



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201837170 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：107106483

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl. : CI2N7/01 (2006.01)

CI2N15/44 (2006.01)

(30)優先權：2017/02/28 美國
 2017/05/10 美國
 2017/09/20 美國
 2018/01/17 美國

62/464,753
 62/504,293
 62/560,834
 62/618,443

(71)申請人：賓州大學委員會 (美國) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US)
 美國

美商健生生物科技有限公司 (美國) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
 美國

(72)發明人：林貝立斯 瑪麗亞 P LIMBERIS, MARIA P. (AU) ; 崔堤寇瓦 安娜 P TRETIKOVA, ANNA P. (US) ; 威爾森 詹姆士 M WILSON, JAMES M. (US) ; 納索 麥可 NASO, MICHAEL (US) ; 寇克曼 裴斯特 KOLKMAN, JOOST (NL) ; 福立森 羅伯特 FRIESEN, ROBERT (NL)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：22 共 298 頁

(54)名稱

新穎 A A V 媒介的流感疫苗

NOVEL AAV-MEDIATED INFLUENZA VACCINES

(57)摘要

提供一種具有 AAV 裂殼之非複製型重組腺相關病毒 (adeno-associated associated virus(rAAV))，其具有包裝於 AAV 裂殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複序列及至少一個編碼四種不同的免疫球蛋白區域(a)、(b)、(c)及(d)之核酸序列。此 rAAV 表現的免疫球蛋白有用於提供抗 A 型流感及 B 型流感之被動免疫。本文亦描述含有此 rAAV 的組成物。提供接種病患抗流感的方法。

A non-replicating recombinant adeno-associated associated virus (rAAV) having an AAV capsid having packaged therein a vector genome which comprises AAV inverted terminal repeat sequences and at least one nucleic acid sequence encoding four different immunoglobulin regions (a), (b), (c) and (d) is provided. The rAAV-expressed immunoglobulins are useful for providing passive immunization against influenza A and influenza B. Also described herein are compositions containing the rAAV. Methods of vaccinating patients against influenza are provided.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

新穎 AAV 媒介的流感疫苗

NOVEL AAV MEDIATED INFLUENZA VACCINES

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種新穎 AAV 媒介的流感疫苗。

【先前技術】

發明之背景

【0002】流感感染係美國第七大致死原因，相當於每年有約 49,000 人死亡，為全球幾乎 500,000 人死亡中一個顯著比例。疫苗並非總是有效地保護人類免受流感。此外，新型流感大流行的出現仍為一種威脅，其可造成生命相當的損失及全球經濟瓦解。於水鳥中之大量 A 型流感病毒庫代表了持續的大流行威脅，如 1997 年出現的高病原性禽流感 H5N1 型及 2013 年出現於人類族群中的 H7N9 (J. Liu et al., Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309, 1206 (2005); H. Chen et al., Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436, 191-192 (2005); 及 R. Gao et al., Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 368, 1888-1897 (2013))。估計每年流感流行的經濟負擔約為

870 億美元。此費用之一半以上用於涵蓋幾乎 100 萬病患所需的醫院照護，其中 70% 為老年病患 (> 65 歲)。

【0003】腺相關病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 係一種無套膜、二十面體之單股 DNA 病毒，直徑 20-26 nm。自 1980 年代初首次以野生型 AAV 作為基因遞送載體的基因工程以來，重組 AAV 已成為對於慢性疾病之基因治療中有效且安全的臨床應用上有希望的基因遞送媒介物。AAV 血清型 2 (AAV2) 為第一個應用於基因轉移的 AAV。已經顯現 AAV2 載體之幾種限制性，包括低轉導 (transduction) 效率、於人類中和抗體 (Nabs) 的高血清盛行率 (seroprevalence) 及潛在的破壞性 T 細胞對殼體 (capsid) 的反應。

【0004】用於遞送抗流感抗體的理想 AAV 殼體將具有低的人血清盛行率，能夠賦予高而穩定的轉基因表現，對中樞神經系統或生殖腺具有最小的生物分布，並具有有利的免疫學概況。選擇的殼體應容易以高產率製造且具有臨床安全性的經歷。考慮選擇的 AAV 殼體包括彼等已於基因治療臨床試驗中測試的 AAV 殼體：AAV1、2、6、8、9 及 rh10。先前的工作證明 AAV9 有效標定呼吸道，且可於預先存在的 AAV9 特異性 Nab 之設定中被有效地重新投予 (Limberis and Wilson, 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103, 35, 12993-12998 (2006))。最近，吾人證明表現 FI6 抗體的 AAV9 載體保護小鼠及雪貂免受各種 H1N1 及 H5N1 流感病毒株之臨床分離株之致死性空氣傳播的攻擊 (Limberis, et al, Sci Transl Med.

2013 May 29 ; 5(187) : 187ra72)。

【0005】仍需求具有增強的性能特徵之合適的替代性流感疫苗。

【發明內容】

發明之摘述

【0006】提供編碼抗流感病毒構築體之非複製型重組腺相關病毒(rAAV)。該 rAAV 具有載體基因體包裝於 AAV 膜體中。本文提供之組成物包含用於自 rAAV 表現的下列抗流感免疫球蛋白區域之組合的載體基因體編碼序列。第一免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 1 之胺基酸序列：(Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)。於某些具體實施例，替代 SEQ ID NO : 1，可選擇使用一候補的免疫球蛋白區域，其為具有 I110M 突變之 SEQ ID NO : 1 之胺基酸序列，其作為 SEQ ID NO : 30 之 aa 24 至 aa 147 而再現。第二免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 2 之胺基酸序列：Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)。第三免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 3 之胺基酸序列：(Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Ala Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)。第四免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 4 之胺基酸序列：(Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp
Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser)。

【0007】於某些具體實施例，本文所述之超過一個免疫球蛋白區域係於融合構築體(fusion construct)中，其進一步包含 Fc 區域，其中可選擇地有連接此四種免疫球蛋白區域及 Fc 區域之連結序列。

【0008】於某些具體實施例，該載體基因體包含選自由下列組成的群組之核酸序列：SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：20、SEQ ID NO：19；SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：31 及 SEQ ID NO：32。於某些具體實施例，提供了包含載劑(carrier)、稀釋劑或賦形劑及至少如本文所述之非複製型 rAAV 的原液(stock)之組成物。該組成物可以調配用於鼻內或肌肉內或靜脈內投予。

【0009】於某些具體實施例，提供一種免疫人類病患對抗流感之方法，其涉及投予有效量之包含如本文所述之 rAAV.JAb、rAAV.hJAb、或 rAAV.JAb210a 之組成物。該組成物可包含一劑約 10^9 GC 至約 7×10^{13} GC 之 rAAV.JAb、rAAV.hJAb、或 rAAV.JAb210a。於某些具體實施例，選擇 AAVhu68 膜體。於其它具體實施例，提供一產品，其包含容器及包含如本文所述 rAAV.JAb、rAAV.hJAb 或 rAAV.JAb210a、可選擇地具有稀釋劑之組成物，及投予說明書。

【0010】於上述具體實施例之目前較佳變體，rAAV

具有 AAVhu68 膠體。於另一具體實施例，rAAV 具有 AAV9 膠體。於又另一具體實施例，rAAV 具有 AAV1 膠體。

【0011】於某些具體實施例，本文提供之 rAAV.JAb 及含有其之組成物有用於接種或免疫人類病患抗流感。

【0012】於某些具體實施例，rAAV.JAb 或含有其之組成物之用途係提供於接種或免疫人類病患抗流感。

【0013】本發明之此等及其它優點由下列發明之詳細說明將顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1A 提供顯示 AAVhu68 的 vp1 膠體蛋白質之胺基酸序列 (SEQ ID NO : 16，比對中標記為 hu.68.VP1)，與 AAV9 (SEQ ID NO : 17)、AAVhu31 (SEQ ID NO : 34，比對中標記為 hu.31) 及 AAVhu32 (SEQ ID NO : 35，比對中標記為 hu.32) 的比對。與 AAV9、AAVhu31 及 AAVhu32 比較，於 AAVhu68 中發現兩個突變 (A67E 及 A157V) 係關鍵的且於圖 1A 中圈出。

圖 1B-1D 提供編碼 AAVhu68 的 vp1 膠體 (比對中標記為 hu.68.VP1) 之核酸序列與 AAV9、AAVhu31 (比對中標記為 hu.31) 及 AAVhu32 (比對中標記為 hu.32) 之比對。

圖 2A-2B 顯示評估表現 hJAb 的 AAV1、AAV9 及 AAVhu68 輽體對小鼠適應 A 型流感 (PR8) 之致死攻擊的保護效果的結果。於圖 2A，6 週齡雌性 BALB/c 小鼠鼻內給予表現 hJAb 之 AAV1、AAV9 或 AAVhu68 輽體的

10^9 個基因體拷貝 (genome copies, GC) (AAV1.hJAb, 正方形; AAV9.hJAb, 圓形; AAVhu68.hJAB, 直立的三角形; 及未處理過的 (Naïve), 倒三角形), 於 CB7 啓動子 (即, AAV.CB7.hJAb 等) 之轉錄控制下。7 日後 (此處註記為第 0 日) 以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊小鼠並每日秤重。基於攻擊日之小鼠體重計算體重減輕百分比。於圖 2B, 如 Kaplan-Meier 圖所描繪, 當小鼠出現緊迫或其體重下降 $>30\%$ 時將小鼠安樂死。

圖 3A-3B 顯示評估表現 hJAb 的 AAV1、AAV9 及 AAVhu68 載體對小鼠適應的 B 型流感 (B/Lee/40) 的致死性攻擊的保護效力的結果。圖 3A 顯示 6 週齡雌性 BALB/c 小鼠的結果, 其給予鼻內 10^9GC 之表現 hJAb 的 AAV 載體 (AAV1.hJAb, 正方形; AAV9.hJAb, 圓形; AAVhu68.hJAb, 直立的三角形, 及未處理過的, 倒三角形) 7 日後 (此處註記為第 0 日) 以 5LD_{50} 之 B/Lee/40 攻擊並每日秤重。基於攻擊日之小鼠體重計算體重減輕百分比。圖 3B 顯示小鼠當其出現窘迫時或其體重下降 $>30\%$ 時安樂死的結果, 如 Kaplan-Meier 圖所描繪。

圖 4 提供於支氣管肺泡灌洗液 (BALF) 中 AAVhu68 媒介的 hJAb 表現的形態。六週齡雌性 BALB/c 小鼠鼻內 (IN) 紿予表現 hJAb 的 AAVhu68 輽體, 於劑量範圍由 10^9GC 至 10^{11}GC 。7 日後犧牲小鼠, 並收取 BALF 藉由蛋白質 A ELISA 測定 hJAb 濃度。

圖 5A 及 5B 顯示 AAVhu68.CB7.JAb210a 的 MED 用於有效預防 A 型流感 (PR8) 的測定。六週齡雌性 BALB/c

小鼠給予 IN AAVhu68.CB7. JAb210a 載體，於劑量範圍 3×10^8 GC 至 10^{10} GC，並於 7 日後(此處註記為第 0 日)以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊並每日秤重。基於攻擊日之小鼠體重計算體重減輕百分比並作圖於圖 5A。圖 5B 描繪存活百分比。在無論載體劑量如何的攻擊下，所有小鼠皆存活。

圖 6A 及 6B 顯示 AAVhu68.CB7.JAb210a 的 MED 用於有效預防 B 型流感 (B/Lee/40) 的測定。6 週齡雌性 BALB/c 小鼠給予 IN AAVhu68.CB7. JAb210 載體，於劑量範圍由 3×10^8 GC 至 10^{10} GC 且於 7 日後(此處註記為第 0 日)以 5LD_{50} 之 B/Lee/40 激發並每日秤重。基於攻擊日之小鼠體重計算體重減輕百分比並作圖於圖 6A。圖 6B 描繪存活百分比。在無論載體劑量如何的攻擊下，所有小鼠皆存活。

圖 7A-7C 顯示 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a-媒介的對 A 型流感 (PR8) 的預防的快速啓動。圖 7A 提供顯示 6 週齡 雌 性 BALB/c 小 鼠 接 受 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 及載體處理的小鼠組以 5LD_{50} 之 PR8 於一日、二日、三日或七日後攻擊的時間表。圖 7B 係顯示於載體投予後不同時間點攻擊動物之體重百分比(%)變化的線形圖。每日秤重經攻擊的動物，如由 x 軸上的資料點表示。基於攻擊日之小鼠體重計算體重減輕百分比。圖 7C 描繪 PR8 攻擊後的存活百分比。此等資料顯示所有小鼠接受 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體的所有小鼠皆於攻擊下存活，而不管載體投劑及 5LD_{50} 之 PR8 的攻擊之間的時間間隔。

圖 8A-8D 說明 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a-媒介的對 B 型流感 (B/Lee/40) 的預防的快速啓動。圖 8A 為顯示 6 週齡雌性 BALB/c 小鼠接受 10^9 或 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 且小鼠之組於一日、二日、三日或七日後以 $5LD_{50}$ 之 B/Lee/40 攻擊的時間表並每日秤重。圖 8B 顯示給予 10^9 GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 的小鼠，基於攻擊日之小鼠體重計算的體重減輕百分比。圖 8C 顯示所有小鼠於攻擊後存活，而不管載體投劑及 B/Lee/40 攻擊之間的時間間隔。圖 8D 顯示了給予 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 的小鼠，基於攻擊日小鼠重量計算的體重減輕百分比。無論載體給藥及 B/Lee/40 攻擊之間的時間間隔如何，所有小鼠皆存活。

圖 9A-9F 顯示了血清循環的 AAVhu68 中和抗體 (NAb) 對 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a-媒介的針對 PR8 致死性攻擊的預防之有效性的影響。初次暴露於 AAVhu68.CB.LacZ 載體 (給予而誘導 NAb 成 AAVhu68) 後約 30 日，6 週齡雌性 BALB/c 小鼠組以各種量之預存在的血清-循環的 AAVhu68-特異性 NAb 紿予 IN 10^9 GC (圖 9A)、 3×10^9 GC (圖 9B)、及 10^{10} GC (圖 9C-9F) 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體，於 7 日後 (此處註記為第 0 日) 以 $5LD_{50}$ 之 PR8 攻擊小鼠並每日秤重。基於感染日的體重計算重量百分比。

圖 10A-10C 顯示血清-循環 AAVhu68NAb 對 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a-媒介的預防針對 PR8 的致命攻擊 (第 90 日) 的有效性的影響。初次暴露於

AAVhu68.CB.LacZ 載體(給予而誘導 NAb 成 AAVhu68)後 90 日，雌性 BALB/c 小鼠組以各種量之預存在的血清-循環 AAVhu68-特異性 NAb 約予 IN 10^9 GC(圖 10A)、 3×10^9 GC(圖 10B)、或 10^{10} GC(圖 10C) 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體，於 7 日後(此處註記為第 0 日)以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊小鼠並每日秤重。基於感染日的體重計算重量百分比。

圖 11 描繪於小鼠中表現 hJAb 的 AAVhu68 載體的生物分布概況。給予 6 週齡雌性 BALB/c 小鼠 IN AAVhu68.CB7.hJAb 載體，劑量範圍從 10^{11} GC(高)至 10^9 GC(低)，並於 7 日後屍體剖檢。收取組織(肺、肝、脾、心臟及腦)用於生物分布分析。虛線表示試驗背景。對於每個組織，從左到右的五條表示分別以 10^{11} GC、 3×10^{10} GC、 10^{10} GC、 3×10^9 GC 及 10^9 GC 處理的小鼠所收集的數據。當使用高劑量之 AAVhu68 載體(圖 11 及 12)，於肺以外的組織中偵測到 AAVhu68 載體基因體。

圖 12A 和 12B 提供於小鼠中表現 JAb210a 的 AAVhu68 載體的生物分佈形態。給予 6 週齡的雌性 BALB/c 小鼠高劑量之 10^{11} GC 的 IN AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體。30 日後，將小鼠屍體剖檢。收取組織(肺、脾、氣管、腎、肝、心臟、腦、卵巢及眼睛)進行生物分佈分析。虛線表示試驗背景。圖 12A 顯示數據作為每個二倍體細胞的 GC，而圖 12B 顯示數據作為每 μgDNA 的 GC。當使用高劑量之 AAVhu68 載體時(圖 11 和 12)，在肺以外的組織中檢測到 AAVhu68 基因

體。圖 12A 顯示大部分載體基因體沉積發生於肺中，其次は脾。腎、肝及心臟中存在極低量的 AAVhu68 載體基因組(圖 12A)。此外，腦、卵巢或眼睛中 AAVhu68 基因體的量太接近背景以至於不能允許數據的準確解釋(圖 12A)。於圖 12B 中，對於肺及脾(左)，描繪 GC/ μ gDNA 的尺度是 10^0 - 10^6 ，而非呈現氣管、腎、肝、心臟、腦、卵巢、眼睛及視神經的條形圖的尺度，其為 10^0 - 10^4 。

圖 13A 和 13B 證實 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 於老鼠(9-18 個月齡)中的保護性形態。BALB/c 小鼠接受 10^9 GC 或 3×10^9 GC 的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a，並於 7 日後以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊。圖 13A 係顯示於載體投予後 7 日攻擊小鼠之體重百分比(%)變化的線形圖。每日秤重小鼠，如由 x 軸上的資料點表示。基於流感攻擊日之體重計算體重減輕百分比。圖 13B 描繪 PR8 攻擊後的存活百分比。此等數據顯示，接受 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 的所有小鼠在 PR8 的 5LD_{50} 攻擊下存活。未處理過的小鼠於第 8 日安樂死。

圖 14A 至 14C 顯示 AAV-表現的 MD3606 於以流感病毒攻擊的小鼠中的預防功效。在以致死劑量(5LD_{50})的小鼠適應的 H1N1(A/波多黎各(Puerto Rico)/8/34-MA)(圖 14A)、小鼠適應的 H3N2(A/香港/1/68-MA)(圖 14B)或小鼠適應的 B(B/Lee/40-MA)病毒(圖 14C)攻擊前 7 日鼻內以指定劑量的 AAV9.MD3606 載體[表示為基因體拷貝(GC)]處理的 BALB/c 小鼠之存活曲線(頂部)及體重減輕(底部)。

圖 15 提供 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載體基因體之示意圖。

圖 16 提供如實施例 16 中所述的載體基因體質體之示意圖。

圖 17A 至 17B 提供了 AAV 轉基因質體之示意圖。圖 17A 提供 AAV2/hu68 反式包裝質體 pAAV2/hu68(trans packaging plasmid pAAV2/hu68)的線性表示。於圖 17B 中，用卡那黴素 (kanamycin) 抗性基因代替 pAAV2/hu68(p0065) 中的氨苄青黴素 (ampicillin) 抗性基因，得到 pAAV2/hu68.KanR(p0068)。

圖 18A 至 18B 提供腺病毒輔助質體之示意圖。圖 18A 提供通過中間體 pAdΔF1 及 pAdΔF5 自親源質體 pBHG10 衍生的輔助質體 pAdΔF6。於圖 18B 中，以卡那黴素抗性基因代替 pAdΔF6 中的氨苄青黴素抗性基因，得到 pAdΔF6(Kan)。藉由 Qiagen Genomic Services 進行 DNA 質體定序證實此三種腺病毒基因的同一性。DNA 分析顯示與三種腺病毒 5 型基因區域 (GenBank 登錄號 AF369965) 具有 100% 的同源性。

圖 19A 至 19B 提供如實例 16 中所述之製造程序流程圖。

圖 20 顯示 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG-媒介的 Rag KO 小鼠預防針對 A 型流感攻擊的作用。Rag KO 小鼠接受 10^{10} GC 的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG (以圓形註記)，並於 7 天後以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊小鼠，並每日稱重。由於第 8 天的漸進性體重減輕，未處理過的小鼠 (倒

三角形)被安樂死。

圖 21A 至 21B 顯示以流感的第二次攻擊 Rag KO 小鼠之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 媒介的預防。以 5LD_{50} 之 PR8 攻擊存活的載體處理的 Rag KO 小鼠以 5LD_{50} 之 B/Lee/40 再次攻擊，並且每日稱重。未處理過的小鼠(三角形)由於在第 8 日進行式的體重減輕而被安樂死。陽性對照小鼠(圓形)係給予 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載體的小鼠，且於以 5LD_{50} 之 B/Lee/40 攻擊 7 日後；所有小鼠於攻擊下存活。於正方形描繪了載體處理的小鼠於 A 型流感病毒暴露之前歷經 B/Lee/40 攻擊(PR8，圖 20)。

圖 22 提供獼猴中表現恒河獼猴甲型胎兒蛋白(rhesus alpha fetoprotein, rhAFP)的 AAV9 輽體的生物分佈形態。給予動物總劑量為 $2 \times 10^{13} \text{GC}$ 之 AAV9.CB7.rhAFP，以直接液體滴注(圓形)或經由 MAD NasalTM(藍色方塊)，並於 99 日後屍體剖檢。收取組織用於生物分佈分析。試驗背景為 25 個基因體拷貝/500ng 組織 DNA。

【實施方式】

【0015】本發明提供者為重組載體，其為活體外表現抗流感抗體構築體且有用於提供抗 A 型流感及/或 B 型流感感染之被動免疫。於較佳具體實施例，該載體為複製缺陷的重組腺相關病毒(rAAV)，具有新穎的分化體 F 蛋白體(clade F capsid)，本文中稱為 AAVhu68。

【0016】於某些具體實施例，表現 rAAV 的抗體(Ab)

構築體展現抗 A 型及/或 B 型流感病毒之中和活性。於某一具體實施例，本發明之 Ab 構築體防止 A 型或 B 型流感病毒感染宿主細胞至少 99%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 45%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20%、或至少 10%，相對於不存在 Ab 構築體時該流感病毒對宿主細胞之感染。例如可以如本文所述測量抗體媒介的中和活性。測量中和活性的可選擇的試驗描述於例如 WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance，日內瓦：世界衛生組織，2005，2002.5 版。例如可以如本文所述測量抗體媒介的中和活性。可選用的測量中和活性之試驗例如描述於 WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance，日內瓦：世界衛生組織，2005，2002.5 版。通常，依據本發明之結合分子具有 1000nM 或更低之中和活性，較佳為 100nM 或更低，更佳為 10nM 或更低，甚至更佳為 1nM 或更低，如於活體外測定的病毒中和試驗 (virus neutralization assay，VNA)。

【0017】於某些較佳的具體實施例，提供了其中複製缺陷腺相關載體表現四種抗流感免疫球蛋白域中的每一種之組成物，該抗流感免疫球蛋白域被設計為提供針對 A 型流感及 B 型流感株的免疫力。於某些具體實施例，所有四種免疫球蛋白域由單一 rAAV 輽體原液 (single rAAV vector stock) 表現。於此具體實施例，該單一 rAAV 輽體原液可含有單順反子表現盒 (monocistronic

expression cassette) 或 雙順反子表現盒 (bicistronic expression cassette)。於其它具體實施例，該免疫球蛋白域由多於 rAAV 載體原液表現。於此具體實施例，該 rAAV 可具有單順反子或雙順反子表現盒。

【0018】於一具體實施例，rAAV 輽體原液含有載體基因體，其中如本文所述的免疫球蛋白域之一個、兩個、三個或四個被表現為融合蛋白。此種融合蛋白可包括免疫球蛋白 Fc 區域及/或鉸鏈(hinge)區域，其中可選擇地存有連接四個免疫球蛋白區域之兩個或更多個的連結序列。可選擇地，免疫球蛋白域與 Fc 區域及/或鉸鏈區域之間可以存在連結序列。連結序列可以緊鄰於第一域(區域)的 C 端及第二域(區域)的 N 端，用於分離兩個、三個或四個域(domain)或區域(region)。可選擇長度約 1 至 20 個胺基酸的任何合適的序列，但其長度較佳為 3 至 18 個胺基酸，或約 5 至約 12 個胺基酸。多個連結序列可以存在於單個編碼的蛋白質序列中，且此等可被獨立地選擇。於一具體實施例，至少一個連結序列為 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 7)。

【0019】於某些具體實施例，表現的免疫球蛋白或免疫球蛋白融合蛋白含有訊息肽，其於宿主細胞中引導表現的蛋白質。可選擇地，訊息肽可來自免疫球蛋白外源的來源。下列例說明人類介白素-2 訊息肽之使用。然而，可選擇另一種合適的訊息肽，例如人或病毒。於一具體實施例，訊息肽的胺基酸序列於 SEQ ID NO: 6 中再現。

【0020】於某些具體實施例，兩個免疫球蛋白區域連

接至第一 Fc 以形成第一鏈，另外兩個免疫球蛋白區域連接至第二 Fc 以形成第二鏈。此種表現盒構築體通常於兩條鏈的編碼序列之間含有 F2A 或 IRES。

【0021】於某些具體實施例，四個免疫球蛋白區域於單個開放讀碼框(open reading frame)中與 Fc 區域連接。於一具體實施例，融合構築體包含 SEQ ID NO : 30 之胺基酸序列。

【0022】鑑於下列域的描述，本文提供的四種免疫球蛋白區域之此等及其它構型，對於本項技術領域中具通常知識者而言將係顯而易見的。

【0023】抗體「Fc 區域」係指可結晶片段，其係與細胞表面受體(Fc 受體)相互作用的抗體的區域。於一具體實施例，Fc 區域為人類 IgG1 Fc。於一具體實施例，Fc 區域為人類 IgG2 Fc。於一具體實施例，Fc 區域為人類 IgG4 Fc。於一具體實施例，Fc 區域為經工程化的 Fc 片段。參見例如，Lobner, Elisabeth, et al. "Engineered IgG1-Fc-one fragment to bind them all." *Immunological reviews* 270.1 (2016) : 113-131 ; Saxena, Abhishek, and Donghui Wu. "Advances in therapeutic Fc engineering-modulation of IgG-Associated effector functions and serum half-life." *Frontiers in immunology* 7 (2016) ; Irani, Vashti, et al. "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases." *Molecular immunology* 67.2

(2015) : 171-182 ; Rath, Timo, et al. "Fc- fusions and FcRn : structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics." *Critical reviews in biotechnology* 35.2 (2015) : 235-254 ; 及 Invivogen, IgG-Fc Engineering For Therapeutic Use, www.invivogen.com/docs/Insight200605.pdf, 2006 年 4 月；其中之每一者藉由引用併入本文。於另一具體實施例，Fc 區域具有於 SEQ ID NO : 11 再現之胺基酸序列。於某些具體實施例，Fc 區域能夠於目標問題中誘導抗體依賴性細胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity)(ADCC)。於某一具體實施例，Fc 區域能夠誘導補體依賴性細胞毒性 (complement dependent cytotoxicity)(CDC)。

【0024】抗體「鉸鏈區域」係 IgG 和 IgA 免疫球蛋白類之重鏈的可撓性胺基酸部分，其藉由雙硫鍵連接此兩條鏈。於一具體實施例，鉸鏈具有 SEQ ID NO : 8 之胺基酸序列。

【0025】「免疫球蛋白分子」為一種含有免疫球蛋白重鏈及免疫球蛋白輕鏈一起共價偶和且能夠特異性與抗原結合之免疫學上活性部分。免疫球蛋白分子為任何類型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及 IgY)、類別(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2)或亞類。術語「抗體」及「免疫球蛋白」於本文中可互換使用。

【0026】「免疫球蛋白重鏈」為一含有免疫球蛋白之抗原結合域(antigen binding domain)之至少一部分及免疫球蛋白重鏈可變區之至少一部分或免疫球蛋白重鏈恆

定區之至少一部分之多肽。因此，免疫球蛋白衍生的重鏈與免疫球蛋白基因超家族的成員具有顯著的胺基酸序列同源性區域。例如，Fab 片段中的重鏈為免疫球蛋白衍生的重鏈。

【0027】「免疫球蛋白輕鏈」為一含有免疫球蛋白之抗原結合域之至少一部分及免疫球蛋白輕鏈可變區之至少一部分或免疫球蛋白輕鏈恆定區之至少一部分之多肽。因此，免疫球蛋白衍生的輕鏈與免疫球蛋白基因超家族的成員具有顯著的胺基酸序列同源性區域。

【0028】「免疫黏附素(immunoadhesin)」為一嵌合、類抗體的分子，其將結合蛋白質的域(通常為受體、配位體、抗體 scFv 片段或細胞黏附分子)與免疫球蛋白恆定域結合，該免疫球蛋白恆定域通常包括鉸鏈區域及 Fc 區域。

【0029】「抗原結合片段(fragment antigen-binding)」(Fab)片段」係與抗原結合的抗體上的區域。其係由重鏈及輕鏈之每一者的一個恆定區及一個可變區組成。

【0030】如本文所用，單域抗體(sdAb)係由獨立於其它 V 區或域而特異性結合抗原或抗原決定位的單一單體可變抗體域所組成的結合分子。單域抗體(sdAbs)為本領域已知，且通常源自天然存在的「僅有重鏈的」抗體，即不含輕鏈的重鏈抗體。此種僅有重鏈的抗體可獲自駱駝科物種，例如駱駝、美洲駝、單峰駝或羊駝(亦稱為駱駝科動物抗體)。衍生自該僅有重鏈的抗體的可變區一般稱為 VHH 域或 sdAb。如本文所使用的 sdAb 亦指來自包

含兩條重鏈及兩條輕鏈的習用免疫球蛋白之單離的單個可變區(VL 或 VH)。此免疫球蛋白可含有人化序列，或來自其它非駱駝科動物來源的區域。

【0031】如本文所使用，術語「多域抗體(multi-domain antibody)」，係指包含至少兩個直接或藉由連結序列相互連結的人化VHH抗體的結合分子。

【0032】如本文所使用，術語「NAb 力價」係產生多少中和其靶向抗原決定位(例如 AAV)的生理作用的中和抗體(例如抗 AAV NAb)的量度。抗 AAV NAb 力價可如以下所述，例如，Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 199 (3) : p. 381-390，其以參考文獻併入本文中。

【0033】縮寫「sc」係指自我互補。「自我互補的 AAV」係指其中已經設計由重組 AAV 核酸序列攜帶的編碼區以形成分子內雙鏈 DNA 模板的構築體。感染後，並非等待細胞媒介的第二股的合成，而是 scAAV 的兩個互補半部將結合形成一個準備立即複製及轉錄的雙股 DNA(dsDNA)單元。參見例如，D M McCarty et al, 「Self-complementary recombinant Adeno-Associated Virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis」, *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254。自我互補 AAVs 描述於例如，U.S.專利 Nos. 6,596,535; 7,125,717；及 7,456,683，其每一者藉由引用整體併入本文。

【0034】如本文所使用，術語「操縱連結 (operably linked)」一詞係指與感興趣基因鄰接的表現控制序列及在反向或距離上起作用以控制感興趣的基因的表現控制序列兩者。

【0035】如本文所使用，「不同特異性」係指所提及的免疫球蛋白構築體(例如，全長抗體、重鏈、或能夠結合特定靶標的其它構築體)結合不同的靶位點。此等可以指相同抗原上的不同靶標、相同病原體的不同株(例如不同病毒毒株)或不同抗原。

【0036】「相同特異性」係指免疫球蛋白結合到可能存在於病原體的多個株(例如流感病毒)上的特定靶位點或病毒或其它病原體的單個或亞型毒株的能力。適合地，此等特異性使得對非靶標位點沒有顯著或可測量的結合。

【0037】當用於指蛋白質或核酸時，術語「異源的」係指蛋白質或核酸包含兩種或更多種序列或子序列，其在自然界中未以彼此相同的關係發現。例如，通常重組產生核酸，其具有來自不相關基因的兩個或更多個序列，該序列被排列以製備新的功能性核酸。例如，於一具體實施例，核酸具有來自一個基因的啓動子，該啓動子被排列以引導來自不同基因的編碼序列的表現。因此，就編碼序列而言，啓動子係異源的。術語「異源的輕鏈」係含有來自抗體的可變區及/或恆定區的輕鏈，其具有與重鏈特異性不同的靶特異性。

【0038】「複製缺陷病毒」或「病毒載體」係指一合

成或人工的病毒顆粒，其中含有感興趣基因的表現盒被包裝於病毒殼體或套膜中，其中任何病毒基因體序列亦被包裝於病毒殼體或套膜內為複製缺陷的，即它們不能產生子代病毒體但保留感染目標細胞的能力。於一具體實施例，病毒載體的基因體不包括編碼複製所需要的酵素的基因(基因體可以被設計成「無膽的(gutless)」-僅包含感興趣的轉基因的側邊為人工基因體的增幅及包裝所需的信息)，但此等基因可於生產過程中被供應。因此，於基因治療中的使用被認為是安全的，由於除非於複製所需的病毒酵素的存在下，子代病毒體的複製及感染無法發生。

【0039】「重組 AAV」或「rAAV」係含有兩種元件、AAV 殼體及至少含有包裝在 AAV 殼體內的非 AAV 編碼序列之載體基因體的 DNase 抗性病毒顆粒。於某些具體實施例，該殼體含有約 60 種由自組裝形成殼體的 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質和 vp3 蛋白質組成的蛋白質。除非另有說明，否則「重組 AAV」或「rAAV」可與短語「rAAV 載體」互換使用。rAAV 是「複製缺陷病毒」或「病毒載體」，由於其缺乏任何功能性 AAV rep 基因或功能性 AAV cap 基因且不能產生子代。在某些具體實施例，僅有的 AAV 序列係 AAV 反向末端重複序列(*inverted terminal repeat sequences*, ITRs)，通常位於載體基因體的最末端 5'和 3'末端，以允許位於 ITR 之間的基因及調控序列被包裝於 AAV 殼體。

【0040】術語「核酸酶抗性」係指 AAV 殼體於表現盒

周圍組裝，該表現盒被設計為將轉基因遞送至宿主細胞並保護此等包裝的基因體序列免於用以移除可能來自生產過程的污染性核酸之核酸酶溫育步驟期間的降解(消化)。

【0041】如本文所使用，「載體基因體」係指被包裝於形成病毒顆粒的 rAAV 膜體內的核酸序列。此種核酸序列含有 AAV 反向末端重複序列(ITS)。於本文之實施例中，載體基因體由 5'至 3'至少包含 AAV 5'ITR、編碼序列、及 AAV 3'ITR。可以選擇來自 AAV2 的 ITR、與膜體不同來源的 AAV、或非全長 ITR。於某些具體實施例，ITR 來自與 AAV 相同的 AAV 來源，其在生產期間提供 rep 功能或反式互補(transcomplementing)AAV。此外，可以使用其它 ITR。又，載體基因體含有指導基因產物表現的調節序列。於此更詳細地討論載體基因體的適合構件。

【0042】於某些具體實施例，用於製造 rAAV 的非病毒基因元件將被稱為載體(例如，生產載體)。於某些具體實施例，此等載體為質體，但考慮使用其它適合的基因元件。此種生產質體可編碼於 rAAV 生產期間表現的序列，例如，生產 rAAV 所需的 AAV 膜體或 rep 蛋白質，其未包裝至 rAAV 中。或者，此種生產質體可攜帶載體基因體，其被包裝入 rAAV。

【0043】如本文所使用，「表現盒(expression cassette)」係指包含編碼序列、啟動子，且可包括其它調節序列之核酸分子。於某些具體實施例，載體基因體

可含有二或多個表現盒。於其它具體實施例，術語「轉基因」可與「表現盒」交換使用。

【0044】本發明上下文中的術語「轉譯」係關於在核糖體的處理過程，其中 mRNA 鏈控制胺基酸序列的組裝以產生蛋白質或肽。

【0045】與 A 型流感病毒有關的術語「流感病毒亞型」係指以血球凝集素(H)及神經胺酸酶(N)病毒表面蛋白質之各種組合為特徵的 A 型流感病毒株。A 型流感病毒亞型可以藉由它們的 H 編號來指稱，例如「包含 H1 或 H3 亞型的 HA 的流感病毒」或「H1 流感病毒」、「H3 流感病毒」，或者藉由 H 編號及 N 編號的組合，例如「流感病毒亞型「H3N2」或「H5N1」。術語流感病毒「亞型」具體而言包括於此種亞型內的所有各個流感病毒「株」，其通常由突變產生且顯示不同的致病概況，且包括天然分離物以及人造突變體或重配體(reassortant)等。此種株亦可被稱為病毒亞型之各種「單離物」。因此，如本文所使用，術語「株」及「單離物」可以互換使用。

【0046】如本文所使用，術語「流感」或「流感病毒疾病」係指由 A 型或 B 型流感病毒感染細胞或受試者而引起的病理狀態。於特定的具體實施例，該術語係指由 A 型或 B 型流感病毒引起的呼吸系統疾病。如本文所使用，術語「流感病毒感染」係指藉由流感病毒在細胞或受試者中增殖及/或存在的侵入。

【0047】本文所述的載體表現一種新穎的抗流感抗體構築體，其提供被動免疫且於施用後若於人群中防止一

種或多種 A 型流感及/或 B 型流感病毒株感染的感染及/或減少與流感感染有關的症狀，則為治療上有效的。此種症狀可能包括但未限於發燒(寒顫)、咳嗽、喉嚨痛、流鼻涕或鼻塞、肌肉或身體疼痛、頭痛、疲勞(疲倦)以及繼發性細菌感染的風險如支氣管炎和肺炎。

【0048】如本文所使用，被交換使用之「免疫球蛋白構築體」、「抗體構築體」或「aAb 構築體」係指能夠結合至目標位置的構築體。於一具體實施例，此目標位置為抗原之抗原決定位(epitope)、或病原的位置。於另一具體實施例，此目標位置為流感病毒的抗原決定位。於一具體實施例，Ab 構築體係選自，但未限於，免疫球蛋白分子、免疫黏附素、單域抗體、多域抗體、全長抗體、免疫球蛋白重鏈、及免疫球蛋白輕鏈。

【0049】術語「表現」在本文中以其最廣泛的含義使用且包括 RNA 之產生或 RNA 及蛋白質之產生。關於 RNA，術語「表現」或「轉譯」特別係關於肽或蛋白質的產生。表現可能為暫時或可為穩定的。

【0050】如本文所使用，「有效量」係指在目標細胞中遞送及表現足以減少或預防流感感染的流感抗體的量之 rAAV 組成物的量。有效量可基於動物模型而非人類病患來確定。本文描述適合的鼠模型之例。

【0051】如本文所使用，術語「目標組織」係指如本文所述的具體實施例、方案或組成物靶向的組織、器官或細胞類型。於一具體實施例，目標組織是呼吸器官或呼吸組織。於替代或另外的具體實施例，目標組織係肺。

於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻子。於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻咽部。於替代或另外的具體實施例，目標組織係呼吸道上皮。於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻氣道上皮。於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻細胞。於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻咽細胞。於替代或另外的具體實施例，目標組織係鼻上皮細胞，其可為纖毛鼻上皮細胞、柱狀上皮細胞、杯狀細胞(將黏液分泌到由纖毛上皮細胞組成的鼻腔表面上)及沿鼻咽表面分層的鱗狀鼻上皮細胞。於替代或另外的具體實施例，目標組織係肺上皮細胞。於再其它具體實施例，目標組織係肌肉，例如骨骼肌。

【0052】如上述，除非另有說明，否則術語「約」當用於修飾數值時表示 $\pm 10\%$ 的變動。

【0053】於整個說明書及請求項中使用的術語「包含」及「含有」及其變體包括「包含(comprises)」、「含(comprising)」、「含有(contains)」及「包括(containing)」等係包括其它組分、元件、整體、步驟等。術語「由...組成(consists of)」或「由...所組成(consisting of)」排除其它組件、元件、整體，步驟等。

【0054】應該注意，術語「一(a)」或「一(an)」係指一個或多個，例如「一增強劑」，被理解為代表一個或多個增強劑。如此，術語「一(a)」(或「一(an)」)，「一個或多個」及「至少一個」於本文中可互換使用。

【0055】關於此等發明之描述，意圖係本文所述的每

種組成物於另一具體實施例，在本發明的方法中是有用的。此外，亦意圖於本文所述的每種組成物於該方法中為有用的，於另一具體實施例，其本身就是本發明之一個具體實施例。

【0056】除非於本說明書中另有指明，否則本文使用的技術及科學術語具有與本項技術領域中具通常知識者通常理解的相同的含義，且藉由參考公開的文本提供本項技術領域中具通常知識者對本申請中使用的許多術語的一般指引。

【0057】I. 抗流感抗體轉基因

設計本文所述之組成物以表現四種抗免疫球蛋白區域，其可選擇表現為一種或多種融合蛋白。應理解的是，下列所指「第一個」、「第二個」、「第三個」及「第四個」係用於闡明欲引述的哪一個區域。然而，此並未限於此等從載體基因體表現的順序或此等出現在融合蛋白中的順序。因此，融合蛋白可含有位於第一區域或第二區域的上游或下游的「第三」區域，及/或「第一」區域可位於「第二」、「第三」或「第四」區域的下游。

【0058】於某些具體實施例，具有 SEQ ID NO : 1 之胺基酸序列的第一免疫球蛋白區域係選自： Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser。於某些具體實施例，於此胺基酸序列中允許一些變異，即與此序列為約 95%至約 99%相同的序列被涵括於本發明。換言之，SEQ ID NO：1 之 1、2、3、4、5、或 6 個胺基酸可經修飾。於一具體實施例，一可替換的第一免疫球蛋白區域係指具有 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列的免疫球蛋白區域，其具有 I10M 突變，其被再現為 SEQ ID NO：30 的 aa24 至 aa147。於某些具體實施例，此等胺基酸序列被保留的改變。然而，可選擇非保留的殘基。

【0059】於某些具體實施例，具有 SEQ ID NO：2 之胺基酸序列的第二免疫球蛋白區域：Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser。於某些具體實施例，於此胺基酸序列中允許一些變異，即與此序列為約 95%至約 99%相同的序列被涵括於本發明。換言之，SEQ ID NO：

2 之 1、2、3、4、5、或 6 個胺基酸可經修飾。於某些具體實施例，此等胺基酸序列被保留的改變。

【0060】第三免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 3 之胺基酸序列：Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Ala Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser。於某些具體實施例，於此胺基酸序列中允許一些變異，即與此序列為約 95% 至約 99% 相同的序列被涵括於本發明。換言之，SEQ ID NO : 3 之 1、2、3、4、5、或 6 個胺基酸可經修飾。於某些具體實施例，此等胺基酸序列被保留的改變。

【0061】第四免疫球蛋白區域具有 SEQ ID NO : 4 之胺基酸序列：Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser。於某些具體實施例，於此胺基酸序列中允許一些變異，即與此序列為約 95%至約 99%相同的序列被涵括於本發明。換言之，SEQ ID NO：4 之 1、2、3、4、5、或 6 個胺基酸可經修飾。於某些具體實施例，此等胺基酸序列被保留的改變。

【0062】又於本發明之範疇內者為編碼免疫球蛋白區域及本文所述之其它蛋白質、肽及片段之核酸序列。提供具有 SEQ ID NO：1 之胺基酸序列的免疫球蛋白區域的適合編碼序列的例子，例如，於 SEQ ID NO：5 之 nt 2052 - 2423、SEQ ID NO：13 之 nt 1840 - 2211、SEQ ID NO：14 之 nt 2052 - 2423、SEQ ID NO：15 之 nt 2052 - 2423、SEQ ID NO：19 之 nt 1840 - 2111、SEQ ID NO：20 之 nt 1210-1581、SEQ ID NO：21 之 nt 55 - 486 及 SEQ ID NO：32 之 nt 70 - 441。

【0063】提供具有 SEQ ID NO：2 之胺基酸序列的免疫球蛋白區域的適合編碼序列的例子，例如，於 SEQ ID NO：5 之 nt 2454 - 2822、SEQ ID NO：13 之 nt 2242 - 2160、SEQ ID NO：14 之 nt 2454 - 2822、SEQ ID NO：15 之 nt 2454 - 2822、SEQ ID NO：19 之 nt 2242 - 2610、SEQ ID NO：20 之 nt 1612 - 1980、SEQ ID NO：21 之 nt 517 - 885、及 SEQ ID NO：32 之 nt 472 - 840。

【0064】提供具有 SEQ ID NO：3 之胺基酸序列的免疫球蛋白區域的適合編碼序列的例子，例如，於 SEQ ID NO：5 之 nt 2853 - 3239、SEQ ID NO：13 之 nt 2641 -

3027、SEQ ID NO：14 之 nt 2853 - 3239、SEQ ID NO：15 之 nt 2853 - 3239、SEQ ID NO：19 之 nt 3448 - 3834、SEQ ID NO：20 之 nt 2803 - 3189、SEQ ID NO：21 之 nt 916 - 1302、及 SEQ ID NO：32 之 nt 871 - 1257。

【0065】提供具有 SEQ ID NO：4 之胺基酸序列的免疫球蛋白區域的適合編碼序列的例子，例如，於 SEQ ID NO：5 之 nt 3270 - 3617、SEQ ID NO：13 之 nt 3058 - 3405、SEQ ID NO：14 之 nt 3270 - 3617、SEQ ID NO：15 之 nt 3270 - 3617、SEQ ID NO：19 之 nt 3865 - 4212、SEQ ID NO：20 之 nt 3220 - 3567、SEQ ID NO：21 之 nt 1333 - 1680、及 SEQ ID NO：32 之 nt 1288 - 1635。

【0066】核酸係指核苷酸的聚合形式，包括 RNA、mRNA、cDNA、基因體 DNA、以及合成形式及上述之混合聚合物。核苷酸係指核糖核苷酸、去氧核苷酸或任一種核苷酸的修飾形式。該術語亦包括單股及雙股形式的 DNA。熟悉技術者應會理解，此等核酸分子的功能變異體亦意圖成爲本發明之一部分。功能變異體係可使用標準遺傳密碼而被直接轉譯以提供與自親源核酸分子轉譯的胺基酸序列相同的胺基酸序列的核酸序列。於較佳具體實施例，編碼免疫球蛋白區域、融合蛋白、及其它構築體之核酸分子被本發明所涵蓋且可用於生產表現盒及載體基因體。此等序列可進行密碼子優化以在酵母細胞或哺乳動物細胞如人類細胞中表現。密碼子優化的方法係已知且先前已被描述(例如 WO 96/09378)。若與野生型序列相比至少一個非較佳的密碼子被更佳的密碼子取

代，則該序列被認為係經密碼子優化的。於此，非較佳密碼子係於有機體中使用頻率低於編碼相同胺基酸的另一密碼子的密碼子，且更佳的密碼子係於有機體中較非較佳密碼子更頻繁使用的密碼子。特定有機體的密碼子使用頻率可於密碼子頻率表中發現，例如 www.kazusa.jp/codon。較佳地，多於一個非較佳密碼子，較佳為大多數或全部非較佳密碼子，被更佳的密碼子取代。較佳地，有機體中最常使用的密碼子被用於密碼子優化的序列。經較佳密碼子的置換通常導致較高的表現。熟悉技術者亦應理解，由於遺傳密碼的簡併性 (degeneracy)，許多不同的核酸分子可編碼相同的多肽。亦應理解，熟悉技術者可使用常規技術進行不影響由核酸分子編碼的胺基酸序列的核苷酸置換以反映將表現多肽的任何特定宿主有機體的密碼子使用。因此，除非另有指明，「編碼胺基酸序列的核酸序列」包括彼此的簡併形式且編碼相同胺基酸序列的所有核苷酸序列。可使用常規分子生物學技術選殖核酸序列，或藉由 DNA 合成從頭 (*de novo*) 生成，其可藉由在 DNA 合成及/或分子選殖領域具有商業服務公司使用常規程序進行 (例如，GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins)。

【0067】於一具體實施例，rAAV 輽體原液含有載體基因體，其中一個、兩個、三個或四個免疫球蛋白區域被表現為融合蛋白。

【0068】於某些具體實施例，免疫球蛋白區域可藉由化學鍵聯連接，或者可直接或藉由短多肽連結子 (linker)

連結在一起。此種連結子序列可為天然存在的序列或非天然存在的序列。連結子序列較佳提供生成的抗體構築體足夠的靈活性且同時對蛋白水解降解具有抗性。

【0069】任選地，為了產生同源及異源二聚體，可將免疫球蛋白編碼序列一起選殖，或可以直接合成全長基因 (Genscript) 並連接到表現載體中。於二聚體構築體中，第一免疫球蛋白區域的 C 末端可與第二免疫球蛋白區域的末端連接。不同長度 (10、15、35 及 57 個胺基酸) 的連結子序列係由胺基酸甘胺酸 (G) 及絲胺酸 (S) 所組成。連結序列可緊鄰第一域 (區域) 的 C 末端及第二域 (區域) 的 N 末端，用於分離兩個、三個或四個域或區域。可選擇長度為約 1 至 60 個胺基酸的任何適合的序列，但其長度較佳為 3 至 35 個胺基酸，或約 5 至約 15 個胺基酸。多個連結序列可存在於單一編碼的蛋白質序列中，且此等可獨立地被選擇。

【0070】適當的連結子之例包括：

SEQ ID NO : 7 : GGGGS GGGGS ;

SEQ ID NO : 23 : GGGGS GGGGS GGGGS ;

SEQ ID NO : 24 : GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
GGGGS GGGGS GGGGS

SEQ ID NO : 25 : GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
GGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
GGGGS 。

【0071】提供適當的連結子編碼序列之例，例如：

SEQ ID NO : 13 之 nt 2212 - 2241、nt 2611 - nt 2640、

nt 3028 - 3057、nt 3406 - 3435；

SEQ ID NO：19 之 nt 2212-2241、nt 2611-2640、nt 3835 - 3864、及 nt 4213 - 4242；

SEQ ID NO：20 之 nt 1582 - 1611、nt 3190 - 3219；
 SEQ ID NO：21 之 nt 487 - 516、nt 886 - 915、nt 1303 - 1332；及 SEQ ID NO：32 之 nt 442- 471、nt 841 - 870、nt 1258 - 1287。

