I547288

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I547288 B**

(45)公告日： 中華民國 105 (2016) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：100120296 (22)申請日： 中華民國 100 (2011) 年 06 月 10 日

(51)Int. Cl.： *A61K48/00 (2006.01)* *C12N15/64 (2006.01)*

(30)優先權：2010/06/10 歐洲專利局 EP10382169

(71)申請人：艾斯提夫博士實驗股份有限公司 (西班牙) LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S. A. (ES)

西班牙

巴塞隆納歐都諾瑪大學 (西班牙) UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA (ES)

西班牙

(72)發明人：波斯奇 圖伯 法蒂瑪 BOSCH TUBERT, FATIMA (ES)；阿于索 羅佩茲 愛都爾 AYUSO LOPEZ, EDUARD (ES)；馬索 馬蒂阿斯 艾伯特 RUZO MATIAS, ALBERT (ES)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2006/0104954A1

Fraldi A. et al., Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIA mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. Hum Mol Genet. 2007 Nov 15;16(22): 2693-702. Epub 2007 Aug 27.

Biro J.C. et al., The BlastNP: a novel, sensitive sequence similarity searching method using overlappingly translated sequences. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2004;4:2777-80.

Richard M. et al., Widespread biochemical correction of murine mucopolysaccharidosis type VII pathology by liver hydrodynamic plasmid delivery. Gene Ther. 2009 Jun;16(6):746-56. doi: 10.1038/gt.2009.36. Epub 2009 Apr 9.

Wang B. et al., Gene Therapy with a Retroviral Vector Expressing Canine β-Glucuronidase to Juvenile (7 Week Old) Dogs Improves the Biochemical Manifestations of MPS VII. Molecular Therapy Volume 11, Supplement 1, May 2005.

Arruda VR, Xiao W. It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. J Thromb Haemost, 2007; 5: 12-5.

Royo N.C. et al.,"Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity", Brain Res. 2008 Jan 23;1190:15-22. Epub 2007 Nov 17.

Matalon R. et al, Sanfilippo A syndrome: sulfamidase deficiency in cultured skin fibroblasts and liver. J Clin Invest. 1974 Oct;54(4): 907-12.

審查人員：李家旭

申請專利範圍項數：27 項　　圖式數：9　　共 38 頁

---

(54)名稱

用於治療疾病之載體及序列

VECTORS AND SEQUENCES FOR THE TREATMENT OF DISEASES

(57)摘要

本發明提供新穎序列、基因構築、載體及醫藥組成物，其用於治療疾病，特定而言，用於治療黏多醣症。

The present invention provides new sequences, gene constructions, vectors and pharmaceutical compositions for the treatment of diseases and specially, for the treatment of mucopolysaccharidoses.

公告本

發明專利說明書

中文說明書替換本(105年2月17日)

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：100120296 A61K 48/00 (2006.01)

※ 申請日：100年6月10日 ※IPC 分類：C12N 15/64 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療疾病之載體及序列/VECTORS AND SEQUENCES FOR THE TREATMENT OF DISEASES

二、中文發明摘要：

本發明提供新穎序列、基因構築、載體及醫藥組成物，其用於治療疾病，特定而言，用於治療黏多醣症。

三、英文發明摘要：

The present invention provides new sequences, gene constructions, vectors and pharmaceutical compositions for the treatment of diseases and specially, for the treatment of mucopolysaccharidoses.

四、指定代表圖：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關於載體，其實用於表現感興趣之蛋白質及於基因治療方面之利用。本發明亦有關於載體及核酸序列，其實用於治療黏多醣症(MPS)，且特定而言，用於治療第三型黏多醣症或聖菲利柏氏(Sanfilippo)症候群。

【先前技術】

溶小體係真核細胞之細胞質中的胞器，其為許多之水解酶之貯存處，亦為降解及回收細胞組分之中心。此胞器含有數種水解酶，包括蛋白酶、核酸酶、醣苷酶、脂酶、磷脂酶、磷酸[酯]酶及硫酸酯酶。所有酶皆為酸性水解酶。

溶小體貯積症(LSDs)係由於基因缺損影響一或多種溶小體酶所造成。一般而言這些基因疾病起因於存在溶小體中某特定酶活性缺失。在較小程度上，這些疾病可能因溶小體生物合成中牽涉到之蛋白質缺失所造成。

LSDs就個別言為罕見的，雖然做為一個整體，這些失調在總人口中係相對常見的。所有LSDs相加起來之盛行率大約為每5,000活產有1人。見Meikle P等人著，JAMA 1999年；281期：頁249-254。總人口中的某些群組，例如中歐及東歐猶太人後裔(德裔猶太人)苦於高發生率之LSDs。舉例而言，德裔猶太人族群中患高歇氏病及黑矇性白癡病之盛行率分別為每600活產中1人及每3,900活產中1人。

第三型黏多醣症(MPSIII)，統稱為聖菲利柏氏

(Sanfilippo)症候群，係由於與硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)生成有關的酶之一缺失所造成之LSDs，其導致該酶之病理累積。根據酶之缺失，MPSIII被分類成四個子型。磺醯胺酶(sulfamidase)活性喪失造成子型IIIA且已被報導為最嚴重、最早發作、最短存活期的疾病。MPSIIIA之症狀發生於生命的前幾年內，其特徵為嚴重的神經退化並導致深度智能不足、具攻擊性、過動，及睡眠改變。患者漸進地喪失說話、吞嚥及基本動作協調的能力。除了神經方面症狀，MPSIIIA患者亦苦於非神經性的改變，包括肝脾腫大、骨骼和關節畸形，以及頻繁腹瀉和呼吸道感染。症狀之漸進惡化造成患者在青春期間死亡。見Neufeld E, Muenzer J，"黏多醣症"，"遺傳性疾病的代謝及分子基礎"，(McGraw-Hill Publishing Co., New York：NY, US, 2001， pp. 3421-3452)。

