACTGATGGAAGCGAG
 AAGCCACTGCTGGTTATAGAGAGAAAGCACGTGAGTGTGTGTGTAGGGAGGGG
 GAGGTTAGAAGGAGGGTCAGTGCCAGGAAGAGGTGAGGAGGGGGGGGAGGAC
 CGTTTCTGAAAGAGTCTCTAAGACCCTGACAGACAGCCCTGACCTTGGTTTCCA
 GAGTCTCAGGGTGCGGTGCCCTGCGTGTGCCACAGAGCACCCCTATGTCCGCA
 GTTCGTGTGTGTCTGGCGTGTGTCAATTGTATTCCCCCCCCCTTGGGTGCCCAGGC
 CCGCCACCGCTCTCTGCCAGCACCCGACCCCCCTCCAGGCTTCTCTCCCTCCCTCC
 CCTTCATTCTGCACTGGCTGCCCCCTTGGCACCCCTCTCTCTCTCCCTGCCCCC
 TCCCCATTTCTGCTTCCCCCCCCACCCGCCCCACGGCTGGTCTCCCTTGACCGGA
 CCCAGCTCTCTGATGGATTCTCTTTGCGCAAATCTGTGCGTCATCGCCCCACCC
 CCGGAACCTCTAGCTGTCCAAGCCCCCAGCCCCAACCTCTCTGGCAGGAGATAC
 GGTCGAAGGGGCTGGTGGCAGAGAGGGGCTATCTCTGACGTTGCAGGTCCCCC
 TCCCATCGCGTTCAAACCTTCCCTTTAAGCGGTGGAGAGAGCTGGAGTTGAGTC
 ACCCCCCCCCCCACCTGCGCAACCCCCCTCCCCACCTGCTCTGGTCTCGCCCTCCA
 AACGTCCTTGGGGGAGGGGAGCGGGCCAGGAGGGAAAGCGACTGGGGAGTGT
 GGGAAAGAGATGGGGCCGAAGGGGGCACAGCGGGGGGCTTGACACAAGCGGC
 AGTCAGGGGACAGAAGGACAGACACACCTTTTTCTCCAGACACAGCACGGATC
 GTGAAACAGACACGACCCAGAGGCACACACATCCTCATTCTTTCCCTTTTCTCTT
 CCGACTCGGACCCTTCCGATGGGATTACAAAACCGCAAGATCCACCCATCTCC
 GCTGTCAGGGGCTGCACCCCGACTGCCCATTCGGGGACAGCCGACGGCGTGCA
 GATCTGTCCCTCTGCACTCAGGTTACGCCGCTCCTTGGGGCCGTGGTCTCGGGG
 TGGGGAACCGGCCCTGGTCCGCTCTTGAATCTTTATCCTTCCCCCTCCCCAGTAT
 TGAGCTCCCACTGGTGCCAGTCAGACGCTGGGACTACCTTTTTCTATTCCACT
 CAGCAACGCGGGCTCCATCCAGCAGCTCCAAGTTGCTCTGCAACCCACCCTCCC
 GCCTTCCAGCGCTCTGCATCCACCCTTCCATTCACTTCCCATTCATTCACTCAT
 CCTTTTCTCTCGTCCCTCCTTCATTCACTCATAGCCCCCGCCCTGCCCGCTTCA
 GCATTCATTCACTCACTCACTCACTCACTTCCCGGAGCTCCGCTAGCGCACACC
 CTTTCCAGCCGAAGCCCCAGCGCGCAGGCGCAGGCCGGGAGAGGCAGGCACCCT
 CCAATCGTCGGGCGTCCTTCTCTCCGGGCGGCCGCGCCGCTTCCCCATGAATG
 AACATTGACGTCAATGGGGCGGGGCGCGCCACGTGACCCCGCGCGCTCCCTT

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

TATAAGGCGGTGGAGGCGGGGGCTGTCCAGCGTGCTGAAGCGGAGCGAGCTA
GCCGCCCGGAGCCGCGCCGACCCAG

CMV プロモーター

[配列番号 27]

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
ACATAACTTACGGTAAAT GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG CCAATAGGGACTTTCCA
TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
A GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC
CCGCCTGGCATTATGCCCAG TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT
ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACA
TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCA
TT GACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCGAAAAT
GTCGTAACAACTCCGCCCCA TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAAG

10

RSV プロモーター

[配列番号 28]

CGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGA
TGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAA
AAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTC
GCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTG
CAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACC
GTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGC
AACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCGCATTGCAGAG
ATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTAC
CACATTGGTGTGCACCTCCAAGGCC

20

30

SV40 プロモーター

[配列番号 29]

CAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA
GGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGCTCCCCAG
CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG
CCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGC
CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTC
TGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTT

40

PGK プロモーター

[配列番号 30]

GATCTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCT
TTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACA

【表 1 - 1 3】

CATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTC
 GCGCCACCTTCTACCCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCGCAGCTC
 GCGTCATGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCA
 AATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCCTTGGGGCAGCGGCC
 AATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGT
 CCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGTC
 CTCCGGAGGCCCGGCATTCCGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTT
 CTCTTCTTCTCATCTCCGGGCCTTTCTGA

10

EF α プロモーター
 [配列番号 31]

GATCTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGT
 CCCCAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGT
 GGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCCTTTTCCCG
 AGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCCTAGTCCCGTGAACGTTCTTTTTC
 GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTCCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG
 CCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACCTGGC
 TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTT
 CGTGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGTGGCCTGGC
 CTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG
 CTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT
 TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAAGATCAGCACACTGGTAT
 TTCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG
 TTCGGCGAGGCGGGGCGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
 CTCAAGCTGCCCGGCCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCC
 CGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGA
 TGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCACAAAATGGAGGACGCGGCGCTC
 GGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCTCT
 CAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG
 ATTAGTTCTCCAGCTTTTGGAGTACGTCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTTA
 TGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTG
 GCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGTTTC
 ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGT
 GAAAACCTACCCCTAAAAGCCAAAA

20

30

シナプシンプロモーター
 [配列番号 32]

AGATCTCTGCAGAAGGCCCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGAT
 GAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGC
 ACCCAACCCCATTTCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGA
 AACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGT
 GCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCCTCAGCACTGAAGGCGC
 GCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAATCCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCTG
 CGTCCGCGCCCGCCGCGGCCAGCCGGACCGCACCGCGAGGCGCGAGATAG
 GGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGA

40

【表 1 - 1 4】

NSEプロモーター

[配列番号 33]

ATGGCGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCATGGTGGCTTTACCAAC
AGtACCGGAATGCCAAGCTTACTTAGATCGCAGATCTCGGTGGTAGTGGCGGTG
GCGGTGGCGGTGGCGACGGCGGCGCTGAGAGAGCGGGAGTGGCAGTGGCGGC
GGCGGCTGCGGCTCCCGGGCGGCGGGCGGAGGAGGCGCCTATAGGGCCGCGCG
GGCGCATGTGACCCGGAGCCCCCGATGAGTCAGGAGCTGCCGGCGGAGGCGCA
CGTACGAGCGCGGGTGGGGGACCGACGAGGGTGGAGTGGGGAAGGGAGGAGG
ATGGGGGAAGGGTGGGG

10

UBCプロモーター

[配列番号 34]

GATCTGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCGTCAC
GGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTCCTGATCCTTCCGC
CCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCC
AGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTG
GTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGAT
TCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGC
GCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTGCGAGCCGGGATTTGGGTGCGGTTCTT
GTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGCTGGGCTGGCC
GGGGCTTTCTGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGAC
CGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGT
GGGGGGAGCGCAGCAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCT
TGTGAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGC
AAGAACCCAAGGTCTTGAGCCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTG
AGATGGGCTGGGCACCATCTGGGGACCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGA
GAACTCGGTTTGTGCTCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGGCGGTGCCGTTGGGC
AGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCCTCGTCGTGTCGTGACGTCACCCG
TTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGG
CTTTTCTCCGTGCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATC
GACAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTT
TGGTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGTTTTTGAAC
TACGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTATGGCACCTTTTGAAT
GTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACTTGTAATTTGTCCGCT
AAATTCTGGCCGTTTTTTGGCTTTTTTGTAGACAACA

20

30

AAV 8

[配列番号 35]

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQKQDDGRGLVLPGYKYL
GPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQED
TSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKK
GQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEG
ADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDN
TYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQN
EGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNG

40

【表 1 - 1 5】

SQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFQFTYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLMNPLIDQ
 YLYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQ
 NNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDDEERFFPSNGILIFGKQNAAR
 DNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGM
 VWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADPPTTF
 NQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNT
 GVYSGPRPIGTRYLTRNL

AAV 9

10

[配列番号 36]

CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCA
 GTCACCCCAAGAACCAGACTCATCCTCGGGCATCGGCAAATCAGGCCAGCAGC
 CCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCG
 ACCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAGAAGCCCCCTCAGGTCTGGGACCTAATA
 CAATGGCTTCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGAC
 GGAGTGGGTAAATTCCTCGGGAAATTGGCATTTGCGATTCCACATGGCTGGGGGAC
 AGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCATTGCCACCTACAACAACCA
 CCTCTACAAGCAAATCTCCAATGGAACATCGGGAGGAAGCACCAACGACAACA
 CCTACTTTGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTG
 CCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCG
 GCCAAAGAGACTCAACTTCAAGCTGTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTTACGA
 CGAACGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACCGTCCAGGTC
 TTTACGGACTCGGAGTACCAGTACCGTACGTCCTAGGCTCTGCCACCAAGGA
 TGCCTGCCACCGTTTCTGACAGCGTCTTCATGGTTCTCAGTACGGCTACCTGA
 CGCTCAACAATGGAAGTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTTCTACTGTCTGGAAT
 ACTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCGGCAACAACCTTTCAGTTCAGCTACACTTT
 CGAGGACGTGCTTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACT
 GATGAACCCCTCATCGACCAGTACCTATACTACCTGGTCAGAACACAGACAAC
 TGGAACCTGGGGGAACCTCAAACCTTTGGCATTACAGCCAAGCAGGCCCTAGCTCAAT
 GGCCAATCAGGCTAGAACTGGGTACCCGGGCCTTGCTACCGTCAGCAGCGCG
 TCTCCACAACCACCAACCAAAAATAACAACAGCAACTTTGCGTGGACGGGAGCT
 GCTAAATTCAAGCTGAACGGGAGAGACTCGCTAATGAATCCTGGCGTGGCTAT
 GGCATCGCACAAAGACGACGAGGACCGCTTCTTTCCATCAAGTGGCGTTCTCAT
 ATTTGGCAAGCAAGGAGCCGGGAACGATGGAGTCGACTACAGCCAGGTGCTGA
 TTACAGATGAGGAAGAAATTAAGCCACCAACCCTGTAGCCACAGAGGAATAC
 GGAGCAGTGGCCATCAACAACCAGGCCGCTAACACGCAGGCGCAAACCTGGACT
 TGTGCATAACCAGGGAGTTATTCCTGGTATGGTCTGGCAGAACCGGGACGTGTA
 CCTGCAGGGCCCTATTTGGGCTAAAATACCTCACACAGATGGCAACTTTACCCC
 GTCTCCTCTGATGGGTGGATTTGGACTGAAACACCCACCTCCACAGATTCTAAT
 TAAAAATACACCAGTGCCGGCAGATCCTCCTCTTACCTTCAATCAAGCCAAGCT
 GAACTCTTTCATCACGCAGTACAGCACGGGACAAGTCAGCGTGGAAATCGAGT
 GGGAGCTGCAGAAAGAAAAACAGCAAGCGCTGGAATCCAGAGATCCAGTATACT
 TCAAACCTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCGAAGGTGTT
 TACTCTGAGCCTCGCCCCATTGGTACTCGTTACCTACCCGTAATTTGTAATTGC
 CTGTTAATCAATAAACCGGTTAATTCGTTTCAGTTGAACTTTGGTCTCTGCG

20

30

40

WPRE エンハンサー

[配列番号 37]

