

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7691367号**  
**(P7691367)**

(45)発行日 令和7年6月11日(2025.6.11)

(24)登録日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/864 (2006.01)	F I	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	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)		A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)		A 6 1 P	25/00	

請求項の数 16 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-545401(P2021-545401)  
 (86)(22)出願日 令和2年2月4日(2020.2.4)  
 (65)公表番号 特表2022-519596(P2022-519596)  
 A)  
 (43)公表日 令和4年3月24日(2022.3.24)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/016542  
 (87)国際公開番号 WO2020/163300  
 (87)国際公開日 令和2年8月13日(2020.8.13)  
 審査請求日 令和5年2月2日(2023.2.2)  
 (31)優先権主張番号 62/800,911  
 (32)優先日 平成31年2月4日(2019.2.4)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 520146112  
 リサーチ・インスティチュート・アット  
 ・ネーションワイド・チルドレンズ・ホ  
 スピタル  
 アメリカ合衆国オハイオ州 43205,  
 コロンバス, チルドレンズ・ドライブ  
 700  
 (73)特許権者 516046846  
 オハイオ ステート 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 43210  
 コロンバス カーマック ロード 1050  
 マウント ホール ファースト フロア  
 (74)代理人 110002077  
 園田・小林弁理士法人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C L N 3 ポリヌクレオチドのアデノ随伴ウイルス送達

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

配列番号4の核酸配列を含む、核酸分子。

**【請求項2】**

請求項1に記載の核酸分子を含む、自己相補的組換えアデノ随伴ウイルス9(s c A A V 9)。

**【請求項3】**

一本鎖ゲノムを含む、請求項2に記載のs c A A V 9。

**【請求項4】**

請求項1に記載の核酸分子を含む、r A A V 粒子。

10

**【請求項5】**

一本鎖ゲノムを含む、請求項4に記載のr A A V 粒子。

**【請求項6】**

請求項2もしくは3に記載のs c A A V 9、請求項1に記載の核酸分子、または請求項4もしくは5に記載のr A A V 粒子、および薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む、組成物。

**【請求項7】**

前記賦形剤が、非イオン性低浸透圧性化合物、緩衝剤、ポリマー、塩、またはこれらの組み合わせを含む、請求項6に記載の組成物。

**【請求項8】**

20

治療有効量の、請求項 2 もしくは 3 に記載の s c A A V 9 、請求項 1 に記載の核酸分子、請求項 4 もしくは 5 に記載の r A A V 粒子、または請求項 6 もしくは請求項 7 に記載の組成物を含む、対象における C L N 3 - バッテン病を治療するための組成物。

**【請求項 9】**

髄腔内、脳室内、脳実質内、静脈内、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される経路を介する投与のために製剤化される、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

髄腔内投与のために製剤化される、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 11】**

脳室内投与のために製剤化される、請求項 8 に記載の組成物。

10

**【請求項 12】**

静脈内投与のために製剤化される、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 13】**

投与量当たり  $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$  v g の前記 r A A V 粒子を含む、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 14】**

投与量当たり  $6 \times 10^{13} \sim 1.2 \times 10^{14}$  v g の前記 r A A V 粒子を含む、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 15】**

前記組成物の投与が、

20

- ( a ) 自己蛍光貯蔵物質のリソーム蓄積の減少または遅延、
- ( b ) A T P シンターゼサブユニット C のリソーム蓄積の減少または遅延、
- ( c ) グリア（星状細胞および / またはミクログリア）活性化の減少または遅延、
- ( d ) 星状細胞増加症の減少または遅延、
- ( e ) M R I によって測定された脳容積損失の減少または遅延、
- ( f ) 発作の発症の減少または遅延、
- ( g ) U B D R S 評価尺度のうちの 1 つ以上における安定化、進行の減少もしくは遅延、または改善、

から選択される C L N 3 - バッテン病の 1 つ以上の症状を減少させ、前記減少、安定化、または改善が、前記組成物を投与する前の前記対象または未処置の C L N 3 - バッテン病患者と比較してである、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

30

**【請求項 16】**

前記 r A A V 粒子を投与した後、前記対象が、トレンデレンベルク体位に置かれる、請求項 8 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

本出願は、2019年2月4日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 8 0 0 , 9 1 1 号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

**【0 0 0 2】**

40

配列表の参照による組み込み

本出願は、開示の別個の部分として、コンピュータ可読形式の配列表（ファイル名：2 0 2 0 年 1 月 3 1 日に作成された 5 3 5 7 6 \_ S e q L i s t i n g . t x t 、 2 6 , 7 0 5 バイト、A S C I I テキストファイル）を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

**【0 0 0 3】**

本開示は、セロイドリポフスチン症ニューロン 3 ( C L N 3 ) ポリヌクレオチドの組換えアデノ随伴ウイルス ( r A A V ) 送達に関する。本開示は、ニューロンセロイドリポフスチン症 ( N C L ) または C L N 3 - バッテン病の C L N 3 遺伝子治療のための r A A V および r A A V の使用方法を提供する。

50

**【背景技術】****【0004】**

ニューロンセロイドリポフスチン症（NCL）は、一群の重度の神経変性障害である。

**【0005】**

C L N 3 遺伝子における変異は、若年型NCLまたはC L N 3 - バッテン病を引き起こし (Kitzmu et al., Human Molecular Genetics 2008; 17(2): 303 - 312, Munroe et al., Am J Hum Genet. 1997; 61: 310 - 316)、これはまたシュピールマイアー - シエーグレン - フォークト病とも呼ばれている。変異はリソソーム貯蔵クリアランスプロセスを妨害する。現時点で、67の疾患を引き起こす変異が報告されている。しかしながら、患者の85%が1.02kbの欠失についてホモ接合性であり、これはエクソン7およびエクソン8の喪失をもたらす。患者に見られるC L N 3 変異は、主にタンパク質（バテニン（battenin））の量または機能性の減少を引き起こす。

10

**【0006】**

C L N 3 - バッテン病の典型的な発症年齢は4～7歳で、潜伏性であるが急速に進行性の視力喪失を伴う。若年型NCLを有する子供は、数ヶ月間で通常の視力から失明へと移行するが、その後数年間明暗の認識を維持することができる。認知力および運動機能の低下は通常、攻撃性（8～10歳）などの行動上の問題、およびその後の発作（10～12歳）と共に、次の（7～10歳）の後に起こる。パーキンソン病の特徴は11～13歳の間に発症する。心臓伝導異常は、疾患の後期にある個体において報告されている。C L N 3 - バッテン病に罹患している個体には表現型の多様性が高いが、全員が低視力または進行性失明を共通して有する。さらに、82人の患者で検証されている統一バッテン病評価尺度（UBDRS）の物理的なサブスケールは、年間2.86ポイント（2.27～3.45、 $p < 0.0001$ ）の着実かつ測定可能な減少を示している。平均生存期間は通常、症状の発症から終末までの15年間である。

20

**【0007】**

C L N 3 - バッテン病に対する治療方針は、疾患を改善するための努力において広範囲にわたっている。これらには、AMP A受容体を標的とするE G I S - 8332およびタラムパネルなどの薬物療法、早期終止変異のリードスルーを可能にする薬物、蓄積された貯蔵物質の破壊を補助する薬物（シスタゴン／システアミン）、さらには免疫抑制療法（ミコフェノール酸、プレドニゾロン）が挙げられる。酵素補充療法および幹細胞療法もまた評価されている。多くの治療手段が研究されてきたが、臨床現場で評価されたものはほとんどない。進行を遅延させるか、または疾患を治癒するのに利用可能なものはない。患者および家族は、症状および緩和ケアを改善するための治療に頼っている。

30

**【0008】**

C l n 3 <sup>e x 7 / 8</sup> マウスモデルは、C L N 3 - バッテン病患者において最も一般的な疾患を引き起こす変異：C L N 3 遺伝子からエクソン7および8を排除する約1kbの変異、を模倣するために2000年代初頭に作成された (Cotman et al., Hum Mol Genet. 2002; 11(22): 2709 - 2721, Mole et al., Eur J Paediatr Neurol. 2001; 5: 7 - 10)。この変異は、患者の85%においてホモ接合型で、さらに患者の15%において他の対立遺伝子の点変異と組み合わせたヘテロ接合型変異として見られる。エクソンの喪失はフレームシフト変異を生じさせることが予測され、それにより喪失または減少した活性を有する、短い不完全な（truncated）タンパク質産物がもたらされる (Lerner et al., Cell. 1995 Sep 22; 82(6): 949 - 57, Kitzmuller et al., Hum Mol Genet. 2008 Jan 15; 17(2): 303 - 12)。彼らの最初の研究において、Cotmanらは、C L N 3 <sup>e x 7 / 8</sup> マウスモデルがC L N 3 疾患のいくつかの側面を首尾よく再現したことを実証した。C L N 3 <sup>e x 7 / 8</sup> 動物は、種々の時点で神経系に自己蛍光貯蔵物質およびATPシンターゼサブユニットCを蓄積し、そして10ヶ月齢から脳内で星状細胞反応性を示した。その後

40

50

の研究は、小脳におけるグルタミン酸受容体機能の変化を詳述しており、これは加速口一タロッドアッセイにおける運動障害に対応していた (Cotman et al., Hum Mol Genet. 2002; 11(22): 2709-2721)。行動的には、CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスは、若年および成熟の両方の時点で特徴付けられており、新生児および若年成体マウスでは神経発達運動遅延が見られ、10~12ヶ月齢で歩行および後肢握りの障害が見られた (Cotman et al., Hum Mol Genet. 2002; 11(22): 2709-2721, Osorio et al., Genes Brain Behav. 2009 Apr; 8(3): 337-345)。CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスは、機能的視覚障害を有するようには見えないが、12ヶ月齢の対照と比較した場合、わずかな生存障害を示している (Cotman et al., Hum Mol Genet. 2002; 11(22): 2709-2721, Seigle et al., Mol Cell Neurosci. 2002 Apr; 19(4): 515-27)。まとめると、最も頻繁なヒト変異を保有するCLN3<sup>ex7/8</sup>マウスマルクスモデルは、CLN3-バッテン病と一致する多数の細胞的および行動的变化を示し、それを療法を試験するための適切なモデルにしている。

#### 【0009】

したがって、CLN3-バッテン病の治療に対する当該技術分野における必要性が残っている。

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本明細書に提供されるのは、組換えAAVを使用するCLN3遺伝子治療のための方法および製品である。

#### 【0011】

本明細書に提供されるのは、5'から3'の順序で、P546プロモーター、およびCLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、rAAV9ゲノムを含む、CLN3ポリペプチドをコードする組換えアデノ随伴ウイルス9(rAAV9)である。いくつかの実施形態では、rAAV9ゲノムは、自己相補的ゲノムを含む。いくつかの実施形態では、rAAV9ゲノムは、一本鎖ゲノムを含む。

#### 【0012】

配列番号1に記載のCLN3ポリペプチドをコードする自己相補的組換えアデノ随伴ウイルス9(scAAV9)が提供され、この中で、scAAV9のゲノムは、5'から3'の順序で、第1のAAV逆方向末端反復、配列番号3の配列を含むP546プロモーター、配列番号1に記載のCLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第2のAAV逆方向末端反復を含む。CLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号2と少なくとも90%同一であり得る。

#### 【0013】

また提供されるのは、5'から3'の順序で、第1のAAV逆方向末端反復、配列番号3の配列を含むP546プロモーター、SV40イントロン、配列番号1のCLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第2のAAV逆方向末端反復を含むゲノムを有するscAAV9；5'から3'の順序で、第1のAAV逆方向末端反復、配列番号3の配列を含むP546プロモーター、配列番号1のCLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ウシ成長ホルモンポリアデニル化ポリア配列、および第2のAAV逆方向末端反復を含むゲノムを有するscAAV9である。例示的な実施形態では、scAAV9は、配列番号4に記載の遺伝子カセットを含むゲノムを有する。

#### 【0014】

配列番号1に記載のCLN3ポリペプチドをコードする一本鎖組換えアデノ随伴ウイルス9(ssAAV9)が提供され、この中で、ssAAV9のゲノムは、5'から3'の順序で、第1のAAV逆方向末端反復、配列番号3の配列を含むP546プロモーター、配列番号1に記載のCLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第2のAAV逆方向末端反復を含む。CLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配

10

20

30

40

50

列番号 2 と少なくとも 90 % 同一であり得る。また提供されるものは、5' から 3' の順序で、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 の配列を含む P546 プロモーター、SV40 イントロン、配列番号 1 の CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含むゲノムを有する ssAAV9；5' から 3' の順序で、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 の配列を含む P546 プロモーター、配列番号 1 の CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ウシ成長ホルモンポリアデニル化ポリ A 配列、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含むゲノムを有する ssAAV9 である。

#### 【0015】

配列番号 4 に記載の核酸配列は、図 1A に提供される遺伝子カセットである。提供されるのは、配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 90 % 同一、または配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 95 % 同一、または配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 98 % 同一である核酸配列を含む s c A A V 9 ゲノムまたは ss A A V 9 ゲノムを有する r A A V 9 である。

10

#### 【0016】

第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 の配列を含む P546 プロモーター、配列番号 1 の CLN3 ポリペプチドをコードする核酸配列、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含む核酸分子もまた提供される。いくつかの実施形態では、CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 と少なくとも 90 % 同一であり得る。

#### 【0017】

また提供されるのは、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む P546 プロモーター、SV40 イントロン、配列番号 1 の CLN3 ポリペプチドをコードする核酸配列、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含む核酸分子である。さらに提供されるのは、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 の配列を含む P546 プロモーター、配列番号 1 の CLN3 ポリペプチドをコードする核酸、ウシ成長ホルモンポリアデニル化ポリ A 配列、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含むポリヌクレオチドである。提供されるポリヌクレオチドのいずれにおいても、CLN3 ポリペプチドは、配列番号 2 に記載の核酸配列、または配列番号 2 と少なくとも 90 % 同一の配列によってコードされ得る。

20

#### 【0018】

これらのポリヌクレオチドのいずれかを含む r A A V 9、s c A A V 9、または ss A A V 9 が提供される。一本鎖ゲノムを有する r A A V 9 もまた提供される。

30

#### 【0019】

さらに提供されるのは、CLN3 ポリペプチドをコードする r A A V 9 ウイルス粒子であり、ここで r A A V 9 ゲノムは 5' から 3' の順序で、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 と少なくとも 90 % 同一の核酸配列を含む P546 プロモーター、配列番号 1 と少なくとも 90 % 同一の CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第 2 の AAV 逆方向末端反復を含む。提供される r A A V 9 粒子は、配列番号 1 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。加えて、r A A V 9 ウイルス粒子は、配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 90 % 同一、配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 95 % 同一、または配列番号 4 の核酸配列と少なくとも 98 % 同一である核酸配列を含む A A V 9 ゲノムを含み得る。r A A V 9 ウイルス粒子のいずれも、SV40 イントロン、および / または BGH ポリ A 配列をさらに含み得る。

40

#### 【0020】

提供される r A A V、ss A A V、および s c A A V のいずれにおいても、AAV 逆方向末端反復は、AAV2 逆方向末端反復であり得る。

#### 【0021】

また提供されるのは、5' から 3' の順序で、第 1 の AAV 逆方向末端反復、配列番号 3 と少なくとも 90 % 同一の核酸配列を含む P546 プロモーター、および配列番号 1 と少なくとも 90 % 同一の CLN3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む r A A

50

V 9 ゲノムを含む核酸分子である。提供される核酸分子は、自己相補的ゲノムまたは一本鎖ゲノムを含み得る。

#### 【 0 0 2 2 】

さらに提供されるのは、5'から3'の順序で、第1のA A V逆方向末端反復、配列番号3と少なくとも90%同一の核酸配列を含むP 5 4 6 プロモーター、配列番号1と少なくとも90%同一のC L N 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および第2のA A V逆方向末端反復を含む、r A A V 9 ゲノムを含む核酸分子である。提供される核酸分子は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含むC L N 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。加えて、核酸分子は、配列番号4の核酸配列と少なくとも90%同一、配列番号4の核酸配列と少なくとも95%同一、配列番号4の核酸配列と少なくとも98%同一である核酸配列を含むA A V 9 ゲノムを含み得る。提供される核酸分子のいずれも、S V 4 0 イントロン、および/またはB G H ポリA配列をさらに含み得る。

10

#### 【 0 0 2 3 】

さらに提供されるのは、本明細書に記載のs c A A V 9、本明細書に記載のs s A A V 9、本明細書に記載の核酸分子、または本明細書に記載のr A A V ウイルス粒子、および少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤を含む組成物である。場合によっては、薬学的に許容される賦形剤は、非イオン性低浸透圧性化合物、緩衝剤、ポリマー、塩、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーはコポリマーである。いくつかの実施形態では、コポリマーはポロキサマーである。例えば、組成物は、非イオン性低浸透圧性化合物を含む薬学的に許容される賦形剤を少なくとも含み得る。例えば、薬学的に許容される賦形剤は、約20~40%の非イオン性低浸透圧性化合物、または約25%~約35%の非イオン性低浸透圧性化合物を含む。例示的な組成物は、20 mMのトリス(pH 8.0)、1 mMのMgCl<sub>2</sub>、200 mMのNaCl、0.001%のポロキサマー188、および約25%~約35%の非イオン性低浸透圧性化合物中に配合されたs c A A V を含む。別の例示的組成物は、1×PBSおよび0.001%ブルロニックF 6 8 中に配合されたs c A A V を含む。

20

#### 【 0 0 2 4 】

またさらに提供されるのは、治療有効量の本明細書に開示されるr A A V 9 ウイルス粒子のいずれか、本明細書に開示されるs c A A V 9 のいずれか、本明細書に開示されるs s A A V 9 のいずれか、本明細書に記載の核酸分子のいずれか、または本明細書に記載の組成物のいずれか、を含む組成物を対象に投与することを含む、対象におけるC L N 3 - バッテン病の治療方法である。

30

#### 【 0 0 2 5 】

提供される方法のいずれにおいても、組成物、r A A V 9、s s A A V 9、s c A A V 9 および/または核酸分子は、髄腔内、脳室内、脳実質内、静脈内、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される経路を介して投与される。

#### 【 0 0 2 6 】

治療有効量の本明細書に開示されるr A A V 9 ウイルス粒子のいずれか、本明細書に開示されるs c A A V 9 のいずれか、本明細書に開示されるs s A A V 9 のいずれか、本明細書に記載の核酸分子のいずれか、または本明細書に記載の組成物のいずれかの、C L N 3 - バッテン病の治療を必要とする対象におけるC L N 3 - バッテン病の治療用の薬剤の調製のための使用である。

40

#### 【 0 0 2 7 】

またさらに提供されるのは、治療有効量の本明細書に開示されるr A A V 9 ウイルス粒子のいずれか、本明細書に開示されるs c A A V 9 のいずれか、本明細書に開示されるs s A A V 9 のいずれか、本明細書に記載の核酸分子のいずれかを含む組成物、またはC L N 3 - バッテン病の治療を必要とする対象におけるC L N 3 - バッテン病を治療するための記載された組成物のいずれかである。