目前沒有MPSIIIA之解藥，因此，現今之治療方法為針對控制該疾病之症狀，以改善患者不佳的生活品質。MPS失調可藉由骨髓移植或酶替代療法(ERT)來治療。這兩種方法有賴於從細胞外介質之溶小體酶內吞作用及經由存在於細胞膜的甘露糖-6-磷酸受器(M6PR)帶至溶小體。然而，已證實骨髓移植對於治療MPSIII患者效果不彰。見Sivakamur P, Wraith J, J. Inherit. Metab. Dis. 1999年；22期：頁849-850。ERT已被廣泛地證實在其他溶小體貯積症中可有效對抗非神經性之貯積，包括MPSI、II及VI。見Harmatz P等人著，J. Mol. Genet. Metab. 2008年；94期：

頁469-475；Muenzer J等人著，Genet. Med. 2006年；8期：頁465-473；及Wraith J等人著，J. Pediatr. 2004年；144期：頁581-588。除了這些治療的高成本，已顯示ERT並不矯正或保存神經功能，其起因於外源提供之酶穿越血腦障壁(BBB)傳遞不足。見Enns G，Huhn S，Neurosurg. Focus 2008年；24期：頁E12。更近期，已證實高劑量ER'T能部分成功清除MPS VII之CNS貯積，可能因為M6PR及甘露糖受器之飽和導致循環系統中蛋白質較長的半衰期。見Vogler C等人著，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005年；102期：頁14777-14782。本研究證實了，長期間循環系統中高濃度之酶與較好的矯正病狀相關。酶之腦內及內CSF傳遞已被證實能有效降低MPS IIIA小鼠之CNS病狀。見Hemsley K等人著，Genes Brain Behav. 2008年；53(2)期：頁161-8；及Savas P等人著，Mol. Genet. Metab. 2004年；82期：頁273-285。然而，此方法因需要多次反覆注射而具高度侵入性，而可能增加腦之損傷及/或感染的風險。

因為當前治療MPSIII的選擇有限，需要有替代的其他方法。基因轉殖可從單一干預提供達到永久產生所喪失之酶的手段。腺相關載體(AAV)係用於許多基因治療應用之快速新興的載體選擇，因為其具高轉導效率且無致病性。AAV載體高效地轉導有絲分裂後細胞，且數種臨床前及臨床研究證實AAV載體中介之基因轉殖的潛力，以有效地驅動用於各種疾病之持續的治療性轉殖基因表現。見Daya

S，Berns K，Clin. Microbiol. Rev. 2008年；21期：頁583-593。

已顯示施用一共表現磺醯胺酶及硫酸酯酶活化劑SUMF1之AAV5載體至新生MPSIIIA小鼠之側腦室可矯正許多神經性及行為方面的改變。見Fraldi A等人著，Hum. Mol. Genet. 2007年；16期：頁2693-2702。然而，MPS患者在出生時鮮少被診斷出來，這表示應發展使於成年期早期的治療性干預。就這方面，以靜脈傳輸一表現磺醯胺酶之慢病毒載體至成年小鼠，使得CNS表現型僅略微改善，可能因為這些載體在活體內轉導表現相對較差。見McIntyre C等人著，Mol. Genet. Metab. 2008年；93期：頁411-418。因此，使用具活體內較高轉導效用之病毒載體，如AAV載體，可能可提供較高的磺醯胺酶循環濃度，其具潛力可改善或矯正神經性病狀。

經由基因治療之MPSIIIA治療需要更有效的載體及解碼磺醯胺酶之序列。亦需要有可加強安全特性的治療此疾病之新穎方法。

【發明內容】

本發明提供用於治療疾病的新穎核苷酸序列，較佳地用於治療黏多醣症(MPS)。因此，本發明之第一態樣係有關於核苷酸序列，其為人類磺醯胺酶(sulfamidase)密碼子最佳化序列，其能以更高速率轉錄更穩定之mRNA，而因此產生高產量之磺醯胺酶酶。酶表現之濃度提高，接著血清磺醯胺酶活性提供，使得由疾病引起的醣胺聚多醣(GAG)

堆積減少。前述序列係SEQ ID NO：1或具有與SEQ ID NO：1至少85%之序列同一性並編碼蛋白質SEQ ID NO：2之序列。

在第二態樣，本發明有關於基因構築，其包含本發明第一態樣之核苷酸序列。

本發明亦提供具血清型9之新穎AAV載體，其可穿過血腦障壁(BBB)並顯示對不同腦部結構更多向性。這使得磺醯胺酶活性專一地在腦中增加，減少GAG堆積而因此改善MPS之神經性症狀。

例如，在施用AAV血清型8及9(AAV8及AAV9)載體至成年MPSIIIA小鼠後，其以肝臟為目標靜脈(i.v.)注射、或以骨骼肌為目標肌內(im)注射、或以中樞神經系統為目標小腦延髓池注射(ic)，以肌內注射傳送載體，磺醯胺酶表現達到之濃度不具有治療性，然而肝導向之方法可產生高濃度之循環磺醯胺酶活性，其矯正了MPSIIIA的體貯積表現型，顯著地改善了與該疾病相關的神經病理。這些結果提供AAV中介之磺醯胺酶基因轉殖在成年MPSIIIA小鼠中，一個與人類臨床情境極相似之疾病模型，之有效性的證據。本案發明人成功地矯正MPSIIIA之體及神經性改變。