【表 1 - 1 6】

CGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAA
CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCAT
GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCT
GTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCAC
TGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCT
CCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCC
GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC
GTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA
CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGC
GGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGC
CTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCG

10

WPRE エンハンサー
[配列番号 38]

CGACTGATCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG
TATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTT
TGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCC
TGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG
GTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACC
TGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAAC
TCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG
ACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTTCCTTGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTC
AATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC
GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA
TCG

20

【図 1】

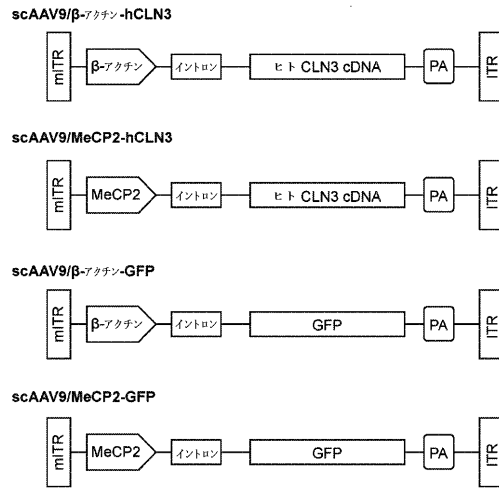


FIG. 1

【図 2 A】

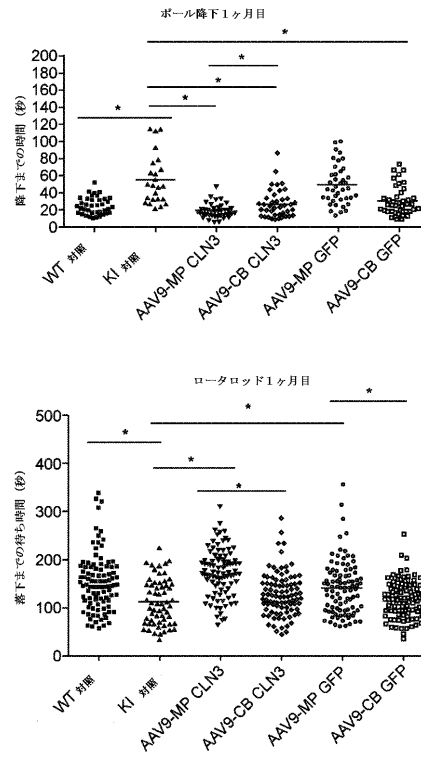


FIG. 2A

【図 2 B】

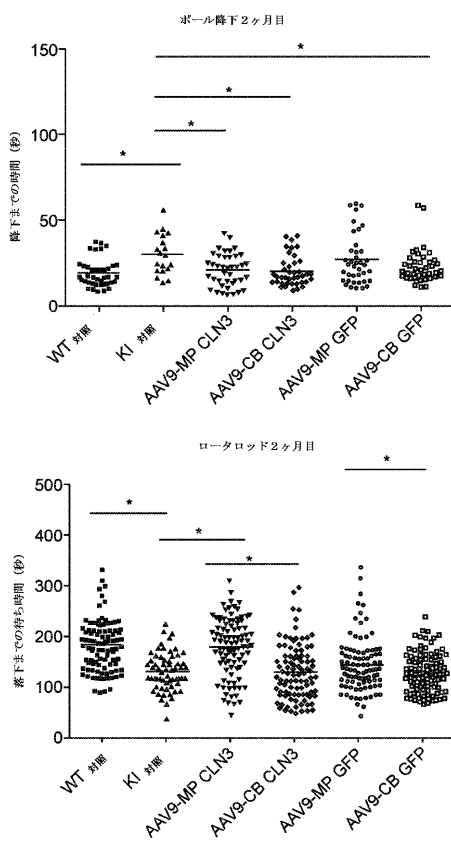


FIG. 2B

【図 2 C】

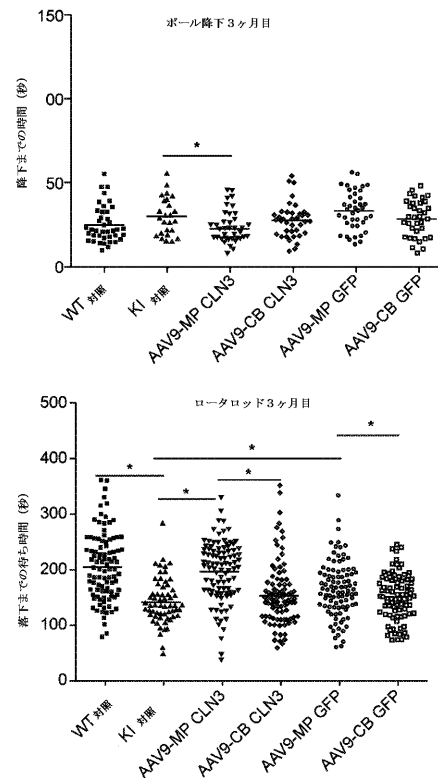


FIG. 2C

【図 2 D】

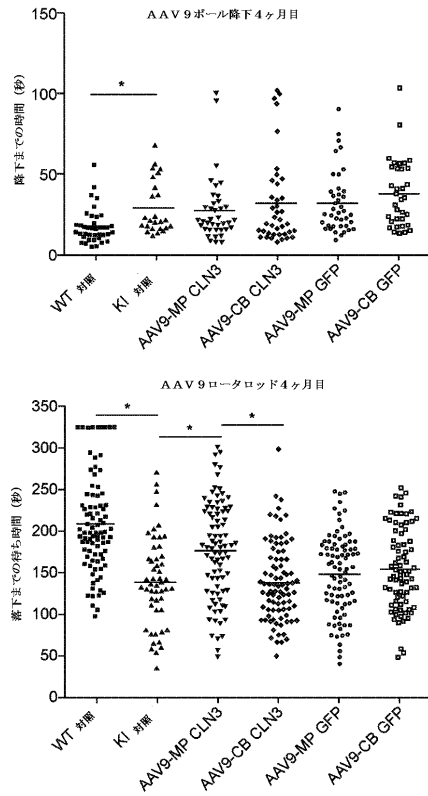


FIG. 2D

【図 2 E】

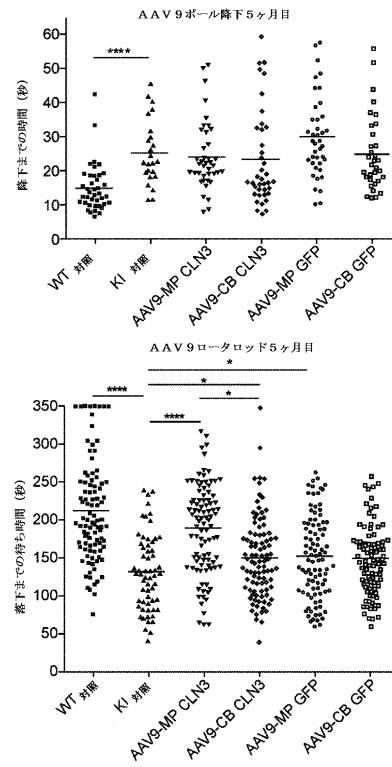


FIG. 2E

【図 2 F】

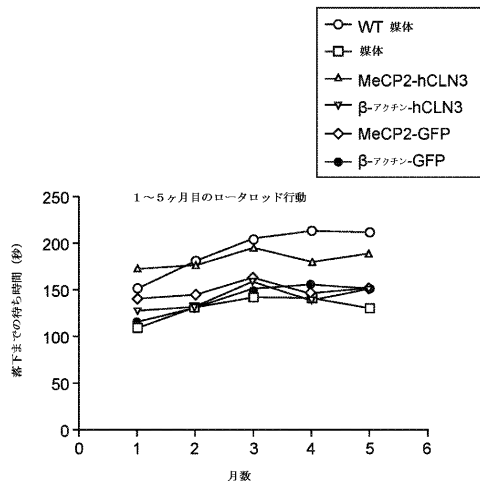


FIG. 2F

【図 3】

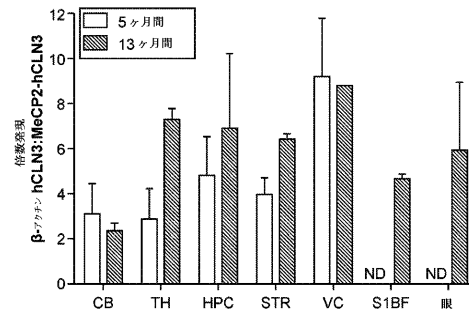


FIG. 3

【図 4】

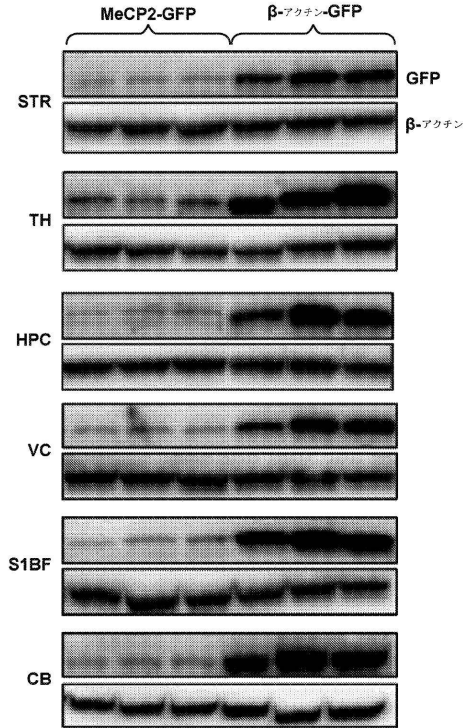


FIG. 4

【図 5】



FIG. 5A



FIG. 5B

【図 6】

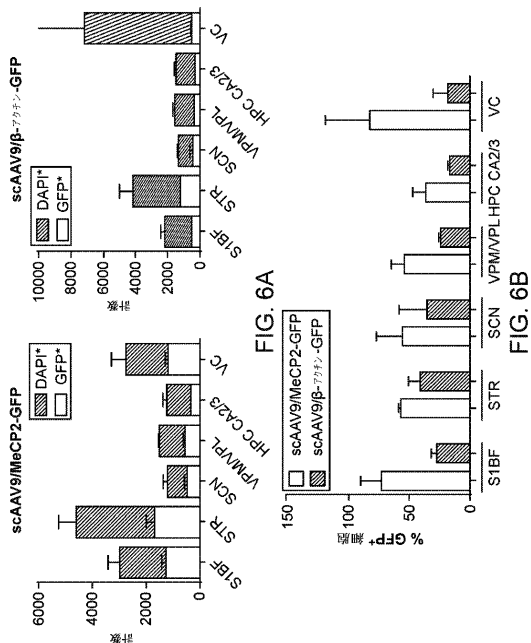


FIG. 6A

FIG. 6B

【図 7 A】

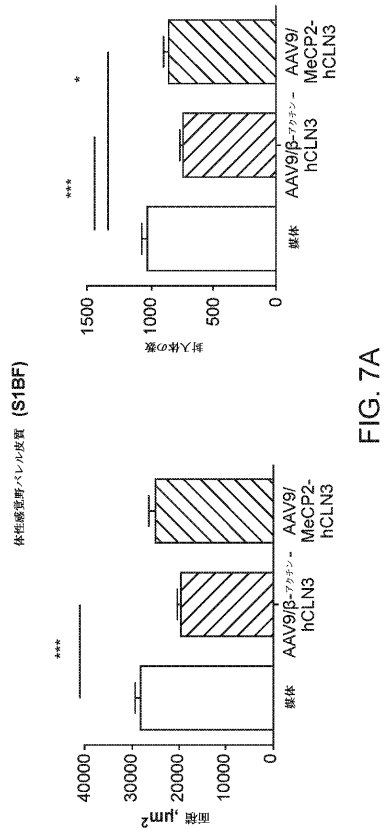


FIG. 7A

【図 7 B】

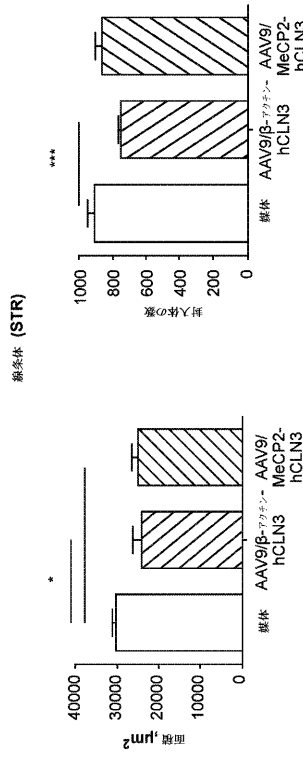