【0072】於某些具體實施例，該蛋白質進一步包含 Fc 尾端。如此，於某些具體實施例，此免疫球蛋白結合域 (binding domains)，如上述，連結至抗體的 Fc 片段，較佳為人類抗體，諸如人類 IgG 抗體之 Fc 片段，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、或 IgG4。此域可直接或使用連結子與 Fc 片段基因融合。於某些具體實施例，結合分子藉由包含 1 至 100 個胺基酸的連結序列連結至該 Fc 片段，較佳為 1 至 60 個胺基酸，或 10 至 60 個胺基酸。連結子之例，包括但未限於，上列的連結序列。於某些具體實施例，免疫球蛋白域被基因融合至 Fc 片段之 C 端。於另外的具體實施例，免疫球蛋白域或融合蛋白被融合至 Fc 片段之 N 端及 C 端兩者。參見例如，WO 2016/124768，其藉由引用併入於本文。於一具體實施例，該 Fc 片段具有 SEQ ID NO：30 之 aa 551 至 aa 772 所再現的胺基酸序列。於一具體實施例，該編碼 Fc 片段之核酸序列為 SEQ ID NO：10。

【0073】於某些具體實施例，載體基因體編碼具有 SEQ ID NO：1、2、3 及 4 之胺基酸序列的抗流感融合構

築體。此種構築體之一例被提供者為 SEQ ID NO : 12。於另外的例為 SEQ ID NO : 27。於此等例兩者，一個前導序列被基因工程至載體基因體緊鄰於 5'免疫球蛋白編碼區的上游。然而，於某些具體實施例，載體基因體可含有多於一個的前導序列，各位於免疫球蛋白編碼區的上游。於某些具體實施例，此等融合蛋白進一步包含至少一個免疫球蛋白鉸鏈區域及 Fc 區域[例如，SEQ ID NO : 12]。又，此等融合蛋白每一者含有多個連結子序列。於其它具體實施例，Fc 區域可被包括於無鉸鏈區域之融合蛋白。於一具體實施例，此載體基因體為 SEQ ID NO : 31。

【0074】於某些具體實施例，於此呈現者為具抗 A 型及 B 型流感活性之單一類抗體蛋白質 (single, antibody-like protein)(稱為多域抗體或 mdAb 或 MDAb)，其中該白質為包含一或多個免疫球蛋白域及一或多個如本文所述之連結子的融合蛋白。於某一具體實施例，於此呈現者為如本文所述之 MDAb 之表現用的組成物。

【0075】當指核酸或其片段時，術語「實質同源性」或「實質相似性」係指當與適合的核苷酸插入或缺失與另一種核酸(或其互補股)進行最佳比對時，比對的核苷酸序列至少具有約 95 至 99% 的核苷酸序列同源性。較佳地，同源性涵蓋全長序列，或其開放讀碼框，或至少 15 個核苷酸長度的另一適合片段。本文描述了適合片段之例子。

【0076】於核酸序列之上下文中，術語「序列同一性」、「序列同一性百分比」或「同一性百分比」係指當爲了最大對應性而比對時於兩序列中的殘基相同。期望序列一致性比較的長度可爲於基因體的全長、基因編碼序列的全長、或至少約 500 至 5000 個核苷酸的片段。然而，亦可期望較小片段間的同一性，例如，至少約 9 個核苷酸，通常至少約 20 至 24 個核苷酸、至少約 28 至 32 個核苷酸、至少約 36 個或以上的核苷酸。相似地，可容易地於蛋白質的全長或其片段上測定胺基酸序列的「序列同一性百分比」。適合地，片段長度爲至少約 8 個胺基酸且可多至約 700 個胺基酸。本文描述適合的片段之例。

【0077】當提及胺基酸或其片段時，術語「實質同源性」或「實質相似性」係指當與適當的胺基酸插入或缺失與另一個胺基酸(或其互補股)進行最佳比對時，比對序列中有至少約 95 至 99% 之胺基酸序列同一性。較佳地，同源性係涵蓋全長序列或其蛋白質，例如，免疫球蛋白區域或域、AAV 帽(cap)蛋白質、或其片段，其至少 8 個胺基酸，或更冀望長度爲至少 15 個胺基酸。本文描述適合的片段之例。

【0078】術語「高度保留」係意指至少 80% 同一性，較佳至少 90% 同一性，更佳超過 97% 同一性。本項技術領域中具有通常知識者容易藉由採用本項技術領域中具有通常知識者已知的演算法及和計算機程式決定同一性。

【0079】通常，當提及兩種不同的腺相關病毒之間的「同一性」、「同源性」、或「相似性」時，「同一性」、「同源性」、或「相似性」係參考「比對的」序列來決定。「比對的」序列或「排列」係指多個核酸序列或蛋白質(胺基酸)序列，通常含與參考序列比較時缺失或添加的鹼基或胺基酸的校正。使用各種公共或商業上可用的多序列比對程式中的任何一種來執行比對。此種程式之例包括「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」、及「MEME」，其可透過網際網路上的 Web 伺服器。此等程式的其它來源對於本項技術領域中具有通常知識者為已知的。或者，亦使用 Vector NTI utilities。本領域中亦有許多可用於測量核苷酸序列同一性的演算法，包括上述程式中所包含者。作為另一例，可以使用 GCG 版本 6.1 中的程序 FastaTM比較多核苷酸序列。FastaTM提供查詢和尋找序列之間最佳重疊區域的比對及百分比序列同一性。例如，核酸序列之間的百分比序列同一性可使用 FastaTM以 GCG 版本 6.1 中提供的系統內定參數 (default parameter)(文字大小為 6，記分矩陣的 NOPAM 因子)確定，於此藉由引用併入本文。多重序列比對程式亦可用於胺基酸序列，例如，「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」、及「Match-Box」程式。一般而言，此等程式之任何一種皆以內定設定 (default settings)使用，但本項技術領域中具有通常知識者可依需要改變此等設定。或者，本項技術領域中具有

通常知識者可以利用另外的演算法或計算機程式，其提供至少與參考演算法及程式提供的同一性或比對的水平。參見，例如，J. D. Thomson et al, *Nucl. Acids. Res.*, 「A comprehensive comparison of multiple sequence alignments」, 27(13) : 2682-2690 (1999)。

【0080】如本文所述，核酸序列可工程化至任何適合的載體中。術語「載體」係指第二核酸分子可被插入其中以導入至宿主細胞中被複製，並且在一些情況下被表達的核酸分子。換言之，載體能夠運輸與其連接的核酸分子。如本文使用，術語「載體」預期包含選殖載體以及表現載體。某些載體能夠於其被導入的宿主中自主複製(例如，具有細菌複製起點(origin of replication)的載體可於細菌中複製)。其它載體可於導入宿主細胞後整合到宿主基因體中，從而與宿主基因體一起複製。依據本發明之載體可藉由本項技術領域中具通常知識者熟知的方法而容易地製備。

【0081】II. 分化體 F AAVhu68

rAAVhu68 係由 AAVhu68 裂體及載體基因體組成。AAVhu68 裂體為 vp1 的異源群體、vp2 的異源群體及 vp3 蛋白質的異源群體的組裝體。如本文所使用，當用於指 vp 裂體蛋白質時，術語「異源」或其任何語法變體係指由例如在胺基酸序列中不相同的元件組成的群體。SEQ ID NO : 16 提供了 AAVhu68vp1 蛋白質的編碼胺基酸序列。AAVhu68 vp2 及 vp3 蛋白質一般表現為由相同核酸序列編碼的可替代的剪接變異體，其編碼 SEQ ID NO :

16 之 vp1 肽氨基酸序列。基於 SEQ ID NO : 16 之編號位置 67 具有麩胺酸(Glu 或 E)及/或位置 157 具有纈胺酸(Val 或 V)，AAVhu68 之氨基酸序列不同於其它 AAV 分化體 F 載體(例如，AAV9、hu31、hu32)。於某些具體實施例，編碼 SEQ ID NO : 16 之 AAVhu68 vp1 肽氨基酸序列的核酸序列被用於生產 rAAVhu68 載體。

【0082】rAAVhu68 具有在表現編碼 SEQ ID NO : 16 的 vp1 肽氨基酸序列的 AAVhu68 核酸的殼體的生產系統(例如，HEK 細胞株、桿狀病毒(baculovirus)系統)中產生的 rAAVhu68 殼體，以及可選擇的額外的核酸序列，例如編碼不含 vp1 及/或 vp2-獨特區域的 vp3 蛋白質。使用單一核酸序列 vp1 產生的 rAAVhu68 產生 vp1 蛋白質的異源群體、vp2 蛋白質的異源群體、及 vp3 蛋白質的異源群體。AAVhu68 殼體包含於 vp1 蛋白質內的亞群、vp2 蛋白質內及 vp3 蛋白質內具有自預測的胺基酸殘基修飾。此等亞群至少包括脫醯胺天冬醯胺(N 或 Asn)殘基。例如，天冬醯胺-甘胺酸對中的天冬醯胺被高度脫醯胺。除非另有指明，高度脫醯胺係指至少 45% 脫醯胺、至少 50% 脫醯胺至約 100% 脫醯胺。此種百分比可使用諸如本文所述的彼等質譜技術來確定。因此，rAAVhu68 包括具有脫醯胺的胺基酸的 vp1、vp2 及/或 vp3 蛋白質的 rAAVhu68 殼體內的亞群，至少包含脫醯的天冬醯胺。另外，其它修飾可包括異構化，特別是在選擇的天冬胺酸(D 或 Asp)殘基位置。於再其它具體實施例，修飾可包括在 Asp 位置的醯胺化。亦參見 US 臨時專利申請案 Nos.

62/614,002、62/591,002 及 62/464,748，各標題為「新穎腺相關病毒(AAV)分化體 F 輽體及其用途」，且藉由引用將其全部內容併入本文。

【0083】於某些具體實施例，AAVhu68 裝體包含 vp1 蛋白質的異源群體，其係編碼 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列的核酸序列的產物，其中 vp1 蛋白質包含位於 67 位的麩胺酸(Glu)及 / 或 157 位的纈胺酸(Val)；於 157 位任選包含纈胺酸(Val)的異源 vp2 蛋白質群；及 vp3 蛋白質的異源群體。AAVhu68 裝體包含至少一個亞群，其中位於 vp1 蛋白質 57 位的天冬醯胺-甘胺酸對中至少 65% 的天冬醯胺(N)及位於 vp1、v2 及 vp3 蛋白質中的 329、452 及 / 或 512 位的天冬醯胺-甘胺酸對中至少 70% 的天冬醯胺(N)，基於 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列的殘基編號，其中脫醯胺導致胺基酸改變。如本文更詳細討論者，脫醯胺的天冬醯胺可被脫醯胺成天冬胺酸、異天冬胺酸、相互轉化的天冬胺酸/異天冬胺酸對或其組合。於某些具體實施例，rAAVhu68 的特徵進一步在於以下一種或多種：(a)每種 vp2 蛋白質獨立地係編碼 SEQ ID NO：16 的至少 vp2 蛋白質的核酸序列的產物；(b)每種 vp3 蛋白質獨立地係編碼 SEQ ID NO：16 的至少 vp3 蛋白質的核酸序列的產物；(c)編碼 vp1 蛋白質的核酸序列係 SEQ ID NO：18，或者與 SEQ ID NO：18 至少 70% 至至少 99% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%) 相同的序列，其編碼 SEQ ID NO：16 的胺基酸。可任選地，該序列單獨用於表現 vp1、vp2

及 vp3 蛋白質。或者，該序列可與編碼 SEQ ID NO : 16 的 AAVhu68 vp3 肽氨基酸序列(約 aa203 至 736)的一種或多種核酸序列共同表現，而不具有 vp1 獨特區域(約 aa1 至 約 aa137)及 / 或 vp2-獨特區域(約 aa1 至 約 aa202)或與其互補的股，對應的 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO : 18 之 約 nt607 至 約 nt2211)，或與 SEQ ID NO : 18 至少 70% 至至少 99%(例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%)相同的序列，其編碼 SEQ ID NO : 16 的 aa203 至 736。另外或者，可將編碼 vp1 及 / 或編碼 vp2 的序列與編碼 SEQ ID NO: 16 的 AAVhu68 vp2 肽氨基酸序列(約 aa 138 至 736)無 vp1-獨特的區域(約 aa 1 至 約 137)的核酸序列共表現，或與之互補的股，對應 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO: 18 的核苷酸 411 至 22121)、或與 SEQ ID NO : 18 為至少 70%至至少 99%(例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%或至少 99%)一致的序列，其編碼 SEQ ID NO : 16 的約 aa138 至 736。另外或者，(d)rAAVhu68 裝體包含 vp1、vp2 及 / 或 vp3 蛋白質之至少一個亞群，該等蛋白質係在位置 N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q258、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、N512、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709 中的一個或多個脫醯胺化，基於 SEQ ID NO: 16 的編號或其組合；(e)rAAVhu68 裝體包含 vp1、vp2 及 / 或 vp3 蛋白質之亞群，該等蛋白質包含在位置 N66、N94、N113、N252、N253、Q258、N270、N303、

N304、N305、N319、N328、N336、N409、N410、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709 的一個或多個 1%至 20% 脫醯胺作用，基於 SEQ ID NO : 16 的編號或其組合；(f)rAAVhu68 裝體包含 vp1 之亞群，其中基於 SEQ ID NO : 16 的編號，vp1 蛋白質位置 57 的 65%至 100% 的 N 被脫醯胺；(g)rAAVhu68 裝體包含 vp1 蛋白質之亞群，其中 vp1 蛋白質位置 57 的 75%至 100% 的 N 被脫醯胺；(h)rAAVhu68 裝體包含 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及/或 vp3 蛋白質之亞群，其中基於 SEQ ID NO : 16 的編號，在位置 329 的 N 的 80%至 100% 被脫醯胺；(i) rAAVhu68 裝體包含 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及/或 vp3 蛋白質之亞群，其中基於 SEQ ID NO : 16 的編號，在位置 452 的 N 的 80%至 100% 被脫醯胺；(j) rAAVhu68 裝體包含 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及/或 vp3 蛋白質之亞群，其中基於 SEQ ID NO : 16 的編號，在位置 512 的 N 的 80%至 100% 被脫醯胺；(k)rAAV 包含約 60 種總裝體蛋白質，以約 1 vp1 對約 1 至 1.5 vp2 對 3 至 10 vp3 蛋白質的比率；(l) rAAV 包含約 60 種總裝體蛋白質，以約 1 vp1 對約 1 vp2 對 3 至 9 vp3 蛋白質的比率。

【0084】於某些具體實施例，修飾 AAVhu68 以改變於天冬醯胺-甘胺酸對中的甘胺酸，以減少脫醯胺作用。於其它具體實施例，天冬醯胺被改變為不同的胺基酸，例如以較慢速率脫醯胺的麩醯胺酸；或缺乏醯胺基團的胺基酸(例如含有醯胺基的麩醯胺酸和天冬醯胺)；及/或與缺乏胺基的胺基酸(例如，含有醯胺基的離胺酸、精胺酸

及組胺酸)。如本文所使用，缺乏醯胺或胺側基的胺基酸係指例如甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、胱胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，及/或脯胺酸。如所述的修飾可為於編碼的 AAVhu68 胺基酸序列中發現的一個、兩個或三個天冬醯胺-甘胺酸對中。於某些具體實施例，所有四個天冬醯胺-甘胺酸對中不進行此種修飾。因此，本發明包括用於減少具有較低脫醯胺速率的 AAVhu68 及/或經工程化的 AAVhu68 變異體之脫醯胺的方法。另外或者，一種或多種其它醯胺胺基酸可被改變成非醯胺胺基酸以減少 AAVhu68 的脫醯胺作用。

【0085】於一具體實施例，AAVhu68vp1 核酸序列具有 SEQ ID NO : 18 的序列或與其互補的股，例如對應的 mRNA 或 tRNA。於某些具體實施例，vp2 及/或 vp3 蛋白質可另外或者自除 vp1 以外的不同核酸序列表現，例如於選擇的表現系統中改變 vp 蛋白質的比例。於某些具體實施例，亦提供編碼不具有 vp1 獨特區域(約 aa1 至約 aa137)及/或 vp2 獨特區域(約 aa1 至約 aa202)的 SEQ ID NO : 16(約 aa 203 至 736)的 AAVhu68 vp3 胺基酸序列的核酸序列，或與之互補的股，對應的 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO : 18 的約 nt 607 至約 nt 2211)。於某些具體實施例，亦提供編碼不具有 vp1 獨特區(約 aa 1 至約 137)的 SEQ ID NO : 16(約 aa 138 至 736)的 AAVhu68 vp2 胺基酸序列的核酸序列，或與之互補的股，對應 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO : 18 的 nt 411 至 2211)。

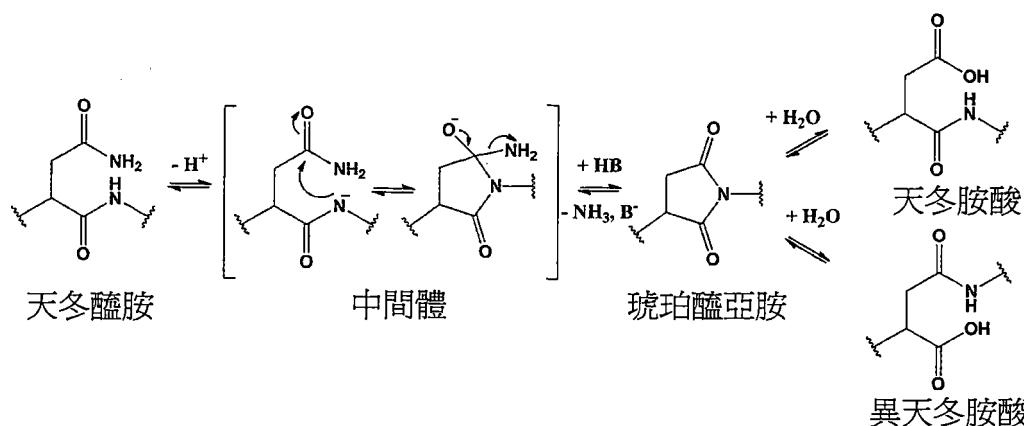
【0086】然而，可選擇編碼 SEQ ID NO：16 的胺基酸序列的其它核酸序列用於生產 rAAVhu68 膠體。於某些具體實施例，該核酸序列具有 SEQ ID NO：18 之核酸序列、或編碼 SEQ ID NO：16 的與 SEQ ID NO：18 序列為至少 70%至 99%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 99%相同的序列。於某些具體實施例，該核酸序列具有 SEQ ID NO：18 之核酸序列、或與 SEQ ID NO：18 之約 nt 411 至約 nt 2211 為至少 70%至 99%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 99%相同的序列，其編碼 SEQ ID NO：16 之 vp2 膠體蛋白質(約 aa 138 至 736)。於某些具體實施例，該核酸序列具有 SEQ ID NO：1 之約 nt 607 至約 nt 2211 之核酸序列、或編碼 SEQ ID NO：16 之 vp3 膠體蛋白質(約 aa 203 至 736)之與 SEQ ID NO：18 為至少 70%至 99.%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 99%相同的序列。

【0087】設計編碼此 AAVhu68 膠體的核酸序列，包括 DNA(基因體或 cDNA)、或 RNA(例如 mRNA)為本領域技術範圍內。於某些具體實施例，編碼 AAVhu68vp1 膠體蛋白質的核酸序列被提供於 SEQ ID NO：18。亦參見圖 1B-1D。於其它具體實施例，可選擇與 SEQ ID NO：18 具有 70%至 99.9%同一性的核酸序列來表現 AAVhu68 膠體蛋白質。於某些其它具體實施例，該核酸序列與 SEQ ID NO：18 具有至少約 75%相同、至少 80%相同、至少

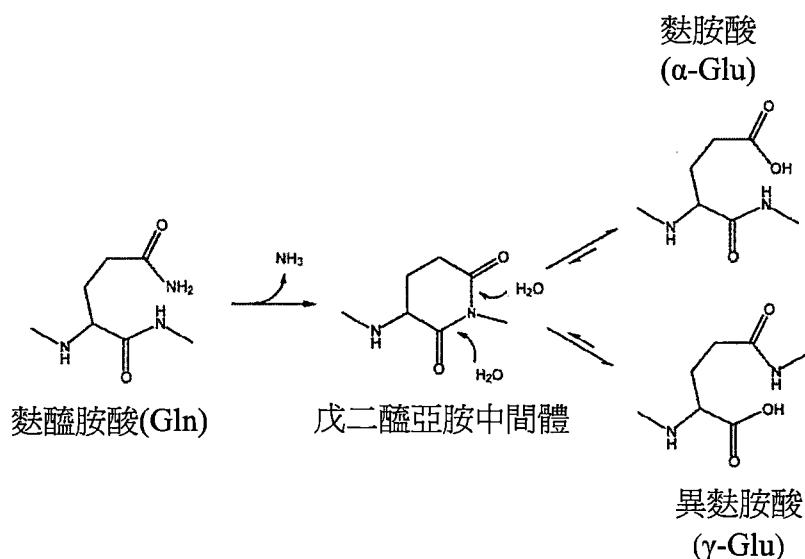
85%、至少 90%、至少 95%、至少 97% 相同或至少 99% 至 99.9% 相同。可藉由各種不同方法設計此種核酸序列以用於選擇系統(即細胞類型)中表現密碼子優化。此優化可使用線上可取得的(例如，GeneArt)、公開的方法或提供密碼子優化服務的公司(例如 DNA2.0(Menlo Park, CA))的方法來進行。例如美國國際專利公開案 WO 2015/012924 中描述了一種密碼子優化方法，其全部內容藉由引用而併入本文。亦參見如，US 專利公開案 No. 2014/0032186 及 US 專利公開案 No. 2006/0136184。產物的開放讀碼框(ORF)的整個長度適當地被修改。然而，於一些具體實施例，只有 ORF 的一個片段可被改變。藉由使用此等方法之一，可將發生率應用於任何指定的多肽序列，並產生編碼多肽的密碼子優化的編碼區的核酸片段。多種選項可用於對密碼子進行實際的改變或合成如本文所述之所設計的密碼子優化的編碼區。可以使用本項技術領域中具通常知識者熟知的標準及常規分子生物學操作進行此種修飾或合成。於一種方法中，藉由標準方法合成長度各自為 80-90 個核苷酸並跨越所需序列長度的一系列互補寡核苷酸對。合成此等寡核苷酸對，使得它們在黏著時形成含有黏性末端的 80-90 個鹼基對的雙股片段，例如合成該對中的每個寡核苷酸以延伸 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多鹼基超過該對中另外的寡核苷酸互補的區域。每對寡核苷酸的單股末端被設計為與另一對寡核苷酸的單股末端黏著。使寡核苷酸對黏著，然後使約 5-6 個此等雙股片段經由黏性單股末端黏著。

著在一起，然後將它們一起連接並選殖到標準細菌選殖載體中，例如可獲自 Invitrogen Corporation、卡爾斯巴德 (Carlsbad)、加州的 TOPO® 載體。然後藉由標準方法對構築體進行定序。製備幾個由連接在一起的 80 至 90 個鹼基對片段之 5 至 6 個片段組成的構築體，即約 500 個鹼基對的片段，使得整個所需序列呈現於一系列質體構築體。然後以適合的限制酶切割此等質體的插入物並連接在一起以形成最終構築體。然後將最終的構築體選殖到標準的細菌選殖載體中，並定序。其它方法對於本項技術領域中具通常知識者而言將顯而易見。此外，基因合成係容易自商業上獲得。

【0088】不欲受理論束縛，咸信脫醯胺原來本質上係非酶促性的，由殼體蛋白質內的官能基引起，該官能團使選擇的天冬醯胺脫醯胺，並且在較小程度上由麩醯胺酸殘基引起。不欲受理論束縛，N 的脫醯胺可通過其 C 端殘基的主鏈氮原子對 Asn 的側鏈醯胺基碳原子進行親核攻擊。咸信形成中間環閉合琥珀醯亞胺殘基。然後琥珀醯亞胺殘基進行快速水解以產生最終產物天冬胺酸 (Asp) 或異天冬胺酸 (IsoAsp)。因此，於某些具體實施例，天冬醯胺 (N 或 Asn) 的脫醯胺作用導致 Asp 或 IsoAsp，其可通過琥珀醯亞胺中間體相互轉化，例如如下所示。



【0089】於某些具體實施例，於 SEQ ID NO : 16 的一或多個麩醯胺酸 (Q) 脫醯胺成麩胺酸 (Glu)，即， α -麩胺酸、 γ -麩胺酸 (Glu)、或 α -及 γ -麩胺酸的摻混物，其可通過共通戊二醯亞胺中間體的相互轉化。下列反應說明此點。



【0090】如本文所提供之 SEQ ID NO : 16 的每個脫醯胺的 N 可獨立地為天冬胺酸 (Asp)、異天冬胺酸 (isoAsp)、天冬胺酸鹽及/或 Asp 和 isoAsp 的相互轉化摻混物，或其組合。可能存在任何合適的 α -及異天冬胺酸的比率。例如，於某些具體實施例，該比率可為天冬胺酸對異天冬胺為 10 : 1 至 1 : 10，天冬胺酸 : 異天冬胺酸約 50 : 50，或天冬胺酸 : 異天冬胺酸的比率約 1 : 3，

或其它選擇的比率。

【0091】於某些具體實施例，SEQ ID NO：16 中一或多個麩醯胺酸(Q)脫醯胺成麩胺酸(Glu)，即， α -麩胺酸、 γ -麩胺酸(Glu)、 α -及 γ -麩胺酸的摻混物，其可如上述說明通過共通的戊二醯亞胺中間體相互轉化。可能存在任何合適的 α -及 γ -麩胺酸的比率。例如，於某些具體實施例，該比率可為 α 對 γ 為10：1至1：10， α ： γ 約50：50，或 α ： γ 的比率約1：3，或其它選擇的比率。

【0092】於某些具體實施例，AAVhu68殼體含有具有至少4個至至少約25個胺基酸殘基位置的vp1、vp2及vp3的亞群，其中與編碼的胺基酸序列SEQ ID NO：16相比，其至少10%被脫醯胺，其中大部分是N殘基。然而，Q殘基亦可以被脫醯胺。

【0093】如本文所使用，除非另有指明，否則vp1蛋白質的「亞群」係於組裝的AAV殼體中的一種(1)vp1蛋白質至所有vp1蛋白質。除非另有指明，否則vp2蛋白質的「亞群」係於組裝的AAV殼體中的一種(1)vp2蛋白質至所有vp2蛋白質。除非另有指明，否則vp3蛋白質的「亞群」係於組裝的AAV殼體中的一種(1)vp3蛋白質至所有vp3蛋白質。

【0094】於某些具體實施例，AAVhu68vp1、vp2及vp3蛋白質中N-G對中的天冬醯胺(N)被高度脫醯胺。於某些具體實施例，AAVhu68殼體包含在高度被脫醯胺化的AAVhu68殼體蛋白質中具有至少四個天冬醯胺(N)位置的AAV vp1、vp2及/或vp3殼體蛋白質之亞群。於某些

具體實施例，約 20 至 50% 的 N-N 對(不包括 N-N-N 三聯體)顯示脫醯胺作用。於某些具體實施例，第一個 N 被脫醯胺。於某些具體實施例，第二個 N 被脫醯胺。於某些具體實施例，脫醯胺為約 15% 至約 25% 脫醯胺。於 AAVhu68 蛋白質的 AAVhu68vp1、vp2 及 vp3 裝體蛋白質之約 8% 至約 42% 中觀察到 SEQ ID NO: 16 的位置 259 的 Q 處的脫醯胺作用。

【0095】於某些具體實施例，rAAVhu68 裝體進一步的特徵在於 D297 中 vp1、vp2 及 vp3 蛋白質的醯胺化作用。於某些具體實施例，基於 SEQ ID NO: 16 的編號，醯胺化 AAVhu68 裝體中 vp1、vp2 及 / 或 vp3 蛋白質的第 297 位之約 70% 至約 75% 的 D。

【0096】於某些具體實施例，裝體的 vp1、vp2 及 / 或 vp3 中的至少一個 Asp 被異構化成 D-Asp。基於 SEQ ID NO: 16 的編號，此等異構物於位置 97、107、384 處之一個或多個殘基通常以小於約 1% 的 Asp 存在。

【0097】於某些具體實施例，rAAVhu68 具有 AAVhu68 裝體，該 AAVhu68 裝體具有 vp1、vp2 及 vp3 蛋白質，該 vp1、vp2 及 vp3 蛋白質具有亞群，該亞群包含於下表中列出的位置處的兩個、三個、四個或更多個脫醯胺的殘基的組合。使用質譜技術可確定 rAAV 中的脫醯胺作用。本項技術領域中具通常知識者將容易理解，可使用以下說明的方法之多種變化。線上層析可使用 Acclaim PepMap 管柱及 Thermo UltiMate 3000 RSLC 系統 (Thermo Fisher Scientific) 與 Q Exactive HF 以 NanoFlex 源

(Thermo Fisher Scientific)偶聯進行。MS 數據使用 Q Exactive HF 數據相關性前 20 位方法 (data-dependent top-20 method) 獲得，從調查掃描中動態選擇最豐富的尚未定序的前驅體離子 (200-2000 m/z)。經由較高能量的碰撞解離片段進行定序，以預測的自動增益控制確定 1e5 離子的目標值，並使用 4m/z 的窗口進行前驅體的單離。於 m/z 200 處以 120,000 的解析率獲得調查掃描。於 m/z 200 處 HCD 光譜的解析率可設定為 30,000，最大離子注入時間為 50 ms，且標準化的碰撞能量為 30。S 透鏡 RF 水平可設定為 50，以得到來自消化的肽佔據的 m/z 區域的理想透射。前驅體離子可自片段化選擇以單個未分配或六個以上的電荷狀態被排除。BioPharma Finder 1.0 軟體 (Thermo Fisher Scientific) 可用於分析獲得的數據。對於肽譜分析 (peptide mapping)，使用設定為固定修飾的脲甲基化 (carbamidomethylation) 的單一入口蛋白質 FASTA 數據庫進行檢索；及氧化、去醯胺化及磷酸化作為可變修飾，10-ppm 質量準確度、高蛋白酶特異性、及 MS/MS 譜之 0.8 的信賴水平。適合的蛋白酶之例可包括，例如，胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶。脫醯胺肽的質譜鑑定相對簡單，由於脫醯胺增加完整的分子質量 +0.984 Da (-OH 和 -NH₂ 基之間的質量差)。脫醯胺肽的質量面積除以脫醯胺及天然肽面積的總和確定特定肽的脫醯胺百分比係。考慮到可能的脫醯胺位點的數量，於不同位點脫醯胺的同量異位物種 (isobaric species) 可能在單峰內共同遷移。因此，來自具有多個潛在脫醯胺位點的肽的

片段離子可用於定位或區分多個脫醯胺位點。於此等情形，觀察到的同位素模式內的相對強度可用於特異性地確定不同脫醯胺肽異構體的相對豐度 (relative abundance)。此方法假設所有異構物種的片段化效率於脫醯胺位點係相同的且係獨立的。此該方法允許脫醯胺所涉及的特定位點以及脫醯胺相關的潛在組合的定義。其它適合的方法、程式及設備可用於脫醯胺。

【0098】

脫醯胺作用 基於預定 AAVHu68 [SEQ ID NO : 16]	平均%，基於 AAVHu68 裝體中的 VP1/VP2/VP3 蛋白質	
經脫醯胺殘基+1 (鄰接 AA)	百分比的廣範圍(%)	狹窄範圍(%)
N57 (N-G)	78 至 100%	80 至 100、85 至 97
N66 (N-E)	0 至 5	0、1 至 5
N94 (N-H)	0 至 15,	0、1 至 15、5 至 12、8
N113 (N-L)	0 至 2	0、1 至 2
~N253 (N-N)	10 至 25	15 至 22
Q259 (Q-I)	8 至 42	10 至 40、20 至 35
~N270 (N-D)	12 至 30	15 至 28
~N304 (N-N)(位置 303 亦為 N)	0 至 5	1 至 4
N319 (N-I)	0 至 5	0、1 至 5、1 至 3
N329 * (N-G)*(位置 328 亦為 N)	65 至 100	70 至 95、85 至 95、80 至 100、85 至 100,
N336 (N-N)	0 至 100	0、1 至 10、25 至 100、30 至 100、30 至 95
~N409 (N-N)	15 至 30	20 至 25
N452 (N-G)	75 至 100	80 至 100、90 至 100、95 至 100
N477 (N-Y)	0 至 8	0、1 至 5
N512 (N-G)	65 至 100	70 至 95、85 至 95、80 至 100、85 至 100
~N515 (N-S)	0 至 25	0、1 至 10、5 至 25, 15 至 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 至 20	2 至 20、5 至 15
N628 (N-F)	0 至 10	0、1 至 10、2 至 8
N651 (N-T)	0 至 3	0、1 至 3
N663 (N-K)	0 至 5	0、1 至 5、2 至 4
N709 (N-N)	0 至 25	0、1 至 22、15 至 25

【0099】於某些具體實施例，AAVHu68 裝體的特徵在

於具有殼體蛋白質中，基於 SEQ ID NO：16 之胺基酸序列的編號，位置 N57、N329、N452、及/或 N512 之至少一個上至少 50% 之 N 殘基經脫醯胺。於某些具體實施例，至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、或至少 90% 之 N 殘基於此等 N-G 位置(即，N57、N329、N452、及/或 N512，基於 SEQ ID NO：16 之胺基酸序列的編號)之一或多個被脫醯胺。於此等及其它具體實施例，AAVhu68 殼體之進一步特徵在於具有蛋白質之群，其中基於 SEQ ID NO：16 之胺基酸序列的編號之位置：N94、N253、N270、N304、N409、N477、及/或 Q599 的一或多個上，約 1% 至約 20% 之 N 殘基具有脫醯胺作用。於某些具體實施例，AAVhu68 至少包含 vp1、vp2 及/或 vp3 蛋白質之亞群，其基於 SEQ ID NO：16 之胺基酸序列的編號，位置 N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q258、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709 之一或多個或其組合，被脫醯胺。於某些具體實施例，殼體蛋白質可具有一或多個經醯胺化的胺基酸。

【0100】又觀察到其它修飾，其中大部分修飾不造成一個胺基酸轉化為不同的胺基酸殘基。可選擇地，殼體的 vp1、vp2 及 vp3 中之至少兩個 Lys 被乙醯化。可選擇地，殼體的 vp1、vp2 及/或 vp3 中的至少一個 Asp 被異構化為 D-Asp。可選擇地，殼體的 vp1、vp2 及/或 vp3 中的至少一個 S 被磷酸化。可選擇地，殼體的 vp1、vp2 及

/或 vp3 中的至少一個 W 被氧化。於某些具體實施例，殼體蛋白具有一個或多個磷酸化。例如，某些 vp1 殼體蛋白質可能於位置 149 被磷酸化。

【0101】AAVhu68 殼體由 AAVhu68 vp1 蛋白質、AAVhu68 vp2 蛋白質及 AAVhu68 vp3 蛋白質以約 1 vp1 : 1 至約 1.5 vp2 : 至 3 至約 10 vp3 的比率組成。於某些具體實施例，AAVhu68 殼體由約 60 個總 vp 蛋白組成。於某些具體實施例，rAAVhu68 的組成物於 AAVhu68 殼體中具有平均約 60 個總 vp1、vp2 及 vp3 蛋白質。於某些具體實施例，包含 rAAVhu68 群體的組成物中的平均 vp1 : vp2 : vp3 比率為約 1 : 約 1 : 至約 3 至 6。

【0102】如本文所使用，「經編碼的胺基酸序列」係指基於轉譯為胺基酸的參考核酸序列的已知 DNA 密碼子的轉譯來預測的胺基酸。下表說明 DNA 密碼子及二十種常見胺基酸，顯示單字母代碼 (SLC) 及三字母代碼 (3LC)。

【0103】

胺基酸	SLC	3 LC	DNA 密碼子
異白胺酸	I	Ile	ATT, ATC, ATA
白胺酸	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
纈胺酸	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
苯丙胺酸	F	Phe	TTT, TTC
甲硫胺酸	M	Met	ATG
半胱胺酸	C	Cys	TGT, TGC
丙胺酸	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
甘胺酸	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
脯胺酸	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
蘇胺酸	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
絲胺酸	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
酪胺酸	Y	Tyr	TAT, TAC
色胺酸	W	Trp	TGG
麴醯胺酸	Q	Gln	CAA, CAG
天冬醯胺	N	Asn	AAT, AAC
組胺酸	H	His	CAT, CAC
麴胺酸	E	Glu	GAA, GAG
天冬胺酸	D	Asp	GAT, GAC
離胺酸	K	Lys	AAA, AAG
精胺酸	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
終止密碼子	終止		TAA, TAG, TGA

【0104】重組物 AAVhu68 的特徵進一步在於分化體

F. AAVhu68 內與另一分化體 F 病毒 AAV9 於 SEQ ID NO : 17(AAV9)之位置 67 及 157 有兩個胺基酸會變化。然而，已發現 AAVhu68 及 AAV9 之間的主要功能差異。一個重要差異為 AAVhu68 膜體已被發現具有較 AAV9 更佳的產量，其亦於分化體 F 中發現。咸信位置 67 之 Glu 及位置 157 之 Val 的胺基酸的一或兩個改變可賦予此種增加的產量。相反地，另一分化體 F AAV(AAV9、hu31、hu31)於位置 67 具有 Ala 並於位置 157 具有 Ala。於某些

具體實施例，與基於 AAV9 的載體相比，具有 AAVhu68 蛋白質的載體提供經包裝的載體的產量至少 15% 增加。於 AAVhu68 及 AAVrh10 之間的比較，AAVhu68 已被發現於低劑量(例如，約 1×10^9)腦室內投予後下比 AAVrh10 提供較佳的轉導(transduction)效率。

【0105】於某些具體實施例中 AAVhu68 蛋白質可為有用的。例如，此種蛋白質可用於生產單株抗體及/或生產可用於基因治療病患中監測 AAVhu68 濃度水平有用的試劑。用於生產有用的抗 AAVhu68 抗體、標示此類抗體或空蛋白質的技術以及適合的試驗形式為本項技術領域中具通常知識者所知。

【0106】更典型地，本文提供的 AAVhu68 蛋白質有用於生產重組 AAV 輽體，其中工程化的核酸序列被包裝於 AAVhu68 蛋白質。此等重組 AAV 輽體，稱為「rAAVhu68」或「rAAVhu68 輽體」，及其用途被更詳細地討論於此申請案的其它段落。此等 rAAVhu68 輽體有用於生產提供良好產量及/或包裝效率之重組 AAV(rAAV)載體，且提供有用於轉導許多不同細胞及組織類型之 rAAV 輽體。此種細胞及組織類型包括但不限於肺、心臟、肌肉、肝臟、胰臟、腎、腦、海馬狀突起、運動皮質、小腦、鼻上皮細胞、心臟的肌肉細胞或心肌細胞、肝細胞、肺內皮細胞、肌細胞、肺上皮細胞、胰島細胞、腺泡細胞、腎細胞、及運動神經元。

【0107】如本文所使用，與 AAV 之群組相關的術語「分化體」係指使用 Neighbor-Joining 演算法決定與另

一群系統發生學相關的一群 AAV，基於 AAV vp1 肽基酸序列的比對，通過至少 75% (至少 1000 次重複) 的步長值 (bootstrap value) 和不超過 0.05 的泊松校正距離 (Poisson correction distance) 測量。Neighbor-Joining 演算法已被描述於文獻。參見，例如，M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000))。計算機程式可用於實現此演算法。例如，MEGA v2.1 程式實現了此修飾的 Nei-Gojobori 方法。使用此等技術及計算機程式以及 AAV vp1 蛋白質之序列，本項技術領域中具通常知識者可以容易地決定是否所選擇的 AAV 包含於本文鑑定的分化體之一者、於另一個分化體中、或於此等分化體之外。參見，例如，G. Gao, et al, *J Virol*, 2004 Jun; 78(12): 6381-6388，其鑑定分化體 A、B、C、D、E 及 F，並提供新穎 AAV 之核酸序列，GenBank 登錄號 AY530553 至 AY530629。亦參見，WO 2005/033321。

【0108】於一具體實施例，本發明提供一工程化分子，其包含於 AAVhu68 vp1 編碼序列及 AAVhu68 rep 編碼序列之間的間隔子 (spacer) 序列。

【0109】如本文所使用，「AAV9 蛋白質」係由多個 AAV9vp 蛋白質構成的自組裝 AAV 蛋白質。AAV9vp 蛋白質通常被表現為由 SEQ ID NO: 36 的核酸序列編碼的可變剪接變異體或與 SEQ ID NO: 36 的核酸序列至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 99%，其編碼 SEQ ID NO:

17 (GenBank 登錄號： AAS99264) 的 vp1 肽氨基酸序列。此等剪接變異體導致具有不同長度的 SEQ ID NO：17 的蛋白質。於某些具體實施例中，「AAV9 蛣體」包括具有與 AAS99264 為 99% 相同或與 SEQ ID NO：17 為 99% 相同的肽氨基酸序列的 AAV。亦參見 US 7906111 及 WO 2005/033321。如本文所使用，「AAV9 變異體」包括彼等述於例如，WO 2016/049230、US 8,927,514、US 2015/0344911、及 US 8,734,809。

【0110】腺相關病毒 (AAV) 病毒載體為如上所定義之具有 AAV 蛣體的 AAV DNA 酶抗性顆粒，其中包裝有用於遞送至目標細胞的核酸序列。

【0111】因此產生殻體的方法，編碼序列以及用於產生 rAAV 病毒載體的方法已被描述。參見例如 Gao 等， Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 及 US 2013/0045186A1。

【0112】如上所述，AAVhu68 序列及蛋白質有用於生產 rAAV。以下實施例描述了具有 AAVhu68 的 rAAV 輽體或 AAV9 輽體的生產。然而，於其它具體實施例，選擇另一種 AAV 蛣體。組織特異性由殻體類型決定。例如，於下列實施例中說明具有 AAVhu68 的病毒載體可用於轉導鼻上皮細胞。於此描述 AAVhu68 的序列。此外，已描述產生具有來自 AAV9 的 AAV9 蛣體及嵌合殻體的載體的方法。參見，例如，US 7,906,111，其藉由引用併入於本文。可以選擇轉導鼻細胞或另一適合目標 (例如肌肉或肺) 的其它 AAV 血清型作為 AAV 病毒載體 (DNA 酶

抗性病毒顆粒)的殼體來源，包括例如，例如，AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、rh10、AAVrh64R1、AAVrh64R2、rh8(參見，例如，US 公開專利申請案 No. 2007-0036760-A1；US 公開專利申請案 No. 2009-0197338-A1；及 EP 1310571)。亦參見，WO 2003/042397 (AAV7 及其它猿猴 AAV)、US 專利 7790449 及 US 專利 7282199 (AAV8)、WO 2005/033321 (AAV9)、及 WO 2006/110689，或尚未被發現，或基於其之重組 AAV，可用作 AAV 殼體的來源。此等文件亦描述可以選擇用於產生 AAV 的其它 AAV 且藉由引用併入本文。於一些具體實施例，用於病毒載體的 AAV 殼體(帽(cap))可藉由前述 AAV 帽或其編碼核酸之一的突變誘導(即，藉由插入、缺失或取代)而產生。於一些具體實施例，AAV 殼體為嵌合，包含來自兩種或三種或四種或更多種前述 AAV 殼體蛋白質的域。於一些具體實施例，AAV 殼體係來自兩種或三種不同 AAV 或重組 AAV 的 Vp1、Vp2 和 Vp3 單體的鑲嵌體(mosaic)。於一些具體實施例，rAAV 組成物包含一種以上之前述帽。

【0113】III. 表現盒及載體

包裝入 AAV 殼體且遞送至宿主細胞的基因體序列通常由至少一個轉基因及其調控序列及 AAV 反向末端重複序列(ITR)組成。rAAV 包括單股 AAV 及自身互補(sc)AAV 兩者。轉基因係一種核酸編碼序列，載體序列異源，其編碼感興趣的多肽、蛋白質，功能性 RNA 分子

(例如，miRNA、miRNA抑制劑)或其它基因產物。核酸編碼序列以允許目標組織細胞中的轉基因轉錄、轉譯及/或表現的方式可操作地連接至調控組件。

【0114】載體的AAV序列通常包含順式作用5'及3'反向末端重複序列(參見例如B.J.Carter,in「Handbook of Parvoviruses」,ed.,P.Tijsser,CRC Press,pp.155 168(1990))。ITR序列長約145bp。較佳地，基本上整個編碼ITR的序列被用於分子，儘管此等序列的一些程度的微小修飾為可允許的。修飾此等ITR序列的能力於本領域之技術範圍內。(參見例如Sambrook等人的文章，「Molecular Cloning. A Laboratory Manual」，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)；及K.Fisher等，J.Virol., 70 : 520 532 (1996))。用於本發明的此種分子之一例係含有轉基因的「順式作用」質體，其中所選擇的轉基因序列及相關的調控元件側接5'及3'AAVITR序列。於一具體實施例，ITR係來自與提供殼體的AAV不同的AAV。於一具體實施例，來自AAV2的ITR序列。已描述稱為ΔITR的5'ITR的縮短版本，其中刪除了D序列及終止解析率位點(terminal resolution site(trs))。於其它具體實施例，使用全長AAV5'和3'ITR。然而，可能會選擇其它AAV來源的ITR。當ITR的來源來自AAV2且AAV殼體來自另一個AAV來源時，所得到的載體可被稱為假型化(pseudotyped)。然而，此等元件的其它構型可能適合的。

【0115】除了以上對重組AAV載體鑑定的主要元件

外，載體亦包括必需的常規控制元件，其以允許其在轉染該質體載體的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與轉基因可操作地連接或感染本發明產生的病毒。如本文所使用，「可操作地連接的」序列包括與感興趣的基因連續的表現控制序列及在反式或距離上起作用以控制感興趣的基因起作用的表現控制序列。

【0116】調節控制元件通常含有啓動子序列作為表現控制序列的一部分，例如位於所選擇的 5'ITR 序列及編碼序列之間。可以使用組成型啓動子、可調節啓動子[參見例如 WO 2011/126808 及 WO 2013/04943]，組織特異性啓動子或對生理學提示反應的啓動子可用於本文所述的載體中。

【0117】適合用於控制治療產物之組成型啓動子之表現的例子包括但不限於雞 β -肌動蛋白(CB)啓動子、CB7 啓動子、人類巨細胞病毒(CMV)啓動子、泛素 C 啓動子(UbC)、猿猴病毒 40(SV40)的早期和晚期啓動子、U6 啓動子、金屬硫蛋白啓動子、EF1 α 啓動子、泛素啓動子、次黃嘌呤磷酸核糖轉移酶(HPRT)啓動子、二氫葉酸還原酶(DHFR) 啓動子 (Scharfmann 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4626-4630(1991)、腺苷脫胺酶啓動子、磷酸甘油激酶(PGK)啓動子、丙酮酸激酶啓動子磷酸甘油變位酶啓動子、 β -肌動蛋白啓動子(Lai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10006-10010 (1989))、莫洛尼白血病病毒(Moloney Leukemia Virus)和其它反轉錄病毒的長末端重複序列(LTR)、單純皰疹病毒(Herpes

Simplex Virus)的胸昔激酶啓動子及本項技術領域中具有通常知識者已知的其它組成型啓動子。適用於本發明的組織或細胞特異性啓動子之例包括但不限於對內皮細胞特異性的內皮素-I (endothelin-I, ET-I) 及 Flt-I、FoxJ1(其靶向纖毛細胞)。

【0118】適於控制治療產物表現的誘導型啓動子包括對外源性試劑(例如藥理學試劑)或對生理學信號有反應的啓動子。此等反應元件包括但未限於結合 HIF-1 α 及 β 的低氧反應元件(hypoxia response element)(HRE)及金屬離子反應元件(metal-ion response element)，如 Mayo 等人所述(1982, Cell 29: 99-108)；Brinster 等人所述(1982, Nature 296: 39-42)及 Searle 等人所述(1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1480-1489)；或熱休克反應元件(heat shock response element)，如 Nouer 等人所述(於：Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., pp167-220, 1991)。

【0119】於一具體實施例，中和抗體構築體的表現係受提供對編碼中和抗體構築體的基因轉錄的緊密控制之可調控啓動子控制，該可調控啓動子例如藥理學試劑、或由藥理學試劑活化的轉錄因子、或者於替代的具體實施例中生理學信號。不洩漏且可以嚴格控制的啓動子系統為較佳。

【0120】可用於本發明之配位體依賴性轉錄因子複合物的可調控啓動子之例包括但未限於由其各自的配位體(例如糖皮質激素、雌激素、黃體素、類視色素(retinoid)、

蛻皮激素 (ecdysone)、及其類似物及模擬物) 所活化的核受體超家族的成員及由四環黴素所活化的 rTTA。於本發明之一態樣，基因開關為一 EcR 系基因開關。此種系統之例包括，但未限於述於下列之系統：US 專利 Nos. 6,258,603、7,045,315、U.S. 公開專利申請案 Nos. 2006/0014711、2007/0161086、及國際公開申請案 No. WO 01/70816。嵌合蛻皮激素受體系統之例述於 U.S. 專利 No. 7,091,038、U.S. 公開專利申請案 Nos. 2002/0110861、2004/0033600、2004/0096942、2005/0266457、及 2006/0100416、及國際公開申請案 Nos. WO 01/70816、WO 02/066612、WO 02/066613、WO 02/066614、WO 02/066615、WO 02/29075、及 WO 2005/108617，其每一者藉由引用整體併入。非類固醇蛻皮激素激動劑調節系統之例為 RheoSwitch® Mammalian Inducible Expression System (New England Biolabs, Ipswich, MA)。

【0121】又其它啓動子系統可包括反應元件，包括但未限於四環黴素 (tet) 反應元件 (諸如 Gossen & Bujard 所述 (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-551)；或賀爾蒙反應元件諸如 Lee 等人所述 (1981, Nature 294: 228-232)；Hynes 等人所述 (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2038-2042)；Klock 等人所述 (1987, Nature 329: 734-736)；及 Israel & Kaufman 所述 (1989, Nucl. Acids Res. 17: 2589-2604) 及本項領域中已知的其它可誘導的啓動子。使用此種啓動子，可控制中和抗體構築體的表現，例如，藉由 Tet 開/關系統 (Gossen 等人，1995, Science

268 : 1766-9 ; Gossen 等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89(12) : 5547-51) ; TetR-KRAB 系統 (Urrutia R., 2003, Genome Biol., 4(10) : 231 ; Deuschle U 等人, 1995, Mol Cell Biol. (4) : 1907-14) ; 美服培酮 (mifepristone) (RU486) 可調節的系統 (Geneswitch ; Wang Y 等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91(17) : 8180-4 ; Schillinger 等人, 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102(39) : 13789-94) ; 及人化泰莫西芬 (tamoxifen)-dep 可調節的系統 (Roscilli 等人, 2002, Mol. Ther. 6(5) : 653-63)。

【0122】於本發明之另一態樣，基因開關係基於 FK506 結合蛋白質 (FKBP) 與 FKBP 雷帕黴素 (rapamycin) 有關聯的蛋白質 (FRAP) 之異二聚體且透過雷帕黴素或其非免疫抑制類似物調節。此種系統之例包括但未限限制，ARGENT™ Transcriptional Technology (ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, Mass.) 及下述的系統：U.S. 專利 Nos. 6,015,709、6,117,680、6,479,653、6,187,757、及 6,649,595、U.S. 公開案 No. 2002/0173474、U.S. 公開案 No. 200910100535、U.S. 專利 No. 5,834,266、U.S. 專利 No. 7,109,317、U.S. 專利 No. 7,485,441、U.S. Patent No. 5,830,462、U.S. 專利 No. 5,869,337、U.S. 專利 No. 5,871,753、U.S. 專利 No. 6,011,018、U.S. 專利 No. 6,043,082、U.S. 專利 No. 6,046,047、U.S. 專利 No. 6,063,625、U.S. 專利 No. 6,140,120、U.S. 專利 No. 6,165,787、U.S. 專利 No. 6,972,193、U.S. 專利 No.

