202136516

(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 202136516 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：110103306 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 01 月 28 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/861 (2006.01)* *C12N7/01 (2006.01)*
C12N15/09 (2006.01) *C12N15/33 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P19/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/01/29 美國 62/967,499

(71)申請人：美商銳進科斯生物股份有限公司 (美國) REGENXBIO INC. (US)
美國

(72)發明人：麥道加 迪文 MCDOUGALD, DEVIN (US)；卡魯木錫 梅勒錫 蘇巴 KARUMUTHIL-MELETHIL, SUBHA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：133 項 圖式數：39 共 310 頁

(54)名稱

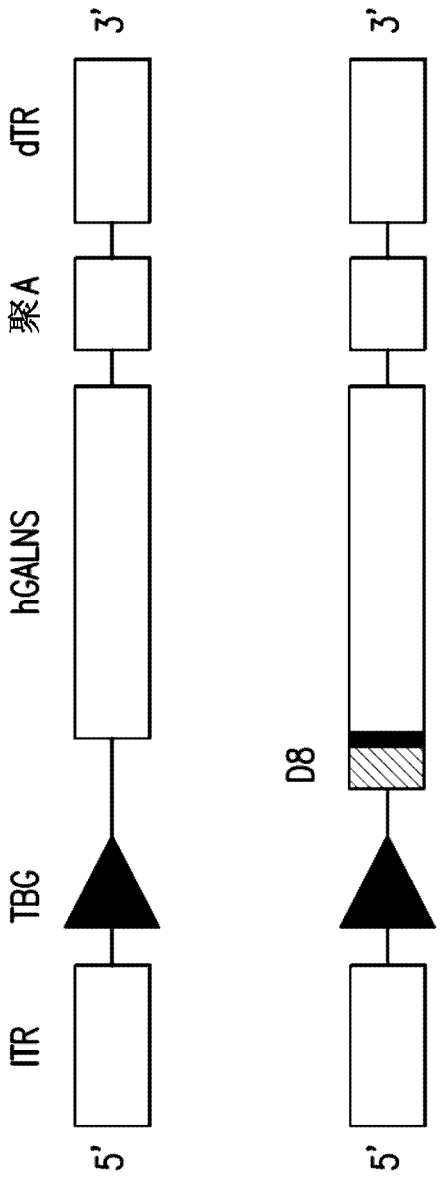
ＩＶＡ型黏多醣病之治療

(57)摘要

本文提供用於治療 IVA 型黏多醣病(MPS IVA)之基因治療方法，該等方法涉及使用重組腺相關病毒(rAAV)將人類 N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)遞送至經診斷患有 MPS IVA 之人類個體之骨。本文亦提供可用於該等基因治療方法中之 rAAV 及製備此類 rAAV 之方法。

Provided herein are gene therapy methods for the treatment of mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) involving the use of recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) to deliver human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (hGALNS) to the bone of a human subject diagnosed with MPS IVA. Also provided herein are rAAVs that can be used in the gene therapy methods and methods of making such rAAVs.

指定代表圖：



【圖 1】

202136516

【發明摘要】

【中文發明名稱】

IVA型黏多醣病之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA

【中文】

本文提供用於治療IVA型黏多醣病(MPS IVA)之基因治療方法，該等方法涉及使用重組腺相關病毒(rAAV)將人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)遞送至經診斷患有MPS IVA之人類個體之骨。本文亦提供可用於該等基因治療方法中之rAAV及製備此類rAAV之方法。

【英文】

Provided herein are gene therapy methods for the treatment of mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA) involving the use of recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) to deliver human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (hGALNS) to the bone of a human subject diagnosed with MPS IVA. Also provided herein are rAAVs that can be used in the gene therapy methods and methods of making such rAAVs.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

IVA型黏多醣病之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS IVA

【技術領域】

【0001】 本案係關於IVA型黏多醣病(MPS IVA)之治療領域。本文提供用於治療涉及重組腺相關病毒(rAAV)之MPS IVA的方法及組成物。

【先前技術】

【0002】 IVA型黏多醣病(MPS IVA；莫爾丘A症候群(Morquio A Syndrome))係一種由N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(GALNS)缺乏引起的常染色體隱性溶酶體貯積病(Khan等人, Mol Genet Metab., 2017; 120(1-2):78-95)。該酶之缺乏引起醣胺聚醣(GAG)、軟骨素-6-硫酸(C6S)及硫酸角質素(KS)之逐步積累，導致獨特的全身性骨骼發育不良，伴隨不完全骨化及連續的生長失衡，引起短頸及短軀幹、頸椎脊髓受壓、氣管阻塞、凸胸、關節鬆弛、脊柱後凸畸形、髖外翻及膝外翻。該疾病之其他臨床表現可包括聽力下降、心臟瓣膜受累及角膜混濁。已在患者中鑑別出200多種不同的突變，且在美國，其發生率為約1/250,000。

【0003】 重度型患者若不接受治療，則會在20秒或30秒內死於氣道受損、頸椎脊髓併發症或心臟瓣膜疾病(Khan等人, Mol Genet Metab., 2017; 120(1-2):78-95；Tomatsu, S.等人, Mol. Genet. Metab. 2016; 117, 150-156；Montaño, A.M.等人, J. Inherit. Metab. Dis. 2007; 30, 165-174；Tomatsu, S.等人, Res. Rep. Endocr. Disord. 2012; 2012, 65-77；

Pizarro, C.等人, Ann. Thorac. Surg. 2016; 102, e329-331)。在臨床實踐中，酶替代療法(ERT)、造血幹細胞移植(HSCT)及各種外科手術目前可作為MPS IVA患者之支持性療法。在2014年2月，FDA批准了ERT(埃洛磺酶α (elosulfase-alpha))之使用(Hendriksz等人, J Inherit Metab Dis., 2014; 37(6): 979-990)。作為當前護理標準，ERT使MPS IVA患者之軟組織病理學及日常生活活動(ADL)部分改善，不過，歸因於該等病變之無血管特性，此等療法對骨及軟骨之影響非常有限。當前ERT之局限包括：i)每週需要注射5-6小時；ii)藥物迅速自循環中清除；iii)治療費用極其昂貴(每位患者每年要花費500,000美元)；以及v)藥物顯示有限的骨滲透性(Algahim及Almassi, Ther Clin Risk Manag., 2013;9:45-53；Tomatsu等人, Curr Pharm Biotechnol., 2011;12:931-945)。對於MPS IVA，當前每週一次投與重組人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(rhGALNS：Vimizim™、埃洛磺酶α)對MPS IVA患者之骨及軟骨病變沒有作用。儘管HSCT對骨之作用可能比ERT好，但由於匹配的供體有限、有效治療之年齡限制、訓練有素之設施的缺乏、程序之死亡風險，諸如移植物抗宿主疾病(GVHD)、感染及其他併發症，此種基於細胞之療法可能不適用於所有患者(Tomatsu等人, Drug Des DevelTher., 2015; 9: 1937-1953)。就這一點而言，迫切需要用於MPS IVA之新藥，特別是用於治療MPS IVA患者之骨骼發育不良的新藥。

【0004】 基因療法有可能成為一次性的永久性療法。使用病毒及非病毒載體進行基因轉移的許多臨床前研究顯示，該療法在MPS疾病中具有治療潛力。腺相關病毒(AAV)載體係一種將治療性基因遞送至目標器官的引人注目之載體，因為載體實現轉殖基因產物之長期表現及較低的免疫原

性風險。由於具有此等優點，正在進行或計劃進行針對MPS I、II、IIIA、IIIB及VI的AAV介導之基因療法的臨床試驗(ClinicalTrials.gov; Sawamoto等人, Expert Opin. Orphan Drugs, 2016; 4, 941-951)。將足夠的酶遞送至軟骨病變及生長板區域有望解決MPS IVA患者之骨骼發育不良。先前的研究顯示，使用AAV2載體轉移GALNS基因將在組織中提供治療性酶水準(Alméciga-Díaz, C.J.等人, Pediatr. Res. 2018; *84*, 545-551)；但是，到目前為止，還沒有研究展示AAV介導之基因療法可以修正MPS IVA小鼠模型之骨骼病變。

【0005】 Dvorak-Ewell及其同事發現，每隔一天五次向野生型小鼠靜脈內註射10 mg/kg rhGALNS結合之Alexa-488螢光團使得在生長板及關節軟骨中偵測到該酶(Dvorak-Ewell, M.等人, PLoS One. 2010; 5, e12194)。該發現表明，高水準之循環酶可以使酶滲透至軟骨病變中。經顯示，重組AAV8載體係可高效轉導肝之AAV8載體，且在肝基因轉移方面之效率比前一代的AAV2載體要高10-100倍(Gao, G.P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002; 99, 11854-11859)。肝特異性啟動子之使用展現出顯著減少的宿主免疫反應，因為據報告，與遍在性啟動子相比，肝定向之AAV基因療法誘導針對轉殖基因產物之免疫耐受(Mingozzi, F.等人, J. Clin. Invest. 2003; 111, 1347-1356；Ziegler, R.J.等人, Mol. Ther. 2004; 9, 231-240；Dobrzynski, E.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006; 103, 4592-4597；Cao, O.等人, Blood 2007; 110, 1132–1140；Mingozzi, F.等人, Blood 2007; 110, 2334-2341)。此受抑制之免疫反應可提供轉殖基因產物之長期表現(Wang, L.等人, Mol. Ther. 2000; 1, 154-158；Sondhi, D.等人, Gene Ther. 2005; 12, 1618-1632)。先前的研究展示，重

組AAV8載體與肝特異性啟動子之組合對於小鼠及貓MPS VI模型中之骨骼病變提供較大的影響(Tessitore, A.等人, Mol. Ther. 2008; 16, 30-37；Cotugno, G.等人, Mol. Ther. 2011; 19, 461-469)。

【0006】 在所有類型之MPS中，MPS IVA患者顯示出最嚴重的骨骼異常(Melbouci, M.等人, Mol. Genet. Metab. 2018; 124, 1-10)，且骨靶向策略可使足夠的酶穿透軟骨區域。先前已展示，藉由將短的酸性胺基酸標籤連接至若干酶之N或C末端可具有增強的骨靶向性(Montaño, A.M.等人, Mol. Genet. Metab. 2008; 94, 178-189；Tomatsu, S.等人, Mol. Ther. 2010;18, 1094-1102)。羥磷灰石(HA)係骨中的主要無機組分，且具有含鈣離子之帶正電表面。骨唾液蛋白及骨橋蛋白與HA結合且此等磷酸化之酸性糖蛋白具有帶負電之酸性胺基酸(Asp及Glu)的重複序列，由此可作為骨靶向策略之潛在目標(Oldberg, A.等人, J. Biol. Chem. 1988; 263, 19430-19432；Kasugai, S.等人, J. Bone Miner. Res. 2000; 15, 936-943)。

【0007】 由於rAAV具有安全型態、多功能性及針對特定功能進行工程改造之能力，其可以在針對許多疾病之多種基因療法應用中使用(參見例如Naso等人, BioDrugs. 2017; 31(4): 317-334)。已使用AAV基因療法對包括神經肌肉、眼及免疫疾病在內之多種遺傳性疾病執行臨床試驗(參見例如Kumar等人, Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2016, 3:16034)。

【0008】 本文中參考文獻之引用不應解釋為承認其為本揭示案之現有技術。

【發明內容】

【0009】 本文提供用於治療IVA型黏多醣病(MPS IVA)之基因治療方法，該等方法涉及使用重組腺相關病毒(rAAV)將人類N-乙醯半乳糖胺-6硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)遞送至經診斷患有MPS IVA之人類個體之骨中。本文亦提供可用於基因治療方法中之rAAV、製備此類rAAV之方法以及可用於製備此類rAAV之聚核苷酸、質體及細胞。

【0010】 在一個態樣中，本文提供一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV反向末端重複序列(ITR) (例如AAV2-ITR、AAV8-ITR或AAV9-ITR)之人類N-乙醯半乳糖胺-6硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因。在一個特定實施例中，該hGALNS表現卡匣還包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在另一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子。

【0011】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR、AAV8-ITR或AAV9-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係TBG啟動子。

【0012】 在另一個態樣中，本文提供一種重組腺相關病毒(rAAV)，

其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)之人N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0013】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0014】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0015】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致

之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24達100%一致之核苷酸序列。

【0016】在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO:22達100%一致之核苷酸序列。

【0017】在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該ApoE強化子包含與SEQ ID NO:20至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該ApoE強化子啟動子包含與SEQ ID NO:20達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19達100%一致之核苷酸序列。

【0018】在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO:17至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO:17達100%一致之核苷酸序列。

【0019】在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動

子。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18達100%一致之核苷酸序列。

【0020】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0021】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0022】 在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0023】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之

hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0024】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0025】 在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0026】 在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該內含子係嵌合內含子。在一個特定實施例中，該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10達100%一致之核苷酸序列。

【0027】 在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例

中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0028】 在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO:9達100%一致之核苷酸序列。

【0029】 在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV8。在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV9。

【0030】 在另一個態樣中，本文提供一種醫藥組成物，其包含本文所提供之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。

【0031】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR、AAV8-ITR或AAV9-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因。在一個特定實施例中，該hGALNS表現卡匣還包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在另一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係TBG啟動子。

【0032】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR、AAV8-ITR或AAV9-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係TBG啟動子。

【0033】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0034】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼

hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0035】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0036】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24達100%一致之核苷酸序列。

【0037】 在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO:22至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO:22達100%一致之核苷酸序列。

【0038】 在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該ApoE強化子包含與SEQ ID NO:20至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該ApoE強化子啟動子包含與SEQ ID NO:20達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19達100%一致之核苷酸序列。

【0039】 在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO:17至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO:17達100%一致之核苷酸序列。

【0040】 在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18達100%一致之核苷酸序列。

【0041】 在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0042】 在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟

動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0043】 在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0044】 在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0045】 在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0046】 在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24達100%一致之核苷酸序列。

【0047】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該內含子係嵌合內含子。在一個特定實施例中，該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10達100%一致之核苷酸序列。

【0048】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO:12至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0049】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID

NO:9至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO:9達100%一致之核苷酸序列。

【0050】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV8。在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV9。

【0051】 在另一個態樣中，本文提供一種包含本文所提供之聚核苷酸的rAAV質體。

【0052】 在另一個態樣中，本文提供一種離體細胞，其包含本文所提供之聚核苷酸或本文所提供之rAAV質體。

【0053】 在另一個態樣中，本文提供一種製備rAAV之方法，該方法包括用本文所提供之rAAV質體及一或多個輔助質體轉染離體細胞，該一或多個輔助質體共同包含AAV基因Rep、Cap、VA、E2a及E4之核苷酸序列。

【0054】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與本文所提供之rAAV或本文所提供之醫藥組成物。

【0055】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白(視情況而定)遞送至該人類個體之骨及肝。在一個特定實施例中，該hGALNS或該融合蛋白藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0056】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白(視情況而定)遞送至該人類個體之骨。

【0057】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，該方法包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之轉殖基因，諸如編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜。在一個特定實施例中，hGALNS藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0058】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，該方法包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜，該hGALNS藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0059】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，該方法包括將治療有效量的hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜，其中該融合蛋白係由rAAV基因體(例如重組AAV8基因體(*亦即*，包含AAV8基因體之主鏈的重組基因體))產生。

【0060】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS

IVA之人類個體的方法，該方法包括將治療有效量的編碼轉殖基因之轉殖基因，諸如編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜，其中該融合蛋白係由rAAV基因體(例如重組AAV8基因體(*亦即*，包含AAV8基因體之主鏈的重組基因體))產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0061】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，該方法包括將治療有效量之hGALNS遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜，該hGALNS係由rAAV基因體(例如重組AAV8基因體(*亦即*，包含AAV8基因體之主鏈的重組基因體))產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0062】 在包括遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜的治療經診斷患有MPS IVA之人類個體之方法的某些態樣及實施例中，遞送至骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜之步驟係遞送至骨及/或軟骨之步驟。

【0063】 在包括遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜的治療經診斷患有MPS IVA之人類個體之方法的某些態樣及實施例中，遞送至骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜之步驟係遞送至(a)骨及/或軟骨，以及(b)韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、心肌及/或心臟瓣膜之步驟。

【0064】 在一個態樣中，本文提供一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8殼體或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)(例如AAV2-ITR)之人類N-乙醯半乳糖胺-6硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0065】 在一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0066】 在一些態樣中，該啟動子係TBG。在一些態樣中，該編碼啟動子之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 6至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 6至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 6至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 6至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 6至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 6達100%一致之核苷酸序列。

【0067】 在一些態樣中，該啟動子係CAG。在一些態樣中，該編碼啟動子之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 28至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 28至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 28至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 28至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 28至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 28達100%一致之核苷酸序列。

【0068】 在一些態樣中，該啟動子係LSPX1。在一些態樣中，該編碼啟動子之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 13至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 13至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 13至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 13至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 13至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 13達100%一致之核苷酸序列。

【0069】 在一些態樣中，該啟動子係LMTP6。在一些態樣中，該編碼啟動子之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 16至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 16至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 16至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 16至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 16至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 16達100%一致之核苷酸序列。

【0070】 在一些態樣中，該啟動子係LBTP2。在一些態樣中，該編碼啟動子之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0071】 在一些態樣中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 27至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 27至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 27至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 27至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 27至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 27達100%一致之核苷酸序列。

【0072】 在一些態樣中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 3至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 3至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 3至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 3至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 3至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 3達100%一致之核苷酸序列。

【0073】 在一些態樣中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 12至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 12至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 12至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 12至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 12達100%一致之核苷酸序列。

【0074】 在一些態樣中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：與SEQ ID NO: 2至少80%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 2至少85%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 2至少90%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 2至少95%一致之核苷酸序列；與SEQ ID NO: 2至少98%一致之核苷酸序列；或與SEQ ID NO: 2達100%一致之核苷酸序列。

【0075】 在一些態樣中，本文提供一種醫藥組成物，其包含一或多種本揭示案之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。在一些態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與一或多種本揭示案之rAAV。

3.1 示例性實施例

【0076】 1. 一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)之

人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0077】 2. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0078】 3. 如段落2之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【0079】 4. 如段落1至3中任一段之rAAV，其中該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。

【0080】 5. 如段落4之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0081】 6. 如段落4之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0082】 7. 如段落1至3中任一段之rAAV，其中該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。

【0083】 8. 如段落7之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0084】 9. 如段落7之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0085】 10. 如段落1至9中任一段之rAAV，其中該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。

【0086】 11. 如段落10之rAAV，其中該hAAT (ΔATG)啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 22至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 22至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 22至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 22至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 22至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【0087】 12. 如段落10之rAAV，其中該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【0088】 13. 如段落1至12中任一段之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。

【0089】 14. 如段落1至12中任一段之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區的核苷酸序列。

【0090】 15. 如段落13或14之rAAV，其中該ApoE強化子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 20至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 20至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 20至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 20至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 20至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【0091】 16. 如段落13或14之rAAV，其中該ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【0092】 17. 如段落14之rAAV，其中該肝控制區：

(a) 包含與SEQ ID NO: 19至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 19至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 19至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 19至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 19至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【0093】 18. 如段落14之rAAV，其中該肝控制區包含與SEQ ID

NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【0094】 19. 如段落1至3中任一項之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。

【0095】 20. 如段落19之rAAV，其中該LBTP1啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 17至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 17至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 17至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 17至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 17至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【0096】 21. 如段落19之rAAV，其中該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【0097】 22. 如段落1至3中任一段之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。

【0098】 23. 如段落22之rAAV，其中該LBTP2啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0099】 24. 如段落22之rAAV，其中該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0100】 25. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0101】 26. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0102】 27. 如段落26之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【0103】 28. 如段落25至27中任一段之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a)包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0104】 29. 如段落25至27中任一段之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0105】 30. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0106】 31. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0107】 32. 如段落31之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【0108】 33. 如段落30至32中任一段之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a)包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0109】 34. 如段落30至32中任一段之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0110】 35. 如段落1至34中任一段之rAAV，其中該hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。

【0111】 36. 如段落35之rAAV，其中該內含子係嵌合內含子。

【0112】 37. 如段落36之rAAV，其中該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。

【0113】 38. 如段落37之rAAV，其中該β-球蛋白/Ig內含子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 10至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 10至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 10至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 10至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【0114】 39. 如段落37之rAAV，其中該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【0115】 40. 如段落1至39中任一段之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。

【0116】 41. 如段落1至40中任一段之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0117】 42. 如段落1至41中任一段之rAAV，其中該編碼轉殖基

因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列：

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致；

(d) 與SEQ ID NO: 12至少95%一致；

(e) 與SEQ ID NO: 12至少98%一致；或

(f) 與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0118】 43. 如段落1至41中任一段之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含與SEQ ID NO: 12達100%一致的編碼hGALNS之核苷酸序列。

【0119】 44. 如段落1至43中任一段之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。

【0120】 45. 如段落44之rAAV，其中該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。

【0121】 46. 如段落45之rAAV，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號：

(a) 包含與SEQ ID NO: 25至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 25至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 25至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 25至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 25至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【0122】 47. 如段落45之rAAV，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信

號包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【0123】 48. 如段落44之rAAV，其中該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。

【0124】 49. 如段落48之rAAV，其中該兔球蛋白聚A位點：

(a) 包含與SEQ ID NO: 9至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 9至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 9至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 9至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【0125】 50. 如段落48之rAAV，其中該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【0126】 51. 如段落1至50中任一段之rAAV，其中該AAV係AAV8。

【0127】 52. 如段落1至50中任一段之rAAV，其中該AAV係AAV9。

【0128】 53. 一種醫藥組成物，其包含如段落1至52中任一段之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。

【0129】 54. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序

列。

【0130】 55. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0131】 56. 如段落55之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【0132】 57. 如段落54至56中任一段之聚核苷酸，其中該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。

【0133】 58. 如段落57之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0134】 59. 如段落57之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0135】 60. 如段落54至56中任一段之聚核苷酸，其中該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。

【0136】 61. 如段落60之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0137】 62. 如段落60之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0138】 63. 如段落54至62中任一段之聚核苷酸，其中該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。

【0139】 64. 如段落63之聚核苷酸，其中該hAAT (ΔATG)啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 22至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 22至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 22至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 22至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 22至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【0140】 65. 如段落63之聚核苷酸，其中該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【0141】 66. 如段落54至65中任一段之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。

【0142】 67. 如段落54至65中任一段之聚核苷酸，其中該骨-肝串

聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區的核苷酸序列。

【0143】 68. 如段落66或67之聚核苷酸，其中該ApoE強化子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 20至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 20至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 20至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 20至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 20至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【0144】 69. 如段落66或67之聚核苷酸，其中該ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【0145】 70. 如段落67之聚核苷酸，其中該肝控制區：

(a) 包含與SEQ ID NO: 19至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 19至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 19至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 19至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 19至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【0146】 71. 如段落67之聚核苷酸，其中該肝控制區包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【0147】 72. 如段落54至56中任一段之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。

【0148】 73. 如段落72之聚核苷酸，其中該LBTP1啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 17至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 17至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 17至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 17至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 17至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【0149】 74. 如段落72之聚核苷酸，其中該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【0150】 75. 如段落54至56中任一段之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。

【0151】 76. 如段落75之聚核苷酸，其中該LBTP2啟動子：

(a)包含與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0152】 77. 如段落75之聚核苷酸，其中該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0153】 78. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0154】 79. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0155】 80. 如段落79之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【0156】 81. 如段落78至80中任一段之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0157】 82. 如段落78至80中任一段之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【0158】 83. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0159】 84. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列

及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0160】 85. 如段落84之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【0161】 86. 如段落83至85中任一段之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0162】 87. 如段落83至85中任一段之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0163】 88. 如段落54至87中任一段之聚核苷酸，其中該hGALNS表現卡匣进一步包含編碼內含子之核苷酸序列。

【0164】 89. 如段落88之聚核苷酸，其中該內含子係嵌合內含子。

【0165】 90. 如段落89之聚核苷酸，其中該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。

【0166】 91. 如段落90之聚核苷酸，其中該β-球蛋白/Ig內含子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 10至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 10至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 10至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 10至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【0167】 92. 如段落90之聚核苷酸，其中該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【0168】 93. 如段落54至92中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。

【0169】 94. 如段落54至93中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0170】 95. 如段落54至94中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致；

(d) 與SEQ ID NO: 12至少95%一致；

(e) 與SEQ ID NO: 12至少98%一致；或

(f) 與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0171】 96. 如段落54至94中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0172】 97. 如段落54至96中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。

【0173】 98. 如段落97之聚核苷酸，其中該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。

【0174】 99. 如段落98之聚核苷酸，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號：

(a) 包含與SEQ ID NO: 25至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 25至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 25至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 25至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 25至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【0175】 100. 如段落98之聚核苷酸，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【0176】 101. 如段落97之聚核苷酸，其中該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。

【0177】 102. 如段落101之聚核苷酸，其中該兔球蛋白聚A位點：

(a) 包含與SEQ ID NO: 9至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 9至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 9至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 9至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【0178】 103. 如段落101之聚核苷酸，其中該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【0179】 104. 如段落54至103中任一段之聚核苷酸，其中該AAV係AAV8。

【0180】 105. 如段落54至103中任一段之聚核苷酸，其中該AAV係AAV9。

【0181】 106. 一種rAAV質體，其包含如段落54至105中任一段之聚核苷酸。

【0182】 107. 一種離體細胞，其包含如段落54至105中任一段之聚核苷酸或如段落106之rAAV質體。

【0183】 108. 一種製備rAAV之方法，其包括用如段落106之rAAV質體及一或多個輔助質體轉染離體細胞，該一或多個輔助質體共同包含AAV基因Rep、Cap、VA、E2a及E4之核苷酸序列。

【0184】 109. 一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與如段落1至52中任一段之rAAV或如段落53之醫藥組成物。

【0185】 110. 一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與如段落1至24中任一段或當直接或間接地從屬於段落1至24中任一段時如段落35至52中任一段之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨及肝。

【0186】 111. 如段落110之方法，其中該hGALNS或該融合蛋白藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0187】 112. 一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與如段落25至34中任一段或當直接或間

接地從屬於段落25至34中任一段時如段落35至52中任一段之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨。

【0188】 113. 一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0189】 114. 如段落13之rAAV，其中該AAV殼體係AAV8殼體或其變異體。

【0190】 115. 如段落13之rAAV，其中該AAV殼體係AAV9殼體或其變異體。

【0191】 116. 一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0192】 117. 如段落113至115中任一段之rAAV或如段落116之聚核苷酸，其中該啟動子係TBG。

【0193】 118. 如段落113至115或117中任一段之rAAV或如段落116至117中任一段之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 6至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 6至少85%一致之核苷酸序列；

(c)與SEQ ID NO: 6至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 6至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 6至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 6達100%一致之核苷酸序列。

【0194】 119. 如段落113至115中任一段之rAAV或如段落116之聚核苷酸，其中該啟動子係CAG。

【0195】 120. 如段落113至115或119中任一段之rAAV或如段落116或119中任一段之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a)與SEQ ID NO: 28至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 28至少85%一致之核苷酸序列；

(c)與SEQ ID NO: 28至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 28至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 28至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 28達100%一致之核苷酸序列。

【0196】 121. 如段落113至115中任一段之rAAV或如段落116之聚核苷酸，其中該啟動子係LSPX1。

【0197】 122. 如段落113至115或121中任一段之rAAV或如段落116或121中任一段之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a)與SEQ ID NO: 13至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 13至少85%一致之核苷酸序列；

(c)與SEQ ID NO: 13至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 13至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 13至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 13達100%一致之核苷酸序列。

【0198】 123. 如段落113至115中任一段之rAAV或如段落116之聚核苷酸，其中該啟動子係LMTP6。

【0199】 124. 如段落113至115或123中任一段之rAAV或如段落116或124中任一段之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 16至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 16至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 16至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 16至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 16至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 16達100%一致之核苷酸序列。

【0200】 125. 如段落113至115中任一段之rAAV或如段落116之聚核苷酸，其中該啟動子係LBTP2。

【0201】 126. 如段落113至115或125中任一段之rAAV或如段落116或125中任一段之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【0202】 127. 如段落113至115或117至126中任一段之rAAV或如

段落116至126中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 27至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 27至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 27至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 27至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 27至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 27達100%一致之核苷酸序列。

【0203】 128. 如段落113至115或117至126中任一段之rAAV或如段落116至126中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 3至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 3至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 3至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 3至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 3至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 3達100%一致之核苷酸序列。

【0204】 129. 如段落113至115或117至126中任一段之rAAV或如段落116至126中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 12至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 12至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 12達100%一致之核苷酸序列。

【0205】 130. 如段落113至115或117至126中任一段之rAAV或如段落116至126中任一段之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a)與SEQ ID NO: 2至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 2至少85%一致之核苷酸序列；

(c)與SEQ ID NO: 2至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 2至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 2至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 2達100%一致之核苷酸序列。

【0206】 131. 如段落113至115或117至130中任一段之rAAV或如段落116至130中任一段之聚核苷酸，其中該AAV-ITR係AAV2-ITR。

【0207】 132. 一種醫藥組成物，其包含如段落113至115或117至131中任一段之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。

【0208】 133. 一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與如段落113至115或117至131中任一段之rAAV或如段落132之醫藥組成物。

4. 縮寫

MPS IVA	IVA型黏多醣病
GALNS	N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶
hGALNS	人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶
GAG	醣胺聚醣
C6S	軟骨素6-硫酸

KS	硫酸角質素
ERT	酶替代療法
HSCT	造血幹細胞移植
AAV	腺相關病毒
TBG	甲狀腺素結合球蛋白
ITR	反向末端重複序列
D8	天冬胺酸八肽
ECM	細胞外基質
ELISA	酶聯免疫吸附分析
HS	硫酸乙醯肝素
IS	內標準
LC-MS/MS	液相層析/串聯質譜
OD	光密度
PBS	磷酸鹽緩衝生理鹽水
RBG pA	兔β-球蛋白聚A
KO	基因剔除
Sp7/Osx	Osterix啟動子

【圖式簡單說明】

【0209】 自如附圖中所示的以下本發明特定實施例之描述將顯而易知前述及其他目的、特徵及優點。附圖未必按比例繪製，而是將重點放在示出本發明各種實施例之原理上。

【0210】

圖1. rAAV基因體之示意圖。

圖2A-2D. (A)測定在用TBG-hGALNS質體、TBG-hGALNS-CoOpt質體、TBG-D8-hGALNS質體或TBG-D8-hGALNS-CoOpt質體轉染後，HuH-7細胞中的細胞內酶活性(n ＝ 2)。(B)描繪各輪在HuH-7細胞中測定的細胞內酶活性。(C)測定在用TBG-hGALNS質體、TBG-hGALNS-