FIG. 7B

【図 7 C D】

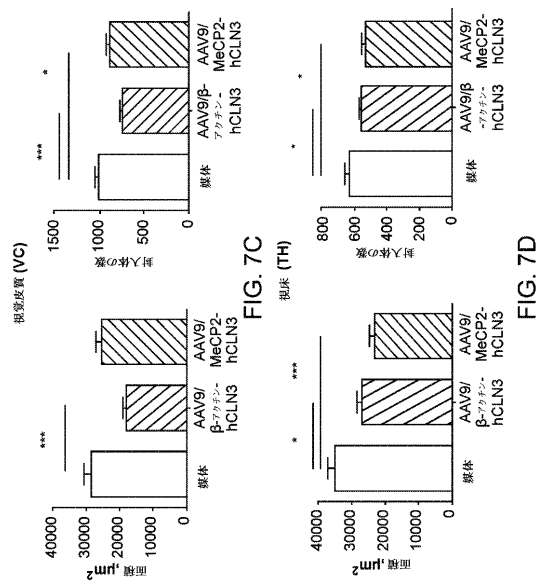


FIG. 7C

FIG. 7D

【図 7 E F】

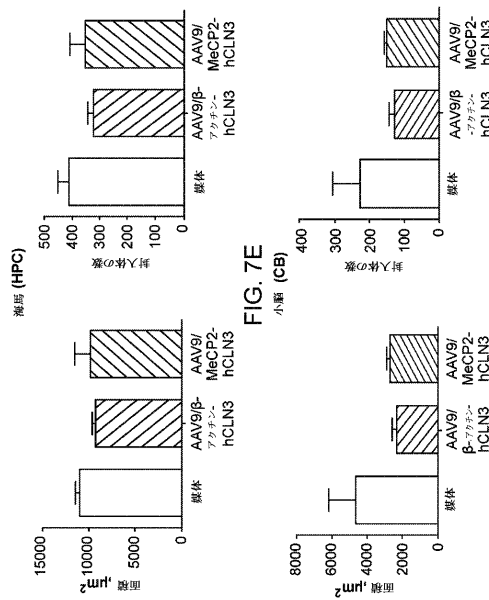


FIG. 7E

FIG. 7F

【図 7 G】

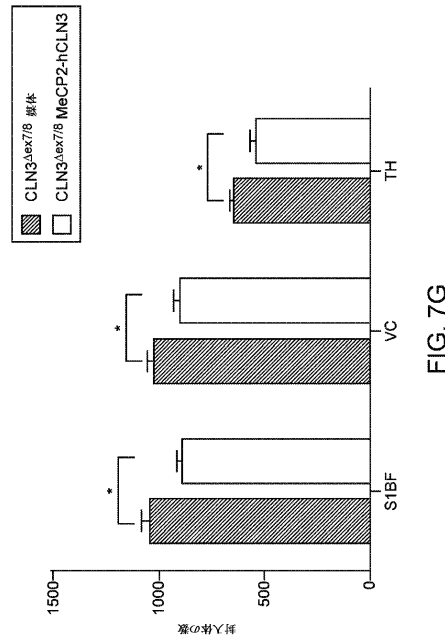


FIG. 7G

【図 8 A】

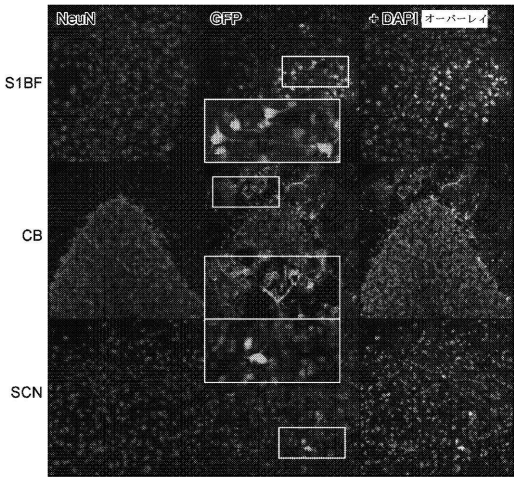


FIG. 8A

【図 8 B】

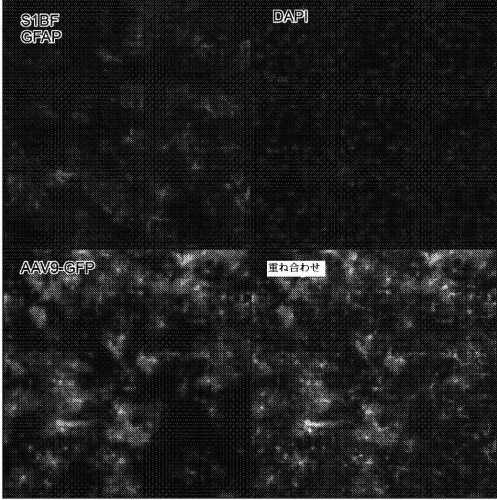


FIG. 8B

【図 8 C】

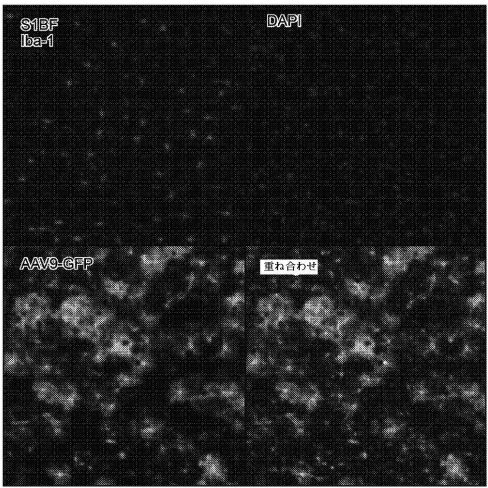


FIG. 8C

【図 9】

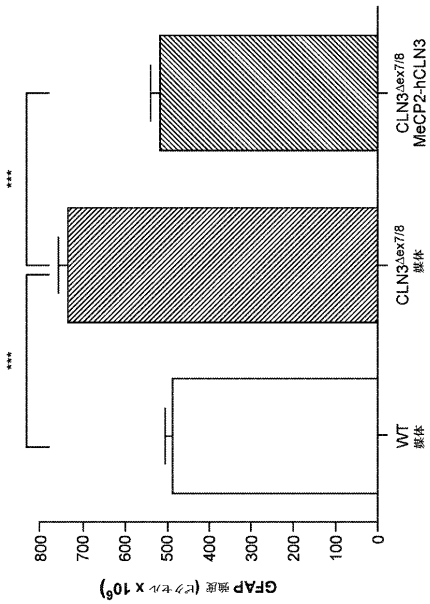


FIG. 9

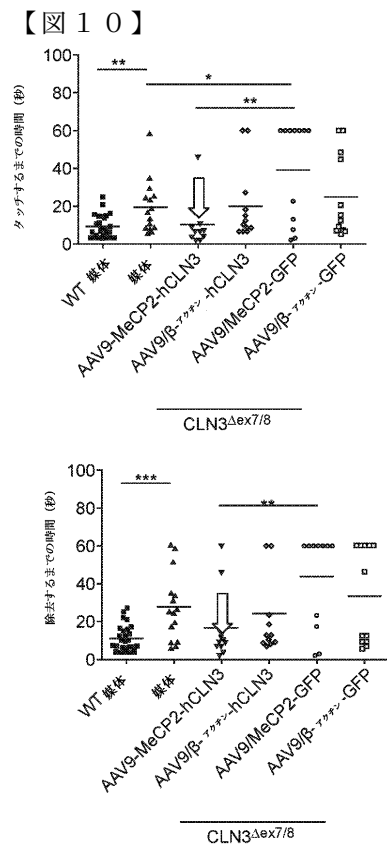


FIG. 10

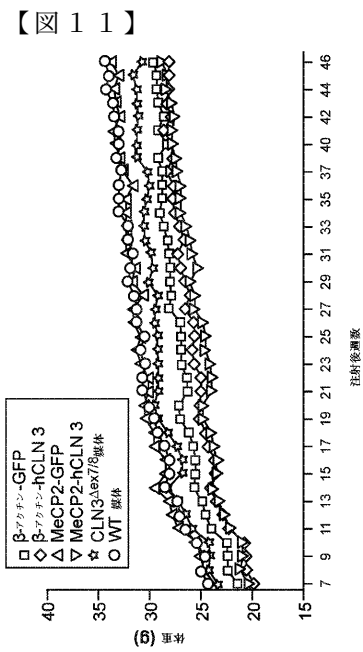


FIG. 11

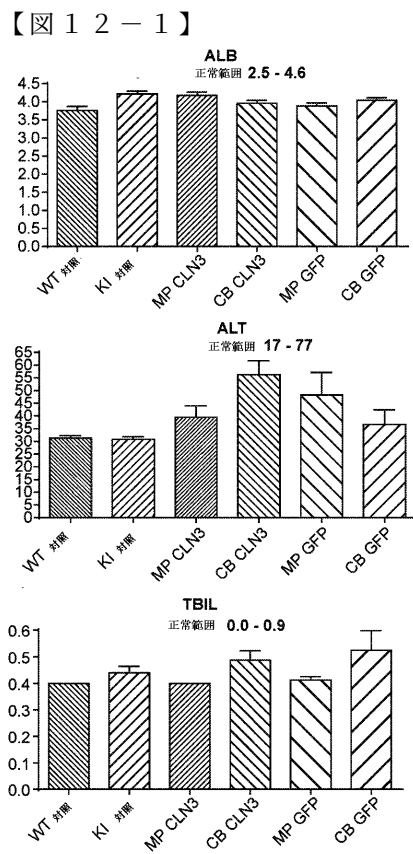


FIG. 12

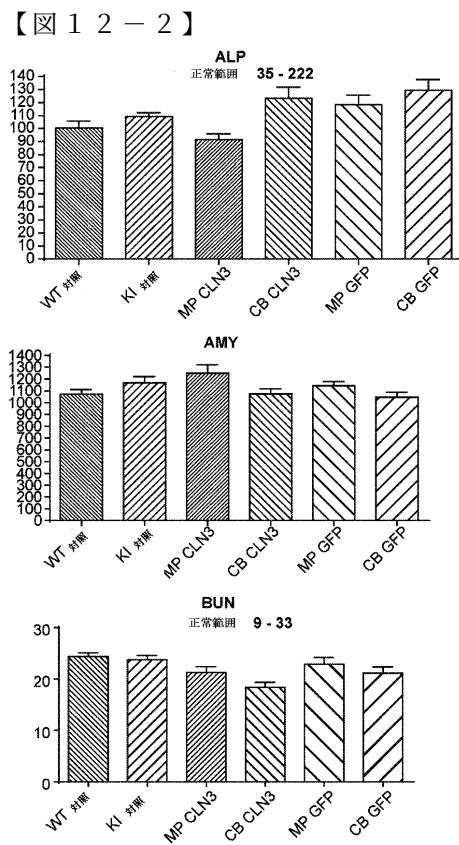


FIG. 12 (続き)