6,326,166、U.S.專利No. 7,008,780、U.S.專利No. 6,133,456、U.S.專利No. 6,150,527、U.S.專利No. 6,506,379、U.S.專利No. 6,258,823、U.S.專利No. 6,693,189、U.S.專利No. 6,127,521、U.S.專利No. 6,150,137、U.S.專利No. 6,464,974、U.S.專利No. 6,509,152、U.S.專利No. 6,015,709、U.S.專利No. 6,117,680、U.S.專利No. 6,479,653、U.S.專利No. 6,187,757、U.S.專利No. 6,649,595、U.S.專利No. 6,984,635、U.S.專利No. 7,067,526、U.S.專利No. 7,196,192、U.S.專利No. 6,476,200、U.S.專利No. 6,492,106、WO 94/18347、WO 96/20951、WO 96/06097、WO 97/31898、WO 96/41865、WO 98/02441、WO 95/33052、WO 99110508、WO 99110510、WO 99/36553、WO 99/41258、WO 01114387、ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit、Version 2.0 (9109102)、及 ARGENT™ Regulated Transcription Plasmid Kit、Version 2.0 (9109/02)，其每一者藉由引用完整併入本文。Ariad系統被設計為由雷帕黴素及其類似物誘導，稱為「rapalog」。於上面列出的與 ARGENT™系統的描述有關的文件中提供了適合的雷帕黴素之例。於一具體實施例，該分子係雷帕黴素[例如由輝瑞公司以 Rapamune™銷售]。於另一具體實施例，使用已知為 AP21967[ARIAD]的 rapalog。可用於本發明的此等二聚化體分子之例包括但不限於雷帕黴素、FK506、FK1012(FK506的同型二聚體)、雷帕黴素類似物(「rapalog」)，其藉由天然產物之化

學修飾添加減少或消除對內源性 FKBP 及/或 FRAP 的親和力的「突起(bump)」。雷帕黴素類似物之例包括但未限於諸如 AP26113 (Ariad)、AP1510 (Amara, J.F. 等人, 1997, Proc Natl Acad Sci USA, 94(20): 10618-23) AP22660、AP22594、AP21370、AP22594、AP23054、AP1855、AP1856、AP1701、AP1861、AP1692 及 AP1889，具設計的最小化與內源 FKBP 交互作用的「突起(bump)」。又其它雷帕黴素類似物可被選擇，例如，AP23573 [Merck]。

【0123】其它適合的增強子包括彼等適於所欲的目標組織指示。於一具體實施例，表現盒包含一或多個表現增強子。於一具體實施例，表現盒含有二或多個表現增強子。此等增強子可彼此為相同或可為不同。例如，增強子可包括 CMV 立即早期增強子。此增強子可存於彼此相鄰的兩個拷貝。或者，此增強子的雙重拷貝可被一或多個序列分開。於又另一具體實施例，該表現盒進一步含有內含子，例如，雞 β -肌動蛋白內含子。其它適合的內含子包括本項技術領域彼等已知者，例如，WO 2011/126808 所述者。適合的 polyA 序列之例包括，例如，兔結合球蛋白(rBG)、SV40、SV50、牛生長賀爾蒙(bGH)、人類生長賀爾蒙、及合成的 polyAs。可選擇地，可選擇一或多個序列以穩定 mRNA。此種序列之另一例為經修飾的 WPRE 序列，其可在 polyA 序列的上游和編碼序列的下游工程化(參見，例如，MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619)。

【0124】AAV 病毒載體可包括多個轉基因。於某些情

形，可使用不同的轉基因編碼蛋白質的每個次單元(例如，免疫球蛋白區域、免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白輕鏈)。於一具體實施例，在以含有每種不同亞基的病毒感染/轉染後，細胞產生多次單元蛋白質。於另一具體實施例，蛋白質的不同次單元可由相同的轉基因編碼。於此情形，單個轉基因包括編碼每個次單元的 DNA，每個次單元的 DNA 由內部核酶進入位點(internal ribozyme entry site, IRES)或自我切割肽(例如 2A)分開。當編碼每個次單元的 DNA 的大小很小時，例如，編碼次單元和 IRES 的 DNA 的總大小為小於 5 千鹼基時，IRES 為理想的。作為 IRES 的替代，DNA 可藉由編碼 2A 肽的序列分開，2A 肽於轉譯後事件中自我切割。參見，例如，ML Donnelly, et al, (Jan 1997) *J. Gen. Virol.*, **78**(Pt 1): 13-21; S. Furler, S et al, (June 2001) *Gene Ther.*, **8**(11): 864-873; H. Klump, et al., (May 2001) *Gene Ther.*, **8**(10): 811-817。此 2A 肽顯著小於 IRES，使其非常適合在空間為限制因子的情況下使用。更經常地，當轉基因很大，由多次單元組成或者兩個轉基因被共同遞送時，攜帶所欲轉基因或次單元的 rAAV 被共同投予以允許它們於活體內連接在一起以形成單個載體基因體。於此種具體實施例，第一 AAV 可以攜帶表現單個轉基因的表現盒，而第二 AAV 可以攜帶表現不同轉基因的表現盒用於在宿主細胞中共表現。然而，所選的轉基因可編碼任何生物活性產物或其它產物，例如研究所需的產物。

【0125】除了上述用於表現盒的元件之外，載體亦包

括習用控制元件，其以允許編碼產物(例如中和抗體或其片段)於以質體載體轉染的細胞中或以本發明產生的病毒感染的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與編碼序列可操作地連接。如本文所使用，「可操作地連接的」序列包括與感興趣的基因連續的表現控制序列及在反式或距離上起作用以控制感興趣的基因起作用的表現控制序列兩者。

【0126】表現控制序列包括適當的增強子；轉錄因子；轉錄終止子；啓動子；有效的 RNA 加工訊息如剪接及聚腺苷酸化(polyA)信息；穩定細胞質 mRNA 的序列，例如土撥鼠肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus (WHP))轉錄後調節元件(WPRE)；增強轉譯效率的序列(即 Kozak 一致序列)；增強蛋白質穩定性的序列；當需要時，增加編碼產物分泌的序列。

【0127】於一具體實施例，選擇調節序列使得總 rAAV 輽體基因體大小為約 2.0 至約 5.5 千鹼基。於一具體實施例，理想的是 rAAV 輽體基因體接近天然 AAV 基因組的大小。因此，於一具體實施例，選擇調節序列，使得總 rAAV 輽體基因體的大小約為 4.7kb。於另一具體實施例，總 rAAV 輽體基因體的大小係小於約 5.2kb。載體基因體的大小可基於包括啓動子、增強子、內含子、poly A 等的調節序列的大小來操縱。參見 Wu 等，Mol Ther, Jan 2010 18(1) : 80-6，其藉由引用併入本文。

【0128】因此，於一具體實施例，載體中包含內含子。適合的內含子包括雞 β -肌動蛋白內含子、人類 β 球蛋白

IVS2(Kelly 等人， Nucleic Acids Research， 43(9)：4721-32(2015))；Promega 嵌合內含子(Almond, B. and Schenborn, E. T. A Comparison of pCI-neo Vector and pcDNA4/HisMax Vector)；及 hFIX 內含子。適合用於本文的各種內含子於本技術領域為已知，且包括但未限於在 bpg.utoledo.edu/~afedorov/lab/eid.html 中找到的彼等內含子，其藉由引用併入本文。亦參閱 Shepelev V. , Fedorov A. Advances in the Exon-Intron Database. *Briefings in Bioinformatics* 2006, 7 : 178-185，其藉由引用併入本文。

【0129】在本文描述的研究中產生數種不同的病毒基因體。然而，本技術領域中具通常知識者應理解，可用其它調節序列替代啓動子、增強子及其它編碼序列的其它基因體構型。提供了編碼本文所述免疫球蛋白區域及/或融合蛋白的載體基因體及表現盒之例，例如，於 SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 14、SEQ ID NO : 15、SEQ ID NO : 19、SEQ ID NO : 20、SEQ ID NO : 21、及 SEQ ID NO : 31。適合地，此等說明性載體基因體包括載體元件，包括啓動子(例如雞 β -肌動蛋白、UBC 或 TBG)、內含子(例如 SV40 內含子或嵌合內含子)、5'UTR 序列(例如 c-myc)、Kozak 序列、poly A(例如 SV40、牛生長激素或兔球蛋白)。於某些具體實施例，IRES 或弗林蛋白酶(furin)、弗林蛋白酶/F2A 或兩者包含在表現盒中。應理解可選擇其它載體元件。

【0130】IV. rAAV 輽體生產

爲了用於生產 AAV 病毒載體(例如，重組(r)AAV)，表現盒可被攜於任何適合的載體上，例如，質體，其貝蒂送至包裝宿主細胞。有用於本發明之質體可被工程化使得其適合於原核細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞等中活體外複製及包裝。適合的轉染技術及包裝宿主細胞爲已知及/或可容易由本項技術領域中具通常知識者設計。

【0131】製備 AAV 系載體(例如，具有 AAV9 或另一種 AAV 膠體)之方法爲已知。參見例如 US 公開專利申請案 2007/0036760(2007 年 2 月 15 日)，其藉由引用併入於本文。本發明並未限於使用 AAV9 或其它分化體 F AAV 肽氨基酸序列，而是包含含有藉由本技術領域已知的其它方法產生的末端 β -半乳糖結合的肽及/或蛋白質，例如，藉由化學合成、藉由其它合成技術、或藉由其它方法。本文提供的任何 AAV 膠體的序列可使用各種技術而容易地產生。適合的生產技術對於本項技術領域中具有通常知識者爲熟知的。參見例如，Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY)。或者，亦可藉由熟知的固相肽合成法合成 (Merrifield, (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 85 : 2149 ; Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62)。此等方法可涉及例如，培養含有編碼 AAV 膠體的核酸序列的宿主細胞；功能 rep 基因；由至少 AAV 反向末端重複 (ITR) 及轉基因組成的微小基因 (minigene)；及足夠的輔助功能以允許將微小基因包裝進 AAV 膠體蛋白質中。此

等及其它適合的生產方法於本項技術領域中具有通常知識者的知識範圍內，而非對本發明的限制。

【0132】需要在宿主細胞中培養以將 AAV 微小基因包裝於 AAV 膠體的組分可以反式提供給宿主細胞。或者，可使用本項技術領域中具有通常知識者已知的方法，由穩定的宿主細胞提供任何一種或多種所需組分(例如，微小基因、rep 序列、cap 序列及/或輔助功能)，該宿主細胞已被工程化以包含一種或多種所需組分。最適合地，此種穩定的宿主細胞將含有於誘導型啓動子控制下的所需組分。然而，所需組分可能處於組成型啓動子的控制之下。本文提供了適合的誘導型及組成型啓動子之例，於討論適合與轉基因一起使用的調節元件時。於又一替代方案，選擇的穩定宿主細胞可於組成型啓動子及其它選定的組分受控於一種或多種誘導型啓動子的控制下包含選擇的組分。例如，可以產生穩定的宿主細胞，其源自 293 細胞(其在組成型啓動子的控制下包含 E1 輔助功能)，但其包含處於誘導型啓動子控制下的 rep 及/或 cap 蛋白質。本項技術領域中具有通常知識者還可以生產又其它穩定的宿主細胞。

【0133】此等 rAAV 特別適用於治療目的及免疫的基因遞送，包括誘導保護性免疫。此外，本發明的組成物亦可以用於活體外生產期望的基因產物。為了活體外生產，可以在用含有編碼所需產物的分子的 rAAV 轉染宿主細胞並於允許表現的條件下培養細胞培養物後，自所需培養物中獲得所需產物(例如蛋白質)。根據需要，

可將表現的產物純化及分離。適合用於轉染、細胞培養、純化及單離的技術係本項技術領域中具有通常知識者已知者。產生及分離適合用作載體的 AAV 的方法係本項技術領域已知。一般參見例如 Griege & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications", *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning 等人, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10: 717-733; 及下列引述的參考文獻，其各藉由引述完整併入本文。為了將轉基因包裝入病毒粒子中，ITR 係與含有表現盒的核酸分子在相同構建體中順式(*in cis*)所需的唯一 AAV 組分。*cap* 及 *rep* 基因可以反式(*in trans*)供應。

【0134】於一具體實施例，本文描述的表現盒被工程化至基因元件(例如，穿梭質體(shuttle plasmid))，其轉染攜帶於其上的免疫球蛋白構築體序列至包裝宿主細胞以生產病毒載體。於一具體實施例，選擇的基因元件藉由適合的方法可被遞送至 AAV 包裝細胞，包括轉染、電穿孔、脂質體遞送、膜融合技術、高速 DNA 塗覆丸粒、病毒感染及原質體融合(protoplast fusion)。亦可製造穩定的 AAV 包裝細胞。或者，表現盒可用於產生除 AAV 以外的病毒載體，或用於活體外產生抗體混合物。用於製造此種構築體的方法對於具有核酸操作技能的人員為已知，且包括基因工程、重組工程及合成技術。參見例如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green

and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。

【0135】術語「AAV 中間體」或「AAV 輽體中間體」係指組裝的 rAAV 裂體，其缺乏包裝於其中的所欲基因體序列。此等亦可被稱為「空的(empty)」裂體。此種裂體可含無可偵測的表現盒之基因體，或僅特別被包裝的基因體序列，其不足以達成基因產物的表現。此等空裂體對於轉移感興趣的基因至宿主細胞為無功能的。

【0136】使用已知技術可生產本文所述的重組 AAV。參見，例如，WO 2003/042397；WO 2005/033321、WO 2006/110689；US 7588772 B2。此種方法涉及培養含有編碼 AAV 裂體的核酸序列之宿主細胞；功能 *rep* 基因；由至少 AAV 反向末端重複(ITR)及轉基因組成的表現盒；及足夠的輔助功能以允許將表現盒包裝到 AAV 裂體蛋白質中。已描述產生裂體、編碼序列的方法，因此已描述用於產生 rAAV 病毒載體的方法。參見例如，Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 及 US 2013/0045186 A1。

【0137】於一具體實施例，提供有用於生產重組 AAVhu68 的生產細胞培養物。此種細胞培養物含有在宿主細胞中表現 AAVhu68 裂體的核酸；適合包裝入 AAVhu68 裂體的核酸分子，例如載體基因體，其含有 AAV ITR 及編碼基因產物的非 AAV 核酸序列，該基因產物可操作地連接至指引產物於宿主細胞中表現的序列；及足夠的 AAV *rep* 功能和腺病毒輔助功能以允許將核酸

分子包裝入重組 AAVhu68 膠體。於一具體實施例，細胞培養物由哺乳動物細胞(例如人類胚胎腎 293 細胞等)或昆蟲細胞(例如桿狀病毒)組成。可選擇地，rep 功能由除 hu68 以外的 AAV 提供。於某些具體實施例，rep 功能的至少一部分來自 AAVhu68。可選擇地，rep 及 cap 序列於細胞培養物中的相同遺傳元件上。rep 序列及 cap 基因之間可能存有間隔子。可選擇地，間隔子是 atgacttaaaccaggt(SEQ ID NO：33)。此等 AAVhu68 或突變 AAV 膠體序列中之任何一個可以處於指引其在宿主細胞中表現的外源調控序列的控制之下。

【0138】於一具體實施例，細胞於適合的細胞培養(例如 HEK 293 細胞)中製備。用於製造本文所述的基因治療載體的方法包括本項技術領域熟知的方法，如用於產生基因治療載體的質體 DNA、載體的生產及載體的純化。於一些具體實施例，基因治療載體為 AAV 載體，且所產生的質體為編碼 AAV 基因體及感興趣的基因之 AAV 順式-質體、含有 AAV rep 及 cap 基因的 AAV 反式質體、及腺病毒輔助質體。載體生成過程可包括方法步驟，諸如細胞培養的開始、細胞繼代、細胞的接種、以質體 DNA 轉染細胞、轉染後的培養基交換為無血清培養基、收取含載體細胞及培養基。收取的含有載體的細胞及培養基於本文中稱為粗製細胞收取物。於另一系統中，藉由以桿狀病毒系載體感染將基因治療載體導入昆蟲細胞。於此等生產系統的評論，一般參見例如 Zhang 等人，2009，“Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for

large-scale recombinant adeno-associated virus production, "Human Gene Therapy 20: 922-929, 其藉由引用完整併入本文。製造及使用此等和其它 AAV 生產系統的方法亦描述於下列美國專利，其藉由引用完整併入本文： 5,139,941；5,741,683；6,057,152；6,204,059；6,268,213；6,491,907；6,660,514；6,951,753；7,094,604；7,172,893；7,201,898；7,229,823；及 7,439,065。

【0139】此後可以對粗製細胞收取物進行方法步驟，如載體收取物的濃縮、載體收取物的滲濾、載體收取物的微流化 (microfluidization)、載體收取物的核酸酶消化、微流化中間體的過濾、藉由層析法的粗純化、藉由超離心的粗純化、藉由切向流過濾的緩衝液交換、及/或調配和過濾以製備團式 (bulk) 載體。

【0140】使用於高鹽濃度的兩步驟親和層析純化，然後使用陰離子交換樹脂層析來純化載體藥物產物並移除空殼體。此等方法詳述於 2016 年 12 月 9 日申請的國際專利申請號 PCT/US2016/065970 及其優先權文件、2016 年 4 月 13 日申請的美國專利申請號 62/322,071 及 2015 年 12 月 11 日申請的美國專利申請號 62/226,357，標題為「AAV9 的可擴展的純化方法」，其各自藉由引用併入於本文。純化 AAV8 之方法，2016 年 12 月 9 日申請的國際專利申請案 No.PCT/US2016/065976，及其優先權文件 2016 年 4 月 13 日申請的美國專利申請案 Nos.62/322,098 及 2015 年 12 月 11 日申請的美國專利申請 62/266,341，及 rh10，2016 年 12 月 9 日申請的國際

專利申請號 PCT/US16/66013 及其優先權文件，2016 年 4 月 13 日申請的美國專利申請案 No.62/322,055 及 62/266,347，題目為「AAVrh10 的可擴展的純化方法」以及 2015 年 12 月 11 日申請的 AAV1 以及 2016 年 12 月 9 日申請的國際專利申請 PCT/US2016/065974 及其優先權文件，2016 年 4 月 13 日申請的美國專利申請 Nos.62/322,083 及美國專利申請案 62/26,351，於 2015 年 12 月 11 日申請的「用於 AAV1 的可擴展純化方法」，全部藉由引用併入本文。

【0141】為了計算空的及完整顆粒含量，將選擇的樣品(例如，於本文的實施例中為碘克沙醇(iodixanol)梯度純化的製劑，其中 GC 的數量 = 顆粒數量)相對於所負載的 GC 顆粒繪製的 vp3 帶體積。生成的線性方程式 ($y = mx + c$) 用於計算測試物品峰值的帶體積中的粒子數量。然後每 $20\mu\text{L}$ 負載的顆粒數 (pt) 乘以 50 得到顆粒 (pt) / mL。 pt/mL 除以 GC/mL 得到顆粒與基因體拷貝的比率 (pt/GC)。 $pt/\text{mL} - GC/\text{mL}$ 得到空的 pt/mL 。空的 pt/mL 除以 pt/mL 並且 $\times 100$ 得到空的顆粒的百分比。

【0142】一般而言，本技術領域已知用於分析空的殼體及具有包裝基因體的 AAV 載體顆粒的方法。參見例如 Grimm 等，Gene Therapy(1999)6: 1322-1330；及 Sommer 等人，Molec. Ther. (2003) 7: 122-128。為了測試變性殼體，該方法包括使經處理的 AAV 原料遭受由任何能夠分離三種殼體蛋白質的凝膠組成的 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳，例如，於緩衝液中含有 3-8% Tris-乙酸鹽的梯度凝

膠，然後於此凝膠中運行直到樣品材料分離，並將凝膠吸印到尼龍或硝酸纖維素膜上，較佳為尼龍。然後使用抗 AAV 蛋白質的一級抗體，較佳為抗 AAV 蛋白質單株抗體，最佳為 B1 抗 AAV-2 單株抗體 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74: 9281-9293)。然後使用二級抗體，一種與一級抗體結合且含有檢測與一級抗體結合的手段，更佳為含有與其共價結合的可檢測分子的抗 IgG 抗體，最佳為與辣根過氧化物酶共價連接的綿羊抗小鼠 IgG 抗體。用於檢測結合的方法用於半定量確定一級和二級抗體之間的結合，較佳能夠檢測放射性同位素發射、電磁輻射或比色變化的檢測方法，最佳為化學發光檢測試劑盒。例如，對於 SDS-PAGE，可以取來自管柱部分的樣品並在含有還原劑(例如 DTT)的 SDS-PAGE 上樣緩衝液 (loading buffer) 中加熱，並且在預製梯度聚丙烯醯胺凝膠 (例如 Novex) 上分離蛋白質。銀染色可以使用 SilverXpress (Invitrogen, CA) 根據製造商的說明書或其它合適的染色方法，即 SYPRO 紅寶石或考馬斯染色劑進行。於一具體實施例，可藉由定量即時 PCR (Q-PCR) 測量管柱級分中 AAV 輽體基因體 (vg) 的濃度。將樣品稀釋並以 DNase I (或其它合適的核酸酶) 消化以移除外源 DNA。核酸酶失活後，將樣品進一步稀釋並使用引子及於引子之間的 DNA 序列特異的 TaqManTM 螢光探針進行增幅。於 Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System 上對每個樣品測量達到限定的螢光程度 (閾值循環，Ct) 所需的循環次數。使用

含有與 AAV 輽體中所含相同序列的質體 DNA，於 Q-PCR 反應中產生標準曲線。藉由將自樣品獲得的循環閾值 (Ct) 值常規化為質體標準曲線的 Ct 值，用於確定載體基因體力價。亦可使用基於數位 PCR (digital PCR) 的終點分析。

【0143】另外，測量空的對完整顆粒比率的另一例子於本領域亦為已知。於分析超速離心機 (AUC) 中測量的沉降速度可以檢測聚集體、其它次要組分，以及根據不同沉降係數提供對不同顆粒物質的相對量的良好定量。此係基於長度及時間基本單位的絕對方法，不需要標準分子作為參考值。將載體樣品加載到具有 12 mm 光徑長度的雙通道木炭-環氧樹脂 (charcoal-epoxy) 中心件的單元中。所提供的稀釋緩衝液被加載到每個細胞的參考通道中。然後將裝載的細胞置於 AN-60 Ti 分析轉子中並加載到配備有吸光度和 RI 檢測器的 Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I 分析超速離心機中。於 20 °C 完全溫度平衡後，使轉子達到 12,000 rpm 的最終運行速度。大約每 3 分鐘記錄 A_{280} 掃描 ~ 5.5 小時 (每個樣本總共掃描 110 次)。原始數據使用 $c(s)$ 方法進行分析，並在分析程序 SEDFIT 中執行。合成的尺寸分佈被繪製且峰值被整合。與每個峰相關的百分比值表示所有峰下總面積的峰面積分數，且基於在 280 nm 產生的原始數據；許多實驗室使用這些值來計算空的粒子：完整粒子比率。然而，由於空的粒子和完整粒子於此波長處具有不同的消光係數 (extinction coefficient)，所以可以相應地調整原始數據。使用消光係數調整之前和之後的空粒子和完整粒子

單體峰值的比率來確定空-完整粒子比率。

【0144】於一態樣，使用最佳化的 q-PCR 方法，其利用廣譜絲胺酸蛋白酶，例如蛋白酶 K(例如可商業上從 Qiagen 獲得)。更特別地，最佳化的 qPCR 基因體力價測定與標準測定相似，不同之處在於在 DNase I 消化後，以蛋白酶 K 緩衝液稀釋樣品並以蛋白酶 K 處理，然後熱失活。以蛋白酶 K 緩衝液適當地稀釋樣品，以相等於樣品的量稀釋。蛋白酶 K 緩衝液可以濃縮至 2 倍或更高。通常，蛋白酶 K 處理為約 0.2 mg/mL，但可從 0.1 mg/mL 變化至約 1 mg/mL。處理步驟通常於約 55 °C 進行約 15 分鐘，但可於較低溫度(例如約 37 °C 至約 50 °C)下於較長期間(例如約 20 分鐘至約 30 分鐘)或更高的溫度(例如，高達約 60 °C)一段較短的時間段(例如約 5 至 10 分鐘)。相似地，熱失活通常在約 95 °C 約 15 分鐘，但溫度可降低(例如約 70 至約 90 °C)且時間可延長(例如約 20 分鐘至約 30 分鐘)。然後稀釋樣品(例如稀釋 1000 倍)，並如標準測定中所述進行 TaqMan 分析。定量亦可使用 ViroCyt 或流式細胞儀完成。

【0145】另外或可選擇地，可使用液滴數位 PCR(ddPCR)。例如，已經描述了藉由 ddPCR 確定單股及自我互補的 AAV 載體基因體力價的方法。參見例如 M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods.* 2014 Apr ; 25(2) : 115-25. doi : 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14。

【0146】簡而言之，從基因體缺陷型 AAVhu68 中間體

分離具有包裝的基因體序列的 rAAVhu68 顆粒的方法涉及使包含重組 AAVhu68 病毒顆粒及 AAVhu68 膜體中間體的懸浮液歷經快速液相層析法 (fast performance liquid chromatography)，其中 AAVhu68 病毒顆粒和 AAVhu68 中間體結合至在 pH10.2 下平衡的強陰離子交換樹脂，並進行鹽梯度，同時在約 260 及約 280 處監測洗脫液的紫外光吸光度。雖然對於 rAAVhu68 而言不太理想，但 pH 可於約 10.0 至 10.4 的範圍內。於此方法中，當 A260/A280 比率達到拐點 (inflection point) 時，洗脫出的部分收集 AAVhu68 全部膜體。於一實施例中，對於親和性層析步驟，可將滲濾產物施加於有效捕獲 AAV2/hu68 血清型的 Capture SelectTM Poros- AAV2/9 親和樹脂 (Life Technologies)。於此等離子條件下，顯著比例的殘留細胞 DNA 及蛋白質流過管柱，而 AAV 顆粒被有效捕獲。

【0147】V. 組成物及用途

本文提供了含有至少一種 rAAV 原液 (stock) (例如，rAAVhu68 原種) 及任選的載劑、賦形劑及/或防腐劑的組成物。rAAV 原液係指為相同的大多數 rAAV 載體，例如，其濃度和劑量單位的討論中以下描述的量相同。

【0148】如本文所使用，術語「AAVhu68.JAb」係指具有本文定義的 AAVhu68 膜體的 rAAV，其中包裝有編碼抗流感抗體 (Ab) 域的載體基因體。如本文所使用，術語「AAV9.JAb」係指具有本文所定義的 AAV9 膜體的 rAAV，其中包裝有編碼抗流感抗體 (Ab) 域的載體基因組。於某些具體實施例，單個 rAAV 原液編碼 SEQ ID

NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 4 的全部四個免疫球蛋白區域，可選擇地於一種或多種融合蛋白質中。載體基因體可包括本文所示的彼等之任一者，例如 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 5 及 SEQ ID NO: 31，或如本文所述工程化的另一種載體基因體。

【0149】於某些具體實施例，組成物可含有至少一第二、不同的 rAAV 原液。此第二載體原液可不同於第一原液，具有不同的 AAV 裂體及/或不同的載體基因體。於某些具體實施例，如本文所述之組成物可含有表現如本文所述之表現盒之不同載體，或另一抗流感組分(例如，抗體構築體、另一生物學藥劑、及/或小分子藥劑)。

【0150】如本文所使用，「載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、媒介物(vehicles)、包衣劑、稀釋劑、抗菌及抗黴菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝液、載劑溶液、懸浮液、膠體等。此種醫藥活性物質之介質及藥劑為本項技術領域中熟知。亦可併入補充的活性成分於組成物中。用語「醫藥上可接受的」係指當投予於宿主時不產生過敏或相似的不良反應的分子實體及組成物。諸如脂質體、奈米膠囊、微粒、微球體、脂質顆粒、囊泡等之遞送媒介物可用於將本發明之組成物引入適合的宿主細胞中。尤其，遞送 rAAV 載體的轉基因可被調配用於遞送，或者被封包於脂質顆粒、脂質體、囊泡、奈米球或奈米顆粒等中。

【0151】於一具體實施例，組成物包括適合遞送至受

試者之最終製劑，例如緩衝至生理學相容的 pH 及鹽濃度之水性液體懸浮劑。任選地，該製劑中存有一種或多種界面活性劑。於另一具體實施例，組成物可作為稀釋用於投予受試者的濃縮物來運輸。於其它具體實施例，組成物可被凍乾並於投予時重新調配。

【0152】適合的界面活性劑或界面活性劑之組合可選自無毒之非離子界面活性劑。於一具體實施例，選擇終止於一級羥基的雙官能嵌段共聚物界面活性劑，例如，諸如亦已知為泊洛沙姆 188(Poloxamer 188)的 Pluronic® F68 [BASF]，其具有中性 pH，具有之平均分子量為 8400。其它界面活性劑及其它泊洛沙姆可被選擇，即非離子三嵌段共聚物，由聚氧丙烯(聚(環氧丙烷))的中央疏水鏈側接兩個聚氧乙烯(聚(環氧乙烷))之親水鏈，SOLUTOL HS 15(聚乙二醇(Macrogol)-15 羥基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚氧辛酸甘油酯)、聚氧 10 油基醚、TWEEN(聚氧乙烯去水山梨醇脂肪酸酯)、乙醇及聚乙二醇。於一具體實施例，此製劑含有泊洛沙姆。此等共聚物通常以字母「P」(泊洛沙姆)命名，後接著三個數字：前兩位數字 $\times 100$ 提供聚氧丙烯核心的近似分子量，最後一位數字 $\times 10$ 提供聚氧乙烯含量的百分比。於一具體實施例，選擇泊洛沙姆 188。界面活性劑可以懸浮液之至多約 0.0005% 至約 0.001% 的量存在。

【0153】以足夠的量投予載體以轉染細胞並提供足夠水平的基因轉移及表現以提供治療益處而沒有過度的不利影響，或具有醫學上可接受的生理效果，此可由醫學

領域之技術人員確定。習用及醫藥上可接受的投予路徑包括但不限於直接遞送至冀望的器官(例如肝臟(可選擇經由肝動脈)、肺、心臟、眼睛、腎臟)、口腔、吸入、鼻內、鞘內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌肉內、皮下、真皮內及其它胃腸外投予路徑。若需要，可以組合投予路徑。

【0154】病毒載體的劑量將主要取決於諸如被治療的病症、病患的年齡、體重及健康等因素，因此可能因病患而異。例如，病毒載體之治療有效人類劑量一般為約25至約1000微升至約5mL之含有約 10^9 至 4×10^{14} GC之AAV載體之水性懸浮液體。將調整劑量以平衡治療益處以抗任何副作用，且此種劑量可根據使用重組載體之治療應用而變化。可監測轉基因之表現水平以確定導致病毒載體之劑量頻率，較佳為含有微小基因的AAV載體。可選擇地，於治療目的所描述的劑量方案相似的劑量方案可用於使用本發明之組成物進行免疫。

【0155】可以劑量單位調配複製缺陷型病毒組成物以含有約 10^9 GC至約 10^{16} GC範圍內的複製缺陷型病毒(用於治療體重70kg的平均受試者)，包括於此範圍內的所有整數或分數量，且對於人類病患較佳為 10^{12} GC至 10^{14} GC。於一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、或 9×10^9 GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、

8×10^{10} 、或 9×10^{10} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、或 9×10^{11} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、或 9×10^{12} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、或 9×10^{13} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、或 9×10^{14} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於另一具體實施例，此組成物被調配為每劑含有至少 10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 、或 9×10^{15} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於一具體實施例，於人類施用，劑量範圍為每劑 10^{10} 至約 10^{12} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於一具體實施例，於人類施用，劑量範圍為每劑 10^9 至約 7×10^{13} GC，包括於此範圍內的所有整數或分數量。於一具體實施例，於人類施用，劑量範圍為 6.25×10^{12} GC 至 5.00×10^{13} GC。於又一具體實施例，劑量為約 6.25×10^{12} GC、約 1.25×10^{13} GC、約 2.50×10^{13} GC、或約 5.00×10^{13} GC。於某一具體實施例，劑量被等分為一半並

投予於每個鼻孔。於某些具體實施例，於人類施用，劑量範圍為 6.25×10^{12} GC 至 5.00×10^{13} GC，以每個鼻孔 0.2 ml 的兩個等分投予，每個受試者中遞送的總體積為 0.8 ml。

【0156】此等上述劑量可以各種體積之載劑、賦形劑或緩衝液製劑中投予，範圍約 25 至約 1000 微升或更高的體積，包括於該範圍內的所有數量，取決於待治療的區域的大小、使用的病毒力價、投予路徑、及方法的預期效果。於一具體實施例，載劑、賦形劑或緩衝液之體積為至少約 25 μ L。於一具體實施例，此體積為約 50 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 75 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 100 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 125 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 150 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 175 μ L。於再另一具體實施例，此體積為約 200 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 225 μ L。於再另一具體實施例，此體積為約 250 μ L。於再另一具體實施例，此體積為約 275 μ L。於再另一具體實施例，此體積為約 300 μ L。於再另一具體實施例，此體積為約 325 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 350 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 375 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 400 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 450 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 500 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 550 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 600 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 650 μ L。於另一具體實施例，此體積為約

700 μ L。於另一具體實施例，此體積為約 700 至 1000 μ L 之間。

【0157】於某些具體實施例，重組載體可藉由對每個鼻孔使用兩次噴霧鼻內投予。於一個具體實施例，藉由交替投予每個鼻孔，例如左鼻孔噴霧、右鼻孔噴霧，然後左鼻孔噴霧、右鼻孔噴霧來投予。於某些具體實施例，交替噴霧之間可能存有延遲。例如，每個鼻孔可以接收以約 10 至 60 秒、或 20 至 40 秒、或約 30 秒至幾分鐘或更長時間間隔分開的多個噴霧。此種噴霧劑可於每次噴霧中遞送例如約 150 μ L 至 300 μ L 或約 250 μ L，以達成約 200 μ L 至約 600 μ L、400 μ L 至 700 μ L、或 450 μ L 至 1000 μ L 的總體積劑量。

【0158】於某一具體實施例，可以鼻內投劑重組 AAV 載體以獲得 5-20 ng/ml 的轉基因表現產物(例如中和抗體構築體，JAb210a MDAb)的濃度，如在鼻洗滌溶液中測量，例如，於投予載體後一週至四週或約兩週。獲得受試者鼻洗液的方法以及定量轉基因表現產物的方法係習用的。參見例如實施例 18 和 19。

【0159】對於其它投予路徑，例如靜脈內或肌肉內，劑量水平將高於鼻內遞送。例如，此種懸浮液可為約 1 mL 至約 25 mL 的體積劑量，劑量高達約 2.5×10^{15} GC。

【0160】依據公開的方法可將上述重組載體遞送至宿主細胞。rAAV 較佳懸浮於生理學相容的載劑中，可被投予人類或非人類哺乳動物病患。於另一具體實施例，組成物包含載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。鑑於轉移病

毒針對的適應症，本技術領域中具通常知識者可容易地選擇適合的載劑。例如，一種適合的載劑包括鹽水，其可以各種緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水)調配。其它示例性之載劑包括無菌鹽水、乳糖、蔗糖、磷酸鈣、明膠、葡聚糖、瓊脂、果膠、花生油、芝麻油及水。緩衝液/載劑應該包括一個防止 rAAV 黏附於輸注管上但不干擾活體內 rAAV 結合活性的成分。

【0161】可選擇地，除了 rAAV 和載劑之外，本發明之組成物可含有其它習用藥物成分，例如防腐劑或化學穩定劑。適合的示例性防腐劑包括氯丁醇、山梨酸鉀、山梨酸、二氧化硫、沒食子酸丙酯、對羥基苯甲酸酯、乙香草醛、甘油、苯酚及對氯苯酚。適合的化學穩定劑包括明膠及白蛋白。

【0162】根據本發明的組成物可以包含醫藥上可接受的載劑，如上定義。適合地，本文所述之組成物包含有效量之一種或多種 AAV 懸浮於醫藥上適合的載劑中及/或與設計用於通過注射、滲透泵、鞘內導管遞送至受試者之適合賦形劑混合、或與用於通過另一裝置或路徑遞送之適合賦形劑混合。於一實施例，組成物被配製用於鼻內投予。於另一實施例，組成物被配製用於肌肉內投予。於又一實施例，組成物被配製用於靜脈內投予。於又一實施例，組成物被配製用於腹膜內投予。

【0163】於一具體實施例，將含有編碼抗病原體構築體(例如中和抗體構築體)的病毒載體的組成物呈液體(例如，霧化的、氣溶膠、噴霧等)鼻內遞送至受試者，以相

對低的滴注體積，以便最小化肺轉導。於一具體實施例，低體積 AAV 的遞送限制了對鼻腔上皮的轉導(藉由表現而測量)超過約 70%、超過 80%、超過 90%、超過約 95% 或超過約 99%。於另一具體實施例，病毒載體可透過除了鼻內噴霧以外的方式局部遞送，例如鼻內注射。

【0164】於某些具體實施例，鼻內遞送裝置提供噴霧霧化器，該噴霧霧化器遞送平均大小範圍為約 30 微米至約 100 微米大小的顆粒之霧。於某些具體實施例，平均大小範圍為約 10 微米至約 50 微米。文獻中已描述了合適的裝置，且一些裝置為可商業上獲得的，例如，LMA MAD NASAL™(Teleflex Medical；愛爾蘭)；Teleflex VaxINator™(Teleflex Medical；愛爾蘭)；來自 Kurve Technologies 之 Controlled Particle Dispersion®(CPD)。亦參見，PG Djupesland, Drug Deliv and Transl. Res(2013) 3 : 42-62。於某些具體實施例，控制遞送的粒徑及體積以優先靶向鼻上皮細胞並最小化靶向肺。於其它具體實施例，為了遞送至肺細胞，顆粒之霧為約 0.1 微米至約 20 微米或更小。此種較小的粒徑可以使鼻內上皮中的滯留最小化。

【0165】可使用任何適合的方法或路徑來投予如本文所述之含 AAV 的組成物，並可選擇地與本文所述的 AAV 媒介的抗體一起共投予其它活性藥物或治療法。投予路徑包括例如全身、口服、靜脈內、腹膜內、皮下或肌內投予。

【0166】於一具體實施例，提供冷凍組成物，其以冷

凍形式如本文所述於緩衝溶液中含有 rAAV。可選擇地，於該組成物中存有一種或多種之界面活性劑(例如 Pluronic F68)、穩定劑或防腐劑。適合地，為了使用，將組成物解凍並以適合的稀釋劑例如無菌鹽水或緩衝鹽水滴定至所需劑量。

【0167】可選擇地，本文所述之組成物可與針對其它病毒靶標之其它抗病毒藥物及/或疫苗組合使用，包括其它流感疫苗，包括：A型流感、B型流感及C型流感。A型流感病毒係最致命的人類病原體。與大流行有關的A型流感之血清型包括H1N1，其於1918年引起西班牙流感，2009年引起豬流感；H2N2於1957年引起亞洲流感；H3N2於1968年引起香港流感；2004年造成禽流感的H5N1型禽流感；H7N7；H1N2；H9N2；H7N2；H7N3；及H10N7。已經描述了針對A型流感的廣泛中和抗體。如本文所使用，「廣泛中和抗體」係指可中和來自多個亞型之多個菌株的中和抗體。例如，CR6261[斯克里普斯研究所(The Scripps Institute)/Crucell]被描述為一種單株抗體，可與包括1918年「西班牙流感」(SC1918/H1)在內的各種流感病毒以及H5N1禽類病毒，於2004年在越南從雞跳到人類的流感(Viet04/H5)。CR6261識別流感病毒表面上主要的蛋白質血球凝集素-膜近端莖之高度保留的螺旋區域。此抗體描述於WO 2010/130636，其藉由引用併入本文。另一種中和抗體F10[XOMA Ltd]已被描述為可用於抗H1N1及H5N1(Sui, Jianhua, et al. "Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of

avian and human influenza A viruses." *Nature structural & molecular biology* 16.3 (2009) : 265-273)。可以選擇針對流感的其它抗體，例如 Fab28 及 Fab49。參見例如 WO 2010/140114 及 WO 2009/115972，其藉由引用併入本文。亦可以容易地選擇其它抗體，諸如彼等述於 WO 2010/010466、美國公開專利公開案 US/2011/076265 及 WO 2008/156763。

【0168】使用此等 rAAV 之方法，例如於 WO 2012/145572 中描述了例如用於被動免疫。其它遞送及使用方法對於本項技術領域中具通常知識者將為顯而易見。例如，除了本文所述之一種或多種組合之外，本文所述之方案進一步可以包含與一種或多種生物藥物、小分子藥物、化學治療劑、免疫增強劑、放射療法、手術等等。如本文所述之生物藥物係基於肽、多肽、蛋白質、酶、核酸分子、載體(包括病毒載體)等。

【0169】於組合療法中，本文所述的 AAV 遞送的免疫球蛋白構築體於開始用另一種藥劑治療之前、期間或之後施用，例如抗病毒治療、抗生素以及其任何組合，即，在治療之前及治療期間、以及在治療之前及開始治療之後、在治療期間及治療之後、或治療之前、治療期間及治療之後。例如，AAV 可於 8 小時至 30 日之間投予，於某些具體實施例，可於開始治療之前約 12 小時、1 日、約 3 日、約 3 至 30 日或 5 至 12 日。

[實施例]

【0170】下列實施例僅係說明性的，並非對本文所述

發明之限制。

【0171】本文使用的一些縮寫如下所示：AAV，腺相關病毒；BALF，支氣管肺泡灌洗液；CB7，具有巨細胞病毒增強子元件之雞 β -肌動蛋白啓動子；cDNA，互補DNA；GC，基因體拷貝；HRP，辣根過氧化物酶；IN，鼻內；IP，腹腔內；ITR，反向末端重複；kg，公斤；ORF，開放讀碼框架；polyA，聚腺苷酸化；及 rBG，兔 β -球蛋白。

【0172】爲了開發一種針對 A 型及 B 型流感的基於腺相關病毒 (AAV) 載體的預防方案，作爲於季節性及/或大流行性流感感染時之傳統流感疫苗的替代方法，於呼吸道上皮發現新穎的 AAV 載體具有增強的性能概況。使用高度特異化的分子技術設計用於檢測及分離來自多種人類及非人類靈長類動物組織之內源性 AAV，從人類組織分離出新穎 AAV，AAVhu68。此載體表現出有利的表型，其包括改善的可製造性及跨許多不同組織類型之增強的轉導。使用 AAVhu68 作爲示例性候選 AAV 載體血清型，對流感抗體表現盒進行了優化。僅測試一個編碼用於表現多域 Ab(MDAb) 的單個開放讀碼框的 AAV 載體。

【0173】實施例 1-新穎的分化體 F AAV -- AAVhu68

以 QIAamp 管柱 (Qiagen) 根據製造商的建議，以下列修飾自人類組織樣品提取組織 DNA 作爲 PCR 模板。選擇 Q5 DNA 聚合酶 (Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB)，因其卓越的高保真度及強大效率以恢復樣品中潛在 AAV 的全長 VP1 基因，如 Gao 等人所

述 [Proc Natl Acad Sci USA, 2002 年 9 月 3 日, 99(18): 11854-11859(Epub 2002 Aug 21)], 引子組修飾如下：於 AV1NS 處，使用引子，prm504, [GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC, SEQ ID NO: 28]，於反向引子 AV2CAS，使用 prm505 [CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA, SEQ ID NO: 29]。

【0174】PCR 條件被變更如下：

	μL
水	9
prm504	1.25
prm505	1.25
模板	1
2X Q5	12.5

【0175】PCR 程式

	時間(秒)	循環(次)
98°	30	1
98°	10	
59°	10	
72°	93	50
72°	120	1

【0176】自凝膠中自 PCR 中切出約 3kb 的條帶；以 QIAquick 凝膠萃取套組 (Qiagen) 提取 DNA 並將其選殖到 Zero Blunt® TOPO® PCR 選殖套組 (Thermo Fisher Scientific) 中。定序質體以獲得 AAV VP1 基因的全長。對於大多數樣品，至少有三個質體被完全定序，一致序列被繪製為該樣品的最終 AAV 序列。

【0177】編碼 AAVhu68 的 vp1 蛋白質之獲得的核酸序列提供於 SEQ ID NO: 18 中。亦參見圖 1B-1D。AAVhu68 的 vp1 氨基酸序列提供於圖 1A 及 SEQ ID NO:

16。與 AAV9(SEQ ID NO : 17)、AAVhu31(SEQ ID NO : 34)及 AAVhu32(SEQ ID NO : 35)相比，兩種突變(A67E 及 A157V)於 AAVhu68(在圖 1A 中圈出)被確定為關鍵。

【0178】然後藉由將 AAVhu68 的 VP1 基因加載至於 AAV9 VP1 基因處的 pAAV2/9 骨架中以製備 pAAV2/hu68 反式質體，以評估包裝效率、產量及轉導性質。pAAV2/9 質體含有位於殼體基因兩側翼的 AAV2 5'及 3'ITR，且可取自 Penn Vector Core[University of Pennsylvania, Phila, PA US, pennvectorcore.med.upenn.edu]。

【0179】實施例 2 - AAVhu68 載體之產量

生產並評估攜帶各種轉基因盒諸如 GFP 及 LacZ 的 AAVhu68 及 AAV9 載體。如 Gao 等人所述，於 293 細胞中使用三重轉染技術生產每一種載體[Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18(2002) : 11854-11859.]。

【0180】a. pAAVhu68 反式質體之生產

編碼 vp1 殼體蛋白質之核酸序列提供於 SEQ ID NO : 18。

藉由將 AAVhu68 之 VP1 基因加載至於 AAV9 VP1 基因處的 pAAV2/9 骨架製造 pAAV2/hu68 反式質體以評估包裝效率、產量及轉導性質。pAAV2/9 質體含有位於殼體基因兩側翼的 AAV2 5'及 3' ITRs 且可取自 Penn Vector Core [University of Pennsylvania, Phila, PA US,

pennvectorcore.med.upenn.edu]。

【0181】b. AAVhu68 載體之產量

培養 293 細胞並於具有 10% 胎牛血清的 Eagle 氏最低必需培養基中於 37°C 5% CO₂ 的環境下保存。如 Gao 等人所述進行轉染 [Gao, Guang-Ping, *et al.* "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.18 (2002): 11854-11859.]，以 pAAV2/hu68 或 pAAV2/9 替換載體質體。將轉染的細胞進一步培養於 6 孔盤。如 Gao 等人所述，藉由使用標定 polyA 區域的探針及引子，經由 TaqMan(Applied Biosystems)分析收集細胞的總裂解物以及上清液而用於病毒定量 [Gao, Guangping, *et al.* "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*." *Human gene therapy* 11.15 (2000): 2079-2091.]。於上清液力價及總裂解物力價，將 6 個 pAAV2/9 質體及 6 個 pAAV2/hu68 質體之產量於 6 孔盤中頭對頭地比較。每個質體來自個別的細菌菌落。