又，本發明之AAV載體增加了磺醯胺酶活性，其降低了GAG堆積並改善了患有MPS之個體的臨床結果。一次給藥即足夠，因為位於反向終端重複序列(ITR)間之啟動子及磺醯胺酶核苷酸序列被併入個體之細胞基因體中。因此，

單一非腸道給藥即足以獲得長期效果。

在第三態樣中，本發明有關於一種醫藥組成物，其包含本發明第一態樣之核苷酸序列、本發明之基因構築或表現載體。

在第四態樣中，本發明有關於本發明之核苷酸序列、基因構築、表現載體或醫藥組成物做為藥劑之用途。該藥劑可用於增加體內磺醯胺酶活性，用於酶替代療法，用於基因治療，或用於MPS治療。

【實施方式】

定義

「核苷酸序列」乙詞係指核酸分子，是DNA或RNA，其包括去氧核糖核苷酸或核醣核苷酸。核酸可為雙股、單股，或包括雙股及單股序列兩者之部分。

「百分比序列同一性」乙詞係指候選序列之核苷酸與SEQ ID NO：1之核苷酸同一性之百分比，比對該等序列後以達到最高百分比之序列同一性。百分比序列同一性可由本技術領域中已建立的方法或演算法而測定，如ALIGN或BLAST。

在此百分比序列同一性之計算方法為，在比對SEQ ID NO：1與候選序列後，將相同之核苷酸數除以SEQ ID NO：1中總核苷酸數，再將結果乘以100。

「編碼」乙詞係指決定核苷酸序列如何轉譯成多肽或蛋白質之基因密碼。一序列中核苷酸順序決定了沿著多肽或蛋白質的胺基酸順序。

「蛋白質」乙詞係指折疊成球型的直鏈胺基酸(多肽)。蛋白質可經過轉譯後修飾，如轉換半胱胺酸殘基成3-羰基丙胺酸(oxoalanine)，醣化作用或金屬鍵結。蛋白質醣化作用係指添加共價鍵結至胺基酸鍊之不同的碳水化合物。

「有效量」乙詞係指一物質足以達到所欲目的之量。例如，表現載體能增加磺醯胺酶活性之有效量係為足以減少醣胺聚多醣堆積之量。表現載體於治療疾病或失調之「治療上有效量」係為足以減少或移除該疾病或失調症狀之表現載體量。一給定物質之有效量可依據物質的性質、施用的路徑、接受該物質之動物大小與種類，以及給予物質之目的而不同。每個個案的有效量可由熟習此藝者根據此技術領域中已建立之方法經由經驗而決定。

「個體」乙詞係指任意之動物，較佳為人類或非人類哺乳類，更佳為小鼠、大鼠、其他嚙齒類、兔子、狗、貓、豬、牛、馬或靈長類，應更佳為人類。

本發明詳細說明

在一較佳具體實施例中，本發明第一態樣之序列具有與SEQ ID NO：1至少85%之序列同一性，該SEQ ID NO：1編碼蛋白質SEQ ID NO：2。較佳地，該序列同一性係至少87%。更佳地，該序列同一性係至少90%。又更佳地，該序列同一性係至少95%。甚至更佳地，該序列同一性係至少98%。最佳地，該序列同一性係至少99%。在一更佳具體實施例中，本發明第一態樣序列為核苷酸序列SEQ ID NO：1。在另一具體實施例中，本發明有關於核苷酸序列

SEQ ID NO：1或此序列之具生物活性之變異體。具生物活性之變異體包括具有與SEQ ID NO：1相同生物或性及至少85%序列同一性之分子。生物活性係指，核苷酸序列SEQ ID NO：1可被轉錄成具更佳穩定性之信使RNA並因此展現高轉錄效率，因此能表現高濃度之活性人類磺醯胺酶。

第二態樣之一較佳具體實施例中，該基因構築包含與SEQ ID NO：1至少85%、較佳地87%、90%、95%、98%、99%序列同一性之核苷酸序列。在一更佳具體實施例中，該基因構築包含核苷酸序列SEQ ID NO：1。基因構築係核酸分子，其中不同的元素已以特定及所欲方式被設計。這些元素可為，除了其他外，複製序列、控制序列、解碼序列，多重選殖序列或重組序列。在一較佳具體實施例中，該基因構築係載體。載體係用來傳送遺傳物質至細胞內之核酸分子。除了前述遺傳物質，載體亦可含有不同功能元素，包括用於轉錄之控制元素，如啟動子或操縱子，轉錄因子結合區域或加強子，及用於起始或終結轉譯之控制元素。載體包括，但不限於：質體、黏質體、病毒、嗜菌體、重組表現匣及轉位子。

本發明第二態樣之一較佳具體實施例中，基因構築係用於轉譯及轉錄感興趣基因之載體，通常由啟動子所控制。啟動子係核苷酸序列，其控制轉譯感興趣基因。啟動子係被運作連接至所欲基因。「運作連接(operably linked)」係指啟動子序列相對於感興趣基因之功能關聯及位置，例

如，若啟動子或加強子影響編碼序列之轉錄，該啟動子或加強子即為運作連接至該序列。一般而言，經運作連接之啟動子係與感興趣序列係相鄰的。然而，加強子並不必須與感興趣序列相鄰，即能控制其表現。

在一較佳具體實施例中，該表現載體包含肝特異性人類α-1抗胰蛋白酶啟動子及SEQ ID NO：1。

較佳之載體係一種表現載體，其包含肝特異性人類α-1抗胰蛋白酶啟動子，該啟動子序列為SEQ ID NO：3。因此，本發明第二態樣之一具體實施例係一種表現載體，其包含肝特異性人類α-1抗胰蛋白酶啟動子，該啟動子序列為SEQ ID NO：3，其適於治療MPS。