#### 【 0 0 2 8 】

50

髓腔内経路によって投与される s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 の例示的な用量は、対象あたり約  $1 \times 10^{11}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子から対象あたり約  $2 \times 10^{15}$  vg までであるか、または対象あたり約  $1 \times 10^{11}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子から対象あたり約  $1 \times 10^{15}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子までであるか、または対象あたり約  $1 \times 10^{12}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子から対象あたり約  $1 \times 10^{15}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子までであるか、または対象あたり約  $1 \times 10^{14}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子までであるか、または対象あたり約  $1 \times 10^{12}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子から対象あたり約  $1 \times 10^{13}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子までである。例えば、約  $1 \times 10^{13}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与するか、または約  $1.5 \times 10^{13}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与するか、または約  $3.4 \times 10^{13}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与するか、または約  $6 \times 10^{13}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与するか、または約  $1.2 \times 10^{14}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与するか、または約  $2 \times 10^{14}$  vg の s c A A V 9、s s A A V 9、もしくは r A A V 9 ウイルス粒子を対象に投与する。

#### 【0029】

処置のための方法、薬剤または組成物は、処置前の対象または未処置の C L N 3 - バッテン病患者と比較して、( a ) 自己蛍光性貯蔵物質のリソーム蓄積の減少または遅延、( b ) A T P シンターゼサブユニット C のリソーム蓄積の減少または遅延、( c ) グリア活性化（星状細胞および / またはミクログリア）活性化の減少または遅延、( d ) 星状細胞増加症の減少または遅延、( e ) M R I により測定した脳容積損失の減少または遅延、( f ) 発作の発症の減少または遅延、ならびに ( g ) C L N 3 バッテン病の進行および / または改善を評価するために使用される尺度、例えば、統一バッテン病評価システム ( U B D R S ) 評価尺度またはハンブルク運動および言語尺度のうちの 1 つ以上の安定化、進行の減少もしくは遅延、または改善のうちの 1 つ以上を対象にもたらす。対象は、本明細書に開示される r A A V 9、s s A A V 9、または s c A A V 9 もしくは核酸分子を投与した後に、トレンデレンベルク体位に保持され得る。

#### 【0030】

またさらに提供されるのは、本明細書に開示される r A A V 9 ウイルスのいずれか 1 つ、本明細書に開示される s c A A V 9 のいずれか、本明細書に開示される s s A A V 9 のいずれか、本明細書に記載の核酸分子のいずれかを含む組成物、または本明細書に記載の組成物のいずれかもしくは本明細書に記載の薬剤のいずれかを、治療を必要とする患者の脳または脊髄に送達することを含む、治療を必要とする対象における C L N 3 疾患を治療する方法である。

#### 【0031】

提供される方法または使用のいずれにおいても、組成物または薬剤は、髓腔内、脳室内、脳実質内、または静脈内注射、またはこれらの組み合わせによって送達することができる。提供される方法のいずれも、本明細書に開示される組成物、r A A V 9 ウイルス粒子もしくは s c A A V 9 または核酸分子の髓腔内注射後に、患者をトレンデレンベルク体位に置くことをさらに含み得る。

#### 【0032】

提供される方法または使用のいずれにおいても、組成物または薬剤は、非イオン性低浸透圧性造影剤を含み得る。例えば、組成物は、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオバミドール、イオペントール、イオプロミド、イオベルソール、イオキシラン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される非イオン性低浸透圧性造影剤を含む。

#### 【0033】

10

20

30

40

50

投与される組成物または薬剤は、薬学的に許容される賦形剤を含み得る。例えば、薬学的に許容される賦形剤は、約20～40%の非イオン性低浸透圧性化合物、または約25%～約35%の非イオン性低浸透圧性化合物を含む。例示的な組成物は、20mMのトリス(pH 8.0)、1mMのMgCl<sub>2</sub>、200mMのNaCl、0.001%のポロキサマー188、約25%～約35%の非イオン性低浸透圧性化合物中に配合されたscAAVを含む。別の例示的組成物は、1×PBSおよび0.001%ブルロニックF68中に配合されたscAAVを含む。

#### 【0034】

提供される方法または使用のいずれにおいても、組成物または薬剤が脳または脊髄に送達されるとき、組成物は脳幹に送達されてもよく、または小脳に送達されてもよく、または視覚皮質に送達されてもよく、または運動皮質に送達されてもよい。さらに、提供される方法または使用のいずれにおいても、組成物または薬剤が脳または脊髄に送達されるとき、組成物は神経細胞、グリア細胞、またはその両方に送達されてもよい。例えば、脳または脊髄に送達することは、ニューロン、下位運動ニューロン、ミクログリア細胞、乏突起膠細胞、星状細胞、シュワン細胞、またはこれらの組み合わせなどの神経系の細胞への送達を含む。

10

#### 【0035】

組成物または薬剤の方法、使用もしくは投与は、処置前の対象または未処置の対象と比較して、(a)自己蛍光性貯蔵物質のリソーム蓄積の減少または遅延、(b)ATPシンターゼサブユニットCのリソーム蓄積の減少または遅延、(c)グリア活性化(星状細胞および/またはミクログリア)活性化の減少または遅延、(d)星状細胞増加症の減少または遅延、(e)MRIにより測定した脳容積損失の減少または遅延、(f)発作の発症の減少または遅延、ならびに(g)CLN3バッテン病の進行および/または改善を評価するために使用される尺度、例えば、統一バッテン病評価システム(UBDRS)評価尺度またはハンブルク運動および言語尺度のうちの1つ以上の安定化、進行の減少もしくは遅延、または改善のうちの1つ以上を対象にもたらす。

20

#### 【0036】

本明細書中の見出しあは、読者の便宜のためであり、限定的であることを意図しない。

#### 【0037】

本明細書における「may」および「can」の使用は、請求項内に含まれる様々な実施形態を説明するためのものであり、請求項の範囲についての不確実性を示すためのものではない。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0038】

【図1】scAAV9.P546.CLN3遺伝子カセットの概略図(図1A)およびscAAV9.P546.CLN3.KANの概略図(図1B)を提供する。AAV2由来の逆方向末端反復(ITS)構造間にP546プロモーターの制御下でヒトCLN3 cDNAを挿入した。SV40イントロン(ヒトCLN3 cDNAの上流)およびウシ成長ホルモンポリアデニル化(BGHポリア)ターミネーター配列(ヒトCLN3 cDNAの下流)は、mRNAプロセシングを助け、導入遺伝子発現を増強する。プラスミド構築物pAAV.P546.CLN3.KANの配列を配列番号5に記載する。このゲノムは、AAV9キャップシドタンパク質にパッケージングされている。

40

【図2】scAAV9.P546.CLN3を注射したCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスにおけるヒトCLN3転写産物の存在を示す画像を提供する。

【図3】scAAV9.P546.CLN3を注射したCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスにおける注射後2ヶ月でのASM蓄積の早期減少を示すグラフを提供する。示されている全てのグラフのy軸は、ASM蓄積の総面積を表す。黒い棒は、野生型マウス(WT-PBS)を表し、薄い灰色の棒は、PBS注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスを表し、濃い灰色マウスは、scAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスを表す。

50

【図4】PBS注射野生型マウス（「WT」）、PBS注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3」）、およびscAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3-AAV」）における様々な脳領域において、注射後4ヶ月および6ヶ月でASMの蓄積が著しく減少することを示す、scAAV9.P546.CLN3を注射したCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスのグラフを提供する。

【図5】scAAV9.P546.CLN3のICV投与により、4ヶ月齢および6ヶ月齢のCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスの脳におけるミトコンドリアタンパク質ATPシンターゼサブユニットCの異常なリソーム蓄積が減少したことを示す画像およびグラフを提供する。ATPシンターゼサブユニットCについて染色され、6ヶ月の時点でDAB染色によって可視化された凍結組織切片の代表的な画像が、上のパネルに提供される。下パネルのグラフは、PBS注射WT（「WT」）、PBS注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3」）、およびscAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3-AAV」）マウスの、皮質の体性感覚1バレル野（S1BF）における注射後4ヶ月（4M）および6ヶ月（6M）での、ならびに後内側腹側核／後外側腹側核（VPM/VPL）における注射後4ヶ月および6ヶ月でのサブユニットCの蓄積の定量化を提供する。N=5であり、未処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>動物とscAAV9.P546.CLN3処置動物との間、ならびに野生型動物間で、p=0.0001であり、注射後4ヶ月および6ヶ月でのS1BFにおける野生型と処置されたCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウス間でp=0.5である。

【図6】scAAV9.P546.CLN3のICV投与が、4ヶ月齢および6ヶ月齢のCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスの脳における星状細胞増加症を減少させたことについての画像およびグラフを提供する。上部：活性化星状細胞のマーカーとしてGFAAPについて染色し、DAB染色で可視化した固定組織切片の代表的な画像（6ヶ月時点）である。下部：PBS注射WT（「WT」）、PBS注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3」）、およびscAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3-AAV」）マウスの注射後4ヶ月および6ヶ月でのGFAAP陽性領域の定量化である。各群および時点についてN=5である。S1BF=バレル皮質。VPM/VPL=後内側腹側核／後外側腹側核。

【図7】scAAV9.P546.hCLN3のICV投与が、4ヶ月齢および6ヶ月齢のCLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスの脳におけるミクログリアの活性化を減少させたことについての画像およびグラフを提供する。上部：活性化ミクログリアのマーカーとしてCD68について染色し、DAB染色で可視化した固定組織切片の代表的な画像（6ヶ月時点）である。下部：PBS注射WT（「WT」）、PBS注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3」）、およびscAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>（「CLN3-AAV」）マウスの注射後4ヶ月および6ヶ月でのCD68陽性領域の定量化である。各群および時点についてN=5である。S1BF=バレル皮質。VPM/VPL=後内側腹側核／後外側腹側核。

【図8】注射後18ヶ月までの野生型およびPBSまたは処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスのロータロッド分析を示すグラフを提供する。両性別の全てのマウス（上部パネル）、雄のみ（中央パネル）、雌のみ（下部パネル）である。

【図9】注射後18ヶ月までの野生型およびPBSまたはscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスのモリス水迷路の遂行能力を示すグラフを提供する。全てのマウス（上部パネル）、雄のみ（中央パネル）、雌のみ（下部パネル）である。

【図10】ポールクライミングアッセイにおけるscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスおよびPBS処置マウスの遂行能力を示すグラフである。ポールクライミングアッセイでは、マウスを垂直なポールの上に向けて置き、マウスが向きを変えて下降する時間と共に落下する回数が、バランスおよび敏捷性を測定する。全てのマウス（上部パネル）、雄のみ（中央パネル）、雌のみ（下部パネル）である。

【図11】scAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスが、PBS処置CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスと比較して、垂直ポールからの落下頻度が低いことを示す

10

20

30

40

50

グラフを提供する。マウスを垂直なポールの上に向けて置き、向きを変えようとしながら落下した回数の計数値を、バランスおよび敏捷性について測定する。全てのマウス（上部パネル）、雄のみ（中央パネル）、雌のみ（下部パネル）である。

【図12】scAAV9.P546.GFPの注射から3週間後の、様々な脳領域ならびに末梢マウス組織におけるGFPタンパク質の免疫蛍光ウエスタンプロット検出を示す画像を提供する。

【図13】 $3 \times 10^{13}$  v g の scAAV9.P546.CLN3 の髄腔内腰椎注射から12週間後の4歳のカニクイザル (*Cynomolgus Macaque*) の様々な脳領域におけるヒトCLN3の発現の逆転写定量的PCRを示すグラフを提供する。これらの値は、腰髄4~7中のCLN3タンパク質のレベルに対して正規化した。

【図14】scAAV9.P546.CLN3 遺伝子カセットの核酸配列（配列番号4）を提供する。AAV2 ITR核酸配列はイタリック体で示されており（5' ITRは配列番号6として記載され、3' ITRは配列番号9として記載されている）、P546プロモーター核酸配列（配列番号3）は一重線で下線が引かれており、SV40イントロン核酸配列（配列番号7）は二重線で下線が引かれており、ヒトCLN3 cDNA配列の核酸配列（配列番号2）は太字で示されており、BGHポリアミネーターの核酸配列（配列番号8）は点線で下線を引かれている。

【図15】全長のAAV9.P546.CLN3の核酸配列（配列番号5）を提供する。

【図16】scAAV9.p546.CLN3処置により、24ヶ月齢までのqPCRで測定した $\text{Cln3}^{-/-}$ マウスの大脳皮質および脊髄におけるhCLN3転写産物の発現レベルが上昇することを示すデータを提供する。平均±SEM、各月の通常の一元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001

【図17】scAAV9.p546.CLN3処置により、24ヶ月齢までのRNA sc op e（赤色蛍光）で測定した $\text{Cln3}^{-/-}$ マウスの脳全体に安定したhCLN3転写産物が產生されることを示す画像を提供する。20倍で撮影した画像。

【図18】scAAV9.p546.CLN3処置が、24ヶ月齢までの $\text{Cln3}^{-/-}$ マウスの脳の2つの領域でASMの蓄積を防止および減少したことを示すデータを提供する。平均±SEM、各月の通常の一元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001。20倍で撮影した画像。

【図19】scAAV9.p546.CLN3処置が、24ヶ月齢までの $\text{Cln3}^{-/-}$ マウスの脳の2つの領域で大量のサブユニットC蓄積（ASMの構成要素）を防止したことを示すデータを提供する。平均±SEM、各月の通常の一元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001。20倍で撮影した画像。

【図20】scAAV9.p546.CLN3処置が、24ヶ月齢までの $\text{Cln3}^{-/-}$ の脳の2つの領域で星状細胞の活性化（GFAP<sup>+</sup>）を防止したことを示すデータを提供する。平均±SEM、各月の通常の一元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001。20倍で撮影した画像。

【図21】scAAV9.p546.CLN3処置が、時点に応じて、24ヶ月齢までの $\text{Cln3}^{-/-}$ の脳の2つの領域でかなりのミクログリアの活性化（CD68<sup>+</sup>）を防止したことを示すデータを提供する。平均±SEM、各月の通常の一元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001。20倍で撮影した画像

【図22】scAAV9.CB.CLN3処置が、6ヶ月齢および12ヶ月齢の $\text{Cln3}^{-/-}$ マウスの様々なバッテン病の病状を予防するのに同様に効果的であることを示すデータを提供する。平均±SEM、通常の二元配置分散分析、\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、\*\*\*\* p < 0.0001。

【図23】24ヶ月齢まで測定した $\text{Cln3}^{-/-}$ に赤血球異常がないことを示すデータを提供する。平均±SEM、通常の二元配置分散分析

10

20

30

40

50

【図24】24ヶ月齢まで測定したC1n3 7/8マウスに白血球異常がないデータを提供する。平均±SEM、通常の二元配置分散分析

【図25】scAAV9.p546.CLN3処置マウスは、12ヶ月齢の性別に基づいて、海馬のCA3領域で異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図26】scAAV9.p546.CLN3マウスが、複数の時点で性別に基づいて、梨状皮質（PIRC）にわずかに異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図27】scAAV9.p546.CLN3マウスが、複数の時点で性別に基づいて、網様視床核（RTN）に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図28】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月で性別に基づいて、体性感覚皮質に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図29】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月で性別に基づいて、視床のVPM/VPLに異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図30】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月で性別に基づいて、扁桃体基底外側部（BLA）に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図31】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月および18ヶ月で性別に基づいて、歯状回（DG）の多形層に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図32】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月および18ヶ月で性別に基づいて、手綱（Hab）に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図33】scAAV9.p546.CLN3マウスが、12ヶ月および18ヶ月で性別に基づいて、背内側核（MD）で異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示すデータを提供する。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図34】scAAV9.p546.CLN3マウスが、性別に基づく脳梁膨大後部皮質（Retrospenial Cortex）（RSC）のサブC蓄積レベルに差がないことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図35】scAAV9.p546.CLN3マウスが、6ヶ月で性別に基づいて、体性感覚皮質（S1BF）で異なるレベルの活性化ミクログリア（CD68<sup>+</sup>）を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図36】scAAV9.p546.CLN3マウスが、性別に基づいて、VPM-VPL、視床で異なるレベルのミクログリア（CD68<sup>+</sup>）活性化を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

10

20

30

40

50

【図37】scAAV9.p546.CLN3マウスが、性別に基づいて、背内側核(MD)で異なるレベルの活性化ミクログリア(CD68<sup>+</sup>)を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

【図38】scAAV9.p546.CLN3マウスが、性別に基づいて、内側下核(Submedial Nucleus)(SM)で異なるレベルの活性化ミクログリア(CD68<sup>+</sup>)を示すことを示す。平均±SEM、テューキーの事後検定を伴う通常の二元配置分散分析、\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001、\*\*\*\*p<0.0001。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0039】

本開示は、CLN3-バッテン病を治療するための方法および製品を提供する。本方法は、遺伝子送達ベクターとしてrAAVを使用して対象にCLN3ポリヌクレオチドを送達することを伴う。

##### 【0040】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、複製欠損パルボウイルスであり、その一本鎖DNAゲノムは、145ヌクレオチドの逆方向末端反復(ITS)を含む約4.7kbの長さであり、ウイルスそれ自体またはその誘導体を指すように使用することができる。この用語は、他に特定されない限り、全てのサブタイプおよび天然に存在する形態および組換え形態の両方を包含する。AAVの複数の血清型がある。AAVの血清型はそれぞれ特定のクレードと関連しており、そのメンバーは血清学的および機能的類似性を共有している。したがって、AAVはクレードによって称されてもよい。例えば、AAV9配列は「クレードF」配列と呼ばれる(Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004))。本開示は、特定のクレード、例えばクレードF内の任意の配列の使用を企図する。AAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列は知られている。例えば、AAV-1の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC\_002077に提供されており、AAV-2の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC\_001401およびSrivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)に提供されており、AAV-3の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC\_1829に提供されており、AAV-4の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC\_001829に提供されており、AAV-5ゲノムは、GenBank受入番号AF085716に提供されており、AAV-6の完全なゲノムは、GenBank受入番号NC\_001862に提供されており、AAV-7およびAAV-8ゲノムの少なくとも一部は、それぞれ、GenBank受入番号AX753246およびAX753249に提供されており、AAV-9ゲノムは、Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)に提供されており、AAV-10ゲノムは、Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006)に提供されており、AAV-11ゲノムは、Virology, 330(2): 375-383 (2004)に提供されており、AAV-12ゲノムの一部は、GenBank受入番号DQ813647に提供されており、AAV-13ゲノムの一部は、GenBank受入番号EU285562に提供されている。AAV\_rh.74ゲノムの配列は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,434,928号に提供されている。AAV-B1ゲノムの配列は、Choudhury et al., Mol. Ther., 24(7): 1247-1257 (2016)に提供されている。ウイルスDNA複製(rep)、カプシド形成/パッケージング、および宿主細胞染色体組み込みを指示するcis作用配列は、ITS内に含有される。3つのAAVプロモーター(それらの相対マップ位置に対してp5、p19、およびp40と名付けられる)は、repおよびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。単一のAAVイントロンの差異的スプライシング(ヌクレオチド2107および2227における)と相まって、2つのrepプロモーター(p5およびp19)により、rep遺伝子から4つのrepタンパク質(rep78、re

p 6 8 、 r e p 5 2 、 および r e p 4 0 ) が産生される。 r e p タンパク質は、最終的にウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性を有する。 c a p 遺伝子は、 p 4 0 プロモーターから発現され、 3 つのカプシドタンパク質 V P 1 、 V P 2 、 および V P 3 をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、 3 つの関連カプシドタンパク質の产生に關与する。単一コンセンサスポリアデニル化部位は、 A A V ゲノムのマップ位置 9 5 に位置する。 A A V の生活環および遺伝学は、 M u z y c z k a , C u r r e n t T o p i c s i n M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y , 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 ( 1 9 9 2 ) において概説されている。