於總裂解物方面，發現 AAVhu68 的產量與 AAV9 的產量相似。然而，於上清液中，AAVhu68 的產量顯著高於 AAV9 的產量。因此，就可擴展生產而言，AAVhu68 與 AAV9 相比被證明是更好的載體，由於對於製造規模擴大，上清液係較佳的。

【0182】c. 不同 AAV 膜體與抗體構築體的比較

在一項研究中，AAVhu68 輽體的產量增加(表 1)。

表 1. AAV1、AAV9 及 AAVhu68 輽體之產量

載體	總產量 (GC)
AAV1.CB7.CI.hJAb	1.03×10^{13}
AAV9.CB7.CI.hJAb	$2.89 \pm 0.08 \times 10^{13}$
AAVhu68.CB7.CI.hJAb	3.40×10^{13}

【0183】實施例 3-對 BALB/c 小鼠進行 AAVhu68 媒介的鼻內給藥以防止 A/波多黎各/8/34(PR8-MTS)的鼻部攻擊

本研究之目的係評估及比較 AAV1.CB7.hJAb、AAV9.CB7.hJAb 及 AAVhu68.CB7.hJAb 輽體的保護效力，所有此等載體均設計用於預防 A 型流感 (A/波多黎各/8/34)，當於小鼠中鼻內投予(IN)時。對於所有的研究，雌性 BALB/c 小鼠 (6 週齡) 購自 Jackson Laboratory(巴爾港，緬因州)，並飼養於賓夕法尼亞大學 (University of Pennsylvania) 移植研究實驗室的動物設施中。本文所述的所有動物程序均由賓夕法尼亞大學的動物照護及使用委員會批准。

【0184】麻醉後的小鼠以它們的背側門牙懸掛，且鼻內 (IN) 接受於 PBS 中稀釋的每個 AAV 輽體的 10^9 基因體拷貝 (GC)，總體積為 $51\mu\text{l}$ ，作為 $17\mu\text{l}$ 的三個等分試樣遞送。攻擊 (challenge) 研究發生於載體投予後 7 日。麻醉後的小鼠以它們的背側門牙懸掛，且鼻內投予 $51\mu\text{l}$ A 型 / 波多黎各/8/34(即 PR8)(5LD_{50})，作為三等份 $17\mu\text{l}$ 遞送。前 14 天每日秤重小鼠一次。任何顯示出窘迫跡像或體重減輕 $\geq 30\%$ 的小鼠皆被安樂死。存活的小鼠於攻擊後 21

天被犧牲。結果示於圖 2A-2B。

【0185】總之，AAV1.CB7.hJAb 之 10^9 GC 的 IN 遞送賦予針對 PR8 挑戰的部分保護(40%)再加上顯著的體重減輕(>20%)。相反地，AAV9.CB7.hJAb 及 AAVhu68.CB7.hJAb 在 10^9 GC 的劑量下的 IN 遞送賦予 80%的針對 PR8 攻擊的保護，其伴隨著 10-20%的體重減輕。

【0186】實施例 4 -AAVhu68 輽體投予至 BALB/c 小鼠以防止以 B/Lee/40 的鼻部攻擊

本研究之目的係評估及比較 AAV1.CB7.hJAb、AAV9.CB7.hJAb 及 AAVhu68.CB7.hJAb 輽體之保護效力，其所有皆被設計為於小鼠中 IN 投予時預防 B 型流感(B/Lee/40)。

【0187】麻醉後的小鼠以它們的背側門牙懸掛，且 IN 接受於 PBS 中稀釋的每個 AAV 輽體的 10^9 GC，總體積為 $51\mu\text{l}$ ，作為 $17\mu\text{l}$ 的三個等分試樣遞送。

【0188】攻擊研究發生於載體投予後 7 日。麻醉後的小鼠以它們的背側門牙懸掛，且鼻內投予 $51\mu\text{l}$ B 型流感/Lee/40(5LD_{50})，作為三等份 $17\mu\text{l}$ 遞送。前 14 天每日秤重小鼠一次。任何顯示出窘迫跡像或體重減輕 $\geq 30\%$ 的小鼠皆被安樂死。存活的小鼠於攻擊後 21 天被犧牲。結果示於圖 3A-3B。

【0189】簡言之，AAV1.CB7.hJAb、AAV9.CB7.hJAb、AAV9.CB7.hJAb 或 AAVhu68.CB7.hJAb 的 10^9 GC 的 IN 遞送賦予 B/Lee/40 全面保護免受以 B/Lee/40 之 IN 攻

擊，再加上於整個攻擊過程中沒有顯著的體重減輕。

【0190】實施例 5-於 BALB/c 小鼠支氣管肺泡灌洗液 (BALF) 中 hJAb 之 AAVhu68 媒介的表現概況

此研究之目的係評估不同劑量之 AAVhu68.CB7.hJAb 被輸送到 BALB/c 小鼠時，BALF 中 hJAb 表現的程度。

【0191】小鼠以 10^9 GC 至 10^{11} GC 的劑量 IN 遞送 AAVhu68.CB7.hJAb 載體。7 日後將小鼠屍體解剖，並將 BALF 收集在 $500\mu\text{l}$ 的 PBS 中。使用蛋白質 A ELISA 如下量化 Ab 的量。ELISA 盤以蛋白質 A 塗覆。隔夜培育後，將平盤以 0.05%Tween-20/PBS 洗滌並封阻。將 BALF 樣品於 PBS 中稀釋並於 37°C 下加入平盤 1 小時。使用生物素-SP-AffiniPure 山羊抗人 IgG Fcg 特異性 Ab(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 及鏈黴親和素-HRP 結合物 (Abcam, Cambridge, MA) 偵測結合。以 TMB 基質 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 將平盤顯色。結果示於圖 4。

【0192】於 IN 遞送 AAVhu68.CB7.hJAb 7 日後，BALF 中偵測到 hJAb 的顯著表現。如預測，載體處理的小鼠的 BALF 中 hJAb 的表現隨著載體劑量從 10^9 GC 增加至 10^{11} GC 而增加。

【0193】實施例 6-AAVhu68.CB7.JAb210a 用於預防 A 型流感或 B 型流感的最低有效劑量 (MED) 之測定

本研究之目的係測定預防 A 型或 B 型流感所需的 AAVhu68.CB7.JAb210a 輽體的 MED。

【0194】將 AAVhu68.JAb210a 輽體 IN 投予 BALB/c 小鼠，劑量範圍為 3×10^8 GC 至 10^{10} CG，在 PBS 中稀釋至總體積為 $51\mu\text{l}$ ，並於 7 日後(在此稱為第 0 日)以 5LD_{50} 的 PR8 或 B/LEE/40 攻擊並於研究期間每日稱重(21 日)。基於感染日的體重計算重量百分比。

【0195】將 AAVhu68.CB7.JAb210a 輽體 IN 紿予小鼠，劑量範圍從 10^7 GC 至 10^{11} GC，於 $51\mu\text{l}$ ，如前所述。攻擊研究發生在載體投予 7 日後。以 5LD_{50} 的 A 型流感病毒(PR8)(圖 5A 和 5B)或 B 型流感病毒(B/LEE/40)(圖 6A 和 6B)IN 攻擊小鼠並每日稱重。

【0196】如圖 5A 及 5B 所示，使用 10^9 GC 劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體達成對抗 PR8 攻擊的有效保護，其伴隨著無動物損失或沒有體重減輕。如圖 5A 及 5B 所示，以 3×10^8 GC 劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體獲得伴隨有顯著體重減輕的存活。

【0197】如圖 6A 及 6B 所示，使用 10^9 GC 劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體達成對 B/LEE/40 攻擊的有效保護，其伴隨著無動物損失及體重減輕。如圖 6A 及 6B 所示，使用 3×10^8 GC 劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體獲得伴隨有顯著體重減輕的存活。

【0198】總之，AAVhu68.CB7.JAb210a 用於保護抗 PR8 的 MED 係 10^9 GC。此外，賦予抗 PR8 全面保護而不伴隨體重減輕的 AAVhu68.CB7.JAb210a 的劑量係

3×10^9 GC。

【0199】爲了防止 B/Lee/40，AAVhu68.CB7.JAb210a 的 MED 係 3×10^8 GC，其爲一種組合療法的重大改進，其係 2016 年 12 月 15 日公開的 WO 2016/200543 中描述的混合 AAV9.FI6 及 AAV9.CR8033 的混合物，其具有 10^9 GC 之針對 B/Lee/40 的 MED。AAVhu68.CB7 的劑量。賦予全面保護的抗 B/Lee/40 而沒有伴隨體重減輕的 AAVhu68.CB7.JAb210a 的劑量係 10^9 GC。

【0200】實施例 7-體內表現改進用之 hJAb 密碼子優化

本研究之目的係藉由獲得來自氣道上皮的細胞的 hJAb 之優先表現，進一步提高 AAV 媒介的 hJAb 表現之已證明的功效，使用預測的密碼子優化圖解改進來自排列在氣道上的細胞之 hJAb 表現。幾種不同的密碼子優化圖解用於改善活體內氣道中 hJAb 的表現。除了評估其於流感攻擊研究中的效力之外，亦評估載體產生的產量。與親本 AAVhu68.CB7.hJAb 相比，密碼子優化導致 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 的產量增加 ~ 20%。此外，AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 於一系列攻擊研究中針對 A 型和 B 型流感的保護進行了評估，此等研究被設計於(a)建立以 A 型或 B 型流感病毒保護免受 IN 攻擊的 MED，(b)評估由 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體賦予的保護的開始，及(c)評估 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體在血清循環 AAVhu68 特異性 NAb 存在下有效地再次投予的能力。

【0201】實施例 8-AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 媒介的 A 型或 B 型流感感染的快速發作

本研究之目的係確定小鼠 IN 遞送後 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體對 A 型流感 (PR8) 或 B 型 (B/Lee/40) 的有效保護作用的開始。

【0202】如先前所述，AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 於 10^9 GC 或 10^{10} CG 稀釋於 PBS 至總體積為 $51\mu\text{l}$ IN 紿予 BALB/c 小鼠，以 5LD_{50} 的 PR8 或 B/LEE/40 病毒，於一、二、此處或七日後攻擊 (分別呈示於圖 7A(PR8) 及圖 8A(B/Lee/40)，為攻擊前 -1、-2、-3 及 -7 日)，並於研究期間每日秤重。基於感染日的體重計算重量百分比。

【0203】如圖 7B 及 7C 所示，使用 10^{10} GC 劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體實現了對抗 PR8 攻擊的有效保護的快速發作，其伴隨著無動物損失。為了防止 B/Lee/40，如圖 8B 及 8C 所示，於 10^9 GC 下的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體之以 \log_{10} 的較低劑量實現了有效保護的快速啓動。

【0204】實施例 9-AAVhu68.CB7.JAb210a 載體於 AAVhu68 特異性血清循環抗體存在下之鼻腔投予

此研究之目的係確定 AAVhu68.CB7.JAb210a 載體能否有效轉導氣道上皮細胞，儘管存有抗 AAVhu68 的血清循環 NAb。如先前所述，IN 投予小鼠 AAVhu68.CB7.nLacZ 載體 (表現與流感病毒轉基因無關)，劑量範圍從 10^9 GC 至 3×10^{10} GC，於 $51\mu\text{l}$ 。於 28 日後 (於抗體反應的高峰) 或第 90 日 (此時 Nab 應被穩定)，自每個載體處理的 (及

非載體處理的)小鼠中分離血清，並測定血清中 AAVhu68 特異性 NAb 的力價。將第 28 日及第 90 日組中的小鼠根據它們的 NAb 狀態分層，並分配於投予 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體之三組中的每一組(圖 9A-9F 及圖 10A-10C)。第 1 組投予 10^9 GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a(圖 9A，第 28 日，或圖 10A，第 90 日)。第 2 組以 3×10^9 GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a(圖 9B，第 28 日或圖 10B，第 90 日)投予。第 3 組以 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a(圖 9C，第 28 日或圖 10C，第 90 日)投予。

【0205】如預測，AAVhu68.CB.nLacZ 輽體之 IN 遞送造成血清循環 AAVhu68 特異性 NAb 的產生，如圖 9 及 10 中之每個圖的右側所示。

【0206】AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 輽體可於存在血清循環 AAVhu68 特異性 NAb 的情況下有效地重新投予。先前存在的血清循環 AAVhu68 特異性 NAb 影響 10^9 GC 輽體之有效再投予。然而，藉由將載體的劑量增加一半 \log_{10} 至 3×10^9 GC 或全部 \log_{10} 至 10^{10} GC，我們顯著改善 A 型流感病毒攻擊小鼠的存活率。小鼠中於血清循環 AAVhu68 NAb 為 1：20 至 1：1,280， 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 劑量 IN 的遞送，造成小鼠抵抗 PR8 攻擊的有效保護。增加初始暴露於 AAVhu68 肝體及施用 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 之間的時間間隔造成針對 PR8 的保護被增進的趨勢。

【0207】實施例 10-AAVhu68.CB7.hJAb 輽體 IN 紿予小鼠後的生物分布概況(Biodistribution Profile)

BALB/c 小鼠 IN 紹予 AAVhu68.hJAb 載體，劑量範圍從 10^{11} GC(高)至 10^9 GC(低)，並於 7 日後進行屍體解剖。收集組織(肺、肝、脾、心臟及腦)進行生物分佈分析。虛線表示測定中的背景水平。

【0208】本研究之目的係確定下列生物分布概況：
 a)IN 遞送載體後的 AAVhu68.CB7.CI.hJAb 載體劑量範圍自 10^9 GC 至 10^{11} GC，並於 7 天後進行屍體解剖；及 b)IN 遞送載體劑量比所提出的 MED 高 100 倍(10^{11} GC)的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 載體。該研究以兩部分進行。A 部分評估 IN 紹予的 AAVhu68.hJAb 的生物分布概況，給予小鼠的劑量範圍自 10^9 至 10^{11} GC，並於載體遞送後第 7 日進行屍體解剖。B 部分評估 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 紹予小鼠最高劑量(10^{11} GC)的生物分布概況，其比 MED 高 100 倍。載體投予後 30 日對小鼠進行屍體解剖。

【0209】於 A 部分研究，如前所述，小鼠 IN 接受 10^9 GC 至 10^{11} GC 的 AAVhu68.CB7.hJAb，以 PBS 稀釋至總體積 $51\mu\text{l}$ 。七日後對小鼠進行屍體解剖，收集數個組織用於分析 AAVhu68 生物分布。

【0210】於 B 部分研究，如前所述，小鼠 IN 接受在 PBS 中稀釋的 10^{11} GC AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 至總體積 $51\mu\text{l}$ 。30 日後對小鼠進行屍體解剖，收集數個組織用於分析 AAVhu68 生物分布。

【0211】如預測，當 IN 遞送載體，大多數載體基因體沉積在肺中。於 AAVhu68.CB7.hJAb 之建議的

MED(10^9 GC)，在腦和心臟中沒有檢測到 AAVhu68 基因體(圖 11)，而在脾臟和肝臟中檢測到的 AAVhu68 載體基因體的程度接近背景(圖 11)。

【0212】隨著載體劑量增加，沉積於肝臟、脾臟、心臟及腦的載體基因體的量以劑量依賴性方式增加(圖 11)。

【0213】當使用高劑量的 AAVhu68 載體時(圖 11、12A 及 12B)，於肺以外的組織中檢測到 AAVhu68 基因體。如圖 12A 及 12B 所示，大多數載體基因體沉積發生在肺中，其次是脾。腎、肝及心臟中存在非常低水平的 AAVhu68 載體基因體(圖 12A 及 12B)。此外，腦、卵巢或眼睛中 AAVhu68 基因體的水平太接近背景以致於不能允許數據的準確解釋(圖 12A)。

【0214】於建議的 AAVhu68.CB7.hJAb 之 MED(10^9 GC)，腦及心臟中沒有檢測到 AAVhu68 基因體，而在脾臟及肝臟中檢測到接近背景的水平的 AAVhu68 基因體。當使用高劑量 AAVhu68 載體(圖 11、12A 及 12B)，在除肺以外的組織中檢測到 AAVhu68 載體基因體。如圖 12A 所示，腦、卵巢或眼睛中 AAVhu68 基因體的水平太接近背景以致於不能允許準確解釋數據。

【0215】實施例 11

AAVhu68.hJAb 及 AAVhu68.JAb210a 載體於活體內表現出令人印象深刻的針對各種 A 型和 B 型流感毒株致死攻擊的預防性概況。當施用於小鼠鼻子時，即使以低

劑量投予，其亦賦予針對 A 型或 B 型流感株的全面保護。

【0216】有趣的是，保護性低 AAV 載體劑量造成產生低水平的血清-循環 AAV 特異性中和抗體。吾人證明此等抗體不會危及有效的載體重新投予，此係有益的，如果有必要防止在有效的通用 AAV 預防窗口期間可能出現的大流行性流感株時。

【0217】該載體的安全性目前正於 IND 進行評估中，以使能支持該預防產品進入 I 期臨床試驗。

【0218】實施例 12-評估 AAV9.CB7.hJAb 在獼猴鼻子中的表現及載體分布概況，使用 LMA® MAD Nasal™ 鼻內黏膜霧化 (MAD nasal) 裝置

此研究被設計用於評估臨床遞送裝置 LMA® MAD Nasal™ 鼻內黏膜霧化 (MAD nasal)，用於將表現恒河獼猴甲型胎兒蛋白 (rhAFP；替代 JAb210a) 的替代載體 (AAV9) 遞送至恒河獼猴鼻。於鼻腔灌洗液中評估轉基因產物 rhAFP 的起始及高峰表現水平，並於屍體剖檢時評估載體生物分布。

【0219】於載體投予當天，將動物鎮靜、稱重並記錄生命徵象。於鼻腔灌洗液 (nasal lavage fluid, NLF) 採集：將小兒科 Foley 導管置於其中一個鼻孔中，一旦就位，將氣球充氣並將導管拉回，直至達到阻力。將高達 5 毫升的磷酸鹽緩衝鹽水溶液注入隔離的鼻腔中，並將頭部標為一側，以允許洗液流入位於正下方的 50 毫升 Falcon 管中。於該過程結束時，將放置在遠側的導管釋放並移除，以無菌 PBS 在外部清潔，並放置於重複該過程之相

鄰鼻孔中。以氣管插管對獼猴插管以保持呼吸道暢通，並保持仰臥位。為了液體輸送 AAV 輽體(動物 RA0065)：將小兒科 Foley 導管置於其中一個鼻孔中，將氣球充氣並將導管拉回，直至達到阻力。將 AAV 輽體(1 mL 體積)以 10^{13} GC 的劑量加入到每個鼻孔中並使其保持約 5 分鐘(總劑量 2×10^{13} GC)。

【0220】於經由 MAD nasal(動物 RQ9476)遞送 AAV 輽體：AAV 輽體透過 MAD nasal 以 10^{13} GC 的形式遞送，總共 0.5 ml/鼻孔，兩個鼻孔給藥一次(總劑量 2×10^{13} GC)。

【0221】於選定日(第 7、21、35、50、81 及 99 日)，監測獼猴的生命徵象、臨床病理學以及從右鼻孔及左鼻孔收集的鼻腔灌洗液中的替代轉基因產物的表現。於屍體剖檢時，收集組織以分析 AAV9 輽體基因體。添加到 MAD nasal 與 AAV9 輽體之組合的安全性係大腦及嗅球中缺乏載體基因體。

【0222】藉由分析 NLF 樣品，使用人甲型胎兒蛋白 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems, Inc, Minneapolis MN, USA) 檢測來自 AAV9 轉導的氣道細胞分泌的 AFP。

【0223】當通過 MAD nasal 將總體積為 0.5 ml 的表現 rhAFP 的 AAV9 輽體以 2×10^{13} GC 的劑量遞送至恒河獼猴的鼻孔時，吾人能夠隨著時間測定 NLF 中的基因表現。有趣的是，於分析 AAV9 輽體生物分布，以於鼻及氣管中檢測到的大多數載體基因體，吾人觀察到經由 MAD 鼻腔遞送的 AAV9 輽體的最小全身播散。

【0224】IN 紿予 AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG 於雄性恒

河獼猴。具體而言，使用 MAD NasalTM(以正方形，圖 22)IN 紿予 1 個獼猴 5.45×10^{12} GC AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG 總體積 0.34ml(以每個鼻孔 0.170ml 的一個等份給予)。MAD NasalTM 將批准的藥物霧化成可被 IN 投予的細霧。於對照獼猴(圓形，圖 22)，載體以液體形式遞送(每個鼻孔 0.5ml)。此短期研究被設計於評估 AAV9.CB7.CI.rhAFP.rBG 的生物分布概況，當使用 MAD NasalTM 遞送至恒河獼猴獼猴鼻部。99 日後對動物進行屍體剖檢。於腦中並未偵測到 AAV9 載體(數據未顯示)及嗅球(圖 22)。

【0225】實施例 13-AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 於恒河獼猴鼻中表現概況的評估

本研究被設計於評估 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 在使用 MAD NasalTM 遞送至恒河獼猴鼻部時的表現概況。雄性恒河獼猴以 2×10^{13} GC 的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 以 0.34mL 的體積經由 MAD NasalTM 裝置平均分配於鼻孔間。MAD 鼻腔霧化器將批准的藥物霧化成可以 IN 紿予的細霧。根據 SOP 7404，每日對所有動物進行存活性檢查。根據 SOP，於所有時間點監測並記錄體重、體溫、呼吸頻率及心率。於第 7、14、21、28 及 35 日收集鼻拭子用於藉由 RT-PCR 分析 JAb210a 表現。於對第 35 日的數據進行評估後，決定對動物長期追蹤或進行屍體剖檢以獲得載體生物分布。於第 7、14、21、28、35、56 及 77 日收集 NLF 及血液樣品用於分析 JAb210a 表現。藉由專門設計用於檢測 JAb210a 的基於 RT-PCR 的測定，於

第 77 日收集的樣品(用細刷子從鼻子收集的廢棄鼻細胞)中證實 JAb210a 的表現。

【0226】組織交叉反應性研究

使用單株 Ab 作為治療劑需要評估 Ab 與正常人和恒河獼猴組織之交叉反應性。組織交叉反應性研究涉及針對一系列正常人類及恒河獼猴組織的單株抗體的免疫組織化學或細胞化學測試，其符合由 FDA 於 1997 年 2 月公佈的「於人類使用的單株抗體產品的製造及測試之考慮要點 (Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Ab Products for Human Use)」及 EMA 於 2008 年 12 月公佈的「單株抗體及相關產品開發、生產、表徵及規格之指南 (Guideline on Development, Production, Characterisation and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products)」(EMEA/CHMP/BWP/157653/2007)。此研究之目的係利用免疫組織化學評估 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 的轉基因產物與選定的人類和恒河獼猴組織之交叉反應性。

【0227】實施例 14-AAVhu68.CB7.CI.JAb210a 對老年小鼠 A 型流感病毒的保護效果評估

此研究之目的係評估對老年小鼠有效預防的可能性，並評估 AAVhu68.CB7.JAb210a 輽體於 IN 投予老齡 (9-18 個月齡)BALB/c 雌性小鼠時對 A 型流感 (A/波多黎各/8/34) 的保護效力。麻醉後的小鼠藉由它們的背側門齒懸掛，且 IN 接受於 PBS 中稀釋的 10^9 GC 或 3×10^9 GC AAV 輽體，總體積為 $51\mu\text{l}$ ，作為 $17\mu\text{l}$ 的三個等分之試樣遞送。

攻擊研究發生於載體投予 7 日後。麻醉後的小鼠藉由它們的背側門齒懸掛並投予 $51\mu\text{l}$ 的 PR8(5LD_{50})，以三等份 $17\mu\text{l}$ 之形式遞送。如圖 13A 所示，攻擊後每日稱重小鼠。根據流感攻擊當日之體重計算體重減輕百分比。任何顯示出窘迫跡象或體重減輕 $\geq 30\%$ 的小鼠都被安樂死。存活小鼠於攻擊後 21 日被犧牲。圖 13B 圖解 PR8 攻擊後之存活百分比。

【0228】總之，IN 遞送 10^9GC 或 $3 \times 10^9\text{GC}$ AAVhu68.CB7.JAb210a 賦予 PR8 攻擊的全面保護，並導致保護老鼠免於 A 型流感 (PR8 的 5LD_{50}) 的致命攻擊。

【0229】實施例 15- 藉由多域抗體 (Multi-Domain Antibody) 對流感血球凝集素 (Hemagglutinin) 之流感感染的普遍保護

本文報告一種多域抗體，其自一組不同的美洲駝單域抗體至流感血球凝集素產生，並且其與前所未有的廣度及對 A 型和 B 型流感病毒的效力相關聯。當靜脈內投予或自重組腺相關病毒載體局部表現時，多域抗體在小鼠中防止 A 型和 B 型流感感染。結果證實，標定多個抗原決定位的多域抗體表現出增強的病毒交叉反應性及效力，且當與腺伴隨病毒遞送組合使用時，可預防流感及其它高度可變病原體的感染。

【0230】疫苗對流感的控制及預防仍不可或缺，但大多數由流感疫苗接種誘導的抗體辨識血球凝集素 (HA) 表面糖蛋白的高度可變的頭部區域。此種抗體主要係菌株特異性的且賦予針對僅一小部分相似變異體的保護。每

年選擇適合的疫苗株亦會帶來許多挑戰，與流行的病毒不佳匹配可能造成次優的疫苗效果(H. Xie et al., H3N2 Mismatch of 2014-15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci. Rep.* 5, 15279 (2015))。此外，數個研究指出，流感疫苗的功效於老年人中顯著降低，老年人發生流感相關併發症的風險增加。參見，例如，H. Chen et al., Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436, 191-192 (2005)；M. T. Osterholm, N. S. Kelley, A. Sommer, E. A. Belongia, Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 12, 36-44 (2012)；及 W. E. Beyer et al., Cochrane re-arranged: support for policies to vaccinate elderly people against influenza. *Vaccine* 31, 6030-6033 (2013)。已廣泛地示性針對來自 A 型及 B 型流感病毒之各種 HAs 的廣泛中和抗體(bnAb)。參見，例如，A. K. Kashyap et al., Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5986-5991 (2008)；M. Throsby et al., Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One* 3, e3942 (2008)；D. Corti et al., A neutralizing antibody selected from

plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850-856 (2011); C. Dreyfus et al., Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science* 337, 1343-1348 (2012); D. C. Ekiert et al., Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science* 324, 246-251 (2009); J. Sui et al., Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 265-273 (2009); D. C. Ekiert et al., A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333, 843-850 (2011); R. H. Friesen et al., A common solution to group 2 influenza virus neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 445-450 (2014); P. S. Lee et al., Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 17040-17045 (2012); and A. Forsman et al., Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J. Virol.* 82, 12069-12081 (2008)。先前，此等 bnAb 已被提議作為老年人及其它高風險人群的預防劑，但此種用途受到以下嚴重阻礙：(i)缺乏足夠的交叉反應性及針對 A 型及 B 型流感病毒的保護，其需要投予至少兩種 bnAb，及(ii)在整個流感季節需要多次高劑量注射來保護。

【0231】本文提出了基於具有抗 A 型及 B 型流感活性的單一抗體樣蛋白質(稱為多域抗體或 MDAb 或 JAb)的黏膜表現的流感預防策略。於在鼻內投予編碼 MDAb 轉基因的重組腺相關病毒(AAV)載體後，MDAb 轉基因於呼吸上皮的表面表現。先前的研究已顯示，於鼻咽黏膜處 AAV 媒介的 bnAb 表現可提供針對 A 型流感病毒感染的長效保護。參見，例如，M. P. Limberis et al., *Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza*. *Sci. Transl. Med.* 5, 187ra72 (2013); 及 V. S. Adam et al., *Adeno-associated virus 9-mediated airway expression of antibody protects old and immunodeficient mice against influenza virus*. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 1528-1533 (2014)。

【0232】A. AAV9 表現的 MD3606 之預防功效

為了評量 AAV-表現的 MD3606(AAV9.MD3606)的活體內保護，我們評估了編碼抗流感抗體(Ab)域的人化序列的重組 AAV9 載體於用適應小鼠的流感 H1N1、H3N2 及 B 病毒攻擊的 BALB/c 小鼠中的預防效力(圖 14A 至 14C)。AAV9.MD3606h 於流感攻擊前 7 日鼻內投予，載體劑量範圍為 4×10^7 至 5×10^9 個基因體拷貝(GC)。投予 5×10^9 GC 完全保護小鼠免受 H1N1 病毒(A/波多黎各/8/34-MA)的致命攻擊，而 8 隻小鼠中的 7 隻小鼠以 5 倍較低劑量存活。以 H3N2 病毒(A/香港/1/68-MA)攻擊的小鼠藉由鼻內投予 5×10^8 GC AAV9.MD3606h(測試的最低

劑量)完全保護。最後，藉由鼻內投予 1×10^9 GC 的 AAV9.MD3606h 完全保護以 B 型流感病毒 (B/Lee/40-MA) 攻擊的小鼠。

【0233】鼻內遞送 AAV9。MD3606h 以低至 5×10^8 GC / 小鼠的載體劑量提供針對 A 型及 B 型流感病毒的全面保護。雖然 MD3606 本身可能用於不需要長期抗體暴露的適應症，如暴露後預防或治療流感，但 AAV 表現的 MD3606 可用於提供持久的抗流感感染的保護。每年一次鼻內投予表現人化 MD3606 的單一 AAV 載體可能足以在整個流感季節提供被動保護。此種預防性方法對於接種效果較差的老年人及其它高風險人群係特別有利。評量此種預防策略的安全性及有效性。隨著 MD3606 對禽流感病毒株前所未有的交叉反應性的快速開始保護，亦提供流感大流行發生後立即之預防性治療，與標準的基於雞蛋的疫苗生產相比，提供了顯著的優勢。

【0234】B. 材料及方法 -AAV9.hJAb 於小鼠中的預防效力

構築並製造表現於雜交巨細胞病毒 (CMV) 增強子 雞 β -肌動蛋白啓動子 (CB7) 控制下的人化 JAb，hJAb 的 AAV9 載體，如先前所述 (M. P. Limberis et al., *Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza*. *Sci. Transl. Med.* 5, 187ra72(2013))。購自美國緬因州巴爾港傑克遜實驗室的六週齡雌性 BALB/c 小鼠飼育於賓夕法尼亞大學轉譯研究實驗室的動物設施中。藉由腹膜內注射 PBS 中的

100mg/kg 氯胺酮 (ketamine)/10mg/kg 甲苯噻嗪 (xylazine) 混合物麻醉小鼠，藉由它們的背側門齒懸掛，其後肢支撐在平台上，並且鼻內投予 AAV9.hJAb 輽體，總體積為 51μl 的 PBS，以三個 17μl 等分試樣於交替的鼻孔中投予。載體投予一週後，稱重經處理及初次接受試驗的小鼠 (naïve mice)，如上所述麻醉，並經鼻內投予攻擊病毒 (5LD₅₀A/ 波多黎各 /8/34-MA H1N1、5LD₅₀A/ 香港 /1/68-MA H3N2 或 5LD₅₀B/Lee/40-MA) 在如上所述的總體積為 51μl 的 PBS 中。每日稱重小鼠並監測疾病或窘迫跡象。表現出行爲困擾或失去 25% 初始體重的動物被安樂死。根據賓夕法尼亞大學機構動物照護及使用委員會的指導方針批准並進行實驗。

【0235】實施例 16-AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 之生產及製造

AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 由外部載體組分及內部 DNA 基因體組成。外部載體組分係血清型 hu68，T = 1 二十面體殼體，由三種 AAV 病毒蛋白質 VP1、VP2 及 VP3 的 60 個拷貝組成，比例為 1：1：18。殼體含有由兩個 AAV 反向末端重複 (ITR) 位於兩翼的 JAb210a 轉基因組成的單股 DNA 基因體。增強子、啓動子、內含子、JAb210a 編碼序列及聚腺苷酸化 (polyA) 信號包含 JAb210a 轉基因。ITR 係於載體生產過程中負責基因體複製及包裝的遺傳元件，且係產生 rAAV 所需的唯一病毒順式元件。JAb210a 編碼序列的表現係由 CB7 啓動子驅動，其係巨細胞病毒 (CMV) 立即早期增強子 (C4) 及雞 β

肌動蛋白啓動子之間的雜合體。雞 β 肌動蛋白內含子(CI)的存在增強此啓動子的轉錄。包括兔 β 球蛋白聚腺苷酸信號以媒介人類 JAb210a mRNA 轉錄物之終止。圖 15 顯示 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載體基因體之示意圖。

【0236】AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 的製造過程涉及以質體 DNA 瞬時轉染人類胚腎(HEK293)細胞。用於生產 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 的 HEK293 主細胞庫(master cell bank, MCB)藉由如 FDA 及 ICH 指南之細節進行測試及鑑定。以聚乙烯亞胺(PEI)媒介的三重轉染於 Corning 36 層 HYPERStacks[®](HS-36)生產批次原料藥物質(Bulk Drug Substance, BDS)。下游製程盡可能使用一次性封閉式生物處理系統(過濾、切向流過濾(tangential flow filtration)及管柱層析)。載體純化涉及數個正交步驟(orthogonal steps)，並將 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 調配於最終調配緩衝液(FFB；總鹽濃度為 200mM, 0.001% (w/v) pluronics F68 及 5% 甘油的 PBS)中。將 BDS 批次冷凍，隨後解凍、合併，調整至目標濃度，通過 0.22 μ m 過濾器並填充於 Daikyo Crystal Zenith[®]2 ml 小瓶(West Pharmaceutical Services, Inc.[®])。填充數據及介質條件係作為批量文檔包之一部分提供。使用多達 50 x HS-36 細胞培養容器的 GMP 生產批次大小，根據需要計劃及使用多個批次以滿足所需的載體量。

【0237】AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 係藉由以下列質體之三重質體轉染人類 HEK 293 MCB 細胞所產生：(i)載體基因體質體，(ii)稱為 pAAVhu68.KanR 的 AAV

輔助質體，其含有 AAV rep2 及 cap hu68 野生型基因，及 (iii) 稱為 pAdΔF6(Kan) 的輔助性腺病毒質體。pAAVhu68.CB7.JAb210a(p3618)包裝的載體基因體的大小為 4718 bp。

【0238】A. AAV 載體基因體質體：pAAV.CB7.JAb210a.rBG (p3618)

構築 AAV 載體基因體質體 pAAV.CB7.CI.JAb210a.rBG (p3618, 圖 16)且大小為 7976 bp。源自該質體的載體基因體係具有 AAV2 衍生的 ITR 於 JAb210a 表現盒兩側的單股 DNA 基因體。來自轉基因盒的表現由 CB7 啓動子、巨細胞病毒(CMV)立即早期增強子(C4)及雞 β 肌動蛋白啓動子之間的雜合體驅動，而來自該啓動子的轉錄經存在雞 β 肌動蛋白內含子(CI)而增強。表現盒的 polyA 信號係兔 β -球蛋白(rBG)polyA。藉由密碼子優化並合成編碼與識別多種流感抗原的 MDAb 樣多肽融合的人 IgG1 FC 區的序列(GeneArt)構築質體，並將生成的構築體選殖到質體 pN469，AAV2 ITR 側翼表現盒中，該質體含有 CB7、CI 及 rBG 表現元件以產生 pAAV.CB7.CI.JAb210a.rBG (p3618)。該質體之所有組成部分均藉由 Qiagen Genomic Services 的直接定序進行驗證，並於 Puresyn 被確認為生產過程的一部分。

【0239】B. 序列元件的描述

反向末端重複(ITR)：AAV ITR(GenBank # NC001401)係兩端相同但方向相反的序列。當 AAV 及腺病毒輔助功能以反式方式提供時，AAV2 ITR 序列同時作為載體 DNA

複製的起點，以及作為載體基因體之包裝信號。如此，ITR 序列代表載體基因體複製及包裝所需的唯一順式序列。

【0240】CMV 立即早期增強子 (382bp, GenBank # K03104.1)。

【0241】雞 β -肌動蛋白啓動子 (282bp; GenBank # X00182.1) 啓動子並用於驅動高水平 Jab210a 表現。

【0242】選擇 CB7 啓動子驅動 hJAb 的表現，因為它產生高水平的氣道特異性表現。已觀察到由 CB7 啓動子驅動的不同轉基因的強烈的及氣道特異性的表現以及包括小鼠、白鼬及 MHP 在內之各種物種之間的良好可轉譯性。

【0243】雞 β -肌動蛋白內含子：來自雞 β -肌動蛋白基因的 973bp 內含子 (GenBank # X00182.1) 存在於載體表現盒中。內含子被轉錄，但藉由剪接自成熟的 mRNA 移除，將兩側序列匯集在一起。已顯示於表現盒中存在內含子有助於將 mRNA 從細胞核轉運至細胞質，如此增進 mRNA 轉譯的穩定水平的累積。此係意圖提高基因表現水平的基因載體中的共同特徵。

【0244】編碼序列：與識別多種流感抗原的 MDAb 樣多肽融合的人類 IgG1 FC 區域係經密碼子優化並合成。藉由對各種流感抗原進行淘選，從美洲駝 VHH 庫中鑑定出原始可變域。流感特異性美洲駝 VHH 鏈完全被人類化。人類化多域多肽之特異性及廣度於人類化製程後保持。多域多肽含有由撓性 Gly-Ser 接頭連接的 4 個可變

重鏈 IgG 域。

【0245】聚腺苷酸化訊息：127bp 的兔 β -球蛋白多腺苷酸化訊息 (GenBank # V00882.1) 為抗體 mRNA 的有效聚腺苷酸化提供順式序列。該元件作為轉錄終止、於新生轉錄物之 3'末端的特異性切割事件及長聚腺苷酸化尾部的添加的訊息。

【0246】C. AAVhu68 輔助質體：pAAV2/hu68.KanR (p0068)

構築 AAV2/hu68 輔助質體 pAAV2/hu68 (Lot# : p0065; 7329bp)。其為編碼來自 AAV 血清型 hu68 之四個野生型 AAV2 rep 蛋白質及三個野生型 AAV VP 蛣體蛋白質之 AAV 輔助質體。從人類心臟組織 DNA 獲得新穎的 AAV 序列並命名為 AAV 血清型 hu68。為了創造嵌合包裝構築體，移除含有野生型 AAV2 rep 及 AAV9 cap 基因之來自質體 pAAV2/9(p0061-2)的 AAV2 cap 基因，並以 AAVhu68 cap 基因質體 pAAV2/hu68 的片段替代 (p0065) (圖 17A)。一般驅動 rep 表現的 AAV p5 啓動子於該構築體中從 rep 的 5'末端移至 cap 的 3'末端。此配置用於在啓動子及 rep 基因之間 (即質體骨架) 引入間隔子，下調 rep 的表現並增加支持載體產生的能力。pAAV2/9 中的質體骨架來自 pBluescript KS。藉由直接定序驗證質體的所有組成部分。然後以卡那黴素 (kanamycin) 抗性基因代替胺苄青黴素 (ampicillin) 抗性基因，得到 pAAV2/hu68n.KanR (p0068) (圖 17B)。藉由經 Qiagen Genomic Services 進行的 DNA 質體定序證實

AAVhu68 裝體基因的同一性。

【0247】D. pAdDeltaF6 (Kan) 腺病毒輔助質體

構建質體 pAdDeltaF6(Kan)，大小為 15,774 bp。該質體含有對於 AAV 複製重要的腺病毒基因體區域，即 E2A、E4 及 VA RNA(腺病毒 E1 功能由 293 細胞提供)，但不包含其它腺病毒複製或結構基因。該質體不含有對於複製至關重要的順式元件，如腺病毒反向末端重複序列，因此預期不會產生感染性腺病毒。其源自於 E1、E3 缺失的 Ad5 分子選殖(pBHG10，一種基於 pBR322 的質體)。於 Ad5 DNA 中導入缺失以去除不必要的腺病毒基因的表現並將腺病毒 DNA 的量自 32 Kb 減至 12 kb(圖 18A)。最後，以卡那黴素抗性基因代替胺苄青黴素抗性基因，得到 pAdDeltaF6(Kan)(圖 18B)。保留於該質體中的 E2、E4 及 VAI 腺病毒基因以及存在於 HEK293 細胞中的 E1 係 AAV 載體生產所必需的。

【0248】E. 細菌種源細胞庫 (Bacterial Master Cell Banks)

藉由混合 1 mL 來自用於質體 DNA 增幅的 1 L 隔夜細菌培養物與等體積之無菌 50% 甘油，製備細菌種源細胞庫 (BMCB) 甘油儲備物。自該混合物製備每構築體兩個 0.5-mL 等份的 BMCB 甘油儲備物，並於 -80°C 下儲存於 Nalgene 低溫小瓶中。為了驗證 BMCB 甘油儲備物，對增幅的質體 DNA 進行結構分析，包括限制性內切酶消化，然後進行凝膠電泳，以及藉由於 Qiagen 進行 Sanger 定序的全質體序列分析。為了製備用於運送至質體 DNA

製造商 (Puresyn) 的細菌工作細胞庫 (BWCB) 甘油儲備物之等分試樣，自 B MCB 甘油儲備物接種 3 mL 培養物並生長隔夜。如上所述，使用 1 mL 隔夜培養物來製備 BWCB 甘油儲備物之等分試樣。藉由對從剩餘的 2 mL 隔夜細菌培養物中提取的 DNA 進行上述結構分析來驗證新的 BWCB 甘油儲備物之等分試樣。質體 DNA 生產商一旦收到，BWCB 甘油儲備物被儲存於 -80°C 的目標特定位置。藉由從冷凍的 BWCB 甘油儲備物刮取而接種製造培養物。

【0249】F. 質體 DNA 製造

所有用於生產用於毒理學/生物分布研究及 1/2 期試驗之 AAV 載體的質體，均由 Puresyn 透過其特殊臨床及 IND-Ready 計劃製作。當超螺旋質體是生產最終產物的中間體時，Puresyn 產生用於重組病毒載體及其它產物之 cGMP 生產的超螺旋質體。該製程中使用的所有生長培養基均為「無動物」(基於每個供應商針對組分產品的分析證書)。該製程使用的所有組分，包括發酵瓶、容器、膜、樹脂、管柱、試管以及與質體接觸的任何組分皆專用於單一質體，且被認證為無 BSE(BSE-free)。無組件為共享的，適當時使用一次性物品。所用的 PolyFlo®樹脂、管柱及利用的組件僅由 Puresyn 公司用於生產單一質體。除了使用專用於特定質體的組件外，該質體於活動 (campaign) 基礎上進行處理。質體的發酵、裂解及純化發生於專用於生產特定質體的房間中。所有房間都標有指定的質體名稱，同時於此等房間內不處理其它質體。

每個質體生產活動之間清潔房間及設備。表 2 紿予每種質體的說明。此外，產生的每種質體於生產重組AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載體之前被完全定序。

【0250】表 2：質體生產釋放說明

參數	說明
外觀	清晰、無色、無可見顆粒
A260 : 280	1.7-2.0
濃度	1.0-1.1mg/mL
DNA 同質性	≥90%全部超螺旋
殘留的 RNA	無可偵測的@ 1.0mg 負載
ssDNA, 線狀 DNA, 染色體 DNA	無可偵測的@ 1.0mg 負載
內毒素	<30EU/mg
同一性	與提供的信息一致
蛋白質	僅供參考
五日生菌試驗(Five day bioburden)	無生長
pH	7.5 - 8.5
調配	TE 緩衝液(10mM Tris, 1.0mM EDTA, pH 8.0-8.1)

【0251】G. 人類胚胎腎 293 種源細胞庫

人類胚胎腎(HEK)293 細胞最初係由 Frank Graham 及其同事以剪切的腺病毒 5 型 DNA 轉形 HEK 細胞而產生 (Graham FL, et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977; 36: 59-74.)。細胞表現高力價 rAAV 生產所需的 E1A 及 E1B 基因產物。HEK293 細胞黏附且可高度轉染，於 DNA 質體轉染後產生高力價的 rAAV。

【0252】H. 製造方法

製造方法流程圖示於圖 19A 至 19B，且表示 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載體生產過程。進入產品製備過程的主要試劑於圖的左側標出，且製程質量評估於圖的右側描述。亦提供每個生產及純化步驟之說明。

產品製造遵循單元操作的線性流程，並使用一次性封閉式生物處理系統，除非另有說明。AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 係於指定生產套件內生產的唯一產品。涉及細胞培養(從細胞接種到上清液收集)的生產過程的所有步驟均使用無菌的一次性使用的一次性試管及袋組件進行無菌操作。細胞於康寧 10 層 CellSTACKs®(CS-10)及 HYPERstack®36 層 (S-36)中培養，所有開放操作均於 ISO Class 5 環境中的 II 級生物安全櫃中進行。純化過程在可能的情況下在封閉系統中進行，然而，管柱層析操作未被視為完全封閉的系統。為了將此種風險降至最低，一次性使用的一次性流動路徑被用作管柱層析生產平台的一部分。管柱層析純化後，產物以 FFB 滲濾。然後 BDS 被冷凍於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。於 BDS 批次經過單獨測試並根據批准的規格進行驗證後，將它們解凍，必要時合併，調整至目標濃度，以最終調配緩衝液，無菌過濾並裝入無菌 Daikyo Crystal Zenith® 2ml 小瓶(West Pharmaceutical Services, Inc.®)容器，裝於它們的填充套件中。無菌過濾中使用的過濾器在使用後進行過濾器完整性測試。填充之後，AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 將進行釋出測試及質量保證(QA)審視。自細胞擴增到最終填充的整個生產過程記錄於執行的批次記錄文件(BRD)中，此等文件於釋出到臨床場所之前，進行人員及 QA 技術審視。

【0253】a. 細胞播種

合格的 HEK293 細胞株用於生產過程。工作細胞庫

(WCB)由完全表徵的 MCB 產生。用於載體生產的細胞培養物從單一解凍的 WCB 小瓶開始，並依據主批次記錄文件 (MBR) 擴展。使用 Corning T-flask 及 CS-10 將細胞擴增至 $5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ 個細胞，其允許產生足夠的細胞質量用於播種高達 45 個 Hyperstack -36(HS-36)以用於每個 BDS 批次的載體生產。將細胞培養於由 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)組成的培養基中，該培養基補充有 10% γ 照射之美國來源的胎牛血清(FBS)。細胞是錨定依賴性，且使用 TrypLETM Select(一種無動物產品的細胞解離試劑)完成細胞解離。細胞接種使用無菌的單次使用的一次性生物處理袋及管組完成。細胞保持於 37 °C (± 2 °C)，於 5% (± 0.5 %) CO₂ 環境。

【0254】b. 瞬時轉染

約 3 日生長後(DMEM 培養基 + 10% FBS)，以新鮮無血清 DMEM 培養基替代 HS-36 細胞培養基，並使用優化的基於聚乙烯亞胺(PEI)的轉染方法，以 3 種生產質體轉染。於此生產過程中使用的所有質體皆於 CMO 質量系統及基礎設施的基礎上生產，此等質量系統及基礎設施採用控制措施以確保可追溯性、文件控制及材料隔離。在 BSC 中製備充足的質體 DNA 轉染複合物以轉染 50 HS-36(每 BDS 批次)。首先製備含有比例為 0.1 : 1 : 2 及 GMP 級 PEI(PEIPro, PolyPlus Transfection SA)的順式(載體基因體)質體、反式(殼體蛋白質基因)質體及輔助(Ad)質體的 DNA/PEI 混合物。於小規模優化研究中確定該質體比率對於 AAV 生產為最佳。充分混合後，將溶液置於

室溫下 25 分鐘，然後加入無血清培養基以終止反應，最後加至 HS-36's。將所有 36 層之 HS-36 之間的轉染混合物均衡化，並將細胞於 37°C (±2°C) 及 5% (±0.5%) CO₂ 環境中培育 5 日。

【0255】c. 細胞培養基收取

藉由將培養基無菌地排出單元，使用一次性生物處理袋從每個 HS-36 收取轉染的細胞和培養基。收取培養基後，加入約 200 升體積的 MgCl₂ 至最終濃度為 2 mM (Benzonase® 的輔因子)，並加入 Benzonase® 核酸酶 (目錄號：1.016797.0001，Merck 集團) 至最終濃度 25 單位/毫升。將產物 (在一次性生物處理袋中) 在 37°C 下在培養箱中溫育 2 小時以提供足夠時間用於消化作為轉染程序的結果存在於收取物中的殘餘細胞和質體 DNA。執行該步驟以使最終載體中殘餘 DNA 的量最小化。培育後，加入 NaCl 至最終濃度為 500 mM 以幫助在過濾及下游切向流過濾期間回收產物。

【0256】d. 澄清

使用串聯連接的深度過濾器膠囊 (1.2/0.22 μm)、作為由蠕動泵驅動的無菌封閉管及袋組，自產物中去除細胞及細胞碎片。澄清可確保下游過濾器及層析管柱免受結垢及生物負荷減少過濾，確保在過濾器序列末端，上游生產過程中可能引入的任何生物負載在下游純化之前被去除。收取物通過 Sartorius Sartoguard PES 膠囊過濾器 (1.2/0.22 μm) (Sartorius Stedim Biotech Inc.)。