CoOpt質體、TBG-D8-hGALNS質體或TBG-D8-hGALNS-CoOpt質體轉染HuH-7細胞後，培養基中的酶活性(n = 2)。(D)描繪各輪在HuH-7細胞中測定的培養基中的酶活性。

圖3. 測定在用TBG-hGALNS質體、TBG-hGALNS-CoOpt質體、TBG-D8-hGALNS質體或TBG-D8-hGALNS-CoOpt質體轉染後，HepG2細胞中的細胞內酶活性。

圖4. 對4週齡之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及免疫耐受小鼠($Galns^{tm(hC79S.mC76S)slu}$，Mtol)投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之活體內研究的時間表。顯示出血液中酶分析及KS分析之時間表。當描述劑量時，每千克之載體拷貝數(vc/kg)與每千克之基因拷貝數(GC/kg)可互換使用。

圖5A-5B. 在投與AAV8-TBG-hGALNS r或AAV-TBG-D8-hGALNS之後，在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之(A)白細胞(WBC)及(B)血漿中量測的hGALNS酶活性隨時間之變化。

圖6. 在投與AAV8-TBG-hGALNS (n=4隻)或AAV8-TBG-D8-hGALNS (n=4隻)之後，在Mtol小鼠之血漿中量測的hGALNS酶活性隨時間之變化。

圖7A-7D. 在(A) MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肝、(B) Mtol小鼠之肝、(C) MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之心臟及Mtol小鼠之心臟以及(D) MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之骨及Mtol小鼠之骨中量測的hGALNS酶活性。

圖8. 用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之血漿中的單硫酸化KS含量。

圖9A-9B. (A)用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之血漿中的單硫酸化KS含量隨時間之變化與未經治療之Mtol及WT小鼠之情形的比較。(B)在16週齡時，用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之血漿中的單硫酸化KS含量明顯低於未治療Mtol小鼠的含量(n = 4-5隻；平均值±SD；*相對於WT，$p < 0.05$；#相對於未治療組，$p < 0.05$；單因子變異數分析)。

圖10.在用AAV8-TBG-hGALNS治療、用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療、未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)中或在WT小鼠中量測的血液diHS-0S含量隨時間之變化。

圖11A-11P. (A)骨病理学評分之圖形描繪。在投與載體AAV8-hGALNS或AAV8-D8-hGALNS之後12週，藉由組織病理學分析评价MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之骨病理学。(B)膝關節(Lig-韌帶；M-半月板；F-股骨；T-脛骨)、(C-F)股骨關節軟骨(40x放大率)、(G-J)股骨生長板(40x放大率)、(K)半月板(40x放大率)、(L)韌帶(脛骨側、40x放大率)、(M、N)心臟瓣膜基部(40x放大率)及(O、P)心臟瓣膜(40x放大率)之組織病理學。

圖12A-12C. (A)在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之肝中量測的hGALNS酶活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之水準的比較(n = 3-8隻；平均值±SD)。(B)在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之脾及Mtol小鼠之脾中量測的hGALNS酶活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小

鼠之水準的比較(n = 3-8隻；平均值±SD)。(C)在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肺及Mtol小鼠之肺中量測的hGALNS酶活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之水準的比較(n = 3-8隻；平均值±SD)。

圖 13A-13B. (A)在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之骨及Mtol小鼠之骨中量測的hGALNS酶活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之水準的比較(n = 3-8隻；平均值±SD)。(B)在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之心臟及Mtol小鼠之心臟中量測的hGALNS酶活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之水準的比較(n = 3-8隻；平均值±SD)。

圖14.用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之血漿中的單硫酸化KS含量與未治療之MPS IVA KO小鼠及未治療之野生型小鼠之含量的比較(n = 4-8隻；平均值± SD)。

圖15A-15B.(A)用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之血漿中的單硫酸化KS含量隨時間之變化與未經治療之Mtol及WT小鼠之情形的比較。(B)在16週齡時，用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之血漿中的單硫酸化KS含量明顯低於未治療Mtol小鼠的含量(n = 4-5隻；平均值±SD；*相對於WT，$p < 0.05$；#相對於未治療組，$p < 0.05$；單因子變異數分析)。

圖16A-16C. (A)用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS

治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肝中的單硫酸化KS含量與未治療之MPS IVA KO小鼠及未治療之野生型小鼠之含量的比較。(B)用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肺中的單硫酸化KS含量與未治療之MPS IVA KO小鼠及未治療之野生型小鼠之含量的比較。(C)用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之肝中的單硫酸化KS含量與未治療之Mtol小鼠及未治療之野生型小鼠之含量的比較。對於(A)-(C)，n = 3-8隻；平均值±SD；*相對於WT，p <0.05；#相對於未治療組，p <0.05；單因子變異數分析。

圖17A-17E. (A)野生型小鼠(所有軟骨細胞均未空泡化且柱狀結構良好組織化)、(B)未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)(所有軟骨細胞均空泡化且柱狀結構明顯結構紊亂且變形)、(C)未治療之Mtol小鼠(所有軟骨細胞均空泡化且柱狀結構明顯結構紊亂且變形)、(D) AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠(軟骨細胞中等空泡化，但柱狀結構變好)及(E) AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠(軟骨細胞中等空泡化，但柱狀結構部分恢復)中股骨生長板之組織病理學(40x放大率)。

圖18A-18D.(A)在未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之股骨生長板中量測的軟骨細胞大小。(B)在未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之股骨生長平板中量測的軟骨細胞大小。(C)在未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、AAV8-TBG-hGALNS

治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之脛骨生長板中量測的軟骨細胞大小。(D)在未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之脛骨生長板中量測的軟骨細胞大小。對於(A)-(D)，n = 4-6隻；平均值±SD；*相對於WT，$p < 0.05$；#相對於未治療組，$p < 0.05$；單因子變異數分析。

圖19. 用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之心臟瓣膜的組織病理學(40x放大率)與未治療小鼠的比較。

圖20. 用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之心肌(40x放大率)的組織病理學與未治療之Mtol小鼠的比較。

圖21A-21D. (A)未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠之心臟瓣膜組織的病理學評分。(B)未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之心臟瓣膜組織的病理學評分。(C)未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠之心肌組織的病理學評分。(D)未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之心肌組織的病理學評分。(對於圖21A-21D，n = 4-6隻；平均值±SD； *相對於

WT，p <0.05；#相對於未治療組，p <0.05；單因子變異數分析)。

圖22.在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV-TBG-D8-hGALNS之後，在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之血漿中量測的hGALNS酶活性隨時間的變化(n＝4-7隻；平均值+SD)。

圖 23. 在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，在Mtol小鼠之血漿中量測的hGALNS酶活性隨時間的變化(n＝4-5隻；平均值+SD)。

圖24A-24K.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之血液及組織中人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)之酶活性。(A) AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS病毒載體基因體之示意性結構。每隔一週自MPS IVA小鼠收集血液樣品，直至16週齡，且在(B)基因剔除(KO)及(C)耐受型(MTOL)小鼠中量測血漿hGALNS酶活性。n = 4-7隻。在註射含或不含骨靶向信號之AAV載體後12週，自MPS IVA小鼠收集組織樣品。在KO及MTOL小鼠中量測包括(D)肝、(E)脾、(F)肺、(G)腎臟、(H)心臟及(I)骨(腿)在內之組織中的hGALNS酶活性(n = 3-8隻；採用Bonferroni事後檢驗，藉由單因子變異數分析對統計數據進行分析且數據表示為平均值±SD。* p <0.05)。(J)中顯示在靜脈內遞送AAV載體後12週，MPS IVA KO小鼠之肝、脾、肺、腎臟、心臟及骨中的hGALNS活性水準。(K)中顯示在靜脈內遞送AAV載體後12週，MTOL小鼠之肝、脾、肺、腎臟、心臟及骨中的hGALNS活性水準。

圖25A-25D.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之血液及組織醣胺聚醣(GAG)含量。每隔一週自MPS IVA小鼠收集血液樣品，直至16週齡，且在(A)基因剔除(KO)及(B)耐受型(MTOL)小鼠中量測血漿單硫酸化KS

含量。n = 4-8隻。在注射含或不含骨靶向信號之AAV載體後12週，自MPS IVA小鼠收集組織樣品。在KO及MTOL小鼠中量測包括(C)肝及(D)肺在內之組織中的KS量。n = 4-8隻。使用Bonferroni事後檢驗，藉由單因子變異數分析對統計數據進行分析。數據表示為平均值±SD。* p < 0.05。

圖26A-26C.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之骨病理學的修正情況。藉由甲苯胺藍染色分析，使用在AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之膝關節中(A)生長板及(B)關節盤的光學顯微鏡檢查，評估軟骨細胞空泡化之修正。將基因剔除(KO)及耐受型(MTOL)小鼠之骨病理學與野生型、未治療之MPS IVA及經含或不含骨靶向信號之AAV8載體治療的MPS IVA相比較。比例尺= 25 μm。(C)藉由Image J軟體對股骨或脛骨生長板病變中之軟骨細胞大小進行定量。數據表示相對於野生型組之倍數變化。n = 4-7隻。使用Bonferroni事後檢驗，藉由單因子變異數分析對統計數據進行分析。數據表示為平均值±SD。* p <0.05。

圖27A-27B.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之心臟病理學的修正情況。藉由甲苯胺藍染色分析，使用經AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之(A)心臟瓣膜及(B)心肌的光學顯微鏡檢查，評估空泡化之修正。將基因剔除(KO)及耐受型(MTOL)小鼠之心臟病理學與野生型、未治療之MPS IVA及經含或不含骨靶向信號之AAV8載體治療之MPS IVA相比較。箭頭指示與疾病相關空泡之位置。比例尺= 25 μm。

圖28.在AAV8載體治療之MPS IVA小鼠中之循環抗hGALNS抗體效價。在注射含或不含骨靶向信號之AAV8載體後12週，自MPS IVA小鼠收集血漿。藉由間接ELISA分析法偵測循環抗hGALNS抗體效價。在微板分

光光度計中量測OD 405值。n ＝ 4-8隻。使用Bonferroni事後檢驗，藉由單因子變異數分析對統計數據進行分析。數據表示為平均值±SD。* p ＜ 0.05。

圖29A-29B.含或不含骨靶向信號之經優化hGALNS的評價。將Huh-7細胞分別用含或不含骨靶向信號的表現hGALNS或密碼子優化之hGALNS的AAV8載體質體轉染。轉染48小時後，收集細胞團粒及培養基，並量測hGALNS活性。(A)測定在用TBG-hGALNS質體、TBG-hGALNS-CoOpt質體、TBG-D8-hGALNS質體或TBG-D8-hGALNS-CoOpt質體轉染後，HuH-7細胞中之細胞內酶活性。(B)測定在用TBG-hGALNS質體、TBG-hGALNS-CoOpt質體、TBG-D8-hGALNS質體或TBG-D8-hGALNS-CoOpt質體轉染HuH-7細胞後，培養基中之酶活性。數據表示為平均值。n = 2。

圖30.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠的血液硫酸乙醯肝素(HS)含量。自MPS IVA小鼠收集血液樣品，並在16週齡時量測基因剔除(KO)及耐受型(MTOL)小鼠之血漿diHS-0S含量。數據表示為平均值±SD。AAV：腺相關病毒；TBG：甲狀腺素結合球蛋白；hGALNS：N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶。

圖31.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠的組織硫酸肝素(HS)含量。在注射含或不含骨靶向信號之AAV載體後12週，自MPS IVA小鼠收集組織樣品。在KO及MTOL小鼠中量測包括肝、脾、肺及腎臟在內之組織中diHS-0S之量。數據表示為平均值±SD。

圖32A-32B.用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之骨病理學的修正情況。藉由甲苯胺藍染色分析，使用AAV8載體治療之MPS IVA小鼠之膝關

節中(A)韌帶及(B)半月板的光學顯微鏡檢查，評估軟骨細胞空泡化之修正。將基因剔除(KO)及耐受型小鼠(MTOL)之骨病理學與野生型、未治療之MPS IVA及經含或不含骨靶向信號之AAV8載體治療之MPS IVA相比較。箭頭指示疾病相關空泡之位置(比例尺= 25 μm)。

圖33. LBTP1啟動子圖，顯示最小Sp7/Osx啟動子片段(Lu, X.等人, JBC 281, 6297-6306, 2006年1月12日) (SEQ ID NO:24)在5'端側接肝特異性ApoE強化子/肝控制區，且在3'端側接ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAAT(ΔATG))以驅動肝細胞特異性表現。將嵌合β-球蛋白/Ig內含子置放於該啟動子序列之下游(3')，亦即，hAAT(ΔATG)之下游。該最小Sp7/Osx啟動子片段驅動成骨細胞特異性表現，且被確定為全長Sp7/Osx啟動子之轉錄活性片段(Lu, X.等人, JBC 281, 6297-6306, 2006年1月12日)。

圖34. LBTP2啟動子圖，顯示全長Sp7/Osx啟動子(Lu, X.等人, JBC 281, 6297-6306, 2006年1月12日) (SEQ ID NO: 23)在5'端側接肝特異性ApoE強化子/肝控制區，且在3’端側接ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAAT(ΔATG))以驅動肝細胞特異性表現。

圖35.全長Sp7/Osx啟動子驅動的表現hGALNS之AAV構築體的示意圖。

圖36.最小Sp7/Osx啟動子驅動的表現hGALANS之AAV構築體的示意圖。

圖37.用於肝細胞及成骨細胞特異性表現的LBTP1啟動子驅動之表現hGALNS之AAV構築體的示意圖。該構築體包含：驅動成骨細胞特異性表現之最小Sp7/Osx啟動子片段。該最小Sp7啟動子片段側接5'肝特異性

ApoE強化子及3'驅動肝細胞特異性表現的 ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAATΔ)、嵌合內含子及密碼子優化之CpG陰性GALNS蛋白編碼序列。

圖38.用於肝細胞及成骨細胞特異性表現的LBTP2啟動子驅動之表現hGALNS之AAV構築體的示意圖。該構築體包含：驅動成骨細胞特異性表現之全長Sp7/Osx啟動子片段。全長Sp7/Osx啟動子片段側接5'肝特異性ApoE強化子及3'驅動肝細胞特異性表現的ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAATΔ)、嵌合內含子及密碼子優化之CpG陰性GALNS蛋白編碼序列。

圖39.小梁骨之所關注體積以白色區域顯示(小梁骨在左，皮質骨在右)。

【實施方式】

相關申請案之交互引用

【0211】 本申請案主張2020年1月29日提出申請的美國臨時申請案第62/967,499號之權益，該案內容以引用之方式整體併入本文中。

關於以電子方式提交之序列表的參考

【0212】 本申請案以引用之方式併入序列表，該序列表係於2020年1月21日創建，以題為「 Sequence_Listing_12656-130-228.txt」之文字檔案形式與本申請案一起提交，且大小為47,601位元組。

【0213】 本發明至少部分係基於一個令人驚訝的發現，即，在IVA型黏多醣病(MPS IVA)動物模型中投與包含某些hGALNS表現卡匣之重組腺相關病毒(rAAV)在整個監測期內保持高水準hGALNS酶活性，並引起包括骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌

及心臟瓣膜在內之組織的改善，相較於酶替代療法(ERT)所達成之效果，展現出一定改善。

【0214】本文描述用於治療需要治療之人類個體之MPS IVA的rAAV。該等rAAV包含編碼hGALNS之重組AAV基因體。該rAAV可投與MPS IVA患者，引起hGALNS之合成及將hGALNS遞送至受影響之組織，諸如骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜，從而改善病理學並防止疾病進展。

【0215】提供一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含AAV殼體及重組AAV基因體，該基因體包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)之hGALNS表現卡匣。在某些實施例中，rAAV殼體與血清型AAV8殼體至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 1至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 1有80-85%、85-90%、90-95%、95-99%或99-99.9%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 1一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 1。在某些實施例中，rAAV殼體與血清型AAV9殼體至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 26至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 26有80-85%、85-90%、90-95%、95-99%或99-99.9%一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列與SEQ ID NO: 26一致。在某些實施例中，rAAV殼體之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 26。有關rAAV殼體之更多詳情，請參見第

6.1.1節。在一些實施例中，hGALNS表現卡匣包含編碼融合蛋白之核苷酸序列，該融合蛋白係hGALNS與酸性寡肽融合。在某些實施例中，酸性寡肽係D8。在某些實施例中，hGALNS表現卡匣進一步包含編碼肝特異性啟動子(例如甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子)之核苷酸序列。在某些實施例中，hGALNS表現卡匣還包含編碼骨-肝串聯啟動子(例如LBTP1或LBTP2啟動子)之核苷酸序列，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子。在某些實施例中，骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子或最小Sp7/Osx啟動子。在某些實施例中，肝特異性啟動子係hAAT啟動子或較佳地為hAAT(ΔATG)啟動子。在某些實施例中，hGALNS表現卡匣另外包含編碼聚A位點之核苷酸序列。在其他實施例中，hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子(例如TBG啟動子)之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。在某些實施例中，hGALNS表現卡匣另外包含編碼聚A位點之核苷酸序列。

【0216】 本文亦提供包含如本文所述之hGALNS表現卡匣的聚核苷酸。亦提供包含本文所提供之聚核苷酸的質體及細胞(例如離體宿主細胞)，其用於製備與本文所提供之方法及組成物一起使用的rAAV。

【0217】 本文亦提供用於製備本文所述之rAAV的方法。

【0218】 本文還提供用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法。在一個態樣中，該方法包括向該人類個體投與本文所述之rAAV。在另一個態樣中，該方法包括將糖基化之hGALNS(例如藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化的hGALNS)遞送至受影響之組織。在另一個態樣中，該方法包括將hGALNS與酸性寡

肽融合之融合蛋白遞送至受影響之組織。該融合蛋白可藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0219】 本文亦提供包含本文所述之rAAV的醫藥組成物及套組。

【0220】 本文所提供之rAAV在第6.1節中有描述，其包括第6.1.1節中關於rAAV殼體之描述以及第6.1.2節中關於hGALNS表現卡匣之描述。製備本文所提供之rAAV的方法以及可用於此類方法中的聚核苷酸、質體及細胞描述於第6.2節中。用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體之方法，包括目標患者人群、投藥途徑及劑量方案描述於第6.3節中。組合療法描述於第6.4節中。疾病標誌物及評估臨床結果之方法描述於第6.5節中。非限制性說明性實例提供於第7節中。

【0221】 不受理論束縛，rAAV之製造、組成及使用方法可經修改以使其仍能將hGALNS酶遞送至人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板及/或心臟瓣膜作為針對MPS IVA之治療方法。

6.1 重組腺相關病毒(rAAV)

【0222】 本文提供可用於治療有需要之人類個體之MPS IVA的rAAV，該等rAAV包括AAV殼體及包含hGALNS表現卡匣之重組AAV基因體。

【0223】 在一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如為編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白的轉殖基因。hGALNS表現卡匣可進一步包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地

連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。

【0224】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。

【0225】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0226】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0227】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV

殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0228】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0229】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0230】 在另一個態樣中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV殼體(例如AAV8或AAV9殼體)；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該

編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0231】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV9殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼CAG啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼CAG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV9-CAG-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0232】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含(a) AAV9殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV9-LMTP6-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0233】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV9殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築

體又稱為AAV9-LBTP2-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0234】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼CAG啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼CAG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV8-CAG-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0235】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV8-LMTP6-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0236】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列

可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV8-LBTP2-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0237】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼TBG啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼TBG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV8-TBG-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0238】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或hGALNScoV2)，且其中該編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，此構築體又稱為AAV8-LSPX1-hGALNScoV2，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0239】在特定實施例中，本文提供一種rAAV，其包含：(a) AAV8殼體；及(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV2-ITR之hGALNSco表現卡匣，該hGALNSco表現卡匣包含編碼TBG啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS (或

hGALNSco)，且其中該編碼TBG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一些實施例中，該構築體又稱為AAV8-TBG-hGALNSco，例如，如本揭示案之實例12中所揭示。

【0240】 在本文所述各態樣及實施例的各種實施例中，AAV係AAV8。在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV9。

【0241】 在某些實施例中，hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，由此使hGALNS蛋白在肝中表現，該hGALNS蛋白一旦自肝細胞分泌，即易位至其他組織，包括但不限於嚴重受影響之器官，諸如骨、軟骨及相關組織，以及心臟瓣膜。

【0242】 下文詳細描述本文所提供之rAAV的不同組分。

6.1.1 殼體

【0243】 殼體係病毒之蛋白質外殼，且可在與宿主環境相互作用時包裝並保護病毒基因體。根據本發明，本文所提供之rAAV包含AAV殼體。在一個特定實施例中，AAV殼體係天然發現之AAV的殼體(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAV11之殼體)。在另一個特定實施例中，AAV殼體源自於天然發現之AAV的殼體(例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAV11之殼體)，例如，因為其具有與天然發現之AAV的殼體之胺基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.9%或100%一致之胺基酸序列。

【0244】 在某些實施例中，本文所描述的可根據本發明使用之AAV

變異殼體包括Anc80或Anc80L65，如Zinn等人, 2015, Cell Rep. 12(6): 1056-1068中所述，該文獻以引用之方式整體併入本文。在某些實施例中，本文所描述的可根據本發明使用之AAV變異殼體包含以下胺基酸插入序列之一：LGETTRP或LALGETTRP，如美國專利第9,193,956號、第9,458,517號及第9,587,282號，以及美國專利申請公開案第2016/0376323號中所描述，各案以引用之方式整體併入本文中。在某些實施例中，本文所描述的可根據本發明使用之AAV變異殼體包括如美國專利第9,193,956號、第9,458,517號及第9,587,282號，以及美國專利申請公開案第2016/0376323號中所述之AAV.7m8，各案以引用之方式整體併入本文中。在某些實施例中，本文所描述的可根據本發明使用之AAV變異殼體包括美國專利第9,585,971號中所揭示之任何AAV，諸如AAV-PHP.B。在某些實施例中，可根據本發明使用之AAV變異殼體包括但不限於以下專利及專利申請案中之任一個中所揭示之殼體，各案以引用之方式整體併入本文中：美國專利第7,282,199號、第7,906,111號、第8,524,446號、第8,906,675號、第8,999,678號、第8,628,966號、第8,927,514號、第8,734,809號、第US 9,284,357號、第9,409,953號、第9,169,299號、第9,193,956號、第9458517號、第9,587,282號、第9,737,618號、第9,840,719號；美國專利申請公開案第2015/0374803號、第2015/0126588號、第2017/0067908號、第2013/0224836號、第2016/0215024號、第2017/0051257號；以及國際專利申請案第PCT/US2002/033630號、第PCT/US2004/028817號、第PCT/2002/033629號、第PCT/US2006/013375號、第PCT/US2015/034799號、第PCT/EP2015/053335號、第PCT/US2016/042472號、第

PCT/US2017/027392號。

【0245】 在某些實施例中，可使用單股AAV(ssAAV)(*同上述*)。在某些實施例中，可使用自互補型載體，例如scAAV(參見例如Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18(2):171-82；McCarty等人, 2001, Gene Therapy, 第8卷, 第16期, 第1248-1254頁；以及美國專利第6,596,535號、第7,125,717號及第7,456,683號，其各自以引用之方式整體併入本文。

【0246】 在特定實施例中，包含在rAAV中之AAV殼體係AAV8殼體或衍生自AAV8殼體。與其他血清型相比，AAV8具有更高的肝轉導效率，且對於抗人AAV抗體具有較低反應性。重要的是，AAV8殼體之特定區域藉由介導核進入及殼體脫殼來促成高肝轉導作用(Tenney等人, Virology, 2014, 454–455: 227-236；Nam等人, J Virol., 2007 81(22): 12260–12271)。因此，AAV8對肝細胞具有向性(tropism)(Sands, M., Methods Mol Biol., 2011;807:141–157)。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列與AAV8殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 1)一致。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列與AAV8殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 1)至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.9%一致，同時保留AAV8殼體包裝病毒基因體之能力，且較佳地亦保留AAV8殼體高效轉導肝細胞之能力。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列除1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸殘基外，與AAV8殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 1)一致，同時保留AAV8殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV8殼體高效轉導

肝細胞的能力。在本文所描述之治療方法的一個特定實施例中，使用AAV8進行hGALNS蛋白之靶向肝表現。

【0247】 在特定實施例中，包含在rAAV中之AAV殼體係AAV9殼體或衍生自AAV9殼體。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列與AAV9殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 26)一致。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列與AAV9殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 26)至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.9%一致，同時保留AAV9殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV9殼體高效轉導肝細胞的能力。在某些實施例中，包含在rAAV中的AAV殼體之胺基酸序列除1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸殘基外，與AAV9殼體之胺基酸序列(SEQ ID NO: 26)一致，同時保留AAV9殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV9殼體高效轉導肝細胞的能力。在本文所描述之治療方法的一個特定實施例中，使用AAV9進行hGALNS蛋白之靶向肝表現。

6.1.2 **hGALNS表現卡匣**

【0248】 AAV具有線性單股DNA(ssDNA)基因體，該基因體在兩個末端含有兩個反向末端重複序列(ITR)。AAV藉由胞吞作用進入細胞中(Meier及Greber, J Gene Med., 2004;6 增刊1:S152-63)。殼體分解後，ssDNA基因體被釋放並轉化為雙股DNA(dsNDA)，由該DNA可表現病毒基因體所編碼之基因(Ding等人, 2005, Gene Ther., 12: 873-880)。

【0249】 根據本發明，本文所提供之rAAV包含重組AAV基因體。

重組AAV基因體可包含AAV基因體或其變異體之主鏈(例如AAV1、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAV11基因體或其變異體之主鏈)。在一些實施例中，重組AAV基因體可包含AAV8基因體或其變異體之主鏈。在一些實施例中，重組AAV基因體可包含AAV9基因體或其變異體之主鏈。在一個特定實施例中，重組AAV基因體包含AAV8基因體或其變異體之主鏈。在一個特定實施例中，重組AAV基因體包含AAV9基因體或其變異體之主鏈。

【0250】根據本發明，重組AAV基因體包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣。在一些實施例中，hGALNS表現卡匣係hGALNSco。在一些實施例中，hGALNS表現卡匣係hGALNScoV2。在一些實施例中，重組AAV基因體包含AAV8基因體或其變異體之主鏈，且包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNScoV2表現卡匣。在一些實施例中，重組AAV基因體包含AAV9基因體或其變異體之主鏈，並包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNScoV2表現卡匣。在一些實施例中，重組AAV基因體包含AAV8基因體或其變異體之主鏈，並包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNSco表現卡匣。在一些實施例中，重組AAV基因體包含AAV9基因體或其變異體之主鏈，並包含側接AAV-ITR(例如AAV2-ITR)之hGALNSco表現卡匣。在一些實施例中，hGALNS表現卡匣包含編碼融合蛋白之核苷酸序列，該融合蛋白係hGALNS與酸性寡肽融合。hGALNS表現卡匣可進一步包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在其他實施例中，hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，

其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。

(a) **hGALNS**

【0251】在一些實施例中，hGALNS係hGALNS、hGALNSco、D8-hGALNS、D8-GALNSco或hGALNScoV2中之一或多種。在一些實施例中，hGALNS係hGALNScoV2。在一些實施例中，hGALNS係hGALNSco。在某些實施例中，hGALNS係hGALNS。在一些實施例中，hGALNS係D8-GALNSco。在一些實施例中，hGALNS係D8-GALNS。

【0252】在某些實施例中，該編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列包含SEQ ID NO: 2、3或27之序列。在某些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列與SEQ ID NO: 2、3或27中所示序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0253】在特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列係hGALNScoV2。在某些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列係hGALNScoV2。在一些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列包含SEQ ID NO: 27之序列。在一些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27中所示序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0254】在特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列係

hGALNSco。在某些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列係hGALNSco。在一些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列包含SEQ ID NO: 3之序列。在一些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列與SEQ ID NO: 3中所示序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0255】 在某些實施例中，編碼融合蛋白之核苷酸序列包含SEQ ID NO: 4或5之序列。在某些實施例中，編碼融合蛋白之核苷酸序列與SEQ ID NO: 4或5中所示序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0256】 在某些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列包含hGALNS（例如hGALNS、hGALNSco、D8-hGALNS、D8-GALNSco、hGALNScoV2)之cDNA序列。在某些實施例中，編碼hGALNS或融合蛋白之hGALNS部分之核苷酸序列與hGALNS之cDNA序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0257】 在某些實施例中，編碼融合蛋白之核苷酸序列包含融合蛋白之cDNA序列。在某些實施例中，編碼融合蛋白之核苷酸序列與融合蛋白之cDNA序列至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少

96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0258】 在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列或編碼融合蛋白之核苷酸序列例如經由熟習此項技術者已知之任何密碼子優化技術進行密碼子優化(參見例如，Quax等人, 2015, Mol Cell 59:149-161之評述)。

【0259】 在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列或編碼融合蛋白之核苷酸序列中之CpG位點耗盡。

【0260】 在本文所述各態樣及實施例之各種實施例中，編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。在一個特定實施例中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

(b) **酸性寡肽**

【0261】 酸性寡肽對羥基磷灰石具有高結合親和力，而羥磷灰石係骨及軟骨之主要成分。如本文所使用，術語「酸性寡肽」係指具有麩胺酸(E)及/或天冬胺酸(D)殘基形成之重複胺基酸序列的寡肽。酸性寡肽中胺基酸殘基之數目可為例如4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個。在特定實施例中，酸性寡肽中胺基酸殘基之數目係4-8個。在特定實施例中，酸性寡肽中胺基酸殘基之數目係6-8個。在一個特定實施例中，

酸性寡肽中胺基酸殘基之數目係6個。在另一個特定實施例中，酸性寡肽中胺基酸殘基之數目係8個。

【0262】 在一個特定實施例中，酸性寡肽係D8(*亦即*，具有八個天冬胺酸殘基之胺基酸序列的寡肽)。在另一個實施例中，酸性寡肽係E6(*亦即*，具有六個麩胺酸殘基之胺基酸序列的寡肽)。E6序列描述於Tomatsu *等人*, 2010, Molecular Therapy, 18(6):11094-1102中，其以引用之方式整體併入本文。