#### 【 0 0 4 1 】

A A V は、例えば、遺伝子治療において、外来 D N A を細胞に送達するためのベクターとして魅力的である固有の特徴を有する。培養中の細胞の A A V 感染は、非細胞変性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は、サイレントかつ無症候性である。さらに、 A A V は、多くの哺乳動物細胞を感染させ、インビオで多くの異なる組織を標的化する可能性を可能にする。さらに、 A A V は、緩徐に分裂する細胞および非分裂細胞を形質導入し、転写的に活性な核エピソーム（染色体外要素）として本質的にそれらの細胞の寿命にわたって存続し得る。天然の A A V プロウイルスゲノムは、組換えゲノムの構築を実現可能にするプラスミド中のクローニング D N A として感染性である。さらに、 A A V 複製、ゲノムキャプシド形成および組み込みを指示するシグナルが A A V ゲノムの I T R 内に含まれるので、ゲノムの内部約 4 . 3 k b ( 複製および構造キャプシドタンパク質、 r e p - c a p をコードする ) のいくつかまたは全てを置換することができるプロモーター、目的の D N A およびポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセットのような外来 D N A と接触させる。場合によっては、 r e p および c a p タンパク質は、トランスで提供される。 A A V の別の重要な特徴は、それが極めて安定した頑健なウイルスであることである。これは、アデノウイルスを不活性化するために使用される条件（ 5 6 ~ 6 5 で数時間）に容易に耐え、 A A V の低温保存の重要性を低くする。 A A V は、凍結乾燥され得る。最後に、 A A V 感染細胞は、重複感染に耐性でない。

#### 【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される「 A A V 」という用語は、野生型 A A V ウィルスまたはウイルス粒子を指す。「 A A V 」、「 A A V ウィルス」、および「 A A V ウィルス粒子」という用語は、本明細書では互換的に使用される。「 r A A V 」という用語は、組換え A A V ウィルスまたは組換え感染性のカプセル化ウイルス粒子を指す。「 r A A V 」、「 r A A V ウィルス」、および「 r A A V ウィルス粒子」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

#### 【 0 0 4 3 】

「 r A A V ゲノム」という用語は、修飾されている天然の A A V ゲノムに由来するポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、 r A A V ゲノムは、天然の c a p および r e p 遺伝子を除去するために修飾されている。いくつかの実施形態では、 r A A V ゲノムは内因性 5 ' および 3 ' 逆方向末端反復（ I T R ）を含む。いくつかの実施形態では、 r A A V ゲノムは、 A A V ゲノムが由来する A A V 血清型とは異なる A A V 血清型からの I T R を含む。いくつかの実施形態では、 r A A V ゲノムは、逆方向末端反復（ I T R ）によって 5 ' 末端および 3 ' 末端に隣接した目的の導入遺伝子（例えば C L N 3 をコードするポリヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、 r A A V ゲノムは「遺伝子カセット」を含む。例示的な遺伝子カセットを図 1 A および配列番号 4 の核酸配列に記載する。 r A A V ゲノムは、本明細書で「 s c A A V ゲノム」と呼ばれる自己相補的（ s c ）ゲノムであり得る。あるいは、 r A A V ゲノムは、本明細書で「 s s A A V ゲノム」と呼ばれる一本鎖（ s s ）ゲノムであり得る。

#### 【 0 0 4 4 】

「 s c A A V 」という用語は、自己相補的ゲノムを含む r A A V ウィルスまたは r A A V ウィルス粒子を指す。「 s s A A V 」という用語は、一本鎖ゲノムを含む r A A V ウィルスまたは r A A V ウィルス粒子を指す。

10

20

30

40

50

## 【0045】

本明細書で提供されるrAAVゲノムは、CLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。CLN3ポリペプチドは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むか、または配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、CLN3活性（例えば、リソソーム自己蛍光貯蔵物質のクリアランスの増加、ATPシンターゼサブユニットCのリソソーム蓄積の減少、ならびに例えば治療前の患者と比較して治療した場合の患者における星状細胞およびミクログリアの活性化の減少のうちの少なくとも1つ）を有するポリペプチドをコードする。

## 【0046】

本明細書で提供されるrAAVゲノムは、場合によっては、CLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み、このポリヌクレオチドは、配列番号2に記載のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号2に記載のヌクレオチド配列と少なくとも65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリヌクレオチドであり、CLN3活性（例えば、リソソーム自己蛍光貯蔵物質のクリアランスの増加、ATPシンターゼサブユニットCのリソソーム蓄積の減少、ならびに例えば治療前の患者と比較して治療した場合の患者における星状細胞およびミクログリアの活性化の減少のうちの少なくとも1つ）を有するポリペプチドをコードする。

10

## 【0047】

本明細書に提供されるrAAVゲノムは、いくつかの実施形態では、CLN3活性を有するポリペプチドをコードし、かつストリンジエントな条件下で配列番号2の核酸配列、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配列を含む。「ストリンジエントな」という用語は、ストリンジエントとして当該技術分野において一般に理解される条件を指すために使用される。ハイブリダイゼーションストリンジエナーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドなどの変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジエントな条件の例は、0.015Mの塩化ナトリウム、65～68での0.0015Mのクエン酸ナトリウム、または42での0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミドである。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)を参照されたい。

20

## 【0048】

本明細書に提供されるrAAVゲノムは、いくつかの実施形態では、CLN3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに隣接する1つ以上のAAV-ITRを含む。CLN3ポリヌクレオチドは、遺伝子カセットを形成するために標的細胞内で機能的である転写制御要素（プロモーター、エンハンサおよび/またはポリアデニル化シグナル配列が含まれるが、これらに限定されない）に作動可能であるように結合されている。プロモーターの例は、ニワトリアクチンプロモーターおよびP546プロモーターである。シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長い末端反復(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウィルス即時型プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびにヒト遺伝子プロモーター（例えば、限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、伸長因子-1aプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、およびクレアチンキナーゼプロモーター）が挙げられるが、これらに限定されない追加のプロモーターが本明細書で企図される。本明細書にさらに提供されるのは、P546転写促進活性を有するプロモーターである、配列番号3に記載のP546プロモーター配列、および配列番号3に記載のヌクレオチド配列と少な

30

40

50

くとも 65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のプロモーター配列である。転写制御因子の他の例は、組織特異的制御因子、例えば、ニューロン内での特異的発現を可能にするか、または星状細胞内での特異的発現を可能にするプロモーターである。例としては、ニューロン特異的エノラーゼおよびグリア線維性酸性タンパク質プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターもまた企図される。誘導性プロモーターの非限定的な例としては、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、およびテトラサイクリン調節プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子カセットはまた、哺乳動物細胞中で発現されたときに CLN3 RNA 転写産物のプロセシングを容易にするためのイントロン配列を含んでもよい。このようなイントロンの一例は、SV40 イントロンである。「パッケージング」とは、AAV 粒子の組立およびキャブシド形成をもたらす一連の細胞内事象を指す。「產生」という用語は、充填細胞による rAAV (感染性のカプセル化された rAAV 粒子) の产生プロセスを指す。

#### 【0049】

AAV 「rep」および「cap」遺伝子は、それぞれアデノ随伴ウイルスの複製タンパク質およびキャブシド形成タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を指す。AAV rep および cap は、本明細書において AAV 「パッケージング遺伝子」と呼ばれる。

#### 【0050】

AAV についての「ヘルパーウイルス」は、AAV (例えば、野生型 AAV) が哺乳動物細胞によって複製およびパッケージングされることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、およびワクシニアなどのポックスウイルスを含む、AAV に対する様々なこのようなヘルパーウイルスは、当該技術分野において既知である。アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含し得るが、サブグループ C のアデノウイルス 5 型が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物、およびトリ起源の多数のアデノウイルスが知られており、ATCC などの寄託機関から入手可能である。ヘルペス科のウイルスには、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) およびエブスタイン-バーウィルス (EBV)、ならびにサイトメガロウイルス (CMV) および偽狂犬病ウイルス (PRV) が含まれ、これらは ATCC などの寄託機関からも入手可能である。

#### 【0051】

「ヘルパーウイルス機能」とは、(本明細書に記載の複製およびパッケージングのための他の要件と併せて) AAV 複製およびパッケージングを可能にするヘルパーウイルスゲノムにコードされている機能を指す。本明細書中に記載されるように、「ヘルパーウイルス機能」は、ヘルパーウイルスを提供すること、または例えば必要な機能をコードするポリヌクレオチド配列をトランスでプロデューサー細胞に提供することによる方法で提供され得る。

#### 【0052】

本明細書で提供される rAAV ゲノムは、AAV rep および cap DNA を欠く。本明細書に企図される rAAV ゲノム (例えば、ITR) 内の AAV DNA は、組換えウイルスを導出するのに好適な任意の AAV 血清型からであり得、AAV 血清型 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74、および AAV-B1 が挙げられるが、これらに限定されない。上記に記載されるように、様々な AAV 血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当該技術分野において既知である。キャブシド変異を有する rAAV も企図される。例えば、Marsiglio et al., Molecular Therapy, 22 (11) : 1900 - 1909 (2014) を参照されたい。本明細書中の修飾キャブシドもまた企図され、グリコシル化および脱アミド化などの種々の翻訳後修飾を有するキャブシドを含む。アスパラギンまたはグルタミン側鎖を脱アミド化してアスパラギン残基をアスパラギン酸またはイソアス

パラギン酸残基に変換すること、およびグルタミンをグルタミン酸またはイソグルタミン酸に変換することは、本明細書に提供されるrAAVキャプシドにおいて企図される。例えば、Giles et al. Molecular Therapy, 26(12):2848-2862(2018)を参照されたい。本明細書中の修飾キャプシドはまた、治療を必要とする罹患組織および臓器にrAAVを指向させる標的化配列を含むと企図される。

#### 【0053】

本明細書に提供されるDNAプラスミドは、本明細書に記載されるrAAVゲノムを含む。DNAプラスミドは、AAV9キャプシドタンパク質を用いて感染性ウイルス粒子中にrAAVゲノムを組み立てるために、AAVのヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルス、E1欠損アデノウイルス、またはヘルペスウイルス）による感染を許容できる細胞に導入される。パッケージングされるべきrAAVゲノム、repおよびcap遺伝子、およびヘルパーウイルス機能が細胞に提供されるrAAVを产生する技術は、当該技術分野において標準的である。rAAV粒子の产生は、以下の成分、rAAVゲノム、rAAVゲノムから分離した（すなわち、その中に存在しない）AAV repおよびcap遺伝子、ならびにヘルパーウイルス機能が、単一細胞（本明細書でパッケージング細胞と表される）内に存在することを必要とする。AAVのrepおよびcap遺伝子は、組換えウイルスが由来し得る任意のAAV血清型に由来してもよく、rAAVゲノムITRとは異なるAAV血清型に由来してもよい。偽型rAAVの生成は、例えば、WO01/83692に開示され、参考によりその全体が本明細書に組み込まれる。様々な実施形態では、AAVキャプシドタンパク質は、組換えrAAVの送達を増強するために修飾され得る。キャプシドタンパク質に対する修飾は、一般的に当該技術分野において既知である。例えば、その開示全体が参考により本明細書に組み入れられる、US2005/0053922およびUS2009/0202490を参照されたい。

10

20

30

40

#### 【0054】

パッケージング細胞を生成する方法は、rAAVの产生に必要な成分を全て安定して発現する細胞株を作成することである。例えば、AAV repおよびcap遺伝子を欠くrAAVゲノム、rAAVゲノムから分離したAAV repおよびcap遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子などの選択可能なマーカーを含むプラスミド（または複数のプラスミド）が、細胞のゲノムに組み込まれてもよい。rAAVゲノムは、GCテーリング（Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:2077-2081）、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有する合成リンカーの付加（Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73）、または直接平滑末端ライゲーション（Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666）などの手順により細菌プラスミドに導入されてもよい。その後、パッケージング細胞株は、アデノウイルスなどのヘルパーウイルスに感染させられ得る。この方法の利点は、細胞が選択可能であり、rAAVの大規模产生に好適であることである。好適な方法の他の例は、rAAVゲノムならびに/またはrepおよびcap遺伝子をパッケージング細胞に導入するためにプラスミドではなくアデノウイルスまたはバキュロウイルスを用いる。

#### 【0055】

rAAV粒子の生産の一般原則は、例えば、Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539、およびMuzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129に概説されている。様々なアプローチは、Ratschini et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072(1984)、Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6466(1984)、Tratschini et al., Mol. Cell. Biol. 1.5:3251(1985)、McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963(1988)、およびLebkowski et al., 1988 M

50

o 1 . C e l l . B i o l . , 7 : 3 4 9 ( 1 9 8 8 ) 、 S a m u l s k i e t a l . ( 1 9 8 9 , J . V i r o l . , 6 3 : 3 8 2 2 - 3 8 2 8 ) 、 米国特許第 5 , 1 7 3 , 4 1 4 号、 W O 9 5 / 1 3 3 6 5 および対応する米国特許第 5 , 6 5 8 , 7 7 6 号、 W O 9 5 / 1 3 3 9 2 、 W O 9 6 / 1 7 9 4 7 、 P C T / U S 9 8 / 1 8 6 0 0 、 W O 9 7 / 0 9 4 4 1 ( P C T / U S 9 6 / 1 4 4 2 3 ) 、 W O 9 7 / 0 8 2 9 8 ( P C T / U S 9 6 / 1 3 8 7 2 ) 、 W O 9 7 / 2 1 8 2 5 ( P C T / U S 9 6 / 2 0 7 7 7 ) 、 W O 9 7 / 0 6 2 4 3 ( P C T / F R 9 6 / 0 1 0 6 4 ) 、 W O 9 9 / 1 1 7 6 4 、 P e r r i n e t a l . ( 1 9 9 5 ) V a c c i n e 1 3 : 1 2 4 4 - 1 2 5 0 、 P a u l e t a l . ( 1 9 9 3 ) H u m a n G e n e T h e r a p y 4 : 6 0 9 - 6 1 5 、 C l a r k e t a l . ( 1 9 9 6 ) G e n e T h e r a p y 3 : 1 1 2 4 - 1 1 3 2 、 米国特許第 5 , 7 8 6 , 2 1 1 号、 米国特許第 5 , 8 7 1 , 9 8 2 号、 および米国特許第 6 , 2 5 8 , 5 9 5 号に記載されている。前述の文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれ、 r A A V 粒子産生に関する文書の部分を特に強調する。

#### 【 0 0 5 6 】

本明細書でさらに提供されるのは、感染性 r A A V 粒子を産生するパッケージング細胞である。一実施形態では、パッケージング細胞は、 He L a 細胞、 2 9 3 細胞、 および P e r C . 6 細胞（同種 2 9 3 株）などの安定して形質転換された癌細胞であり得る。別の実施形態では、パッケージング細胞は、形質転換された癌細胞ではない細胞、例えば、低継代 2 9 3 細胞（アデノウイルスの E 1 で形質転換されたヒト胎児腎細胞）、 M R C - 5 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、 W I - 3 8 細胞（ヒト胎児線維芽細胞）、 V e r o 細胞（サル腎細胞）、 および F R h L - 2 細胞（アカゲザル胎児肺細胞）であり得る。

#### 【 0 0 5 7 】

本開示の r A A V ゲノムを含む r A A V （例えば、感染性キャプシド化 r A A V 粒子）も本明細書に提供される。 r A A V のゲノムは、 A A V の r e p および c a p D N A を欠いており、すなわち、 r A A V のゲノムの I T R 間に A A V の r e p または c a p D N A が存在しない。 r A A V ゲノムは自己相補的（ s c ）ゲノムであり得る。 s c ゲノムを有する r A A V は、本明細書中で s c A A V と称される。 r A A V ゲノムは一本鎖（ s s ）ゲノムであり得る。一本鎖ゲノムを有する r A A V は、本明細書中で s s A A V と称される。

#### 【 0 0 5 8 】

本明細書に提供される例示的な r A A V は、「 s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 」と命名される s c A A V である。 s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 s c A A V は、 P 5 4 6 プロモーターの制御下にあるヒト C L N 3 c D N A を含む s c A A V ゲノムを含む（配列番号 3 ）。 s c A A V ゲノムはまた、 S V 4 0 イントロン（ヒト C L N 3 c D N A の上流）およびウシ成長ホルモンポリアデニル化（ B G H ポリ A ）ターミネーター配列（ヒト C L N 3 c D N A の下流）を含む。この s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 遺伝子カセットの配列を配列番号 4 に記載する。 s c A A V ゲノムは、 A A V 9 キャプシドにパッケージ化されており、 A A V 2 I T R ( 1 つの I T R は P 5 4 6 プロモーターの上流にあり、他の I T R は B G H ポリ A ターミネーター配列の下流にある ) を含む。

#### 【 0 0 5 9 】

r A A V は、当該技術分野で標準的な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィーまたは塩化セシウム勾配によって精製され得る。ヘルパーウイルスから r A A V ベクターを精製するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、 C l a r k e t a l . , H u m . G e n e T h e r . , 1 0 ( 6 ) : 1 0 3 1 - 1 0 3 9 ( 1 9 9 9 ) 、 S c h e n p p a n d C l a r k , M e t h o d s M o l . M e d . , 6 9 4 2 7 - 4 4 3 ( 2 0 0 2 ) 、米国特許第 6 , 5 6 6 , 1 1 8 号、 および W O 9 8 / 0 9 6 5 7 に開示される方法を含み得る。

#### 【 0 0 6 0 】

r A A V を含む組成物もまた提供される。組成物は、 C L N 3 ポリペプチドをコードする r A A V を含む。組成物は、対象とした異なるポリペプチドをコードする 2 つ以上の r

10

20

30

40

50

A A V を含み得る。いくつかの実施形態では、r A A V は s c A A V または s s A A V である。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書で提供される組成物は、r A A V と、薬学的に許容される 1 つまたは複数の賦形剤を含む。許容される賦形剤は、レシピエントにとって非毒性であり、好ましくは、用いられる投与量および濃度で不活性であり、リン酸塩 [ 例えば、リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) ] 、クエン酸塩、もしくは他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；E D T A などのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および / または T w e e n 、ポロキサマー 1 8 8 などのコポリマー、ブルロニック ( 例えば、ブルロニック F 6 8 ) もしくはポリエチレングリコール ( P E G ) などの非イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供される組成物は、イオビトリドール、イオヘキソール、イオメプロール、イオパミドール、イオペントール、イオプロミド、イオベルソール、またはイオキシランなどの非イオン性低浸透圧性化合物を含有する薬学的に許容される水性賦形剤を含むことができ、非イオン性低浸透圧性化合物を含有する水性賦形剤は、以下の特性：約 1 8 0 m g 1 / m L 、約 3 2 2 m O s m / k g 水の蒸気圧浸透圧法による重量オスモル濃度、約 2 7 3 m O s m / L の容量オスモル濃度、2 0 で約 2 . 3 c p のおよび 3 7 で約 1 . 5 c p の絶対粘度、ならびに 3 7 で約 1 . 1 6 4 の比重のうちの 1 つ以上を有することができる。例示的な組成物は、約 2 0 ~ 4 0 % の非イオン性低浸透圧性化合物、または約 2 5 % ~ 約 3 5 % の非イオン性低浸透圧性化合物を含む。例示的な組成物は、2 0 m M のトリス ( p H 8 . 0 ) 、1 m M の M g C l 2 、2 0 0 m M の N a C l 、0 . 0 0 1 % のポロキサマー 1 8 8 、および約 2 5 % ~ 約 3 5 % の非イオン性低浸透圧性化合物中に配合された s c A A V または r A A V ウィルス粒子を含む。別の例示的組成物は、1 × P B S および 0 . 0 0 1 % ブルロニック F 6 8 中に配合された s c A A V を含む。