【0257】e. 大規模切向流過濾

藉由使用客制的無菌封閉生物處理管、袋及膜組的切向流過濾(TFF)實現澄清產品的體積減少(10倍)。TFF的原理係在平行於適合孔隙率(100kDa)的膜的壓力下流動溶液。壓差驅動較小尺寸的分子通過膜並有效地進入廢物流，同時留住比膜孔更大的分子。藉由再循環溶液，平行流動掃過膜表面，防止膜孔結垢。藉由選擇適合的膜孔徑及表面積，液體樣品的體積可以迅速減小，同時留住及濃縮所需的分子。TFF應用中的滲濾包括以與液體穿過膜和廢物流相同的速率向再循環樣品中加入新鮮緩衝液。隨著滲濾體積的增加，從再循環樣品中去除越來越多量的小分子。此造成澄清產物的適度純化，但亦達成與隨後的親和性管柱層析步驟相容的緩衝液交換。因此，將100kDa的PES膜用於濃縮，然後用至少4體積倍數(diavolumes)的由20mM Tris pH 7.5及400mM NaCl組成的緩衝液滲濾。滲濾後的產品在4°C下儲存隔夜，然後以1.2/0.22μm深度的濾膜進一步澄清以去除任何沉澱物質。

【0258】f. 親和性層析

滲濾後的產物施用於能有效捕獲AAVhu68血清型的Poros TM Capture SelectTM AAV9親和性樹脂(Life Technologies)。於此等離子條件下，相當大比例之殘留細胞DNA及蛋白質流過層析管柱，而AAV顆粒被有效捕獲。施用後，以5倍體積的低鹽Benzonase溶液(2500單位/mL Benzonase，20mM Tris pH 7.5及40mM NaCl，1.5mM MgCl₂)處理管柱以移除任何剩餘的宿主細胞及質

體核酸。洗滌管柱以移除另外的進料雜質，然後進行立即藉由收集到 1/10 體積的中和緩衝液 (Bis Tris Propane, 200mM, pH 10.2) 的低 pH 步驟洗脫 (400mM NaCl, 20mM 檸檬酸鈉, pH 2.5)。

【0259】g. 陰離子交換層析

為了進一步減少包括空 AAV 顆粒的製程中雜質，將 Poros-AAVhu68 洗脫池稀釋 50 倍 (20 mM Bis Tris 丙烷, 0.001% Pluronic F68; pH 10.2) 以降低離子強度以使其能夠結合 CIMultusTM QA 整體矩陣 (BIA Separations)。低鹽洗滌後，使用 60 管柱體積 (CV) NaCl 線性鹽梯度 (10-180mM NaCl) 洗脫載體產物。此種淺鹽梯度有效地將沒有載體基因體 (空顆粒) 的殼體顆粒自含載體基因體的顆粒 (完整顆粒) 中分離出來，並產生富含完整殼體的製劑。將級分 (fraction) 收集到含有 1/100 體積的 0.1% pluronic F68 及 1/27 體積的 Bis-Tris pH 6.3 的無菌聚丙烯管中以分別使與管的非特異性結合及暴露於高 pH 的長度最小化。匯集的完整粒子峰值部分被稀釋 20 倍於 20mM Bis-Tris 丙烷、0.001% Pluronic F68 中；pH 10.2 且重新施用於已經清潔的相同的管柱。重新施用 10-180mM NaCl 鹽梯度並收集適合的完整粒子峰級分。評估峰面積並與之前的數據進行比較以確定近似載體產量。

【0260】h. 最終調配緩衝液 (FFB) 及生物負載減少過濾以產生 BDS

總鹽濃度為 200mM、0.001% (w/v) pluronic F68 及

5% 甘油) 的 PBS 中並濃縮以在所需目標 (即 $4.5-5.5 \times 10^{13}$ GC/ml) 下產生 BDS 中間體。移除樣品於 BDS 中間體試驗。將 BDS 中間體無菌過濾 ($0.22 \mu\text{m}$)，儲存於無菌聚丙烯管中，並在 $\leq -60^\circ\text{C}$ 的隔離區域冷凍，直到最終填充物釋出。

【0261】i. 最終填充

總鹽濃度為 200mM、0.001% (w/v) pluronic F68 及 5% 甘油的 PBS。然後將產物通過 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾器進行最終過濾，並將其填充到滅菌的 Daikyo Crystal Zenith® 2ml 小瓶 (West Pharmaceutical Services, Inc.®) 並加塞子以捲曲封條密封，每個小瓶的填充量為 $\geq 0.5 \text{ mL}$ 至 $\leq 1.0 \text{ mL}$ 。小瓶分別標記。標記的小瓶儲存於 $\leq -60^\circ\text{C}$ 。投予前一些劑量需要於 FFB 中稀釋。於投劑時，稀釋係於臨床現場由配藥進行。

【0262】j. 生物相容性

在劑量水平可能產生變化的問題係於載體儲存及病患投予期間通過與塑料及其它固體表面結合而損失 AAV 載體。於此方面，將臨床上適合的界面活性劑 Pluronic F68 加入到 AAV 載體的最終製劑緩衝液中，預期將此種型式的損失降至最低。

【0263】實施例 17- 免疫缺陷小鼠之 AAVhu68.JAb210a 媒介的 A 型流感的預防

評估了有效預防缺乏功能性免疫系統的小鼠的潛力。使用缺乏成熟 T 細胞或 B 細胞的 Rag KO 小鼠 ($\text{Rag}^{1^{\text{tm1Mom}}}$, Jax 002216)。Rag KO 雌性小鼠 (6-8 週齡)

接受在 PBS 中稀釋的 IN 10^{10} GC 的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 至總體積 $51\mu\text{l}$ ，以 $17\mu\text{l}$ 的三個等分試樣遞送。七日後，以 5LD_{50} 的 PR8 攻擊小鼠。圖 20 顯示載體投予後七日攻擊的 Rag KO 小鼠體重百分比(%)變化的線圖。如 x 軸所示，每天稱重小鼠。基於感染流感攻擊日時的體重計算體重減輕百分比。任何顯示出窘迫跡象或體重減輕 $\geq 30\%$ 的小鼠皆被安樂死。接受 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 的所有 Rag KO 小鼠於 PR8 攻擊中存活。

【0264】然後使受到攻擊存活的 Rag KO 小鼠接受 B 型流感的第二次攻擊。由於 Rag KO 小鼠缺乏功能性免疫系統，此實驗用於解決先前感染對預防隨後的流感攻擊的效力的影響。對照 Rag KO 小鼠接受 10^{10} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 稀釋於 PBS 至總體積為 $51\mu\text{l}$ ，以 $17\mu\text{l}$ 的三個等分試樣遞送，以確認在沒有先前感染的情況下預防針對 B 型流感病毒的效力。七日後，以 5LD_{50} 的 B/Lee/40(圖 21A 和 21B)攻擊包括未處理過的小鼠及存活載體處理的小鼠(先前呈示於圖 20)的小鼠組。

【0265】圖 21A 係顯示以 5LD_{50} B/Lee/40 攻擊的 Rag KO 小鼠的重量百分比(%)變化的線圖。如 x 軸所示，每天稱重小鼠。基於感染流感攻擊日時的體重計算體重減輕百分比。任何顯示出窘迫跡象或體重減輕 $\geq 30\%$ 的小鼠皆被安樂死。存活的小鼠於攻擊後 42 日被犧牲。圖 21B 圖解 B/Lee/40 攻擊後的存活百分比。於沒有先前流感病毒感染的情況下接受 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 載

體的小鼠以 5LD_{50} 之 B/Lee/40 攻擊後存活。然而，此對先前暴露於 PR8 攻擊的小鼠的存活有影響。吾人觀察了給予 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體且以 PR8 攻擊的 Rag KO 小鼠的 80% 存活率。

【0266】實施例 18- AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 的毒性及耐受性；AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 於恒河獼猴之非臨床藥理學/毒性及生物分布研究

【0267】A. 概觀

於此種非臨床藥理學/毒理學研究，恒河獼猴僅接受兩次劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 或媒介物 (FFB) 中的一種之鼻投予作為對照。載體以無菌 1xDPBS + 0.001% Pluronic F-68 稀釋。I 期臨床試驗的臨床載體製劑係最終鹽濃度為 200mM，0.001% (w/v) pluronic F68 和 5% 甘油的 PBS。載體投予後，每日監測非人類靈長類動物 (NHPs) 的一般觀察結果。每兩週對 NHPs 進行監測以獲得全面的臨床病理學 (具有差異的細胞計數、臨床化學及凝血小組) 以及每月對基因轉移載體的免疫反應 [對 AAVhu68 裝體的中和抗體 (NAb)]，以及藉由 IFN- γ ELISPOT 測定評估針對裝體及轉基因的細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 反應]。

【0268】在載體投予後第 28 日及第 90 日完成本研究之生命期後，將獼猴進行屍體解剖以收取組織，以進行全面的組織病理學檢查。從鼻子、氣管及肺的樣品中提取 DNA 和 RNA，分別藉由 qPCR 及 RT-PCR 進行基因體拷貝及轉基因表現分析。JAb210a 表現亦於鼻腔灌洗液

及血清中評估。於屍體解剖時，自肺、脾及骨髓收集淋巴細胞以檢查此等器官中 CTL 的存在。

【0269】B. 輽體

測試物品 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 如實施例 16 所述製造。最終產物於 FFB 中稀釋。生產後載體儲存於 $<-60^{\circ}\text{C}$ 直至投予當日。載體製劑於投劑當日進行。核實製備及稀釋。稀釋的載體保持於濕冰上或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下，直到投劑長達 6 小時。對照動物與不含載體(對照品)的媒介物緩衝液一起投予。此作為本研究的媒介物對照。控制物品於收到時儲存於室溫下直至投予當日。投予後，剩餘的載體製劑及對照製品被保持於 $<-60^{\circ}\text{C}$ 下並重新冷凍。

【0270】依據 SOP 7410，AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 輽體使用 LMA®MAD NasalTM(MAD NasalTM)裝置 (Teleflex, Inc)以非侵入方式遞送至每個鼻孔。MAS NasalTM 將批准的藥物霧化成可被 IN 投予的細霧狀。使用鼻腔直接液體灌注進行其它物種如小鼠的類似研究。然而，經由液體遞送至小鼠鼻腔氣道的基因表現並未相等於使用臨床設備 MAD NasalTM 遞送載體的較高等物種的基因表現。此外，NHP 中的某些毒理學及免疫反應與人類密切相關。

【0271】表 3：恒河獼猴及人類鼻腔表面積和投劑量的比較

	鼻	
	人類(成人)	恒河獼猴 (成猴)(3-6 歲)
表面積(m^2)	0.0181*	0.00616*
遞送體積(μL)	800	272

* Handbook of Toxicology, 第三版, Michael J. Derelanko 編輯, Carol S. Auletta。

【0272】人類鼻子表面積($0.0181m^2$)比恒河獼猴鼻子表面積($0.00616m^2$)約大 2.94 倍(表 3)。因此，建議遞送到 NHP 鼻子的體積為 $0.80mL$ (載體在人體鼻中傳遞的體積) $\div 2.94 = 0.272mL$ 。建議用於人類的最高臨床劑量為 $5 \times 10^{13} GC$ 。當基於恒河獼猴鼻子表面積推算該劑量時，用於恒河獼猴的類似劑量為 $5 \times 10^{13} GC \div 2.94 = 1.7 \times 10^{13} GC$ 。為了提高在獼猴鼻腔內遞送小體積時的準確性，使體積增加至 $0.28mL$ ，以提高 $70\mu L$ 兩個等分試樣的準確性，而不是每個鼻孔 $68\mu L$ ；兩個鼻孔皆被治療。

【0273】C.動物

此研究使用 7 隻雄性及 7 隻雌性恒河獼猴(3-6 歲， $3-10 kg$)，並檢查兩種不同劑量的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG。NHP 的一個組(第 1 組)接受 $1.7 \times 10^{13} GC$ 的 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG，總體積為 $0.28mL$ (作為四個等份 $70\mu L$ 提供)，當基於人類鼻子的表面積外推時(表 3)，表示臨床試驗的最高載體劑量。另一組(第 2 組)之 NHPs 接受 $4.25 \times 10^{13} GC$ 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG，呈總體積 $0.56mL$ 提供(以八個 0.07 毫升的等量試樣給予)。當基於 NHP 鼻子的

表面積外推時，該劑量比臨床試驗之最高載體劑量高 2.5 倍。

【0274】使用 MAD nasal 以 IN 投予載體。以左右鼻孔中提供 0.07mL 等分試樣遞送載體；於 5 分鐘內對 1.7×10^{13} GC 劑量輸送兩個等分試樣於每個鼻孔，且於 5 分鐘內為每 4.25×10^{13} GC 劑量遞送每個鼻孔四個等分試樣。經由鼻道的 IN 途徑被選擇使用，因其為靶向鼻子(疾病目標之臨床部位)的最有效途徑。

【0275】藉由線上程式 Research Randomizer(www.randomizer.org/form.htm)將每種性別的 NHP 隨機分配於三個隊列中的一個隊列。於載體投予之前自至少三個時間點收集血液，並將其送至 Antech GLP 用於具有差異和臨床化學的細胞計數。於開始研究之前至少兩次確定 NAB 力價，分離 PBMC 以提供對載體殼體及轉基因的細胞免疫反應的基線水平。所有基線評估均於開始研究前一個月內完成。

【0276】研究室保持在相對於走廊的正向氣流條件下。研究室獨立提供每小時至少 10 次 100% 新鮮空氣通過過濾器的空氣交換。動物保存室的溫度範圍維持於 64-79°F(18-26°C)，濕度範圍維持於 30-70%。根據 SOP 8026，藉由 Edstrom Watchdog 系統監測溫度、濕度及空氣交換。

【0277】動物於 ABSL-2 條件下單獨放置在不銹鋼籠中，其分別具有 4.3-6.0 平方英尺的地板面積及 30-32 英寸的高度。所有籠子尺寸及住房條件均符合「實驗動物護

理和使用指南」，並符合 SOP 7707 及 7710 標準。飼育房及籠子始終處於鎖住狀態，且只能由授權人員進入。在載體投予之前，將動物個別飼養於 IACUC 批准的豁免以防止血清轉化(發展 AAV 載體殼體特異性 NAB)。依據 SOP 7709，動物可於載體投予後兩週進行配對。依據 SOP 7701，經由人類及相互作用(即，聽覺及視覺刺激)、食物獎勵及操作機器(*manipulanda*)提供動物的行為、情緒及社會需求。操作機器(*manipulanda*)每兩週消毒並旋轉一次。進入設施係藉由鑰匙及徽章讀取進行控制。自動控制的 12 小時光照週期：12 小時黑暗被維持並由建築物自動化系統控制，且由 Edstrom Watchdog System 進行監控。黑暗時期從 1900 小時(± 30 分鐘)開始。根據標準操作規程 7710 及 7711，每日清潔籠子且隔兩週更換及消毒。每隔兩週使用籠子清洗設備對籠子及架子進行一次消毒，且盡可能地防止灰塵、碎屑、廢物、糞便或疾病危險的累積。根據 SOP 7710，動物自由餵食由 PMI 飼料公司(Brentwood, MO)之 Certified Primate Diet 5048。分析通常由飼料供應商進行。水經由自動供水系統隨意飲用。供水來自費城市，並經由反滲透過濾。對於可能的化學污染物(Lancaster Laboratories, 蘭開斯特，賓夕法尼亞州)每年分析處理過的水兩次，且每季檢測一次細菌污染物(QC 實驗室，南安普敦，賓夕法尼亞州)。於整個研究過程中，將認證的濃縮裝置添加到每個研究動物的籠中。污染分析由製造商進行，分析數據可用。每日提供食品強化，如水果、蔬菜、堅果及穀物。

每日提供操作機器，如鑼、鏡子、益智餵食器及葡萄乾球 (raisin ball)。動物亦每日接受視覺強化及與人類互動。根據 SOP 7408，獼猴被麻醉。

【0278】根據 SOP 7408 將獼猴麻醉。如下將載體以 0.28mL 至 0.56mL 的體積投予至鼻中。AAV 載體使用 MAD nasal 遞送。於每個鼻孔中載體以 0.07mL 等份遞送。對於 1.7×10^{13} GC 劑量，每個鼻孔中的兩個等分試樣於 5 分鐘內遞送。對於 4.25×10^{13} GC，每個鼻孔中的四個等分部分在 5 分鐘內遞送。載體投予後，每日監測動物的一般觀察結果。所有觀察結果皆依照 SOP 7404 被記錄。

【0279】藉由每日視覺觀察監測動物的一般外觀、毒性跡象、痛苦及行為變化。所有動物每次麻醉抽血時都要進行身體檢查。於屍體剖檢時，檢查動物的嚴重異常情況。

【0280】D.研究時程

表 4 研究時程

【0281】紅色頂部 (RC)：無抗凝劑；淡紫色頂部 (LT)：EDTA 鉀；綠色頂部 (GT)：肝素；藍色頂部 (BT)：檸檬酸鈉。

NHP 藥理學/毒性及生物分布研究時程				
研究時間點	樣品/程序	第 1 組 A、B、C、D、E、F*	第 2 組 G、H、I、J、K、L*	第 3 組 M、N*
-第 X 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	臨床路徑(基線)(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(基線)(BT)	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	抗體(基線)(RC)	6	6	2
-第 Y 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2

(於研究開始 之一個月間)	免疫學(基線)(PBMC)(GT)	6	6	2
	臨床路徑(基線)(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(基線)(BT)	6	6	2
	PBMC 單離/ELISPOT	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	抗體(基線)(RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
第 0 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	臨床路徑(基線)(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(基線)(BT)	6	6	2
	PBMC 單離/ELISPOT	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	抗體(基線)(RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
	AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, 1.7x10 ¹³ GC in 0.28 mL, IN	6	-	-
	AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG, 4.25x10 ¹³ GC 於 0.56 mL, IN	-	6	-
第 7 日	媒介物對照, 0.28 mL, IN	-	-	2
	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	臨床路徑(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(BT)	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	抗體(RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
第 14 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	免疫學(PBMC)(GT)	6	6	2
	臨床路徑(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(BT)	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	抗體 (RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
第 21 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	臨床路徑(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(BT)	6	6	2
	PBMC 單體/ELISPOT	6	6	2
	抗體 (RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
第 28±3 日	體重、溫度、呼吸頻率、心率	6	6	2
	免疫學(PBMC)(GT)	6	6	2
	臨床路徑(LT, RC)	6	6	2
	凝固盤(BT)	6	6	2

	PBMC 單離/ELISPOT	6	6	2
	淋巴細胞單離 (肺、脾)/ELISPOT	3	3	2
	抗體(RC)	6	6	2
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	6	6	2
	載體排出(尿液及糞便採樣)	6	6	2
	屍體剖檢	3	3	2
	如本文所述收取組織	3	3	2
Day 35	體重、溫度、呼吸頻率、心率	3	3	0
	臨床路徑(LT, RC)	3	3	0
	凝固盤(BT)	3	3	0
	PBMC 單離/ELISPOT	3	3	0
	抗體(RC)	3	3	0
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	3	3	0
Day 42	體重、溫度、呼吸頻率、心率	3	3	0
	免疫學(PBMC)(GT)	3	3	0
	臨床路徑(LT, RC)	3	3	0
	凝固盤(BT)	3	3	0
	載體排出(尿液及糞便採樣)	3	3	0
	抗體(RC)	3	3	0
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	3	3	0
Day 49	體重、溫度、呼吸頻率、心率	3	3	0
	臨床路徑(LT, RC)	3	3	0
	凝固盤(BT)	3	3	0
	PBMC 單離/ELISPOT	3	3	0
	抗體 (RC)	3	3	0
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	3	3	0
Day 90±3	體重、溫度、呼吸頻率、心率	3	3	0
	免疫學(PBMC)(GT)	3	3	0
	臨床路徑(LT, RC)	3	3	0
	凝固盤(BT)	3	3	0
	PBMC 單離/ELISPOT	3	3	0
	淋巴細胞單離 (肺、脾)/ELISPOT	3	3	0
	抗體(RC)	3	3	0
	鼻腔灌洗液及血清用於 JAb210a 蛋白質表現	3	3	0
	載體排出(尿液及糞便採樣)	3	3	0
	屍體剖檢	3	3	0
	如本文所述收取組織	3	3	0

* 猿 猴 於 此 依 序 由 字 母 代 表 。

【0282】該載體使用 MAD NasalTM 進行 IN 投予。載體以 70 μL 等分試樣提供於左右鼻孔；於 5 分鐘內為每個

鼻孔輸送兩個等分試樣用於 1.7×10^{13} GC 劑量，並且在 5 分鐘內為每 4.25×10^{13} GC 劑量遞送每個鼻孔四個等分試樣。此研究選擇 1.7×10^{13} GC 及 4.25×10^{13} GC 的劑量。在臨床試驗的受試者中投予的最高劑量係於 0.80 mL PBS 中的 5×10^{13} GC，使用 MAD NasalTM 以 0.20 mL 等分試樣投予。第 1 組 (1.7×10^{13} GC) 及第 2 組 (4.25×10^{13} GC) 選擇的劑量分別反映了計劃用於臨床試驗的最高劑量， 5×10^{13} GC，以及比臨床試驗計劃的最高劑量高 2.5 倍的劑量。

【0283】每個載體處理組包括六隻動物，雌雄恒河獼猴混合。對照組包括兩隻動物並於第 28 日犧牲。研究於恒河獼猴的鼻氣道中進行，設計用於評估 AAV9 的表現概況，AAV9 係一種非常類似於 AAVhu68 的血清型。利用包括恒河獼猴 AFP(rhAFP) 在內的多種轉基因，當將 AAV 直接施用於鼻子時，建立了 NHP 鼻腔灌洗液中表現動力學的時間表。轉基因表現於載體遞送後第 14 日仍檢測到且於第 14-28 日達到其高峰。然後轉基因表現於第 56 日及第 84 日之間穩定並開始衰減。選擇用於本文描述的本研究的時間點以捕獲基因表現的高峰(第 28 日)以及超過載體表現的高峰(第 90 日)。此等時間點允許於早期時間(第 28 日)隨著基因表現的減少(第 90 日)收集關於載體安全性及毒性的重要資訊。

【0284】於第 0 日的研究，使用 MAD NasalTM 投予獼猴 1.7×10^{13} GC 之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 於鼻中，其總體積為 0.28M1 (70 μL 之四等份) 或 4.25×10^{13} GC

之 AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG，總體積為 0.56mL (70 μ L 之 8 等份)。

【0285】按照標準操作規程對所有動物進行每日存活力檢查。根據標準操作規程，於所有時間點監測並記錄體重、體溫、呼吸頻率及心率。根據標準操作程序 7408 及 7411，將 NHP 麻醉並採集血液。採集的血液用於 CBC、臨床化學及凝血小組檢查。臨床病理學、臨床化學及凝血小組由 Antech GLP 完成。分析動物血液化學及血液分佈的變化。於指定的時間點對來自動物的樣品評估化學成分、具有差異和血小板計數的全血計數(CBC)。依據 SOP 7408 將動物麻醉。可將小兒科 Foley 導管置於其中一個鼻孔中，並且一旦就位，以空氣使氣球膨脹，並且將導管拉回，直到達到阻力。將獼猴的頭/身體傾斜到相應側，然後使用高達 5mL 的 PBS(每個鼻孔)沖洗鼻腔；液體作為液滴被收集在位於相應鼻孔正下方的 Falcon 管中。於該過程結束時，導管被移除並丟棄，且對相鄰的鼻孔重複該程序。將血清分離並等分到標記的微量離心管中。依據 SOP，使用 NAB 分析從指定的時間點在血清上檢查體液免疫反應。依據 SOP 6003，將 PBMC 分離並冷凍保存。依據 SOP 6002，藉由 IFN- γ ELISPOT 分析對 AAVhu68 及 JAb210a 的 T 細胞反應，其中陽性反應標準係斑點形成單位(SFU)/ 10^6 個細胞 > 55 ， $\times 3$ 係培養基陰性對照值(無刺激)。依據 SOP 測定血清 NAB，依據 SOP 6002 進行 IFN- γ ELISPOT 及依據 SOP 藉由 TaqMan qPCR 進行排出的 AAV 載體。依據 SOP 7428，於指定的

時間點採集尿液及糞便樣品，於乾冰上冷凍並儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。提取 DNA 並依照 SOP 3001 的精神進行 TaqMan qPCR 反應，但基於樣本可能需要對程序進行修改。

【0286】於預定的屍體解剖時間點(載體投劑後第 28 日及第 90 日)，依據 SOP 7422 及 7600，將 NHP 安樂死。依據 SOP 7422，藉由缺乏心跳及呼吸來證實死亡。動物進行屍體剖檢，依據 SOP 7600 收取完整病理學組織。亦收集組織以進行生物分布並儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

【0287】收集用於生物分布及組織學的組織，包括心血管系統：心臟、主動脈(胸及腹腔)；消化系統：肝臟(尾狀、左、中、及右葉)、膽囊、食道、胃、十二指腸、空腸、迴腸、盲腸、結腸、胰臟；內分泌系統：腦下垂體、甲狀腺左及右葉、甲狀旁腺、腎上腺(左及右)；造血系統：脾臟、胸腺、淋巴結(腹股溝，左及右)、淋巴結(腸系膜)、淋巴結(腋下，左及右)、骨髓(肋骨)、培氏斑(Peyer's patches)(以腸段收集)；肌肉骨骼系統：骨骼肌(四頭肌)；呼吸系統：鼻竇、篩狀板、鼻中膈、咽、喉、氣管、肺(4 葉)；神經系統：腦(包括大腦[前額葉及枕葉]、中腦、視神經(左及右)、視交叉、小腦、延髓/橋腦、眼睛(左及右，收集於改良的戴維森固定劑(Davison's fixative))；脊髓(頸椎、胸段中部、腰椎)、坐骨神經(左及右)；生殖系統(雄性)：睪丸(左及右、收集於改良的戴維森固定劑)、副睪(左及右)、前列腺；生殖系統(雌性)：卵巢(左及右)、子宮、乳腺(左及右)；泌尿系統：腎臟(左及右)、膀胱；及其它：胸部紋身、皮膚、巨觀(於屍體

剖檢時作出的組織病理學不適用(例如，液體、空氣要素、失去的解剖部分)未收集)。

【0288】將所有組織固定於 10%NBF 或改良的戴維森固定劑中，並依據 SOP 4003、4004、4006 及 4007 進行處理。將屍體剖檢期間觀察到的任何巨觀病變收集並保存於 10%NBF。組織處理、組織病理學評估、T 細胞反應及 RNA 製備藉由以下各自的 SOP 進行。評估組織病理學切片。

【0289】在屍體解剖時，依據 SOP 6004、6005 及 6006 分別收集肺、肝、脾及骨髓，並自各組織分離淋巴細胞。依據 SOP 6002，藉由 IFN- γ ELISPOT 分析對 AAVhu68 及 JAb210a 的 T 細胞反應，其中陽性反應標準為斑點形成單位(SFU)/ 10^6 個細胞 > 55 ， $\times 3$ 為培養基陰性對照值(無刺激)。於屍體解剖時收集組織用於生物分布，在乾冰上冷凍，並儲存於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。若需要，依據 SOP 3001 自組織提取 DNA 並進行 TaqMan qPCR 反應。另外，於屍體解剖時收集組織用於 RNA 表現，於乾冰上冷凍並於 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下儲存。自 100mg 的鼻子、氣管及肺的幾個葉的幾個區域單離經 DNase 處理的總 RNA。藉由分光光度法定量 RNA，並使用隨機引子將等分試樣反轉錄成 cDNA。藉由 qPCR 檢測載體特異性序列(跨越轉基因的區域及 poly A 信號)來量化含有載體衍生的訊息的 cDNA。

【0290】統計分析係於血液化學值上進行。野生型恒河獼猴的正常值範圍係通過採用研究動物預載體投劑(最少兩個基線)收集的所有值的平均值並藉由計算標準

偏差 (SD) 所產生。範圍以平均值 \pm SD 表示。平均值之兩個 SD 之外的值被認為是極端值。

【0291】確定以下臨床化學參數：白蛋白、鹼性磷酸酶 (ALP)、丙氨酸轉氨酶 (ALT)、天冬氨酸氨基轉移酶 (AST)、澱粉酶、膽紅素 (直接)、膽紅素 (全部)、鈣、氯離子、膽固醇、肌酸磷酸激酶 (CPK)、肌酸酐、 γ -麩胺醯基轉移酶 (GGT)、葡萄糖、乳酸脫氫酶 (LD)、脂肪酶、鎂、磷、鉀、鈉、三酸甘油酯、總蛋白質及尿素氮。

【0292】收集血液用於 CBC 及血小板計數並儲存於 2-8°C 下，直至隔夜運送至 Antech GLP。確定以下血液學參數：全血計數、平均血小板體積 (穩定的 8 小時)、紅血球計數、紅血球分佈寬度、血紅素、血細胞比容、平均紅血球體積 (MCV)、平均紅血球血紅素 (MCH)、平均紅細胞血紅素濃度 (MCHC)、血小板計數、白血球計數、白血球差異、及 RBC 形態。

【0293】實施例 19-臨床開發-用於遞送抗流感抗體的 AAV 載體之安全性及耐受性

A. 概觀

正在研究第 1 期臨床試驗以確定 AAV2/hu68 表現的轉基因之適當劑量用於隨後的第 2 期療效評估。臨床開發始於第 1 期劑量遞增試驗，評估單次投予 AAV2/hu68 載體、遞送 JAB210a MDAb，擴大用於最佳劑量的安全性評估。若載體於初始階段第 1 期試驗中具有可接受的安全性及 PK 曲線，則隨後的第 2 期開發可以包括評估載體於安全性、PK 及受控制的流感攻擊模型中的初步效

力。老年族群(65 歲及以上)係該臨床產品開發計劃的目標族群。該載體被預見為具有兩種潛在角色：對流行病的對策及傳統季節性疫苗的替代方法。其作為大流行對策的應用可能係於流感大流行出現期間的儲存或製造活動的背景下進行。第 1 期試驗於美國開始，可能擴展到合格 CRO 進行的第 2 期療效試驗(即攻擊研究)。若健康志願者證明了安全性及初步療效，則於擴大族群之後續試驗將被考慮進一步發展。

【0294】若第 1 期試驗證明可接受的安全性(包括完整的 6 個月安全性數據及所需的臨床前安全性數據)、藥物動力學(PK)及初始免疫學(例如流感中和活性、轉基因表現的水平及持續時間、對殼體及轉基因的免疫反應)概況，進行第 2 期試驗。劑量選自第 1 期試驗，並於受控制的流感攻擊模型中進行測試。第 2 期試驗之目標係評估初步療效並確定載體之有效劑量。

【0295】如實施例 16 所述製備載體。將載體調配為含有總鹽濃度 200mM、0.001% (w/v) pluronic F68 及 5% 甘油(最終製劑緩衝液，FFB)。AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 於以四個劑量水平稀釋到 FFB 後鼻內投予。初始劑量水平根據臨床前療效數據進行選擇，並基於非臨床安全性評估進行改良，最高劑量受限於無 AAV 輽體顆粒聚集時可達到的濃度。經由商業批准的 Teleflex Medical (MAD300)(MAD NasalTM)的 LMA 鼻內黏膜霧化裝置 (IMAD)，以每個鼻孔 0.2ml 的兩個等分試樣投予的劑量範圍為 6.25×10^{12} 個基因體拷貝(GC)至 5×10^{13} GC，

於每個受試者 0.8 毫升。目標將是於投予載體後兩週內在鼻洗滌溶液中測量達到濃度為 $5\text{-}20\text{ ng}/\text{ml}$ 的 JAb210a MDAb。於第 0 日投予四個劑量組中之一個劑量的單一劑量之載體 ($6.25 \times 10^{12}\text{ GC}$ 、 $1.25 \times 10^{13}\text{ GC}$ 、 $2.5 \times 10^{13}\text{ GC}$ 或 $5 \times 10^{13}\text{ GC}$)。監測每個投予方案中之受試者的安全性及免疫原性參數，直至研究第 180 日 (± 2)。

【0296】B.目標

主要目標係老年病患之載體安全性及耐受性基於 CBC、化學物質、尿液分析、局限於鼻腔的局部免疫反應及臨床發現的不良事件的發生來評估。依據 FDA 於 2007 年 9 月公佈的健康成人及青少年志願者入選預防性疫苗臨床試驗的修訂版之毒性分級量表對不良事件進行分級。

【0297】次要目標係評估鼻洗液及血清中流感中和活性之水平及持續時間，例如抗個體遺傳型 ELISA (anti-idiotype ELISA) 及基於抗 HA ELISA 的測定；評估鼻洗液及血清中 JAb210a MDAb 表現的水平及持續時間；評估轉基因及殼體的中和抗體水平；評估藉由 IFN γ ELISPOT 測定法測量的轉基因、JAb210a MDAb 及殼體的細胞反應的水平及載體於鼻、咽、尿、直腸及血液樣品中的排出水平。

【0298】C.研究設計

為評估初步的安全性及耐受性，為了解載體於健康志願者中的藥物動力學，並為進一步發展而選擇劑量水平，進行基於臨床前數據的劑量水平的開放標籤之劑量

遞增試驗。此研究最多招募五組，每組四位受試者。受試者於治療前 4-12 週進行篩選，並追蹤 6 個月。

【0299】健康志願者以載體 IN 治療。研究目標係評估安全性及耐受性，並了解載體之藥物動力學，並為未來發展選擇最佳劑量。

【0300】於劑量遞增之前，使用單個遞增的載體劑量進行開放標籤試驗，對每個劑量組進行正式安全性評估。每組具有四位受試者之 4 組，及適應性擴展至八個之最佳劑量，定義為造成鼻腔灌洗液中產生 5-20 ng/ml 之 MDAb。

【0301】a. 投予

每個志願者 IN 接受一個 0.8 毫升劑量的載體，經由使用批准的 MAD NasalTM 向每個鼻孔兩次連續應用 0.2 ml 於每個鼻孔。多達 24 名志願者被編入五組。1-4 組接受遞增的劑量水平之載體，最終組(第 5 組)於最佳劑量水平(由 1-4 組中的安全性及藥物動力學參數定義)擴展至 8 位志願者。

【0302】使用 MAD 鼻用 TM 於第 0 日投予載體。

第 1 組：劑量 6.25×10^{12} GC；

第 2 組：劑量 1.25×10^{13} GC；

第 3 組：劑量 2.50×10^{13} GC；

第 4 組：劑量 5.00×10^{13} GC；

第 5 組：於最佳劑量水平擴展組

【0303】於每組內的受試者投劑之間需要一週的觀察。於升級至下一劑量之前，於組間總共四週用於評估

安全性數據。

【0304】於載體投予前一晚，受試者被納入研究住院部門。於早上，獲得空腹血液，然後對受試者 IN 投予。前 24 小時經常地監測生命徵象。於代表研究結束的第一、3、7、14 及 28 日以及第 2、4 及 6 個月的時間收集血液、鼻洗液、尿液及直腸拭子以進行安全性測試。樣品用於安全實驗室、檢測載體釋出、轉基因表現評估以及轉基因及載體殼體的免疫原性。

【0305】研究持續時間為載體投予後 6 個月(180 日)。

【0306】停止規則係基於劑量限制性毒性的發生。劑量限制性毒性定義為組中任何一種治療相關的 4 級或任何兩種 3 級治療相關不良事件的發生。於任何關於劑量遞增、組擴展或停止的決定之前，仔細審查所有不良事件。

【0307】表 5

組	活動中的 數量	AAVhu68.CB7.CI.JAb210a.rBG 劑量水平(GC)	欲投予的總體積 (ml)	投予路徑
1	4	6.25×10^{12}	每一鼻孔 0.2ml；施予兩組， 每位受試者共 0.8ml 劑量	IN
2	4	1.25×10^{13}		IN
3	4	2.50×10^{13}		IN
4	4	5.00×10^{13}		IN
5	8	最佳劑量	每一鼻孔 0.2ml；施予兩組， 每位受試者共 0.8ml 劑量	IN
總數	24			

【0308】b. 目標族群，納入/排除標準

診斷及主要納入標準係年齡在 65 歲及以上，體重指數 ≥ 19 至 $\leq 30 \text{ kg/m}^2$ ，體重 ≥ 50 至 $\leq 100 \text{ kg}$ 的健康男性或女

性受試者。具有生育潛力的女性若於研究前具有陰性的血清妊娠測試且正在使用有效的避孕方法(激素，IUD)，則有資格入選。

【0309】納入標準為：65 歲及以上的男性或女性受試者；能夠給予書面知情同意參加；根據病史、體格檢查、生命徵象及基線臨床安全實驗室檢查確定的健康狀況；非習慣性吸煙者(習慣性吸煙者係指每週吸煙超過 4 支香煙或其它煙草製品的人)，並同意於參與期間不使用煙草製品；女性應該符合以下標準之一：停經後至少一年或手術不育。

【0310】排除標準為：季節性花粉熱或季節性過敏性鼻炎或常年性過敏性鼻炎或慢性或鼻竇或竇狀況的顯著病史；於投予載體之前需要治療 1 年的氣喘病史；鼻腔結構異常的受試者包括鼻中隔偏曲及鼻息肉、慢性鼻竇炎、氣喘或 COPD；目前正使用鼻內類固醇；調查員評估存在嚴重失控的醫療或精神疾病(急性或慢性)(此包括但未限於在進行篩選的 3 個月內及在攻擊之前的第 0 日再次確認時，對新的醫學或手術治療的建立或對於不受控制的症狀或藥物毒性的顯著劑量改變)；HIV-1 或 HIV-2 或 HBsAg 或 HCV 抗體陽性血清學；癌症，或治療癌症，3 年內，不包括基底細胞癌或鱗狀細胞癌，此等為允許的；存有免疫抑制或可能與免疫反應受損相關的任何醫學病症，包括但未限於糖尿病；目前在前 3 個月期間接受(或接受的歷史)任何可能不利地影響免疫系統的藥物或其它治療，例如過敏注射，免疫球蛋白、干擾

素、免疫調節劑、細胞毒性藥物或其它已知常與顯著的主要器官毒性相關的藥物，或全身性皮質類固醇(口服或注射)(局部使用皮質類固醇)；研究前一年之藥物或化學濫用史；於載體投予前 30 日內接受任何研究產品或未註冊藥物，或者目前參加任何研究藥物研究，或打算在隨後的研究期內參加此類研究；於研究期間在載體投予或計劃投予前六個月接受血液或血液製品；載體投予前 72 小時內發生的急性疾病，定義為有或無發燒之中度或重度疾病(由研究者透過病史及身體檢查確定)或口腔內測量發燒 $>38^{\circ}\text{C}$ ；懷孕及 / 或哺乳期的女性；血清對 AAV2/hu68 的中和抗體 $>1:80$ ；以及調查員認為可能干擾主要研究目標及評估之任何情況。

【0311】c. 劑量水平測定

初始劑量水平根據臨床前療效數據進行選擇，並依據非臨床安全性評估進行，最高劑量受 AAV 聚集性質的限制。經由 MAD NasalTM，劑量範圍自 6.25×10^{12} 至 5×10^{13} GC/劑量，每個鼻孔以 $2 \times 0.2\text{ml}$ 投予。目標係投予載體兩週後於鼻洗液中具有 $5-20\text{ng}/\text{ml}$ 之 JAb210a MDAb。當調整總體重時，此等劑量顯著低於彼等投予猴子、小鼠及雪貂的劑量。於任何劑量下，於此等物種中進行的任何非臨床研究中皆未觀察到此載體或結構上與用於臨床試驗的載體結構相似之 AAV 輽體的變體之實質毒性。

【0312】d. 劑量投予及持續時間

每個劑量組經由 MAD NasalTM 接受每個鼻孔 0.4ml

的載體。受試者逐一投予。相同劑量組內的治療間隔將由非臨床研究確定(例如 1 週)。一旦一組中的所有受試者皆通過了研究第 14 日，就會審查初步的安全性數據。若未發現安全問題，則開始劑量遞增至下一劑量。於第 4 組完成且最高劑量的初步安全性被證實後，於最佳劑量，為可被投予之最大耐受劑量或最高劑量，編入的第 5 組且為最後一組擴容至共 8 位受試者(即，追加 4 位受試者)。受試者最多為 24。

【0313】e. 建議的臨床調查之期間

知情同意書/HIPAA，人口統計學評估/病史及納入/排除篩查係於 -12 至 -4 週之訪問 0(篩選)進行。

【0314】藥物史及安全實驗室(包括：綜合代謝檢查 [鈉、鉀、氯離子、二氧化碳、葡萄糖、血尿素氮、乳酸脫氫酶、肌酸酐、肌酸磷酸激酶、鈣、總蛋白、白蛋白、AST、ALT、鹼性磷酸酶及總膽紅素]；CBC [白血球計數、血紅素、血容比、血小板計數、紅血球分佈寬度、平均紅血球容積、平均紅血球血紅素及平均紅血球血紅素濃度]；尿液分析 [尿色、濁度、pH、葡萄糖、膽紅素、酮、血液、蛋白質、WBC]；凝血 [PT、INR、PTT]；血清學 (HIVAb、HBsAg、HepCAb、RPR))，於訪問期間檢查，包括於第 -12 至 -4 週訪問 0(篩選)、在第 -4 至 -1 週訪問 1(篩選)、在第 0 日訪問 2、第 7 日訪問 3、第 14 日訪問 4、第 28 日訪問 5、第 2 個月訪問 6、第 4 個月訪問 7、及第 6 個月訪問 8。

【0315】尿妊娠試驗(僅育齡婦女)、避孕諮詢、心電

圖(根據最新的 FDA 指導原則，分析每次就診時 QT 及 QTC 的變化)及肺功能檢查(肺活量測量法(包括肺活量、用力肺活量、於 0.5、1、2 及 3 秒的時間間隔內用力呼氣量(FEV)、用力呼氣流量 25-75%(FEF 25-27)及最大自主通氣量(MVV))，體檢(體重、身高(僅於訪問 1 測量)、BMI)、胸部 X 光檢查(若於篩選後 3 個月內進行胸部 X 光檢查並發現其正常且受試者沒有經歷肺部體徵或症狀)、生命體徵(輸注日期間的生命體徵：輸注前，於投予後 15(± 5)、30(± 5)分鐘及 1(± 10 分鐘)、3(± 10 分鐘)及 6 小時(± 10 分鐘)。包括血壓，心率、溫度、呼吸)、研究血液(T 細胞對殼體及轉基因的反應)、研究鼻洗液(藉由基於細胞的中和測定的 Ab 水平)、研究血清(NAB 對殼體及轉基因，Ab 水平)、高峰鼻呼氣流量(使用便攜式吸氣流量計進行測量，呼氣後，連接有小面罩的儀表水平放置，形成鼻子周圍的氣密密封。然後指示受試者強制並急劇吸氣(約 1 秒)。於每次測試完成後，通過光標在校準刻度上的位置記錄流速。)，及 SNOT-22 問卷(22 點問卷，詢問病患一系列健康及生活品質問題，症狀級數係從 0(沒有症狀)至 5(盡可能的糟糕)，分數係所有選擇的數字的和(最大 110)。病患亦可以標記多達 5 個病患最重要的問題/關切)，於第 -4 至 -1 週之訪問 1(篩選)、第 0 日之訪視 2、第 7 日之訪問 3、第 14 日之訪問 4、第 28 日之訪問 5、第 2 個月之訪問 6、第 4 個月之訪問 7 及第 6 個月之訪問 8 被評量。

【0316】載體投予及編入 24 小時停留於第 0 日之訪問

2 進行。

【0317】於第 0 日之訪問 2、第 7 日之訪問 3、第 14 日之訪問 4、第 28 日之訪問 5、第 2 個月之訪問 6、第 4 個月之訪問 7、第 6 個月之訪問 8，監測不良事件。

【0318】局部及全身反應原性評估於第 0 日訪問 2、第 7 日訪問 3、第 14 日訪問 4、第 28 日訪問 5 進行。

【0319】f. 觀測及測量方法

主要目標係根據發生不良事件及實驗室參數變化以及生命體徵的變化確定載體溶液之單次遞增劑量的安全性及耐受性，自基線至多至治療後 6 個月。安全性評估亦包括載體溶液投予後 14 日之急性期鼻黏膜及肺的反應原性評估。

【0320】次要目標係評估 PK，包括洗鼻液中轉基因的濃度、血清濃度、最大濃度、清除率、排除半衰期；及藉由測量對 IP 所有組分 (AAV2/hu68 膜體、JAb210a MDAb) 的抗體結合及 T 細胞反應來評估單一遞增劑量之免疫原性。

【0321】評估包括血液化學(肝功能測試 [LFT]、肌酸酐)、血液學(全血細胞計數 [CBC] 與差異、血小板、凝血酶原時間/部分凝血活酶時間 (PT/PTT)、肌酸磷酸激酶 (CPK)、肌鈣蛋白 (troponin) 及尿分析，於整個試驗過程中進行評估，於載體溶液投予後的急性/亞急性期更頻繁地進行監測。於整個試驗期間進行血清、鼻腔灌洗及 PBMCs 取樣，用於監測轉基因表現及評估抗體及對轉基因和 AAV2/hu68 膜體的細胞反應。於投予載體溶液之前

對所有女性志願者進行尿液人類絨毛膜促性腺激素(HCG)測試。

【0322】於研究期間(即 6 個月)收集不良事件(AE)及嚴重不良事件(SAE)。

【0323】於整個試驗過程中常規評估藥物動力學(PK)以確定 JAb210a MDAb 表現的動力學。每隔一定時間對鼻清洗液及血清進行採樣，使用分析法藉由質譜及 ELISA 測定 Ab 水平。

【0324】根據常規方法發展質譜、抗個體遺傳型分析、轉基因表現(ELISA)、載體排出的評估。

【0325】g. 載體溶液的投予

載體溶液的投予以兩個連續的 0.2ml 劑量進入每個鼻孔(即總共 0.8ml 的載體溶液)。載體溶液使用由 Teleflex Medical(Teleflex.com)製造的商業上批准的裝置投予。該設備被稱為 LMA MAD Nasal™(鼻腔黏膜霧化裝置)。有關如何最好地使用該設備將「操作指南」。基本上，將受試者置於臥位，並將裝置的尖端放置在每個鼻道(一次一個)的孔處，之後經由注射器將流體推過霧化器遞送載體溶液。

【0326】h. 研究設計及樣品大小決定

劑量遞增方案所基於的主要終點係安全性。安全性監測包括臨床觀察及實驗室檢測結果兩者，並依據 2007 年 9 月 FDA 發布的納入健康成人及青少年志願者的預防性疫苗臨床試驗之毒性分級量表進行分級。唯一的修正係關於評估指引文件中的臨床異常集中於與注射部位有

關的發現上。與近端及遠端呼吸系統臨床發現相關的標準被建立。

【0327】最大耐受劑量(MTD)被定義為低於受試者證明劑量限制性毒性(DLT)的劑量的劑量，為兩名受試者中任何治療相關的3級或一項治療相關的4級事件。承認於所提議的劑量範圍內可能達不到MTD。於此種情形，使用的最高劑量係未來試驗的推薦劑量。至少八個受試者於MTD治療，或者如果未達到MTD，則以最高劑量治療。因此，可能需要增加4位額外的受試者以確保8位受試者於推薦劑量下被治療。

【0328】此設計係標準的「4+4」第I期劑量遞增試驗，每個劑量水平4位病患，於任何水平的劑量限制性毒性(DLT)情況下擴展至每個水平8位病患，規定將推薦劑量的病患擴展至4位額外的病患，以更佳地表徵該水平之最佳劑量及毒性速率。使用劑量群組及病患群組之間至少7日的時間間隔來確保潛在的短期毒性的充分評估。投予後觀察受試者6個月，儘管用於確定MTD是否已經達到及/或遞升至下一劑量的觀察期係來自該組的總體數據，包括於該組之最終受試者後至少14日。

【0329】若組中的0/4受試者經歷3級或4級毒性，則劑量遞升，且接下來的四位受試者於下一個更高劑量下進行治療；若1/4受試者經歷與治療相關的3級毒性，則另外4位受試者以相同劑量治療。若沒有任何其它受試者經歷與3級或4級毒性相關的治療(總共1/8)，則劑量遞升且接下來的四位受試者於下一個較高劑量下接受

治療。若任何其它受試者經歷 3 級或 4 級毒性(共 $> 1/8$)，則另外四位受試者參加較低劑量群組，且若清除則認為是 MTD；若任何受試者經歷與治療相關的 4 級毒性，則不會有更多受試者參加該劑量，且另外 4 位受試者編入此組接受劑量低於 4 級毒性發生以建立 MTD 的劑量。

【0330】i. 安全性及不良事件

未預料到的涉及受試者或其它的問題被定義為符合以下所有標準之任何事件、經驗或結果：性質、嚴重程度或頻率未被預期(即於研究相關文件中未描述，例如 IRB 批准的協議或同意書、調查員手冊等)；與參與研究相關或可能相關(即可能涉及的手段，有合理的可能性，事件經驗或結果可能由研究涉及的程序引起)；及建議研究將受試者或其它人置於更大的傷害風險中(包括身體、心理、經濟或社會傷害)。

【0331】不良事件(AE)係研究過程中嚴重程度發展或惡化之任何症狀、體徵、疾病或經歷。併發疾病或傷害應被視為不良事件。若異常導致診斷程序的異常結果被認為是不良事件：導致研究中止；與嚴重的不良事件有關；與臨床體徵或症狀有關；導致額外的治療或進一步的診斷測試，被研究者認為具有臨床意義。

【0332】不良事件被分類為嚴重或不嚴重。嚴重的不良事件係下列任何 AE：致命、危及生命、需要或延長住院時間、導致持續性或顯著殘疾或無行為能力、先天性異常或出生缺陷、重要的醫療事件。

【0333】重要的醫療事件係彼等可能不會立即威脅生

命的事件，但顯然具有重大的臨床意義。它們可能會危及受試者，且可能需要干預以防止上述其它嚴重後果之一者。例如，藥物過量或濫用、沒有導致住院病人的癲癇發作、或急診部門的支氣管痙攣強化治療一般被認為係嚴重的。