【0263】 在一個特定實施例中，酸性寡肽與hGALNS之N末端融合。在另一個實施例中，酸性寡肽與hGALNS之C末端融合。

【0264】 在一個特定實施例中，酸性寡肽與hGALNS直接融合，而沒有插入之胺基酸序列。在另一個特定實施例中，酸性寡肽經由連接子胺基酸序列(例如長度為1-10、2-8或4-6個胺基酸殘基之胺基酸序列)與hGALNS融合。

【0265】 在某些實施例中，hGALNS酶可被遞送至骨及軟骨區域中之溶酶體以改善骨及軟骨病理學。

(c) **基因表現之啟動子及修飾物：**

【0266】 在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含調節基因遞送或基因表現之組分(例如「表現控制元件」)。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含調節基因表現之組分。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含影響結合或靶向細胞之組分。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含在攝取後影響hGALNS於細胞內之定位的組分。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含可用作可偵測或可選擇標誌物之組分，例如用以偵測或選擇已攝取

hGALNS表現卡匣之細胞。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含編碼一或多個啟動子之核苷酸序列，其中至少一個啟動子可操作地連接至編碼hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白的核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子可為組成型啟動子。在替代實施例中，啟動子可為誘導型啟動子。

【0267】 在某些實施例中，啟動子係CAG啟動子。在一些實施例中，CAG啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之序列一致性的核苷酸序列。在一些實施例中，CAG啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有100%一致性之核苷酸序列。在一些實施例中，CAG啟動子包含SEQ ID NO: 28或SEQ ID NO: 28之一部分的核苷酸序列。

【0268】 在一些實施例中，一部分例如與本揭示案之啟動子約或至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。舉例而言，在一些實施例中，包含SEQ ID NO: 28之一部分之核苷酸序列的CAG啟動子係包含SEQ ID NO: 28之約或至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的CAG啟動子。

【0269】 在某些實施例中，啟動子係肝特異性啟動子。

【0270】 肝特異性啟動子可以為但不限於甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子(參見例如，Yan等人, 2012, Gene, 506(2):289-94，以引用之方式整體併入本文中)。在某些實施例中，TBG啟動子包含與SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、

至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在某些實施例中，TBG啟動子包含與SEQ ID NO: 6達100%一致之核苷酸序列。在某些實施例中，TBG啟動子包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 6之一部分之核苷酸序列。

【0271】 在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 14具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 15。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 13之一部分。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 15之一部分。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 15之一部分。

【0272】 在某些實施例中，啟動子係肝及肌肉特異性啟動子。

【0273】 在某些實施例中，肝及肌肉啟動子包含與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝及肌肉啟動子係SEQ ID NO: 16。在某些實施例中，肝及肌肉啟動子包

含SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 16之一部分。

【0274】 在某些實施例中，啟動子包含或為骨-肝串聯啟動子，其包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子。

【0275】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 23之一部分。

【0276】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 24之一部分。

【0277】 在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。在一個特定實施例中，hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動

子包含與SEQ ID NO:22達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 22之一部分。

【0278】 在一個特定實施例中，肝特異性啟動子係hAAT啟動子。在一個特定實施例中，該hAAT啟動子包含與SEQ ID NO: 21至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT啟動子包含與SEQ ID NO: 21達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT啟動子包含SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 21之一部分。

【0279】 在一個特定實施例中，骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼強化子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該強化子係肝特異性強化子。在一個特定實施例中，肝特異性實施例係ApoE強化子。在一個特定實施例中，骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含肝特異性強化子(例如ApoE強化子)之肝控制區的核苷酸序列。在一個特定實施例中，ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，ApoE強化子啟動子包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，ApoE強化子啟動子包含SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 20之一部分。在一個特定實施例中，肝控制區包含與SEQ ID NO: 19至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致

之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，肝控制區包含SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 19之一部分。在一個特定實施例中，強化子(例如ApoE強化子)及肝控制區在骨特異性啟動子之上游。

【0280】 在一個特定實施例中，骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子(參見*例如*圖33及37)。在一個特定實施例中，LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO: 17至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO:17達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，LBTP1啟動子包含SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 17之一部分。

【0281】 在一個特定實施例中，骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子(參見*例如*圖34及38)。在一個特定實施例中，LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，LBTP2啟動子包含SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 18之一部分。

【0282】 在某些實施例中，啟動子包含或為骨特異性啟動子。

【0283】 在一個特定實施例中，骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子(參見例如Lee等人, 2019, Mol Therapy: Methods & Clinical Development 15:101-111；Lu等人, 2006, J. Biological Chemistry, 281(10) :6297-6306；及Nishio等人, 2006, Gene 372 :62-70；以引用之

方式整體併入本文中)。在一個特定實施例中，Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列(參見*例如*圖35)。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 23之一部分。

【0284】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:24至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列(參見*例如*圖36)。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 24之一部分。

【0285】 在某些實施例中，啟動子包含或為肝特異性啟動子。

【0286】 在一個特定實施例中，肝特異性啟動子係hAAT啟動子。在一個特定實施例中，hAAT啟動子包含與SEQ ID NO: 21至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT啟動子包含與SEQ ID NO: 21達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT啟動子包含SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 21之一部分。

【0287】 在一個特定實施例中，肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)

啟動子。在一個特定實施例中，hAAT(ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，hAAT(ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，hAAT(ΔATG)啟動子包含SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 21之一部分。SEQ ID NO: 22包含ATG變為GTG之修飾，其在第8節(序列表)中以下劃線顯示。

【0288】 在某些實施例中，啟動子包含一或多個增強hGALNS或融合蛋白之表現的元件。在某些實施例中，啟動子包含TATA盒。

【0289】 在某些實施例中，該一或多個啟動子元件相對於彼此可為反向或移動的。在某些實施例中，該啟動子之元件可定位成協同地起作用。在某些實施例中，該啟動子之元件可定位成獨立地起作用。在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含一或多個選自由以下組成之群的啟動子：肝特異性TBG啟動子、人CMV立即早期基因啟動子、SV40早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus，RS)長末端重複序列及大鼠胰島素啟動子。在某些實施例中，本文所提供之hGALNS表現卡匣包含一或多個組織特異性啟動子。在一個特定實施例中，組織特異性啟動子係肝特異性啟動子。在一個特定實施例中，TBG啟動子具有SEQ ID NO. 6之核苷酸序列。

【0290】 在某些實施例中，hGALNS表現卡匣包含一或多個另外的表現控制元件，其可包括編碼強化子(例如α mic/bik強化子)之核苷酸序列、阻遏體、編碼內含子或嵌合內含子之核苷酸序列(例如雞β-肌動蛋白

基因之第一內含子)及/或編碼聚A位點(例如兔球蛋白聚A位點)之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該編碼兔球蛋白聚A位點之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 9之序列。在一個特定實施例中，該編碼內含子之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 10之序列。在一個特定實施例中，該編碼α mic/bik強化子之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 11之序列。

【0291】 在一個特定實施例中，hGALNS表現卡匣包含α mic/bik強化子、編碼內含子之核苷酸序列、編碼TBG啟動子之核苷酸序列、編碼hGALNS或hGALNS與酸性寡肽(較佳地為D8)融合之融合蛋白之核苷酸序列及編碼兔球蛋白聚A位點之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該編碼兔球蛋白聚A位點之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 9之序列。在一個特定實施例中，該編碼內含子之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 10之序列。在一個特定實施例中，該編碼α mic/bik強化子之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 11之序列。

【0292】 在某些實施例中，hGALNS表現卡匣包含一或多個另外的表現控制元件，其可包括編碼強化子(*例如*，如本文所述之ApoE強化子)之核苷酸序列、及/或編碼聚A位點(*例如*，如本文所述之β-球蛋白聚腺苷酸化信號、或如本文所述之兔球蛋白聚A位點)之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該編碼兔球蛋白聚A位點之核苷酸序列具有SEQ ID NO: 9之序列。

【0293】 在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該內含子係嵌合內含子。在一個特定實施例中，該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含

與SEQ ID NO: 10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10達100%一致之核苷酸序列。

【0294】在本文所描述之rAAV的各態樣及實施例之各種實施例中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO: 25至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

(d) **反向末端重複序列**

【0295】在本發明之一些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣(例如hGALNScoV2、hGALNSco、D8-GALNSco、hGALNS或D8-hGALNS)側接兩個AAV反向末端重複序列(ITR)。在特定實施例中，hGALNS表現卡匣係hGALNSco。在特定實施例中，hGALNS表現卡匣係hGALNScoV2。ITR序列可用於將重組基因表現卡匣包裝至病毒粒子中

(參見例如，Yan等人, 2005, J. Virol., 79(1):364-379；美國專利第7,282,199 B2號、美國專利第7,790,449 B2號、美國專利第8,318,480 B2號、美國專利第8,962,332 B2號及國際專利申請案第PCT/EP2014/076466號，其各自以引用之方式整體併入本文中)。在一些實施例中，側接ITR係AAV2 ITR。在一些實施例中，側接ITR係AAV9 ITR。在一個特定實施例中，側接ITR係AAV8 ITR。在一個特定實施例中，ITR序列可具有SEQ ID NO.: 7之序列。在一個特定實施例中，ITR序列可具有SEQ ID NO.: 8之序列。在一個特定實施例中，5’ ITR可具有SEQ ID NO.: 7之序列。在一個特定實施例中，3’ ITR可具有SEQ ID NO.: 8之序列。

(e) **非轉譯區**

【0296】 在某些實施例中，本文所述之hGALNS表現卡匣包含一或多個非轉譯區(UTR)，例如3'及/或5' UTR。在某些實施例中，該等UTR針對所希望之蛋白質表現量優化。在某些實施例中，該等UTR針對hGALNS之mRNA半衰期優化。在某些實施例中，該等UTR針對hGALNS之mRNA的穩定性優化。在某些實施例中，該等UTR針對hGALNS之mRNA的二級結構優化。

6.1.3 醫藥組成物及套組

【0297】 在某些實施例中，本文提供醫藥組成物，其包含本文所提供之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。醫藥組成物可製備為個別、單一單位劑型。本文所提供之醫藥組成物可調配成用於例如非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、鼻內、鞘內或經皮投與。在一個特定實施例中，該醫藥組成物係調配成用於靜脈內投與。熟習此項技術者將容易地選擇適合的醫藥學上可接受之載劑(*例如*用於靜脈內投與及在肝細胞中轉導)。

【0298】 本文提供套組，其包含在一或多個容器中包含的本文所述之醫藥組成物。可以包裝醫藥組成物之容器可包括但不限於瓶子、小包、安瓿、管、吸入器、袋子、小瓶及容器。在某些實施例中，該套組包含有關投與該醫藥投與之說明書。在某些實施例中，套組包含可用於投與該醫藥組成物之裝置，包括但不限於注射器、無針注射器、滴注袋、貼片及吸入器。

【0299】 亦提供當使用本文所述之rAAV，藉由基因療法治療MPS IVA時可使用之裝置及血液循環系統。熟習此項技術者將容易地選擇此類裝置及系統。

6.2 製造rAAV

【0300】 本文亦提供包含如本文所述之hGALNS表現卡匣的聚核苷酸，可用於產生本文所提供之rAAV的質體及細胞，以及製備本文所提供之rAAV的方法。

6.2.1 **聚核苷酸、質體及細胞**

【0301】 本文提供包含hGALNS表現卡匣之聚核苷酸。

【0302】 在一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如為編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因。hGALNS表現卡匣可進一步包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列(例如TBG啟動子)，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在一些實施例中，hGALNS表現卡匣可進一步包含編碼CAG啟動子之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼CAG啟動子之核苷酸序列可操作地連

接至編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，CAG啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，CAG啟動子係SEQ ID NO: 28。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 14具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 15。

【0303】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼肝特異性啟動子(例如TBG啟動子)之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。

【0304】在一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如為編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因。hGALNS表現卡匣可進一步包

含編碼啟動子之核苷酸序列，其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係CAG啟動子。

【0305】在一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼轉殖基因之核苷酸序列，該轉殖基因諸如為編碼hGALNS與酸性寡肽(例如D8)融合之融合蛋白的轉殖基因。hGALNS表現卡匣可進一步包含編碼肝及肌肉特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝及肌肉特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，肝及肌肉特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 16。

【0306】在另一個態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNS之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係CAG啟動子。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 14具有

至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 28。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 15。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 16。在某些實施例中，啟動子包含SEQ ID NO: 28。在某些實施例中，啟動子包含SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，啟動子包含SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，啟動子包含SEQ ID NO: 15。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 16。hGALNS表現卡匣可如第6.1.2節中所述。

【0307】在一個特定實施例中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR（例如AAV2-ITR）之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼TBG啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼TBG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼TBG啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 6達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼TBG啟

動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 6具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0308】 在一個特定實施例中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNSco表現卡匣，該hGALNSco表現卡匣包含編碼TBG啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNSco或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼TBG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNSco或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼TBG啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 6達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNSco之核苷酸序列與SEQ ID NO: 3達100%一致。在某些實施例中，編碼TBG啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 6具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 3具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0309】在一個特定實施例中，本文提供一致聚核苷酸，其包含側接 AAV-ITR（例如 AAV2-ITR）之 hGALNScoV2 表現卡匣，該 hGALNScoV2表現卡匣包含編碼CAG啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼CAG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼CAG啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 28達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27達100%一致。在某些實施例中，編碼CAG啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0310】在一個特定實施例中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接 AAV-ITR（例如 AAV2-ITR）之 hGALNScoV2 表現卡匣，該 hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 13達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸

序列與SEQ ID NO: 27達100%一致。在某些實施例中，編碼LSPX1啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0311】在一個特定實施例中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR（例如AAV2-ITR）之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 16達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27達100%一致。在某些實施例中，編碼LMTP6啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之

核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0312】在一個特定實施例中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR（例如AAV2-ITR）之hGALNScoV2表現卡匣，該hGALNScoV2表現卡匣包含編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列及編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列，其中該編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼hGALNScoV2或hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 18達100%一致。在一個特定實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27達100%一致。在某些實施例中，編碼LBTP2啟動子之核苷酸序列與SEQ ID NO: 18具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在某些實施例中，編碼hGALNScoV2之核苷酸序列與SEQ ID NO: 27具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在一個特定實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。在某些實施例中，編碼hGALNS之核苷酸序列與SEQ ID NO: 12具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

【0313】在一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR（例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣

包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包括骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0314】 在另一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0315】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0316】 在一個特定實施例中，該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0317】在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。在一個特定實施例中，hAAT(ΔATG)啟動子包含與 SEQ ID NO: 22至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO:22達100%一致之核苷酸序列。

【0318】在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區之核苷酸序列。在一個特定實施例中，ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該ApoE強化子啟動子包含與SEQ ID NO:20達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，肝控制區包含與SEQ ID NO: 19至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝控制區包含與SEQ ID NO:19達100%一致之核苷酸序列。

【0319】在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。在一個特定實施例中，LBTP1啟動子包含與 SEQ ID NO: 17至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP1啟動子包含與SEQ ID

NO:17達100%一致之核苷酸序列。

【0320】 在一個特定實施例中，該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。在一個特定實施例中，LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO:18達100%一致之核苷酸序列。

【0321】 在另一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0322】 在另一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0323】 在一個特定實施例中，Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO:23達100%一致之核苷酸序列。

【0324】 在另一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【0325】 在另一個特定態樣中，本文提供一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR (例如AAV2-ITR)之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該酸性寡肽係D8。

【0326】 在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【0327】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該內含子係嵌合內含子。在一個特定實施例中，該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。在一個特定實施例中，該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO: 10至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-

球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO:10達100%一致之核苷酸序列。

【0328】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致。在一個特定實施例中，該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【0329】 在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。在一個特定實施例中，β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO: 25至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO:25達100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。在一個特定實施例中，該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致之核苷酸序列。在一個特定實施例中，兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【0330】在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV8。在本文所描述之聚核苷酸的各態樣及實施例之各種實施例中，AAV係AAV9。

【0331】在一個特定實施例中，聚核苷酸呈ssDNA形式。在另一個特定實施例中，聚核苷酸呈dsDNA的形式。

【0332】本文亦提供包含本文所提供之聚核苷酸的質體(下文稱為「rAAV質體」)。在一個特定實施例中，rAAV質體係ssDNA質體。在另一個特定實施例中，rAAV質體係dsDNA質體。在一些實施例中，rAAV質體呈環狀形式。在其他實施例中，rAAV質體呈線性形式。

【0333】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(LSPX1)：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的Mik/BikE強化子、b) ApoE強化子、c)人AAT(hAAT)啟動子、d)聚A信號及e)視情況存在之內含子；(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的Mik/BikE強化子、b) ApoE強化子、c) hAAT啟動子、d)兔β-球蛋白聚A信號及e)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。

【0334】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(LSPX2)：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的ApoE強化子、b) hAAT啟動子、c)聚A信號及d)視情況存在之內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2

之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的ApoE強化子、b) hAAT啟動子、c)聚A信號及d)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。

【0335】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(LTP1)：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的Mik/BikE強化子、b) TBG啟動子、c) hAAT(ΔATG)啟動子、d)聚A信號及e)視情況存在之內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a)兩個串聯的Mik/BikE強化子、b) TBG啟動子、c) hAAT(ΔATG)啟動子、d)聚A信號及e)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。

【0336】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(LTP2)：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b)兩個串聯的Mik/BikE強化子、c) TBG啟動子、d) hAAT(ΔATG)啟動子、e)聚A信號及f)視情況存在之內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b)兩個串聯的MckE強化子、c) TBG啟動子、d) hAAT(ΔATG)啟動子、e)聚A信號及f)

視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。

【0337】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(LMTP6)：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b)三個串聯的MckE強化子、c) CK啟動子、d) hAAT(ΔATG)啟動子、e)聚A信號及f)視情況存在之內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b)三個串聯的MckE強化子、c) CK啟動子、d) hAAT(ΔATG)啟動子、e)聚A信號及f)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。

【0338】在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(肝-骨串聯啟動子1 (LBTP1))：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b) hAAT(ΔATG)啟動子、c)聚A信號、d)視情況存在之內含子及e) Sp7/Osx啟動子或最小Sp7/Osx啟動子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b) hAAT(ΔATG)啟動子、c)兔β-球蛋白聚A信號或β-球蛋白聚腺苷酸信號、d)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子及e)最小Sp7/Osx啟動子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或

hGALNScoV2之核苷酸序列與酸性寡肽(諸如第6.1.2(b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0339】 在某一實施例中，本文所述之構築體包含以下組分(肝-骨串聯啟動子2 (LBTP2))：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b) hAAT(ΔATG)啟動子、c)聚A信號、d)視情況存在之內含子及e) Sp7/Osx啟動子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，本文所述之構築體包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) ApoE強化子、b) hAAT(ΔATG)啟動子、c)兔β-球蛋白聚A信號或β-球蛋白聚腺苷酸化信號、d)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子及e) Sp7/Osx啟動子；及(3)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列與酸性寡肽(諸如第6.1.2(b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0340】 在某一實施例中，本文所述之構築體按以下次序包含以下組分(LBTP1)：(1) AAV反向末端重複序列(ITR)、(2) ApoE強化子、3)最小Sp7/Osx啟動子、4) hAAT(ΔATG)啟動子、5)視情況存在之內含子、(6)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列、(7)聚A信號及(8) AAV反向末端重複序列(ITR)。在一個特定實施例中，本文所述之構築體按以下次序包含以下組分(LBTP1)：(1) AAV2反向末端重複序

列(ITR)、(2) ApoE強化子、3)最小Sp7/Osx啟動子、4) hAAT(ΔATG)啟動子、5)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子、(6)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列、(7)兔β-球蛋白聚A信號或β-球蛋白聚腺苷酸化信號，以及(8) AAV2反向末端重複序列(ITR)。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列與酸性寡肽(諸如第6.1.2(b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0341】 在某一實施例中，本文所述之構築體按以下次序包含以下組分(LBTP2)：(1) AAV反向末端重複序列(ITR)、(2) ApoE強化子、3) Sp7/Osx啟動子、4) hAAT(ΔATG)啟動子、5)視情況存在之內含子、(6)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列、(7)聚A信號及(8) AAV反向末端重複序列(ITR)。在一個特定實施例中，本文所述之構築體按以下次序包含以下組分(LBTP2)：(1) AAV2反向末端重複序列(ITR)、(2) ApoE強化子、3) Sp7/Osx啟動子、4) hAAT(ΔATG)啟動子、5)視情況存在的來源於人β-球蛋白及Ig重鏈之嵌合內含子、(6)編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列、(7)兔β-球蛋白聚A信號或β-球蛋白聚腺苷酸化信號，以及(8) AAV2反向末端重複序列(ITR)。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列與酸性寡肽(諸如第6.1.2(b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合。在一個特定實施例中，該編碼hGALNS、hGALNSco或hGALNScoV2之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【0342】 本文進一步提供表現(例如重組表現)本文所提供之rAAV的

細胞(較佳地，離體細胞)。在某些實施例中，該細胞(較佳地，離體細胞)包含本文所提供之聚核苷酸或本文所提供之rAAV質體。在某些實施例中，細胞(較佳地，離體細胞)進一步包含提供AAV Rep、Cap及Ad5功能之輔助聚核苷酸或輔助質體。該細胞(較佳地，離體細胞)可為哺乳動物宿主細胞，例如HEK293、HEK293-T、A549、WEHI、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO 、W138、HeLa、293、Saos、C2C12、L、HT1080、HepG2、初代纖維母細胞、肝細胞及肌母細胞。哺乳動物宿主細胞可來源於例如人類、猴、小鼠、大鼠、兔或倉鼠。在一個特定實施例中，哺乳動物宿主細胞係人胚腎293(HEK293)細胞或HEK293-T細胞。

6.2.2 製備rAAV之方法

【0343】 提供製備本文所提供之rAAV的方法。在某些實施例中，該方法包括用第6.2.1節中所提供之rAAV質體及一或多個輔助質體轉染細胞(較佳地，離體細胞)，該一或多個輔助質體共同地提供AAV Rep、Cap及Ad5功能。在某些實施例中，該一或多個輔助質體共同地包含AAV基因Rep、Cap、VA、E2a及E4之核苷酸序列。

【0344】 本文所提供的用於基因療法應用之rAAV的製造可使用此項技術中已知之方法，例如Clement等人, 2016, Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 27:16002中所述之方法，其以引用之方式整體併入本文。在某些實施例中，質體DNA之轉染係如此項技術中所述，使用磷酸鈣質體沈澱法，利用rAAV及一或多個輔助質體，在人胚腎293細胞(HEK293)或HEK293-T上執行，該一或多個輔助質體提供AAV Rep及Cap功能以及Ad5基因(VA RNA、E2a及E4)。在某些實施例中，

Rep、Cap及Ad5基因可在同一輔助質體上。在某些實施例中，利用雙輔助體方法(或三重轉染)，其中AAV Rep、Cap及Ad5功能係由獨立質體提供。在某些實施例中，HEK293細胞可適於在無動物組分及抗生素之培養基中懸浮生長。

【0345】在某些實施例中，rAAV可使用包裝及生產細胞株製造。本文所提供之rAAV可使用哺乳動物宿主細胞製造，例如A549、WEHI、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、W138、HeLa、HEK293、HEK293- T、Saos、C2C12、L、HT1080、HepG2、初代纖維母細胞、肝細胞及肌母細胞。本文所提供之rAAV可使用來自人類、猴、小鼠、大鼠、兔或倉鼠之宿主細胞製造。在某些實施例中，穩定細胞株可藉由在宿主細胞中引入產生病毒之手段，例如複制及殼體基因(例如AAV之rep及cap基因)及本文所提供之rAAV質體，來進行工程改造。在一個特定實施例中，rAAV可使用HEK293細胞製造。在某些實施例中，rAAV可在Sf9昆蟲細胞中，藉由用編碼rep基因、cap基因及rAAV基因體之基因共感染三個重組桿狀病毒質體來產生。

【0346】該等細胞可根據熟習此項技術者容易選擇之適當方案培養、轉染及收集。在某些實施例中，該等細胞可在標準杜貝卡氏改良型伊格氏培養基(Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM)中培養，該DMEM包括但不限於胎牛血清、葡萄糖、青黴素、鏈黴素及1-麩醯胺酸(McClure等人, J Vis Exp. 2011, (57): 3348；Shin等人, Methods Mol Biol. 2012, 798: 267–284)。細胞可以用熟習此項技術者容易選擇之組分轉染。在某些實施例中，轉染可在培養基溶液中進行，該等培養基溶液包括但不限於DMEM及伊斯科夫氏改良型杜貝卡氏培養基(Iscove's

modified Dulbecco's medium，IMDM)。在某些實施例中，轉染時間可花費46小時、47小時、48小時、49小時、50小時、51小時、52小時、53小時、54小時、55小時、56小時、57小時、58小時、59小時、60小時、61小時、62小時、63小時、64小時、65小時、66小時、67小時、68小時、69小時、70小時、50-55小時、55-60小時、60-65小時或65-70小時。轉染後，可藉由刮取細胞將其自培養物孔移出並洗滌孔以收集所有經轉染細胞來收集細胞。

【0347】 關於製備包含AAV8殼體之rAAV的方法，參見美國專利第7,282,199 B2號具體實施方式之第IV節，該案以引用之方式整體併入本文中。該等載體之基因體拷貝效價可例如藉由TAQMAN®分析測定。病毒粒子可例如藉由$CsCl_2$沈降來回收。在一個特定實施例中，本文所述之rAAV係分離或純化之rAAV。

【0348】 已鑑別出多種AAV血清型。在某些實施例中，本文所提供之rAAV或聚核苷酸包含來源於一或多種AAV血清型之一或多種組分。在某些實施例中，本文所提供之rAAV或聚核苷酸包含來源於AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAV11中之一或多種的一或多種組分。在某些實施例中，本文所提供之rAAV或聚核苷酸可包含來自AAV8、AAV9、AAV10或AAV11血清型中之一或多種的一或多種組分。在一個特定實施例中，本文所提供之rAAV或聚核苷酸可包含來自AAV8血清型之一或多種組分。在一些實施例中，本文所提供之rAAV或聚核苷酸可包含來自AAV9血清型之一或多種組分。AAV組分之核酸序列以及製備重組AAV及AAV殼體之方法描述於例如美國專利第7,282,199 B2號、美國專利第7,790,449 B2

號、美國專利第8,318,480 B2號、美國專利第8,962,332 B2號及國際專利申請案第PCT/EP2014/076466號中，其各自以引用之方式整體併入本文。在特定實施例中，本文提供編碼hGALNS之rAAV8。

【0349】 在某些實施例中，描述rAAV8，其包含：(i)重組基因體，其包含處於調控元件控制下且側接ITR的含有hGALNS或融合蛋白之表現卡匣，該融合蛋白係hGALNS與酸性寡肽融合；及(ii)病毒殼體，其具有AAV8殼體蛋白之胺基酸序列或與AAV8殼體蛋白之胺基酸序列(SEQ ID NO: 1)至少95%、96%、97%、98%、99%或99.9%一致，同時保留AAV8殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV8殼體高效轉導肝細胞的能力。在某些實施例中，AAV8殼體具有SEQ ID NO: 1之序列及1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸取代，並保留AAV8殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV8殼體高效轉導肝細胞的能力。

【0350】 在某些實施例中，描述rAAV9，其包含：(i)重組基因體，其包含處於調控元件控制下且側接ITR的含有hGALNS或融合蛋白之表現卡匣，該融合蛋白係hGALNS與酸性寡肽融合；及(ii)病毒殼體，其具有AAV9殼體蛋白之胺基酸序列或與AAV9殼體蛋白之胺基酸序列(SEQ ID NO: 26)至少95%、96%、97%、98%、99%或99.9%一致，同時保留AAV9殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV9殼體高效轉導肝細胞的能力。在某些實施例中，AAV9殼體具有SEQ ID NO: 26之序列及1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸取

代，並保留AAV9殼體包裝病毒基因體的能力，且較佳地亦保留AAV9殼體高效轉導肝細胞的能力。

6.2.3 **功效評估**

【0351】 可使用活體外分析，例如細胞培養分析，量測自本文所述之rAAV之hGALNS表現，由此指示例如rAAV之效力。用於該分析之細胞可包括但不限於A549、WEHI、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、W138、HeLa、HEK293、HEK293-T 、HuH7、Saos、C2C12、L、HT1080、HepG2、初代纖維母細胞、肝細胞及肌母細胞。在一個特定實施例中，用於細胞培養分析中之細胞包括HuH7細胞。在某些實施例中，可分析經rAAV轉染之細胞的hGALNS酶活性。

【0352】 亦可使用動物模型評估自本文所述之rAAV之hGALNS表現及其功效。已描述MPS IVA之小鼠模型(參見例如，Tomatsu等人, 2003, Hum Mol Genet 12(24):3349-3358)。MPS IVA之小鼠模型已靶向破壞小鼠GALNS之外顯子2。此等小鼠沒有可偵測之GALNS酶活性，且在尿液中偵測到GAG含量增加。在2個月大時，在網狀內皮細胞、庫普弗細胞(Kupffer cell)及脾內襯之竇細胞中觀察到GAG之貯積增加。在12個月大時，在絲球體之內臟上皮細胞及在心臟瓣膜基部處之細胞中觀察到液泡變化，但其在實質細胞，諸如肝細胞及腎小管上皮細胞中不存在。在海馬及新皮層神經元、腦膜細胞中觀察到GAG之溶酶體貯積。此小鼠模型之角膜上皮細胞中之硫酸角質素(KS)及軟骨素-6-硫酸(C6S)相較於野生型增加，但骨骼指徵在小鼠模型中並不明顯。另外，對人GALNS具有耐受性之MPS IVA之小鼠模型亦已有描述(參見例如，Tomatsu等人, 2005,

Hum Mol Genet 14(22):3321-3335)。關於評估自本文所述之rAAV之hGALNS表現及其功效的例示性分析，參見第7節中之實例。

【0353】 根據一些實施例，該等方法包括基因療法載體，例如調控元件及提供增加之功能性hGALNS蛋白表現之轉殖基因的組合。此類表現可藉由以下方法量測：1)熟練技術人員已知之若干蛋白質(hGALNS)測定分析，不限於夾心ELISA、西方墨點法(Western Blot)、組織學染色及液相層析串聯質譜法(LC-MS/MS)；2)若干蛋白質活性分析，諸如酶分析或功能分析；及/或3)若干受質偵測分析，不限於硫酸角質素(KS)、醣胺聚醣(CAG)及/或軟骨素-6-硫酸(C6S)偵測，且被確定為有效且適合於人類治療(Hintze, J.P.等人, *Biomarker Insights* 2011:6 69–78)。經顯示，使用此類活體外及活體內細胞、血液及組織研究進行的hGALNS之定量及功能特性評估與某些療法之功效相關(Hintze, J.P.等人, 2011, *同上述*)，且被用於評價對於用本文所述之載體進行MPS IVA之基因療法治療的反應。