#### 【 0 0 6 2 】

本開示の方法で投与される r A A V の投薬量は、例えば、特定の r A A V 、投与モード、投与の時間、治療目標、個体、および標的とされる細胞型に応じて異なることになり、当該技術分野における標準の方法によって決定され得る。投薬量は、ウイルスゲノム ( v g ) の単位で表されてもよい。本明細書で企図される投薬量は、約 1 × 1 0 1 1 、約 1 × 1 0 1 2 、約 1 × 1 0 1 3 、約 1 . 1 × 1 0 1 3 、約 1 . 2 × 1 0 1 3 、約 1 . 3 × 1 0 1 3 、約 1 . 5 × 1 0 1 3 、約 2 × 1 0 1 3 、約 2 . 5 × 1 0 1 3 、約 3 × 1 0 1 3 、約 3 . 4 × 1 0 1 3 、約 3 . 5 × 1 0 1 3 、約 4 × 1 0 1 3 、約 4 . 5 × 1 0 1 3 、約 5 × 1 0 1 3 、約 6 × 1 0 1 3 、約 1 × 1 0 1 4 、約 1 . 2 × 1 0 1 4 、約 2 × 1 0 1 4 、約 3 × 1 0 1 4 、約 4 × 1 0 1 4 、約 5 × 1 0 1 4 、約 1 × 1 0 1 5 、約 1 × 1 0 1 6 まで、またはそれ以上の総ウイルスゲノムを含む。約 1 × 1 0 1 1 ~ 約 1 × 1 0 1 5 v g 、約 1 × 1 0 1 2 ~ 約 1 × 1 0 1 5 v g 、約 1 × 1 0 1 3 ~ 約 6 × 1 0 1 4 v g 、および約 6 × 1 0 1 3 ~ 約 1 . 2 × 1 0 1 4 v g の投薬量も企図される。本明細書中に例示される用量は、6 × 1 0 1 3 v g である。本明細書に例示される他の用量は 1 . 2 × 1 0 1 4 である。

#### 【 0 0 6 3 】

標的細胞 ( 神経系の細胞、神経細胞またはグリア細胞が挙げられるが、これらに限定されない ) に r A A V を形質導入する方法が提供される。神経系の細胞は、ニューロン、下位運動ニューロン、ミクログリア細胞、乏突起膠細胞、星状細胞、シュワン細胞、またはこれらの組み合わせを含む。

#### 【 0 0 6 4 】

「形質導入」という用語は、レシピエント細胞による機能性ポリペプチドの発現をもた

10

20

30

40

50

らす、本開示の複製欠損 r A A V を介した、インビボまたはインビトロのいずれかでの、標的細胞への C L N 3 ポリヌクレオチドの投与 / 送達を指すように使用される。本開示の r A A V による細胞の形質導入は、r A A V によってコードされるポリペプチドまたは R N A の持続的発現をもたらす。したがって、本開示は、髄腔内、脳室内、脳実質内、または静脈内経路、またはこれらの任意の組み合わせによって、C L N 3 ポリペプチドをコードする r A A V を対象に投与 / 送達する方法を提供する。髄腔内送達は、脳または脊髄のくも膜の下の空間への送達を指す。いくつかの実施形態では、髄腔内投与は槽内投与による。

#### 【 0 0 6 5 】

髄腔内投与が本明細書に例示される。これらの方法は、標的細胞（神経細胞および / またはグリア細胞を含むが、これらに限定されない）に本明細書に記載の 1 つ以上の r A A V を形質導入することを含む。いくつかの実施形態では、C L N 3 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む r A A V ウィルス粒子は、患者の脳および / または脊髄に投与もしくは送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、脳に送達される。送達が企図される脳の領域としては、運動皮質、視覚皮質、小脳、および脳幹が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、脊髄に送達される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ニューロンまたは下位運動ニューロンに送達される。ポリヌクレオチドは、神経細胞およびグリア細胞に送達され得る。グリア細胞は、ミクログリア細胞、乏突起膠細胞、または星状細胞である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、シュワン細胞に送達される。

10

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、患者は、r A A V の投与後トレントデレンベルク体位（低頭位（head down position））に保持される（例えば、約 5、約 10、約 15 または約 20 分間）。例えば、患者は、低頭位で約 1 度～約 30 度、約 15 ～ 約 30 度、約 30 ～ 約 60 度、約 60 ～ 約 90 度、または約 90 ～ 約 180 度傾けられてもよい。

20

#### 【 0 0 6 7 】

本明細書で提供される方法は、本明細書で提供される r A A V を含む組成物の有効用量または有効複数用量をそれを必要とする対象（例えば、ヒト患者を含むが、これに限定されない動物）に投与する工程を含む。用量が C L N 3 - バッテン病の発症前に投与される場合、投与は予防的である。用量が C L N 3 - バッテン病の発症後に投与される場合、投与は治療的である。有効用量は、疾患に関連する少なくとも 1 つの症状を緩和（排除または減少）する用量であり、疾患の進行を遅らせ、または予防する用量であり、疾患の範囲を縮小する用量であり、疾患の寛解（部分的または完全な）をもたらす用量であり、および / または生存を延長させる用量である。処置前の対象と比較して、または未処置の対象と比較して、本明細書で提供される方法は、C L N 3 バッテン病の進行および / または改善を評価するために使用される尺度、例えば、統一バッテン病評価システム（U B D R S）またはハンブルク運動および言語尺度のうちの 1 つ以上の安定化、進行の減少、または改善をもたらす。U B D R S 評価尺度（M a r s h a l l e t a l . , N e u r o l o g y . 2 0 0 5 6 5 ( 2 ) : 2 7 5 - 2 7 9 ） [ U B D R S 身体評価尺度、U B D R S 発作評価尺度、U B D R S 行動評価尺度、U B D R S 能力評価尺度、U B D R S 症状発現順序、および U B D R S 臨床全般印象（C G I ）を含む]、小児の生活の質の尺度（P E D S Q O L ）は、運動機能、言語機能、認知機能、および生存を量る。処置前の対象と比較して、または未処置の対象と比較して、本明細書で提供される方法は、以下の：自己蛍光貯蔵物質のリソソーム蓄積の減少または遅延、A T P シンターゼサブユニット C のリソソーム蓄積の減少または遅延、グリア活性化（星状細胞および / またはミクログリア）活性化の減少または遅延、星状細胞増加症の減少または遅延、および M R I によって測定された脳容積損失の減少または遅延のうちの 1 つ以上をもたらし得る。

30

#### 【 0 0 6 8 】

併用療法も提供される。本明細書で使用される組み合わせは、同時治療または連続治療

40

50

のいずれかを含む。本明細書に記載の方法と標準的な薬物療法との組み合わせが特に企図される。さらに、本発明に従って使用するための組成物の組み合わせ（例えば、scAAV9 . P546 . CLN3と本明細書に開示される造影剤との組み合わせ）（同時治療または連続治療のいずれか）が具体的に企図される。

#### 【0069】

出生後の送達を必要とする対象への送達が企図されるが、胎児への子宮内送達も企図される。

#### 【実施例】

#### 【0070】

以下の実施例は特定の実施形態を説明するが、当業者には変形および修正が発生するであろうことが理解される。したがって、特許請求の範囲に見られるそのような制限のみが、本発明に課せられるべきである。

10

#### 【0071】

実施例では、P546プロモーターの制御下でCLN3 cDNAを保有する自己相補的AAV(scAAV9 . P546 . CLN3と命名)を产生した。P546プロモーターは、MecP2プロモーターの短縮型であり、ニューロンおよび星状細胞の両方において中程度のレベルで導入遺伝子の発現を可能にする。この遺伝子治療ベクターの有効性を、ヒト患者に最も頻繁に見られる変異を有するCLN3<sup>ex7/8</sup>ノックインマウスモデルにおいて試験した。scAAV9 . P546 . CLN3の安全性および有効性を、CLN3<sup>ex7/8</sup>ノックインマウスモデル、野生型マウス、および非ヒト靈長類においてインピボで評価した。マウスおよび非ヒト靈長類からのデータは、視床、海馬、線条体、扁桃体、髓質、および小脳などの深部脳構造を含む脳および脊髄全体にわたる星状細胞およびニューロンの効率的な形質導入を明らかに実証している。

20

#### 【0072】

#### 実施例 1

##### scAAV9 . P546 . CLN3の產生

2つのNot1制限部位の間のヒトCLN3のオープンリーディングフレーム(配列番号2)を含むDNAを、Eurofin Genomics, USAによって合成し、次いで、二本鎖AAV2-ITRベースの产生プラスミドに挿入した。AAV2-ITR間に挿入されたCLN3 DNAを示すプラスミド構築物の概略図[5'ITRは、McCarthy et al., Gene Therapy 8:1248-1254(2001)で以前に記載されたように修飾され、scAAVが生成された]を図1に示す。プラスミド構築物はまた、P546プロモーター、SV40キメライントロン、およびウシ成長ホルモン(BGH)ポリアデニル化シグナルを含む。

30

#### 【0073】

scAAV9 . P546 . CLN3を、HEK293細胞中のアデノウイルスヘルパープラスミドpHelper(Stratagene, Santa Clara, CA)と共に、二本鎖AAV2-ITRベースの产生プラスミドと、前述の([Gao et al., J. Virol., 78:6381-6388(2004)]Rep2Cap9配列をコードするプラスミドを用いて、一過性トリプルプラスミドトランスフェクション法により、cGMP条件下で产生した。ウイルスを2つの塩化セシウム密度勾配精製工程により精製し、PBSに対して透析して、ウイルスの凝集を防ぐために0.001%ブルロニック-F68と配合し、4℃で保存した。全てのscAAV調製物を、Taq-Man技術を使用した定量的PCRによって滴定した。scAAVの純度は、4~12%ドデシル硫酸ナトリウム-アクリルアミドゲル電気泳動および銀染色(Invitrogen, Carlsbad, CA)によって評価した。

40

#### 【0074】

#### 実施例 2

CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスにおけるCSF送達scAAV9 . P546 . CLN3の長期有効性試験

50

### 細胞標的化および発現

マウスにおけるウイルス導入ヒトCLN3の発現および体内分布を確認するために、scAAV9.P546.CLN3を1×PBSおよび0.001%Pluronic F68中に配合するか、または20mMのトリス(pH 8.0)、1mMのMgCl<sub>2</sub>、200mMのNaCl、0.001%のポロキサマー188中に配合し、生後36時間以内に脳室内(IVC)注射により、CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスに投与し、発現を様々な時点で監視した。等量のPBSを注射した野生型マウスおよびCLN3<sup>ex7/8</sup>マウスを対照とした。有効投与量は、NCHウイルスベクターコアタイター(titer)を使用して $2.2 \times 10^{10}$  vg / マウスであった。

#### 【0075】

詳細な脳内分布プロファイルを得るために、RNAscopeインサイチューハイブリダイゼーション技術を使用して、脳、頸髄、胸髄、および腰髄中のヒトCLN3 mRNAを特異的に特定した。この技術は、scAAV9によってコードされるヒト導入遺伝子のみを検出するために、RNAインサイチューハイブリダイゼーションを特異的プローブと使用することを伴う。強いシグナルは、PBS注射対照においてシグナルがなかったことと比較して、scAAV9.P546.CLN3で注射したCLN3<sup>ex7/8</sup>マウスの特に皮質(領域A~C)で、注射後4ヶ月および6ヶ月の時点で観察された。分析は、AAV9送達CLN3導入遺伝子が、皮質、視床、後脳、小脳、および脊髄を含む脳の様々な領域において適切なレベルで発現されることを実証した。小脳において、シグナルは、ブルキンエニューロンにおいて特に強かった。導入遺伝子の発現は、4ヶ月および6ヶ月の時点で、逆転写PCRによって脳および脊髄の全領域においても検出された(図2)。

#### 【0076】

まとめると、CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスからの組織に対して行われた逆転写PCRデータおよびRNAscope分析は、scAAV9.P546.CLN3の単回IVC注射が、脳および脊髄全体における注射後最長6ヶ月のヒトCLN3の標的化および発現の成功をもたらしたことを確認した。これは、CLN3-バッテン病の病因に不釣り合いに関与している細胞を特異的に標的とするためのscAAV9のIVC媒介送達の妥当性を確認する。CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスマルモデルにおける発現データは、定量的RT-PCRによるヒト導入遺伝子の検出のために同じプライマーを使用して野生型マウスにおける研究においてさらに確認された。

#### 【0077】

scAAV9.P546.CLN3の送達後の病理の改善

#### 自己蛍光貯蔵物質(ASM)の蓄積

自己蛍光貯蔵物質(ASM)の蓄積はバッテン病の進行に対する特徴的な組織学的マークーである(Mole et al., Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2015; 1852(10): 2237-2241, Cotman et al., Clin Lipidol. 2012 Feb; 7(1): 79-91、Seehafer et al., Neurobiol Aging. 2006; 27: 576-588)。ASMの蓄積は、バッテン病の多くの形態に対する疾患進行の強力な指標である(Bosch et al., J Neurosci. 2016; 36(37): 9669-9682, Morgan et al., PLoS One. 2013; 8(11): e78694)。本明細書では、ASMの減少が治療の成功的指標として使用されることが企図される。ASMは、CLN3-バッテン病の最も早期に検出可能な疾患の徵候の1つであり、2ヶ月齢までにCLN3<sup>ex7/8</sup>マウスの多数の脳領域すでに見られた(図3)。

#### 【0078】

蛍光画素面積の自動量化は、2ヶ月齢のscAAV9.P546.CLN3注射CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスにおいて体性感覚皮質および視床における蓄積ASMの有意な減少を確認した。この初期の時点で、運動皮質および視覚皮質におけるASM蓄積のより高い変動性が、PBS処置CLN3<sup>ex7/8</sup>マウスにおいて見られたので、分析の統計的検

10

20

30

40

50

出力は、これら 2 つの領域についてより低かった。注射後 4 ヶ月および 6 ヶ月で、4 つの脳領域全てが、PBS 処置 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスと比較して ASM 蓄積の非常に有意な減少を示した(図 4)。scAAV9.P546.CLN3 注射 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスを野生型動物と比較すると、わずかに高いASM レベルは、注射後 4 ヶ月で scAAV9.P546.CLN3 注射 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスの体性感覚および視覚皮質において見出されたが、一方、運動皮質および視床において野生型と scAAV9.P546.CLN3 注射 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスとの間に有意差は見られなかった。注射後 6 ヶ月で、全ての領域が野生型マウスおよび scAAV9.P546.CLN3 処置 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスにおいて匹敵する低レベルのASM を示し、これは PBS 処置 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup>マウスと比較してはるかに低く、ASM 蓄積における長期持続性および高効率減少を確認した( $p = 0.0001$ )。PBS と scAAV9.P546.CLN3 処置動物との間の(群あたり  $N = 10$ )、注射後 4 ヶ月での視覚皮質( $p = 0.001$ )、注射後 6 ヶ月での運動皮質( $p = 0.001$ )以外の全てについて  $p = 0.0001$  であった。

#### 【0079】

##### ミトコンドリアタンパク質 ATP シンターゼサブユニット C の蓄積

野生型および CLN3<sup>e × 7 / 8</sup> PBS 注射マウスまたは scAAV9.P546.CLN3 注射マウスの脳組織を、ATP シンターゼサブユニット C の蓄積について分析した。健康な個体では、このタンパク質は、ミトコンドリア膜の呼吸鎖の一部であるが、バッテン病を患っている患者では、このタンパク質はリソソーム内に異常に蓄積する(Palmer et al., Am J Med Genet. 1992; 42(4): 561-567)。CLN3<sup>e × 7 / 8</sup> マウスでは、野生型動物と比較して、視床の後内側腹側核および後外側腹側核(VPM/VPL 領域)においてサブユニット C の蓄積が 4 ヶ月齢までに明らかになり、これは、NCL マウスモデルでは多くの場合早期に影響を受ける脳領域である(Morgan et al., PLoS One. 2013; 8(11): e18694, Pontikis et al., Neurobiol Dis. 2005; 20(3): 823-836)。未処置動物は、体性感覚皮質および視床の VPM/VPL 領域に蓄積した ATP シンターゼサブ C について強いシグナルを示したが、scAAV9.P546.CLN3 処置動物は、注射後 4 ヶ月および 6 ヶ月の両方での野生型動物に匹敵する最小のシグナルを示した(図 5)(PBS と scAAV9.P546.CLN3 処置動物との間で  $p = 0.0001$ )。

#### 【0080】

##### グリア細胞および星状細胞の活性化

貯蔵物質の異常な蓄積および ATP シンターゼサブ C の蓄積に加えて、ヒト患者および動物モデルの両方における疾患進行の他の組織学的マーカーには、星状細胞およびミクログリアの活性化が含まれる(Cotman et al., Hum Mol Genet. 2002; 11(22): 2709-2721, Morgan et al., PLoS One. 2013; 8(11): e18694, Pontikis et al., Neurobiol Dis. 2005; 20(3): 823-836, Palmer et al., Am J Med Genet. 1992; 42(4): 561-567)。特に、反応性ミクログリアは、CLN3-バッテン病の後期におけるニューロン細胞死の主な原因であり得る、IL1-26などの炎症誘発性メディエーターを放出するようにプライミングされる。活性化星状細胞は、4 ヶ月および 6 ヶ月の時点でグリア原線維酸性タンパク質(GFAP)について染色することによって、視床の VPM/VPL および体性感覚皮質切片において特定された。体性感覚皮質については、体性感覚皮質の皮質層 IV 内のバレル皮質で定量化を行った。注射後 6 ヶ月の代表的な画像を図 6 に示す。

#### 【0081】

GFAP 陽性領域の処置後 4 ヶ月および 6 ヶ月の定量化は、星状細胞の活性化が、PBS 注射 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup> マウスと比較して、scAAV9.P546.CLN3 注射 CLN3<sup>e × 7 / 8</sup> マウスの両方の脳領域において有意に減少したこと示している(図 6)

10

20

30

40

50

)。これらの脳領域における s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 注射 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスにおける G F A P 染色のレベルは、P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスと比較してはるかに低かったが、これらは、分析されたほとんどの領域について、注射後 4 ヶ月および 6 ヶ月の両方で野生型レベルを超えたままであった。

#### 【 0 0 8 2 】

グリア活性化はまた、活性化ミクログリアのマーカーとして抗 C D 6 8 染色を使用して、V P M / V P L および体性感覚皮質切片において決定した。C D 6 8 は、食作用などの炎症誘発性機能についてプライミングされた細胞においてアップレギュレーションされるリソソームタンパク質である (Seehafer et al., J Neuroimmunol. 2011; 230: 169 - 172)。星状細胞で観察されたものと同様に、グリア活性化は、4 ヶ月後に、P B S 注射 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスと比べて、A A V 9 注射 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスの V P M / V P L および体性感覚皮質領域において有意に減少した(図 7)。体性感覚皮質において、s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 による処置は、C D 6 8 染色を野生型マウスに匹敵するレベルまで減少させた。6 ヶ月の時点で、V P M / V P L 領域において、P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスと比較して s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 処置の C D 6 8 染色のレベルに有意な改善は見られなかつたが、それでもなお s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 処置マウスの体性感覚皮質における反応性グリアの有意な減少が見られた(図 7)。