【0334】所有不符合任何嚴重標準之不良事件應視為非嚴重不良事件。

【0335】事先存在的病況係於研究開始時出現的病況。若於研究期間之病況之頻率、強度或病情特徵惡化，則應將事先存在的病況記錄為不良事件。

【0336】於篩選時，應將任何臨床上顯著的異常記錄為事先存在的病況。於研究結束時，任何符合不良事件定義的臨床顯著新發現/異常亦必須記錄並記錄為不良事件。

【0337】所有未解決的不良事件皆由研究者追蹤，直到事件被解決，受試者失去追蹤或不利事件被另外解釋。於最後一次預定訪問時，研究者應指導每位受試者報告受試者或受試者的私人醫師認為可能與本研究合理相關之任何後續事件。研究者應於受試者中斷或終止研究參與之後的任何時間通知研究發起人任何死亡或不良事件，此等事件可能與本研究合理相關。若研究者應該知道於參與本研究的受試者之後計畫的後代中癌症或先天性異常之發生，則亦應通知發起人。

【0338】若符合以下任一條件，臨床實驗室異常被記錄為不良事件：實驗室異常未被重複測試反駁，以確認

異常；此異常暗示疾病及/或器官毒性；此種異常程度要求主動管理；例如劑量變化、停藥、更頻繁的追蹤評估、進一步的診斷調查等。

【0339】任何造成住院或長期住院的不良事件均被記錄並報告為嚴重不良事件，除非另有特別說明。若病況符合標準及不良事件，任何應手術的病況均記錄為不良事件。於以下情況，無論是病況、住院、長期住院，抑或是手術，皆不會被報告為不良事件：住院或長期住院治療先前存在病症之診斷性程序或選擇的手術程序，若手術之目的係選擇性的或診斷性的，且預後是無重大事故的，則手術不應被報告為不良事件的結果；需要住院或長期住院以允許研究的功效測量。

【0340】根據以下描述研究人員負責確保將 AE 記錄於 CRF 的適當頁面：輕度：與通常活動無限制或僅有輕微不適；中度：與通常活動限制有關或與明顯不適有關；嚴重：與無法進行通常活動有關或與非常顯著的不適感與研究藥物的關係有關。

【0341】研究人員依據下列定義確定 AE 與研究藥物的關係：

很可能的：遵循合理的時間順序的反應，從遵循已知的或預期的反應模式之載體溶液的投予至可疑的研究示踪劑；且其不能藉由該受試者/病患的臨床狀態的已知特徵來合理解釋；

可能的：遵循自研究示踪劑投予的合理時間順序的反應；其遵循已知的或預期的對懷疑的研究示踪劑之反

應模式；但此可容易地由許多其它因素產生；

不太可能：不遵循研究示踪劑投予之合理時間順序的反應。然而，不能排除來自載體溶液的因果關係。

無：存有足夠數據指出病因與研究示踪劑無關的反應。

【0342】為確保對受試者的風險降到最低，受試者分別分組編入四至八位受試者參加研究。於組中的所有受試者投予載體溶液後，於組中的最後受試者完成至少 2 週的追蹤且對全部組之主要安全性評估已進行並且檢查之前，不發生於其它組的受試者的投劑。組之成員之間的投劑間隔時間不少於 1 週。於此項研究中，劑量限制性毒性(DLT)被定義為組中的兩種 3 級毒性事件或 4 級事件，其中它們被認為係治療相關的。如上所述，一組中的一位受試者經歷三級治療相關毒性，於該劑量中觸發該劑量的另外四位受試者的劑量，於此組內多達 8 位受試者的劑量。於該劑量下具有治療相關的 3 級毒性的第二位受試者觸發劑量減少，若需要，另外四位受試者以較低劑量治療，以確保總共 8 位受試者被治療；若於此較低劑量下無超過兩個三級及無四級毒性，則被認為 MTD。任何與 4 級毒性相關的治療於在該劑量停止增加，並於較低劑量觸發另外 4 位受試者之增加以幫助建立 MTD。立即報告並評估任何嚴重不良事件與研究治療的關係。若 SAE 被認為係治療相關的，其作為研究的停止標準。

【0343】j. 統計分析

包括圖形方法在內的各種描述性統計被用來概括有效性終點。平均值、標準偏差、中位數及範圍被計算用於測量的連續值。信賴區間適用於產生概括統計。儘管報告了實際的 p 值，但假設檢驗使用 $\alpha=0.05$ 的雙側顯著性水平(I 型誤差)完成。對於測量的連續變量，兩組比較(例如劑量群組之間)通常使用 Wilcoxon 秩和檢定(Wilcoxon rank-sum test)；Wilcoxon 符號秩檢定(Wilcoxon signed-rank test)用於配對數據，諸如肺功能參數的基線變化。使用費雪精準檢定(Fisher's exact test)及使用 McNemar 檢定(McNemar's test)的病患組間比較分類變量。

【0344】本說明書所列出之所有專利、專利公開案及其它出版物，以及標記為「17-7987PCT_ST25.txt」的序列表，及於 2018 年 1 月 17 日申請的美國臨時專利申請號 62/618,443、2017 年 9 月 20 日申請的 62/560,834、於 2017 年 5 月 10 日申請的申請案 62/504,293、以及於 2017 年 2 月 2 日申請的申請案 62/464,753 的優先權申請案，其藉由引用併入本文。儘管已參考特別較佳的具體實施例描述本發明，但應理解，可於不脫離本發明之精神的情況下作修改。此等修改意圖落入所附申請專利範圍的範疇中。

【符號說明】

無。

序列表非關鍵詞文字

於數字標識符號 <223> 下提供包含非關鍵詞文字的序列的下列資訊。

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
1	<223> 第一免疫球蛋白區域之胺基酸序列
2	<223> 第二免疫球蛋白區域之胺基酸序列
3	<223> 第三免疫球蛋白區域之胺基酸序列
4	<223> 第四免疫球蛋白區域之胺基酸序列
5	<p><223> 具 CB7 啓動子及 rBG polyA 的 J210a 載體基因體</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (198)..(579)</p> <p><223> CMV IE 啓動子</p> <p><220></p> <p><221> 增強子</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (279)..(538)</p> <p><223> C4 增強子</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (582)..(862)</p> <p><223> 雞 b-肌動蛋白(CB)啓動子</p> <p><220></p> <p><221> TATA_訊息</p> <p><222> (836)..(839)</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (956)..(1928)</p> <p><223> 雞 β-肌動蛋白 內含子</p> <p><220></p> <p><221> 5'UTR</p> <p><222> (1938)..(1985)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p> <p><220></p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1986)..(1991)</p> <p><223> kozak</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1992)..(2051)</p> <p><223> hmIL2 引導子</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2052)..(2423)</p> <p><223> 第一免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2424)..(2453)</p> <p><223> L1</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2454)..(2822)</p> <p><223> 第二免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2823)..(2852)</p> <p><223> L2</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2853)..(3239)</p> <p><223> 第三免疫球蛋白區域</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3240)..(3269)</p> <p><223> L3</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3270)..(3617)</p> <p><223> 第四免疫球蛋白區域</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3618)..(3632)</p> <p><223> 鋸鏈</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3633)..(4298)</p> <p><223> Fc</p>
	<p><220></p> <p><221> polyA_訊息</p> <p><222> (4374)..(4500)</p> <p><223> 兔球蛋白 polyA</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (4589)..(4718)</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<223> 3' ITR
6	<223> 人類 IL2 (hmIL2)引導子之胺基酸序列
7	<223> 連結子 1 (L1)之胺基酸序列
8	<223> 鉸鏈
9	<223> 合成構築體
10	<223> Fc
11	<223> 合成構築體
12	<223> 人化 FM1W3
13	<p><223> 人化 sdAb 多聚體 J310a</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (17)..(146)</p> <p><223> 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (207)..(1433)</p> <p><223> UbC</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (1527)..(1659)</p> <p><223> Promega 嵌合內含子</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵 詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 5'UTR</p> <p><222> (1726)..(1773)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1774)..(1779)</p> <p><223> kozak</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1780)..(1839)</p> <p><223> hmIL2 引導子</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1840)..(2211)</p> <p><223> 第一免疫球蛋白區域</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2212)..(2241)</p> <p><223> L1</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (2242)..(2610)</p> <p><223> 第二免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2611)..(2640)</p> <p><223> L2</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2641)..(3027)</p> <p><223> 第三免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3028)..(3057)</p> <p><223> L3</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3058)..(3405)</p> <p><223> 第四免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3406)..(3435)</p> <p><223> L4</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3436)..(4101)</p> <p><223> Fc</p> <p><220></p> <p><221> polyA_訊息</p> <p><222> (4119)..(4350)</p> <p><223> SV40 late polyA 訊息</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (4415)..(4544)</p> <p><223> 3' ITR</p>
14	<p><223> CB7_J310a</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (198)..(579)</p> <p><223> CMV IE 啓動子</p> <p><220></p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><221> 啓動子</p> <p><222> (582)..(862)</p> <p><223> CB 啓動子</p>
	<p><220></p> <p><221> TATA_訊息</p> <p><222> (836)..(839)</p> <p><223> TATA</p>
	<p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (956)..(1928)</p> <p><223> 雞 β-肌動蛋白 內含子</p>
	<p><220></p> <p><221> 5'UTR</p> <p><222> (1938)..(1985)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1986)..(1991)</p> <p><223> kozak</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1992)..(2051)</p> <p><223> hmIL2 弓導子</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (2052)..(2423) <223> 第一免疫球蛋白區域
	<220> <221> 各種不能歸類的結合 <222> (2424)..(2453) <223> L1
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (2454)..(2822) <223> 第二免疫球蛋白區域
	<220> <221> 各種不能歸類的結合 <222> (2823)..(2852) <223> L2
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (2853)..(3239) <223> 第三免疫球蛋白區域
	<220> <221> 各種不能歸類的結合

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (3240)..(3269)</p> <p><223> L3</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3270)..(3617)</p> <p><223> 第四免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3618)..(3647)</p> <p><223> L4</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3648)..(4313)</p> <p><223> Fc</p> <p><220></p> <p><221> polyA_訊息</p> <p><222> (4389)..(4515)</p> <p><223> 兔球蛋白 polyA</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (4604)..(4733)</p> <p><223> 3' ITR</p>
15	<223> CB7 J2201

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (198)..(579)</p> <p><223> CMV IE 啓動子</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (582)..(862)</p> <p><223> CB 啓動子</p> <p><220></p> <p><221> TATA_訊息</p> <p><222> (836)..(839)</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (956)..(1928)</p> <p><223> 雞 β-肌動蛋白內含子</p> <p><220></p> <p><221> 5'UTR</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵 詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (1938)..(1985)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1986)..(1991)</p> <p><223> kozak</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1992)..(2051)</p> <p><223> hmIL2 引導子</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2052)..(2423)</p> <p><223> 第一免疫球蛋白區域</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2424)..(2453)</p> <p><223> L1</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2454)..(2822)</p> <p><223> 第二免疫球蛋白區域</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2823)..(2852)</p> <p><223> L2</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2853)..(3239)</p> <p><223> 第三免疫球蛋白區域</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3240)..(3269)</p> <p><223> L3</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3270)..(3617)</p> <p><223> 第四免疫球蛋白區域</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3618)..(3632)</p> <p><223> 鋸鏈</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3633)..(4298)</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<223> Fc <220> <221> polyA_訊息 <222> (4374)..(4500) <223> 兔球蛋白 poly A <220> <221> 重複區域 <222> (4589)..(4718) <223> 3' ITR
16	<223> AAV hu68 vp1
17	<223> 人類腺相關病毒 9 vp1
18	<223> AA Vhu68 vp1 編碼序列
19	<223> 具 UbC 啓動子及 SV40 polyA 的編碼四個免疫球蛋白域之載體基因體 <220> <221> 重複區域 <222> (17)..(146) <223> AAV2-5' ITR <220> <221> 啓動子 <222> (207)..(1433)

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><223> UbC 啓動子, 包括 UB fow 啓動位點</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (1527)..(1659)</p> <p><223> 嵌合內含子</p> <p><220></p> <p><221> 5'UTR</p> <p><222> (1726)..(1773)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1774)..(1779)</p> <p><223> kozak</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1780)..(1839)</p> <p><223> hm IL2 引導子</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1840)..(2111)</p> <p><223> 第一免疫球蛋白區域之編碼區域</p> <p><220></p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2212)..(2241)</p> <p><223> 連結子 L1</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2242)..(2610)</p> <p><223>第二免疫球蛋白區域之編碼序列</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2611)..(2640)</p> <p><223> 連結子 L2</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2641)..(3303)</p> <p><223> Fc1</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3304)..(3315)</p> <p><223> furin</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3316)..(3387)</p> <p><223> 2A</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (3388)..(3447) <223> hm1 IL2 引導子
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (3448)..(3834) <223>第三免疫球蛋白區域之編碼序列
	<220> <221> 各種不能歸類的結合 <222> (3835)..(3864) <223> 連結子序列 L3
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (3865)..(4212) <223>第四免疫球蛋白區域之編碼序列
	<220> <221> 各種不能歸類的結合 <222> (4213)..(4242) <223> 連結子 L4
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (4243)..(4908)</p> <p><223> Fc2</p> <p><220></p> <p><221> polyA_訊息</p> <p><222> (4926)..(5157)</p> <p><223> SV40 late polyA 訊息</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (5222)..(5351)</p> <p><223> AAV2 - 3' ITR</p>
20	<p><213> 人工序列</p> <p><220></p> <p><223>具 TBG 啓動子之載體基因體，BGH polyA</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> AAV2 - 5' ITR</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (205)..(913)</p> <p><223> 甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啓動子</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> TATA_訊息</p> <p><222> (875)..(878)</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (939)..(1071)</p> <p><223> SV40 混雜內含子(SV40 misc intron)</p> <p><220></p> <p><221> 5'UTR</p> <p><222> (1096)..(1143)</p> <p><223> c-myc 5'UTR</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1144)..(1149)</p> <p><223> kozak</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1150)..(1209)</p> <p><223> hmIL2 連結子</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1210)..(1581)</p> <p><223> 用於第一免疫球蛋白區域之編碼序列</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (1582)..(1611)</p> <p><223> 連結子 L1</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1612)..(1980)</p> <p><223> 用於第二免疫球蛋白區域之編碼序列</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (1981)..(1995)</p> <p><223> 銂鏈</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1996)..(2658)</p> <p><223> Fc1</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (2659)..(2670)</p> <p><223> furin</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (2671)..(2742)</p> <p><223> 2A</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2743)..(2802)</p> <p><223> hm IL2 引導子</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (2803)..(3189)</p> <p><223> 用於第三免疫球蛋白區域之編碼序列</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3190)..(3219)</p> <p><223> 連結子序列 L3</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (3220)..(3567)</p> <p><223> 用於第四免疫球蛋白區域之編碼序列</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (3568)..(3582)</p> <p><223> 鋸鏈</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (3583)..(4248) <223> Fc2
	<220> <221> polyA_訊息 <222> (4377)..(4591) <223> 牛生長賀爾蒙(BGH)polyA
	<220> <221> 重複區域 <222> (4679)..(4808) <223> AAV2 - 3'ITR
21	<223> 用於融合蛋白質之 J211 編碼序列
	<220> <221> 5'UTR <222> (1)..(48) <223> c-myc 5'UTR
	<220> <221> 各種不能歸類的特徵 <222> (49)..(54) <223> kozak
	<220>

SEQ ID NO : (包含非關鍵 詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (55)..(114)</p> <p><223> hmIL2 引導子</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (115)..(486)</p> <p><223> 用於第一免疫球蛋白區域之編碼序列</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (487)..(516)</p> <p><223> 連結子序列 L1</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (517)..(885)</p> <p><223> 用於第二免疫球蛋白區域之編碼序列</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (886)..(915)</p> <p><223> 引導子序列 L2</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (916)..(1302)</p> <p><223> 第三免疫球蛋白區域之編碼序列</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (1303)..(1332)</p> <p><223> 連結子序列 L3</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1333)..(1680)</p> <p><223> 用於第四免疫球蛋白區域之編碼序列</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的結合</p> <p><222> (1681)..(1695)</p> <p><223> 鋸鏈</p>
	<p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1696)..(2361)</p> <p><223> Fc</p>
22	<223> 連結子
23	<223> 連結子
24	<223> 連結子
25	<223> 連結子
26	<223> J210a 編碼序列

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
27	<223> 合成構築體
28	<223> 引子 prm504
29	<223> 引子 prm505
30	<p><223> MD3606 之胺基酸序列</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (24)..(147)</p> <p><223> 具 I110M 之第一免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (158)..(280)</p> <p><223> 第二免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (291)..(419)</p> <p><223> 第三免疫球蛋白區域</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (430)..(485)</p> <p><223> 第四免疫球蛋白區域</p> <p><220></p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (551)..(772)</p> <p><223> Fc</p>
31	<p><223> AAV 載體基因體 AAV.CB7.hJAB Fc</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (1)..(130)</p> <p><223> 5' IRT</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (198)..(579)</p> <p><223> CMV IE 啓動子</p> <p><220></p> <p><221> 增強子</p> <p><222> (279)..(538)</p> <p><223> 具 2 個配錯之 C4 增強子</p> <p><220></p> <p><221> 啓動子</p> <p><222> (582)..(862)</p> <p><223> CB 啓動子</p> <p><220></p> <p><221> TATA 訊息</p>

SEQ ID NO : (包含非關鍵詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
	<p><222> (836)..(839)</p> <p><223> TATA</p> <p><220></p> <p><221> 內含子</p> <p><222> (956)..(1928)</p> <p><223> 雞 β-肌動蛋白 內含子</p> <p><220></p> <p><221> 各種不能歸類的特徵</p> <p><222> (1941)..(4259)</p> <p><223> 用於 MD3606 之編碼序列</p> <p><220></p> <p><221> polyA_訊息</p> <p><222> (4346)..(4472)</p> <p><223> 兔球蛋白 poly A</p> <p><220></p> <p><221> 重複區域</p> <p><222> (4561)..(4690)</p> <p><223> 3' ITR</p>
32	<223> MD3606 之編碼序列
33	<223> 間隔子
34	<223> 人類 AAVhu31 vp1
35	<223> 人類 AAVhu32 vp1

SEQ ID NO : (包含非關鍵 詞文字)	於<223>的非關鍵詞文字
36	<223> AAV9 壳體 vp1 編碼序列

序列表

<110> 賓夕法尼亞大學理事會
Janssen Biotech, Inc.

<120> 新穎 AAV 媒介的流感疫苗

<130> 17-7987PCT

<150> 62/464753

<151> 2017-02-28

<150> 62/504293

<151> 2017-05-10

<150> 62/560834

<151> 2017-09-20

<150> 62/618443

<151> 2017-01-17

<160> 36

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第一免疫球蛋白區域之胺基酸序列

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His
85 90 95

Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第二免疫球蛋白區域之胺基酸序列

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly
20 25 30

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
35 40 45

Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65 70 75 80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln
85 90 95

Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第三免疫球蛋白區域之胺基酸序列

<400> 3

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5						10				15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Glu	Asn	Lys
								20					30		

Ala	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val
								35			40		45		

Leu	Cys	Ile	Ser	Lys	Ser	Gly	Ser	Trp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
					55						60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70				75				80		

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
								85		90			95		

Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Gly	Leu	Cys	Trp	Asp	Gly	Thr	Thr	Phe
				100				105				110		

Ser	Arg	Leu	Ala	Ser	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
					115				120			125			

Ser

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 第四免疫球蛋白區域之胺基酸序列

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser
 20 25 30

Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 4718

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具 CB7 啓動子及 rBG polyA 的 J210a 載體基因體

<220>

<221> 重複區域

<222> (1)..(130)

<223> 5' ITR

<220>

<221> 啓動子

<222> (198)..(579)

<223> CMV IE 啓動子

<220>

<221> 增強子

<222> (279)..(538)

<223> C4 增強子

<220>
<221> 啓動子
<222> (582) .. (862)
<223> 雞 b-肌動蛋白(CB) 啓動子

<220>
<221> TATA 訊息
<222> (836) .. (839)

<220>
<221> 內含子
<222> (956) .. (1928)
<223> 雞 β -肌動蛋白內含子

<220>
<221> 5' UTR
<222> (1938) .. (1985)
<223> c-myc 5' UTR

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (1986) .. (1991)
<223> kozak

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (1992) .. (2051)
<223> hML2 引導子

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (2052) .. (2423)
<223> 第一免疫球蛋白區域

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (2424) .. (2453)
<223> L1

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (2454) .. (2822)
<223> 第二免疫球蛋白區域

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (2823) .. (2852)
<223> L2

<220>
<221> 各種不能歸類的特徵
<222> (2853) .. (3239)
<223> 第三免疫球蛋白區域

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3240)..(3269)

<223> L3

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3270)..(3617)

<223> 第四免疫球蛋白區域

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3618)..(3632)

<223> 鉸鏈

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3633)..(4298)

<223> Fc

<220>

<221> polyA_訊息

<222> (4374)..(4500)

<223> 兔球蛋白 polyA

<220>

<221> 重複區域

<222> (4589)..(4718)

<223> 3' ITR

<400> 5

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggccgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcaact 120

aggggttcct ttagttat gattaacccg ccatgctact tatctaccag gtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattt attattgact agttattaaat agtaatcaat 240

tacgggtca ttagttcata gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc cccgcattt acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtat tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttattttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgagggc gggcgggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccctttat ggcgaggcgg cggcgccgc ggccctataa	840
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc	900
cggccggcc tcgcgcccgc cgcggcggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag	960
cggcgggac ggcccttctc ctccggcgtg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt	1020
ttctttctg tggctgcgtg aaagccttga gggctccgg gagggccctt tgtgcgggg	1080
gagcggctcg ggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgt gcggctccgc	1140
gctgcccggc ggctgtgagc gctgcggcgc cggcgcgggg ctttgcgc tccgcagtgt	1200
gcgcgagggg agcgcggcgc gggcggtgc cccgcggtgc gggggggct gcgagggaa	1260
caaaggctgc gtgcgggtg tgtgcgtggg ggggtgagca ggggtgtgg gcgcgtcggt	1320
cgggctgcaa ccccccctgc acccccctcc ccgagttgtc gagcacggcc cggcttcggg	1380
tgcggggctc cgtacggggc gtggcgccgg gctgcgcgtg cggcgggg ggtggcggca	1440
ggtgggggtg cggggcgggg cggggccgccc tcgggcccggg gagggctcgg gggagggcg	1500
cggcggccccc cggagcgcgcg gcggctgtcg aggccgcggc agccgcagcc attgccttt	1560
atggtaatcg tgcgagaggg cgcaggact tcctttgtcc caaatctgtc cggagccgaa	1620
atctggagg cggccgcgc acccccttag cgggcgcggg gcgaagcggt gcggcgcgg	1680
caggaaggaa atggcgggg agggccttcg tgcgtcgccg cggccgcgtc ccctctccc	1740
tctccagcct cggggctgtc cggggggggc cggctgcctt cgggggggac gggcagggc	1800
ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc	1860
cttctcttt ttcctacagc tcctggcaa cgtgcgtgtt attgtgcgt ctcatttcattt	1920
tggcaaagaa ttgcgttagg cacttgcac tggaaacttac aacacccgag caaggacgcg	1980
actctgccac catgtaccga atgcagctgc tgagctgtat cgcactgagc ctggcactgg	2040
tgaccaacag ccaggtgcag ctgggtggaga gcggaggagg agtgggcag ccaggagggaa	2100
gcctgcact gagctgtgca gcaagcatca gcatttcga catctacgca atggactggt	2160
accgacaggc accaggaaag cagcgagagc tgggtggcagt gagcttccga gacggaagca	2220
cctactacgc agacagcgtg aaggacgat tcaccatcag ccgagacaac agcaagaaca	2280
ccctgtacct gcagatgaac agcctgcgag cagaggacac cgcagtgtac tactgtcatg	2340
tgagcctgta ccgggaccacca ctgggagtgg caggaggaat cggagtgtac tggggacagg	2400

gaaccctggt gaccgtgagc agcggaggag gaggaagcgg aggagggagga agcgaagtgc	2460
agctgctgga aagcggcggc ggcctggtgc agcccgccgg cagcctgcgg ctgagctgtg	2520
ctgctagcgg ccggacctac gctatggct gtttcggca ggctcccgcc aaggaacggg	2580
aatttgtggc tgctattaaac gctctggca cccggaccta ttatgctgac agcgtgaagg	2640
gccggtttac cattagccgg gacaacagca agaacaccct gtatctgcag atgaacagcc	2700
tgcgggctga agacaccgct gtgttattatt gtaccgctca gggccagtgg cgggctgctc	2760
ccgtggctgt ggctgctgaa tacgaatttt ggggccaggg caccctggtg accgtgagca	2820
gcggaggagg aggatctgga ggaggaggat ctgaggtgca gctgctggag agcggaggag	2880
gactggtgca gccaggagga agcctgcggc tgagctgcgc cgccagcggta ttcaccctgg	2940
agaacaaggc catcggtgg ttccggcagg ccccaggaaa ggagcgggag ggagtgtgt	3000
gcatcagcaa gagcggaaagc tggacctact acgcccatacg cgtgaaggga cggttcacca	3060
tcagccggga taacagcaag aacaccgtgt acctgcagat gaacagcctg cggccagagg	3120
ataccgcgt gtactactgc gccaccacca cccggggagg aggactgtgc tgggacggaa	3180
ccacccctcag ccggctggcc agcagctggg gacaggaaac cctggtgacc gtgagcagcg	3240
gaggaggagg atccggagga ggaggatccg aggtgcagct ggtggagtca ggaggaggac	3300
tggtgccagcc cggaggatca ctgagactgt cctgcgtgc ttcaggattc accttctcaa	3360
cctcctggat gtattggctg agacaggctc ccggaaaagg actggagtgg gtgtcagtga	3420
tcaacaccga cggaggaacc tattatgctg attcagtgaa aggaagattc accatctcaa	3480
gagataactc aaaaaacacc ctgtatctgc agatgaactc actgagagct gaggataccg	3540
ctgtgttata ttgcgttaaa gattggggag gaccggagcc caccagagga caggaaaccc	3600
tggtgaccgt gtcatcagac aagaccata cctgtccacc ttgtccagca ccagagctgc	3660
tgggaggacc aagcgtgttc ctgttccac caaagccaaa ggacaccctg atgatcagcc	3720
gaaccccaga ggtgacctgt gtgggtgg acgtgagcca tgaggaccca gaggtgaagt	3780
tcaactggta cgtggacgga gtggagggtgc ataacgcaa gaccaagcca cgagaggagc	3840
agtacaacag cacctaccga gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcattcag gactggctga	3900
acggaaagga gtacaagtgt aaggtgagca acaaggcact gccagcacca atcgagaaga	3960
ccatcagcaa ggcaaaggga cagccacgag agccacaggt gtacaccctg ccaccaagcc	4020

gagacgagct gaccaagaac caggtgagcc tgacctgtct ggtgaaggga ttctacccaa	4080
gcgacatcgc agtggagtgg gagagcaacg gacagccaga gaacaactac aagaccaccc	4140
caccagtgct ggacagcgac ggaagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga	4200
gccggtggca gcagggaaac gtgttcagct gtagcgtgat gcacgaggca ctgcataacc	4260
attacaccca gaagagcctg agcctgagcc cagggaaatg ataaagccgc cgccgtaccc	4320
ctagagtcga cccgggcggc ctcgaggacg gggtaacta cgcctgagga tccgatctt	4380
ttccctctgc caaaaattat ggggacatca tgaagccct tgagcatctg acttctggct	4440
aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgaa tttttgtgt ctctcactcg	4500
gaagcaattc gttgatctga atttcgacca cccataatac ccattaccct ggtagataag	4560
tagcatggcg ggttaatcat taactacaag gaaccctag tggatggatt ggccactccc	4620
tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccggc	4680
tttgcggcggg cggcctcagt gagcgagcga gcgccgcag	4718

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IL2 (hIL2) 引導子之胺基酸序列

<400> 6

Met	Tyr	Arg	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu
1				5					10				15		

Val Thr Asn Ser

20

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連結子 1 (L1) 之胺基酸序列

<400> 7

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
1				5					10		

<210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 鋸鏈

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(15)
 <223> 鋸鏈

<400> 8
 gac aag acc cat acc
 Asp Lys Thr His Thr
 1 5

15

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 9
 Asp Lys Thr His Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(666)

<400> 10
 tgt cca cct tgt cca gca cca gag ctg ctg gga gga cca agc gtg ttc
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

48

ctg ttc cca cca aag cca aag gac acc ctg atg atc agc cga acc cca

96

Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
20								25						30		
gag gtg acc tgt gtg gtg gac gtg agc cat gag gac cca gag gtg															144	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
35								40						45		
aag ttc aac tgg tac gtg gac gga gtg gag gtg cat aac gca aag acc															192	
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
50								55						60		
aag cca cga gag gag cag tac aac agc acc tac cga gtg gtg agc gtg															240	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
65								70						75		
ctg acc gtg ctg cat cag gac tgg ctg aac gga aag gag tac aag tgt															288	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
85								90						95		
aag gtg agc aac aag gca ctg cca gca cca atc gag aag acc atc agc															336	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
100								105						110		
aag gca aag gga cag cca cga gag cca cag gtg tac acc ctg cca cca															384	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
115								120						125		
agc cga gac gag ctg acc aag aac cag gtg agc ctg acc tgt ctg gtg															432	
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
130								135						140		
aag gga ttc tac cca agc gac atc gca gtg gag tgg gag agc aac gga															480	
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
145								150						155		
cag cca gag aac aac tac aag acc acc cca cca gtg ctg gac agc gac															528	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	
165								170						175		
gga agc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg															576	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
180								185						190		
cag cag gga aac gtg ttc agc tgt agc gtg atg cac gag gca ctg cat															624	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
195								200						205		
aac cat tac acc cag aag agc ctg agc ctg agc cca gga aag															666	
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
210								215						220		

<210> 11
 <211> 222
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 11

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
1				5				10						15	

Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				20				25				30			

Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
				35			40				45				

Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
				50		55			60						

Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
65				70					75			80			

Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Glu	Tyr	Lys	Cys
				85				90			95			

Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
	100					105						110			

Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
	115				120				125						

Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
	130				135					140					

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
145						150			155			160			

Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	165				170				175						

Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				180				185			190				

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 12

<211> 746

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化FM1W3

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala
 20 25 30

Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala
 35 40 45

Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val
 85 90 95

Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 130 135 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg

145

150

155

160

Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 165 170 175

Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp
 180 185 190

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 195 200 205

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220

Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala
 225 230 235 240

Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Val Gln Leu Leu Glu
 260 265 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 275 280 285

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg
 290 295 300

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser
 305 310 315 320

Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 325 330 335

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 340 345 350

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Gly
 355 360 365

Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser
 370 375 380

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400

 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu
 405 410 415

 Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 420 425 430

 Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 435 440 445

 Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr
 450 455 460

 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 465 470 475 480

 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 485 490 495

 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly
 500 505 510

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 515 520 525

 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 530 535 540

 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 545 550 555 560

 Thr Cys Val Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 565 570 575

 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 580 585 590

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr Val Leu
 595 600 605

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 610 615 620

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 625 630 635 640

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 645 650 655

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 660 665 670

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 675 680 685

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 690 695 700

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 705 710 715 720

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 725 730 735

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 740 745

<210> 13

<211> 4544

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人化 sdAb 多聚體 J310a

<220>

<221> 重複區域

<222> (17)..(146)

<223> 5' ITR

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (207) .. (1433)
 <223> UbC

<220>
 <221> 內含子
 <222> (1527) .. (1659)
 <223> Promega 嵌合內含子

<220>
 <221> 5' UTR
 <222> (1726) .. (1773)
 <223> c-myc 5' UTR

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1774) .. (1779)
 <223> kozak

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1780) .. (1839)
 <223> hmlL2 引導子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1840) .. (2211)
 <223> 第一免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2212) .. (2241)
 <223> L1

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2242) .. (2610)
 <223> 第二免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2611) .. (2640)
 <223> L2

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2641) .. (3027)
 <223> 第三免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3028) .. (3057)
 <223> L3

<220>		
<221>	各種不能歸類的特徵	
<222>	(3058) .. (3405)	
<223>	第四免疫球蛋白區域	
<220>		
<221>	各種不能歸類的結合	
<222>	(3406) .. (3435)	
<223>	L4	
<220>		
<221>	各種不能歸類的特徵	
<222>	(3436) .. (4101)	
<223>	Fc	
<220>		
<221>	polyA_訊息	
<222>	(4119) .. (4350)	
<223>	SV40 late polyA 訊息	
<220>		
<221>	重複區域	
<222>	(4415) .. (4544)	
<223>	3' ITR	
<400>	13	
	taaggcctta attaggctgc gcgctcgctc gctcaactgag gccgcccggg caaagccgg	60
	gcgtcgggcg acctttggtc gcccggcctc agtgagcggag cgagcgcgca gagagggagt	120
	ggccaaactcc atcacttaggg gttccttgtta gttaatgatt aaccggccat gctactttatc	180
	tacgtagcca tgctctagga agatctggcc tccgcgcgg gttttggcgc ctccgcggg	240
	cgccccccctc ctcacggcga gcgctgccac gtcagacgaa gggcgcagga gcgtcctgat	300
	cttccggccc ggacgctcag gacagcggcc cgctgctcat aagactcggc cttagaaccc	360
	cagtagatcagc agaaggacat tttaggacgg gacttgggtg actctagggc actggtttc	420
	tttccagaga gcggaacagg cgagggaaag tagtcccttc tcggcgattc tgccggaggga	480
	tctccgtggg gcggtgaacg ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt ggcacagacta	540
	tttccgtcgc agccgggatt tgggtcgccg ttcttggggatt tggatcgctg tgatcgtcac	600
	ttggtagtgc gcccggctgct gggctggccg gggctttcggt ggcgcggg ccgcgtggc	660
	ggacggaagc gtgtggagag accgccaagg gctgttagtct gggccgcga gcaagggttc	720
	cctgaactgg gggttggggg gagcgcagca aaatggcggc tggccggatc tcttgaatgg	780
	aagacgcttg tgaggcgggc tgtgaggtcg ttgaaacaag gtggggggca tggtaggcgg	840
	caagaaccca aggtctttag gcttcgcta atgcggaaaa gctcttattc gggtgagatg	900

ggctggggca ccatctgggg accctgacgt gaagtttgc actgactgga gaactcggtt	960
tgtcgctgt tgccggggcg gcagttatgc ggtgccgtt ggcagtgcac ccgtacctt	1020
gggagcgcgc gcccctcgctcg tgtcgacg tcacccgttc tgttggctta taatgcaggg	1080
tggggccacc tgccggtagg tgtcggttag gctttctcc gtcgcaggac gcagggttcg	1140
ggccttagggt aggctctcct gaatcgacag ggcgcggacc tctggtgagg ggagggataa	1200
gtgaggcgtc agtttctttg gtcggttta tgtacctatc ttcttaagta gctgaagctc	1260
cggtttgaa ctatgcgctc ggggttggcg agtgtgttt gtgaagttt ttaggcacct	1320
tttgaatgt aatcatttgg gtcaatatgt aattttcagt gtttagactag taaattgtcc	1380
gctaaattct ggccgtttt ggctttttg ttagacgaag ctttattgcg gtagttatc	1440
acagttaaat tgctaacgca gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca	1500
gaagttggc gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag	1560
accaatagaa actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgttctga taggcaccta	1620
ttggtcttac tgacatccac tttgccttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt	1680
acagctctta aggctagagt acttaatacg actcaactata ggctaggcga ctttgcactg	1740
gaacttacaa cacccgagca aggacgcgac tctgccacca tgtaccgaat gcagctgctg	1800
agctgtatcg cactgagcct ggcactggtg accaacagcc aggtgcagct ggtggagagc	1860
ggaggaggag tggtgcagcc aggaggaagc ctgcgactga gctgtgcagc aagcatcagc	1920
atcttcgaca tctacgcaat ggactggta cgcacggcac cagggaaagca gcgcgagctg	1980
gtggcagtga gcttccgaga cggaagcacc tactacgcag acagcgtaa gggacgattc	2040
accatcagcc gagacaacag caagaacacc ctgtacctgc agatgaacag cctgcgagca	2100
gaggacacccg cagtgtacta ctgtcatgtg agcctgtacc gggacccact gggagtgca	2160
ggaggaatcg gagtgtactg gggacaggga accctggta ccgtgagcag cggaggaggag	2220
ggaagcggag gaggaggaag cgaagtgcag ctgctggaaa gcggcggcgg cctggcgcag	2280
cccgccggca gcctgcggct gagctgtgct gctagcggcc ggacctacgc tatggctgg	2340
tttcggcagg ctcccgccaa ggaacggaa tttgtggctg ctattaacgc tctggcacc	2400
cggacctatt atgctgacag cgtgaaggc cggttacca ttagccggaa caacagcaag	2460
aacaccctgt atctgcagat gaacagcctg cggcgtgaag acaccgctgt gtattattgt	2520

accgctcagg gccagtggcg ggctgctccc gtggctgtgg ctgctgaata cgaattttgg	2580
ggccagggca ccctggtgac cgtgacgcgc ggaggaggag gatctggagg aggaggatct	2640
gaggtgcagc tgctggagag cggaggagga ctggcagc caggaggaag cctgcggctg	2700
agctgcgcgg ccagcggatt caccctggag aacaaggcca tcggctggtt ccggcaggcc	2760
ccagggaaagg agcgggaggg agtgctgtgc atcagcaaga gcggaaagctg gacctactac	2820
gccgatacg tgaagggacg gttcaccatc agccggata acagcaagaa caccgtgtac	2880
ctgcagatga acagcctgcg gccagaggat accgcgtgt actactgcgc caccaccacc	2940
gccggaggag gactgtgctg ggacggaacc accttcagcc ggctggccag cagctgggga	3000
cagggAACCC tggtgaccgt gagcagcgg a g g a g g a g g a t c c g a g	3060
gtgcagctgg tggagtcaagg aggaggactg gtgcagcccg gaggatcaact gaga ctgtcc	3120
tgcgctgctt caggattcac cttctcaacc tcctggatgt attggctgag acaggctccc	3180
ggaaaaggac tggagtgggt gtcagtgtac aacaccgacg gaggaaccta ttatgctgat	3240
tcagtgaaag gaagattcac catctcaaga gataactcaa aaaacaccct gtatctgcag	3300
atgaactcac tgagagctga ggataccgct gtgtattatt gcgctaaaga ttggggagga	3360
cccgagccca ccagaggaca gggAACCTG gtgaccgtgt catcaggagg aggaggatca	3420
ggaggaggag gatcctgtcc accttgcac gcaccagagc tgctggagg accaagcgtg	3480
ttcctgttcc caccaagcc aaaggacacc ctgatgatca gccgaacccc agaggtgacc	3540
tgtgtggtgg tggacgtgag ccatgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac	3600
ggagtggagg tgcataacgc aaagaccaag ccacgagagg agcagtacaa cagcacctac	3660
cgagtggta gctgctgac cgtgctgcat caggactggc tgaacggaaa ggagtacaag	3720
tgtaaggtga gcaacaaggc actgccagca ccaatcgaga agaccatcag caaggcaaag	3780
ggacagccac gagagccaca ggtgtacacc ctgccaccaa gccgagacga gctgaccaag	3840
aaccaggta gcctgaccc tctggtaag ggattctacc caagcgacat cgcagtggag	3900
tgggagagca acggacagcc agagaacaac tacaagacca ccccaccagt gctggacagc	3960
gacggaagct tctcctgta cagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcaggaa	4020
aacgtttca gctgtacgt gatgcacgag gcactgcata accattacac ccagaagagc	4080
ctgaggctga gcccaggaaa gtgataaagc ggccgcttcg agcagacatg ataagataca	4140
ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgctt atttgtgaaa	4200

tttgtatgc tattgctta tttgtacca ttataagctg caataaaca gttaacaaca	4260
acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggagggtt ttttaagca	4320
agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcg ataaggatct tcctagagca tggctacgt	4380
gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgtat ggagttggcc	4440
actccctctc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccggc gaccaaaggt cgcccgacgc	4500
ccgggctttg cccggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcag	4544

<210> 14
 <211> 4733
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CB7_J310a

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1)..(130)
 <223> 5' ITR

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (198)..(579)
 <223> CMV IE 啓動子

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (582)..(862)
 <223> CB 啓動子

<220>
 <221> TATA_訊息
 <222> (836)..(839)
 <223> TATA

<220>
 <221> 內含子
 <222> (956)..(1928)
 <223> 雞 β -肌動蛋白內含子

<220>
 <221> 5' UTR
 <222> (1938)..(1985)
 <223> c-myc 5' UTR

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵

<222> (1986) .. (1991)
 <223> kozak

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1992) .. (2051)
 <223> hmIL2 引導子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2052) .. (2423)
 <223> 第一免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2424) .. (2453)
 <223> L1

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2454) .. (2822)
 <223> 第二免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2823) .. (2852)
 <223> L2

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2853) .. (3239)
 <223> 第三免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3240) .. (3269)
 <223> L3

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3270) .. (3617)
 <223> 第四免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3618) .. (3647)
 <223> L4

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3648) .. (4313)
 <223> Fc

<220>
 <221> polyA_訊息

<222> (4389)..(4515)
 <223> 兔球蛋白 polyA

<220>

<221> 重複區域

<222> (4604)..(4733)

<223> 3' ITR

<400> 14

ctgcgcgctc gctcgctcac	tgaggccgcc	cgggcaaagc	ccggcgctcg	ggcgacctt	60	
ggtcgcccgg	cctcagttag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtggccaa	ctccatca	120
aggggttccct	tgttagttaat	gattaacccg	ccatgctact	tatctaccag	gtaatgggg	180
atcctctaga	actatagcta	gtcgacattt	attattgact	agttattaaat	agtaatcaat	240
tacgggtca	ttagttcata	gcccatatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	300
tggcccgcc	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattt	acgtcaataa	tgacgtatgt	360
tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	420
aactgcccac	ttggcagttac	atcaagtgtt	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	480
caatgacgg	aatatggcccg	cctggcatta	tgcccagttac	atgaccttat	gggactttcc	540
tacttggcag	tacatctacg	tattagtcatt	cgctattacc	atggtcgagg	tgagccccac	600
gttctgcttc	actctccca	tctccccccc	ctccccaccc	ccaattttgt	atttatttat	660
tttttaatta	tttttgtcag	cgtatggggc	gggggggggg	ggggggcgcg	cgccaggogg	720
ggcggggcgg	ggcgaggggc	ggggcggggc	gaggcggaga	ggtgcggcgg	cagccaatca	780
gagcggcgcg	ctccgaaagt	ttccctttat	ggcgaggcgg	cgccggcggc	ggccctataa	840
aaagcgaagc	gcgcggcggg	cggagtcgc	tgcgctgc	cttcgccccg	tgcccccgtc	900
cggccggcc	tcgcgcccgc	cgcggcgct	ctgactgacc	gcgttactcc	cacaggtgag	960
cggcgggac	ggcccttctc	ctccggctg	taattagcgc	ttggtttaat	gacggcttgt	1020
ttctttctg	tggctgcgt	aaagccttga	ggggctccgg	gagggccctt	tgtgcgggg	1080
gagcggctcg	gggggtgcgt	gcgtgtgtgt	gtgcgtgggg	agcggcgct	gcggctccgc	1140
gctgcccggc	ggctgtgagc	gctgcggcgc	cggcgccggg	ctttgtgcgc	tccgcagtgt	1200
gcgcgagggg	agcgcggccg	ggggcggtgc	cccgcggtgc	ggggggggct	gcgagggaa	1260
caaaggctgc	gtgcgggttg	tgtgcgtggg	gggggtgagca	gggggtgtgg	gagcgtcggt	1320
cgggctgcaa	ccccccctgc	acccccctcc	ccgagttgt	gagcacggcc	cggttcggg	1380

tgccgggctc cgtacggggc gtggcgccgg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcggca	1440
ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccgccc tcgggcggg gagggctcg gggagggcgc	1500
cggcggccccc cggagcgccg gcggctgtcg aggcgccggc agccgcagcc attgccttt	1560
atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tccttgcgtcc caaatctgtg cggagccgaa	1620
atctgggagg cgccgcccaca cccccccttag cgggcgcggg gcgaagcggt gcggcgccgg	1680
caggaaggaa atgggcgggg agggccttcg tgctcgccg cgccgcccgtc cccttctccc	1740
tctccagcct cggggctgtc cgcgggggaa cggctgcctt cgggggggac gggcaggcgc	1800
ggggttcggc ttctggcggt tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc	1860
cttcttcttt ttcctacagc tcctggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcattcat	1920
tggcaaagaa ttgcgttaggg cactttgcac tggaacttac aacacccgag caaggacgcg	1980
actctgccac catgtaccga atgcagctgc tgagctgtat cgcactgagc ctggcactgg	2040
tgaccaacag ccaggtgcag ctgggggaga gcggaggagg agtggtgcag ccaggaggaa	2100
gcctgcgact gagctgtgca gcaagcatca gcatcttcga catctacgca atggactggt	2160
accgacaggc accaggaaag cagcgagagc tggggcagt gagcttccga gacggaagca	2220
cctactacgc agacagcgtg aaggacgat tcaccatcag ccgagacaac agcaagaaca	2280
ccctgtacct gcagatgaac agcctgcgag cagaggacac cgcagtgtac tactgtcatg	2340
tgagcctgta cggggaccacca ctgggagtgg caggaggaat cggagtgta cggggacagg	2400
gaaccctgggt gaccgtgagc agcggaggag gaggaagcgg aggaggagga agcgaagtgc	2460
agctgctgga aagcggcggc ggcctgggtgc agcccgccgg cagcctgcgg ctgagctgt	2520
ctgctagogg ccggacactac gctatggct gtttcggca ggctcccgcc aaggaacggg	2580
aatttgtggc tgctattaaac gctctggca cccggaccta ttatgctgac agcgtgaagg	2640
gccgggtttac cattagccgg gacaacagca agaacaccct gtatctgcag atgaacagcc	2700
tgccggcgtga agacaccgct gtgtattatt gtaccgctca gggccagtgg cgggctgctc	2760
ccgtggctgt ggctgctgaa tacgaatttt gggccaggc caccctggta accgtgagca	2820
gcggaggagg aggatctgga ggaggaggat ctgaggtgca gctgctggag agcggaggag	2880
gactggtgca gccaggagga agcctgcggc tgagctgcgc cgccagcggta ttcaccctgg	2940
agaacaaggc catcggttgg ttccggcagg ccccaggaaa ggagcgggag ggagtgtgt	3000
gcatcagcaa gagcggaaac tggacctact acgcccatacg cgtgaaggaa cggttccacca	3060

tcagccggga taacagcaag aacaccgtgt acctgcagat gaacagcctg cggccagagg	3120
ataccggcgt gtactactgc gccaccacca ccgcccggagg aggactgtgc tggacggaa	3180
ccacccctcag ccggctggcc agcagctggg gacagggAAC cctggtgacc gtgagcagcg	3240
gaggaggagg atccggagga ggaggatccg aggtgcagct ggtggagtca ggaggaggac	3300
tggtgccagcc cggaggatca ctgagactgt cctgcgctgc ttcaggattc accttctcaa	3360
cctccctggat gtattggctg agacaggctc ccggaaaagg actggagtgg gtgtcagtga	3420
tcaacaccga cggaggaacc tattatgctg attcagtgaa aggaagattc accatctcaa	3480
gagataactc aaaaaacacc ctgtatctgc agatgaactc actgagagct gaggataccg	3540
ctgtgttatta ttgcgctaaa gattggggag gacccgagcc caccagagga cagggAACCC	3600
tggtgaccgt gtcatcagga ggaggaggat caggaggagg aggatcctgt ccacccctgtc	3660
cagcaccaga gctgctggga ggaccaagcg tggccctgtt cccaccaaag ccaaaggaca	3720
ccctgtatgtat cagccgaacc ccagaggtga cctgtgttgt ggtggacgtg agccatgagg	3780
acccagaggt gaagttcaac tggtacggtt acggagtgga ggtgcataac gcaaagacca	3840
agccacgaga ggagcagtac aacagcacct accgagtggtt gagcgtgctg accgtgctgc	3900
atcaggactg gctgaacgga aaggagtaca agttaaggtt gagcaacaag gcactgccag	3960
caccaatcga gaagaccatc agcaaggcaa agggacagcc acgagagcca caggtgtaca	4020
ccctgccacc aagccgagac gagctgacca agaaccaggtt gagcctgacc tggctgggtga	4080
agggattctt cccaaagcgac atcgacgtgg agtggagag caacggacag ccagagaaca	4140
actacaagac caccacca gtcgtggaca gcacggaa ctcttcctg tacagcaagc	4200
tgaccgttga caagagccgg tggcagcagg gaaacgttgtt cagctgttagc gtgtatgcacg	4260
aggcactgca taaccattac acccagaaga gcctgagcct gagccagga aagtataaa	4320
gcggccgcgg tacctctaga gtcgacccgg gcggcctcga ggacgggggtg aactacgcct	4380
gaggatccga tcttttccc tctgcaaaaa attatggggat catcatgaag ccccttgagc	4440
atctgacttc tggctaataa agggaaattttt ttttcattgc aatagtgtgt tggatttttt	4500
tgtgtctctc actcggaagc aattcggttga tctgaatttc gaccacccat aataccatt	4560
accctggtag ataagtagca tggcgggtta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg	4620
gagttggcca ctccctctc ggcgcgtcgc tcgctcactg aggccggcgc accaaaggc	4680

gccccgacgcc cgggcgttgc cccggcggcc tcagttagcg agcgagcgcg cag

4733

<210> 15
 <211> 4718
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CB7 J2201