【図 12 - 3】

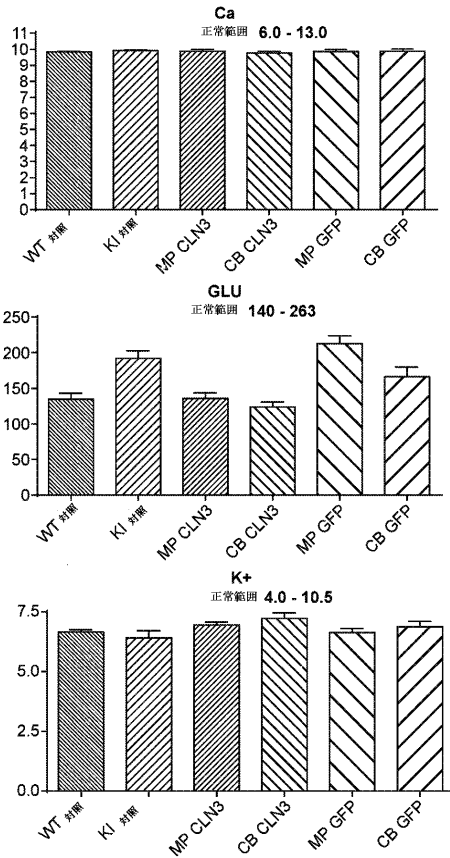
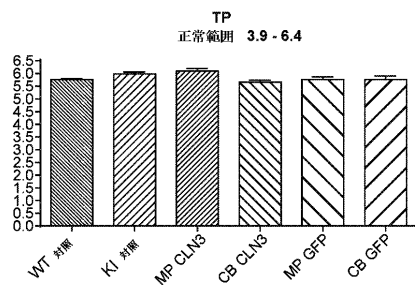


FIG. 12 (続き 1)

【図 12 - 5】



WT 対照 : 媒体注射 (PBS) を与えた C57BL/6 WT マウス
 KI 対照 : 媒体注射 (PBS) を与えた CLN3^{Aex7/8} マウス
 MP CLN3: AAV9/MeCP2-hCLN3 を与えた CLN3^{Aex7/8} マウス
 CB CLN3: AAV9/β-アクトニン-hCLN3 を与えた CLN3^{Aex7/8} マウス
 MP GFP: AAV9/MeCP2-GFP を与えた CLN3^{Aex7/8} マウス
 CB GFP: AAV9/β-アクトニン-GFP を与えた CLN3^{Aex7/8} マウス

FIG. 12 (続き 3)

【図 12 - 4】

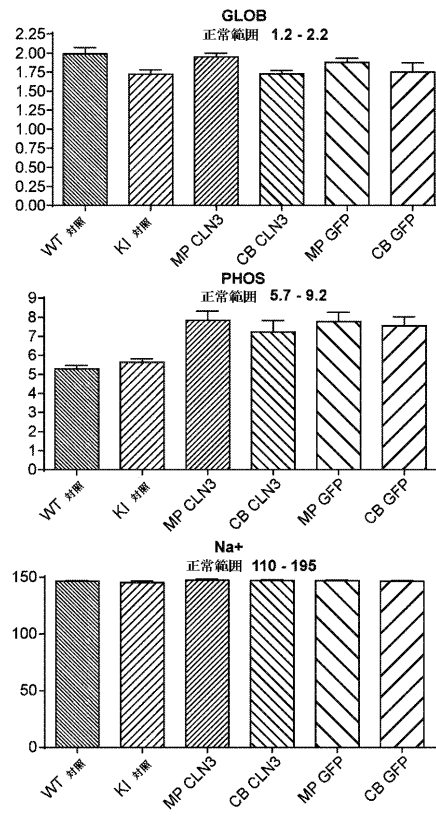


FIG. 12 (続き 2)

【図 13 - 1】

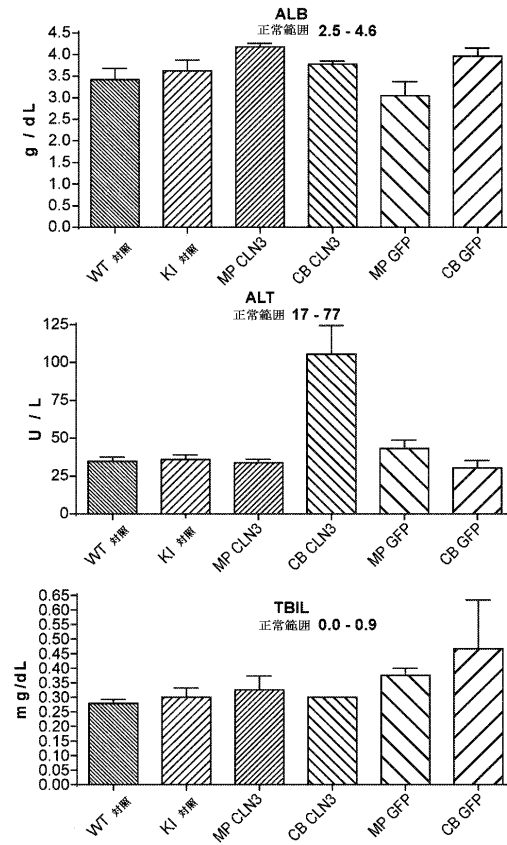


FIG. 13

【図 13-2】

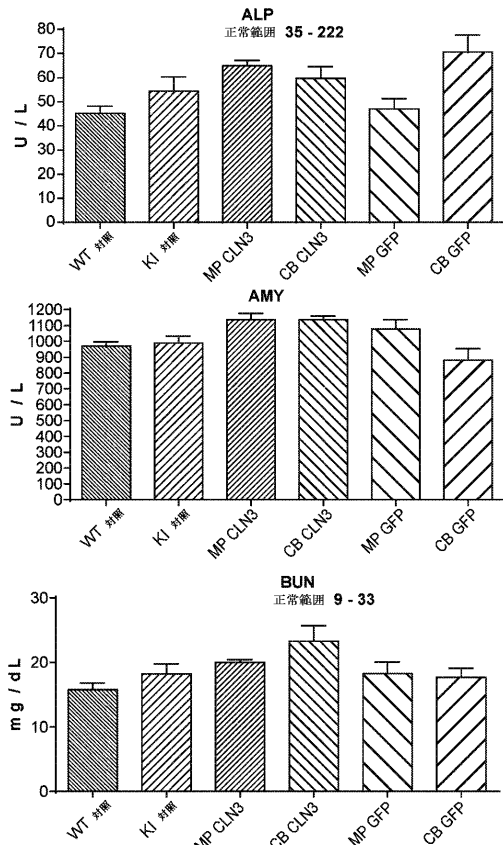


FIG. 13 (続き)