#### 【 0 0 8 3 】

##### s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 の送達後の行動の改善

ヒト C L N 3 - バッテン病患者では、運動機能障害および認知機能障害などの神経障害が、C L N 3 - バッテン病(遅発性小児性バッテン病)などの早期発症型疾患変種と比較して非常に遅れて明らかになり、これは短く不完全な C L N 3 タンパク質の残存機能に起因する可能性がある (Kitzmueller et al., Hum Mol Genet. 2008 Jan 15; 17 (2): 303 - 12)。この表現型の遅延はまた、C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスモデルにも存在する。2 ヶ月齢から開始し、2 ヶ月間隔で継続する s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 の有効性試験では、マウスは、運動機能および協調運動を試験するための加速ロータロッドアッセイおよびポールクライミング、ならびに学習および記憶を評価するためのモリス水迷路を含む、一連の行動試験パラダイムを受けた。現在、動物は注射後 10 ヶ月間追跡調査されており、研究は進行中である。このマウスモデルを特徴付けるこれまでの刊行物は、神経発達行動の初期遅延、それに続く正常化、およびその後の生後 10 ~ 12 ヶ月頃からの低下を示している (Osorio et al., Genes Brain Behav. 2009 Apr; 8 (3): 337 - 345)。

#### 【 0 0 8 4 】

ロータロッド分析は、注射後 18 ヶ月までの野生型および P B S または処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスの間の統計的な有意差を示さなかった。

#### 【 0 0 8 5 】

ロータロッドアッセイを 2 ヶ月毎に行った。マウスを加速ホイール上に置いて、マウスが落下するまでの時間を測定した。各時点において、マウスを午前中に訓練し、試験を午後に 4 時間後に行った。以前に公表された (Bosch et al., J Neurosci. 2016; 36 (37): 9669 - 9682) データとは異なり、注射後 18 ヶ月まで野生型マウスおよび P B S C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスの遂行能力に有意差は観察されなかつた。しかしながら、P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスに対し雌 W T マウスでは、注射後 2 ヶ月で落下するまでの潜時 (latency) における有意差が観察された。以前のデータと比較したこの矛盾は、試験プロトコルの設計および / またはハウジングの環境要因にある可能性が最も高い。この研究で使用されている現在のプロトコルは、各時点で 1 日にのみ動物を試験しているのに対し、以前に公表されたデータは 4 日間にわたって試験を繰り返していた。さらに、この研究で使用されたプロトコルは、以前に公表されたデータと比較してわずかに低い開始速度 (40 rpm に対し 36 rpm) および午前の訓練と午後の試験期間との間のより長い時間間隔で行われた (2 時間の休息に対し 4

10

20

30

40

50

時間の休息）。さらに、午前中の訓練の設定も異なっていた：以前の研究では、マウスは5分間、午前中だけ5 rpmで回転する車輪で訓練されたが、現在の研究の動物は、2秒毎に0.3 rpmまでの車輪の加速をもたらす午後のテストで適用されたのと全く同じ設定で行われた。まとめると、記載した設定を用いて、注射後18ヶ月までに、野生型動物と比較して、未処置マウスまたはscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスでは、加速ロータロッドホイールを保持する能力の障害は観察されなかった（図8の上部パネル）。

#### 【0086】

モリス水迷路分析は、注射後2、4、16、および18ヶ月での、野生型とCLN3<sup>e×7/8</sup>マウスとの間に統計的に有意な差を示した。

10

#### 【0087】

モリス水迷路試験では、動物を、隠れたプラットフォームを含む水で満たされたプールに置いた。訓練の後、方向定位のために環境の手がかりを使って隠されたプラットフォームを見つけるのに動物がかかった時間を、学習および記憶能力の兆候として測定した。注射後2ヶ月および4ヶ月で、野生型動物とPBSまたはscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスとの間に統計的差異が観察され、これは疾患のこの時点ですでに学習および記憶がこの試験で測定可能であるよう損なわれたことを示し、その結果、動物が隠れたプラットフォームを見つけるまでの潜時間が生じた。さらに、16ヶ月および18ヶ月で、野生型と、PBSまたはscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスとの間で、潜時におけるより有意な統計的差異を観察した（図9、左上パネル）。16ヶ月での潜時の増加はまた、PBS処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスについての水泳速度の増加と相関していた（図9、右上パネル）。加えて、性別で分類すると、16ヶ月および18ヶ月で雄の野生型動物とscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスとの間に潜時の統計的差異を観察した（図9、左中央パネル）が、一方scAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>雄マウスの水泳速度は、16ヶ月で有意に減少した（図9、右中央パネル）。scAAV9.P546.CLN3処置雌CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスは、18ヶ月で、野生型またはPBS処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスと比較して有意に増加した潜時を示した（図9、左下パネル）が、一方、PBS処置CLN3<sup>e×7/8</sup>雄マウスの水泳速度は、16ヶ月で有意に増加した（図9、右下パネル）。

20

#### 【0088】

ポールクライミングアッセイは、PBS注射動物と比較して、scAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>の改善された遂行能力を示した。

30

#### 【0089】

ポールクライミングテストは、マウスを上向きにして置いたときにマウスが垂直ポール上で向きを変えるのに要する時間間、ならびに下向きにして置いたときにポールを下降する時間を測定する。さらに、向きを変えようとするか、または下降しようとしている間にポールから落下する回数も測定されることがある。この試験は、協調運動およびバランス能力を評価する。

40

#### 【0090】

注射後10ヶ月および12ヶ月で、scAAV9.P546.CLN3動物は、PBS処置動物と比較して、ポールの下降が有意に速かった（図10、左上パネル）。注射後10ヶ月および12ヶ月で、PBS処置CLN3<sup>e×7/8</sup>動物がポールを下降するのに要する時間において統計的に有意な差が見られたが、一方野生型とscAAV9.P546.CLN3処置CLN3<sup>e×7/8</sup>とでは区別できなかった（図10、左上のパネル）。動物が上向きから下向きに向きを変えるのにかかる時間に関して、2つの統計的に有意な差が見られた。2ヶ月および16ヶ月齢で、野生型動物は、scAAV9.P546.CLN3およびPBS処置CLN3<sup>e×7/8</sup>マウスの両方と比較して有意に早く向きを変えた。この差は、野生型と比較して差が見られなかつた雌（図10、左下パネル）と比較して雄マウス（図10、左中央パネル）においてより顕著であった。2ヶ月および16ヶ月

50

月の時点は、このパラメーターの違いが研究群間で観察された唯一の時点であった（図10、左上パネル）。

#### 【0091】

追加の統計的に有意な差は、ポールからの落下の平均回数において見られ、P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  の雄および雌マウスは、野生型および s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 処置動物と比べて、より頻繁に落下した（図11）。上部グラフ：s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 処置動物と P B S 処置動物との間で落下の回数において、有意差が2ヶ月目に見られた。統計的に有意な差もまた、注射後16ヶ月で野生型マウスと P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスとの間で観察した。中央グラフ：雄のみである。P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスは、注射後16ヶ月で最大の統計的有意性を伴って、他の処置群よりも頻繁にポールから落下した。下部グラフ：雌については、注射後8ヶ月で落下における差は有意であったが、この傾向は研究全体を通して見られた。各処置群について N = 5 (5M / 5F) であった。興味深いことに、ポールからの落下における差は、18ヶ月全体にわたって見られ、早い時点（4ヶ月）ならびに8ヶ月および16ヶ月で統計的に有意であった。8ヶ月時点で、この差は雌においてのみ統計的に有意であったが、明らかな傾向は雄においても存在し、雄では注射後16ヶ月で統計的に有意であった。一般に、P B S 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  の雄は、他の処置群よりも頻繁にポールから落下した。

10

#### 【0092】

まとめると、C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスの s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 による処置が、A S M 物質、ならびに A T P シンターゼサブユニット C の蓄積（両方とも C L N 3 - バッテン病の進行の主要な特徴である）を防止するという強力な証拠がある。これらのデータは、グリア（星状細胞およびミクログリア）活性化における強力な減少と相関している。疾患経過の早い段階ではあるが、行動表現型の改善への最初の傾向が明らかになってきている：s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 処置 C L N 3  $\times 7 / 8$  マウスは、より速く動いて落下しにくかったために、P B S 処置動物と比べて、垂直ポールを下降することでより能力が高かった。全体として、これらのデータはこの疾患の治療戦略としての s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 遺伝子治療を支持している。

20

#### 【0093】

##### 実施例 3

##### マウスにおける s c A A V 9 . P 5 4 6 . G F P を用いた発現研究

30

P 5 4 6 プロモーターは、ニワトリ - ベータ - アクチン (C B A) プロモーターと同様の様式で C N S 全体にわたって導入遺伝子の発現を可能にする。2つのプロモーターを並べて比較するために、生後1日目に、マウスに  $1 \times$  P B S および 0.001% の % ブルロニック F 6 8 または 20 mM のトリス (pH 8.0) 、1 mM の M g C l 2 、200 mM の N a C l 、0.001% ポロキサマー 188 中に配合した s c A A V 9 . C B . G F P または s c A A V 9 . P 5 4 6 . G F P のいずれかを、動物あたり  $5 \times 10^{10}$  ウイルスゲノムで注射した。3週間後、動物を犠死させ、脳を蛍光解剖顕微鏡下に直接置いた。蛍光画像から、G F P 分布は類似しているが、s c A A V 9 . C B . G F P を受容した動物と比較して s c A A V 9 . P 5 4 6 . G F P を受容した動物において蛍光レベルが低いことが明らかであって、P 5 4 6 プロモーターが、C B A プロモーターと比べて、導入遺伝子のより適度な発現レベルをもたらすことを確認した。

40

#### 【0094】

別のマウスに s c A A V 9 . P 5 4 6 . G F P を注射し、200日間生存させた。200日後、動物を犠死させ、全脳矢状切片を G F P 発現について染色した。注射後の200日目であっても、G F P 導入遺伝子の広範な発現が、皮質、海馬、中脳、髓質、扁桃体、および小脳を含む脳全体にわたって観察され、さらに P 5 4 6 プロモーターが C N S 遺伝子治療のための優れた候補であることを示唆する。

#### 【0095】

G F P 蛍光および G F P 免疫蛍光染色からのデータは、様々な組織および脳領域からのウエスタンプロットデータによってさらに裏付けられた。G F P 発現は、s c A A V 9 .

50

P 5 4 6 . G F P で処置したマウス ( n = 3 ) でリカーシステムを用いる蛍光ウエスタンプロットで、注射後 3 週間目に容易に検出可能であったが、一方対照として使用された P B S 注射動物 ( n = 1 ) ではバンドは検出されなかった。導入遺伝子発現は、全脳溶解物、ならびに皮質、髓質、中脳、海馬、小脳および脊髄を含む領域特異的溶解物において明らかであった。

#### 【 0 0 9 6 】

さらに、G F P 発現は、心臓および肝臓でも確認されたが、肺および脾臓はほとんどまたはまったく転写産物発現を示さなかった（図 1 2）。s c A A V 9 . P 5 4 6 . G F P によるウエスタンプロットデータは、マウスおよび非ヒト靈長類安全性研究からの発現データと一致し、ここでは非常に類似した発現プロファイルが見られた。さらに、脳および末梢臓器におけるこの発現パターンは、s c A A V 9 . C B . G F P で見られるパターンに匹敵する。

#### 【 0 0 9 7 】

まとめると、免疫染色およびウエスタンプロット技術を用いたマウスにおける広範な発現分析は、P 5 4 6 プロモーターが、強力な C B A プロモーターと比較してより適度な発現レベルを可能にしながら、神経系全体にわたって非常に類似かつ長期持続的発現プロファイルをもたらすことを示している。

#### 【 0 0 9 8 】

##### 実施例 4

##### 非ヒト靈長類における s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 を用いた発現研究

3 . 4 × 1 0 <sup>1 3</sup> v g の s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 の単回用量を、1 × P B S および 0 . 0 0 1 % のブルロニック F 6 8 中に入れ、3 匹の 3 ~ 4 歳のカニクイザルに投与した。

#### 【 0 0 9 9 】

s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 を注射したカニクイザルの脳組織における標的化分析では、ヒト C L N 3 導入遺伝子に特異的であり、かつ内因性非ヒト靈長類 C L N 3 R N A と交差反応しないプライマーを使用して、標的を R N A レベルに関して分析した。注射の 1 2 週間後に犠死させたカニクイザルの 1 匹の様々な脳領域からの組織における逆転写定量的 P C R は、脊髄、皮質、視床、線条体、小脳、および網膜の全てのレベルでヒト C L N 3 の発現を明らかにし、さらに P 5 4 6 プロモーターによる s c A A V 9 の広範な到達および脳ならびに脊髄全体の転写産物の発現を強調した（図 1 3）。注目すべきことに、ベクター由来のヒト C L N 3 の検出に使用されるプライマーは、内因性の N H P C L N 3 転写産物と交差反応しない。したがって、ゼロへの正規化は不可能であったため、生理食塩水を注射した動物または注射していない動物に対してではなく 1 に設定した腰髄に見られるベクター由来 C L N 3 R N A レベルに対して正規化を行った。アクチンを正規化遺伝子として使用した。

#### 【 0 1 0 0 】

まとめると、非ヒト靈長類からのデータは、単回髄腔内腰椎注射後に、s c A A V 9 が神経系を通過し、C N S の広い領域に到達する可能性が高いことを証明している。注目すべきことに、s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 の髄腔内注射によって処置された全ての非ヒト靈長類は、治療によく耐え、注射後 6 ヶ月までのいかなる時点でも、いずれの動物においても有害作用は観察されなかった。

#### 【 0 1 0 1 】

##### 実施例 5

##### s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 遺伝子治療の臨床試験

s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 は、C L N 3 - バッテン病のヒト患者に髄腔内で送達されるであろう。

#### 【 0 1 0 2 】

臨床試験用の s c A A V は、実施例 1 に記載されているように c G M P 条件下で、H E K 2 9 3 細胞の三重トランスフェクション法を利用して、N a t i o n w i d e C h i

10

20

30

40

50

l d r e n ' s H o s p i t a l 臨床製造施設により製造される。

#### 【0103】

参加のために選択された患者は、遺伝子型によって決定される C L N 3 疾患と診断された 3 ~ 10 歳であろう。第 1 のコホート (n = 3) は、患者あたり  $6 \times 10^{13}$  v g の総 s c A A V の一回限りの遺伝子導入用量を受けるであろう。s c A A V 9 . P 5 4 6 . C L N 3 は、1 mM の M g C l<sub>2</sub>、200 mM の N a C l、0.001% のポロキサマー 188 トリス (pH 8.0) 中に 20 mM で配合され、腰椎嚢のくも膜下棘腔に至る突起間への腰椎穿刺によって挿入された髄腔内カテーテルを介して一度に送達されるであろう。安全性は、臨床的根拠に基づき、かつ安全性ラベルを検討することにより評価されるであろう。遺伝子導入後 30 日目の安全性データの検討を可能にするために、各被験者の登録の間に最低 4 週間があるであろう。安全性の懸念がなければ、注射後 1 ヶ月で第 3 の被験者が評価された後、4 人の追加被験者の第 2 のコホートが登録されることになる。コホート 2 における各被験者 (n = 4) は、 $1.2 \times 10^{14}$  v g の総 s c A A V の漸増用量を受けることになる。次の被験者への投与の前に、5 つの時点 (1、2、7、14、および 21 日目) からの安全性分析の検討ならびに D S M B 検討を可能にするために、コホート 1 の完了からコホート 2 の開始までの間に少なくとも 6 週間のウインドウがあるであろう。

10

#### 【0104】

疾患進行は、U B D R S 尺度（上記の発明を実施するための形態において言及した）および小児生活の質（P E D S Q O L）尺度を使用する生活の質に対する治療の影響、および長期生存の可能性を用いて測定されるであろう。

20

#### 【0105】

全ての患者が 3 年間の試験を完了したときに、有効性に関する一次分析が評価されるであろう。有効性を決定する根拠は、C L N 3 - バッテン病のために特別に開発された確立された統一バッテン病評価尺度（U B D R S）に基づいて、疾患の安定化または進行の減少によるものであろう。3 年間の試験期間の終了時に、F D A ガイダンスに従って、患者を 5 年間にわたって毎年監視するであろう。

#### 【0106】

##### 実施例 6

###### C l n 3 7 / 8 マウスモデルでの追加研究

実施例で記載されているように、2 匹の野生型 (W T) および C l n 3 7 / 8 マウスに、生後 1 日目に脳室内 (I C V) 注射を介して P B S、s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3、または s c A A V 9 . C B . C L N 3 遺伝子治療のいずれかを投与した。この研究では、マウスに  $5 \times 10^{10}$  v g / 動物 (4  $\mu$  L 容量) を投与した。

30

#### 【0107】

注射の方法とタイミングは、C L N 3 - バッテン病患者に関連する特定のニューロン集団をターゲットにするように選択された。動物は、手順中に低体温によって鎮静され、完全に回復するまで監視され、以前に記載されたように遺伝子型が決定された (M o r g a n et al . P L o S O n e 8 、および Laboratory , T J Proto col 18 2 5 7 : Standard P C R A s s a y を参照されたい)。

#### 【0108】

統計分析は G r a p h P a d P r i s m を使用して行い、詳細は図の凡例に記載されている。一般に、二元配置分散分析は適切な事後検定で使用され、外れ値は R O U T 法で除去された (Q = 0.1 ~ 1%)。必要に応じて、対応のない t 検定を使用した。

40

#### 【0109】

##### 脳における h C L N 3 転写産物の発現と分布

定量的 P C R を実施して、処置したマウスの脳内の h C L N 3 転写産物を測定した。全 R N A および c D N A は以前に記載されたように生成された (C a i n et al . M o 1 T h e r . , 2 0 1 9 を参照されたい)。2<sup>Δ</sup> - デルタ - デルタ C t 法を使用して、ハウスキーピング対照として G a p d h に正規化されたヒト C L N 3 転写産物の相対的な遺伝子発現を計算した。h C L N 3 フォワードプライマー配列：C G C T A G C A T C T

50

C A T C A G G C C T T G (配列番号 11)、h C L N 3 リバースプライマー配列：A G  
C A T G G A C A G C A G G G T C T G (配列番号 12)。

#### 【0110】

図16に示すように、s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置により、24ヶ月齢までのq P C Rで測定した場合、C l n 3<sup>7 / 8</sup>マウスの大脳皮質および脊髄におけるh C L N 3 転写産物の発現レベルが上昇した。したがって、s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 の単回の新生児 I C V 投与は、h C L N 3 の持続的かつ十分に標的化された発現をもたらす。

#### 【0111】

加えて、R N A s c o p e を実行して、処置したマウスの脳内のC L N 3 転写産物を検出した。マウスをC O<sub>2</sub> 安樂死させ、心臓をP B S で灌流した。脳を収集し、1 mmの矢状脳ブロックに配置した。脳を正中線と正中線の3 mm右でスライスした。3 mmの矢状片を - 5 0 ° C のイソペンタンで瞬間冷凍し、16 μmのクリオスタッフで切片化し、スライド上に配置した。次に、スライドをメーカーが推奨するプロトコル (A C D B i o マニュアル 3 2 0 2 9 3 および 3 2 0 5 1 3 ) に従って処理した。切片は、ヒト特異的C L N 3 プローブ (A C D B i o カタログ番号 4 7 0 2 4 1 ) で標識され、これはマウスとヒトC L N 3 の間の相同意がほとんどないC L N 3 遺伝子の領域 (領域 6 3 1 - 1 7 1 1 ) の20個のダブルZペアで構成されていた。スライドを、h C L N 3 プローブに550 nmフルオロフォアをタグ付けしたAmp 4 - F L - A l t C を使用して、R N A s c o p e F l u o r e s c e n t M u l t i p l e x K i t (A C D B i o カタログ番号 3 2 0 8 5 0 ) で蛍光標識し、スライドをD A P I で対比染色して核を標識した。組織切片を、退色防止封入剤 (D a k o f a r a m o u n t 、A g i l e n t ) を使用してカバースリップの下のスライドにマウントした。スライドを、画像化前に暗所に保管した。切片を、N I S - E l e m e n t s A d v a n c e d R e s e a r c h ソフトウェア (v 4 . 2 0 ) を備えたN i k o n N i E 顕微鏡を使用して画像化および分析した。