另一較佳載體係一種表現載體，其包含肝特異性人類α-1抗胰蛋白酶啟動子及本發明第一態樣之核苷酸序列。本發明提供新穎載體用於治療疾病，較佳地用於治療黏多醣症(MPS)。

另一較佳載體係一腺相關載體。在一較佳具體實施例中，該腺相關載體被用來產生腺相關粒子，其中血清型係1、2、5、7、8或9。在一更佳具體實施例中，該血清型為9。腺相關載體係一載體，其源自於細小病毒家族(*Parvoviridae*)之腺相關病毒(AAV)之基因體。AAV基因體由單股去氧核醣核酸(ssDNA)構成。AAV感染人類，但不非病原(亦即，不導致疾病)。他們可染感分裂及非分裂細胞，且其向性隨血清型而改變。血清型係將病毒依其衣殼抗原而分類。在本文中，「向性(tropism)」係指不同病毒

演化成傾向以特定宿主物種、或該等物種中特定細胞型為目標的方向。AAV之血清型，其由其衣殼蛋白質所決定，定義了病毒之向性並使其進入一特定細胞型。腺相關載體粒子之產生將於下文描述。

在一較佳具體實施例中，該表現載體序列係SEQ ID NO：4。

第三態樣之一較佳具體實施例中，該醫藥組成物係由非腸道給藥來施用。非腸道給藥係指醫藥組成物之施用路徑為注射或輸入。非腸道給藥之實例為靜脈、皮下、小腦延髓池及肌內注射。較佳地，該醫藥組成物係由靜脈或小腦延髓池內(intracisternal)給藥來施用。

在另一較佳的具體實施例中，該醫藥組成物包含本發明之治療上有效量之核苷酸序列、基因構築或表現載體。

本發明之核苷酸序列、基因構築、表現載體或醫藥組成物可用做為藥劑。在一較佳具體實施例中，他們被用於增加體內磺醯胺酶活性。

在另一較佳的具體實施例中，本發明之核苷酸序列、基因構築、表現載體或醫藥組成物可用做為藥劑，其用於酶替代療法或基因治療，較佳地基因治療。「基因治療」係指將感興趣之遺傳物質(例如，DNA或RNA)傳送至宿主以治療或預防遺傳性獲得性疾病或病狀。該感興趣之遺傳物質編碼在體內需要其產生之產物(例如，蛋白質、多肽、肽或功能RNA)。例如，感興趣之遺傳物質可編碼具治療價值之酶、激素、受體或多肽。本案發明人提出一種新穎

之基因治療方法，可用於治療MPSIIIA且比現存技術更具療效。此方法係基於表現磺醯胺酶之AAV載體。酶替代療法(ERT)係一種醫療處理，其在於取代特定酶不足或缺失之患者體內之酶。該酶通常以重組蛋白質被製造並施用至患者。

在又一具體實施例中，本發明之核苷酸序列、基因構築、表現載體或醫藥組成物較佳地被用為治療黏多醣症，更佳地為第三型黏多醣症或聖菲利柏氏症候群，較佳地經由基因治療。在第三型黏多醣症症候群中，本發明治療對子型A特別有效果。

在一附加具體實施例中，用於基因治療MPS之醫藥組成物在於以非腸道投予載體，其包含與SEQ ID NO：1具90%序列同一性之核苷酸序列。

在另一附加具體實施例中，載體係藉由肌內注射被用來基因治療以治療溶小體貯積症(LSD)，該載體包含CMV早期加強子/雞β-肌動蛋白(CAG)啟動子及一與SEQ ID NO：1具95%序列同一性之核苷酸序列。

在另一附加具體實施例中，載體係被用來做一藥劑以經由靜脈施來治療MPS，該載體係一具血清型1之AAV載體，其包含CAG啟動子及一與SEQ ID NO：1具87%序列同一性之核苷酸序列。

在另一附加具體實施例中，醫藥組成物以非經腸道方式施用以治療一疾病，該醫藥組成物包含一與SEQ ID NO：1具98%序列同一性之核苷酸序列及一普存啟動子。

本發明已經一般術語說明，而在參照下述實例後將更易於理解，該等實例僅為例示之用而無意限制本發明。

一般程序

1. 重組AAV載體

此處所述之AAV載體係藉由三次轉染所構築。用於製備載體之所需材料為：HEK293細胞(表現E1基因)、提供腺病毒功能之輔助質體，從血清型2提供AAV ***rep基因***以及從所欲血清型(亦即AAV1，AAV2，AAV5，AAV7，AAV8，AAV9)提供***cap基因***之輔助質體，以及最後，具有ITRs及感興趣之構築的骨架質體。

為了產生磺醯胺酶-表現AAV載體，在普存雜合CAG啟動子(其含有雞β-肌動蛋白啟動子及CMV加強子)或肝特異性人類α-1抗胰蛋白酶(hAAT)啟動子之控制下，將鼠類磺醯胺酶之cDNA殖入AAV骨架質體。

使用三個已修飾之質體，藉由無輔助病毒轉染HEK293細胞來產生載體。見Matsushita T等人著，Gene Ther. 1998年；5期：頁938-945及Wright J等人著，Mol. Ther. 2005年；12期：頁171-178。在裝著添有10%FBS(胎牛血清)之DMEM(達爾伯克改良伊格爾培養基)的轉瓶(RB)(Corning, Corning, NY, US)中將細胞培養至70%匯合並接著與下列質體共轉染：1)帶有表現匣之質體，該表現匣之側有病毒ITRs(已如上述)；2)帶有AAV rep2及對應cap(cap1及cap9)基因之輔助質體；及3)帶有腺病毒輔助功能之質體。藉由兩個連續氯化銫梯度使用標準實驗計畫或如前所述之最佳