【0354】 因此，本發明提供這樣一類方法及基因療法載體，如藉由hGALNS酶活性分析，例如使用本文實例2、3及8中所述之分析格式，或實質上類似之分析所量測，該等方法及基因療法載體使個體之組織細胞，包括例如肝臟、肌肉、白細胞、腎臟、肺、脾、心臟、骨或軟骨細胞中之細胞內hGALNS酶活性水準相較於野生型水準增加至一定水準，或使細胞內hGALNS酶活性水準增加至野生型hGALNS活性水準之約2倍、或野生型hGALNS活性水準之約5倍、野生型hGALNS活性水準之約10倍、野生型hGALNS活性水準之約25倍、野生型hGALNS活性水準之約 40倍、野生型hGALNS活性水準之約50倍、野生型hGALNS活性水準之約 60倍、野生型hGALNS活性水準之約70倍、野生型hGALNS活性水準之約75倍、

野生型hGALNS活性水準之約80倍、野生型hGALNS活性水準之約85倍、野生型hGALNS活性水準之約90倍、野生型hGALNS活性水準之約95倍或野生型hGALNS活性水準之約100倍。在一些實施例中，該基因療法提供在投與基因療法後兩週，使個體體內之hGALNS活性水準相較於投與前水準或未治療個體體內之平均水準增加的方法。在一些實施例中，該基因療法提供在投與基因療法後兩週，增加個體體內之hGALNS活性水準的方法。在一些實施例中，該基因療法提供在投與基因療法後兩週，增加個體之血液或組織，例如肝、肌肉、腎臟、肺、脾、心臟、骨或軟骨中之hGALNS活性水準的方法。在一些實施例中，在投與基因療法後十週，量測到個體體內之hGALNS活性水準增加。

【0355】 本發明亦提供這樣一類方法及基因療法載體，如藉由KS分析，例如使用本文實例2、3及8中所述之分析格式，或實質上類似之分析所量測，該等方法及基因療法載體使該個體之血液(例如血漿或血清)或組織KS含量相較於未治療野生型個體中之KS含量降低至一定水準，或使KS含量降低至野生型KS含量之約1.1倍、或野生型KS含量之約1.2倍、野生型KS含量之約1.3倍、野生型KS含量之約1.4倍、野生型KS含量之約1.5倍、野生型KS含量之約1.6倍、野生型KS含量之約1.7倍、野生型KS含量之約1.8倍、野生型KS含量之約1.9倍、野生型KS含量之約2倍、野生型KS含量之約2.5倍、野生型KS含量之約3倍、野生型KS含量之約3.5倍、或野生型KS含量之約4倍。在一些實施例中，該基因療法提供在投與基因療法後兩週，降低個體體內之KS含量的方法。在一些實施例中，該基因療法提供在投與基因療法後兩週，降低個體體內之組織KS含量的方法。在一些實施例中，KS分析包括量測血液或組織中之單硫酸化KS，且基因

療法提供在投與基因療法後兩週，降低個體體內之單硫酸化KS含量的方法。

6.3 治療方法

【0356】 本文提供用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法。

【0357】 在一個態樣中，該方法包括向人類個體投與本文所述之rAAV或本文所述之醫藥組成物。

【0358】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白(視情況而定)遞送至該人類個體之骨及肝。在一個特定實施例中，該hGALNS或該融合蛋白藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0359】 在另一個態樣中，本文提供一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白(視情況而定)遞送至該人類個體之骨。

【0360】 在另一個態樣中，該方法包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之轉殖基因，諸如編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白的轉殖基因遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)。在一個特定實施例中，該hGALNS藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0361】 在另一個態樣中，該方法包括藉由向該人類個體投與本文所提供之rAAV，將治療有效量之hGALNS遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，該hGALNS藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【0362】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量的hGALNS與酸性寡肽(諸如第6.1.2 (b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，其中該融合蛋白係由rAAV基因體產生。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。

【0363】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量的hGALNS與酸性寡肽(諸如第6.1.2 (b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，其中該融合蛋白係由rAAV基因體產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。在一些實施例中，rAAV基因體包含編碼CAG啟動子之核苷酸序列，其中該編碼CAG啟動子之核苷酸序列可操作地連接至編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，CAG啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在一個特定實施例中，rAAV基因體包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之

核苷酸序列可操作地連接至編碼融合蛋白之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係TBG啟動子。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 14具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，肝特異性啟動子包含與SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，CAG啟動子係SEQ ID NO: 28。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，肝特異性啟動子係SEQ ID NO: 15。

【0364】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量的hGALNS與酸性寡肽(諸如第6.1.2 (b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，其中該融合蛋白係由rAAV基因體產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。在一個特定實施例中，rAAV基因體包含編碼肝及肌肉特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝及肌肉特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，肝及肌肉啟動子包含與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 16。

【0365】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量的hGALNS與酸性寡肽(諸如第6.1.2 (b)節中所述之酸性寡肽，例如D8)融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，其中該融合蛋白係由rAAV基因體產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。在一個特定實施例中，rAAV基因體包含編碼啟動子之核苷酸序列，其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至編碼融合蛋白之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係CAG啟動子。

【0366】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量之hGALNS遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，該hGALNS係由rAAV基因體產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。在一個特定實施例中，rAAV基因體包含編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列，其中該編碼肝特異性啟動子之核苷酸序列可操作地連接至編碼hGALNS之核苷酸序列。在一個特定實施例中，該肝特異性啟動子係TBG啟動子。

【0367】 在另一個態樣中，該方法包括將治療有效量之hGALNS遞送至該人類個體之骨、軟骨、韌帶、生長板、半月板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜(例如遞送至骨及/或軟骨)，該hGALNS係

由rAAV基因體產生且藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。rAAV基因體可包含如第6.1.2節所述之hGALNS表現卡匣。在一個特定實施例中，rAAV基因體包含編碼啟動子之核苷酸序列，其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至編碼hGALNS之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 28具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 14具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子包含與SEQ ID NO: 16具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之核苷酸序列。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 28。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 14。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 15。在某些實施例中，啟動子係SEQ ID NO: 16。

【0368】 在本文所述之治療方法的各種實施例中，rAAV或rAAV基因體包含來源於一或多種AAV血清型之一或多種組分。在某些實施例中，rAAV或rAAV基因體包含來源於AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10或AAV11中之一或

多種的一或多種組分。在某一實施例中，rAAV或rAAV基因體包含來自AAV8、AAV9、AAV10或AAV11血清型中之一或多種的一或多種組分。在一個特定實施例中，rAAV或rAAV基因體包含一或多種來自AAV8血清型之組分。在一些實施例中，rAAV或rAAV基因體包含一或多種來自AAV9血清型之組分。AAV組分之核酸序列以及製備重組AAV及AAV殼體之方法描述於例如美國專利第7,282,199 B2號、美國專利第7,790,449 B2號、美國專利第8,318,480 B2號、美國專利第8,962,332 B2號及國際專利申請案第PCT/EP2014/076466號中，其各自以引用之方式整體併入本文。

【0369】 在本文所述之治療方法的各种實施例中，遞送至骨、軟骨、韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜之步驟係遞送至(a)骨及/或軟骨，以及(b)韌帶、半月板、生長板、肝、脾、肺、腎臟、氣管、心肌及/或心臟瓣膜的步驟。

6.3.1 目標患者人群

【0370】 根據本發明，人類個體或患者係已經診斷患有MPS IVA (莫爾丘A症候群)之個體。在特定實施例中，患者具有MPS IVA的以下症狀中的一或多種：心臟瓣膜形態異常、齲齒、頸脊髓病、頸椎半脫位、尿中硫酸軟骨素排泄、粗陋面部特徵、髂骨翼狹窄、髖外翻、不成比例短軀幹、身材矮小、管狀骨之骨骺畸形、胸腔擴張、膝外翻、灰色牙釉質、聽力障礙、肝腫大、脊柱前凸過度、齒狀突發育不全、腹股溝疝氣、關節鬆弛、青少年發作、尿中硫酸角蛋白排泄、脊柱後凸、大肘、下頜前突、幹骺端變寬、角膜基質混濁、骨質疏鬆症、卵圓形椎體、扁平椎、點狀近端第二至第五掌骨、突出胸骨、反復上呼吸道感染、限制性呼吸機缺陷、脊

柱側彎、腕部尺骨偏斜、嘴巴張寬及齒間距大。

【0371】 在某些實施例中，患者已經鑑別為對hGALNS治療有反應。

【0372】 在一個特定實施例中，患者患有嚴重且快速進展的早期發作型MPS IVA。在另一個特定實施例中，患者患有緩慢進展的、晚期發作型MPS IVA。

【0373】 在一個特定實施例中，患者係成年人(至少16歲)。在另一個特定實施例中，患者係青少年(12-15歲)。在另一個特定實施例中，患者係兒童(12歲以下)。

【0374】 在一個特定實施例中，患者未滿6歲。

6.3.2 投藥及劑量

【0375】 本文所述之rAAV的投與途徑及擬投與人類患者的rAAV之量可基於疾病之嚴重程度、人類患者之狀況及治療醫師之知識來確定。

(a) 治療劑量

【0376】 在特定實施例中，投與人類個體之rAAV的量足以向受影響組織(骨、軟骨、韌帶、半月板及/或心臟瓣膜)提供治療有效量之hGALNS。

【0377】 在某些實施例中，劑量係由經本文所提供之rAAV投與人類個體之基因體拷貝數來量度。在一個特定實施例中，投與1×10^{10}至1×10^{16}個基因體拷貝。在另一個特定實施例中，投與1×10^{10}至1×10^{11}個基因體拷貝。在另一個特定實施例中，投與1×10^{11}至1×10^{12}個基因體拷貝。在另一個特定實施例中，投與1×10^{12}至1×10^{13}個基因體拷貝。在另一個特定實施例中，投與1×10^{13}至1×10^{14}個基因體拷貝。在另一個特定實施例

中，投與1×10^{14}至1×10^{15}個基因體拷貝。在另一個特定實施例中，投與1×10^{15}至1×10^{16}個基因體拷貝。

【0378】不受理論束縛，至少10%的所投與之rAAV感染所投與之人類個體的肝。在某些實施例中，10-15%、15-20%、20-25%、25-35%、30-40%、35-45%、40-50%、45-55%、50-60%、55-65%、60-70%、65-75%、70-80%、75-85%、80-90%、85-95%或90-100%的所投與之rAAV感染人類個體之肝。

【0379】不受理論束縛，至少10%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶在肝細胞中表現。在某些實施例中，10-15%、15-20%、20-25%、25-35%、30-40%、35-45%、40-50%、45-55%、50-60%、55-65%、60-70%、65-75%、70-80%、75-85%、80-90%、85-95%、或90-100%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶在肝細胞中表現。

【0380】不受理論束縛，至少10%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶到達人類個體之受影響組織(例如骨)。在某些實施例中，10-15%、15-20%、20-25%、25-35%、30-40%、35-45%、40-50%、45-55%、50-60%、55-65%、60-70%、65-75%、70-80%、75-85%、80-90%、85-95%或90-100%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶到達人類個體之受影響組織(例如骨)。

【0381】不受理論束縛，至少10%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶係藉由在肝細胞中表現及分泌而糖基化。在某些實施例中，10-15%、15-20%、20-25%、25-35%、30-40%、35-45%、40-50%、45-55%、50-60%、55-65%、60-70%、65-75%、70-80%、75-85%、80-90%、85-95%或90-100%的由rAAV病毒基因體表現之hGALNS酶係藉由

在肝細胞中表現及分泌而糖基化。

【0382】 不受理論束縛，至少10%的經肝細胞糖基化之hGALNS酶可到達人類個體之受影響組織(例如骨)。在某些實施例中，10-15%、15-20%、20-25%、25-35%、30-40%、35-45%、40-50%、45-55%、50-60%、55-65%、60-70%、65-75%、70-80%、75-85%、80-90%、85-95%或90-100%的經肝細胞糖基化之hGALNS酶可到達人類個體之受影響組織(例如骨)。

(b) 投藥途徑

【0383】 在一個特定實施例中，rAAV可以醫藥組成物形式存在以便投與人類個體(參見第6.1.3節)。

【0384】 rAAV可例如藉由非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、鼻內、鞘內或經皮投與來投與。在一個特定實施例中，rAAV係藉由靜脈內投與來投與。

6.4 組合療法

6.4.1 利用免疫抑制之聯合療法

【0385】 儘管rAAV之遞送應使免疫反應減至最少，但與基因療法相關的最明顯之潛在毒性源係在遺傳上缺乏hGALNS之人類個體中產生針對所表現之hGALNS蛋白的免疫性，且由此可能導致不耐受該酶或rAAV。因此，在某些實施例中，建議結合免疫抑制療法共同治療患者，尤其是在治療hGALNS含量接近於零的嚴重疾病患者時。可以採用涉及他克莫司(tacrolimus)或雷帕黴素(rapamycin)(西羅莫司(sirolimus))聯合黴酚酸之方案、或組織移植手術中使用之其他免疫抑制方案的免疫抑制療法。此類免疫抑制治療可以在基因療法之過程中投與，且在某些實施例

中，用免疫抑制療法進行預治療可為較佳的。根據治療醫師之判斷，可以在基因療法後繼續進行免疫抑制療法，並在誘發免疫耐受性時；例如在180天後，停止免疫抑制療法。

【0386】 在某些實施例中，本文所提供之治療方法進一步包括向人類患者投與包含普賴蘇濃(prednisolone)、黴酚酸及他克莫司之免疫抑制方案。在某些實施例中，本文所提供之治療方法進一步包括向人類患者投與包含普賴蘇濃、黴酚酸及雷帕黴素(西羅莫司)之免疫抑制方案。在某些實施例中，本文所提供之治療方法進一步包括向人類患者投與不含他克莫司之免疫抑制方案。在某些實施例中，本文所提供之治療方法進一步包括向人類患者投與包含一或多種皮質類固醇(諸如甲基普賴蘇濃及/或普賴蘇濃)、以及他克莫司及/或西羅莫司之免疫抑制方案。在某些實施例中，免疫抑制療法包括在hGALNS治療之前或同時，向該個體投與(a)他克莫司及黴酚酸之組合、或(b)雷帕黴素及黴酚酸之組合，且之後繼續投與。在某些實施例中，免疫抑制療法在180天後停止。在某些實施例中，免疫抑制療法在30、60、90、120、150或180天後停止。

6.4.2 利用其他治療之聯合療法

【0387】 所述實施例之方法涵蓋涉及向人類個體投與如本文所述之rAAV並伴隨投與其他可用治療的組合療法。該等另外的治療可在基因療法治療之前、同時或之後投與。可與本發明之基因療法組合的可用MPS IVA治療包括但不限於酶替代療法(ERT)及/或HSCT療法。在一個特定實施例中，ERT可使用藉由重組DNA技術在人類細胞株中產生之D8-hGALNS酶來執行。可用於產生此類酶之人類細胞株包括但不限於HT-22、SK-N-MC、HCN-1A、HCN-2、NT2、SH-SY5y、hNSC11、

ReNcell VM、人胚腎293細胞(HEK293)、HEK293-T、纖維肉瘤HT-1080、HKB-11、CAP、HuH-7及視網膜細胞株、PER.C6或RPE(參見例如Dumont等人, 2016, Critical Rev in Biotech 36(6):1110-1122「Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives」，其以引用之方式整體併入)。

6.5 疾病標誌物及治療評估

【0388】在某些實施例中，本文所述之治療方法的功效可藉由量測疾病之生物標誌物(諸如GAG、KS及C6S貯積量)之減少及/或骨、軟骨、韌帶、半月板、心臟瓣膜、尿液及/或血清中hGALNS酶活性之增加來監測。亦可監測炎症徵象及其他安全事件。

【0389】在某些實施例中，本文所述之治療方法的功效係藉由量測患者體內疾病生物標誌物之水準來監測。在某些實施例中，疾病生物標誌物之水準係在患者之血清中量測。在某些實施例中，疾病生物標誌物之水準係在患者之尿液中量測。在某些實施例中，疾病生物標誌物係GAG。在某些實施例中，疾病生物標誌物係KS。在某些實施例中，疾病生物標誌物係C6S。在某些實施例中，疾病生物標誌物係hGALNS酶活性。

【0390】在某些實施例中，本文所述之治療方法的功效可藉由量測患者與溶酶體貯積缺乏相關之身體特徵來監測。在某些實施例中，身體特徵可為貯積病變。在某些實施例中，身體特徵可為短脖子及短軀幹。在某些實施例中，身體特徵可為凸胸。在某些實施例中，身體特徵可為關節鬆弛。在某些實施例中，身體特徵可為脊柱後凸。在某些實施例中，身體特徵可為氣管阻塞。在某些實施例中，身體特徵可為脊髓壓迫。在某些實施例中，身體特徵可為聽力障礙。在某些實施例中，身體特徵可為角膜混

濁。在某些實施例中，身體特徵可為骨及關節畸形。在某些實施例中，身體特徵可為心臟瓣膜疾病。在某些實施例中，身體特徵可為限制性/阻塞性氣道。此類身體特徵可藉由熟習此項技術者已知之任何方法量測。

7. 實例

【0391】 本文所提供之某些實施例將藉由以下非限制性實例說明。

7.1 實例1. 編碼rAAV基因體之質體的設計及活體外轉染分析

【0392】 為了產生擬包裝在AAV8殼體中的含hGALNS表現卡匣之重組AAV基因體，設計出編碼重組AAV基因體之質體。設計並產生四種質體：TBG-hGALNS (hGALNS表現卡匣含有編碼hGALNS之核苷酸序列，其表現受肝特異性TBG啟動子之調控)、TBG-hGALNS CoOpt (hGALNS表現卡匣含有經密碼子優化的編碼hGALNS之核苷酸序列，其表現受肝特異性TBG啟動子之調控)、TBG-D8-hGALNS (hGALNS表現卡匣含有編碼hGALNS與D8融合之融合蛋白的核苷酸序列，其調控係受肝特異性TBG啟動子調控)或TBG-D8-hGALNS CoOpt (hGALNS表現卡匣含有經密碼子優化的編碼hGALNS與D8融合之融合蛋白的核苷酸序列，其調控係受肝特異性TBG啟動子調控)。所得rAAV分為兩類：(a)包含重組AAV基因體之rAAV，該基因體含有側接AAV反向末端重複序列(ITR)之hGALNS表現卡匣，其中該hGALNS表現卡匣包含可操作地連接至肝特異性TBG啟動子序列之hGALNS cDNA序列，以及編碼聚A位點之核苷酸序列；及 (b)包含重組AAV基因體之rAAV，該基因體包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)之hGALNS表現卡匣，其中該hGALNS表現卡匣包含可操作連接至肝特異性TBG啟動子序列之D8-hGALNS cDNA序列，以及編碼聚A位點之核苷酸序列(圖1)。D8係骨靶向性天冬胺酸八

肽。

【0393】 接下來，使用Lipofectamine-3000方案，用該四種質體之一轉染人肝細胞癌(HuH7)細胞，以測試活體外hGALNS表現。培育48小時後，收集轉染之HuH7細胞及上清液，並分析細胞團粒及培養基中GALNS酶之活性。用GFP質體轉染之Huh7細胞用作對照。藉由用TBG-hGALNS或TBG-hGALNS CoOpt質體轉染，使得細胞內hGALNS酶活性同等地增加(圖2A及2B)。在用TBG-D8-hGALNS或TBG-D8-hGALNS CoOpt質體轉染後，細胞內酶活性亦增加，不過增加程度要低於用TBG-hGALNS或TBG-hGALNS CoOpt質體轉染之程度(圖2A及2B)。藉由用任何質體轉染，在細胞培養基中偵測到的酶活性增加(圖2C及2D)。

【0394】 類似地，使用Lipofectamine-3000方案，用該四種質體之一轉染人肝癌細胞(HepG2)，以測試活體外hGALNS表現(圖3)。培育72小時後，收集轉染之HepG2細胞並分析細胞團粒中之hGALNS酶活性。與用對照質體轉染相比，藉由用TBG-hGALNS或TBG-hGALNS CoOpt質體轉染，使細胞內hGALNS酶活性增加。與對照質體相比，用TBG-D8-hGALNS或TBG-D8-hGALNS CoOpt質體轉染不會引起hGALNS活性增加。

7.2 實例2. 向MPS IVA基因剔除(galns-/-)小鼠活體內投與rAAV

【0395】 產生rAAV8，其包含能夠在肝特異性啟動子TBG下表現天然人GALNS (hGALNS)(AAV8-TBG-hGALNS，在一些圖中亦標為AAV8-hGALNS)、或能夠在肝特異性啟動子下表現具有天冬胺酸八肽(D8)之hGALNS (AAV8-TBG-D8-hGALNS，在一些圖中亦標為AAV8-D8-hGALNS)的病毒基因體。分別使用TBG-hGALNS CoOpt及TBG-D8-

hGALNS CoOpt質體產生病毒基因體。將兩種類型之病毒分別以5×10^{13}個GC/kg體重之劑量靜脈內投與4週齡MPS IVA基因剔除(KO)小鼠及Mtol免疫耐受小鼠。KO小鼠具有靶向破壞的mGALNS之外顯子2，且沒有可偵測的GALNS酶活性。Mtol小鼠對人GALNS蛋白具有耐受性。未治療之KO小鼠及野生型(WT)小鼠用作對照。注射後，監測此等小鼠14週。每兩週收集血液，並分析其hGALNS活性及硫酸角質素(KS)。rAAV投與、血液收集、GALNS酶分析及KS分析之時間表顯示於圖4中。屍體剖檢時，藉由組織病理學分析評價骨病理學。

【0396】 如圖5A中所示，在rAAV治療之小鼠的白細胞(WBC)中，hGALNS酶活性增加，在治療後10週達到接近WT小鼠之水準。投與rAAV後兩週，所有rAAV治療之小鼠之血漿中的hGALNS酶活性相較於WT小鼠中之水準平均提高20倍(在WT小鼠中水準之5-100倍範圍內)(圖5B)。此增加在整個14週之監測期內均得以維持(圖5B)。圖22中顯示類似的資料。用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠中的血漿酶活性水準明顯高於用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠中的血漿酶活性水準(圖6)，且兩個治療組之酶活性水準均高於WT水準。圖23中顯示類似的資料。

【0397】 將在用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療的KO (galns-/-)小鼠之肝中量測的hGALNS活性與WT小鼠之肝hGALNS活性相比較(圖7A)。用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠之肝中的hGALNS活性水準比WT水準高40倍，而用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之肝hGALNS活性比WT水準高8倍。與未治療之Mtol小鼠(經PBS治療)相比，用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療

之Mtol小鼠之肝中的hGALNS活性升高(圖7B)。用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠之肝中的hGALNS活性水準比未治療之小鼠高50倍，而用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠的肝hGALNS活性比未治療之Mtol小鼠高8倍。有關在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS後分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之肝中量測的hGALNS活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns -/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之比較(n = 3-8隻；平均值±SD)的更多資料，參見圖12A。

【0398】亦量測(a) WT小鼠、(b)未治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、(c)用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、(d)用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、(e)未治療之Mtol小鼠、(f)用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠及(g)用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠的心臟中之hGALNS活性(圖7C)。對於MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠，用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠及用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之心臟中的hGALNS活性水準均高於未治療小鼠中之活性。有關在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS後分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之心臟中量測的hGALNS活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns -/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之比較的更多資料(n = 3-8隻；平均值±SD)，參見圖13B。

【0399】類似地，量測(a) WT小鼠、(b)未治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、(c)用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、(d)用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小

鼠、(e)未治療之Mtol小鼠、(f)用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠及(g)用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之骨中的hGALNS活性(圖7D)。對於MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠，用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠及用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之骨中的hGALNS活性水準均高於未治療小鼠中之水準。有關在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS後分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之骨中量測的hGALNS活性水準與未治療之MPS IVA KO小鼠(galns -/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠之比較的更多資料(n = 3-8隻；平均值±SD)，參見圖13A。

【0400】 在MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠中，在遞送AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS載體後，經治療小鼠之肝、心臟及骨中的hGALNS活性水準均升高。此外，血液與骨中之hGALNS酶活性之間存在直接相關性。

【0401】 亦量測相較於未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠，在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之脾及Mtol小鼠之脾中的hGALNS酶活性水準(n ＝ 3-8隻；平均值±SD)(圖12B)。對於MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠，用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠及用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之脾中的hGALNS活性水準均高於未治療小鼠中之水準。

【0402】 此外，亦量測相較於未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、未治療之Mtol小鼠及野生型小鼠，在投與AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS之後，分別在MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肺

及Mtol小鼠之肺中的hGALNS酶活性水準(n ＝ 3-8隻；平均值±SD)(圖12C)。對於MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠，用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠及用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之肺中的hGALNS活性水準均高於未治療小鼠中之水準。

【0403】 量測血液硫酸角質素(KS)含量。在KO (galns-/-)小鼠中，在投藥後兩週，rAAV治療在兩組中引起血漿中之單硫酸化硫酸角質素(KS)含量降低至WT含量(圖8及圖14)。兩個rAAV治療組之血漿中此等降低之含量一直維持到注射後12週屍體剖檢時。相比之下，未治療之KO小鼠之血漿中的KS含量並未降低，且在監測之時間段內仍保持升高。在治療後兩週，向Mtol小鼠投與任一rAAV使得血漿中單硫酸化硫酸角質素(KS)含量相較於WT水準降低，且血漿中之KS含量相較於未治療之Mtol小鼠顯著降低(圖9A-9B及圖15A-15B)。然而，未治療小鼠組、用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠組、用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠組與WT小鼠組的血液diHS-0S含量之間沒有差異(圖10)。

【0404】 量測相較於未治療之MPS IVA KO小鼠及未治療之野生型小鼠，分別在用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療的MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肝、Mtol小鼠之肝及MPS IVA KO小鼠(galns-/-)之肺中的單硫酸化KS含量(圖16A-16C)。相較於未治療之小鼠，投與任一rAAV使得肝中單硫酸化KS顯著減少且使得肺中單硫酸化KS顯著減少。投與AAV載體後，MPS IVA KO小鼠(galns-/-)及Mtol小鼠之肝及肺中的KS含量幾乎恢復正常。

【0405】 關於經治療之KO小鼠之肝的組織病理學評價顯示，在竇內襯細胞及庫普弗細胞中之GAG貯積完全清除。

【0406】在整個監測期間，在血漿KO及Mtol小鼠模型中，投與AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS維持較高的酶活性水準。此持續存在之循環酶使血漿中之KS降低至WT水準，相對於利用ERT所實現之效果，此係顯著的改善(Tomatsu等人, Human Molecular Genetics, 2008, 17(6): 815-824)。儘管在兩個小鼠模型中以及對於AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS而言，在投與rAAV後兩週，血漿中之KS含量均恢復正常，但在用ERT治療KO小鼠之先前研究中，即使在每週輸注達12週後，血漿中之KS含量仍未恢復正常(Tomatsu等人, Human Molecular Genetics, 2008, 17(6): 815-824)。另外，高酶水準及較長的循環時間增加骨及軟骨療法中之滲透，由此改善此等區域之貯積。

【0407】rAAV治療後12週，對小鼠實施安樂死並收集組織，並評估其醣胺聚醣(GAG)之貯積情況。用甲苯胺藍對組織染色。藉由組織病理學分析評價骨病理學，且MPS IVA KO(galns-/-)小鼠之病理學評分以圖形描繪呈現(圖11A)。圖11B顯示膝關節(MPS IVA KO (galns-/-)小鼠)之染色圖像。

【0408】圖11C顯示MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之股骨關節軟骨的40x放大之染色圖像。在未治療之小鼠(左圖)中，淺表細胞變得結構紊亂，且軟骨細胞膨脹並空泡化。此外，柱狀結構變形且結構紊亂。相比之下，用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠的組織顯示組織化之淺表細胞、減少之空泡化軟骨細胞，以及柱狀結構之維持(右側兩個圖)。此等態樣更詳細地顯示於圖11D-11F中。

【0409】 圖11G顯示未治療或經rAAV治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之股骨生長板的40x放大之染色圖像。在未治療之小鼠(左圖)中，軟骨細胞空泡化且柱狀結構明顯結構紊亂及變形。經AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠的軟骨細胞(中間圖)亦空泡化，但柱狀結構僅中等變形。相比之下，對於用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠的組織(右圖)，軟骨細胞中等空泡化且柱狀結構變得組織化。此等態樣更詳細地顯示於圖11H-11J中。圖17A-17E亦顯示(A)野生型小鼠(所有軟骨細胞均未空泡化且柱狀結構良好組織化)、(B)未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)(所有軟骨細胞均空泡化且柱狀結構明顯結構紊亂及變形)、(C)未治療之Mtol小鼠(所有軟骨細胞均空泡化且柱狀結構明顯結構紊亂及變形)、(D)用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠(軟骨細胞中等空泡化，但柱狀結構變好)及(E)用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠(軟骨細胞中等空泡化，但柱狀結構部分恢復)中股骨生長板的40x放大之染色圖像。

【0410】 圖18A顯示在未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns -/-)的股骨及脛骨生長板中量測的軟骨細胞大小。圖18B顯示在未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠的股骨生長板中量測的軟骨細胞大小。圖18C顯示在未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns-/-)或用AAV8- TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠(galns -/-)的脛

骨生長板中量測的軟骨細胞大小。圖18D顯示在未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠的脛骨生長板中量測的軟骨細胞大小。

【0411】 AAV基因轉移後，MPS IVA KO小鼠及Mtol小鼠之生長板中的軟骨細胞大小及柱狀結構均得到實質上改善。

【0412】 圖11K顯示未治療或經rAAV治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之半月板的40x放大之染色圖像。在未治療之小鼠(左圖)中，大多數細胞膨脹並空泡化。用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠之半月板(中間圖)中的一些細胞空泡化。用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之組織中的大多數細胞(右圖)未空泡化。