#### 【0112】

図17に示すように、s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置により、24ヶ月齢までのR N A s c o p e (赤色蛍光)で測定した場合、C l n 3<sup>7 / 8</sup>マウスの脳全体に安定したh C L N 3 転写産物が生成する。定量的P C T およびR N A s c o p e アッセイにより、s c A A V 9 . p 5 4 6 の単回の、新生児のI C V 投与が、h C L N 3 の持続的かつ十分に標的化された発現をもたらすことを確認する。s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 遺伝子治療は、24ヶ月齢までの脳および脊髄全体でh C L N 3 遺伝子発現を増加させる。

#### 【0113】

古典的なバッテン病の病理

s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 の投与が、C l n 3<sup>7 / 8</sup>マウスの脳における古典的なバッテン病の病状を予防したかどうかを判断するために、I C V 投与後に貯蔵物質の蓄積 (A S M ) とグリア反応性を調べた。野生型およびC L N 3<sup>7 / 8</sup>マウスを、C O<sub>2</sub> 安樂死させ、P B S で灌流し、組織を4% P F A で固定した。固定された脳を、50 μm のビプラトーム (L e i c a V T 1 0 0 0 8 ) で切片化した。切片を、標準的な蛍光抗体法およびD A B 染色プロトコルで処理した。一次抗体には、抗C D 6 8 (A b D S e r o t e c 、M C A 1 9 5 7 、1 : 2 0 0 0 ) 、抗G F A P (D a k o 、Z 0 3 3 4 、1 : 8 0 0 0 ) 、および抗A T P シンターゼサブユニットC (A b c a m 、a b 1 8 1 2 4 3 、1 : 1 0 0 0 ) が含まれていた。二次抗体には、抗ラットおよび抗ウサギビオチン化が含まれていた (V e c t o r L a b s 、B A - 9 4 0 0 、1 : 2 0 0 0 ) 。切片を、20倍のA p e r i o スライド走査型顕微鏡を使用して画像化および分析した。画像を、視床のV P M / V P L と体性感覚皮質の2 / 3層から抽出し、各動物の複数の組織から複数の画像が撮影された。免疫反応性の総面積は、I m a g e J の閾値分析を使用して定量化した。

#### 【0114】

図18は、s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置が、24ヶ月齢までのC l n 3<sup>7 /</sup>

10

20

30

40

50

<sup>8</sup>マウスの脳の2つの領域でASMの蓄積を防止および減少することを示している。図1  
9は、scAAV9.p546.CLN3処置が、24ヶ月齢までのC1n3<sup>7/8</sup>マウスの脳の2つの領域で、おむね大量のサブユニットCの蓄積(ASMの構成要素)を防止したことを示している。図20は、scAAV9.p546.CLN3処置が、24ヶ月齢までのC1n3<sup>7/8</sup>の脳の2つの領域で星状細胞の活性化(GFAP+)をおむね防止することを示している。図21は、scAAV9.p546.CLN3処置が、時点に応じて、24ヶ月齢までのC1n3<sup>7/8</sup>の脳の2つの領域でミクログリアの活性化(CD68+)を防止することを示している。したがって、scAAV9.p546.CLN3は、記憶物質の蓄積やグリア反応性を含む、C1n3<sup>7/8</sup>マウスの脳における古典的なバッテン病の病状を予防した。図22は、scAAV9.CB.CLN3処置が、6ヶ月齢および12ヶ月齢のC1n3<sup>7/8</sup>マウスの様々なバッテン病の病状を予防するのに同様に効果的であることを示している。

#### 【0115】

加えて、scAAV9.p546.CLN3による処置は、ICV投与後24ヶ月まで測定した場合、赤血球(CBC)異常または白血球(WBC)異常を引き起こさなかった。図23は、次のCBCパラメーターのデータを提供する：RBC数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球ヘモグロビン濃度、RBC分布、血小板数、および平均血小板容積。図24は、次のWBCパラメーターのデータを提供する：WBC数、リンパ球数パーセント、単球パーセント、顆粒パーセント。

#### 【0116】

scAAV9.p546.CLN3遺伝子治療は、ASM、サブユニットC、GFAPおよびCD68の発現を含む、C1n3<sup>7/8</sup>マウスの24ヶ月齢までのCLN3-バッテン病の細胞の特徴の多くを予防する。加えて、scAAV9.CB.CLN3遺伝子治療は、ASM、サブユニットC、GFAP、CD68の発現など、C1n3<sup>7/8</sup>マウスの24ヶ月齢までのCLN3-バッテン病の細胞の特徴の多くを予防する。

#### 【0117】

##### 実施例7

##### C1n3<sup>7/8</sup>マウスマルクスモデルにおける性に基づく組織病理学的分析

実施例2に記載されるように、野生型(WT)およびC1n3<sup>7/8</sup>マウスに、生後1日目に脳室内(ICV)注射を介して、PBS、scAAV9.p546.CLN3、またはscAAV9.CB.CLN3遺伝子治療のいずれかを投与した。この研究では、マウスに5×10<sup>10</sup>vg/動物(4μL容量)を投与した。

#### 【0118】

野生型およびCLN3<sup>7/8</sup>マウスを、CO<sub>2</sub>安樂死させ、PBSで灌流し、組織を4%PFAで固定した。固定された脳を、50μmのビプラトーム(Leica VT1000)で切片化した。切片を、標準的な蛍光抗体法およびDAB染色プロトコルで処理した。一次抗体には、抗CD68(AbD Serotec、MCA1957、1:2000)および抗ATPシナターゼサブユニットC(Abcam、ab181243、1:1000)が含まれていた。二次抗体には、抗ラットおよび抗ウサギビオチン化が含まれていた(Vector Labs、BA-9400、1:2000)。切片を、20倍のAperioスライド走査型顕微鏡を使用して画像化および分析した。画像は次の領域から抽出された：海馬のCA2/CA3領域、海馬歯状回の多形層、扁桃体基底外側部、手綱、視床網様体核、視床後外側腹側核/後内側腹側核、視床背内側および内側下領域、梨状皮質、脳梁膨大後部皮質、および体性感覚皮質の2/3層で、各動物の複数の組織から複数の画像が撮影されている。免疫反応性の総面積は、ImageJの閾値分析を使用して定量化した。

#### 【0119】

図25は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、12ヶ月齢で性別に基づいて、海馬のCA3領域に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。12ヶ月

10

20

30

40

50

月齢で、処置された雌の C 1 n 3<sup>7 / 8</sup> マウスは野生型よりも有意に多くのサブ C を蓄積したが、処置された雄におけるサブ C 蓄積は野生型と異ならなかった。ただし、この違いは、分析された他のどの時点でも見られなかった。

#### 【 0 1 2 0 】

図 2 6 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 で処置されたマウスが、複数の時点で性別に基づいて、梨状皮質（ P I R C ）でわずかに異なるレベルのサブ C 蓄積を示したこと 10 を示す。 1 2 ヶ月齢で、処置された雌の変異体 C L N 3 マウスは野生型よりも有意に多くのサブ C を蓄積し、 A A V 処置は P B S 変異体レベル未満の蓄積を妨げなかつたが、処置された雄のサブ C 蓄積は野生型と異ならなかつた。しかしながら、この相関関係は分析された他のどの時点でも見られず、処置された雌のサブ C 蓄積が野生型と有意差がなく、未処置の変異マウスよりも有意に低かつた 1 8 ヶ月齢の所見と一致しなかつた。 1 8 ヶ月齢で、処置を受けた雄のサブ C 蓄積は、 W T レベルよりも大幅に高くなる。

#### 【 0 1 2 1 】

図 2 7 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置マウスが、複数の時点で性別に基づいて、網様視床核（ R T N ）で異なるレベルのサブ C 蓄積を示したこと 20 を示す。 6 ヶ月齢で、処置された雌の変異体 C L N 3 マウスは野生型よりも有意に多くのサブ C を蓄積したが、処置された雄におけるサブ C の蓄積は野生型と異ならなかつた。 1 2 ヶ月齢で、処置された雄は野生型レベルのままであったが、処置された雌は野生型マウスと未処置の変異マウスの両方よりも有意に多くのサブ C を有している。処置された雌の変異体と未処置の変異体との間のこの違いは 1 8 ヶ月では存在せず、サブ C は W T よりも有意に高かつたが、雄と雌の両方で未処置の変異体よりも有意に低かつた。

#### 【 0 1 2 2 】

図 2 8 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置マウスが、 1 2 ヶ月で性別に基づいて、体性感覚皮質で異なるレベルのサブ C 蓄積を示すことを示す。 1 2 ヶ月齢では、 A A V による処置は、未処置の変異体の雌と比較してサブ C 蓄積を減少させなかつたが、処置された雄におけるサブ C 蓄積は防止され、野生型と異ならなかつた。ただし、この違いは、分析された他のどの時点でも見られなかつた。

#### 【 0 1 2 3 】

図 2 9 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 で処置されたマウスが、 1 2 ヶ月で性別に基づいて、視床の V P M / V P L に異なるレベルのサブ C 蓄積を示したこと 30 を示す。 6 ヶ月齢で、処置された雌は未処置の変異体の雌よりも有意に少ないサブ C を蓄積したが、野生型の雌よりも有意に多かつた。この違いは 1 2 ヶ月から 1 8 ヶ月まで続いたが、分析したどの時点でも野生型と処置された雄との間に違いはなかつた。

#### 【 0 1 2 4 】

図 3 0 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 で処置されたマウスが、 1 2 ヶ月で性別に基づいて、扁桃体基底外側部（ B L A ）で異なるレベルのサブ C 蓄積を示すことを示す。 1 2 ヶ月齢で、 A A V は処置された雌の動物におけるサブ C 蓄積を有意に防止しなかつた。 1 8 ヶ月の時点で、処置された雌のサブ C 蓄積は野生型よりも有意に高いままであつたが、未処置の雌よりも低かつた。 1 8 ヶ月までに、処置された雄は、野生型の雄よりも有意に多くのサブ C を有し始め、雌群で見られたものと同様の結果になつた。

#### 【 0 1 2 5 】

図 3 1 は、 s c A A V 9 . p 5 4 6 . C L N 3 処置マウスが、 1 2 ヶ月および 1 8 ヶ月で性別に基づいて、歯状回（ D G ）の多形層に異なるレベルのサブ C 蓄積を示すことを示す。 1 2 ヶ月齢で、処置された雌は、野生型の雌および未処置の変異体の雌の両方よりも有意に多くのサブ C を蓄積したように見えた。生の画像（ 図示せず ）は、閾値処理の結果に影響を与える可能性のある歯状回の多形層を取り囲む暗くなつた顆粒細胞層を明らかにした。この暗い部分は、この群にのみ存在し、 1 2 ヶ月の時点でのみ存在した。この増加は、雌では 1 8 ヶ月で見られなくなつたが、処置された雄では 1 8 ヶ月で、野生型雄よりも多くのサブ C 蓄積を示し始めた。

#### 【 0 1 2 6 】

図32は、scAAV9.p546.CLN3処置マウスが、12ヶ月および18ヶ月で性別に基づいて、手綱に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。12ヶ月齢で、処置された雌は未処置の変異体の雌よりも有意に少ないサブCを蓄積したが、野生型の雌よりも有意に多かった。この違いは18ヶ月でも見られたが、分析したどの時点でも野生型と処置された雄との間に違いはなかった。

#### 【0127】

図33は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、12ヶ月および18ヶ月で性別に基づいて、背内側核に異なるレベルのサブC蓄積を示すことを示す。12ヶ月齢で、処置された雌は未処置の変異体の雌よりも有意に少ないサブCを蓄積したが、野生型の雌よりも有意に多かった。この違いは18ヶ月でも見られたが、分析したどの時点でも野生型と処置された雄との間に違いはなかった。

10

#### 【0128】

図34は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、性別に基づいて脳梁膨大後部皮質(RSC)のサブC蓄積レベルに差がないことを示す。分析したどの時点でも、野生型と処置された雄との間に違いはなかった。

#### 【0129】

図35は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、6ヶ月で性別に基づいて、体性感覚皮質(S1BF)で異なるレベルの活性化ミクログリア(CD68<sup>+</sup>)を示すことを示す。6ヶ月齢で、処置された雌は野生型および未処置の雌と比較してミクログリアの活性化が増加したが、処置された雄は野生型よりも高いが未処置よりは低い。12ヶ月齢と18ヶ月齢で性差は見られなかった。

20

#### 【0130】

図36は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、性別に基づいてVPM-VPL、視床で異なるレベルのミクログリア活性化を示すことを示す。6ヶ月齢で、処置された雌は野生型および未処置の雌と比較してミクログリアの活性化が増加するが、処置された雄は野生型よりも高いが未処置よりは低い。この違いは12ヶ月においても見られる。同様のことが18ヶ月の雌群でも見られるが、処置された雄はこの時点で野生型と有意差はなかった。

#### 【0131】

図37は、scAAV9.p546.CLN3マウスが、性別に基づいて背内側核(MD)で異なるレベルの活性化ミクログリア(CD68<sup>+</sup>)を示すことを示す。6ヶ月齢で、処置された雌は野生型および未処置の雌と比較してミクログリアの活性化が増加し、処置された雄は野生型よりも高かったが、未処置の雄と異ならなかった。12ヶ月齢および18ヶ月齢の両方で、処置された雄は野生型よりもミクログリアの活性化が高く、未処置の雄よりも活性化が低かったが、処置は雌には影響を与えたなかったようである。

30

#### 【0132】

図38は、scAAV9.p546.CLN3で処置されたマウスが、性別に基づいて、内側下核(SM)で異なるレベルの活性化ミクログリアを示すことを示す。6ヶ月齢で、処置された雌は野生型および未処置の雌と比較してミクログリアの活性化が増加したが、処置された雄は未処置の雄と有意差はなく、どちらも野生型よりも活性が高かった。12ヶ月までに、処置はどちらの性においてもミクログリアの活性化の程度に影響を与えないようであった。18ヶ月までに、処置された雄はミクログリアの活性化が野生型レベルに減少したが、処置された雌は未処置の雌と同程度に活性化されたままであった。

40

#### 【0133】

前述のデータは、scAAV9.p546.CLN3処置動物が、CLN3<sup>7/8</sup>マウス脳のいくつかの領域でATP合成酵素サブユニットCの蓄積およびCD68<sup>+</sup>ミクログリアの活性化に関し性別に基づいて病状が異なることを示す。性別による病理学的差異の違いは、雌特有のものであるように思われる。12ヶ月の時点で、違いの大部分が最も一貫して見られ、多くは12ヶ月でのみ示され、18ヶ月で示されなくなる。

#### 【0134】

50

本明細書では本発明の好ましい実施形態を示し、記載してきたが、そのような実施形態が例としてのみ提供されていることは当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変形、変更、および置換を思い付くであろう。本明細書に記載の実施形態に対する様々な代替形態を採用してもよいことを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造ならびにそれらの同等物がそれによって包含されることが意図される。