化實驗計畫來純化載體。見Ayuso E等人著，Gene Ther. 2010年；17期：頁503-510。載體相對PBS被透析、過濾、以qPCR(定量聚合酵素鏈反應)滴定並儲存於-80℃直到被使用。

2.動物

使用同基因型C57Bl/6磺醯胺酶-缺乏小鼠菌落(MPSIIIA)。見Crawley A等人著，腦Res. 2006年；1104期：頁1-17。感染MPSIIIA及健康控制組小鼠係自異型基礎自交而得。以PCR分析從尾剪下之樣本之基因體DNA，其放大了含有突變的序列，及隨後以MspA1I限制酶分解，來測定基因型，如前所述。見Bhattacharyya R等人著，Glycobiology 2001年；11期：頁99-103。讓小鼠任意採食標準飲食(Panlab，Barcelona，ES)並維持在12小時日-夜循環條件下(於9：00 A.M.開始光照)。

3.施用載體及蒐集樣本

就靜脈傳送AAV載體方面，經由尾靜脈注射總劑量10^{12}載體基因體之適當AAV載體至2個月大MPSIIIA動物。就肌內注射方面，以氯胺酮(100 mg/kg)及甲苯噻嗪(xylacine)(10 mg/kg)之混合物麻醉2個月大MPSIIIA動物，注射總劑量10^{12}載體基因體之適當AAV載體至後肢的6條肌肉中(兩腿之四頭肌、腓腸肌及脛骨前肌)。在10個月大的時候，麻醉小鼠並接著以10 ml之PBS快速灌流(transcardially perfused)以從組織完全清除血液。蒐集整個腦及多個體組織(包括肝、脾、胰、腎、肺、心、骨骼肌及睾丸)，將其

冰凍於液態氮中並儲存於-80℃，或浸在福馬林中用以接續的組織學分析。

4. RNA分析

使用TriPure分離試劑(Roche Diagnostics, Barcelona, ES)從骨骼肌及肝臟樣本獲得總RNA，並以北方墨點法分析。將墨點與鼠類磺醯胺酶探針混成，藉由以Ready-to-Go DNA Labelling Beads(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, US)隨機引動以^{32}P-dCTP標記。

5. 磺醯胺酶活性及醣胺聚多醣定量

在水中以超聲波破壞肝臟、骨骼肌及腦樣本，並以4-甲基繖形酮-衍生之熒光物質(Moscerdam Substrates, Oegstgeest, NL)試驗上清液中之磺醯胺酶活性，如前所述。見Karpova E等人著，J. Inherit. Metab. Dis. 1996年；19期：頁278-285。以相對蛋白質總量來正常化磺醯胺酶活性濃度，使用Bradford蛋白質試驗(Bio-Rad, Hercules, CA, US)來量化。

就醣胺聚多醣(GAG)定量方面，將組織樣本稱重並以蛋白酶K分解，藉由離心及過濾淨化萃取物。以軟骨素4-硫酸鹽為標準，使用Blyscan硫酸化醣胺聚多醣套組(Biocolor, Carrickfergus, County Antrim, GB)來測定組織萃取物及尿液中之GAG濃度。正常化組織中GAG濃度至濕組織重量，正常化尿液中GAG濃度至肌酸酐濃度，以特定套組(Horiba ABX, Irvine, CA, US)測量。

6. 組織學分析

組織被固定在福馬林中12-24小時，包埋於石蠟中並藉由熱引導抗原決定基擷取(heat-induced epitope retrieval)切片(檸檬酸緩衝液，pH 6)。就免疫組織化學偵測LAMP1方面，在4℃將石蠟切片與稀釋100倍之大鼠抗-LAMP1抗體(1D4B；Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, US)培養整夜，接著與稀釋300倍之生物素化兔抗-大鼠抗體(Dako, Glostrup, DK)培養。藉由將切片與稀釋100倍之ABC-過氧化酶染色套組(Thermo Scientific, Waltham, MA, US)培養放大LAMP1訊號，並藉著使用3,3-胺聯苯胺(Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, US)做為色素原來顯現。以光學顯微鏡(Eclipse E800；Nikon, Tokyo, JP)獲得明視野影像。就微小白蛋白及鈣結合蛋白免疫染色方面，於4℃將石蠟切片與稀釋2000倍之兔抗-鈣結合蛋白D28k(Swant)或與稀釋100倍之兔抗-微小白蛋白(Swant, Marly, CH)培養整夜。之後，將樣本與生物素化山羊抗-兔IgG(Vector Labs., Burlingame, CA, US)培養，接著與抗生蛋白鏈菌素(streptavidin)-Alexa 488(1：100，分子探針，Invitrogen, Carlsbad, CA, US)培養，並以TOPRO-3染細胞核。以共軛焦顯微鏡(Leica Microsystems，Heidelberg，DE)獲得影像。

就雙重免疫染色LAMP1及Mac2而言，先於4℃將切片與與稀釋100倍之大鼠抗-LAMP1抗體培養整夜，接著與稀釋300倍之生物素化兔抗-大鼠抗體培養，接著與抗生蛋白鏈菌素(streptavidin)-Alexa 488(1：300)培養。之後，將切片

與稀釋50倍之兔抗-Mac2培養，接著與稀釋300倍生物素化山羊抗-兔培養，接著與抗生蛋白鏈菌素(streptavidin)-Alexa 568(1：300；分子探針，Invitrogen, Carlsbad, CA, US)培養。最後，以Hoechst(1：100；Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, US)染細胞核。