【図 13-4】

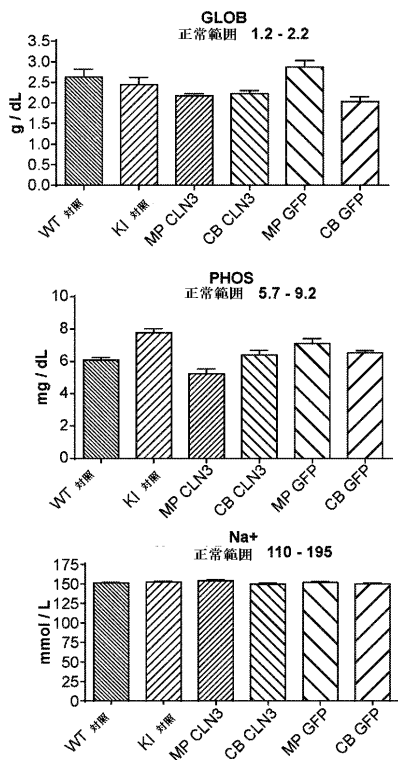


FIG. 13 (続き 2)

【図 13-3】

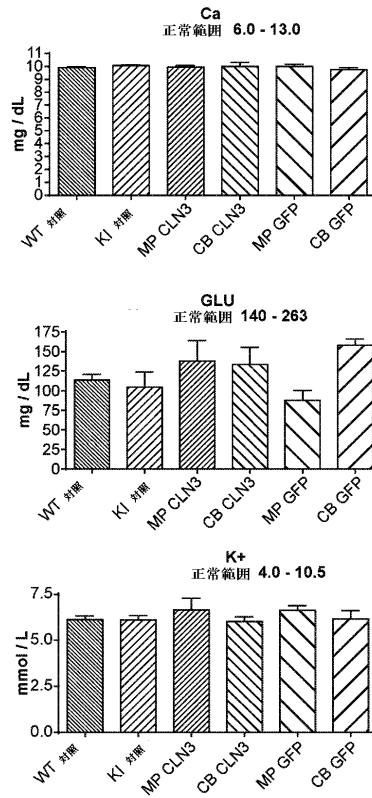


FIG. 13 (続き 1)

【図 13-5】

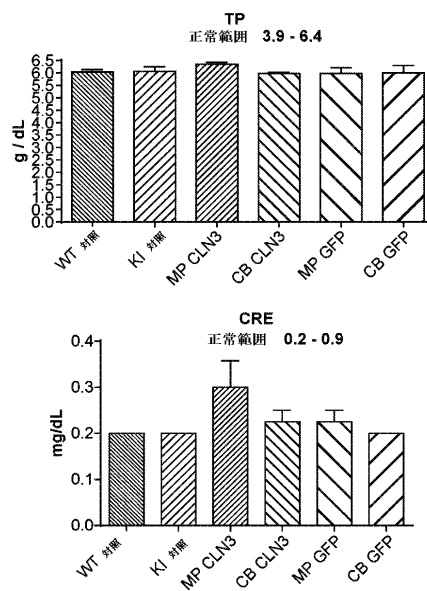


FIG. 13 (続き 3)

【図 14 A - C】

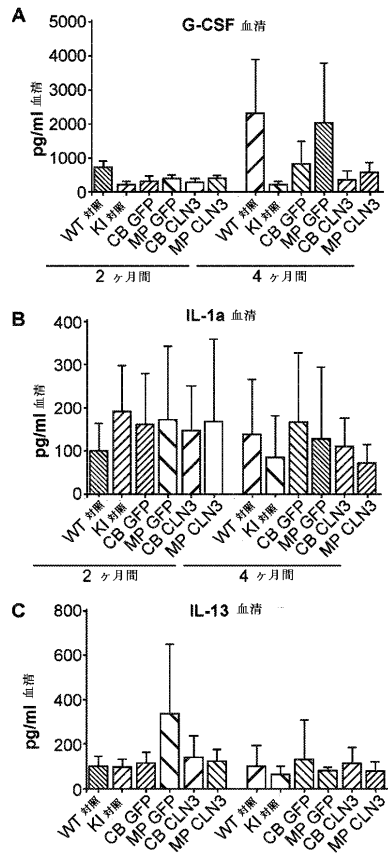


FIG. 14

【配列表】

0006754361000001.app

【図 14 D - F】

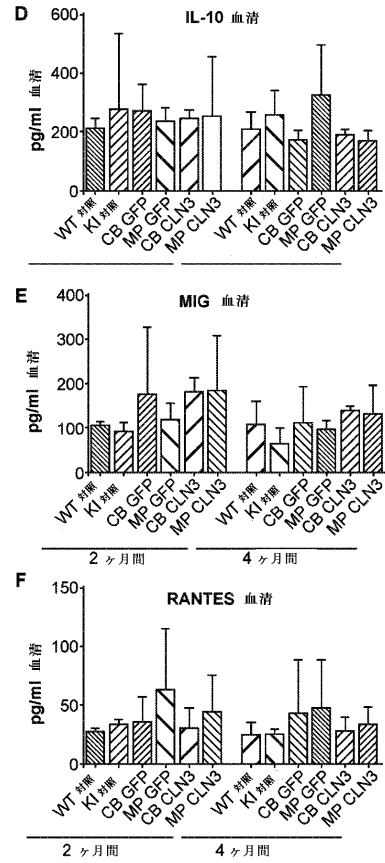


FIG. 14 (続き)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 P 25/00

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 キーリアン, タミー

アメリカ合衆国 ネブラスカ 6 8 1 2 8, ラ ビスタ, エミライン ストリート 1 0 2 0
8

(72)発明者 ファウスト, ケビン

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 5 4, ニュー オールバニー, ベベルハイマー ロード
7 4 4 1

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0225666 (US, A1)

国際公開第97/008308 (WO, A1)

HUMAN GENE THERAPY, 2014年 3月, 25(3), p.223-239

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0, 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8, 4 8 / 0 0,
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0,
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8, 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

PubMed

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)