【0413】 圖11L顯示未治療或經rAAV治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之脛骨側上韌帶的40x放大之染色圖像。在未治療之小鼠(左圖)中，大多數細胞空泡化。用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠之韌帶(右側兩個圖)中的一些細胞仍空泡化。

【0414】 圖11M顯示未治療或經rAAV治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之心臟瓣膜基部的40x放大之染色圖像。在未治療小鼠中二尖瓣基部(左圖)處的許多細胞空泡化，而在用AAV8-TBG-hGALNS (中間圖)或AAV8-TBG-D8-hGALNS (右圖)治療之小鼠之二尖瓣組織基部處未觀察到空泡化細胞。未治療之小鼠組織的此等態樣更詳細地顯示於圖11N中。在心臟瓣膜之組織中觀察到類似的結果(圖11O)。Mtol小鼠之類似結果顯示於圖19 (下圖)中。未治療小鼠中的許多心臟瓣膜細胞(左圖)空泡化，而在用AAV8-TBG-hGALNS (中間圖)或AAV8-TBG-D8-hGALNS (右圖)治

療之小鼠之心臟瓣膜組織中未觀察到空泡化細胞。未治療之小鼠組織的此等態樣更詳細地顯示於圖11P中。

【0415】 圖20顯示用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠中之心肌的組織病理學(40x放大率)與未治療之Mtol小鼠的比較。

【0416】 AAV基因轉移後，MPS IVA KO (galns-/-)小鼠及Mtol小鼠之心臟瓣膜及心肌均沒有明顯的空泡化細胞。

【0417】 圖21A顯示未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns -/-)小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之心臟瓣膜組織的病理學評分。圖21B顯示未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之心臟瓣膜組織的病理學評分。圖21C顯示未治療之野生型小鼠、未治療之MPS IVA KO(galns-/-)小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO (galns-/-)小鼠之心肌組織的病理學評分。圖21D顯示未治療之野生型小鼠、未治療之Mtol小鼠、用AAV8-TBG-hGALNS治療之Mtol小鼠或用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之Mtol小鼠之心肌組織的病理學評分。

【0418】 另外，藉由組織病理學分析評價Mtol小鼠之骨病理學。使用不成對t檢驗檢查未治療組與各治療組之間病理學評分之差異(分數：0(正常)至3(嚴重))，*參見*表1。

表1. Mtol小鼠之骨中的病理學評分(n = 2-5隻，平均值±SD)

	未治療組	AAV8-TBG-	AAV8-TBG-D8-

				hGALNS治療組	hGALNS治療組
生長板	股骨	空泡化	2.90 ± 0.10	1.38 ± 0.34 *	1.41 ± 0.21 *
		柱狀結構	2.93 ± 0.11	1.44 ± 0.33 *	1.47 ± 0.16 *
	脛骨	空泡化	2.85 ± 0.21	1.56 ± 0.26 *	1.50 ± 0.29 *
		柱狀結構	2.75 ± 0.31	1.63 ± 0.20 *	1.41 ± 0.33 *
關節軟骨	股骨	空泡化	2.48 ± 0.34	1.38 ± 0.18 *	1.16 ± 0.33 *
		柱狀結構	2.35 ± 0.44	1.38 ± 0.18 *	1.22 ± 0.19 *
	脛骨	空泡化	2.53 ± 0.16	1.19 ± 0.14 *	1.27 ± 0.21 *
		柱狀結構	2.44	1.38	1.21 ± 0.26
韌帶			2.80 ± 0.26	1.72 ± 0.56 *	1.66 ± 0.26 *
半月板			2.73 ± 0.34	1.41 ± 0.33 *	1.34 ± 0.26 *

*相對於未治療組，p <0.05

【0419】 兩種病毒均減少關節軟骨、韌帶及在關節軟骨週圍之半月板、以及在脛骨及股骨中之生長板區域中的GAG貯積。在用AAV-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠的骨及軟骨中觀察到相當多的GAG貯積減少。

【0420】 在rAAV治療之小鼠的骨、生長板、關節軟骨、半月板、韌帶及心臟組織得到實質上改善。此外，經治療小鼠的心臟瓣膜及心臟瓣膜基部之缺陷幾乎完全緩解，且在心臟瓣膜基部及心臟瓣膜處均未觀察到明顯的空泡化細胞。結果顯示相對於ERT之顯著改善，因為ERT治療之小鼠顯示生長板中空泡化細胞未清除，生長板中之柱狀結構紊亂，且在心臟瓣膜中有大量的空泡化細胞(Tomatsu等人, Human Molecular Genetics, 2008, 17(6): 815-824)。

【0421】 在除肝外的組織(產生hGALNS及D8-hGALNS蛋白之組織)中觀察到治療效果的事實表明，存在甘露糖-6-磷酸受體介導之交叉修正。

7.3 實例3. 肝靶向性AAV8基因療法改善IVA型黏多醣病鼠類模型中之骨骼及心血管病理學

【0422】本實例係關於在包括實例1-2在內的本文所述之其他實例中描述及執行的實驗，且呈現由實例1-2得到另外的數據。在本實例中，評價在肝特異性甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子控制下表現含或不含骨靶向信號之hGALNS的AAV8載體，且研究此等重組AAV8載體在兩個鼠類MPS IVA疾病模型之骨及心臟病變中的治療功效。骨及心臟係受此病症影響之主要器官。

7.3.1 結果

(a) 血液及組織中之GALNS酶活性：在鼠類MPS IVA模型中，AAV-hGALNS遞送使得血漿及各種組織中之GALNS活性明顯增加。

【0423】兩個MPS IVA小鼠模型(MPS IVA KO及MTOL)在hGALNS活性缺乏、血液及組織中KS含量增加以及在包括軟骨細胞、半月板、韌帶以及心肌及心臟瓣膜在內之各種組織中的貯積材料(空泡)方面再現人類疾病。此等生物標誌物已被廣泛用於評價此等小鼠模型中表現型之嚴重程度及若干方法之治療功效(Tomatsu, S.等人, Hum. Mol. Genet., 2008, 17, 815-824；Tomatsu, S.等人, Hum. Mol. Genet., 2003, 12, 3349-3358；Tomatsu, S.等人, Hum. Mol. Genet., 2005, 14, 3321-3335；Tomatsu, S.等人, Mol. Ther., 2010, 18, 1094-1102)。在該研究中，將5×10^{13}個GC/kg體重之均一劑量的AAV8-TBG-hGALNSco及AAV8-TBG-D8-hGALNSco (圖24A)靜脈內遞送至4週齡之MPS IVA KO及MTOL小鼠中。注射後，監測小鼠12週，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並獲取膝關節及心臟瓣膜進行組織病理學分析。

【0424】MPS IVA KO及MTOL小鼠中之血漿酶活性顯示於圖24B-

24C中。在未治療之MPS IVA小鼠中未偵測到血漿hGALNS活性。注射後兩週，用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠的血漿hGALNS活性相較於野生型小鼠中之活性顯著增加。注射後2週，由AAV8-TBG-D8-hGALNS引起之酶活性高於由AAV8-TBG-hGALNS引起之活性；然而，注射後12週，該兩種AAV載體之血漿hGALNS活性沒有差異。注射後2週，在用兩種AAV載體治療之MTOL小鼠中，血漿hGALNS活性相較於野生型小鼠中之活性顯著增加。在整個研究期間，用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之小鼠中的酶活性水準高於用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠中的酶活性水準，表明具有骨靶向信號之hGALNS使血液循環相較於天然hGALNS延長，此可能因為組織中吸收減少。此等結果展示，在兩個MPS IVA小鼠模型中單次注射AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS後，獲得超生理水準之循環hGALNS活性，且該等高水準酶活性在研究期間得到維持。

【0425】 在IV遞送AAV載體後12週，肝中之hGALNS活性水準顯示於圖24J及圖24K中。所有經治療之MPS IVA小鼠中的hGALNS活性水準均顯著高於未治療之MPS IVA小鼠中的水準。用AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MPS IVA KO小鼠中的平均酶活性水準分別比在野生型小鼠中觀察到的水準高49倍及9倍。在用AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之MTOL小鼠中，hGALNS活性比野生型小鼠中發現之水準高60倍及9倍。用AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之KO及MTOL小鼠之肝中的GALNS活性顯著低於用AAV8-TBG-hGALNS治療之小鼠中的活性。

【0426】 檢查MPS IVA小鼠之組織中的組織hGALNS活性水準以評

價hGALNS缺乏之潛在交叉修正情況。在AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療後，在KO及MTOL小鼠的所有經檢查之組織中，包括在脾、肺、腎臟、骨(腿)及心臟中均觀察到hGALNS活性(圖24J-24K)。脾及心臟中的酶活性類似於或高於野生型水準，且在肺及腎臟中觀察到略微較低水準之酶活性。值得注意的是，在用AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之KO小鼠之骨中分別觀察到37%及20%的野生型酶活性。另外，在用該兩種AAV載體治療之MTOL小鼠中觀察到57%及43%之野生型酶活性。此等結果表明，在AAV基因轉移後，穩定的超生理水準之hGALNS酶促使該酶滲透至MPS IVA小鼠的包括骨在內之各種組織中。骨中之hGALNS活性水準在AAV8-TBG-hGALNS與AAV8-TBG-D8-hGALNS之間無統計學差異。

(b) 血液及組織中的單硫酸化KS含量因AAV-GALNS遞送而降低

【0427】 在MPS IVA小鼠之血漿及組織中量測單硫酸化KS，而單硫酸化KS係KS之主要組分。KO及MTOL小鼠中之血漿單硫酸化KS含量顯示於圖25A-25B中。在投與AAV載體之前，未治療之KO小鼠之血漿KS含量顯著高於野生型小鼠中之含量(平均值：41.8 ng/ml相對於16.3 ng/ml)。注射後兩週，對於兩種AAV載體，血漿中之單硫酸化KS含量完全恢復正常，且此含量又維持至少10週(在屍體剖檢時)。在四週齡時，野生型小鼠與未治療之MTOL小鼠中的單硫酸化KS含量類似。在整個研究期間，野生型小鼠中之單硫酸化KS含量維持在恆定水準；然而，未治療之MTOL小鼠中的單硫酸化KS含量隨年齡增長而逐漸增加。用任一AAV載體治療之MTOL小鼠在整個研究期間均維持正常水準。在16週齡時，與未治療之MTOL小鼠中的含量相比，用AAV載體治療之MTOL小鼠中的單

硫酸化KS含量顯著降低。

【0428】 量測MPS IVA小鼠之組織中的Mono-KS含量。屍體剖檢時，在KO及MTOL小鼠之組織中均存在GAG之過量貯積。注射任一AAV載體後12週，KO及MTOL小鼠之肝及肺中單硫酸化KS之量顯著降低(圖25C-25D)。為了評估此等表現hGALNS之AAV載體對其他GAG水準之影響，對MPS IVS小鼠之血液及組織中的硫酸乙醯肝素(HS)含量進行分析。KO及MTOL在血漿中均具有正常的diHS-0S含量，且在注射AAV載體後，該等含量不受影響(圖30)。在注射AAV載體後12週，所有組之肝及肺中的組織diHS-0S含量亦無變化(圖31)。

(c) AAV GALNS載體之遞送使MPS IVA小鼠之骨及軟骨病理學改善

【0429】 在註射AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS後12週，評估來自MPS IVA小鼠之組織，包括骨(股骨及脛骨)及心臟(心肌及心臟瓣膜)。

【0430】 在16週齡時，未治療之MPS IVA KO及MTOL小鼠的股骨及脛骨生長板(透明軟骨)(圖27A)、關節盤(圖27B)、在膝關節週圍之韌帶(圖32A)及半月板(圖32B)中展現GAG貯積空泡。生長板亦展現出結構紊亂之柱狀結構及膨脹且空泡化之軟骨細胞(圖27A-27B)。在用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之KO小鼠中，膝關節中之生長板、關節軟骨、韌帶及半月板中的貯積材料部分減少，且軟骨細胞之柱狀結構得到改善，但仍結構紊亂及變形。在用此等AAV載體治療之MTOL小鼠中，膝關節中之生長板、關節軟骨、韌帶及半月板具有明顯較多的貯積減少，且生長板及關節軟骨之柱狀結構顯示出較之未治療之MTOL小鼠中的情形更顯著的恢復。

【0431】 為了客觀地評估生長板之軟骨細胞中空泡化的改善，對KO及MTOL小鼠之生長板病變中軟骨細胞之大小進行定量(4C)。觀察到此等生長板病變中軟骨細胞大小中等減少，此在MTOL小鼠中達到統計學顯著性。未治療之MPS IVA小鼠在心臟瓣膜及心肌中展現GAG貯積空泡。AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS在經治療之KO及MTOL小鼠的此等心臟病變中提供幾乎完全的清除(圖27A-27B)。

(d) 抗hGALNS抗體之循環

【0432】 總體而言，注射AAV8載體後12週，KO小鼠之骨病理學改善不如MTOL小鼠中之改善明顯。為了研究對hGALNS有體液反應之可能性，藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)量測針對hGALNS之抗體效價。間接ELISA方法藉由使用塗在盤上之全長rhGALNS偵測血漿中之抗hGALNS抗體。與來自其他組之血漿相比，來自用AAV載體治療之KO小鼠的血漿顯示出明顯較高的循環抗hGALNS抗體含量(對於用AAV8-TBG-hGALNS或AAV8-TBG-D8-hGALNS治療之KO，0.50±0.38或0.62±0.43個光密度(OD)單位)(圖28)。在野生型小鼠、未治療之KO及MTOL小鼠中未偵測到循環抗hGALNS抗體。

7.3.2 材料及方法

(a) 開發AAV hGALNS表現卡匣

【0433】 為了開發具有hGALNS之AAV8載體，測定經密碼子優化的hGALNS序列。將在肝特異性TBG啟動子控制下轉譯成526個胺基酸的經優化之1569 bp序列包裝於AAV8殼體中。在含骨靶向信號之載體質體中，在hGALNS之N末端信號肽之後插入天冬胺酸八肽(D8)序列，產生對主要骨基質羥基磷灰石具有高親和力的骨靶向性hGALNS(圖24A)。在用

Huh-7細胞執行轉染實驗後，確定由此等AAV載體質體產生GALNS。由密碼子優化之開放閱讀框架產生的細胞內及細胞外hGALNS活性水準與由天然hGALNS編碼序列產生之水準類似(圖29A-29B)。

(b) 表現卡匣設計及AAV載體產生

【0434】 設計出帶有天然及含D8之GALNS轉殖基因的表現卡匣以包裝於AAV8載體中(圖28)。將骨靶向信號，即天冬胺酸八肽(D8)序列插入hGALNS之N末端信號肽之後。該設計包括肝特異性甲狀腺素結合球蛋白(TBG)啟動子，以及兔β-球蛋白聚腺苷酸化尾(聚A)。在小鼠研究中，將密碼子優化之hGALNS序列用於兩種載體。在使用Huh-7細胞之轉染實驗中證實此等表現卡匣質體之GALNS酶活性。轉染後48小時，測定細胞溶解產物及上清液中的活性水準(圖29A-29B)。由密碼子優化之構築體產生的GALNS活性水準類似於由天然hGALNS編碼序列產生之水準。

【0435】 AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS載體係在REGENXBIO (Rockville, MD)，遵循專有GMP載體製造方案的按比例縮小版本產生。簡言之，用輔助質體、AAV8殼體質體及含有hGALNS/D8-hGALNS質體之轉殖基因質體對HEK293細胞(RGX293)進行三重轉染。使用親和層析法，自細胞培養物上清液純化出經包裝之載體，並使用Digital Droplet PCR (BioRad)法滴定。

(c) 鼠類模型及活體內研究設計

【0436】 藉由使用兩類MPS IVA鼠類模型測試AAV8-TBG-hGALNS及AAV8-TBG-D8-hGALNS之治療潛力(Tomatsu等人, Hum Mol Genet 2003; 12(24):3349-3358；Tomatsu等人, Hum. Mol. Genet. 2005; 14, 3321-3335)。第一類係具有基因破壞之*Galns*基因剔除小鼠模型(KO：

Galns-/-)((Tomatsu等人, Hum Mol Genet 2003; 12(24):3349-3358)。第二類係對人GALNS具有耐受性之鼠類模型(MTOL：$Galns^{tm(hC79S.mC76S)slu}$)，其含有在β-球蛋白/Ig內含子中表現hGALNS之轉殖基因及鄰近外顯子2之活性位點突變(C76S)，由此藉由靶向突變誘發將具有C79S活性位點突變之無活性hGALNS編碼序列及C76S突變引入鼠類*Galns*基因中(Tomatsu等人, Hum. Mol. Genet. 2005; 14, 3321-3335)。兩類模型在血液及組織中均無可偵測之酶活性，且顯示主要在網狀內皮庫魯弗細胞、心臟瓣膜、心肌及軟骨細胞(包括生長板及關節軟骨)中存在貯積材料積累。

【0437】 先前已描述在C57BL/6背景中兩種MPS IVA鼠類模型之開發，即MPS IVA基因剔除小鼠(Galns-/-)(Tomatsu等人, Hum Mol Genet 2003; 12(24):3349-3358)及對人GALNS蛋白具有耐受性之MPS IVA小鼠($Galns^{tm(hC79S.mC76S)slu}$)(Tomatsu等人, Hum. Mol. Genet. 2005; 14, 3321-3335)。GALNS基因剔除小鼠模型(KO：*Galns*-/-)係藉由靶向破壞GALNS基因開發(Tomatsu等人, Hum Mol Genet 2003; 12(24):3349-3358)。對人GALNS具有耐受性之小鼠模型(MTOL：$Galns^{tm(hC79S.mC76S)slu}$)含有在β-球蛋白/Ig內含子中表現hGALNS之轉殖基因及鄰近外顯子2之活性位點突變(C76S)，由此引入無活性hGALNS編碼序列及C79S活性位點突變(Tomatsu等人, Hum. Mol. Genet. 2005; 14, 3321-3335)。兩類小鼠模型在血液及組織中均無可偵測之酶活性，且顯示主要在網狀內皮庫魯弗細胞、心臟瓣膜及心肌、以及軟骨細胞(包括生長板及關節軟骨)內存在貯積材料積累。

【0438】 在第14天，藉由PCR對實驗組進行基因分型。用5×10^{13}

個GC/kg之均一劑量的任一AAV8載體經靜脈內治療4週齡之同型接合MPS IVA小鼠。對另一組MPS IVA小鼠以及未受影響之C57BL/6同窩仔畜投與磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)。投與的總劑量體積係每隻小鼠約100μl。所有動物護理及實驗均得到內莫爾斯/阿爾弗雷德I.杜邦兒童醫院(Nemours/Alfred I. duPont Hospital for Children)之機構動物護理及使用委員會的批准。

(d) 血液及組織收集

【0439】 在研究中，每隔一週自所有動物收集約100 μl血液放入含EDTA之試管中(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)。將血液以8,000 rpm離心10分鐘，並將分離之血漿保持在-20℃，直至執行GALNS酶分析及GAG分析。在16週齡時，在CO_2腔室中對小鼠實施安樂死並灌注20 ml之0.9%生理鹽水。收集肝、腎臟、肺、脾、心臟及膝關節並在-80℃儲存，直至加工用於GALNS酶分析及GAG分析。另外，收集各種組織樣品並將其儲存於10%中性緩衝福馬林(formalin)中以待組織病理學分析。

(e) GALNS活性分析

【0440】 如先前所述，測定血液及組織GALNS活性(Toietta, G.,等人, Hum. Gene Ther. 2001; *12*, 2007-2016)。使用均質機，將冷凍組織用均質化緩衝液均質化，該均質化緩衝液由25 mmol/l Tris–HCl pH 7.2及1 mmol/l苯甲基磺醯基氟組成。將組織溶解產物或血漿以及在0.1 M NaCl、0.1 M乙酸鈉pH 4.3中之22 mM 4-甲基繖形酮基-β-哌喃半乳糖苷-6-硫酸酯(Research Products International, Mount Prospect, IL, USA)在37℃下培育16小時。接著，將於0.1 M NaCl、0.1 M乙酸鈉pH 4.3中的10 mg/ml來自米曲霉(Aspergillus oryzae)之β-半乳糖苷酶(Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA)添加至反應樣品中，並於37℃下再培育2小時。將樣品轉移至終止溶液(1 M甘胺酸、NaOH，pH 10.5)中，並在Perkin Elmer Victor X4 讀板器(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)上以366 nm激發波長及450 nm發射波長讀取板。活性表示為每小時每微升血漿或每毫克蛋白質釋放的4-甲基繖形酮之奈莫耳量。利用BCA蛋白質分析套組(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)測定蛋白質濃度。

(f) 自組織提取GAG

【0441】自各種小鼠組織提取GAG係改編自Mochizuki等人(Mochizuki, H.等人, J. Biol. Chem. 2008; *283*, 31237-31245)所開發之提取方法。簡言之，將切除之組織在液氮中冷凍，並使用均質機，用丙酮均質化。將獲得的粉末在離心機真空下乾燥。使脫脂之組織粉末懸浮於0.5 M NaOH中並在50℃下培育2小時以自其核心蛋白移出GAG鏈。用1 M HCl中和後，添加NaCl達到3M之最終濃度。藉由離心移除不溶性材料，並用1 M HCl將上清液之pH值調至1.0以下。藉由離心移除沈澱之核苷酸，並用1M NaOH中和上清液。藉由添加兩體積的含1.3%乙酸鉀之乙醇使粗GAG沈澱。離心後，將沈澱物溶解於蒸餾水中。

(g) GAG分析

【0442】如先前所述(Oguma, T.等人, Biomed. Chromatogr. 2007; *21*, 356-362；Oguma, T.等人, Anal. Biochem. 2007; *368*, 79-86；Shimada, T.等人, JIMD. Rep. 2014; *16*, 15-24；Shimada, T.等人, JIMD. Rep. 2015; *21*, 1-13；Kubaski, F.等人, J. Inherit. Metab. Dis. 2017; *40*, 151-158)，藉由LC-MS/MS量測血液及組織GAG水準。簡言之，將50 mM Tris-HCl (pH 7.0)及樣品放入96孔接收盤上的96孔ω 10K過濾盤(Pall

Corporation, Port Washington, NY, USA)中。樣品以2,500 g離心15分鐘。將過濾盤轉移至新接收盤上，並向過濾盤中添加50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 μg/mL作為內標(IS)之軟骨膠糖、1 mU肝素酶及1 mU角質酶II之混合液。將樣品在37℃水浴中培育隔夜。接著，將樣品以2,500 g離心15分鐘。該設備由配備6460三重四極桿質譜儀之1290 Infinity LC系統(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)組成。在恆溫保持於60℃之Hypercarb管柱(2.0 mm內徑，50 mm長度；5 μm粒子；Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)上分離二醣。移動相係5 mM醋酸銨pH 11.0(溶液A)至100%乙腈(溶液B)之梯度溶析。流速為0.7 ml/min，且梯度如下：0分鐘100%溶液A、1分鐘70%溶液A、2分鐘70%溶液A、2.20分鐘0%溶液A、2.60分鐘0%溶液A 、2.61分鐘100%溶液A、5分鐘100%溶液A。質譜儀係結合電噴霧電離以負離子模式操作(Agilent Jet Stream technology)。使用特定前體物及產物離子，m/z分別對各二醣進行定量(IS，354.3→193.1；單硫酸化KS，462→97；HS-0S 378.3→175.1)。進樣量為10μl且每個樣品之操作時間為5分鐘。

(h) 甲苯胺藍染色及病理學評估

【0443】如先前所述(Tomatsu, S.等人, Mol. Genet. 2005, 14, 3321-3335)，執行甲苯胺藍染色。簡言之，在16週齡時，自MPS IVA小鼠及WT小鼠收集膝關節及心臟二尖瓣，藉由光學顯微鏡檢查評價貯積顆粒之含量。將組織固定於之含2%三聚甲醛、4%戊二醛之PBS中，並在四氧化鋨中後固定且包埋於Spurr樹脂中。接著，檢查經甲苯胺藍染色的0.5 μm厚之切片。為了評價股骨或脛骨生長板中之軟骨細胞大小(空泡化)，藉由Image J軟體量測每隻小鼠中之增殖區域中的約300個軟骨細胞，且結

果表示為相對於野生型組之倍數變化。

(i) 藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)偵測針對GALNS之抗體

【0444】 如先前所述(Tomatsu, S.等人, Hum. Mol. Genet. 2003; *12*, 961-973)，使用間接ELISA法偵測經治療小鼠及未治療小鼠之血漿中的針對GALNS之抗體。簡言之，用在15 mM Na_2CO_3、35 mM $NaHCO_3$、0.02% NaN_3，pH 9.6中的2 μg/ml純化之rhGALNS (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)塗覆96孔微量滴定盤隔夜。用TBS-T (10 mM Tris，pH 7.5，150 mM NaCl、0.05% TWEEN 20)洗滌各孔三次，且接著，在室溫下用含3%牛血清白蛋白之PBS (pH 7.2)封閉1小時。用TBS-T洗滌三次後，將小鼠血漿於TBS-T中之100倍稀釋液添加至各孔中，並在37℃下培育2.5小時。用TBS-T洗滌各孔四次，接著將含有1:1,000稀釋的過氧化酶結合之山羊抗小鼠IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)的TBS-T添加至各孔中並在室溫下培育1小時。將各孔用TBS-T洗滌三次，並用TBS (10mM Tris，pH7.5，150mM NaCl)洗滌兩次。添加過氧化酶受質(ABTS溶液，Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (每孔100 μl)，並在室溫下培育各盤30分鐘。藉由添加1% SDS終止反應，並在Perkin Elmer Victor X4讀板器(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)上以在410 nm下之光密度讀取盤。

(j) 統計分析

【0445】 所有數據均以平均值加標準差(SD)表示。使用GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)，藉由單因子變異數分析及Bonferroni事後檢驗執行多重比較測試。差異之統計學顯著性被認為是$p<0.05$。

7.4 實例4. 評價延長之酶暴露對骨病理學之影響

【0446】 進行以下研究以評價延長之酶暴露對骨病理學的影響。對於本研究，將5 × 10^{13}個GC/kg體重劑量之AAV8-TBG-hGALNSco投與4週齡之MPSIVA KO小鼠中。對照組係未治療之MPS IVA KO小鼠及相同年齡的未治療之野生型小鼠。本研究中使用三組小鼠，每組6-10隻。注射後，監測小鼠24週或48週，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

【0447】 類似地，將5 × 10^{13}個GC/kg體重之劑量的AAV8-TBG-hGALNSco遞送至4週齡之MTOL小鼠中。對照組包括未治療之MTOL小鼠及相同年齡的未治療之野生型小鼠。本研究中使用三組小鼠，每組6-10隻。注射後，監測小鼠24週或48週，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

7.5 實例5. 新生兒研究：評價早期干預對骨病理學之影響

【0448】 對新生小鼠進行以下研究以評價早期干預對骨病理學之影響。在本研究中，將5 × 10^{13}個GC/kg體重之劑量的AAV8-TBG-hGALNSco投與MPSIVA KO新生小鼠。對照組包括未治療之MPS IVA KO小鼠及相同年齡的未治療之野生型小鼠。在16週齡時，處死小鼠，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

【0449】類似地，將5 × 10^{13}個GC/kg體重之劑量的AAV8-TBG-hGALNSco遞送至新生MTOL小鼠中。對照組包括未治療之MTOL小鼠及相同年齡的未治療之野生型小鼠。本研究中使用三組小鼠，每組6隻。在16週齡時，處死小鼠，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

7.6 實例6. 新表現卡匣評價

【0450】進行以下研究以針對功效改善評價經優化之啟動子構築體。在本研究中，將AAV8-TBG-hGALNSco、AAV8-CAG-hGALNSco、AAV8-啟動子1-hGALNSco、AAV8-啟動子2-hGALNSco、AVV9-啟動子2-hGALNSco以1 × 10^{13}個GC/kg體重之劑量投與4週齡之MPSIVA KO小鼠(每組10隻小鼠)。對照組包括未治療之MPS IVA KO小鼠及相同年齡的未治療之野生型小鼠。監測小鼠12週或48週，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

7.7 實例7. 晚期AAV基因療法研究

【0451】進行以下研究以評價晚期AAV基因療法之功效。在本研究中，將AAV-TBG-hGALNSco、AAV-CAG-hGALNSco、AAV-啟動子1-hGALNSco、AAV-啟動子2-hGALNSco、AVV-啟動子2-hGALNSco投與8-10週齡之MPSIVA KO小鼠(每組5隻小鼠)。未治療之MPS IVA KO小鼠用作對照。監測小鼠一段時間，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及

KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

【0452】類似地，將AAV-TBG-hGALNSco、AAV-CAG-hGALNSco、AAV-啟動子1-hGALNSco、AAV-啟動子2-hGALNSco、AVV-啟動子2-hGALNSco投與8-10週齡之MTOL小鼠(每組5隻小鼠)。未治療之MTOL小鼠用作對照。監測小鼠一段時間，且每隔一週收集血液樣品以分析酶活性及KS含量。另外，在屍體剖檢時，自不同器官獲取組織樣品用於酶活性及KS含量分析，並自膝關節及心臟瓣膜獲取組織樣品進行組織病理學分析。

7.8 實例8. 骨-肝串聯啟動子驅動之構築體

【0453】構築LBTP1 (骨-肝串聯啟動子)驅動之構築體，其包含圖33及37中所示之組分。LBTP1啟動子包含驅動成骨細胞特異性表現之最小Sp7/Osx啟動子片段。確定最小Sp7/Osx啟動子係Sp7/Osx啟動子之轉錄活性片段(Lu, X.等人, JBC 281, 6297-6306, 2006年1月12日)。LBTP1序列含有在5'端側接肝特異性ApoE強化子/肝控制區且在3'端側接ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAATΔATG)以驅動肝細胞特異性表現的最小Sp7啟動子片段(SEQ ID NO: 24)之一個拷貝。將嵌合β-球蛋白/Ig內含子置放於啟動子序列之下游(3')，亦即，hAATΔATG之下游。

【0454】構築LBTP2 (骨-肝串聯啟動子)驅動之構築體，其包含圖34及38中所示之組分。LBTP2係設計且工程改造如下：全長Sp7/Osx啟動子(Lu, X.等人, JBC 281, 6297-6306, 2006年1月12日) (SEQ ID NO:23)在5'端側接肝特異性ApoE強化子/肝控制區，且在3'端側接ATG三核苷酸耗盡之hAAT啟動子(hAATΔATG)以驅動肝細胞特異性表現。將嵌合β-球蛋