7.西方墨點法分析

在蛋白質裂解緩衝液中均質化對半的小腦。於10% (wt/vol) SDS-PAGE跑10毫克蛋白質，轉至聚偏二氟乙烯膜上，並於4℃與抗鈣結合蛋白(Swant, Marly, CH)及α-微管蛋白(Abcam Cambridge, MA, US)之第一抗體培養整夜。使用標記山葵過氧化酶之豬抗-兔抗體(Dako, Glostrup, DK)及ECL Plus西方墨點法偵測試劑(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, US)來進行偵測。

8.透射式電子顯微分析

f以過量異氟醚(isofluorane)(Isofluo，Labs, Esteve, Barcelona, ES)犧牲小鼠，並以1 ml of 2.5%戊二醛及2%三聚甲醛經下腔靜脈灌流。一小部分(大約1mm^3)之肝臟側葉及小腦小山側葉被切片並於4℃在同固定劑中培養2小時。在冷卡可酸鹽緩衝液中清洗後，切片被後固定於1%四氧化鋨，並在水狀醋酸鈾醯中染色，接著經由一梯度乙醇系列脫水，並包埋於環氧樹脂中。使用檸檬酸鉛染來自樹脂塊之超薄切片(600-800Å)並在透射電子顯微鏡(H-7000；Hitachi, Tokyo, JP)下實驗。

9.統計分析

所有結果皆以平均數±標準誤差表示。使用t-test或單向ANOVA做成統計比較。若$P<0.05$，則被認為是統計上顯著的。

實例S

實例1

肌內傳送AAV1-CAG-mu-SFMD-WPRE

注射總劑量10^{12}載體基因體之AAV1-CAG-鼠類磺醯胺酶-WPRE載體至2個月大雄性與雌性MPSIIIA小鼠後肢的6條肌肉中(兩腿之四頭肌、腓腸肌及脛骨前肌)。

在施用8個月後，經注射之肌肉展現了高濃度的源自載體之磺醯胺酶表現及活性，但在血清中觀察到很低濃度的磺醯胺酶活性(6-7%控制組小鼠)，此暗示了分泌自骨骼肌之低效率。見圖1A及1B。此外，在這些小鼠的肝臟中觀察到極低但顯著的源自載體之磺醯胺酶表現，此指出，在注射的當下，載體從骨骼肌漏出進入循環系統並轉變了肝臟。雖然僅達到低濃度的循環磺醯胺酶活性，仍觀察到肝臟中GAG堆積之矯正，且在其他某些體組織中(脾，心，胰)有顯著的降低，不過在其他體組織中(腎，肺)則無。見圖1C。在腦中無達到GAG貯積之減少。

實例2

肌內傳送AAV8-CAG-mu-SFMD-WPRE

注射總劑量10^{12}載體基因體之AAV8-CAG-鼠類磺醯胺酶-WPRE載體至2個月大雄性與雌性MPSIIIA小鼠後肢的6條肌肉中(兩腿之四頭肌、腓腸肌及脛骨前肌)。

在施用8個月後，經注射之肌肉展現了與健康控制組動物相似的磺醯胺酶活性。見圖2A。在血清中觀察到低濃度的磺醯胺酶活性(10-15%控制組小鼠)。見圖2B。亦觀察到載體漏至肝臟的情形，因為在肝臟中觀察到源自載體之磺醯胺酶表現及活性，甚至比以肌內AAV1處理之小鼠還高濃度。見實例1。在肝臟及脾臟中GAG堆積被矯正，且觀察到在其他體組織(心臟，胰臟，膀胱)中減少更多，但腎及肺仍有大量無被矯正的。見圖2C。在腦中無達到GAG貯積之減少。

實例3

靜脈傳送AAV8-CAG-mu-SFMD-WPRE

經由尾靜脈注射總劑量10^{12}載體基因體之AAV8-CAG-鼠類磺醯胺酶-WPRE載體至2個月大MPSIIIA小鼠。

在施用8個月後，經處理之雄性展現了肝臟內磺醯胺酶活性，其濃度相似於控制組小鼠，但雌性為4倍低。見圖3A。一致的，循環磺醯胺酶活性在雄性中高(濃度相似於控制組小鼠)，而在雌性中低(25%控制組小鼠)。見圖3B。這些高濃度之循環磺醯胺酶可矯正在肝臟、心臟、脾臟、胰臟及膀胱中GAG堆積，並在肺中也顯著地降低其堆積，但腎中則無。見圖3C，肝臟GAG定量。在腦中無觀察到GAG貯積之減少。

實例4

靜脈傳送AAV8-hAAT-mu-SFMD

經由尾靜脈注射總劑量10^{12}載體基因體之AAV8-hAAT-

鼠類磺醯胺酶載體至2個月大MPSIIIA小鼠。

在施用8個月後，經處理之雄性展現了肝臟內磺醯胺酶活性，其濃度為高達控制組動物之500%。在雌性個體中，肝臟磺醯胺酶濃度達到與控制組個體相同的濃度。見圖4A。循環磺醯胺酶活性，一致的，雄性中比雌性中較高(雄性500%，相對於雌性160%)。見圖4B。這些超生理(supraphysiological)濃度的循環磺醯胺酶可矯正所有體器官中之GAG堆積，包括腎。見圖4C，肝臟GAG定量。

在腦中，經處理之雄性低濃度磺醯胺酶活性，並降低了GAG堆積。見圖5A及B。當以電子顯微鏡檢驗，經處理之雄性之小腦浦肯頁細胞展現了較低電子密集的內含物。見圖5C。以AAV8-hAAT-mu-SFMD載體靜脈處理達到了體病理狀態的矯正，但僅改善MPSIIIA小鼠之神經退化特性。