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (1) .. (130)
 <223> 5' ITR

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (198) .. (579)
 <223> CMV IE 啓動子

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (582) .. (862)
 <223> CB 啓動子

<220>
 <221> TATA_訊息
 <222> (836) .. (839)

<220>
 <221> 內含子
 <222> (956) .. (1928)
 <223> 雞 β -肌動蛋白內含子

<220>
 <221> 5' UTR
 <222> (1938) .. (1985)
 <223> c-myc 5' UTR

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1986) .. (1991)
 <223> kozak

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1992) .. (2051)
 <223> hmIL2 引導子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2052) .. (2423)
 <223> 第一免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2424)..(2453)
 <223> L1

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2454)..(2822)
 <223> 第二免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2823)..(2852)
 <223> L2

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2853)..(3239)
 <223> 第三免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3240)..(3269)
 <223> L3

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3270)..(3617)
 <223> 第四免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3618)..(3632)
 <223> 鋸鏈

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3633)..(4298)
 <223> Fc

<220>
 <221> polyA_訊息
 <222> (4374)..(4500)
 <223> 兔球蛋白 poly A

<220>
 <221> 重複區域
 <222> (4589)..(4718)
 <223> 3' ITR

<400> 15
 ctgcgcgcgtc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccctt 60
 ggtcgccccgg cctcagttag ctagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgttagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaaat agtaatcaat	240
tacgggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc cccgcattt acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	420
aactgcccac ttggcagttac atcaagtgtt tcataatgcca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagttac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac	600
gttctgcttc actctccca tctcccccc ctccccaccc ccaattttgt atttattttat	660
tttttaatta ttttgtgcag cgatggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc gggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccctttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa	840
aaagcgaagc gcgccggcgg cgggagtcgc tgccgcgtgc cttcccccgc tgcccgctc	900
cgccggccgc tcgcgcgcgc cgcccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag	960
cgggcgggac ggcccttctc ctccggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt	1020
ttctttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtcggggg	1080
gagcggctcg ggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtggg agcgcgcgt gcggctccgc	1140
gctgcccggc ggctgtgagc gctgcggcgc cggcgcggg ctttgcgc tccgcagtgt	1200
gcgcgagggg agcgcggcgcg gggcggtgc cccgcgggtc gggggggct gcgcgggaa	1260
caaaggctgc gtgcgggtg tgtgcgtggg ggggtgagca ggggtgtgg gcgcgtcggt	1320
cgggctgcaa ccccccctgc accccccctcc ccgagttgtc gagcacggcc cggcttcggg	1380
tgccgggctc cgtacggggc gtggcgccgg gctcgccgtc ccggcgccgg ggtggcggca	1440
ggtgggggtg ccggcgccggg cggggccgc tcgggcggg gagggctcgg gggagggcgc	1500
cggcgcccc cggagcgcccg cggcgctgtcg aggcgccggc agccgcagcc attgccttt	1560
atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tccttgcctt caaatctgtg cggagccgaa	1620
atctgggagg cgccgcccga cccccccttag cggcgccgg ggcgcgggt gcggcgccgg	1680
caggaaggaa atggcgccggg agggccttcg tgcgtgcgcg cgccgcgtc cccttctccc	1740

tctccagcct cggggctgtc cgcgggggga cggctgcctt cgggggggac gggcaggc	1800
gggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc	1860
cttcttctt ttcctacagc tcctggcaa cgtgctggtt attgtgtt ctcattt	1920
tggcaaagaa ttgcgttaggg cactttgcac tggaaacttac aacacccgag caaggacgcg	1980
actctgccac catgtacccgg atgcagctgc tgagctgcat cgcctgagc ctggccctgg	2040
tgaccaacag ccaggtgcag ctggggaga gcggaggagg agtggtgcag ccaggaggaa	2100
gcctgcggct gagctgcgcc gccagcatca gcatttcga tatctacgcc atggatttgt	2160
accggcaggc cccagggaaag cagcgggagc tggggccgt gagcttccgg gacggaagca	2220
cctactacgc cgatagcgtg aaggacggt tcaccatcag cggataac agcaagaaca	2280
ccctgtacct gcagatgaac agcctgcggg ccgaggatac cgcgtgtac tactgccacg	2340
tgagcctgta cgggatcca ctgggagtgg ccggaggaat cggagtgtac tggggacagg	2400
gaaccctggt gaccgtgagc agcggaggag gaggaagcgg aggaggagga agcgaggtgc	2460
agctgctgga gagcggagga ggactgggtgc agccaggagg aagcctgcga ctgagctgt	2520
cagcaagcgg acgaacctac gcaatggct gttccgaca ggcaccagga aaggagcgg	2580
agttcgtggc agcaatcaac gcactggaa cccgaaccta ctacgcagac agcgtgaagg	2640
gacgattcac catcagccga gacaacagca agaacaccct gtaccgtcag atgaacagcc	2700
tgcgagcaga ggacaccgca gtgtactact gtaccgcaca gggacagtgg cgagcagcac	2760
cagtggcagt ggcagcagag tacgagttct gggacaggg aaccctggg accgtgagca	2820
gcggaggagg aggatctgga ggaggaggat ctgaagtgcg gctgctggaa agcggcggcg	2880
gcctggcgtca gcccggcggc agcctgcggc tgagctgtc tgctagcggc tttaccctgg	2940
aaaacaaggc tattggctgg tttcggcagg ctccggcaa ggaacggaa ggcgtgctgt	3000
gtattagcaa gagcggcagc tggacctatt atgctgacag cgtgaaggc cggtttacca	3060
ttagccggaa caacagcaag aacaccgtgt atctgcagat gaacagcctg cggcccgaaag	3120
acaccgtgt gtattattgt gctaccacca cgcgtggcgg cggcctgtgt tgggacggca	3180
ccacctttag ccggctggct agcagctggg gccaggac cctggtgacc gtgagcagcg	3240
gaggaggagg atccggagga ggaggatccg aggtgcagct ggtggagtca ggaggaggac	3300
tggtgcagcc cggaggatca ctgagactgt cctgcgtgc ttcaggattc accttctcaa	3360
cctcctggat gtattggctg agacaggctc cggaaaagg actggagtgg gtgtcagtga	3420

tcaacaccga	cgaggagaacc	tattatgctg	attcagtcaa	3480
gagataactc	aaaaaacacc	ctgtatctgc	agatgaactc	3540
ctgtgtatta	ttgcgctaaa	gattggggag	gaccggagcc	3600
tggtgaccgt	gtcatcagat	aagaccacaca	cttgcacccacc	3660
tgggaggacc	aagcgtttc	ctgttccac	caaagccaaa	3720
ggaccccaga	ggtgacctgc	gtgggtgtgg	atgtgagcca	3780
tcaactggta	cgtggacgga	gtggaggtgc	acaacgccaa	3840
agtacaacag	cacctaccgg	gtggtgagcg	tgctgaccgt	3900
acggaaagga	gtacaagtgc	aaggtagca	acaaggccct	3960
ccatcagcaa	ggccaaggga	cagccacggg	agccacaggt	4020
gggatgagct	gaccaagaac	caggtgagcc	tgacctgcct	4080
gcgatatcg	cgtggagtgg	gagagcaacg	gacagccaga	4140
caccagtgt	ggatagcgcac	ggaagtttct	tcctgtacag	4200
gccggtggca	gcagggaaac	gtgttcagct	gcagcgtgat	4260
actacaccca	gaagagcctg	agcctgagcc	cagaaagt	4320
ctagagtcga	ccgggcggc	ctcgaggacg	gggtgaacta	4380
ttccctctgc	caaaaattat	ggggacatca	tgaagccct	4440
aataaaggaa	atttattttc	attgcaatag	tgtgtggaa	4500
gaagcaattc	gttgatctga	atttcgacca	cccataatac	4560
tagcatggcg	ggttaatcat	taactacaag	gaacccctag	4620
tctctgcgog	ctcgctcgct	cactgaggcc	ggcgcaccaa	4680
tttgcccggg	cggcctcagt	gagcgagcga	gcgcgcag	4718

<210> 16
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AAV hu68 vp1

<400> 16

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1				5					10				15		
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro
		20						25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
		50			55					60					
Val	Asn	Glu	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
		65			70				75			80			
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
		85			90							95			
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
		100					105					110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro
		115			120							125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	
		130			135							140			
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Gly	Ile	Gly
		145			150				155			160			
Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
		165					170					175			
Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
		180					185					190			
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
		195					200					205			
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
		210			215							220			

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435

440

445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 17

<211> 736

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類腺相關病毒 9 vp1

<400> 17

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100

105

110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320

Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn
				325						330					335
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu
	340					345								350	
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro
						355		360				365			
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp
						370		375				380			
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe
					385		390			395			400		
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu
					405				410				415		
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu
					420		425					430			
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser
					435			440				445			
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser
					450		455				460				
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro
					465		470			475			480		
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn
					485			490				495			
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn
					500			505				510			
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys
					515			520				525			
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly
					530		535				540				

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 18

<211> 2211

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AAVhu68 vp1 編碼序列

<400> 18	
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctcagtga aggcatcgc	60
gagtgggtggg ctttgaacc tggagccctt caacccaagg caaatcaaca acatcaagac	120
aacgctcggg gtcttgtgt tccgggttac aaatacctt gaccggcaa cggactcgac	180
aagggggagc cggtaaacga agcagacgca gcccgcctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgcccga cgccgagttc	300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtttttt gggggcaacc tcggcgagc agtcttccag	360
gccaaaaaga ggcttcttga acctttttt ctgggttggg aagcggctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga ggctgttaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgt gggatttggc	480
aaatcggtt cacagccgc taaaaagaga ctcaatttgc gtcagactgg cgacacagag	540
tcagtccttcc accctcaacc aatcgagaa cctccgcag cccctcagg tgtggatct	600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga	660
gtggtagtt ctcggaaa ttggcattgc gattccaaat ggctggggga cagagtcatc	720
accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaattc	780
tccaaacagca catctggagg atcttcaaatac gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc	840
tggggtagtt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcaaaga	900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt	960
caggtcaaag agttacgga caacaatggc gtcaagacca tcgctaataa cttaccagc	1020
acggtccagg tttcacggc ctcagactat cagctccgt acgtgctcgg gtcggctcac	1080
gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttccctagta cgggtatcta	1140
acgcttaatg atggaagcca agccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc	1200
ccgtcgcaaa tgctaagaac ggttaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta	1260
cctttccata gcagctatgc tcacagccaa agcctggacc gactcatgaa tccactcatc	1320
gaccaatact tgcactatct ctcaaagact attaacgggtt ctggacagaa tcaacaaacg	1380
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaaagaaa ctacataacct	1440
ggaccaggct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa	1500
tttgcttggc ctggagcttc ttcttggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatct	1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tcttcctt gtctggatct	1620
ttaattttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata	1680
accaacgaag aagaaattaa aactaccaac ccagtagcaa cggagtccta tggacaagtg	1740
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccc gctgggttca aaaccaagga	1800
atactccgg gtatggtttgcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttggcc	1860
aaaattcctc acacggacgg caactttcac cttctccgc tggatggagg gtttggaaatg	1920
aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg	1980
gctttcaaca aggacaagct gaactcttc atcaccaggatttctactgg ccaagtcagc	2040
gtggagatttgcgttggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag	2100
tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttgcgtttaatac tgaagggttt	2160
tattctgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgtaa	2211

<210> 19

<211> 5351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具 UbC 啓動子及 SV40 polyA 的編碼四個免疫球蛋白域之載體基因體

<220>

<221> 重複區域

<222> (17) .. (146)

<223> AAV2-5' ITR

<220>

<221> 啓動子

<222> (207) .. (1433)

<223> UbC 啓動子，包括 UB fow 啓動位點

<220>

<221> 內含子

<222> (1527) .. (1659)

<223> 嵌合內含子

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1726) .. (1773)

<223> c-myc 5' UTR

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (1774)..(1779)
 <223> kozak

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1780)..(1839)
 <223> hm IL2 引導子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1840)..(2111)
 <223> 第一免疫球蛋白區域之編碼區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2212)..(2241)
 <223> 連結子 L1

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2242)..(2610)
 <223> 第二免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (2611)..(2640)
 <223> 連結子 L2

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (2641)..(3303)
 <223> Fc1

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3304)..(3315)
 <223> furin

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (3316)..(3387)
 <223> 2A

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3388)..(3447)
 <223> hm1 IL2 引導子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (3448)..(3834)
 <223> 第三免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合

<222> (3835)..(3864)

<223> 連結子序列 L3

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3865)..(4212)

<223> 第四免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (4213)..(4242)

<223> 連結子 L4

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (4243)..(4908)

<223> Fc2

<220>

<221> polyA_訊息

<222> (4926)..(5157)

<223> SV40 late polyA 訊息

<220>

<221> 重複區域

<222> (5222)..(5351)

<223> AAV2 - 3' ITR

<400> 19

taaggcctta attaggctgc gcgcgtcgctc gctcaactgag gccggccggg caaagccogg 60

gcgtcgccgcg acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt 120

ggccaaactcc atcaactaggg gttccttgta gttaatgatt aacccgccat gctacttatac 180

tacgttagcca tgctctagga agatctggcc tccgcgcgg gttttggcgc ctccgcggg 240

cgcccccctc ctcacggcga gcgcgtccac gtcagacgaa gggcgagga gcgtcctgat 300

ccttccggccc ggacgctcag gacagcggcc cgctgctcat aagactcggc cttagaaccc 360

cagtatcagc agaaggacat tttaggacgg gacttgggtg actctagggc actggtttc 420

tttccagaga gcggaacagg cgaggaaaag tagtcccttc tcggcgattc tgccggaggga 480

tctccgtggg gcggtaacg ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt ggcacagcta 540

gttccgtcgc agccgggatt tgggtcgccg ttcttggtt gggatcgctg tgatcgac 600

ttggtgagta gcgggctgct gggctggccg gggctttcgt ggccgcggg ccgctcggtg 660

ggacggaagc gtgtggagag accgccaagg gctgttagtct gggtccgcga gcaaggttgc 720

cctgaactgg gggttggggg gagcgagca aaatggcggc tgttcccgag tcttgaatgg 780

aagacgctt	tgaggcgggc	tgtgaggctcg	ttgaaacaag	gtggggggca	tggtggcgg	840
caagaaccca	aggcttgag	gccttcgcta	atgcggaaa	gctcttattc	gggtgagatg	900
ggctgggca	ccatctgggg	accctgacgt	gaagttgtc	actgactgga	gaactcggtt	960
tgtcgctgt	tgcggggcgc	gcagttatgc	ggtgccgtt	ggcagtgcac	ccgtacctt	1020
gggagcgcgc	gccctcgctcg	tgtcgacg	tcaccgttc	tgtggctta	taatgcaggg	1080
tggggccacc	tgccggtagg	tgtgcggtag	gctttctcc	gtcgaggac	gcagggttcg	1140
ggcctagggt	aggctctcct	aatcgacag	gcccggacc	tctggtggagg	ggagggataa	1200
gtgaggcgtc	agtttcttt	gtcggttta	tgtacctatc	ttcttaagta	gctgaagctc	1260
cggtttgaa	ctatgcgctc	ggggttggcg	agtgtgttt	gtgaagttt	ttaggcacct	1320
tttgaatgt	aatcatttgg	gtcaatatgt	aattttcagt	gttagactag	taaattgtcc	1380
gctaaattct	ggccgtttt	ggctttttg	ttagacgaag	ctttattgcg	gtagtttac	1440
acagttaaat	tgctaacgca	gtcagtgcct	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	1500
gaagttggtc	gtgaggcact	ggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	1560
accaatagaa	actggcctt	tcgagacaga	gaagacttt	gctttctga	taggcaccta	1620
ttggtcttac	tgacatccac	tttgccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	1680
acagctctta	aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctaggca	ctttgcactg	1740
gaacttacaa	cacccgagca	aggacgcgac	tctgccacca	tgtaccggat	gcagctgctg	1800
agctgcacatcg	ccctgagcct	ggccctggtg	accaacagcc	aggtgcagct	ggtggagagc	1860
ggaggaggag	tggtgcagcc	aggaggaagc	ctgcccgtga	gctggccgc	cagcatcagc	1920
atcttcgata	tctacgccat	ggattggta	cggcaggccc	caggaaagca	gcgggagctg	1980
gtggccgtga	gcttcggga	cggaagcacc	tactacgccc	atagcgtaa	gggacggttc	2040
accatcagcc	gggataacag	caagaacacc	ctgtacctgc	agatgaacag	cctgcgggccc	2100
gaggataccg	ccgtgtacta	ctgccacgt	agcctgtacc	gggatccact	gggagtggcc	2160
ggaggaatcg	gagtgtactg	gggacaggga	accctggta	ccgtgagcag	cgaggaggaga	2220
ggaagcggag	gaggaggaag	cgaggtgcag	ctgctggaga	gcggaggagg	actgggtcag	2280
ccaggaggaa	gcctgcgact	gagctgtca	gcaagcggac	gaacctacgc	aatgggctgg	2340
ttccgacagg	caccaggaaa	ggagcgagag	ttcgtggcag	aatcaacgc	actgggaacc	2400
cgaacctact	acgcagacag	cgtgaaggga	cgattcacca	tcagccgaga	caacagcaag	2460

aacaccctgt acctgcagat gaacagcctg cgagcagagg acaccgcagt gtactactgt	2520
accgcacagg gacagtggcg agcagcacca gtggcagtgg cagcagagta cgagttctgg	2580
ggacagggaa ccctggtgc cgtgagcagc ggaggaggag gatctggagg aggaggatct	2640
tgtccaccc tt gtccagcacc agagctgctg ggaggaccaa gcgtgttcct gttcccacca	2700
aagccaaagg acaccctgtat gatcagccga accccagagg tgaccctgtgt ggtgggtggac	2760
gtgagccatg aggacccaga ggtgaagttc aactggtacg tggacggagt ggaggtgcat	2820
aacgcaaaga ccaagccacg agaggagcag tacaacagca cctaccgagt ggtgagcgt	2880
ctgaccgtgc tgcatcagga ctggctgaac ggaaaggagt acaagtgtaa ggtgagcaac	2940
aaggcactgc cagcaccaat cgagaagacc atcagcaagg caaagggaca gccacgagag	3000
ccacaggtgt acaccctgcc accaagccga gacgagctga ccaagaacca ggtgagcctg	3060
acctgtctgg tgaagggatt ctacccaagc gacatcgac tggagtggga gagcaacgga	3120
cagccagaga acaactacaa gaccacccca ccagtgtgg acagcgacgg aagttcttc	3180
ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc cggtggcagc agggaaacgt gttcagctgt	3240
agcgtgatgc acgaggcact gcataaccat tacacccaga agagcctgag cctgagccca	3300
ggacggaagc ggccccccccc agtgaagcag accctgaact tcgatctgct gaagctggcc	3360
ggagacgtgg agagcaaccc aggaccaatg taccggatgc agctgctgct gctgatcgcc	3420
ctgaggctgg ccctggtgc caacagcgaa gtgcagctgc tggaaagcgg cggcggcctg	3480
gtgcagcccg gcggcagcct gcggctgagc tgtgctgcta gcggctttac cctggaaaac	3540
aaggctattt gctggtttcg gcaggctccc ggcaaggaac gggaggcgt gctgtgtatt	3600
agcaagagcg gcagctggac ctattatgct gacagcgtga agggccgggtt taccattagc	3660
cgggacaaca gcaagaacac cgttatctg cagatgaaca gcctcgcc cgaagacacc	3720
gctgtgtatt attgtgctac caccaccgct ggccggccccc tgtgttgga cggcaccacc	3780
tttagccggc tggctagcag ctggggccag ggcaccctgg tgaccgttag cagcggagga	3840
ggaggatccg gaggaggagg atccgaggtg cagctggtag agtcaggagg aggactgg	3900
cagcccgag gatcactgag actgtcctgc gctgcttcag gattcacctt ctcaacctcc	3960
tggatgtatt ggctgagaca ggctcccgga aaaggactgg agtgggtgtc agtcatcaac	4020
accgacggag gaacctatta tgctgattca gtgaaaggaa gattcaccat ctcaagagat	4080

aactcaaaaa acaccctgta tctgcagatg aactcactga gagctgagga taccgctgtg	4140
tattattgcg ctaaagattg gggaggaccc gagcccacca gaggacaggg aaccctggtg	4200
accgtgtcat caggaggagg aggatcagga ggaggaggat cctgcccacc ttgcccagcc	4260
ccagagctgc tgggaggacc aagcgtgttc ctgttcccac caaagccaaa ggataccctg	4320
atgatcagcc ggaccccaga ggtgacctgc gtggtggtgg atgtgagcca cgaggatcca	4380
gaggtgaagt tcaactggta cgtggacgga gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagcca	4440
cgggaggagc agtacaacag cacctaccgg gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcaccag	4500
gattggctga acggaaagga gtacaagtgc aaggtgagca acaaggccct gccagcccc	4560
atcgagaaga ccatcagcaa gcccaaggga cagccacggg agccacaggt gtacaccctg	4620
ccaccaagcc gggatgagct gaccaagaac caggtgagcc tgacctgcct ggtgaaggga	4680
ttctacccaa gcgatatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gacagccaga gaacaactac	4740
aagaccaccc caccagtgct ggatagcgac ggaagcttct tcctgtacag caagctgacc	4800
gtggataaga gccgggtggca gcagggaaac gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc	4860
ctgcacaacc actacacccca gaagagcctg agcctgagcc cagggaaagtg ataaagcggc	4920
cgcttcgagc agacatgata agatacattt atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc	4980
agtaaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta	5040
taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg	5100
gggagatgtg ggaggtttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt aaaatcgata	5160
aggatcttcc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac	5220
aaggaacccc tagtcatgg gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gtcactgag	5280
gccgggacac caaagggtcgc ccgacgccccggcgtttgccc gggggccctc agtgagcgag	5340
cgagcgcgca g	5351

<210> 20

<211> 4808

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具 TBG 啓動子之載體基因體, BGH polyA

<220>

<221> 重複區域
 <222> (1).. (130)
 <223> AAV2 - 5' ITR

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (205).. (913)
 <223> 甲狀腺素結合球蛋白 (TBG) 啓動子

<220>
 <221> TATA_訊息
 <222> (875).. (878)

<220>
 <221> 內含子
 <222> (939).. (1071)
 <223> SV40 混雜內含子 (SV40 misc intron)

<220>
 <221> 5' UTR
 <222> (1096).. (1143)
 <223> c-myc 5' UTR

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1144).. (1149)
 <223> kozak

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1150).. (1209)
 <223> hmIL2 連結子

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1210).. (1581)
 <223> 用於第一免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (1582).. (1611)
 <223> 連結子 L1

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (1612).. (1980)
 <223> 用於第二免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>
 <221> 各種不能歸類的結合
 <222> (1981).. (1995)
 <223> 鋸鏈

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵

<222> (1996)..(2658)

<223> Fc1

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (2659)..(2670)

<223> furin

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (2671)..(2742)

<223> 2A

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (2743)..(2802)

<223> hm IL2 引導子

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (2803)..(3189)

<223> 用於第三免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (3190)..(3219)

<223> 連結子序列 L3

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3220)..(3567)

<223> 用於第四免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (3568)..(3582)

<223> 鋸鏈

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (3583)..(4248)

<223> Fc2

<220>

<221> polyA 訊息

<222> (4377)..(4591)

<223> 牛生長賀爾蒙(BGH) polyA

<220>

<221> 重複區域

<222> (4679)..(4808)

<223> AAV2 - 3' ITR

<400> 20

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctcg ggcgaccttt

60

ggtcgccccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatca	120
aggggttcct ttagttat gattaaccgg ccatgctact tatctacgtt gccatgctt	180
aggaagatcg gaattcgccc ttaagcttagc aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc	240
caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca	300
caaacattcc agatccaggta taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg	360
cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa cattccagat	420
ccggcgcgccc agggctggaa gctacctttg acatcatttc ctctgcgaat gcatgtataa	480
tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgcataa ctttccctta	540
aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagttag aacttttcc tgctgcctct	600
tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactttgcc agcatggact	660
taaacccttc cagctctgac aatcctcttt ctctttgtt ttacatgaag ggtctggcag	720
ccaaagcaat cactcaaagt tcaaaccctt tcaaaaaatg ctttgcctt cttggccttgc	780
gttttgcata tcaagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctgggtt aatttataac	840
taagagtgtt ctagtttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga tgggttttc	900
ttagagactg cagaagttgg tcgtgaggca ctggcaggta aagtatcaag gttacaagac	960
agggttaagg agaccaatag aaactggct tgcgtggaca gagaagactc ttgcgtttct	1020
gataggcacc tattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca ggtgtccagg	1080
cgcccaattc gtcttagggca ctttgcactg gaacttacaa caccggagca aggacgcgac	1140
tctgcacca tttatcgat gcagctgctg agctgtattt ctctgagcct ggctctggtg	1200
accaacagcc aggtgcagct ggtggaaagc ggccggccggc tgggtgcagcc cggccggcagc	1260
ctgcggctga gctgtgctgc tagcattagc atttttgaca tttacgctat ggactggat	1320
cgccaggctc cccggcaagca gcgggaactg gtggctgtga gctttcggtt cggcagcacc	1380
tattatgctg acagcgtgaa gggccgggtt accattagcc gggacaacag caagaacacc	1440
ctgtatctgc agatgaacag cctgcggct gaagacacccg ctgtgtattt ttgtcatgtt	1500
agcctgtatc gggacccctt gggcgtggct ggccggcattt gcgtgtattt gggccaggc	1560
accctgggtga ccgtgaggcag cggaggagga ggaagcggag gaggaggaag cgagggtgcag	1620
ctgctggaga gggaggaggactgggtgcag ccaggagggaa gcctgcgact gagctgtgca	1680

gcaagcggac	gaacctacgc	aatgggctgg	ttccgacagg	caccaggaaa	ggagcgagag	1740
ttcgtggcag	caatcaacgc	actggaaacc	cgaacctact	acgcagacag	cgtgaaggga	1800
cgattcacca	tcagccgaga	caacagcaag	aacaccctgt	acctgcagat	gaacagcctg	1860
cgagcagagg	acaccgcagt	gtactactgt	accgcacagg	gacagtggcg	agcagcacca	1920
gtggcagtgg	cagcagagta	cgagttctgg	ggacagggaa	ccctggtgac	cgtgagcagc	1980
gacaagaccc	atacctgtcc	accttgtcca	gcaccagagc	tgctgggagg	accaagcgtg	2040
ttcctgttcc	caccaaagcc	aaaggacacc	ctgatgatca	gccgaacccc	agaggtgacc	2100
tgtgtggtgg	tggacgtgag	ccatgaggac	ccagaggtga	agttcaactg	gtacgtggac	2160
ggagtgagg	tgcataacgc	aaagaccaag	ccacgagagg	agcagtacaa	cagcacctac	2220
cgagtggtga	gcgtgctgac	cgtgctgcat	caggactggc	tgaacggaaa	ggagtacaag	2280
tgtaaggtga	gcaacaaggc	actgccagca	ccaatcgaga	agaccatcag	caaggcaaag	2340
ggacagccac	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgccaccaa	gccgagacga	gctgaccaag	2400
aaccaggta	gcctgacctg	tctggtgaag	ggattctacc	caagcgacat	cgcagtggag	2460
tgggagagca	acggacagcc	agagaacaac	tacaagacca	ccccaccagt	gctggacagc	2520
gacggaagct	tcttctgt	cagcaagctg	accgtggaca	agagccgtg	gcagcaggga	2580
aacgtgttca	gctgtagcgt	gatgcacgag	gcactgcata	accattacac	ccagaagagc	2640
ctgaggctga	gcccaggacg	gaagcggcgg	gctccgtga	agcagaccct	gaactttgac	2700
ctgctgaagc	tggctggcga	cgtggaaagc	aacccggcc	ccatgtatcg	gatcagotg	2760
ctgctgctga	ttgctctgag	cctggctctg	gtgaccaaca	gcgaggtgca	gctgctggag	2820
agcggaggag	gactggtgca	gccaggagga	gcctgcggc	tgagctgcgc	cgcgcggag	2880
ttcacccctgg	agaacaaggc	catggctgg	ttccggcagg	ccccaggaaa	ggagcgggag	2940
ggagtgcgt	gcatcagcaa	gagcggaaagc	tggacctact	acgcgcgatag	cgtgaaggga	3000
cggttcacca	tcagccggga	taacagcaag	aacaccgtgt	acctgcagat	gaacagcctg	3060
cggccagagg	ataccgcgt	gtactactgc	gccaccacca	cgcgcggagg	aggactgtgc	3120
tgggacggaa	ccaccttcag	ccggctggcc	agcagctggg	gacagggAAC	cctggtgacc	3180
gtgagcagcg	gaggaggagg	atccggagga	ggaggatccg	aggtgcagct	ggtggagtca	3240
ggaggaggac	tggtgcagcc	cgaggatca	ctgagactgt	cctgcgcgtc	ttcaggattc	3300
accttctcaa	cctcctggat	gtattggctg	agacaggctc	ccggaaaagg	actggagtg	3360

gtgtcagtga tcaacaccga cgaggagaacc tattatgctg attcagtgaa aggaagattc	3420
accatctcaa gagataactc aaaaaacacc ctgtatctgc agatgaactc actgagagct	3480
gaggataccg ctgtgtatta ttgcgctaaa gattggggag gacccgagcc caccagagga	3540
cagggaaccc tggtgaccgt gtcatcagac aagaccata cctgtcccc ctgtcccgct	3600
cccgaaactgc tggcgccccc cagcgtgtt ctgtttcccc ccaagccaa ggacaccctg	3660
atgattagcc ggaccccccga agtacccctgt gtggtggtgg acgtgagcca tgaagacccc	3720
gaagtgaagt ttaactggta cgtggacggc gtggaaagtgc ataacgctaa gaccaagccc	3780
cgggaagaac agtataacag cacctatcgg gtggtgagcg tgctgaccgt gctgcatcag	3840
gactggctga acggcaagga atataagtgt aaggtgagca acaaggctct gcccgcctcc	3900
attgaaaaga ccattagcaa ggctaaggc cagccccggg aacccaggt gtataccctg	3960
ccccccagcc gggacgaact gaccaagaac caggtgagcc tgacctgtct ggtgaagggc	4020
ttttatccca ggcacattgc tgtggagtgg gaaagcaacg gccagcccgaaacaaactat	4080
aagaccaccc ccccggtgct ggacagcgac ggcagcttt ttctgtatag caagctgacc	4140
gtggacaaga gccggtgca gcagggcaac gtgttagct gtagcgtgat gcacgaagct	4200
ctgcataacc attataccca gaagagcctg agcctgagcc cggcaagtg ataaagccgc	4260
cgcagcttat ggggatttgtt ggacgact cctggagccc gtcagtatcg gcgaaattcc	4320
agctgagcgc cggtcgctac cattaccagt tggctggtg tcaaaaataa ggatctgcct	4380
cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg cttccttga	4440
ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaaa tgagggaaatt gcatcgatt	4500
gtctgagtag gtgtcattct attctgggg gtgggtgg gcaggacagc aagggggagg	4560
attgggaaga caatagcagg catgctgggg actcgagttt agggcgaatt cccgataagg	4620
atcttcctag agcatggcta cgtagataag tagcatggcg gttaatcat taactacaag	4680
gaacccttag tggatggagg ggccactccc tctctgcgcg ctgcgtcgct cactgaggcc	4740
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccggc ttggccggg cggcctcagt gagcgagoga	4800
gcgcgcag	4808

<210> 21
 <211> 2361
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於融合蛋白質之 J211 編碼序列

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1) .. (48)

<223> c-myc 5' UTR

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (49) .. (54)

<223> kozak

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (55) .. (114)

<223> hmlL2 引導子

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (115) .. (486)

<223> 用於第一免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (487) .. (516)

<223> 連結子序列 L1

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (517) .. (885)

<223> 用於第二免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (886) .. (915)

<223> 引導子 序列 L2

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (916) .. (1302)

<223> 用於第三免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>

<221> 各種不能歸類的結合

<222> (1303) .. (1332)

<223> 連結子序列 L3

<220>

<221> 各種不能歸類的特徵

<222> (1333) .. (1680)

<223> 用於第四免疫球蛋白區域之編碼序列

<220>						
<221>	各種不能歸類的結合					
<222>	(1681)..(1695)					
<223>	鉸鏈					
<220>						
<221>	各種不能歸類的特徵					
<222>	(1696)..(2361)					
<223>	Fc					
<400>	21					
ggcactttg	cactggaaact	tacaacaccc	gagcaaggac	gogactctgc	caccatgtat	60
cgatgcagc	tgctgagctg	tattgctctg	agcctggctc	tggtgaccaa	cagccaggtg	120
cagctggtgg	aaagcggcgg	cggcgtggtg	cagccggcg	gcagcctgcg	gctgagctgt	180
gctgctagca	ttagcatttt	tgacatttac	gctatggact	ggtatcggca	ggctcccgcc	240
aagcagcggg	aactggtggc	tgtgagcttt	cgggacggca	gcacccattta	tgctgacagc	300
gtgaagggcc	ggtttaccat	tagccggac	aacagcaaga	acaccctgta	tctgcagatg	360
aacagcctgc	gggctgaaga	caccgctgtg	tattattgtc	atgtgagcct	gtatcggac	420
cccctggcg	tggctggcgg	cattggcgtg	tattggggcc	agggcaccct	ggtgaccgtg	480
agcagcggag	gaggaggaag	cggaggagga	ggaagcggagg	tgcagctgct	ggagagcggag	540
ggaggactgg	tgcagccagg	aggaagcctg	cgactgagct	gtgcagcaag	cggacgaacc	600
tacgcaatgg	gctggttccg	acaggcacca	gaaaggagc	gagagttcgt	ggcagcaatc	660
aacgcactgg	gaacccgaac	ctactacgca	gacagcgtga	agggacgatt	caccatcagc	720
cgagacaaca	gcaagaacac	cctgtacctg	cagatgaaca	gcctgcgagc	agaggacacc	780
gcagtgtact	actgtaccgc	acagggacag	tggcgagcag	caccagtggc	agtggcagca	840
gagtacgagt	tctggggaca	ggaaaccctg	gtgaccgtga	gcagcggagg	aggaggatct	900
ggaggaggag	gatctgaggt	gcagctgctg	gagagcggag	gaggactggt	gcagccagga	960
ggaaggcctgc	ggctgagctg	cgcgcgcagc	ggattcaccc	tggagaacaa	ggccatcggc	1020
tggttccggc	aggccccagg	aaaggagcgg	gaggagactgc	tgtgcacatcag	caagagcggaa	1080
agctggacct	actacgcccga	tagcgtgaag	ggacggttca	ccatcagccg	ggataacagc	1140
aagaacacccg	tgtacctgca	gatgaacacgc	ctgcggccag	aggataccgc	cgtgtactac	1200
tgccgccacca	ccaccgcccgg	aggaggactg	tgctgggacg	gaaccacctt	cagccggctg	1260
gccagcagct	ggggacaggg	aaccctggtg	accgtgagca	gcggaggagg	aggatccgga	1320

ggaggaggat ccgaggtgca gctggtggag tcaggaggag gactggtgca gcccggagga	1380
tcactgagac tgtcctgcgc tgcttcagga ttcaccttct caacccctcg gatgtattgg	1440
ctgagacagg ctcccgaaa aggactggag tgggtgtcag tgatcaacac cgacggagga	1500
acctattatg ctgattcagt gaaaggaaga ttcaccatct caagagataa ctaaaaaac	1560
accctgtatc tgcagatgaa ctcactgaga gctgaggata ccgctgtgtatattgcgc	1620
aaagattggg gaggacccga gcccaccaga ggacaggaa ccctggtgac cgtgtcatca	1680
gacaagaccc atacctgtcc cccctgtccc gctccgaaac tgctggcgg ccccagcgt	1740
tttctgtttc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatta gccggacccc cgaagtgacc	1800
tgtgtggtgg tggacgtgag ccatgaagac cccgaagtga agtttaactg gtacgtggac	1860
ggcgtggaag tgcataacgc taagaccaag ccccggaag aacagtataa cagcacctat	1920
cgggtggtga gcgtgctgac cgtgctgcat caggactggc tgaacggcaa ggaatataag	1980
tgtaaggtga gcaacaaggc tctgcccgt cccattgaaa agaccattag caaggctaag	2040
ggccagcccc gggaaacccca ggtgtataacc ctgccccca gccggacga actgaccaag	2100
aaccaggtga gcctgacctg tctggtgaag ggctttatc ccagcgcacat tgctgtggag	2160
tggaaagca acggccagcc cgaaaacaac tataagacca cccccccgt gctggacagc	2220
gacggcagct ttttctgta tagcaagctg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc	2280
aacgtgttta gctgttagcgt gatgcacgaa gctctgcata accattatac ccagaagagc	2340
ctgaggctga gccccggcaa g	2361

<210> 22
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連結子

<400> 22

Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
1			5				10				15		

Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
20						25				30			

Ser Gly Gly Gly Ser
35

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連結子

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連結子

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 25
<211> 57
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連結子

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 26

<211> 2307

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> J210a 編碼序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2307)

<400> 26

atg tac cga atg cag ctg ctg agc tgt atc gca ctg agc ctg gca ctg
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

48

gtg acc aac agc cag gtg cag ctg gtg gag agc gga gga gga gtg gtg
 Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val
 20 25 30

96

cag cca gga gga agc ctg cga ctg agc tgt gca gca agc atc agc atc
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile
 35 40 45

144

ttc gac atc tac gca atg gac tgg tac cga cag gca cca gga aag cag
 Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
 50 55 60

192

cga gag ctg gtg gca gtg agc ttc cga gac gga agc acc tac tac gca
 Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

240

gac agc gtg aag gga cga ttc acc atc agc cga gac aac agc aag aac
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

288

acc ctg tac ctg cag atg aac agc ctg cga gca gag gac acc gca gtg
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

336

tac tac tgt cat gtg agc ctg tac cgg gac cca ctg gga gtg gca gga

384

Tyr	Tyr	Cys	His	Val	Ser	Leu	Tyr	Arg	Asp	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Gly	
115							120						125			
gga	atc	gga	gtg	tac	tgg	gga	cag	gga	acc	ctg	gtg	acc	gtg	agc	agc	432
Gly	Ile	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
130							135						140			
gga	gga	gga	gga	agc	gga	gga	gga	gga	agc	gaa	gtg	cag	ctg	ctg	gaa	480
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	
145							150				155				160	
agc	ggc	ggc	ggc	ctg	gtg	cag	ccc	ggc	agc	ctg	cgg	ctg	agc	tgt		528
Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	
165							170						175			
gct	gct	agc	ggc	cgg	acc	tac	gtc	atg	ggc	tgg	ttt	cgg	cag	gct	ccc	576
Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	
180							185						190			
ggc	aag	gaa	cgg	gaa	ttt	gtg	gtc	att	aac	gct	ctg	ggc	acc	cgg		624
Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Asn	Ala	Leu	Gly	Thr	Arg	
195							200						205			
acc	tat	tat	gct	gac	agc	gtg	aag	ggc	cgg	ttt	acc	att	agc	cgg	gac	672
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	
210							215						220			
aac	agc	aag	aac	acc	ctg	tat	ctg	cag	atg	aac	agc	ctg	cgg	gct	gaa	720
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
225							230						235			240
gac	acc	gct	gtg	tat	tat	tgt	acc	gct	cag	ggc	cag	tgg	cgg	gct	gct	768
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ala	Gln	Gly	Gln	Trp	Arg	Ala	Ala	
245							250						255			
ccc	gtg	gct	gtg	gct	gct	gaa	tac	gaa	ttt	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctg	816
Pro	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Tyr	Glu	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
260							265						270			
gtg	acc	gtg	agc	agc	gga	gga	gga	gga	tct	gga	gga	gga	tct	gag		864
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
275							280						285			
gtg	cag	ctg	ctg	gag	agc	gga	gga	gga	ctg	gtg	cag	cca	gga	gga	agc	912
Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
290							295						300			
ctg	cgg	ctg	agc	tgc	gcc	gcc	agc	gga	ttc	acc	ctg	gag	aac	aag	gcc	960
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Glu	Asn	Lys	Ala	
305							310						315			320
atc	ggc	tgg	tcc	cgg	cag	gcc	cca	gga	aag	gag	cgg	gag	gga	gtg	ctg	1008
Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Gly	Val	Leu	
325							330						335			

tgc atc agc aag agc gga agc tgg acc tac tac gcc gat agc gtg aag Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys 340 345 350	1056
gga cgg ttc acc atc agc cgg gat aac agc aag aac acc gtg tac ctg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu 355 360 365	1104
cag atg aac agc ctg cgg cca gag gat acc gcc gtg tac tac tgc gcc Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 370 375 380	1152
acc acc acc gcc gga gga gga ctg tgc tgg gac gga acc acc ttc agc Thr Thr Thr Ala Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser 385 390 395 400	1200
cgg ctg gcc agc agc tgg gga cag gga acc ctg gtg acc gtg agc agc Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 405 410 415	1248
gga gga gga tcc gga gga gga tcc gag gtg cag ctg gtg gag Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu 420 425 430	1296
tca gga gga gga ctg gtg cag ccc gga gga tca ctg aga ctg tcc tgc Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys 435 440 445	1344
gct gct tca gga ttc acc ttc tca acc tcc tgg atg tat tgg ctg aga Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp Leu Arg 450 455 460	1392
cag gct ccc gga aaa gga ctg gag tgg gtg tca gtg atc aac acc gac Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Asn Thr Asp 465 470 475 480	1440
gga gga acc tat tat gct gat tca gtg aaa gga aga ttc acc atc tca Gly Gly Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser 485 490 495	1488
aga gat aac tca aaa aac acc ctg tat ctg cag atg aac tca ctg aga Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg 500 505 510	1536
gct gag gat acc gct gtg tat tat tgc gct aaa gat tgg gga gga ccc Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro 515 520 525	1584
gag ccc acc aga gga cag gga acc ctg gtg acc gtg tca tca gac aag Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asp Lys 530 535 540	1632
acc cat acc tgt cca cct tgt cca gca cca gag ctg ctg gga gga cca Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 545 550 555 560	1680

agc gtg ttc ctg ttc cca cca aag cca aag gac acc ctg atg atc agc Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 565 570 575	1728
cga acc cca gag gtg acc tgt gtg gtg gac gtg agc cat gag gac Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 580 585 590	1776
cca gag gtg aag ttc aac tgg tac gtg gac gga gtg gag gtg cat aac Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn 595 600 605	1824
gca aag acc aag cca cga gag gag cag tac aac agc acc tac cga gtg Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 610 615 620	1872
gtg agc gtg ctg acc gtg ctg cat cag gac tgg ctg aac gga aag gag Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 625 630 635 640	1920
tac aag tgt aag gtg agc aac aag gca ctg cca gca cca atc gag aag Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 645 650 655	1968
acc atc agc aag gca aag gga cag cca cga gag cca cag gtg tac acc Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 660 665 670	2016
ctg cca cca agc cga gac gag ctg acc aag aac cag gtg agc ctg acc Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 675 680 685	2064
tgt ctg gtg aag gga ttc tac cca agc gac atc gca gtg gag tgg gag Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 690 695 700	2112
agc aac gga cag cca gag aac aac tac aag acc acc cca cca gtg ctg Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 705 710 715 720	2160
gac agc gac gga agc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 725 730 735	2208
agc cgg tgg cag cag gga aac gtg ttc agc tgt agc gtg atg cac gag Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 740 745 750	2256
gca ctg cat aac cat tac acc cag aag agc ctg agc ctg agc cca gga Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 755 760 765	2304
aag Lys	2307

<210> 27
 <211> 769
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 27

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val
 20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile
 35 40 45

Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
 50 55 60

Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly
 115 120 125

Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 165 170 175

Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
 180 185 190

Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg
 195 200 205

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 210 215 220

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gln Trp Arg Ala Ala
 245 250 255

Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu
 275 280 285

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 290 295 300

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala
 305 310 315 320

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu
 325 330 335

Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 340 345 350

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 355 360 365

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 370 375 380

Thr Thr Thr Ala Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Arg	Leu	Ala	Ser	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
					405				410						415

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	
					420			425							430

Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys
						435		440				445			

Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Ser	Trp	Met	Tyr	Trp	Leu	Arg
						450		455				460			

Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Val	Ile	Asn	Thr	Asp
						465		470		475					480

Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser
						485		490				495			

Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg
						500		505				510			

Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Trp	Gly	Gly	Pro
						515		520				525			

Glu	Pro	Thr	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Lys
						530		535				540			

Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
						545		550				555			560

Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
						565		570				575			

Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
						580		585				590			

Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
						595		600				605			

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 610 615 620

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 625 630 635 640

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 645 650 655

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 660 665 670

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 675 680 685

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 690 695 700

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 705 710 715 720

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 725 730 735

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 740 745 750

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 755 760 765

Lys

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 prm504

<400> 28

gctgcgycaa ctggaccaat gagaac

<210> 29
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引子 prm505

<400> 29
 cgccagagacc aaagttcaac tgaaacga

28

<210> 30
 <211> 772
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> MD3606 之胺基酸序列

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (24)..(147)
 <223> 具 I110M 之第一免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (158)..(280)
 <223> 第二免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (291)..(419)
 <223> 第三免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (430)..(485)
 <223> 第四免疫球蛋白區域

<220>
 <221> 各種不能歸類的特徵
 <222> (551)..(772)
 <223> Fc

<400> 30

Glu Phe Ala Thr Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Gln Ser Ile Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 35 40 45

Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro
 50 55 60

Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly
 115 120 125

Val Ala Gly Gly Met Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Val Gln 145 150 155 160

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 165 170 175

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg
 180 185 190

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu
 195 200 205

Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 210 215 220

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 225 230 235 240

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp

245

250

255

Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln
 260 265 270

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro
 290 295 300

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 325 330 335

Gly Val Leu Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp
 340 345 350

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 355 360 365

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 370 375 380

Tyr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr
 385 390 395 400

Thr Phe Ser Arg Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 405 410 415

Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 420 425 430

Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 435 440 445

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr
 450 455 460

Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile
 465 470 475 480

Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 485 490 495

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 500 505 510

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp
 515 520 525

Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 530 535 540

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 545 550 555 560

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 565 570 575

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 580 585 590

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 595 600 605

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 610 615 620

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 625 630 635 640

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 645 650 655

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 660 665 670

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 675 680 685

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 690 695 700

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 705 710 715 720

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 725 730 735

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 740 745 750

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 755 760 765

Ser Pro Gly Lys
 770

<210> 31

<211> 4690

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV 載體基因體 AAV. CB7. hJAB Fc

<220>

<221> 重複區域

<222> (1)...(130)

<223> 5' IRT

<220>

<221> 啓動子

<222> (198)...(579)

<223> CMV IE 啓動子

<220>

<221> 增強子

<222> (279)...(538)

<223> 具 2 個配錯之 C4 增強子

<220>

<221> 啓動子

<222> (582)...(862)