白/Ig內含子置放於啟動子序列之下游(3')，亦即，hAATΔATG之下游。

【0455】 不希望受理論束縛，自下游啟動子去除ATG位點之串聯啟動子允許表現兩種mRNA轉錄物，取決於宿主細胞轉錄機構，每個啟動子驅動一種轉錄物之表現，然而，蛋白質轉譯起始將在卡匣中蛋白質編碼序列之單個預定起始密碼子處發生。相較於在蛋白質起始密碼子上游包含多餘ATG位點之串聯啟動子，此策略應提供更有效且更可靠之表現。

7.9 實例9. 用基於骨-肝串聯啟動子之構築體治療MPS IVA

【0456】 向呈現MPS IVA之個體投與足以在骨及肝中產生治療有效濃度之GALNS轉殖基因(例如GALNS、GALNSco或GALNSco/CpG-)產物之劑量的AAV8或AAV9，其包含如第7.8節實例8中所述之構築體，該構築體編碼該轉殖基因。投與係藉由非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、鼻內、鞘內或經皮投與進行。治療後，評價個體之疾病生物標誌物(諸如GAG、KS及C6S貯積)之減少及/或骨、軟骨、韌帶、半月板、心臟瓣膜、尿液及/或血清中hGALNS酶活性之增加。同時監測炎症徵象及其他安全事件。

7.10 實例10. 全長及最小Sp7/Osx啟動子驅動之構築體

【0457】 構築全長Sp7/Osx啟動子(骨特異性啟動子)驅動之構築體，其包含圖35中所示之組分。

【0458】 構築最小Sp7/Osx啟動子(骨特異性啟動子)驅動之構築體，其包含圖36中所示之組分。

7.11 實例11. 用基於全長或最小Sp7/Osx啟動子之構築體治療MPS IVA

【0459】 向呈現MPS IVA之個體投與足以在骨及肝中產生治療有效濃度之GALNS轉殖基因(例如GALNS、GALNSco或GALNSco/CpG-)產

物之劑量的AAV8或AAV9，其包含如第7.10節實例10中所述之構築體，該構築體編碼該轉殖基因。投與係藉由非經腸、皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、鼻內、鞘內或經皮投與進行。治療後，評價個體之疾病生物標誌物(諸如GAG、KS及C6S貯積)之減少及/或骨、軟骨、韌帶、半月板、心臟瓣膜、尿液及/或血清中hGALNS酶活性之增加。同時監測炎症徵象及其他安全事件。

7.12 實例12. MPS IVA KO小鼠中在不同表現系統下包裝有hGALNS之AAV載體

【0460】 目的：本研究之目的係展示經優化之啟動子構築體改善AAV基因療法用於莫爾丘A症候群之功效。

【0461】 動物：在所有組中使用相同數目的包括雄性及雌性小鼠在內之MPS IVA KO小鼠。在治療開始時，小鼠為約4週齡，具有一定體重，以約20 g劑量投與。GALNS基因剔除小鼠模型(KO：Galns-/-)係藉由靶向破壞GALNS基因而開發。此等小鼠在血液及組織中沒有可偵測之酶活性，並顯示主要在網狀內皮庫魯弗細胞、心臟瓣膜及心肌以及軟骨細胞(包括生長板及關節軟骨)內存在貯積材料積累。在第14天，藉由PCR對實驗組進行基因分型。在構成該研究之群體內的每一測試動物指定一個唯一的編號。該編號呈現於每個籠上可見之籠卡上。籠卡含有研究編號、群組、劑量及性別。為便利給藥及/或屍體剖檢，將動物分成數組。將唯一的測試動物編號用於原始數據記錄及試樣。

【0462】 來源、鑑別及儲存條件：測試物係純化的在不同啟動子元件控制下表現hGALNS之AAV載體。測試物係以冷凍等分試樣形式提供。測試物包括：1)媒劑；2) vimizim®(埃洛磺酶α)；3) AAV8-TBG-

hGALNScoV2 ； 4) AAV8-CAG-hGALNScoV2 ； 5) AAV8-LSPX1-hGALNScoV2 ； 6) AAV8-LMTP6-hGALNScoV2 ； 7) AAV8-LBTP2-hGALNScoV2 ； 8) AAV9-CAG-hGALNScoV2 ； 9) AAV9-LMTP6-hGALNScoV2 ； 10)AAV9-LBTP2-hGALNScoV2 ；及 11) AAV8-TBG-hGALNSco。

【0463】 給藥調配物之製備：測試物調配物係以即用型冷凍原液形式提供以在每個給藥日給予各組。在第一次解凍測試物時，將測試物等分成用於多次注射之數個小體積且附上適當標籤，並在-80℃下冷凍保存。關於給藥溶液之製備的計算如下：總GC/動物=劑量(GC/kg體重)×動物之體重；所需原液之總體積=總GC/動物/原液濃度(GC/mL)= x mL(其中x係所需進樣量)。在製備劑量時，該材料可在室溫下維持至多四小時。

表2.實驗設計

組	測試物	投與途徑	動物數目	濃度(GC/mL)	劑量體積	目標劑量(GC/kg)	目標劑量(GC/動物)	動物編號
1	媒劑	IV	6	TBD		NA	NA	G-至G-
2	Vimizim	IV	6	TBD		每週2 mg/kg	NA	G-至G-
3	AAV8-TBG-V2	IV	6	1.8E13		5E13	TBD	G-至G-
4	AAV8-CAG-V2	IV	6	TBD		5E13	TBD	G-至G-
5	AAV8-LSPX1-V2	IV	6	2.1E13		5E13	TBD	G-至G-
6	AAV8-LMTP6-V2	IV	6	2E13		5E13	TBD	G-至G-
7	AAV8-LBTP2-V2	IV	6	TBD		5E13	TBD	G-至G-
8	AAV9-CAG-V2	IV	6	TBD		5E13	TBD	G-至G-
9	AAV9-LMTP6-V2	IV	6	3.2E13		5E13	TBD	G-至G-
10	AAV8-LBTP2-V2	IV	6	TBD		5E13	TBD	G-至G-
11	AAV8-TBG	IV	6	3.8E13		5E13	TBD	G-至G-

【0464】 記錄體重及臨床觀察結果，並收集血液樣品進行生物分析。12週後，對動物實施安樂死，並收集選定的組織進行分子、生物分析

及組織病理學評價。

【0465】 研究程序：將納入本研究中之動物隨機分至各研究組中。當獲得KO動物且其對載體選擇並無任何偏向時，投與載體。

【0466】 劑量投與：所有動物皆接受單次IV劑量的其指定組特異性測試物。在劑量投與之當天，對所有動物稱重以確定要投與之病毒粒子的數目。所有組中之動物皆每兩週稱重一次，並自給藥第一天開始定期觀察其發病率及死亡率。在整個研究期間，定期記錄臨床徵象。觀察動物之臨床效果、疾病及/或死亡之徵象。

【0467】 樣品收集：每兩週自下頜下靜脈收集血液樣品(約100 μL)，並製備血漿樣品。使用血漿樣品測試酶活性以及GAG水準以確定AAV基因療法之功效。將樣品維持在-80℃待用。

【0468】 屍體剖檢：在投與測試物/媒劑後12週之後，對所有組中之動物實施安樂死。將在研究期間確定為垂死之任何動物處死，並儘可能收集樣品。屍體剖檢時，自所有動物收集血液樣品以製備血漿(自一半體積的個別樣品製備)及血清(自另一半體積之個別樣品製備)樣品，將其在-80℃下儲存。使用該等樣品偵測酶活性水準以及硫酸角質素含量。一式兩份收集所選組織樣品以分析組織酶活性、KS含量、載體拷貝數及基因表現。收集樣品，速凍並在-80℃儲存待用。使用諸如心臟、肝、骨骼肌(二頭肌、腓腸肌)、肺、腎臟、脾、氣管及膝蓋骨(kneecap)之類器官進行組織酶活性分析。使用諸如心臟、肝、肺、脾、氣管及膝蓋骨之類器官進行組織KS含量分析。使用心臟、肝、骨骼肌(二頭肌、腓腸肌)、肺、腎臟、脾、肘骨(armcap)、任何可用的骨/軟骨組織、性腺及腦進行載體生物分佈分析(gDNA-qPCR)。使用心臟、肝、骨骼肌(二頭肌、腓腸肌)、肺、

腎臟、脾、肘骨以及任何可用的骨/軟骨組織進行基因表現分析(RNA-qRT-PCR)。用福馬林固定膝關節-1、脛骨、前肢關節-2、心臟瓣膜及基部、肝、腦及脾以進行組織學分析。股骨用乙醇保存並用於顯微CT分析。

【0469】 分析：酶活性分析：藉由使用均質機，用均質化緩衝液將冷凍組織均質化，該均質化緩衝液由25 mmol/l Tris–HCl，pH 7.2，及1 mmol/l苯甲基磺醯基氟組成。將組織溶解產物或血漿與在0.1 M NaCl、0.1 M乙酸鈉pH 4.3中之22 mM 4-甲基繖形酮基-β-哌喃半乳糖苷-6-硫酸酯(Research Products International, Mount Prospect, IL, USA)在37℃下培育16小時。接著，將在0.1 M NaCl、0.1 M乙酸鈉pH 4.3中的10 mg/ml來自米曲霉(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)之β-半乳糖苷酶添加至反應樣品中，並在37℃下培育2小時。將樣品轉移至終止溶液(1 M甘胺酸、NaOH，pH 10.5)中，並在Perkin Elmer Victor X4讀板儀(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)上以366 nm激發波長及450 nm發射波長對該盤進行讀取。活性表示為每小時每微升血漿或每毫克蛋白質釋放的4-甲基繖形酮之奈莫耳數。藉由BCA蛋白質分析套組(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)測定蛋白質濃度。

【0470】 GAG(KS)之提取及KS含量之分析：簡言之，將切除之組織在液氮中冷凍，並使用均質機，用丙酮均質化。將獲得的粉末在離心機真空下乾燥。使脫脂之組織粉末懸浮於0.5 M NaOH中，並在50℃培育2小以自其核心蛋白中移出GAG鏈。用1 M HCl中和後，添加NaCl達到3M之最終濃度。接著，藉由離心移除不溶性材料，並用1 M HCl將上清液之pH值調至1.0以下。藉由離心移除沈澱之核苷酸，並用1M NaOH中和上清

液。藉由添加兩體積的含1.3%乙酸鉀之乙醇使粗GAG沈澱。離心後，將沈澱物溶解於蒸餾水中。

【0471】 GAG分析：藉由LC-MS/MS量測血液及組織之GAG水準。簡言之，將50 mM Tris-HCl (pH 7.0)及樣品裝載至在96孔接收盤上的96孔ω 10K過濾盤(Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)中。將樣品以2,500 g離心15分鐘。接著，將過濾盤轉移至新接收盤上，並將50 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 μg/mL作為內標(IS)之軟骨膠糖、1 mU肝素酶及1 mU角質酶II之混合液添加至過濾盤上。將樣品在37℃水浴中培育隔夜，且接著以2,500 g離心15分鐘。該設備由配備6460三重四極桿質譜儀之1290 Infinity LC系統(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)組成。在恆溫保持於60℃之Hypercarb管柱(2.0 mm內徑，50 mm長度；5 μm粒子；Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)上分離二醣。移動相係5 mM醋酸銨pH 11.0(溶液A)至100%乙腈(溶液B)之梯度溶析。流速為0.7 ml/min，且梯度如下：0分鐘100%溶液A、1分鐘70%溶液A、2分鐘70%溶液A、2.20分鐘0%溶液A、2.60分鐘0%溶液A、2.61分鐘100%溶液A、5分鐘100%溶液A。質譜儀係結合電噴霧電離以負離子模式操作(Agilent Jet Stream technology)。使用特定前體物及產物離子，m/z分別對各二醣進行定量(IS，354.3→193.1；單硫酸化KS，462→97；HS-0S，378.3→175.1)。進樣量為10 μL且每個樣品之操作時間為5分鐘。

【0472】 載體分佈分析：根據說明手冊，藉由使用Qiagen Puregene套組(Germantown, MD)，自選定之組織中純化出總基因體DNA。使用針對兔b-球蛋白(rBG)聚A之特異性引子及探針序列，對自小鼠之冷凍樣品提取的基因體DNA執行數位式PCR (dPCR)分析，該等引子及探針序列如

下：正向引子，5’-GCCAAAAATTATGGGGACAT-3’；反向引子，5’-ATTCCAACACACTATTGCAATG-3’；及探針，6FAM-ATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT-QSY。使用酶消化或M220聚焦超音波處理器(Covaris, Woburn, MA)測試未斷裂以及斷裂之基因體DNA。使用rBG TaqMan分析(經FAM標記)(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)對AAV載體進行定量dPCR分析。使用來自Thermo Fisher Scientific之Tfrc TaqMan®拷貝數參考分析(Copy Number Reference Assay)(經VIC®標記)進行Tfrc dPCR。用於此分析之儀器係QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K晶片套組v2: A26316(ThermoFisher Scientific)。PCR擴增譜分析係用ABI Geneamp 9700 PCR，即配備雙平板模塊之熱循環儀(Thermal Cycler w/ Dual Flat Blocks) (Applied Biosystems, Waltham, MA)進行如下：在96℃保持10分鐘；在60℃保持2分鐘且在98℃保持30秒，39個循環；在60℃保持2分鐘；最後保持10℃。PCR擴增後，在QuantStudio 3D儀器上讀取晶片以獲得對VIC及FAM通道呈陽性之孔的數目、無DNA之孔及空孔的數目。使用QuantStudio 3D Analysis Suite執行數據分析及晶片品質評估。使用Tfrc結果作為2個拷貝之參照，計算每個小鼠基因體中AAV之拷貝數。

【0473】組織病理學分析：使用在16週齡時，自MPS IVA及WT小鼠收集之膝關節及二尖瓣心臟瓣膜，藉由光學顯微鏡檢查評價貯積顆粒之含量。將組織固定於含2%三聚甲醛、4%戊二醛之PBS中，並在四氧化鋨中後固定且包埋於Spurr樹脂中。接著，檢查甲苯胺藍染色的0.5 μm厚之切片。為了評價股骨或脛骨生長板中之軟骨細胞大小(空泡化)，藉由Image J軟體分析在每隻小鼠中之增殖區域中的約300個軟骨細胞，且結果

表示相對於野生型組之倍數變化。

【0474】 顯微CT分析：在製備顯微CT樣品之前，預先解剖出股骨。接著，將股骨包裹在經生理鹽水(0.9%生理鹽水)潤濕之紗布中，並軸向堆疊於掃描小瓶中。每個掃描時期，一個小瓶中最多可堆疊三個。歸因於SkyScan 1275系統帶來的速度，對整個骨進行掃描且隨後，自完整掃描數據中裁剪出所關注之體積。

【0475】 掃描：根據表3中之設置，設定全部四個股骨樣品之掃描條件。在掃描期間，獲得2-D投影圖像。

表3.掃描設置

	十八個小鼠股骨	**描述**
像素大小：	8 μm	每個圖像切片中像素之大小
照相機設置：	高(1944 × 1536)	照相機之解析度(像素數)
濾光片：	1 mm鋁	移除低能X射線光譜以減小射束硬化之影響
電壓：	80 kV	X射線管之電壓
電流：	125 μA	X射線管之電流
旋轉步進值：	0.4°	在每個捕捉之圖像之間旋轉樣品之角度
幀平均：	6	在給定位置處獲取之圖像的數目且求平均值以減少噪音假影
掃描時間：	01:07:08 (HH:MM:SS)	掃描每個骨之總有效時間

【0476】 重建：調整與圖像品質相關之因素以製備各樣品之截面圖像進行3D容積繪製。表4顯示重建修正因數。

表4.重建因數

	值	**描述**
圖像格式：	BMP - 8位元	輸出之圖像文件格式

	值	描述
射束硬化：	20%	過濾出較低能量之X射線，因為該等射線穿過樣品，引起射束硬化，僅留下較高能量之X射線。此使得樣品邊緣變亮而中心變暗，即使樣品可能為均勻材料。可使用厚度均勻的濾光片或均質金屬(諸如鋁)之物理薄片來防止低能X射線到達樣品。除可能使用物理濾光片外，Bruker SkyScanNRecon軟體還使用迭代重建演算法修正射束硬化，該演算法將整個樣品中之衰減平均化。
動態範圍：	0.0 - 0.05	將浮點值轉換為8數位灰階值

【0477】 定量分析：形態分析係在Bruker CTAn軟體(v1.18.8.0)中執行。皮質及小梁骨之關注體積(Volumes of interest，VOI)保持相同，除非各骨之間的物理差異不同。報告的標準輸出變量與Journal of Bone & Mineral Research (Bouxsein等人, 2010)之指導方針一致。

【0478】 小梁骨VOI：先使用遠端骨骺板鑑別小梁骨之VOI。自此共同的標記開始，起點為近端250 μm且接著延伸2.5 mm。使用自動化方案界定每個切片中的關注區域以使其包括距內膜皮質壁一定均勻距離(通常為約1 mm)。盡力避免在ROI中包括生長板。

【0479】 皮質骨VOI：基於遠端骨骺板起始標記及在近端大轉子之最高點，確定所關注之皮質骨量。在該兩個解剖特徵之間，獲得骨的總長度。骨的總長度乘以55%，得到一個起始位置，該起始位置距離近端轉子略大於一半長度。將低於此起點總計0.5 mm捕捉為VOI。關注區域包括整個皮質骨，並執行後處理以移除可能存在的任何小梁(圖39)。

表5.分析設置

	值	描述
臨限值(小梁骨)	85/255	測定標識手動繪製之ROI內之所有小梁骨的灰階

	值	描述
		標度值。共有256個灰階值，範圍自0-255，其中0係全白，而255係全黑。在此分析中，小梁骨由白色標識且平均臨限值為 85。亦對灰階標度圖像執行視覺比較檢查以確保臨限值之準確性。該臨限值係以在整個研究中評估之一部分樣品的平均值確定。
臨限值(皮質骨)	98/255	與上述類似。

8. 序列表

SEQ ID NO.	描述	序列
1	AAV8殼體蛋白	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKA NQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAAD AAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQER LQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTA PGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQ TGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPM ADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRT WALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPW GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKL FNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPY VLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYA HSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTGGTANTQTLG FSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNN NSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEE RFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEEIKTT NPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGM VWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGL KHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQ VSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFA VNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
2	人GALNS(hGALNS)	atggcggcggttgtcgcggcgacgaggtggtggcagctgttgctggtgctcagcg ccgcggggatgggggcctcgggcgccccgcagccccccaacatcctgctcctgc tcatggacgacatgggatggggtgacctcggggtgtatggagagccctccagaga gaccccgaatttggaccggatggctgcagaagggctgcttttcccaaacttctattct gccaaccctctgtgctcgccatcgagggcggcactgctcacaggacggctaccca tccgcaatggcttctacaccaccaacgcccatgccagaaacgcctacacaccgca ggagattgtgggcggcatcccagactcggagcagctcctgccggagcttctgaag aaggccggctacgtcagcaagattgtcggcaagtggcatctgggtcacaggcccc

SEQ ID NO.	描述	序列
		agttccacccccctgaagcacggatttgatgagtggtttggatccccccaactgccactt tggaccttatgacaacaaggccaggcccaacatccctgtgtacagggactgggag atggttggcagatattatgaagaatttcctattaatctgaagacgggggaagccaac ctcacccagatctacctgcaggaagccctggacttcattaagagacaggcacggc accacccctttttcctctactgggctgtcgacgccacgcacgcacccgtctatgcctc caaacccttcttgggcaccagtcagcgagggcggtatggagacgccgtccggga gattgatgacagcattgggaagatactggagctcctccaagacctgcacgtcgcgg acaacaccttcgtcttcttcacgtcggacaacggcgctgccctcatttccgcccccg aacaaggtggcagcaacggcccctttctgtgtgggaagcagaccacgtttgaagg agggatgagggagcctgccctcgcatggtggccagggcacgtcactgcaggcca ggtgagccaccagctgggcagcatcatggacctcttcaccaccagcctggcccctt gcgggcctgacgccgcccagcgacagggccattgatggcctcaacctcctcccc accctcctgcagggccggctgatggacaggcctatcttctattaccgtggcgacac gctgatggcggccaccctcgggcagcacaaggctcacttctggacctggaccaac tcctgggagaacttcagacagggcattgatttctgccctgggcagaacgtttcaggg gtcacaactcacaatctggaagaccacacgaagctgcccctgatcttccacctggg acgggacccaggggagaggttccccctcagctttgccagcgccgagtaccagga ggccctcagcaggatcacctcggtcgtccagcagcaccaggaggccttggtcccc gcgcagccccagctcaacgtgtgcaactgggcggtcatgaactgggcacctccg ggctgtgaaaagttagggaagtgtctgacacctccagaatccattcccaagaagtg cctctggtcccactag
3	hGALNSco(經密碼子優化)	atggctgctgttgttgccgctaccagatggtggcagctgctgctggttctgtctgccg ctggaatgggagcttctggtgctccccagcctcctaacattctgctgctgctcatgga cgacatgggctggggcgatctgggagtgtatggcgagcctagcagagagacacc caacctggatagaatggccgccgagggcctgctgttccccaatttctacagcgcca atcctctgtgcagcccctctagagctgctctgctgacaggcagactgcccatcaga aacggcttctacaccaccaacgctcacgcccggaatgcctacacaccccaagaga tcgttggcggcatccccgattctgagcagctcctgcctgagctgctgaagaaggcc ggctacgtcagcaagatcgtcggcaaatggcacctgggccacagacctcagtttc accctctgaagcacggcttcgacgagtggttcggcagccccaattgtcacttcggc ccctacgacaacaaggccagacctaacatccccgtgtacagagactgggagatg gtcggacggtactacgaggaattccccatcaacctgaaaaccggcgaggccaatc tgacccagatctacctgcaagaggccctggacttcatcaagcggcaggccagaca ccatcctttctttctgtactgggccgtcgacgccacacacgcccctgtgtatgccagc aagccttttctgggcaccagccagcgtggcagatatggcgacgccgtgcgggaaa tcgatgacagcatcggcaagatcctggaactgctgcaggatctgcacgtggccga caacaccttcgtgttcttcaccagcgacaacggcgctgccctgatttctgctcctgag caaggcggcagcaacggcccatttctgtgtggcaagcagaccacctttgaaggcg gcatgagagagcctgctctggcttggtggcctggacatgtgacagccggacaagt gtctcaccagctgggcagcatcatggacctgtttaccacctctctggccctggccgg actgacacctccatctgatagagccatcgacggcctgaacctgctgcctacactgct tcagggcagactgatggacagacccatcttctactaccggggcgacaccctgatg

SEQ ID NO.	描述	序列
		gccgctacactgggacagcacaaggcccacttttggacctggaccaacagctggg agaacttccggcagggcatcgacttttgccctggccagaatgtgtccggcgtgacc acacacaatctggaagatcacaccaagctgcccctgatctttcacctgggcagaga tcccggcgagagattccctctgtcttttgccagcgccgagtaccaagaagccctga gcagaatcacctccgtggtgcagcagcaccaagaggctctggttccagctcagcc ccagctgaacgtgtgtaattgggccgtgatgaactgggcccctcctggatgtgaaa agctgggcaagtgtctgaccctcctgagagcatccccaagaaatgcctgtggtcc cactga
4	D8-hGALNS	accgccatgcggggtccgagcggggctctgtggctgctcctggctctgcgcaccg tgctcggatcagatgatgatgatgatgatgatgatgccgaggcagaaaccggtgcc ccgcagccccccaacatcctgctcctgctcatggacgacatgggatggggtgacc tcggggtgtatggagagccctccagagagaccccgaatttggaccggatggctgc agaagggctgcttttcccaaacttctattctgccaaccctctgtgctcgccatcgagg gcggcactgctcacaggacggctacccatccgcaatggcttctacaccaccaacg cccatgccagaaacgcctacacaccgcaggagattgtgggcggcatcccagact cggagcagctcctgccggagcttctgaagaaggccggctacgtcagcaagattgt cggcaagtggcatctgggtcacaggccccagttccacccccctgaagcacggattt gatgagtggtttggatcccccaactgccactttggaccttatgacaacaaggccagg cccaacatccctgtgtacagggactgggagatggttggcagatattatgaagaattt cctattaatctgaagacgggggaagccaacctcacccagatctacctgcaggaag ccctggacttcattaagagacaggcacggcaccacccctttttcctctactgggctgt cgacgccacgcacgcacccgtctatgcctccaaacccttcttgggcaccagtcagc gagggcggtatggagacgccgtccgggagattgatgacagcattgggaagatact ggagctcctccaagacctgcacgtcgcggacaacaccttcgtcttcttcacgtcgg acaacggcgctgccctcatttccgcccccgaacaaggtggcagcaacggcccctt tctgtgtgggaagcagaccacgtttgaaggagggatgagggagcctgccctcgca tggtggccagggcacgtcactgcaggccaggtgagccaccagctgggcagcatc atggacctcttcaccaccagcctggcccttgcgggcctgacgccgcccagcgaca gggccattgatggcctcaacctcctccccacccctcctgcagggccggctgatgga caggcctatcttctattaccgtggcgacacgctgatggcggccaccctcgggcagc acaaggctcacttctggacctggaccaactcctgggagaacttcagacagggcatt gatttctgccctgggcagaacgtttcaggggtcacaactcacaatctggaagacca cacgaagctgcccctgatcttccacctgggacgggacccaggggagaggttccc cctcagctttgccagcgccgagtaccaggaggccctcagcaggatcacctcggtc gtccagcagcaccaggaggccttggtccccgcgcagccccagctcaacgtgtgc aactgggcggtcatgaactgggcacctccgggctgtgaaaagttagggaagtgtct gacacctccagaatccattcccaagaagtgcctctggtcccactagctcga
5	D8-GALNSco(經密碼子優化)	atgagaggaccatctggtgctctgtggctgctgctggctctgagaacagtgctggg cagcgacgacgatgatgacgatgacgacgccgaggctgaaacaggtgctcccca gcctcctaacatcctgctgctgctcatggacgatatgggctggggcgatctgggag tgtatggcgagcctagcagagagacacccaacctggatagaatggccgccgagg

SEQ ID NO.	描述	序列
		gcctgctgttccccaatttctacagcgccaatcctctgtgcagcccctctagagctgc tctgctgacaggcagactgcccatcagaaacggcttctacaccaccaacgctcacg cccggaatgcctacacaccccaagagatcgttggcggcatccccgattctgaaca gctgctgcctgagctgctgaagaaggccggctacgtcagcaagatcgtcggcaaa tggcacctgggccacagacctcagtttcaccctctgaagcacggcttcgacgagtg gttcggcagccccaattgtcacttcggcccctacgacaacaaggccagaccaaac atccccgtgtacagagactgggagatggtcggacggtactacgaggaattccccat caacctgaaaaccggcgaggccaatctgacccagatctacctgcaagaggccctg gacttcatcaagcggcaggccagacaccatcctttctttctgtactgggccgtcgac gccacacacgcccctgtgtatgccagcaagccttttctgggcaccagccagcgtg gcagatatggcgacgccgtgcgggaaatcgatgacagcatcggcaagatcctgg aactgctgcaggatctgcacgtggccgacaacaccttcgtgttcttcaccagcgac aacggcgctgccctgatttctgctcctgagcaaggcggcagcaacggcccatttct gtgtggcaagcagaccacctttgaaggcggcatgagagagcctgctctggcttggt ggcctggacatgtgacagccggacaagtgtctcaccagctgggctccatcatgga cctgtttaccacctctctggccctggccggactgacacctccatctgatagagccat cgacggcctgaacctgctgcctacactgcttcagggcagactgatggacagaccc atcttctactaccggggcgacaccctgatggccgctacactgggacagcacaagg cccacttttggacctggaccaacagctgggagaacttccggcagggcatcgacttttt gccctggccagaatgtgtccggcgtgaccacacacaatctggaagatcacaccaa gctgcccctgatctttcacctgggcagagatcccggcgagagattccctctgtctttt gccagcgccgagtaccaagaagccctgagcagaatcaccagcgtggtgcagca gcaccaagaggctctggttccagctcagccccagctgaacgtgtgtaattgggccg tgatgaactgggcccctcctggatgtgaaaagctgggcaagtgtctgacccctcct gagagcatccccaagaaatgcctgtggtcccactga
6	TBG啟動子	gggctggaagctacctttgacatcatttcctctgcgaatgcatgtataatttctacaga acctattagaaaggatcacccagcctctgcttttgtacaactttcccttaaaaaactgc caattccactgctgtttggcccaatagtgagaacttttttcctgctgcctcttggtgctttt gcctatggcccctattctgcctgctgaagacactcttgccagcatggacttaaaccc ctccagctctgacaatcctctttctcttttgttttacatgaagggtctggcagccaaagc aatcactcaaagttcaaaccttatcatttttttgctttgttcctcttggccttggttttgtaca tcagctttgaaaataccatcccagggttaatgctggggttaatttataactaagagtgc tctagttttgcaatacaggacatgctataaaaatggaaagat
7	5' ITR	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggc gacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtgg ccaactccatcactaggggttcct
8	3' ITR	aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactg aggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctca gtgagcgagcgagcgcgcag
9	兔球蛋白聚A	gatcttttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgac ttctggctaataaaggaaatttatttttcattgcaatagtgtgttggaatttttttgtgtctctc