實例5

靜脈傳送AAV9-CAG-mu-SFMD

經由尾靜脈注射總劑量10^{12}載體基因體之AAV9-CAG-mu-SFMD載體載體至2個月大MPSIIIA小鼠。

雄性與雌性小鼠皆展現了高濃度循環磺醯胺酶(雄性為控制組之500%，雌性為150%)，其有效的矯正兩個性別的所有體組織。此外，鑒於AAV血清型9之腦轉導的高效率，觀察到在兩個性別的腦中顯著的磺醯胺酶活性，其有效地矯正所有腦區域的GAG貯積。見圖6A及6B。MPSIIIA之特徵，神經發炎(星膠質細胞增生(astrogliosis)及微膠質細胞增生(microgliosis))，在以AAV9處理小鼠中被完全的

正常化。此外，以AAV9處理小鼠比起無治療動物在旋轉滾輪測試中表現較佳。見圖6C。

實例6：小腦延髓池傳送不同血清型AAV-CAG-GFP-WPRE

為了評估腦中不同AAV血清型被施用至腦脊髓液的向性，帶有GFP報導基因(CAG-GFP-WPRE構築)之AAV2、5、7、8及9載體的5×10^{10}載體基因體被施用至MPSIIIA小鼠小腦延髓池。在所有不同血清型中，AAV9載體具有最高的轉導效率，因為AAV9在腦中極遠區域(亦即嗅球、下視丘、大腦皮質、小腦、腦幹)中介星狀細胞及神經元之轉導。見圖7。

實例7

小腦延髓池傳送AAV9-CAG-mu-SFMD

注射總劑量$5x10^{10}$載體基因體之AAV9-CAG-mu-SFMD載體至2個月大被麻醉MPSIIIA動物之小腦延髓池中，總量為5 μl。

在施用3個月後，被處理動物之整個腦皆達到GAG堆積之完全矯正。見圖8。源自載體之磺醯胺酶表現亦被發現於被處理動物之肝臟中，此暗示了，在小腦延髓池傳送後，某些載體到達循環系統並被肝臟所吸收。與此結果一致，GAG堆積在肝臟中亦被正常化。

實例8

靜脈傳送AAV9-CAG-co-hu-SFMD(密碼子最佳化人類磺醯胺酶)

為了降低載體之施用劑量，人類磺醯胺酶之密碼子使用被最佳化。此方法的目標為穩定化磺醯胺酶mRNA並增加其轉譯，因此有利於從相同載體劑量達到較高產量。

AAV9-CAG-hu-co-SFMD載體之10^{12}病毒基因體(vg)被經尾靜脈施用至2個月大MPSIIIA小鼠。相較於非最佳化基因，在肝臟中獲得至少3倍量的磺醯胺酶濃度。見圖9。

上文提到的所有文獻皆在此以引用方式全文併入。

雖然前述發明已以明確理解之目的詳盡地敘述，熟悉此一行業技藝人士依本發明之教示，可明顯知道各種形式及細節的變化是可在不離本發明及所附之申請專利範圍之範疇下被做成的。

【圖式簡單說明】

圖1，肌內傳送AAV1-CAG-mu-SFMD-WPRE，(A)控制組、MPS組及被治療組小鼠之骨骼肌磺醯胺酶活性，(B)控制組、MPS組及被治療組小鼠之血清內磺醯胺酶活性，(C)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內醣胺聚多醣(GAG)定量，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤差，¥ P<0.05相對於控制組，#P<0.05相對於雄性，*P<0.05相對於無治療MPS，ND：未檢出；

圖2，肌內傳送AAV8-CAG-mu-SFMD-WPRE，(A)控制組、MPS組及被治療組小鼠之骨骼肌磺醯胺酶活性，(B)控制組、MPS組及被治療組小鼠之血清內磺醯胺酶活性，(C)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內醣胺聚多醣(GAG)定量，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤

差，¥ P<0.05相對於控制組，#P<0.05相對於雄性，*P<0.05相對於無治療MPS，ND：未檢出；

圖3，靜脈傳送AAV8-CAG-mu-SFMD-WPRE，(A)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內磺醯胺酶活性，(B)控制組、MPS組及被治療組小鼠之血清內磺醯胺酶活性，(C)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內醣胺聚多醣(GAG)定量，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤差，¥ P<0.05相對於控制組，#P<0.05相對於雄性，*P<0.05相對於無治療MPS，ND：未檢出；

圖4，靜脈傳送AAV8-hAAT-mu-SFMD，(A)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內磺醯胺酶活性，(B)控制組、MPS組及被治療組小鼠之血清內磺醯胺酶活性，(C)控制組、MPS組及被治療組小鼠之肝臟內醣胺聚多醣(GAG)定量，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤差，¥ P<0.05相對於控制組，#P<0.05相對於雄性，*P<0.05相對於無治療MPS，ND：未檢出；

圖5，在靜脈傳送AAV8-hAAT-mu-SFMD後，MPSIIIA小鼠之神經性病狀的改善，(A)控制組、MPS組及被治療雄性之不同腦部位中(以簡圖描繪)磺醯胺酶活性，(B)同樣腦部位中醣胺聚多醣(GAG)定量，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤差，¥P<0.05相對於控制組，*P<0.05相對於無治療MPS，ND：未檢出，(C)小腦中浦肯頁細胞之透射電子顯微鏡圖，無治療MPSIIIA小鼠之浦肯頁神經元體質被填充許多大型的電子密集內含物(白箭號)，而在iv-