【 0 1 3 5 】

本出願で参照される全ての文書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

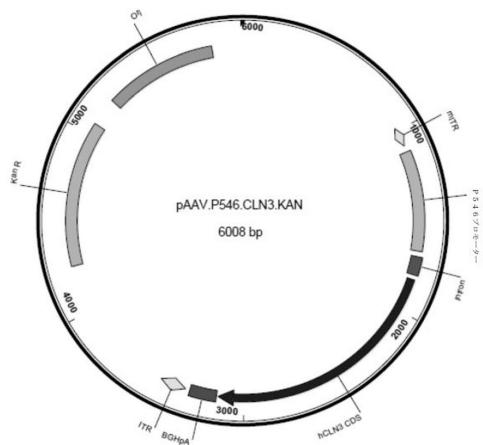
## 【図面】

## 【図 1】

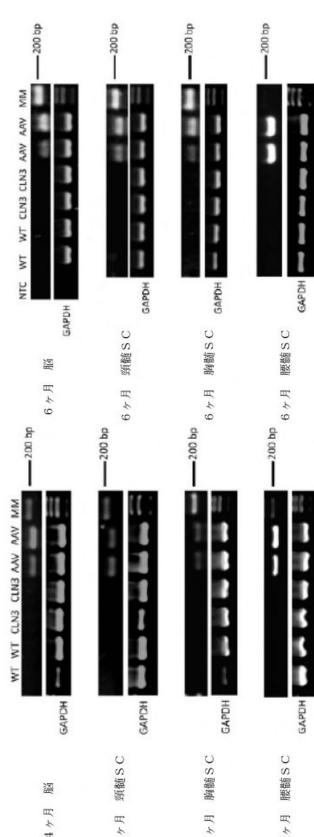
A



B



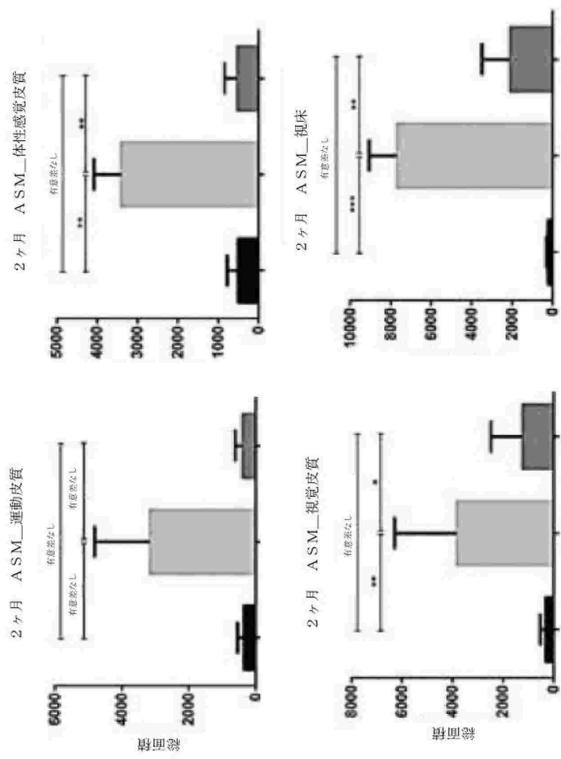
## 【図 2】



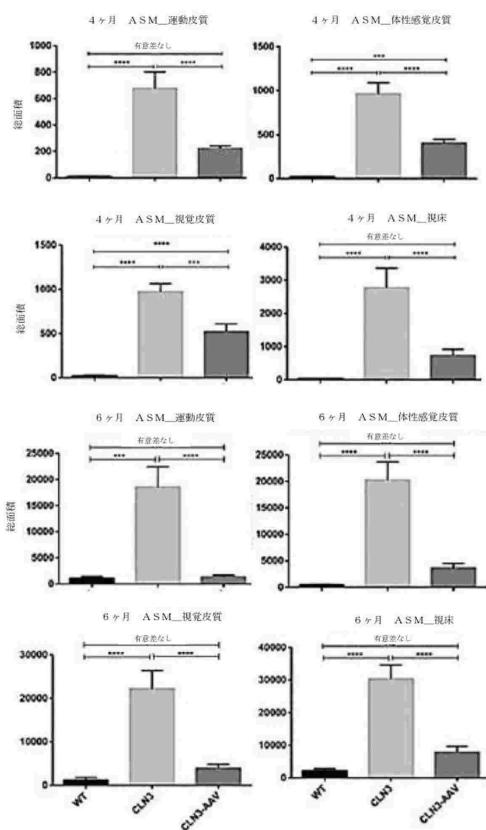
10

20

## 【図 3】



## 【図 4】

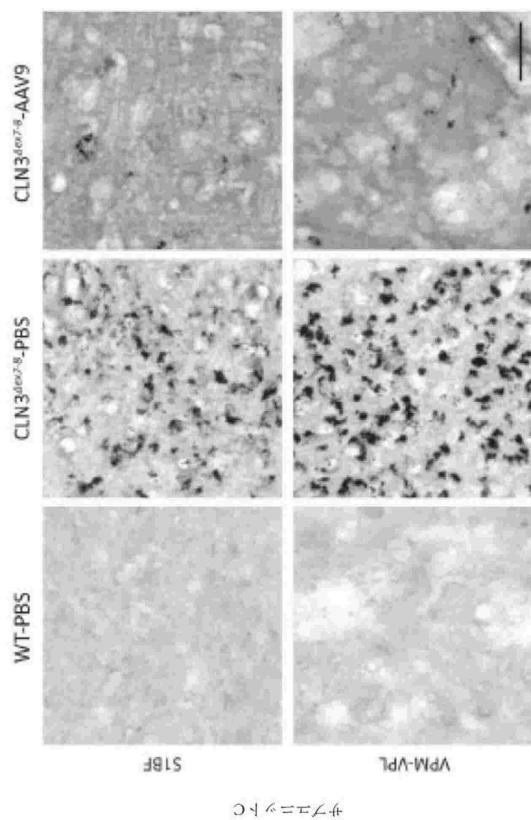


30

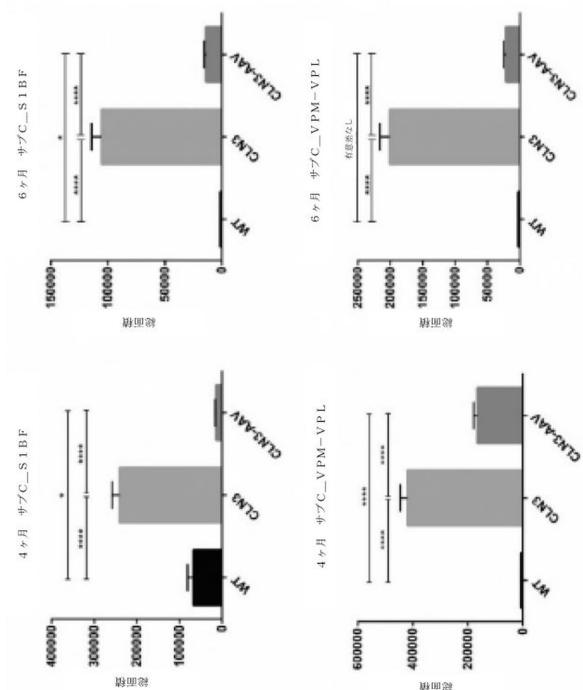
40

50

【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



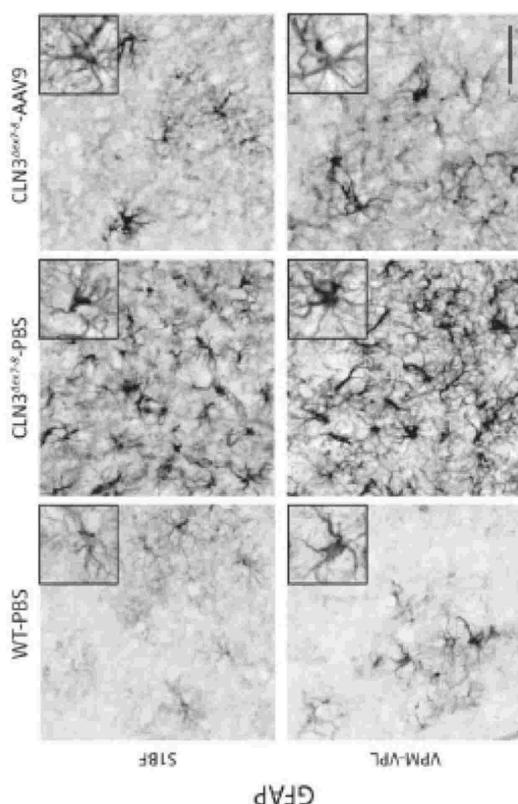
10

20

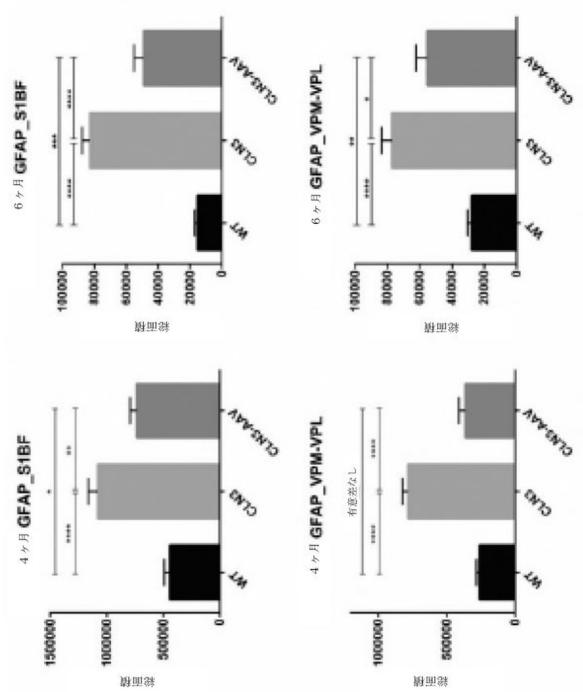
30

40

【図 6 - 1】

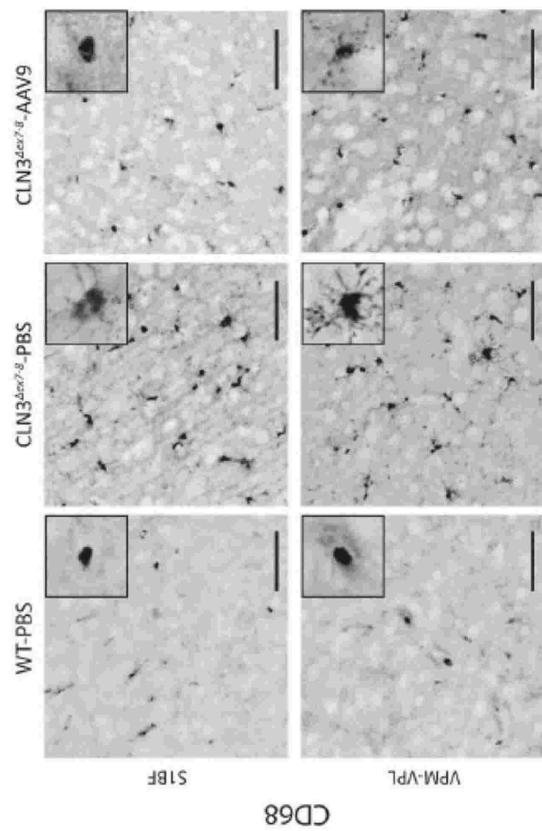


【図 6 - 2】

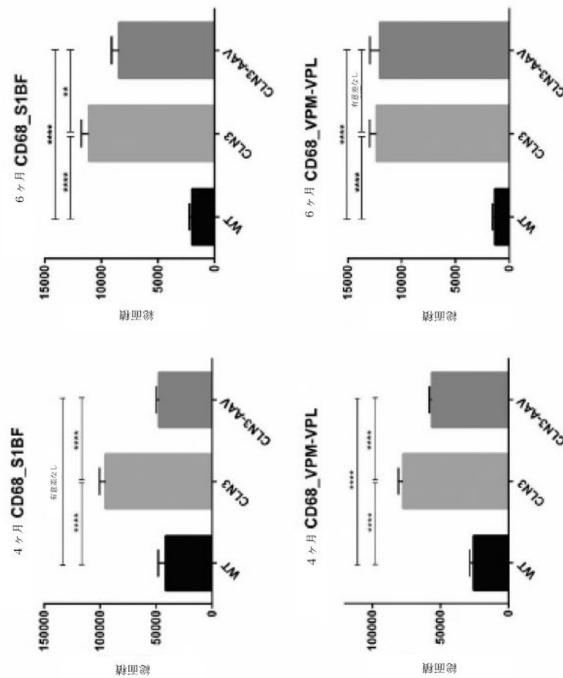


50

【図 7 - 1】



【図 7 - 2】



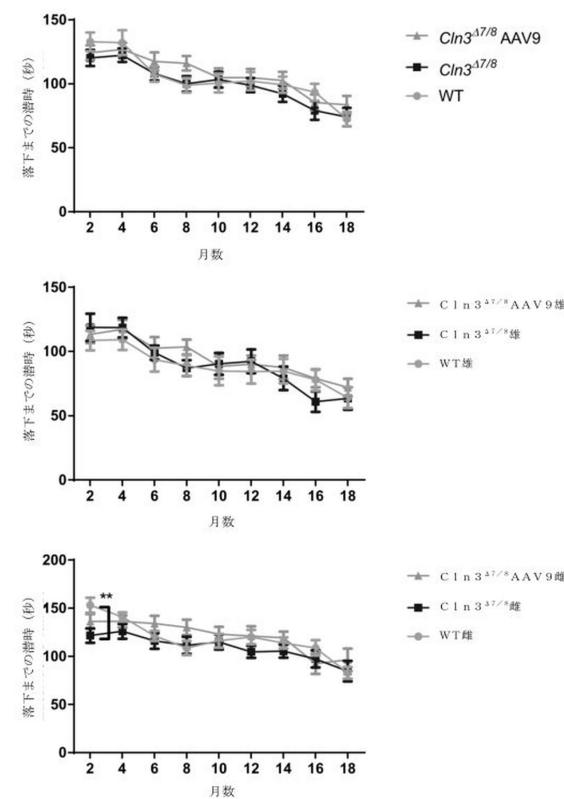
10

20

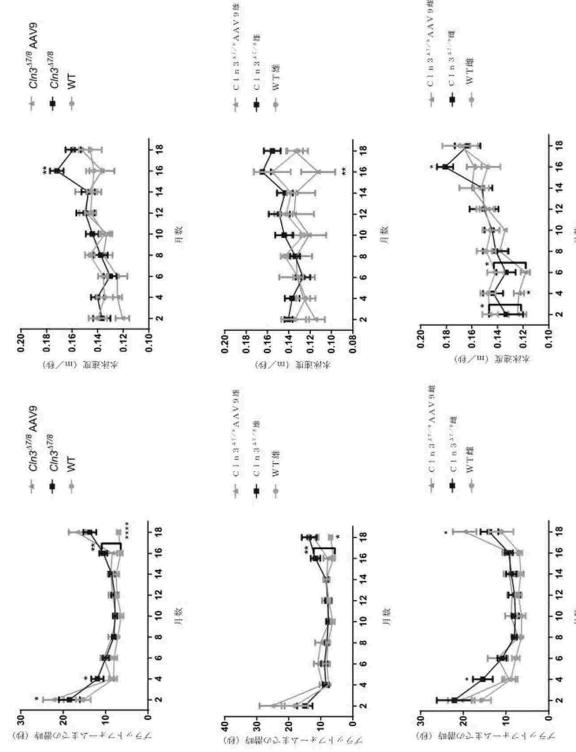
30

40

【図 8】

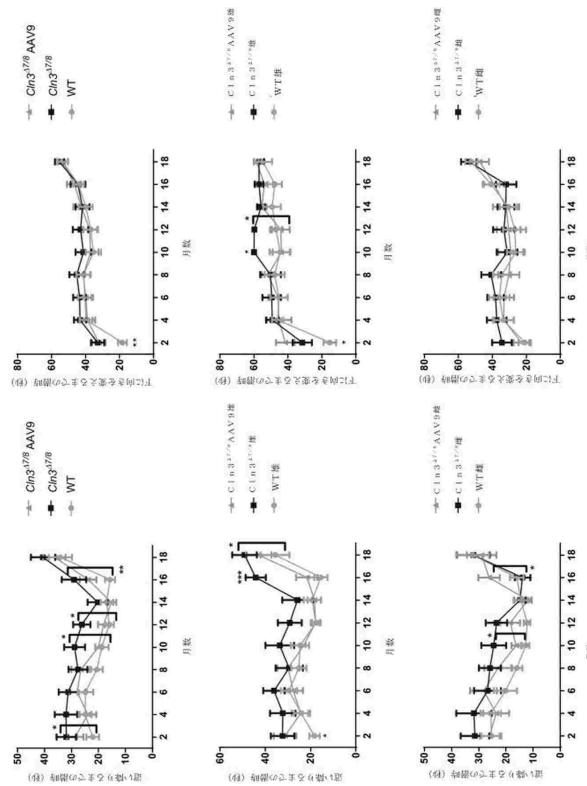


【図 9】

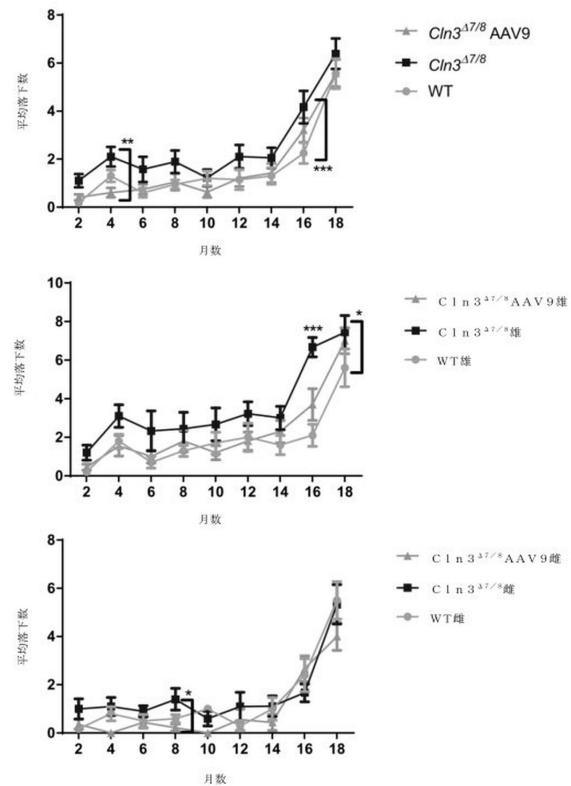


50

【図 10】



【図 11】



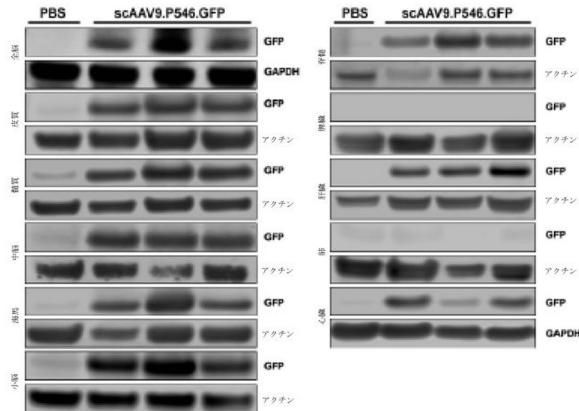
10

20

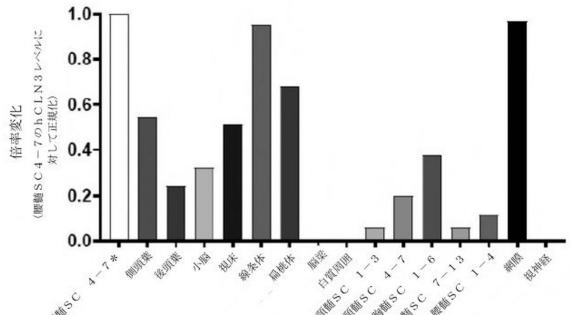
30

40

【図 12】



【図 13】



50

【図14】

(配列番号:4)  
CLN3 - scAAV9.P546.CLN3



【図 15-1】

### 【図 1.5 - 2】

(図 16)

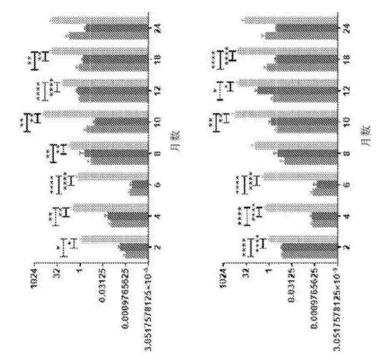
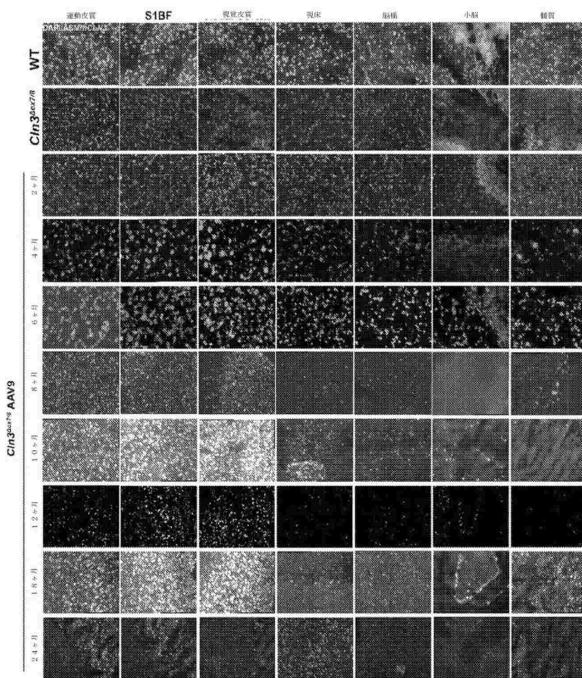
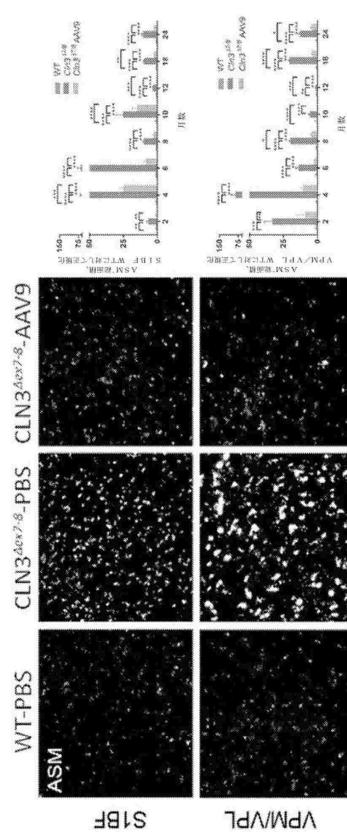


Figure 3 consists of two bar charts. The left chart is for the hippocampus (海馬), and the right chart is for the cortex (大脳皮質). Both charts show the relative expression levels of Cx3cr1 (black bars) and Cx3cr1/pd46 (grey bars) across different ages: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, and 24 months. The y-axis represents the relative expression level, ranging from 1 to 1024. In both charts, Cx3cr1 expression peaks at 2 months and then decreases as age increases. Cx3cr1/pd46 expression is relatively low and stable across all ages.