SEQ ID NO.	描述	序列
		actcg
10	β-球蛋白/Ig內含子(嵌合內含子)	gtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgtcgagacagagaagactcttgcgtttctgataggcacctattggtcttactgacatccacttttgcctttctctccacag
11	α mic/bik強化子	aggttaatttttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactctctctgtttgctctggttaataatctcaggagcacaaacattcc
12	GALNS(經密碼子優化且CpG耗盡)	ATGGCTGCTGTGGTGGCTGCTACAAGATGGTGGCAACTGCTGCTGGTGCTGTCTGCAGCTGGAATGGGAGCTTCTGGTGCCCCTCAGCCTCCTAATATCCTGCTGCTGCTGATGGATGACATGGGCTGGGGAGATCTGGGAGTGTATGGGGAGCCTAGCAGAGAGACACCCAACCTGGATAGAATGGCTGCAGAGGGCCTGCTGTTCCCCAACTTCTACTCTGCCAATCCTCTGTGCAGCCCCTCTAGAGCTGCACTGCTTACAGGCAGACTGCCCATCAGAAATGGCTTCTACACCACAAATGCCCATGCCAGAAATGCCTACACACCCCAAGAGATAGTTGGAGGCATCCCTGACTCTGAACAGCTGCTGCCTGAGCTGCTGAAGAAAGCTGGCTATGTGTCCAAGATAGTTGGCAAGTGGCACCTGGGCCACAGACCTCAGTTTCACCCTCTGAAACATGGCTTTGATGAGTGGTTTGGCAGCCCCAACTGCCACTTTGGCCCCTATGATAACAAGGCCAGACCTAACATCCCTGTGTACAGAGACTGGGAGATGGTTGGAAGGTACTATGAAGAGTTCCCCATCAACCTGAAAACAGGGGAAGCCAATCTGACCCAGATCTACCTGCAAGAGGCCCTGGACTTCATCAAGAGACAGGCCAGACACCATCCTTTCTTTCTGTACTGGGCTGTTGATGCCACACATGCCCCTGTGTATGCCAGCAAGCCTTTTCTGGGCACCAGCCAGAGGGGCAGATATGGGGATGCTGTCAGAGAAATTGATGACAGCATTGGCAAGATCCTGGAACTGCTGCAGGACCTGCATGTGGCTGACAACACCTTTGTGTTCTTCACCTCTGACAATGGGGCAGCCCTGATCTCTGCCCCTGAGCAAGGTGGCAGCAATGGCCCATTTCTGTGTGGCAAGCAGACCACCTTTGAAGGTGGCATGAGAGAGCCTGCTCTGGCCTGGTGGCCTGGACATGTTACAGCTGGACAAGTGTCTCACCAGCTGGGCAGCATCATGGACCTGTTTACCACATCTCTGGCCCTGGCTGGACTGACCCCTCCATCTGATAGAGCCATTGATGGCCTGAACCTGCTGCCTACACTTCTGCAGGGCAGACTGATGGACAGACCCATCTTCTACTACAGAGGTGACACCCTGATGGCTGCCACACT

SEQ ID NO.	描述	序列
		GGGACAGCACAAGGCCCACTTTTGGACCTGGACC AACAGCTGGGAGAACTTCAGACAGGGCATTGATT TCTGCCCTGGCCAGAATGTGTCTGGGGTCACCACT CACAACCTGGAAGATCACACCAAGCTGCCCCTCAT CTTCCACCTGGGAAGAGATCCTGGGGAGAGATTCC CTCTGAGCTTTGCCTCTGCTGAGTACCAAGAAGCC CTGAGCAGAATCACATCTGTGGTGCAGCAGCATCA AGAGGCTCTGGTTCCAGCTCAGCCCCAGCTGAATG TGTGCAACTGGGCAGTGATGAATTGGGCCCCACCT GGCTGTGAAAAGCTGGGCAAATGTCTGACCCCAC CTGAGAGCATCCCTAAAAAGTGCCTGTGGTCCCAC TGA
13	LSPX1啟動子	AGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGT GGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCAGATCC AGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGT GGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCAGATCC GGCGCGCCAGGGCTGGAAGCTACCTTTGTCTAGAA GGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCACCC TGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCAGC AGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACTGA ACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGGGC AAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACAGC CCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAGAG GTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCAAC ATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAGGA GCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGTGA GAGGGGTACCCGGGGATCTTGCTACCAGTGGAAC AGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGC CAGCTAAGTGGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACT CACGCCACCCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTG TGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTCGGT AAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAA GCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCC CAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGA TAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAG CCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAAT ACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCA GGCACCACCACTGACCTGGGACAGT

SEQ ID NO.	描述	序列
14	LSPX2啟動子	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCAC CCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCA GCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACT GAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGG GCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACA GCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAG AGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCA ACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAG GAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGT GAGAGGGTCTAGAAGGCTCAGAGGCACACAGGAG TTTCTGGGCTCACCCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAG TTCCCATCCTCCAGCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCT GAAGTCCACACTGAACAAACTTCAGCCTACTCATG TCCCTAAAATGGGCAAACATTGCAAGCAGCAAAC AGCAAACACACAGCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTG GAGCTGGGGCAGAGGTCAGAGACCTCTCTGGGCC CATGCCACCTCCAACATCCACTCGACCCCTTGGAA TTTCGGTGGAGAGGAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTG GTTTAGGTAGTGTGAGAGGGGTACCCGGGGATCTT GCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGT GAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCA GAGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTG GACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACA ATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTAC ACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCG GGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCT GTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTA ATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGG ATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCC TGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGG GACAGT
15	LTP1啟動子	AGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGT GGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCAGATCC AGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGT GGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTG GTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCAGATCC GGCGCGCCAGGGCTGGAAGCTACCTTTGACATCAT TTCCTCTGCGAATGCATGTATAATTTCTACAGAAC CTATTAGAAAGGATCACCCAGCCTCTGCTTTTGTA CAACTTTCCCTTAAAAAACTGCCAATTCCACTGCT

SEQ ID NO.	描述	序列
		GTTTGGCCCAATAGTGAGAACTTTTTCCTGCTGCC TCTTGGTGCTTTTGCCTATGGCCCCTATTCTGCCTG CTGAAGACACTCTTGCCAGCATGGACTTAAACCCC TCCAGCTCTGACAATCCTCTTTCTCTTTTGTTTTAC ATGAAGGGTCTGGCAGCCAAAGCAATCACTCAAA GTTCAAACCTTATCATTTTTTGCTTTGTTCCTCTTG GCCTTGGTTTTGTACATCAGCTTTGAAAATACCAT CCCAGGGTTAATGCTGGGGTTAATTTATAACTAAG AGTGCTCTAGTTTTGCAATACAGGACATGCTATAA AAATGGAAAGATGTTGCTTTCTGAGAGGATCTTGC TACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTG AGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCCAG AGACTGTCTGACTCACGCCACCCCCTCCACCTTGG ACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAGT GACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACAC TGCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGG CGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGT TTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAAT ATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCCTCTGGAT CCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTG TCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGA CAGT
16	LMTP6啟動子	AGGCTCAGAGGCACACAGGAGTTTCTGGGCTCAC CCTGCCCCCTTCCAACCCCTCAGTTCCCATCCTCCA GCAGCTGTTTGTGTGCTGCCTCTGAAGTCCACACT GAACAAACTTCAGCCTACTCATGTCCCTAAAATGG GCAAACATTGCAAGCAGCAAACAGCAAACACACA GCCCTCCCTGCCTGCTGACCTTGGAGCTGGGGCAG AGGTCAGAGACCTCTCTGGGCCCATGCCACCTCCA ACATCCACTCGACCCCTTGGAATTTCGGTGGAGAG GAGCAGAGGTTGTCCTGGCGTGGTTTAGGTAGTGT GAGAGGGCCACTACGGGTTTAGGCTGCCCATGTA AGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTG GTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCCCCCCC CCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTG TCCCTGGTGGATCCCACTACGGGTTTAGGCTGCCC ATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGAT GCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCCC CCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAA CCCTGTCCCTGGTGGATCCCACTACGGGTTTAGGC TGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCC

SEQ ID NO.	描述	序列
		GAGATGCCTGGTTATAATTAACCCAGACATGTGGC TGCCCCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAA AATAACCCTGTCCCTGGTGGATCCCCTGCATGCGA AGATCTTCGAACAAGGCTGTGGGGGACTGAGGGC AGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATAC GTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCATGT TCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAG ACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTC AGCCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCATGGGGC TGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCA CGGTGCCCGGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCT CTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGG CTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCA GGGGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCACCACCT CCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAG CGTCGAGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAA GGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGT GGTACTCTCCCAGAGACTGTCTGACTCACGCCACC CCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTG AGCCAGGTACAGTGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGT GGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAAGCGTCCGGG CAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTG GACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGG TGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCG TTGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA GGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCAC CACTGACCTGGGACAGT
17	LBTP1啟動子	aggttaatttttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactctct ctgtttgctctggttaataatctcaggagcacaaacattccagatccaggttaattttta aaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactctctctgtttgctctg gttaataatctcaggagcacaaacattccagatccggcgcgccagggctggaagc tacctttgtctagaaggctcagaggcacacaggagtttctgggctcaccctgccccc ttccaacccctcagttcccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccac actgaacaaacttcagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagca aacagcaaacacacagccctccctgcctgctgaccttggagctggggcagaggtc agagacctctctgggcccatgccacctccaacatccactcgacccctttggaatttcg gtggagaggagcagaggttgtcctggcgtggtttaggtagtgtgagaggggtacc cggggatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagag ggccagctaagtggtactctcccagagactgtctgactcacgccacccctccacc ttggacacaggacgctgtggtttctgagccaggtacaatgactcctttcggtaagtg cagtggaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcg

SEQ ID NO.	描述	序列
		actcagatcccagccagtggacttagcccctgtttgctcctccgataactggggtga ccttggttaatattcaccagcagcctcccccgttgcccctctggatccactgcttaaat acggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctggg acagt
18	LBTP2啟動子	aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcaccctgcccccttccaaccctca gttcccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaactt cagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaaca cacagccctccctgcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctct gggcccatgccacctccaacatccactcgacccccttggaatttcggtggagagga gcagaggttgtcctggcgtggtttaggtagtgtgagagggcacacatacacgaaca cacatacatatacatacattcacatatatgcacacacatacacatatacacgcataca cgtacacacaaatgcacactcacacatgcacacacatacataatatacacactctca cacatgcacatacacacatacatacacatacatgtgcatgcacacacacaaataca catgcatacatccacattcacacagatgcagacacaaatgcacacacacacacaca cacacacacacacacacacacacacacacgcacactgccaccctgaactagtggtg gctaaatgaacaataagtctccatcaccagcttgggggggaggtaggtggtagtgta ggtgcccccattgtgtgatcatgttcattgtatgagtttgtctgtgttcattcatcatagt gacagtccccatgtgggtagcagagagtacgtgtgcatgcatcatctccgtgtttgc tcatgagtgtgtatgtcagtgtgttccagtctttctgtgtgagtgtcgtccccaatcccc catccccccccccagatctctaattagtggtttggggtttgttccttttccctcctgttcc tttcctcagcagcgcggcagcagcggcggcagcctcggtggtagcagcagcagc agcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcaacagaagctgccgcg ccgctgagtagcagcaaggactccgagtcaagagtaggattgtaggattggatctg agtgggaacaagagtgagctggcctgagagaggagcagatgcctcccagcgcc ctcaggccacccattgccagtaatcttcaagccagacctcttgagaggagacggga cagccaaccctagcctacccaggtacagacactgggcagttctgggggactgccc acagatgcctattggattcctggggtatgtaggactcccgggtctaccagccctttc acctttccccatagcacccccaaggaagctctgacaacttgcccatattcctgtttcc cacccgtcccctgggcaccccctttcttctctccctcccagatcccttctttggggag ctcagcaaatggagcaggaaatttggaccctctgcctccctctctcgccttcctcatt ggatccggagtcttctccgctgggaaagctgtaattagagggtggatccctacaga cagagagcagccccccccacccccacccccagtcccttctaactttagatctcttct ctcccattctcccattctccctccctctcccttctccctctcccactggctcctcggttct ctccatctgcctgactccttgggacccggtccccagatcttgctaccagtggaacag ccactaaggattctgcagtgagagcagagggccagctaagtggtactctcccaga gactgtctgactcacgccacccccctccaccttggacacaggacgctgtggtttctga gccaggtacagtgactcctttcggtaagtgcagtggaagctgtacactgcccaggc aaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactcagatcccagccagtggacttagc ccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttggttaatattcaccagcagcctcc cccgttgcccctctggatccactgcttaaatacggacgaggacagggccctgtctc ctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacagt

SEQ ID NO.	描述	序列
19	含ApoE強化子之ApoE肝控制區	aggctcagaggcacacaggagtttctgggctcaccctgccccttccaacccctca gttcccatcctccagcagctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaacttt cagcctactcatgtccctaaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaaca cacagccctccctgcctgctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctct gggcccatgccacctccaacatccactcgacccccttggaatttcggtggagagga gcagaggttgtcctggcgtggtttaggtagtgtgagaggg
20	ApoE強化子	gctgtttgtgtgctgcctctgaagtccacactgaacaaacttcagcctactcatgtccc taaaatgggcaaacattgcaagcagcaaacagcaaacacacagccctccctgcct gctgaccttggagctggggcagaggtcagagacctctctg
21	hAAT啟動子(帶下劃線：自atg變為gtg)	gatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggcc agctaagtggtactctcccagagactgtctgactcacgccacccccctccaccttgga cacaggacgctgtggtttctgagccaggtacaatgactcctttcggtaagtgcagtg gaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactca gatcccagccagtggacttagcccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttg gttaatattcaccagcagcctcccccgttgcccctctggatccactgcttaaatacgg acgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacag t
22	hAAT(ΔATG)啟動子(帶下劃線：自atg變為gtg)	gatcttgctaccagtggaacagccactaaggattctgcagtgagagcagagggcc agctaagtggtactctcccagagactgtctgactcacgccacccccctccaccttgga cacaggacgctgtggtttctgagccaggtacagtgactcctttcggtaagtgcagtg gaagctgtacactgcccaggcaaagcgtccgggcagcgtaggcgggcgactca gatcccagccagtggacttagcccctgtttgctcctccgataactggggtgaccttg gttaatattcaccagcagcctcccccgttgcccctctggatccactgcttaaatacgg acgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacag t
23	Sp7/Osx	cacacatacacgaacacacatacatatacatacattcacatatatgcacacacatac acatatacacgcatacacgtacacacaaatgcacactcacacatgcacacacatac ataatatacacactctcacacatgcacatacacacatacatacacatacatgtgcatg cacacacacaaatacacatgcatacatccacattcacacagatgcagacacaaatg cacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacgcacactgcca ccctgaactagtggtggctaaatgaacaataagtctccatcaccagcttgggggga ggtaggtggtagtgtaggtgcccccattgtgtgatcatgttcattgtatgagtttgtctg tgttcattcatcatagtgacagtccccatgtgggtagcagagagtacgtgtgcatgca tcatctccgtgtttgctcatgagtgtgtatgtcagtgtgttccagtctttctgtgtgagtgt cgtccccaatcccccatcccccccccccagatctctaattagtggtttggggtttgttcc ttttccctcctgttcctttcctcagcagcgcggcagcagcggcggcagcctcggtgg tagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcaac agaagctgccgcgccgctgagtagcagcaaggactccgagtcaagagtaggatt gtaggattggatctgagtgggaacaagagtgagctggcctgagagaggagcaga tgcctcccagcgccctcaggccacccattgccagtaatcttcaagccagacctcttg

SEQ ID NO.	描述	序列
		agaggagacgggacagccaaccctagcctacccaggtacagacactgggcagtt ctgggggactgcccacagatgcctattggattcctggggtatgtaggactcccggg tctaccagccctttcacctttccccatagcacccccaaggaagctctgacaacttgc ccatattcctgtttcccacccgtcccctgggcacccccttttcttctctccctcccagat cccttctttggggagctcagcaaatggagcaggaaatttggaccctctgcctccctc tctcgccttcctcattggatccggagtcttctccgctgggaaagctgtaattagaggg tggatccctacagacagagagcagccccccccacccccacccccccagtcccttcta actttagatctcttctctcccattctcccattctccctccctctcccttctccctctcccac tggctcctcggttctctccatctgcctgactccttgggacccggtcccca
24	最小 Sp7/Osx	cgcggcagcagcggcggcagcctcggtggtagcagcagcagcagcagcagca gcagcagcagcagcagcagcagcagcaacagaagctgccgcgccgctgagta gcagcaaggactccgagtcaagagtaggattgtaggattggatctgagtgggaac aagagtgagctggcctgagagaggagcagatgcctcccagcgccctcaggccac ccattgccagtaatcttcaagccagacctcttgagaggagacgggacagccaacc ctagcctacccaggtacagacactgggcagttctgggggactgcccacagatgcc tattggattcctggggtatgtaggactcccgggtctaccagccctttcacctttcccc atagcacccccaaggaagctctgacaacttgcccatattcctgtttcccacccgtcc cctgggcacccccttttcttctctccctcccagatcccttctttggggagctcagcaaa tggagcaggaaatttggaccctctgcctccctctctcgccttcctcattggatccgga gtcttctccgctgggaaagctgtaattagagggtggatccctacagacagagagca gcccccccacccccacccccccagtcccttctaactttagatctcttctctcccattctc ccattctccctccctctcccttctccctctcccactggctcctcggttctctccatctgc ctgactccttgggacccggtcccca
25	β-球蛋白聚腺苷酸化信號	aataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctctca
26	AAV9殼體蛋白	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKA NQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAA DAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQE RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKT APGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFG QTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPV ADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRT WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWG YFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLF NIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPY VLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVG RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYA HSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFS VAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFF

SEQ ID NO.	描述	序列
		PLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPV ATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMV WQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMK HPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQV SVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAV NTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
27	hGALNScoV2	ATGGCTGCTGTGGTGGCTGCTACAAGATGGTGGCA ACTGCTGCTGGTGCTGTCTGCAGCTGGAATGGGAG CTTCTGGTGCCCCTCAGCCTCCTAATATCCTGCTGC TGCTGATGGATGACATGGGCTGGGGAGATCTGGG AGTGTATGGGGAGCCTAGCAGAGAGACACCCAAC CTGGATAGAATGGCTGCAGAGGGCCTGCTGTTCCC CAACTTCTACTCTGCCAATCCTCTGTGCAGCCCCTC TAGAGCTGCACTGCTTACAGGCAGACTGCCCATCA GAAATGGCTTCTACACCACAAATGCCCATGCCAGA AATGCCTACACACCCCAAGAGATAGTTGGAGGCA TCCCTGACTCTGAACAGCTGCTGCCTGAGCTGCTG AAGAAAGCTGGCTATGTGTCCAAGATAGTTGGCA AGTGGCACCTGGGCCACAGACCTCAGTTTCACCCT CTGAAACATGGCTTTGATGAGTGGTTTGGCAGCCC CAACTGCCACTTTGGCCCCTATGATAACAAGGCCA GACCTAACATCCCTGTGTACAGAGACTGGGAGAT GGTTGGAAGGTACTATGAAGAGTTCCCCATCAACC TGAAAACAGGGGAAGCCAATCTGACCCAGATCTA CCTGCAAGAGGCCCTGGACTTCATCAAGAGACAG GCCAGACACCATCCTTTCTTTCTGTACTGGGCTGTT GATGCCACACATGCCCCTGTGTATGCCAGCAAGCC TTTTCTGGGCACCAGCCAGAGGGGCAGATATGGG GATGCTGTCAGAGAAATTGATGACAGCATTGGCA AGATCCTGGAACTGCTGCAGGACCTGCATGTGGCT GACAACACCTTTGTGTTCTTCACCTCTGACAATGG GGCAGCCCTGATCTCTGCCCCTGAGCAAGGTGGCA GCAATGGCCCATTTCTGTGTGGCAAGCAGACCACC TTTGAAGGTGGCATGAGAGAGCCTGCTCTGGCCTG GTGGCCTGGACATGTTACAGCTGGACAAGTGTCTC ACCAGCTGGGCAGCATCATGGACCTGTTTACCACA TCTCTGGCCCTGGCTGGACTGACCCCTCCATCTGA TAGAGCCATTGATGGCCTGAACCTGCTGCCTACAC TTCTGCAGGGCAGACTGATGGACAGACCCATCTTC TACTACAGAGGTGACACCCTGATGGCTGCCACACT GGGACAGCACAAGGCCCACTTTTGGACCTGGACC AACAGCTGGGAGAACTTCAGACAGGGCATTGATT

SEQ ID NO.	描述	序列
		TCTGCCCTGGCCAGAATGTGTCTGGGGTCACCACT CACAACCTGGAAGATCACACCAAGCTGCCCCTCAT CTTCCACCTGGGAAGAGATCCTGGGGAGAGATTCC CTCTGAGCTTTGCCTCTGCTGAGTACCAAGAAGCC CTGAGCAGAATCACATCTGTGGTGCAGCAGCATCA AGAGGCTCTGGTTCCAGCTCAGCCCCAGCTGAATG TGTGCAACTGGGCAGTGATGAATTGGGCCCCACCT GGCTGTGAAAAGCTGGGCAAATGTCTGACCCCAC CTGAGAGCATCCCTAAAAAGTGCCTGTGGTCCCAC TGA
28	CAG啟動子	gacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcc catatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgc ccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaa tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggc agtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaa atggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcag tacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtcgaggtgagccccacgttctgctt cactctcccatctccccccctcccacccccaattttgtatttatttatttttttaattattt tgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggcgcgcgccaggcggggc ggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcag ccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcg gcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgcgctgcc ttcgccccgtgccccgctccgccgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgact gaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt aattagcgcttggtttaatgacggcttgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttgag gggctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgt gtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgctgcccggcggctgtga gcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgagggga gcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggggctgcgaggggaaca aaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggggtgtgggcgcg tcggtcgggctgcaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcc cggcttcgggtgcggggctccgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgccg ggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctcgg gccggggagggctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcgg ctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagg gcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatctgggaggcgcc gccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccggcaggaa ggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccttctccct ctccagcctcggggctgtccgcgggggggacggctgccttcgggggggacggggg cagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaac catgttcatgccttcttcttttttcctacag

9. 等效物及以引用之方式併入

【0480】 儘管參照本發明之具體實施例對本發明進行詳細描述，但應理解，在功能上等效之變化亦在本發明之範圍內。實際上，熟習此項技術者自前述描述及附圖將對除本文所顯示及描述之修改外的本發明之各種修改顯而易見。此類修改意欲在所附申請專利範圍之範圍內。熟習此項技術者僅使用常規實驗，將認識到或能夠確定本文所述的本發明之具體實施例的許多等效物。此類等效物意欲涵蓋在以下申請專利範圍內。

【0481】 在本說明書中提及之所有出版物、專利及專利申請案皆以引用之方式整體併入本文，其引用程度就如同特定且個別地指示各個別出版物、專利或專利申請案以引用之方式整體併入本文中。

【序列表】

<110> 美商銳進科斯生物股份有限公司(REGENXBIO INC.)

<120> IVA型黏多醣病之治療

<130> 12656-130-228

<140> TBA
<141> 與本案同一日提交

<150> 62/967,499
<151> 2020-01-29

<160> 28

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 738
<212> PRT
<213> 腺相關病毒(Adeno-associated Virus，AAV)