AAV8-hAAT治療雄性中，發現較少且較小的內含物(黑箭號)；

圖6，靜脈AAV9-CAG-mu-SFMD，(A)控制組、MPS組及被治療組小鼠之不同腦部位中(以簡圖描繪)磺醯胺酶活性，(B)同樣腦部位中醣胺聚多醣(GAG)定量，(C)藉由加速旋轉滾輪測試來評估運動功能，數值為每組4至8隻小鼠之平均數±標準誤差，¥P<0.05相對於控制組，*P<0.05相對於無治療MPS；

圖7，在小腦延髓池傳送AAV2、5、7、8及9-CAG-GFP-WPRE載體後之腦轉導，在所有經分析的區域，AAV9展現了最高效率之轉導，，BS：腦幹，CB：小腦，OB：嗅球，HT：下視丘，CX：大腦皮質；

圖8，小腦延髓池傳送AAV9-CAG-mu-SFMD載體，控制組、MPS組及被治療組小鼠之不同腦部位中(以簡圖描繪)醣胺聚多醣(GAG)定量。數值為每組3隻小鼠之平均數±標準誤差，¥P<0.05相對於控制組，*P<0.05相對於無治療MPS；

圖9，靜脈傳送AAV9-CAG-hu-co-SFMD，控制組小鼠、MPS小鼠及以AAV9-CAG-mu-SFMD(非最佳化基因)或AAV9-CAG-hu-co-SFMD(最佳化基因)治療之小鼠之肝臟內磺醯胺酶活性；

【主要元件符號說明】

無。

105. 2. 17 修正本

七、申請專利範圍：

1. 一種核苷酸序列，其包含SEQ ID NO：1。
2. 如申請專利範圍第1項之核苷酸序列，其編碼SEQ ID NO：2的蛋白質。
3. 一種基因構築，其包含申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列。
4. 如申請專利範圍第3項之基因構築，其中該基因構築係載體。
5. 如申請專利範圍第4項之基因構築，其中該載體係表現載體。
6. 如申請專利範圍第5項之基因構築，其中該載體係腺相關病毒載體(AAV)。
7. 如申請專利範圍第5項之基因構築，其包含運作連接到SEQ ID NO：1之CAG啟動子。
8. 如申請專利範圍第7項之基因構築，其為質體AAV-CAG-co-hu-SFMD，其中AAV代表AAV基因，CAG代表CAG啟動子及co-hu-SFMD代表SEQ ID NO：1之密碼子最佳化人類磺醯胺酶序列。
9. 如申請專利範圍第5項之基因構築，其包含運作連接到SEQ ID NO：1之SEQ ID NO：3的hAAT啟動子。
10. 一種載體，其包含如申請專利範圍第3項至第9項中任一項之基因構築或如申請專利範圍第1項或第2項之核苷酸序列。
11. 如申請專利範圍第10項之載體，其中該載體為AAV載體

及AAV之血清型為1、2、5、7、8或9。

12. 如申請專利範圍第11項之載體，其中該血清型為9。

13. 如申請專利範圍第12項之載體，其中該載體包含運作連接到SEQ ID NO：1之CAG啟動子。

14. 如申請專利範圍第11項之載體，其中該血清型為8或9，且該載體包含運作連接到SEQ ID NO：1之SEQ ID NO：3的hAAT啟動子。

15. 如申請專利範圍第12項之載體，其中該載體包含運作連接到SEQ ID NO：1之SEQ ID NO：3的hAAT啟動子。

16. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項中任一項之基因構築或如申請專利範圍第10項至第15項中任一項之載體。

17. 如申請專利範圍第16項之醫藥組成物，其係用於非腸道給藥。

18. 如申請專利範圍第16項之醫藥組成物，其包含治療上有效量之如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項中任一項之基因構築或如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體。

19. 如申請專利範圍第18項之醫藥組成物，其包含治療上有效量之如申請專利範圍第13項之載體，且用於小腦延髓池內(intracisternal)給藥。

20. 一種如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項中任一項之基因構築、如申請專利

範圍第10項至第15項任一項之載體或如申請專利範圍第16至第19項任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製備供基因治療之藥劑。

21. 一種如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項之基因構築、如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體或如申請專利範圍第16至第19項任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製備增加體內磺醯胺酶活性之藥劑。

22. 一種如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項任一項之基因構築、如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體或如申請專利範圍第16至第19項任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製備供酶替代療法之藥劑。

23. 一種如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項之基因構築、如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體或如申請專利範圍第16至第19項任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製備治療黏多醣症之藥劑。

24. 一種用於製造或如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體粒子之方法，其包含下列步驟：

i)提供第一載體，其包含側有AAV反向終端重複序列(ITR)的SEQ ID NO：1，運作連接到SEQ ID NO：1之CAG啟動子或SEQ ID NO：3之hAAT啟動子；第二載體，其包含AAV *rep*基因和AAV *cap*基因；及第三載體，

其包含腺病毒輔助功能基因；

ii)以步驟i)之載體共同轉染細胞；

iii)培養步驟ii)之轉染細胞；及

iv)從步驟iii)之培養中純化載體粒子。

25. 一種細胞，其包含如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列或如申請專利範圍第3至第9項之基因構築。

26. 一種製造如申請專利範圍第16項至第19項任一項之醫藥組成物之方法，其包含將如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項之基因構築；或如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體與至少一醫藥上可接受之媒劑或載劑合併。

27. 一種如申請專利範圍第1或第2項之核苷酸序列、如申請專利範圍第3至第9項之基因構築、如申請專利範圍第10項至第15項任一項之載體或如申請專利範圍第16至第19項任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製備治療第IIIA型黏多醣之藥劑。