<223> CB 啓動子

<220>

〈221〉 TATA_訊息
〈222〉 (836)..(839)
〈223〉 TATA

- <220>
- <221> 內含子
- <222> (956)..(1928)
- <223> 雞 β -肌動蛋白內含子

- 〈220〉
- 〈221〉 各種不能歸類的特徵
- 〈222〉 (1941)..(4259)
- 〈223〉 MD3606 之編碼序列

<220> polyA_訊息
<221> (4346)..(4472)
<222> 兔球蛋白 poly A
<223>

<220>
<221> 重複區域
<222> (4561)..(4690)
<223> 3' ITR

<400> 31 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggacccctt 60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatca 120
aggggttcct tgtatgtat gattaacccg ccatgctact tatctaccag gtaatgggg 180
atcctctaga actatagcta gtcgacattt attattgact agttatata agtaatcaat 240
tacgggtca ttagttcata gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcatttgc acgtcaataa tgacgtatgt 360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt attacggta 420
aactgcccac ttggcagttac atcaagtgtt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgccagttac atgacctt gggactttcc 540
tacttggcag tacatctacg tattgtcat cgctattacc atggcgagg tgagccccac 600
gttctgcttc actctccccca tctccccccctt ccaatttgt atttatttt 660
tttttaatta ttttgtcag cgatggggc ggggggggg gggggcgcg cgccaggcgg 720
ggcggggcgg ggcgagggc gggcgggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccatca 780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccctttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840
aaagcgaagc ggcggcggcggcggcggcgc tgccgcgtgc cttcgcccccggc tgcccccgtc 900

cgccggccgcc	tcgcgccgcc	cgcggcgt	ctgactgacc	gcgttactcc	cacaggttag	960
cggcgggac	ggcccttctc	ctccgggctg	taattagcgc	ttggtttaat	gacggcttgt	1020
ttctttctg	tggctgcgtg	aaagccttga	ggggctccgg	gagggccctt	tgtgcggggg	1080
gagcggctcg	gggggtgcgt	gcgtgtgtgt	gtgcgtgggg	agcggccgcgt	gcggctccgc	1140
gctgcccggc	ggctgtgagc	gctgcggcgc	cggcgcgggg	ctttgtgcgc	tccgcagtgt	1200
gcgcgagggg	agcgcggccg	ggggcggtgc	ccgcgggtgc	ggggggggct	gcgaggggaa	1260
caaaggctgc	gtgcgggtg	tgtgcgtggg	gggggtgagca	gggggtgtgg	gcgcgtcggt	1320
cggcgtgcaa	ccccccctgc	acccccctcc	ccgagttgtc	gagcacggcc	cggcttcggg	1380
tgcggggctc	cgtacggggc	gtggcgccgg	gctcgccgtg	ccggcgggg	ggtggcggca	1440
ggtgggggtg	ccggcggggg	cggggccgccc	tcgggcccggg	gagggctcgg	gggaggggccc	1500
cggcggcccc	cggagcgcgg	gcccgtgtcg	aggcgcggcg	agccgcagcc	attgcctttt	1560
atggtaatcg	tgcgagaggg	cgcaggact	tcctttgtcc	caaattctgtg	cggagccgaa	1620
atctggagg	cggccggca	ccccctctag	cgggcgccgg	gcgaagcggt	gcggcgccgg	1680
caggaaggaa	atggcggggg	agggccctcg	tgcgtcgccg	cgccggccgtc	cccttctccc	1740
tctccagcct	cggggctgtc	cgcgggggga	cggctgcctt	cgggggggac	ggggcagggc	1800
ggggttcggc	ttctggcgtg	tgaccggcgg	ctctagagcc	tctgctaacc	atgttcatgc	1860
tttcttcttt	ttcctacagc	tcctggcaaa	cgtgctggtt	attgtgctgt	ctcatcattt	1920
tggcaaagaa	ttcgctagat	gaattcgcca	ccatggcttg	ggtgtggacc	ttgctattcc	1980
tgtatggcagc	tgcccaaagt	atacaggccc	aggtgcagct	ggtggagagc	ggcggcggcg	2040
tggtgcagcc	oggcggcagc	ctgcgcctga	gctgcgcgc	cagcatcagc	atcttcgaca	2100
tctacgcccc	ggactggcac	cggcaggccc	ccggcaagca	gcgcgagctg	gtggccgtga	2160
gcttcgcgca	cggcagcacc	tactacgcgg	acagcgtgaa	ggccgccttc	accatcagcc	2220
gcgcacaacag	caagaacacc	ctgtacctgc	agatgaacag	cctgcgcgcc	gaggacaccg	2280
ccgtgtacta	ctgccacgtg	agcctgttacc	gcgcacccct	ggcgtggcc	ggcggcatgg	2340
gcgtgtactg	gggccagggc	accctggta	ccgtgagcag	cggcggcggc	ggcagcggcg	2400
gcggcggcag	cgaggtgcag	ctgctggaga	gcggcggcgg	cctggtgcag	cccgccggca	2460
gcctgcgcct	gagctgcgcc	gccagcggcc	gcacctacgc	catggctgg	ttccgcccagg	2520
ccccccggcaa	ggagcgcgag	ttcgtggccg	ccatcaacgc	cctgggcacc	cgcacacct	2580

acgcccacag cgtgaagggc cgcttcacca tcagccgca caacagcaag aacaccctgt	2640
acctgcagat gaacagcctg cgccgcgagg acaccgcgt gtactactgc accgcccagg	2700
gccagtgccg cgccgcggcc gtggccgtgg ccgcgcgatcg cgagttctgg ggccaggcga	2760
ccctgggtgac cgtgagcagc ggccgcggcg gcagcggcgg cggccgcagc gaggtgcagc	2820
tgctggagag cggccggcggc ctgggtgcagc ccggccggcag cctgcgcctg agctgcgcgc	2880
ccagccggcgtt caccctggag aacaaggcca tcggctgggtt ccgcaggcgc cccggcaagg	2940
agcgccgaggg cgtgctgtgc atcagcaaga gcggcagctg gacctactac gccgacagcg	3000
tgaagggccg cttcaccatc agccgcgaca acagcaagaa caccgtgtac ctgcagatga	3060
acagcctgcg ccccgaggac accgcgcgtgt actactgcgc caccaccacc gcggccggcg	3120
gcctgtgctg ggacggcacc accttcagcc gcctggccag cagctggggc cagggcaccc	3180
tggtgaccgt gagcagcggc ggcggccggca gcggccggcg cggcagcggatgt gtgcagctgg	3240
tggagagcgg cggccggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gcgcctgagc tgcgcgcaca	3300
gcggcttcac cttcagcacc agctggatgt actggctgcg ccaggcccc ggcaagggcc	3360
tggagtgggt gagcgtgatc aacaccgacg gcggcaccta ctacgcccac agcgtgaagg	3420
gccgcttcac catcagccgc gacaacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc	3480
tgcgcgcga ggacaccgccc gtgtactact gcgcgaaggat ctggggccgc cccgagccca	3540
cccgccggcca gggcacccctg gtgaccgtga gcagcgcacaa aactcacaca tgcccaccgt	3600
gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg	3660
acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg	3720
aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga	3780
caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc	3840
tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc	3900
cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggcga gccccgagaa ccacaggtgt	3960
acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg	4020
tcaaaggctt ctatcccagc gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga	4080
acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca	4140
agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc	4200

atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatgag	4260
aattcatcgatccggggcc cgtcgactgc agaggcctgc atgcaagctt ggctcgagga	4320
cggggtaac tacgcctgag gatccgatct tttccctct gccaaaaatt atggggacat	4380
catgaagccc cttgagcatc tgacttctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat	4440
agtgtgttgg aatttttgt gtctctcaact cggaaagcaat tcgttgatct gaatttcgac	4500
cacccataat acccattacc ctggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca	4560
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg	4620
ccgggcgacc aaaggctcgcc cgacgccccgg gctttgccccgg ggcggcctca gtgagcgagc	4680
gagcgcgccag	4690

<210> 32
<211> 2319
<212> DNA
<213> 人工序列

〈220〉
〈223〉 MD3606 之編碼序列

<400> 32
gaattcgcca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tcatggcagc tgcccaaagt 60
atacaggccc aggtgcagct ggtggagagc ggcggcggcg tggtcagcc cggcggcagc 120
ctgcgcctga gctgcgccgc cagcatcagc atcttcgaca tctacccat ggactggta 180
cgccaggccc ccggcaagca gcgcgagctg gtggccgtga gcttccgcga cggcagcacc 240
tactacgccc acagcgtgaa gggccgcttc accatcagcc gcgacaacag caagaacacc 300
ctgtacctgc agatgaacag cctgcgcgcc gaggacaccc cggtgtacta ctgccacgtg 360
agcctgtacc gcgacccccc tggcgtggcc ggcggcatgg gcgtgtactg gggccaggc 420
accctggta ccgtgagcag cggcggcggc ggcagcggcg gcggcggcag cgaggtgcag 480
ctgctggaga gcggcggcgg cctggtgcag cccggcggca gcctgcgcct gagctgcgcc 540
gccagcggcc gcacctacgc catggctgg ttccgcccagg ccccccggcaa ggagcgcgag 600
ttcgtggccg ccatcaacgc cctggcacc cgcacctact acgcccacag cgtgaaggc 660
cgcttacca tcagccgcga caacagcaag aacaccctgt acctgcagat gaacagcctg 720
cgccgcgagg acaccgcgt gtactactgc accgcccagg gccagtgccg cggccggccccc 780
gtggccgtgg ccgccgagta cgagttctgg gcccaggcga ccctggtgc cgtgagcagc 840

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc gaggtgcagc tgctggagag cggcggcggc	900
ctgggtgcagc ccggcggcag cctgcgcctg agctgcgcgg ccagcggctt caccctggag	960
aacaaggcca tcggctggtt cgcgcaggcc cccggcaagg agcgcgaggg cgtgctgtc	1020
atcagcaaga gcggcagctg gacctactac gccgacagcg tgaagggccg cttcaccatc	1080
agccgcgaca acagcaagaa caccgtgtac ctgcagatga acagcctgcg ccccggaggac	1140
accggcgtgt actactgcgc caccaccacc gccggcggcg gcctgtgctg ggacggcacc	1200
accttcagcc gcctggccag cagctgggc cagggcaccc tggtgaccgt gaggcagcggc	1260
ggcggcggca gcggcggcgg cggcagcgg gtgcagctgg tggagagcgg cggcggcctg	1320
gtgcagcccg gcggcagcct gcgcctgagc tgccgcgcga gcggcttcac cttcagcacc	1380
agctggatgt actggctgcg ccaggcccc ggcaagggcc tggagtgggt gaggcgtgatc	1440
aacaccgacg gcggcaccta ctacccgcac agcgtgaagg gccgccttcac catcagccgc	1500
gacaacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgccgcgcga ggacaccgc	1560
gtgtactact gcgccaagga ctggggcggc cccgagccca cccgcggcca gggcacccctg	1620
gtgaccgtga gcagcgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	1680
gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg	1740
acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	1800
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgcgaaga caaagccgcg ggaggagcag	1860
tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgccaccagga ctggctgaat	1920
ggcaaggagt acaagtgc当地 ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc	1980
atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg	2040
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	2100
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	2160
cccggtctgg actccgacgg ctccttcctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	2220
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtatgc atgaggctct gcacaaccac	2280
tacacgcaga agaggctctc cctgtctccg ggtaaatga	2319

<210> 33

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 間隔子

<400> 33

atgacttaaa ccaggt

16

<210> 34

<211> 736

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類AAVhu31 vp1

<400> 34

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Ser Gln Pro Ala Lys Lys Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380

Gly Gly Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Ser Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

<210> 35

<211> 736

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類AAVhu32 vp1

<400> 35

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30

Lys	Pro	Ala	Glu	Arg	His	Lys	Asp	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
35						40								45	
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
50					55					60					
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65					70				75				80		
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
85					85				90				95		
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
100						105							110		
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Glu	Pro	
115						120						125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
130					135					140					
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly
145					150					155			160		
Lys	Ser	Gly	Ser	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	
165						170						175			
Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
180						185						190			
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	
195						200					205				
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
210						215					220				
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225						230				235			240		
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
245								250					255		

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465

470

475

480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 36

<211> 2211

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AAV9 裝體 vp1 編碼序列

<400> 36

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtggtgcc ctttggaaacc tggagccctt caacccaaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccctt gaccggcaa cggactcgac 180

aagggggagc cggtaaacgc agcagacgctg gcgccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacccgaa cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctgggtgagg aacggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggatttggc 480

aaatcggtg cacagccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcaatcccag accctcaacc aatcgagaa cctcccgac cccctcagg tgtggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtggtagtt ctcggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780

tccaaacagca catctggagg atcttcaaata gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc 1020

acgggtccagg ttttacggta ctcagactat cagctccgt acgtgctcggttcggctcac	1080
gaggggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttccctcagta cgggtatctg	1140
acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct gaaatattc	1200
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta	1260
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc	1320
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacgggtt ctggacagaa tcaacaaacg	1380
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc aggaaagaaa ctacataacct	1440
ggaccaggct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa	1500
tttgcttggc ctggagcttc ttcttggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct	1560
ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccctt gtctggatct	1620
ttaatttttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata	1680
accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg	1740
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag ggcgcagaccc gctgggttca aaaccaagga	1800
atacttccgg gatatggtttgcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttggggcc	1860
aaaattcctc acacggacgg caactttcac cttctccgc tggatggagg gtttggaaatg	1920
aagcaccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcggta tcctccaacg	1980
gccttcaaca aggacaagct gaacttttc atcacccagt attctactgg ccaagtca	2040
gtggagatcg agtggggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaaccc ggagatccag	2100
tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgtat	2160
atagtgaaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgtaa	2211

201837170

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

新穎 AAV 媒介的流感疫苗

NOVEL AAV MEDIATED INFLUENZA VACCINES

【中文】

提供一種具有 AAV 裝體之非複製型重組腺相關病毒 (adeno-associated virus (rAAV))，其具有包裝於 AAV 裝體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複序列及至少一個編碼四種不同的免疫球蛋白區域 (a)、(b)、(c) 及 (d) 之核酸序列。此 rAAV 表現的免疫球蛋白有用於提供抗 A 型流感及 B 型流感之被動免疫。本文亦描述含有此 rAAV 的組成物。提供接種病患抗流感的方法。

【英文】

A non-replicating recombinant adeno-associated associated virus (rAAV) having an AAV capsid having packaged therein a vector genome which comprises AAV inverted terminal repeat sequences and at least one nucleic acid sequence encoding four different immunoglobulin regions (a), (b), (c) and (d) is provided. The rAAV-expressed immunoglobulins are useful for providing passive immunization against influenza A and influenza B. Also described herein are compositions containing the rAAV. Methods of vaccinating patients against influenza are provided.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種非複製型重組腺相關病毒 (adeno-associated associated virus, rAAV)，其具有包裝於 AAV 膠體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複序列 (AAV inverted terminal repeat sequences) 及至少一個編碼免疫球蛋白區域 (a)、(b)、(c) 及 (d) 之核酸序列，其中各免疫球蛋白區域 (a)、(b)、(c) 及 (d) 係表現自 rAAV，其中

(a) 第一免疫球蛋白區域，具有 SEQ ID NO : 1 之胺基酸序列：(Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ile Ser Ile Phe Asp Ile Tyr Ala Met Asp Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Val Ser Phe Arg Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His Val Ser Leu Tyr Arg Asp Pro Leu Gly Val Ala Gly Gly Ile Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)；

(b) 第二免疫球蛋白區域，具有 SEQ ID NO : 2 之胺基酸序列：(Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Asn Ala Leu Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala Gln Gly Gln Trp Arg Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Glu Tyr Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)；

(c)第三免疫球蛋白區域，具有 SEQ ID NO：3 之
胺基酸序列：(Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
Ala Ser Gly Phe Thr Leu Glu Asn Lys Ala Ile Gly Trp
Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Leu
Cys Ile Ser Lys Ser Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Thr Ala
Gly Gly Gly Leu Cys Trp Asp Gly Thr Thr Phe Ser Arg
Leu Ala Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser Ser)；

(d)第四免疫球蛋白區域，具有 SEQ ID NO：4 之
胺基酸序列：(Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Trp Met Tyr Trp
Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
Val Ile Asn Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser)。

- 2.如請求項 1 之 rAAV，其中該第一、第二、第三及/或第四免疫球蛋白區域係於融合構築體中，該構築體進一步包含 Fc 區域，其中可選擇地有連接四個免疫球蛋白區域及 Fc 區域的連結序列。
- 3.如請求項 1 或 2 之 rAAV，其中該融合構築體進一步包含位於一或多個免疫球蛋白區域間的連結序列。
- 4.如請求項 2 或 3 之 rAAV，其中獨立地選擇各連結序列。
- 5.如請求項 2 至 4 中任一項之 rAAV，其中至少一個連結序列為 GGGGSGGGGS(SEQ ID NO : 7)。
- 6.如請求項 1 至 5 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含來自對在第一免疫球蛋白的胺基端的免疫球蛋白為外源(exogenous)的來源之訊息肽。
- 7.如請求項 6 之 rAAV，其中該訊息肽為人類介白素-2 訊息肽。
- 8.如請求項 1 至 7 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含單順反子表現盒(monocistronic expression cassette)。
- 9.如請求項 1 至 7 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含雙順反子表現盒(bicistronic expression cassette)。
- 10.如請求項 9 之 rAAV，其中兩個該免疫球蛋白區域連結至第一 Fc 以形成第一鏈，且其它兩個免疫球蛋白區域連結至第二 Fc 以形成第二鏈。

- 11.如請求項 9 或 10 之 rAAV，其中該載體基因體包含 IRES 或 F2A 序列。
- 12.如請求項 1 至 11 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含 5'UTR。
- 13.如請求項 12 之 rAAV，其中 5'UTR 為人類 c-myc 5'UTR 之片段。
- 14.如請求項 1 至 13 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含單股 AAV5'反向末端重複及 AAV3'反向末端重複。
- 15.如請求項 1 至 14 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體編碼具有 SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：12、或 SEQ ID NO：30 之胺基酸序列的抗流感融合構築體。
- 16.如請求項 1 至 15 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含選自由下列組成的群組的核酸序列：SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：14、SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：26、SEQ ID NO：20、SEQ ID NO：13、SEQ ID NO：31 及 SEQ ID NO：32。
- 17.如請求項 1 至 16 中任一項之 rAAV，其中該 AAV 具有 AAVhu68 膜體，該膜體包含：(a)vp1 蛋白質之異源群體，該 vp1 蛋白質為編碼 SEQ ID NO：16 之胺基酸序列之核酸序列的產物，vp1 蛋白質包含於位置 67 之麩胺酸(Glu)及/或於位置 157 之纈胺酸(Val)，(b)可選擇地包含於位置 157 之纈胺酸(Val)之 vp2 蛋白質之異源群體，及(c)vp3 蛋白質之異源群體，其中 vp1、vp2

及 vp3 蛋白質含有至少一個次群體，其中於天冬醯胺-甘胺酸對的天冬醯胺被脫醯胺，其中脫醯胺造成胺基酸改變，且其中編號係基於 SEQ ID NO : 16 之胺基酸序列。

18.如請求項 17 之 rAAV，其中於天冬醯胺-甘胺酸對之天冬醯胺之至少 65%位於 vp1 蛋白質之位置 57 及/或於天冬醯胺-甘胺酸對之 N 之至少 75%位於 vp1、v2 及/或 vp3 蛋白質之位置 329、452 及/或 512 被脫醯胺，基於 SEQ ID NO : 16 之胺基酸序列的殘基編號。

19.如請求項 17 或 18 之 rAAV，其中經脫醯胺的天冬醯胺係被脫醯胺成天冬胺酸、異天冬胺酸、相互轉換天冬胺酸/異天冬胺酸對、或其組合。

20.如請求項 16 至 19 中任一項之 rAAV，其中 rAAVhu68 進一步特徵為下列一或多個：

(a)每個 vp2 蛋白質係獨立地為至少編碼 SEQ ID NO : 16 之 vp2 蛋白質之核酸序列的產物；

(b)每個 vp3 蛋白質係獨立地為至少編碼 SEQ ID NO : 16 之 vp3 蛋白質之核酸序列的產物；

(c)編碼 vp1 蛋白質之核酸序列為 SEQ ID NO : 18，或與 SEQ ID NO : 18 至少 70% 至至少 99% 一致的序列，其編碼 SEQ ID NO : 16 之胺基酸序列；

(d)rAAVhu68 膜體進一步包含 vp1、vp2 及/或 vp3 蛋白質之至少一亞群，其於位置 N57、N66、N94、N113、N252、N253、Q258、N270、N303、N304、N305、N319、N328、N329、N336、N409、N410、N452、N477、

N512、N515、N598、Q599、N628、N651、N663、N709、或其組合之一或多個被脫醯胺，

其中編號係基於 SEQ ID NO: 16 之胺基酸序列。

- 21.如請求項 1 至 20 中任一項之 rAAV，其中該 AAV 具有 AAV9 裝體，其中該 AAV9 裝體包含具有 SEQ ID NO: 17 之胺基酸序列或經 SEQ ID NO: 36 編碼的胺基酸序列的 vp1 裝體蛋白質。
- 22.一種組成物，其包含載劑、稀釋劑或賦形劑、及至少如請求項 1 至 21 中任一項之非複製型 rAAV 之原液 (stock)。
- 23.如請求項 22 之組成物，其中該組成物被調配用於鼻內投予。
- 24.如請求項 22 之組成物，其中該組成物被調配用於肌肉內或靜脈內投予。
- 25.如請求項 1 至 21 中任一項之 rAAV 或如請求項 22 至 24 中任一項之組成物，其有用於接種或免疫人類病患抗流感。
- 26.如請求項 25 之 rAAV 或組成物，其適用於以約 10^9 至約 7×10^{13} GC 之 rAAV 於鼻內投劑病患。
- 27.一種如請求項 1 至 21 中任一項之 rAAV 或如請求項 22 至 26 中任一項之組成物之用途，其用於保護人類病患抗流感。
- 28.一種產品，其包含容器，該容器包含如請求項 1 至 21 中任一項之 rAAV、可選用的稀釋劑、及投予用說明書。

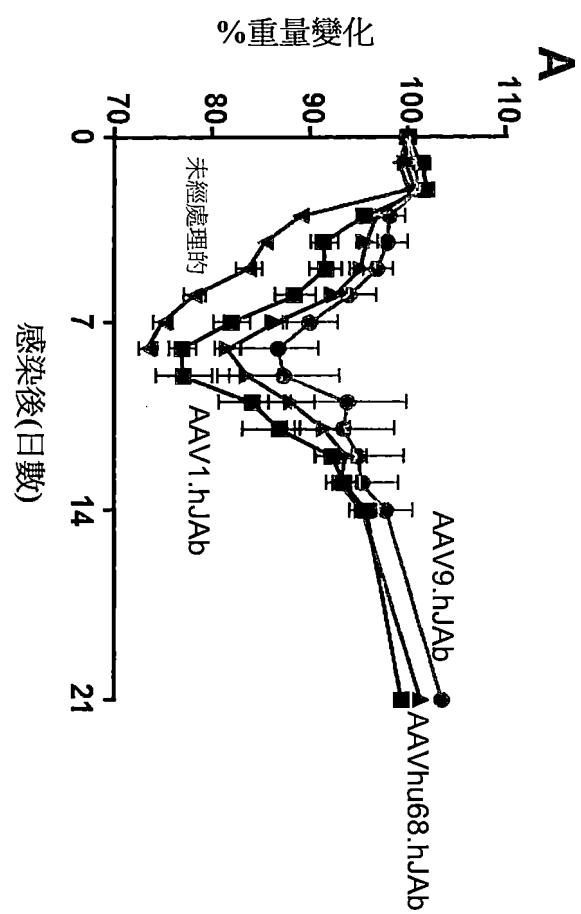


圖2A

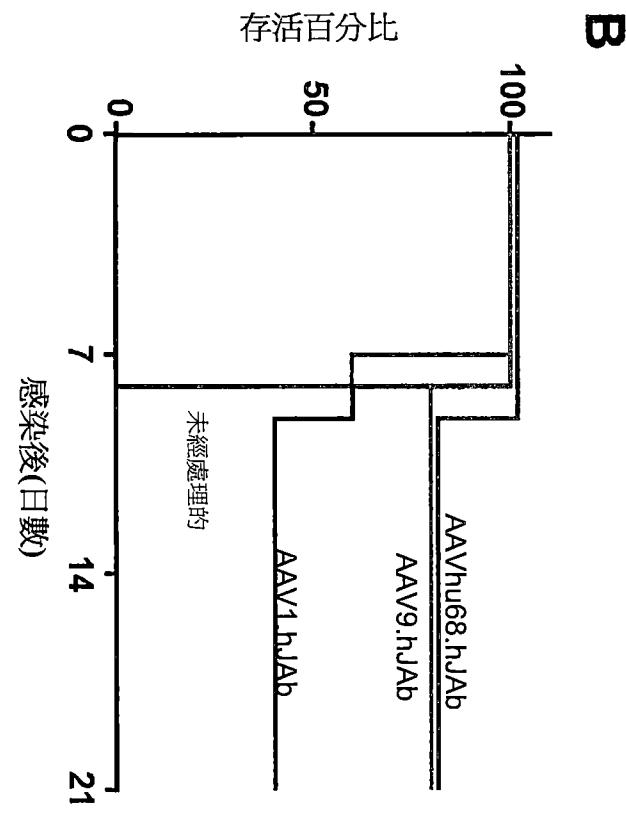


圖2B

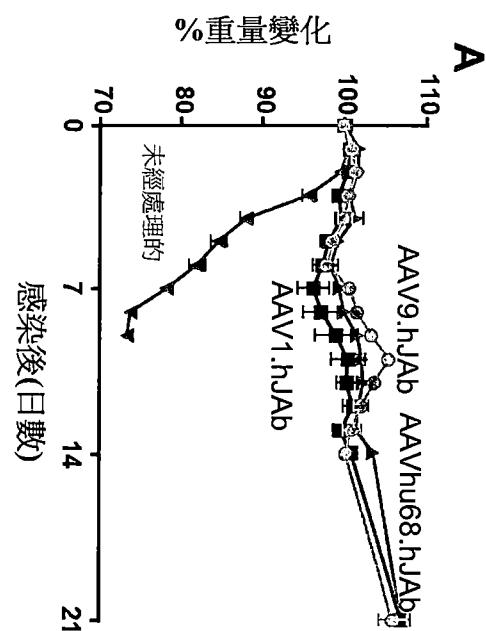


圖3A

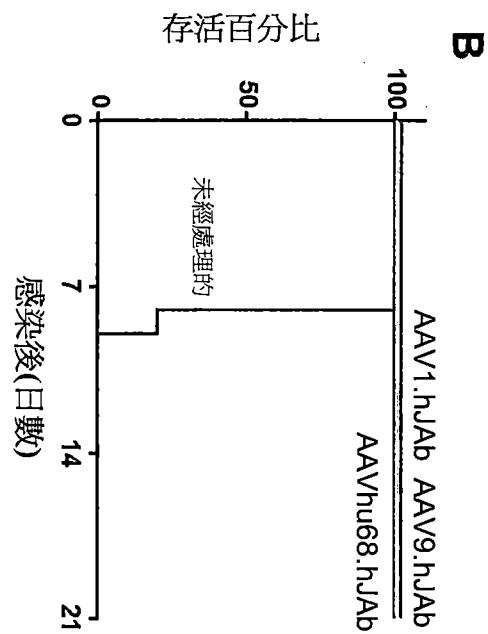


圖3B

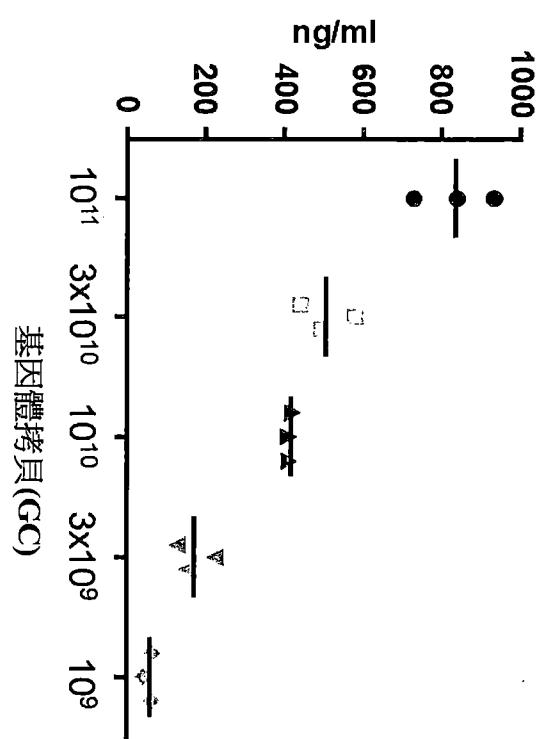


圖4

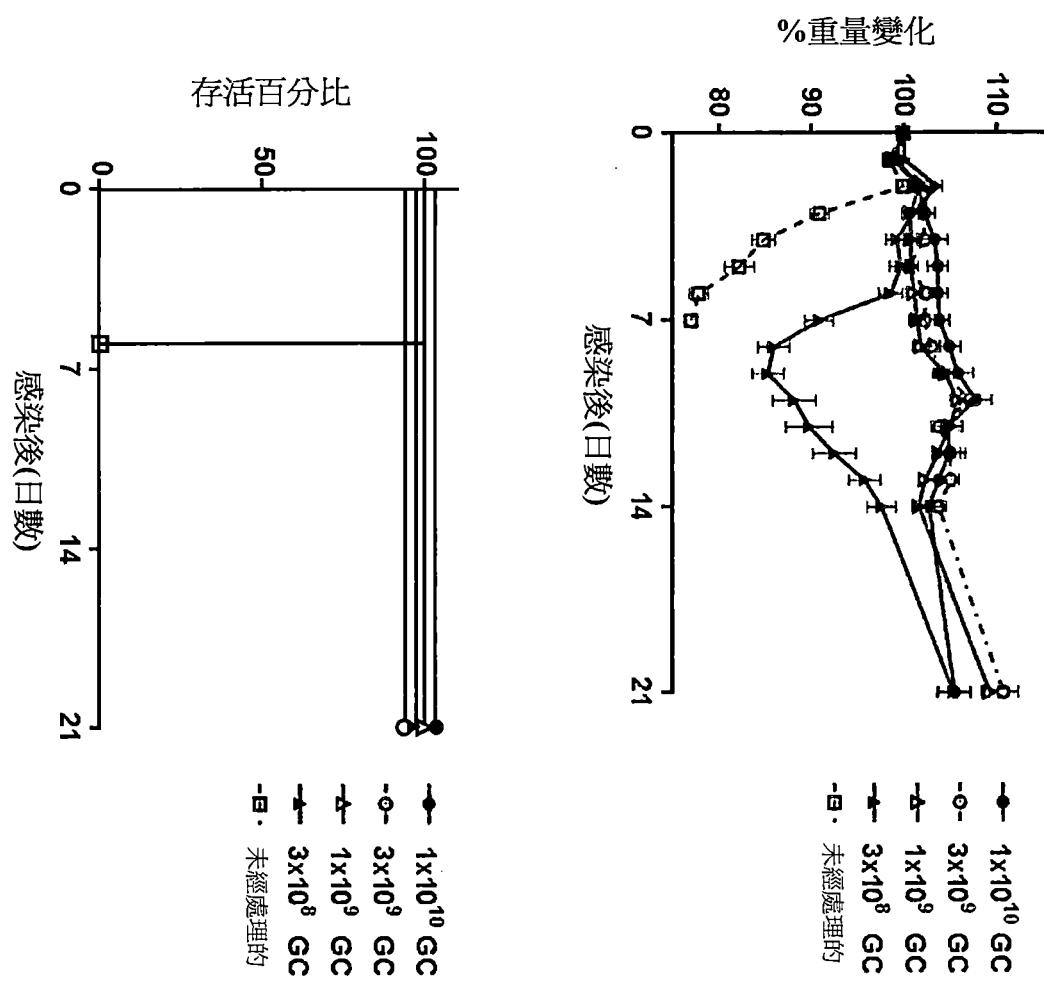


圖5B

圖5A

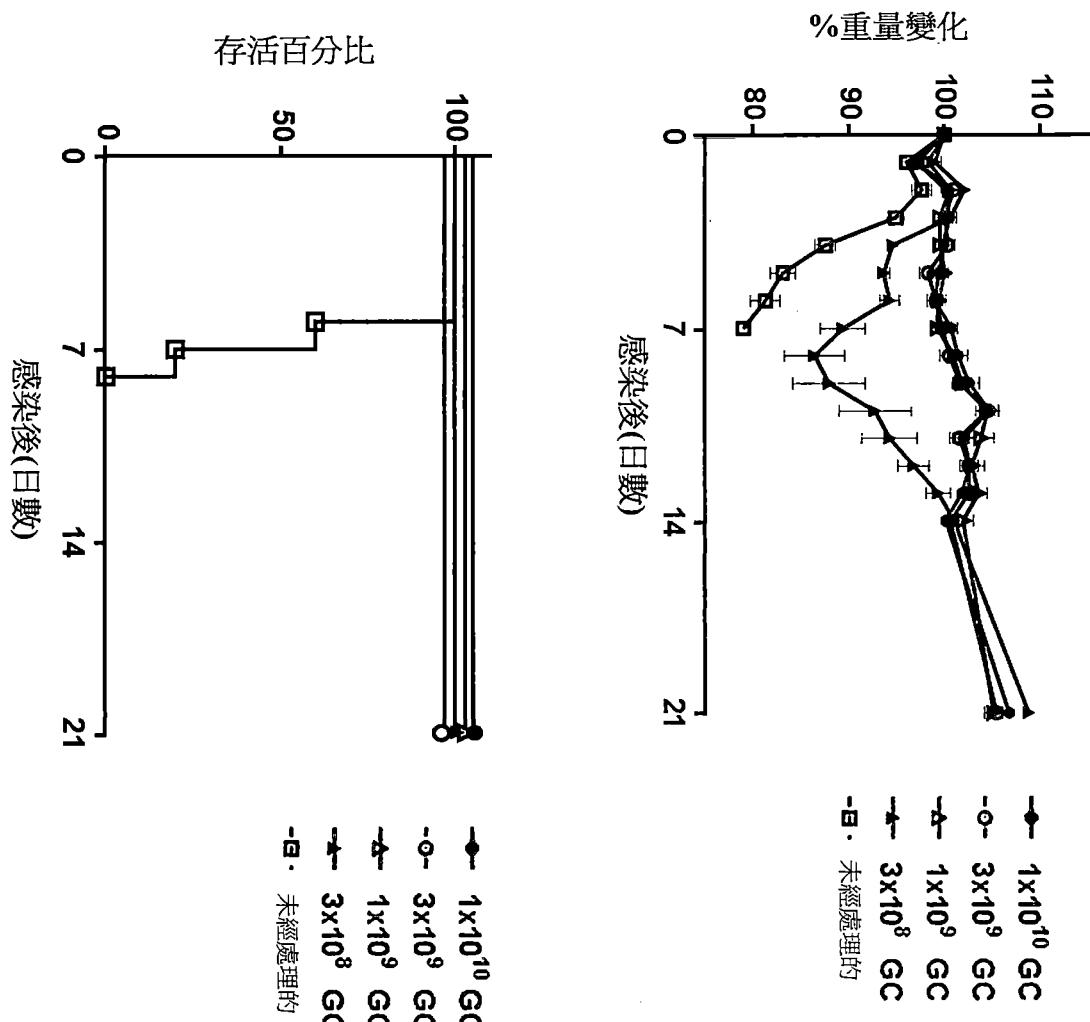


圖6B

圖6A

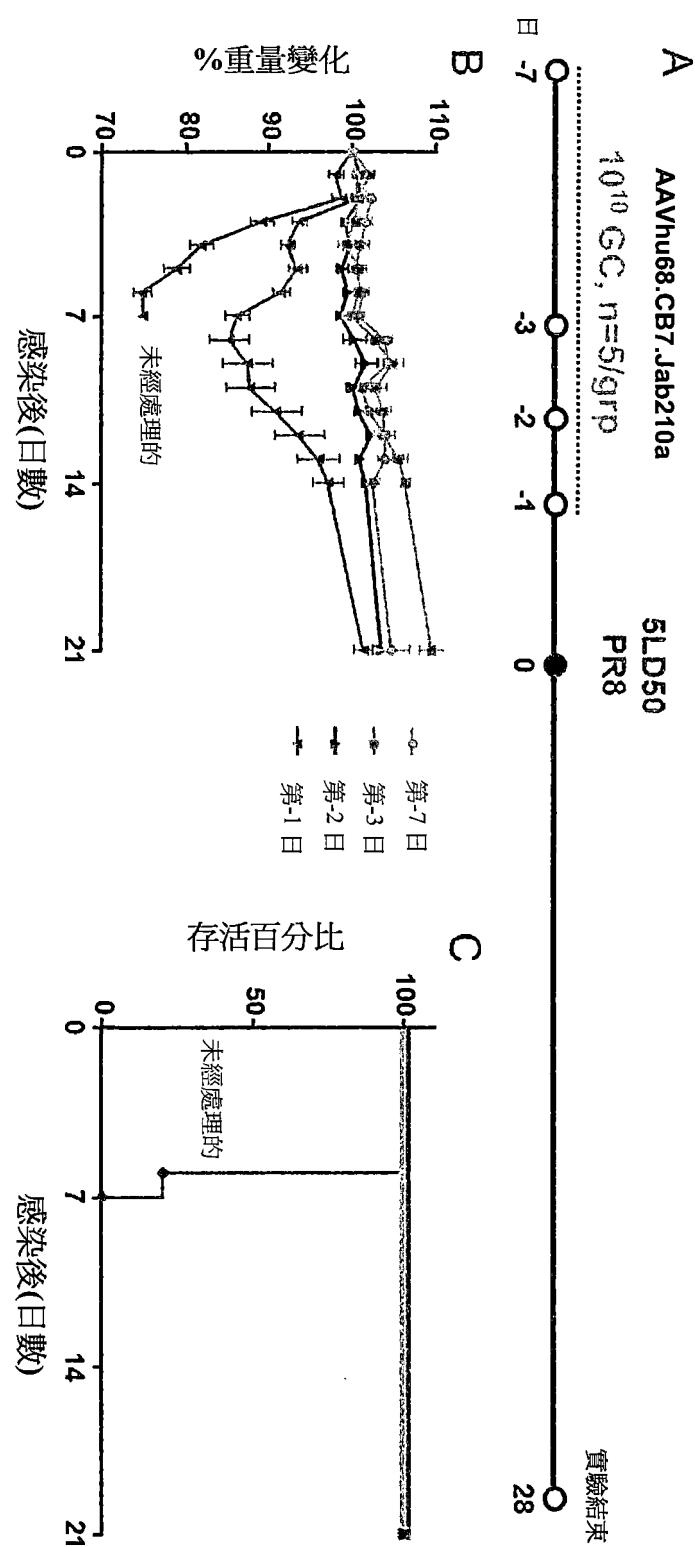


圖7A-7C

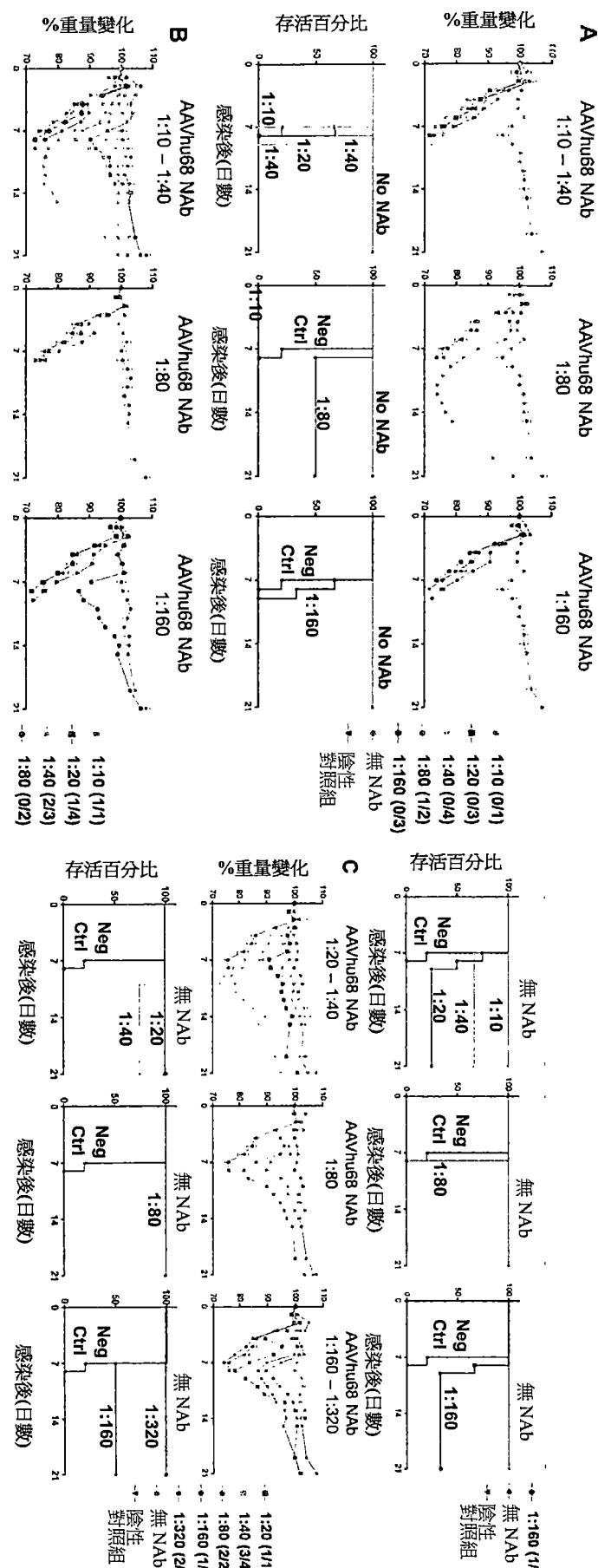
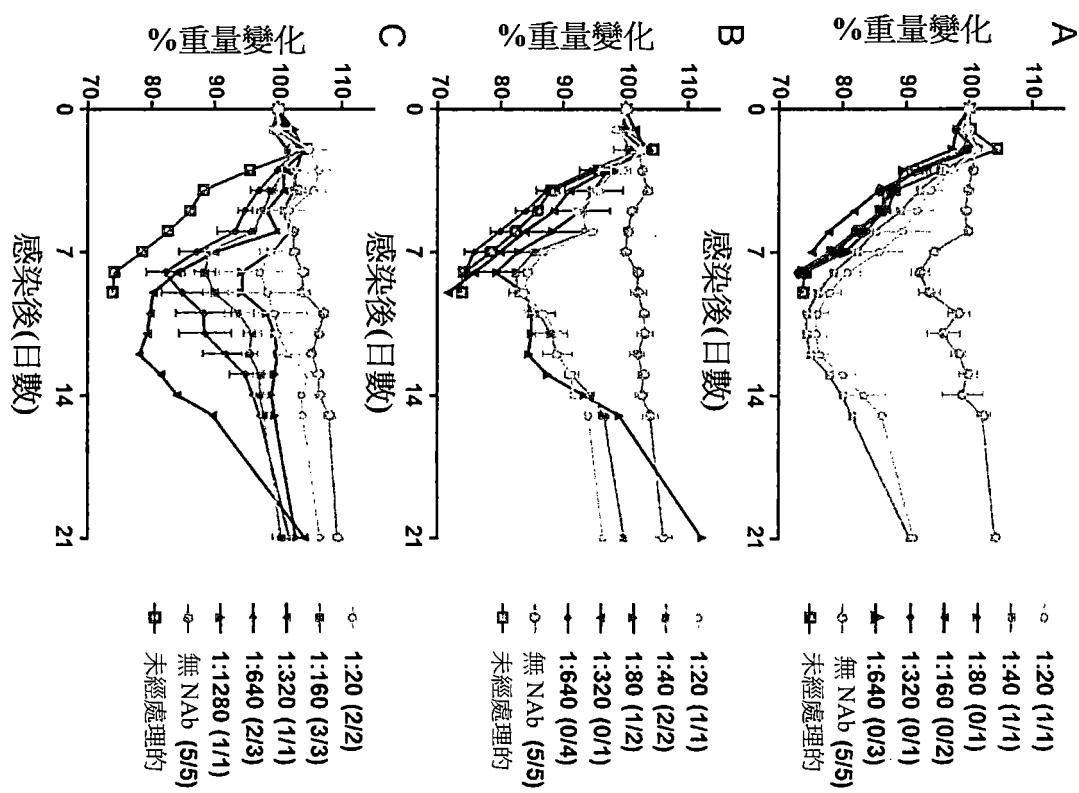


圖9A-9C



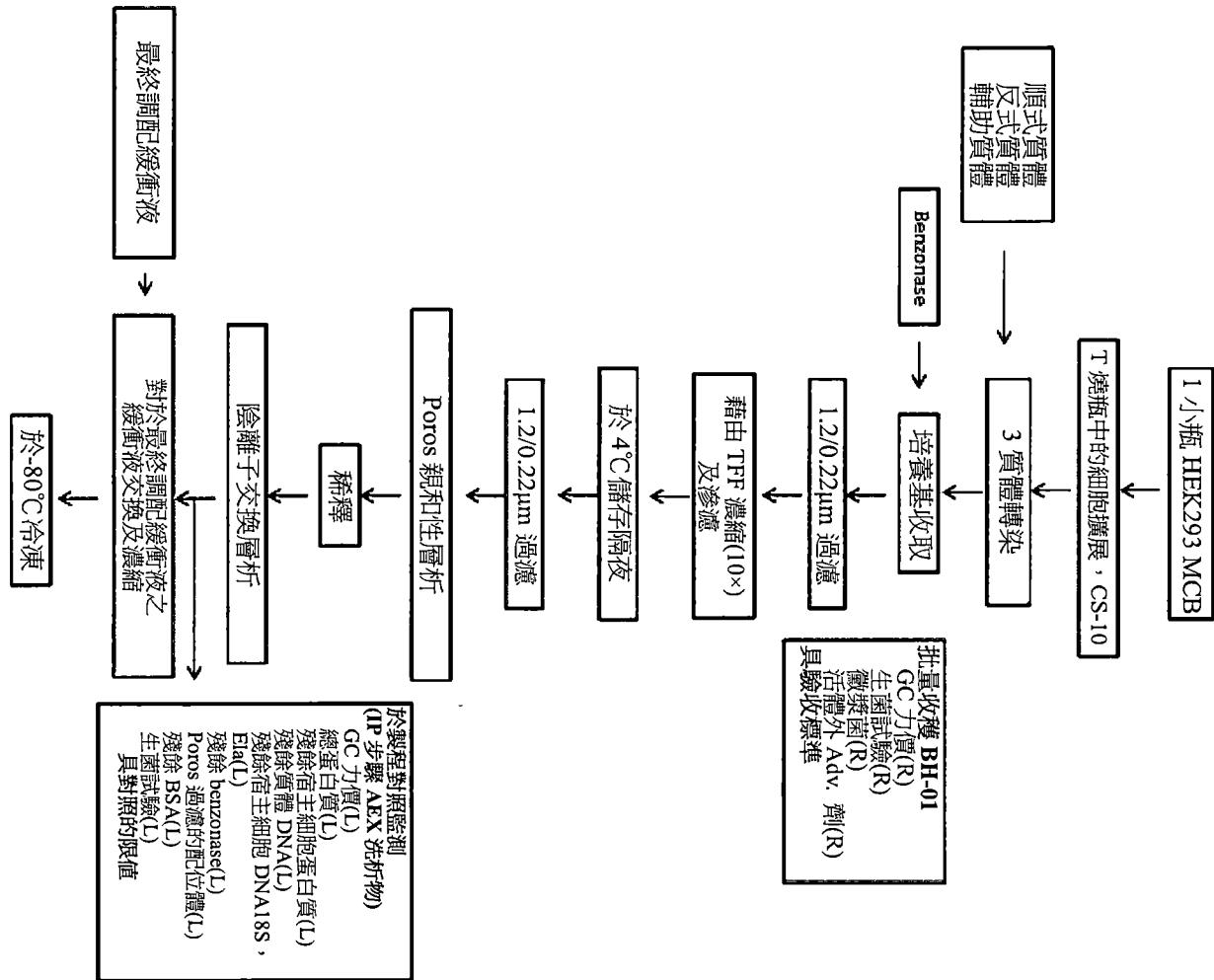


圖19A

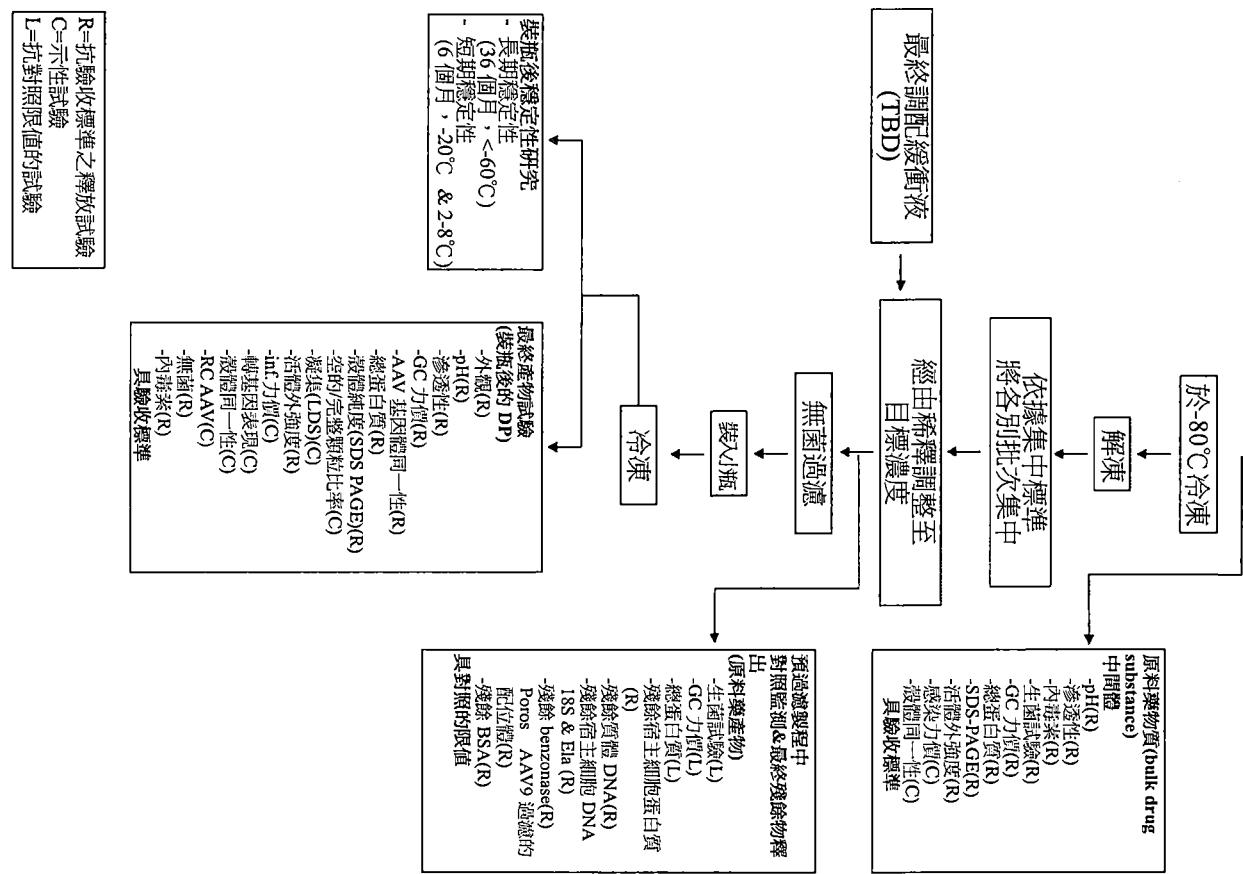


圖19B

R=抗驗收標準之釋放試驗
C=示生試驗
L=抗對照限值的試驗