【図17】



【図18】

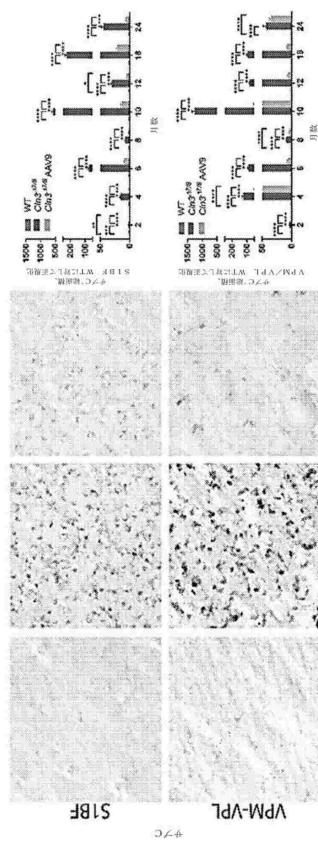


10

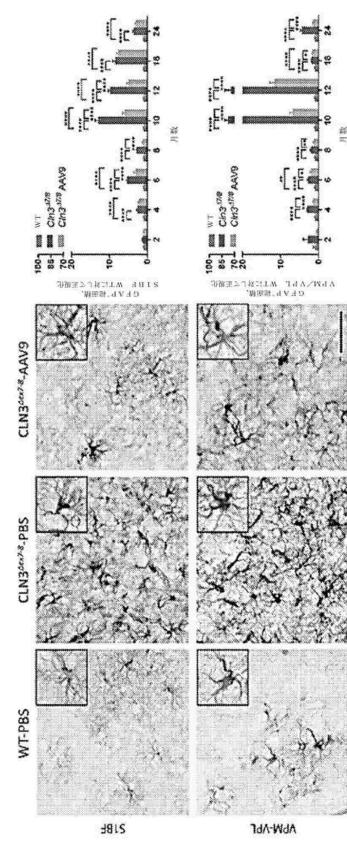
20

30

【図19】



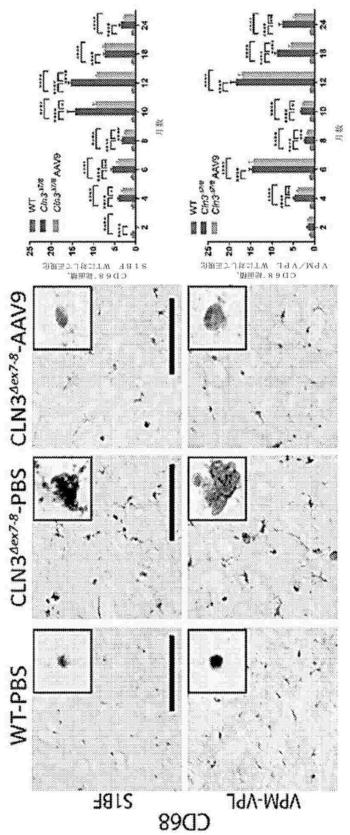
【図20】



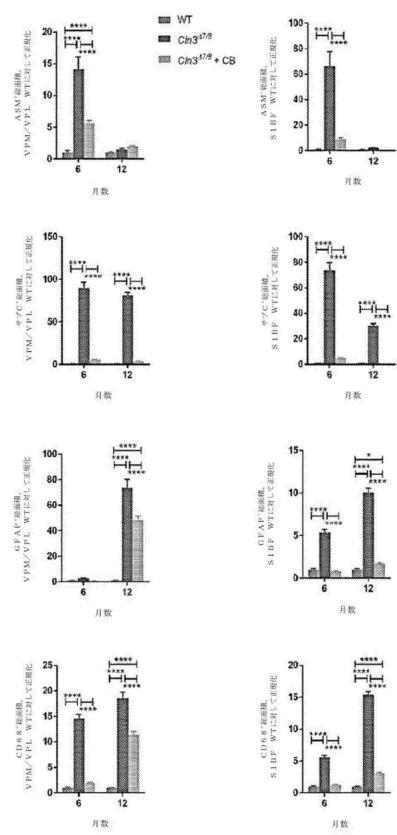
40

50

【図 2 1】



【図 2 2】



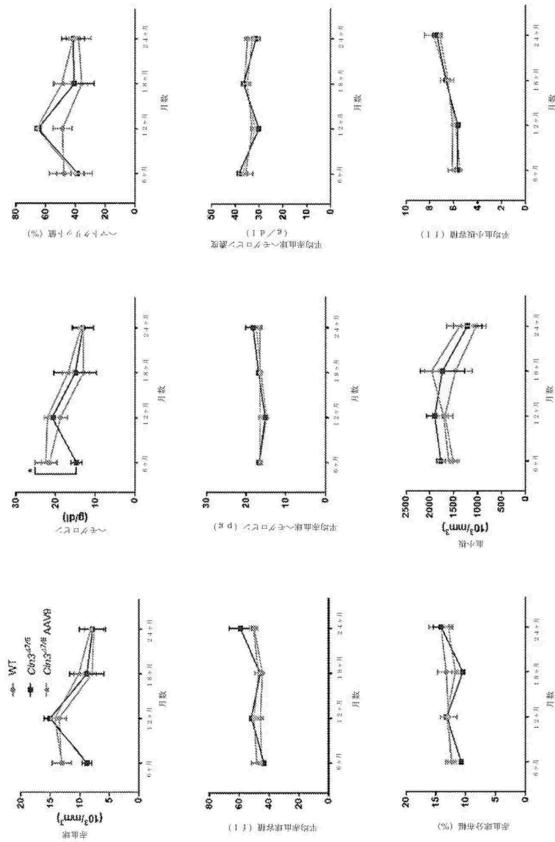
10

20

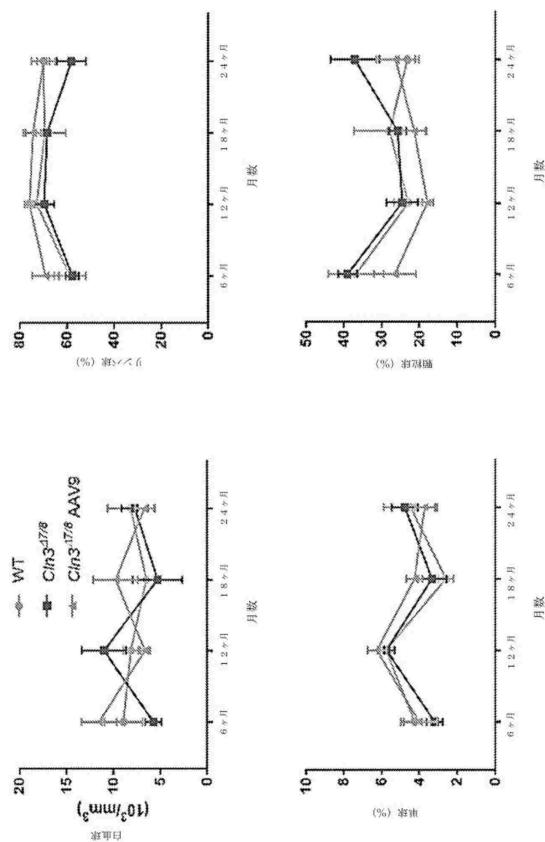
30

40

【図 2 3】

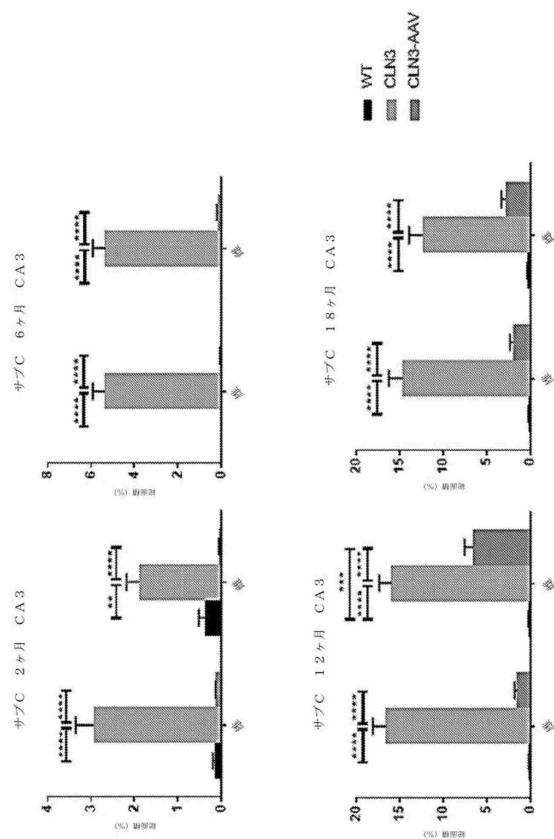


【図 2 4】

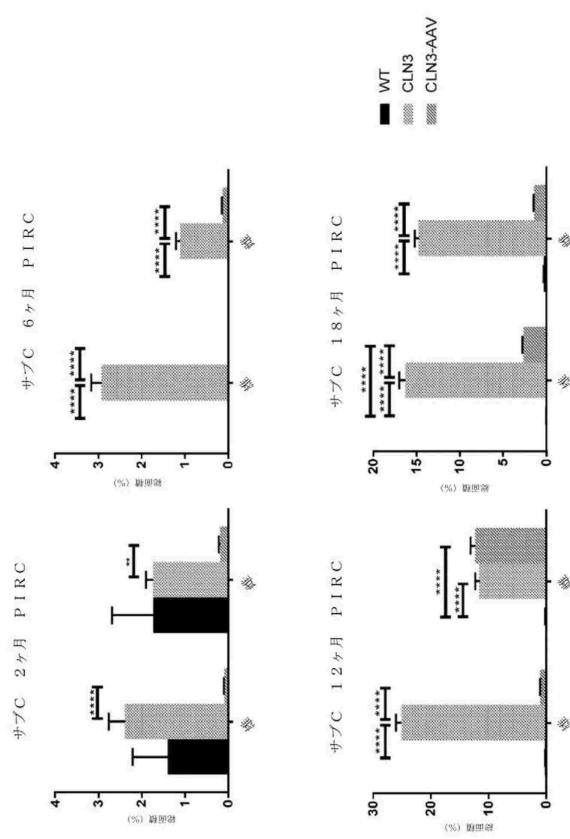


50

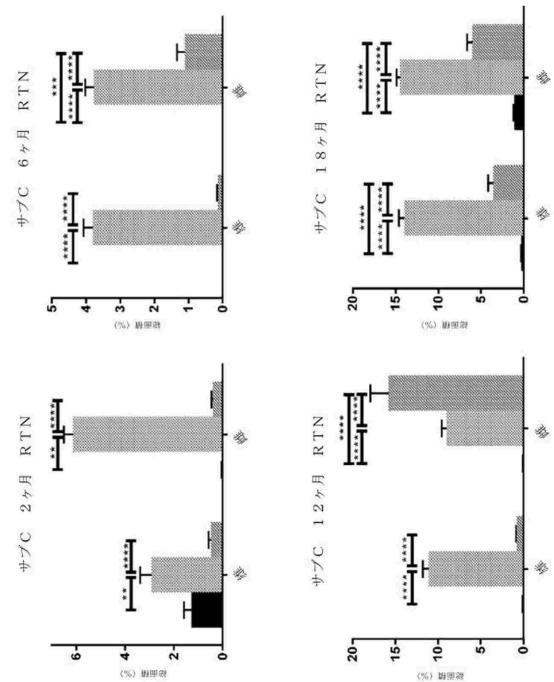
【図 2 5】



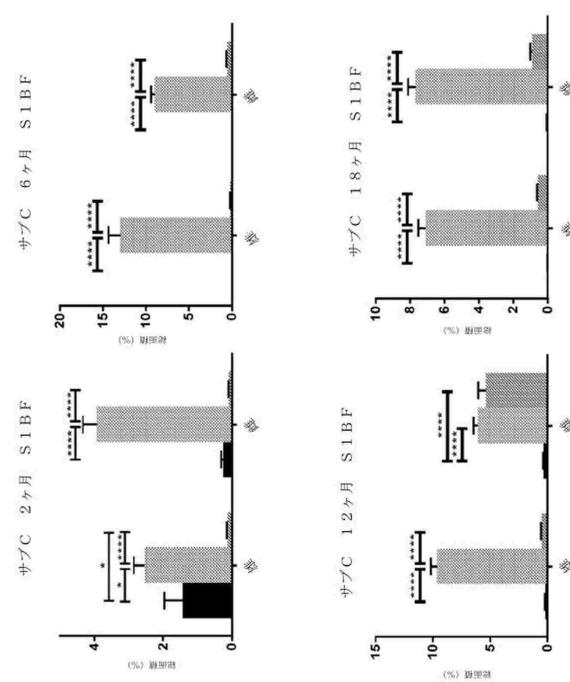
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

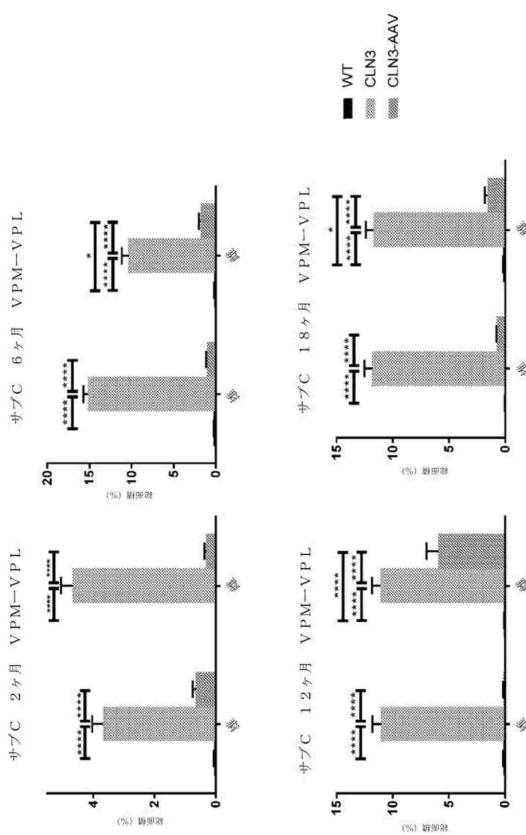
20

30

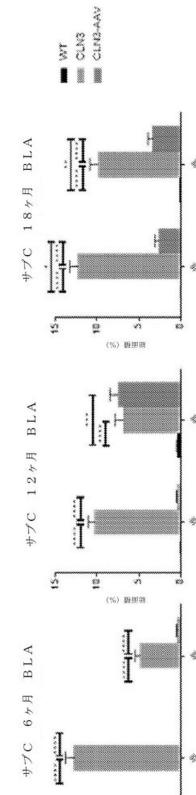
40

50

【図29】



【図30】



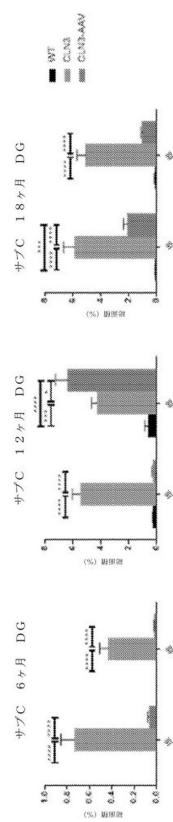
10

20

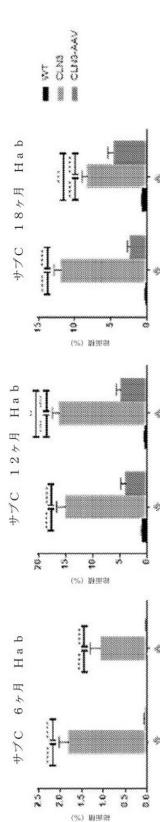
30

40

【図31】

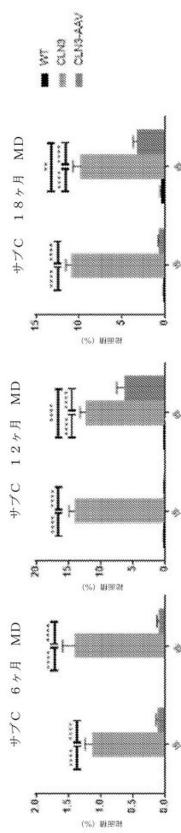


【図32】

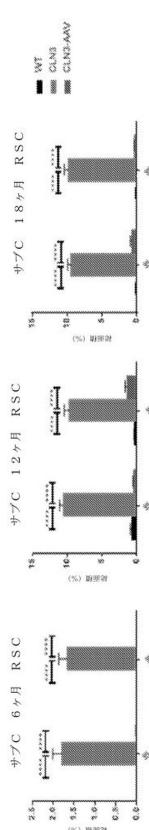


50

【図3-3】



【図3-4】



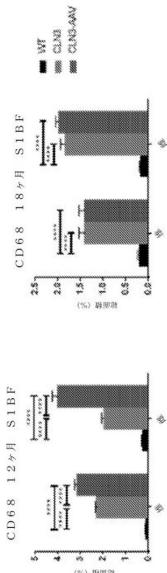
10

20

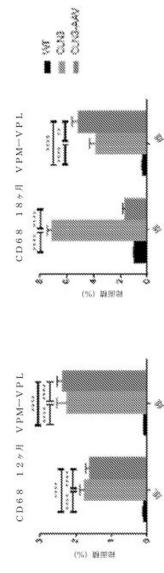
30

40

【図3-5】

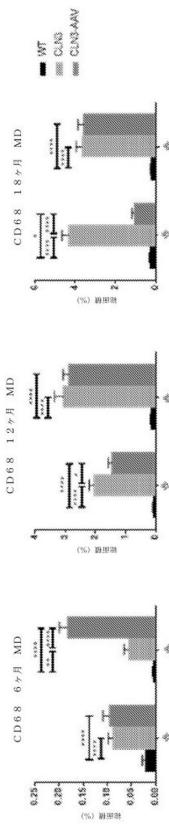


【図3-6】

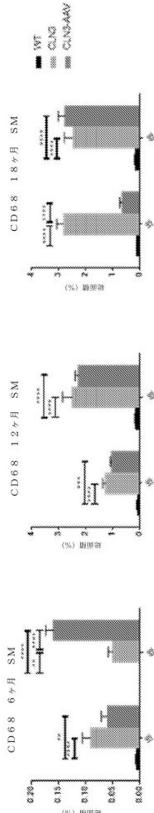


50

【図 3 7】



【図 3 8】



10

20

30

40

50

【配列表】  
0007691367000001.app

---

フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I
A 61 K 38/17 (2006.01)	A 61 K 38/17
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 K 47/10 (2017.01)	A 61 K 47/10
A 61 K 47/18 (2017.01)	A 61 K 47/18
A 61 K 47/02 (2006.01)	A 61 K 47/02
A 61 K 49/04 (2006.01)	A 61 K 49/04 210

## (72)発明者 マイヤー, キャスリン

アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700

## (72)発明者 カスパー, ブライアン ケー.

アメリカ合衆国 オハイオ 43081, ウエスター・ヴィル, ナッシュ アヴェニュー 5922

## (72)発明者 ファウスト, ケビン

アメリカ合衆国 オハイオ 43201, コロンバス, ノース ハイ ストリート 1524, シー・オー オハイオ ステート ファウンデーション

## 審査官 野村 英雄

## (56)参考文献 特表2018-500311 (JP, A)

国際公開第2018/094251 (WO, A1)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

C 12 Q 1/00 - 3/00

Capulus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)