<220>
<223> AAV8殼體蛋白

<400> 1

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 Lys Pro
20 25 30

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe 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 Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
            420                 425                 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
        435                 440                 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
    450                 455                 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
465                 470                 475                 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
```

485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525

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

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560

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

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 2
<211> 1569
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)

<220>
<223> 人GALNS (hGALNS)

<400> 2
atggcggcgg ttgtcgcggc gacgaggtgg tggcagctgt tgctggtgct cagcgccgcg 60

gggatggggg cctcgggcgc cccgcagccc cccaacatcc tgctcctgct catggacgac 120

atgggatggg gtgacctcgg ggtgtatgga gagccctcca gagagacccc gaatttggac 180

cggatggctg cagaagggct gcttttccca aacttctatt ctgccaaccc tctgtgctcg 240

ccatcgaggg cggcactgct cacaggacgg ctacccatcc gcaatggctt ctacaccacc 300

aacgcccatg ccagaaacgc ctacacaccg caggagattg tgggcggcat cccagactcg 360

gagcagctcc tgccggagct tctgaagaag gccggctacg tcagcaagat tgtcggcaag 420

tggcatctgg gtcacaggcc ccagttccac cccctgaagc acggatttga tgagtggttt 480

ggatccccca actgccactt tggaccttat gacaacaagg ccaggcccaa catccctgtg 540

tacagggact gggagatggt tggcagatat tatgaagaat ttcctattaa tctgaagacg 600

ggggaagcca acctcaccca gatctacctg caggaagccc tggacttcat taagagacag 660

gcacggcacc acccctttt cctctactgg gctgtcgacg ccacgcacgc acccgtctat 720

gcctccaaac ccttcttggg caccagtcag cgagggcggt atggagacgc cgtccgggag 780

attgatgaca gcattgggaa gatactggag ctcctccaag acctgcacgt cgcggacaac 840

accttcgtct tcttcacgtc ggacaacggc gctgccctca tttccgcccc cgaacaaggt 900

ggcagcaacg gccccttttct gtgtgggaag cagaccacgt ttgaaggagg gatgagggag 960

cctgccctcg catggtggcc agggcacgtc actgcaggcc aggtgagcca ccagctgggc 1020

agcatcatgg acctcttcac caccagcctg gcccttgcgg gcctgacgcc gcccagcgac 1080

agggccattg atggcctcaa cctcctcccc accctcctgc agggccggct gatggacagg 1140

cctatcttct attaccgtgg cgacacgctg atggcggcca ccctcgggca gcacaaggct 1200

cacttctgga cctggaccaa ctcctgggag aacttcagac agggcattga tttctgccct 1260

gggcagaacg tttcaggggt cacaactcac aatctggaag accacacgaa gctgcccctg 1320

atcttccacc tgggacggga cccaggggag aggttccccc tcagctttgc cagcgccgag 1380

taccaggagg ccctcagcag gatcacctcg gtcgtccagc agcaccagga ggccttggtc 1440

cccgcgcagc cccagctcaa cgtgtgcaac tgggcggtca tgaactgggc acctccgggc 1500

tgtgaaaagt tagggaagtg tctgacacct ccagaatcca ttcccaagaa gtgcctctgg 1560

tcccactag 1569

<210> 3
<211> 1569
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> hGLANSco (經密碼子優化)

<400> 3
atggctgctg ttgttgccgc taccagatgg tggcagctgc tgctggttct gtctgccgct 60

ggaatgggag cttctggtgc tccccagcct cctaacattc tgctgctgct catggacgac 120

atgggctggg gcgatctggg agtgtatggc gagcctagca gagagacacc caacctggat 180

agaatggccg ccgagggcct gctgttcccc aatttctaca gcgccaatcc tctgtgcagc 240

ccctctagag ctgctctgct gacaggcaga ctgcccatca gaaacggctt ctacaccacc 300

aacgctcacg cccggaatgc ctacacaccc caagagatcg ttggcggcat ccccgattct 360

gagcagctcc tgcctgagct gctgaagaag gccggctacg tcagcaagat cgtcggcaaa 420

tggcacctgg gccacagacc tcagtttcac cctctgaagc acggcttcga cgagtggttc 480

ggcagcccca attgtcactt cggcccctac gacaacaagg ccagacctaa catccccgtg 540

tacagagact gggagatggt cggacggtac tacgaggaat tccccatcaa cctgaaaacc 600

ggcgaggcca atctgaccca gatctacctg caagaggccc tggacttcat caagcggcag 660

gccagacacc atcctttctt tctgtactgg gccgtcgacg ccacacacgc ccctgtgtat 720

gccagcaagc cttttctggg caccagccag cgtggcagat atggcgacgc cgtgcgggaa 780

atcgatgaca gcatcggcaa gatcctggaa ctgctgcagg atctgcacgt ggccgacaac 840

accttcgtgt tcttcaccag cgacaacggc gctgccctga tttctgctcc tgagcaaggc 900

ggcagcaacg gcccatttct gtgtggcaag cagaccacct ttgaaggcgg catgagagag 960

cctgctctgg cttggtggcc tggacatgtg acagccggac aagtgtctca ccagctgggc 1020

agcatcatgg acctgtttac cacctctctg gccctggccg gactgacacc tccatctgat 1080

agagccatcg acggcctgaa cctgctgcct acactgcttc agggcagact gatggacaga 1140

cccatcttct actaccgggg cgacaccctg atggccgcta cactgggaca gcacaaggcc 1200

cacttttgga cctggaccaa cagctgggag aacttccggc agggcatcga cttttgccct 1260

ggccagaatg tgtccggcgt gaccacacac aatctggaag atcacaccaa gctgcccctg 1320

atctttcacc tgggcagaga tcccggcgag agattccctc tgtcttttgc cagcgccgag 1380

taccaagaag ccctgagcag aatcacctcc gtggtgcagc agcaccaaga ggctctggtt 1440

ccagctcagc cccagctgaa cgtgtgtaat tgggccgtga tgaactgggc ccctcctgga 1500

tgtgaaaagc tgggcaagtg tctgaccccc cctgagagca tccccaagaa atgcctgtgg 1560

tcccactga 1569

<210> 4
<211> 1604
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> D8-hGALNS

<400> 4
accgccatgc ggggtccgag cggggctctg tggctgctcc tggctctgcg caccgtgctc 60

ggatcagatg atgatgatga tgatgatgat gccgaggcag aaaccggtgc cccgcagccc 120

cccaacatcc tgctcctgct catggacgac atgggatggg gtgacctcgg ggtgtatgga 180

gagccctcca gagagacccc gaatttggac cggatggctg cagaagggct gcttttccca 240

aacttctatt ctgccaaccc tctgtgctcg ccatcgaggg cggcactgct cacaggacgg 300

ctacccatcc gcaatggctt ctacaccacc aacgcccatg ccagaaacgc ctacacaccg 360

caggagattg tgggcggcat cccagactcg gagcagctcc tgccggagct tctgaagaag 420

gccggctacg tcagcaagat tgtcggcaag tggcatctgg gtcacaggcc ccagttccac 480

cccctgaagc acggatttga tgagtggttt ggatccccca actgccactt tggaccttat 540

gacaacaagg ccaggcccaa catccctgtg tacagggact gggagatggt tggcagatat 600

tatgaagaat ttcctattaa tctgaagacg ggggaagcca acctcaccca gatctacctg 660

caggaagccc tggacttcat taagagacag gcacggcacc acccctttt cctctactgg 720

gctgtcgacg ccacgcacgc acccgtctat gcctccaaac ccttcttggg caccagtcag 780

cgagggcggt atggagacgc cgtccgggag attgatgaca gcattgggaa gatactggag 840

ctcctccaag acctgcacgt cgcggacaac accttcgtct tcttcacgtc ggacaacggc 900

gctgccctca tttccgcccc cgaacaaggt ggcagcaacg gccccttttct gtgtgggaag 960

cagaccacgt ttgaaggagg gatgagggag cctgccctcg catggtggcc agggcacgtc 1020

actgcaggcc aggtgagcca ccagctgggc agcatcatgg acctcttcac caccagcctg 1080

gcccttgcgg gcctgacgcc gcccagcgac agggccattg atggcctcaa cctcctcccc 1140

accctcctgc agggccggct gatggacagg cctatcttct attaccgtgg cgacacgctg 1200

atggcggcca ccctcgggca gcacaaggct cacttctgga cctggaccaa ctcctgggag 1260

aacttcagac agggcattga tttctgccct gggcagaacg tttcaggggt cacaactcac 1320

aatctggaag accacacgaa gctgcccctg atcttccacc tgggacggga cccaggggag 1380

aggttccccc tcagctttgc cagcgccgag taccaggagg ccctcagcag gatcacctcg 1440

gtcgtccagc agcaccagga ggccttggtc cccgcgcagc cccagctcaa cgtgtgcaac 1500

tgggcggtca tgaactgggc acctccgggc tgtgaaaagt tagggaagtg tctgacacct 1560

ccagaatcca ttcccaagaa gtgcctctgg tcccactagc tcga 1604

<210> 5
<211> 1593
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> D8-GALNSco (經密碼子優化)

<400> 5
atgagaggac catctggtgc tctgtggctg ctgctggctc tgagaacagt gctgggcagc 60

gacgacgatg atgacgatga cgacgccgag gctgaaacag gtgctcccca gcctcctaac 120

atcctgctgc tgctcatgga cgatatgggc tggggcgatc tgggagtgta tggcgagcct 180

agcagagaga cacccaacct ggatagaatg gccgccgagg gcctgctgtt ccccaatttc 240

tacagcgcca atcctctgtg cagcccctct agagctgctc tgctgacagg cagactgccc 300

atcagaaacg gcttctacac caccaacgct cacgcccgga atgcctacac accccaagag 360

atcgttggcg gcatccccga ttctgaacag ctgctgcctg agctgctgaa gaaggccggc 420

tacgtcagca agatcgtcgg caaatggcac ctgggccaca gacctcagtt tcaccctctg 480

aagcacggct tcgacgagtg gttcggcagc cccaattgtc acttcggccc ctacgacaac 540

aaggccagac caaacatccc cgtgtacaga gactgggaga tggtcggacg gtactacgag 600

gaattcccca tcaacctgaa aaccggcgag gccaatctga cccagatcta cctgcaagag 660

gccctggact tcatcaagcg gcaggccaga caccatcctt tctttctgta ctgggccgtc 720

gacgccacac acgcccctgt gtatgccagc aagccttttc tgggcaccag ccagcgtggc 780

agatatggcg acgccgtgcg ggaaatcgat gacagcatcg gcaagatcct ggaactgctg 840

caggatctgc acgtggccga caacaccttc gtgttcttca ccagcgacaa cggcgctgcc 900

ctgatttctg ctcctgagca aggcggcagc aacggcccat ttctgtgtgg caagcagacc 960

acctttgaag gcggcatgag agagcctgct ctggcttggt ggcctggaca tgtgacagcc 1020

ggacaagtgt ctcaccagct gggctccatc atggacctgt ttaccacctc tctggccctg 1080

gccggactga cacctccatc tgatagagcc atcgacggcc tgaacctgct gcctacactg 1140

cttcagggca gactgatgga cagacccatc ttctactacc ggggcgacac cctgatggcc 1200

gctacactgg gacagcacaa ggcccacttt tggacctgga ccaacagctg ggagaacttc 1260

cggcagggca tcgacttttg ccctggccag aatgtgtccg gcgtgaccac acacaatctg 1320

gaagatcaca ccaagctgcc cctgatcttt cacctgggca gagatcccgg cgagagattc 1380

cctctgtctt ttgccagcgc cgagtaccaa gaagccctga gcagaatcac cagcgtggtg 1440

cagcagcacc aagaggctct ggttccagct cagccccagc tgaacgtgtg taattgggcc 1500

gtgatgaact gggcccctcc tggatgtgaa aagctgggca agtgtctgac ccctcctgag 1560

agcatcccca agaaatgcct gtggtcccac tga 1593

<210> 6
<211> 460
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> TBG啓動子

<400> 6
gggctggaag ctacctttga catcatttcc tctgcgaatg catgtataat ttctacagaa 60

cctattagaa aggatcaccc agcctctgct tttgtacaac tttcccttaa aaaactgcca 120

attccactgc tgtttggccc aatagtgaga acttttttcct gctgcctctt ggtgcttttg 180

cctatggccc ctattctgcc tgctgaagac actcttgcca gcatggactt aaaccccctcc 240

agctctgaca atcctctttc tcttttgttt tacatgaagg gtctggcagc caaagcaatc 300

actcaaagtt caaaccttat catttttttgc tttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat 360

cagctttgaa aataccatcc cagggttaat gctggggtta atttataact aagagtgctc 420

tagttttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat 460

<210> 7

<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 5-prime ITR

<400> 7
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 8
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 3-prime ITR

<400> 8
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag 130

<210> 9
<211> 127
<212> DNA
<213> 兔(Rabbit)

<220>
<223> 兔球蛋白聚A

<400> 9
gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agcccccttga gcatctgact 60

tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120

tcactcg 127

<210> 10
<211> 133
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> β-球蛋白/Ig內含子(嵌合內含子)

<400> 10
gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60

cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120

tttctctcca cag 133

<210> 11
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> α mic/bik強化子

<400> 11
aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc 100

<210> 12
<211> 1569
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> GALNS (經密碼子優化及CpG耗盡)

<400> 12
atggctgctg tggtggctgc tacaagatgg tggcaactgc tgctggtgct gtctgcagct 60

ggaatgggag cttctggtgc ccctcagcct cctaatatcc tgctgctgct gatggatgac 120

atgggctggg gagatctggg agtgtatggg gagcctagca gagagacacc caacctggat 180

agaatggctg cagagggcct gctgttcccc aacttctact ctgccaatcc tctgtgcagc 240

ccctctagag ctgcactgct tacaggcaga ctgcccatca gaaatggctt ctacaccaca 300

aatgcccatg ccagaaatgc ctacacaccc caagagatag ttggaggcat ccctgactct 360

gaacagctgc tgcctgagct gctgaagaaa gctggctatg tgtccaagat agttggcaag 420

tggcacctgg gccacagacc tcagtttcac cctctgaaac atggctttga tgagtggttt 480

ggcagcccca actgccactt tggcccctat gataacaagg ccagacctaa catccctgtg 540

tacagagact gggagatggt tggaaggtac tatgaagagt tccccatcaa cctgaaaaca 600

ggggaagcca atctgaccca gatctacctg caagaggccc tggacttcat caagagacag 660

gccagacacc atcctttctt tctgtactgg gctgttgatg ccacacatgc ccctgtgtat 720

gccagcaagc cttttctggg caccagccag aggggcagat atggggatgc tgtcagagaa 780

attgatgaca gcattggcaa gatcctggaa ctgctgcagg acctgcatgt ggctgacaac 840

acctttgtgt tcttcacctc tgacaatggg gcagccctga tctctgcccc tgagcaaggt 900

ggcagcaatg gcccatttct gtgtggcaag cagaccacct ttgaaggtgg catgagagag 960

cctgctctgg cctggtggcc tggacatgtt acagctggac aagtgtctca ccagctgggc 1020

agcatcatgg acctgtttac cacatctctg gccctggctg gactgacccc tccatctgat 1080

agagccattg atggcctgaa cctgctgcct acacttctgc agggcagact gatggacaga 1140

cccatcttct actacagagg tgacaccctg atggctgcca cactgggaca gcacaaggcc 1200

cacttttgga cctggaccaa cagctgggag aacttcagac agggcattga tttctgccct 1260

ggccagaatg tgtctggggt caccactcac aacctggaag atcacaccaa gctgcccctc 1320

atcttccacc tgggaagaga tcctggggag agattccctc tgagctttgc ctctgctgag 1380

taccaagaag ccctgagcag aatcacatct gtggtgcagc agcatcaaga ggctctggtt 1440

ccagctcagc cccagctgaa tgtgtgcaac tgggcagtga tgaattgggc cccacctggc 1500

tgtgaaaagc tgggcaaatg tctgacccca cctgagagca tccctaaaaa gtgcctgtgg 1560

tcccactga 1569

<210> 13
<211> 969
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LSPX1啓動子

<400> 13
aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg 240

tctagaaggc tcagaggcac acaggagttt ctgggctcac cctgcccccc tccaacccct 300

cagttcccat cctccagcag ctgtttgtgt gctgcctctg aagtccacac tgaacaaact 360

tcagcctact catgtcccta aaatgggcaa acattgcaag cagcaaacag caaacacaca 420

gccctccctg cctgctgacc ttggagctgg ggcagaggtc agagacctct ctgggcccat 480

gccacctcca acatccactc gacccccttgg aatttcggtg gagaggagca gaggttgtcc 540

tggcgtggtt taggtagtgt gagaggggta cccggggatc ttgctaccag tggaacagcc 600

actaaggatt ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc 660

tgactcacgc caccccctcc accttggaca caggacgctg tggtttctga gccaggtaca 720

atgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca 780

gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc tcctccgata 840

actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccct ctggatccac 900

tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc accactgacc 960

tgggacagt 969

<210> 14
<211> 1050
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LSPX2啓動子

<400> 14
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gtctagaagg ctcagaggca cacaggagtt tctgggctca 360

ccctgccccc ttccaacccc tcagttccca tcctccagca gctgtttgtg tgctgcctct 420

gaagtccaca ctgaacaaac ttcagcctac tcatgtccct aaaatgggca aacattgcaa 480

gcagcaaaca gcaaacacac agccctccct gcctgctgac cttggagctg gggcagaggt 540

cagagacctc tctgggccca tgccacctcc aacatccact cgacccccttg gaatttcggt 600

ggagaggagc agaggttgtc ctggcgtggt ttaggtagtg tgagaggggt acccggggat 660

cttgctacca gtggaacagc cactaaggat tctgcagtga gagcagaggg ccagctaagt 720

ggtactctcc cagagactgt ctgactcacg ccacccccctc caccttggac acaggacgct 780

gtggtttctg agccaggtac aatgactcct ttcggtaagt gcagtggaag ctgtacactg 840

cccaggcaaa gcgtccgggc agcgtaggcg ggcgactcag atcccagcca gtggacttag 900

cccctgtttg ctcctccgat aactggggtg accttggtta atattcacca gcagcctccc 960

ccgttgcccc tctggatcca ctgcttaaat acggacgagg acagggccct gtctcctcag 1020

cttcaggcac caccactgac ctgggacagt 1050

<210> 15
<211> 1089
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LTP1啓動子

<400> 15
aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg 240

acatcatttc ctctgcgaat gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc 300

cagcctctgc ttttgtacaa ctttcccttа aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc 360

caatagtgag aacttttttcc tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc 420

ctgctgaaga cactcttgcc agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt 480

ctcttttgtt ttacatgaag ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta 540

tcatttttttg ctttgttcct cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc 600

ccagggttaa tgctggggtt aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac 660

atgctataaa aatggaaaga tgttgctttc tgagaggatc ttgctaccag tggaacagcc 720

actaaggatt ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc 780

tgactcacgc caccccctcc accttggaca caggacgctg tggtttctga gccaggtaca 840

gtgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca 900

gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc tcctccgata 960

actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccct ctggatccac 1020

tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc accactgacc 1080

tgggacagt 1089

<210> 16
<211> 1579
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> LMTP6啓動子

<400> 16
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gccactacgg gtttaggctg cccatgtaag gaggcaaggc 360

ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccagac atgtggctgc ccccccccc 420

cccaacacct gctgcctcta aaaataaccc tgtccctggt ggatcccact acgggtttag 480

gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540

agacatgtgg ctgccccccc ccccccccaac acctgctgcc tctaaaaata accctgtccc 600

tggtggatcc cactacgggt ttaggctgcc catgtaagga ggcaaggcct ggggacaccc 660

gagatgcctg gttataatta acccagacat gtggctgccc ccccccccccc caacacctgc 720

tgcctctaaa aataaccctg tccctggtgg atcccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag 780

gctgtggggg actgagggca ggctgtaaca ggcttggggg ccagggctta tacgtgcctg 840

ggactcccaa agtattactg ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc 900

tagactcagc acttagttta ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca 960

aggccatggg gctgggcaag ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa 1020

cgagctgaaa gctcatctgc tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag 1080

tcacaccctg taggctcctc tatataaccc aggggcacag gggctgccct cattctacca 1140

ccacctccac agcacagaca gacactcagg agccagccag cgtcgagatc ttgctaccag 1200

tggaacagcc actaaggatt ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc 1260

agagactgtc tgactcacgc caccccctcc accttggaca caggacgctg tggtttctga 1320

gccaggtaca gtgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag 1380

cgtccgggca gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc 1440

tcctccgata actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccct 1500

ctggatccac tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc 1560

accactgacc tgggacagt 1579

<210> 17
<211> 969
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LBTP1啓動子

<400> 17

aggttaattt ttaaaaagca gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc 60

tgtttgctct ggttaataat ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa 120

aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt 180

aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg 240

tctagaaggc tcagaggcac acaggagttt ctgggctcac cctgcccccc tccaacccct 300

cagttcccat cctccagcag ctgtttgtgt gctgcctctg aagtccacac tgaacaaact 360

tcagcctact catgtcccta aaatgggcaa acattgcaag cagcaaacag caaacacaca 420

gccctccctg cctgctgacc ttggagctgg ggcagaggtc agagacctct ctgggcccat 480

gccacctcca acatccactc gacccccttgg aatttcggtg gagaggagca gaggttgtcc 540

tggcgtggtt taggtagtgt gagaggggta cccgggggatc ttgctaccag tggaacagcc 600

actaaggatt ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc 660

tgactcacgc caccccctcc accttggaca caggacgctg tggtttctga gccaggtaca 720

atgactcctt tcggtaagtg cagtggaagc tgtacactgc ccaggcaaag cgtccgggca 780

gcgtaggcgg gcgactcaga tcccagccag tggacttagc ccctgtttgc tcctccgata 840

actggggtga ccttggttaa tattcaccag cagcctcccc cgttgccccct ctggatccac 900

tgcttaaata cggacgagga cagggccctg tctcctcagc ttcaggcacc accactgacc 960

tgggacagt 969

<210> 18
<211> 2074
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LBTP2啓動子

<400> 18
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg gcacacatac acgaacacac atacatatac atacattcac 360

atatatgcac acacatacac atatacacgc atacacgtac acacaaatgc acactcacac 420

atgcacacac atacataata tacacactct cacacatgca catacacaca tacatacaca 480

tacatgtgca tgcacacaca caaatacaca tgcatacatc cacattcaca cagatgcaga 540

cacaaatgca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cgcacactgc 600

caccctgaac tagtggtggc taaatgaaca ataagtctcc atcaccagct tgggggggagg 660

taggtggtag tgtaggtgcc cccattgtgt gatcatgttc attgtatgag tttgtctgtg 720

ttcattcatc atagtgacag tccccatgtg ggtagcagag agtacgtgtg catgcatcat 780

ctccgtgttt gctcatgagt gtgtatgtca gtgtgttcca gtctttctgt gtgagtgtcg 840

tccccaatcc cccatccccc cccccagatc tctaattagt ggtttggggt ttgttccttt 900

tccctcctgt tcctttcctc agcagcgcgg cagcagcggc ggcagcctcg gtggtagcag 960

cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcaacagaa gctgccgcgc 1020

cgctgagtag cagcaaggac tccgagtcaa gagtaggatt gtaggattgg atctgagtgg 1080

gaacaagagt gagctggcct gagagaggag cagatgcctc ccagcgccct caggccaccc 1140

attgccagta atcttcaagc cagacctctt gagaggagac gggacagcca accctagcct 1200

acccaggtac agacactggg cagttctggg ggactgccca cagatgccta ttggattcct 1260

ggggtatgta ggactcccgg gtctaccagc ccttttcacc tttccccata gcaccccccaa 1320

ggaagctctg acaacttgcc catattcctg tttcccaccc gtcccctggg caccccctttt 1380

tcttctctcc ctcccagatc ccttctttgg ggagctcagc aaatggagca ggaaatttgg 1440

accctctgcc tccctctctc gccttcctca ttggatccgg agtcttctcc gctgggaaag 1500

ctgtaattag agggtggatc cctacagaca gagagcagcc cccccacccc caccccccag 1560

tcccttctaa ctttagatct cttctctccc attctcccat tctccctccc tctcccttct 1620

ccctctccca ctggctcctc ggttctctcc atctgcctga ctccttggga cccggtcccc 1680

agatcttgct accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct 1740

aagtggtact ctcccagaga ctgtctgact cacgccaccc cctccacctt ggacacagga 1800

cgctgtggtt tctgagccag gtacagtgac tcctttcggt aagtgcagtg gaagctgtac 1860

actgcccagg caaagcgtcc gggcagcgta ggcgggcgac tcagatccca gccagtggac 1920

ttagcccctg tttgctcctc cgataactgg ggtgaccttg gttaatattc accagcagcc 1980

tcccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg ccctgtctcc 2040

tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagt 2074

<210> 19
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 含ApoE強化子之ApoE肝控制區

<400> 19
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc 60

ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc acactgaaca aacttcagcc 120

tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc 180

cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc 240

tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt 300

ggtttaggta gtgtgagagg g 321

<210> 20
<211> 154
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> ApoE強化子

<400> 20
gctgtttgtg tgctgcctct gaagtccaca ctgaacaaac ttcagcctac tcatgtccct 60

aaaatgggca aacattgcaa gcagcaaaca gcaaacacac agccctccct gcctgctgac 120

cttggagctg gggcagaggt cagagacctc tctg 154

<210> 21
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> hAAT啓動子

<400> 21
gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta 60

agtggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac 120

gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 180

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 240

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 300

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 360

cagcttcagg caccaccact gacctgggac agt 393

<210> 22
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> hAAT(Δ-ATG)啓動子

<400> 22
gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta 60

agtggtactc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac 120

gctgtggttt ctgagccagg tacagtgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca 180

ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact 240

tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 300

cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 360

cagcttcagg caccaccact gacctgggac agt 393

<210> 23
<211> 1360
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Sp7/Osx

<400> 23
cacacataca cgaacacaca tacatataca tacattcaca tatatgcaca cacatacaca 60

tatacacgca tacacgtaca cacaaatgca cactcacaca tgcacacaca tacataatat 120

acacactctc acacatgcac atacacacat acatacacat acatgtgcat gcacacacac 180

aaatacacat gcatacatcc acattcacac agatgcagac acaaatgcac acacacacac 240

acacacacac acacacacac acacacacac gcacactgcc accctgaact agtggtggct 300

aaatgaacaa taagtctcca tcaccagctt ggggggaggt aggtggtagt gtaggtgccc 360

ccattgtgtg atcatgttca ttgtatgagt ttgtctgtgt tcattcatca tagtgacagt 420

ccccatgtgg gtagcagaga gtacgtgtgc atgcatcatc tccgtgtttg ctcatgagtg 480

tgtatgtcag tgtgttccag tctttctgtg tgagtgtcgt ccccaatccc ccatcccccc 540

ccccagatct ctaattagtg gtttggggtt tgttcctttt ccctcctgtt cctttcctca 600

gcagcgcggc agcagcggcg gcagcctcgg tggtagcagc agcagcagca gcagcagcag 660

cagcagcagc agcagcagca gcaacagaag ctgccgcgcc gctgagtagc agcaaggact 720

ccgagtcaag agtaggattg taggattgga tctgagtggg aacaagagtg agctggcctg 780

agagaggagc agatgcctcc cagcgccctc aggccaccca ttgccagtaa tcttcaagcc 840

agacctcttg agaggagacg ggacagccaa ccctagccta cccaggtaca gacactgggc 900

agttctgggg gactgcccac agatgcctat tggattcctg gggtatgtag gactcccggg 960

tctaccagcc cttttcacct ttccccatag caccccccaag gaagctctga caacttgccc 1020

atattcctgt ttcccacccg tcccctgggc acccccctttt cttctctccc tcccagatcc 1080

cttctttggg gagctcagca aatggagcag gaaatttgga ccctctgcct ccctctctcg 1140

ccttcctcat tggatccgga gtcttctccg ctgggaaagc tgtaattaga gggtggatcc 1200

ctacagacag agagcagccc ccccaccccc acccccagt cccttctaac tttagatctc 1260

ttctctccca ttctcccatt ctccctccct ctcccttctc cctctcccac tggctcctcg 1320

gttctctcca tctgcctgac tccttgggac ccggtcccca 1360

<210> 24
<211> 756
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 最小Sp7/Osx

<400> 24
cgcggcagca gcggcggcag cctcggtggt agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc 60

agcagcagca gcagcagcaa cagaagctgc cgcgccgctg agtagcagca aggactccga 120

gtcaagagta ggattgtagg attggatctg agtgggaaca agagtgagct ggcctgagag 180

aggagcagat gcctcccagc gccctcaggc cacccattgc cagtaatctt caagccagac 240

ctcttgagag gagacgggac agccaaccct agcctaccca ggtacagaca ctgggcagtt 300

ctgggggact gcccacagat gcctattgga ttcctggggt atgtaggact cccgggtcta 360

ccagcccttt tcacctttcc ccatagcacc cccaaggaag ctctgacaac ttgcccatat 420

tcctgtttcc cacccgtccc ctgggcaccc ccttttcttc tctccctccc agatcccttc 480

tttggggagc tcagcaaatg gagcaggaaa tttggaccct ctgcctccct ctctcgcctt 540

cctcattgga tccggagtct tctccgctgg gaaagctgta attagagggt ggatccctac 600

agacagagag cagccccccc acccccaccc cccagtccct tctaacttta gatctcttct 660

ctcccattct cccattctcc ctccctctcc cttctccctc tcccactggc tcctcggttc 720

tctccatctg cctgactcct tgggacccgg tcccca 756

<210> 25
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> β-球蛋白聚腺苷酸化信號

<400> 25
aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttggaa ttttttgtgt ctctca 56

<210> 26
<211> 736
<212> PRT
<213> AAV9

<220>
<223> AAV9殼體蛋白

<400> 26

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 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> 27

<211> 1569
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> hGALNScoV2

<400> 27
atggctgctg tggtggctgc tacaagatgg tggcaactgc tgctggtgct gtctgcagct 60

ggaatgggag cttctggtgc ccctcagcct cctaatatcc tgctgctgct gatggatgac 120

atgggctggg gagatctggg agtgtatggg gagcctagca gagagacacc caacctggat 180

agaatggctg cagagggcct gctgttcccc aacttctact ctgccaatcc tctgtgcagc 240

ccctctagag ctgcactgct tacaggcaga ctgcccatca gaaatggctt ctacaccaca 300

aatgcccatg ccagaaatgc ctacacaccc caagagatag ttggaggcat ccctgactct 360

gaacagctgc tgcctgagct gctgaagaaa gctggctatg tgtccaagat agttggcaag 420

tggcacctgg gccacagacc tcagtttcac cctctgaaac atggctttga tgagtggttt 480

ggcagcccca actgccactt tggcccctat gataacaagg ccagacctaa catccctgtg 540

tacagagact gggagatggt tggaaggtac tatgaagagt tccccatcaa cctgaaaaca 600

ggggaagcca atctgaccca gatctacctg caagaggccc tggacttcat caagagacag 660

gccagacacc atcctttctt tctgtactgg gctgttgatg ccacacatgc ccctgtgtat 720

gccagcaagc cttttctggg caccagccag aggggcagat atggggatgc tgtcagagaa 780

attgatgaca gcattggcaa gatcctggaa ctgctgcagg acctgcatgt ggctgacaac 840

acctttgtgt tcttcacctc tgacaatggg gcagccctga tctctgcccc tgagcaaggt 900

ggcagcaatg gcccatttct gtgtggcaag cagaccacct ttgaaggtgg catgagagag 960

cctgctctgg cctggtggcc tggacatgtt acagctggac aagtgtctca ccagctgggc 1020

agcatcatgg acctgtttac cacatctctg gccctggctg gactgacccc tccatctgat 1080

agagccattg atggcctgaa cctgctgcct acacttctgc agggcagact gatggacaga 1140

cccatcttct actacagagg tgacaccctg atggctgcca cactgggaca gcacaaggcc 1200

cacttttgga cctggaccaa cagctgggag aacttcagac agggcattga tttctgccct 1260

ggccagaatg tgtctggggt caccactcac aacctggaag atcacaccaa gctgcccctc 1320

atcttccacc tgggaagaga tcctggggag agattccctc tgagctttgc ctctgctgag 1380

taccaagaag ccctgagcag aatcacatct gtggtgcagc agcatcaaga ggctctggtt 1440

ccagctcagc cccagctgaa tgtgtgcaac tgggcagtga tgaattgggc cccacctggc 1500

tgtgaaaagc tgggcaaatg tctgacccca cctgagagca tccctaaaaa gtgcctgtgg 1560

tcccactga 1569

<210> 28
<211> 1676
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> CAG啓動子

<400> 28
gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttcact ctccccatct 420

ccccccccctc cccacccccca attttgtatt tatttatttt ttaattattt tgtgcagcga 480

tgggggcggg gggggggggg gggcgcgcgc caggcggggc ggggcggggc gaggggcggg 540

gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag cggcgcgctc cgaaagtttc 600

cttttatggc gaggcggcgg cggcggcggc cctataaaaa gcgaagcgcg cggcgggcgg 660

gagtcgctgc gcgctgcctt cgccccgtgc cccgctccgc cgccgcctcg cgccgcccgc 720

cccggctctg actgaccgcg ttactcccac aggtgagcgg gcgggacggc ccttctcctc 780

cgggctgtaa ttagcgcttg gtttaatgac ggcttgtttc ttttctgtgg ctgcgtgaaa 840

gccttgaggg gctccgggag ggccctttgt gcgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900

tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gctccgcgct gcccggcggc tgtgagcgct 960

gcgggcgcgg cgcggggctt tgtgcgctcc gcagtgtgcg cgaggggagc gcggccgggg 1020

gcggtgcccc gcggtgcggg gggggctgcg aggggaacaa aggctgcgtg cggggtgtgt 1080

gcgtgggggg gtgagcaggg ggtgtgggcg cgtcggtcgg gctgcaaccc cccctgcacc 1140

cccctccccg agttgctgag cacggcccgg cttcgggtgc ggggctccgt acggggcgtg 1200

gcgcggggct cgccgtgccg ggcgggggggt ggcggcaggt gggggtgccg ggcggggcgg 1260

ggccgcctcg ggccgggggag ggctcgggggg aggggcgcgg cggcccccgg agcgccggcg 1320

gctgtcgagg cgcggcgagc cgcagccatt gccttttatg gtaatcgtgc gagagggcgc 1380

agggacttcc tttgtcccaa atctgtgcgg agccgaaatc tgggaggcgc cgccgcaccc 1440

cctctagcgg gcgcgggggcg aagcggtgcg gcgccggcag gaaggaaatg ggcggggagg 1500

gccttcgtgc gtcgccgcgc cgccgtcccc ttctccctct ccagcctcgg ggctgtccgc 1560

gggggggacgg ctgccttcgg gggggacggg gcagggcggg gttcggcttc tggcgtgtga 1620

ccggcggctc tagagcctct gctaaccatg ttcatgcctt cttcttttttc ctacag 1676

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV反向末端重複序列(ITR)之人類N-乙醯半乳糖胺-6-硫酸鹽硫酸酯酶(hGALNS)表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項2】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項3】

如請求項2之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之rAAV，其中該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。

【請求項5】

如請求項4之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項6】

如請求項4之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項7】

如請求項1至3中任一項之rAAV，其中該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。

【請求項8】

如請求項7之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項9】

如請求項7之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之rAAV，其中該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。

【請求項11】

如請求項10之rAAV，其中該hAAT (ΔATG)啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 22至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 22至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 22至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 22至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 22至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【請求項12】

如請求項10之rAAV，其中該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。

【請求項14】

如請求項1至12中任一項之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包

含編碼包含ApoE強化子之肝控制區的核苷酸序列。

【請求項15】

如請求項13或14之rAAV，其中該ApoE強化子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 20至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 20至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 20至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 20至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 20至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【請求項16】

如請求項13或14之rAAV，其中該ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【請求項17】

如請求項14之rAAV，其中該肝控制區：

(a) 包含與SEQ ID NO: 19至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 19至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 19至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 19至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 19至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【請求項18】

如請求項14之rAAV，其中該肝控制區包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【請求項19】

如請求項1至3中任一項之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。

【請求項20】

如請求項19之rAAV，其中該LBTP1啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 17至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 17至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 17至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 17至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 17至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【請求項21】

如請求項19之rAAV，其中該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【請求項22】

如請求項1至3中任一項之rAAV，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。

【請求項23】

如請求項22之rAAV，其中該LBTP2啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【請求項24】

如請求項22之rAAV，其中該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【請求項25】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項26】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項27】

如請求項26之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項28】

如請求項25至27中任一項之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項29】

如請求項25至27中任一項之rAAV，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項30】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b) 重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項31】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b) 重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡

匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項32】

如請求項31之rAAV，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項33】

如請求項30至32中任一項之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項34】

如請求項30至32中任一項之rAAV，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項35】

如請求項1至34中任一項之rAAV，其中該hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。

【請求項36】

如請求項35之rAAV，其中該內含子係嵌合內含子。

【請求項37】

如請求項36之rAAV，其中該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。

【請求項38】

如請求項37之rAAV，其中該β-球蛋白/Ig內含子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 10至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 10至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 10至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 10至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【請求項39】

如請求項37之rAAV，其中該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【請求項40】

如請求項1至39中任一項之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。

【請求項41】

如請求項1至40中任一項之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列已耗盡CpG位點。

【請求項42】

如請求項1至41中任一項之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列：

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致；

(d) 與SEQ ID NO: 12至少95%一致；

(e) 與SEQ ID NO: 12至少98%一致；或

(f) 與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【請求項43】

如請求項1至41中任一項之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【請求項44】

如請求項1至43中任一項之rAAV，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。

【請求項45】

如請求項44之rAAV，其中該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。

【請求項46】

如請求項45之rAAV，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號：

(a) 包含與SEQ ID NO: 25至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 25至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 25至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 25至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 25至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【請求項47】

如請求項45之rAAV，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【請求項48】

如請求項44之rAAV，其中該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。

【請求項49】

如請求項48之rAAV，其中該兔球蛋白聚A位點：

(a) 包含與SEQ ID NO: 9至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 9至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 9至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 9至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【請求項50】

如請求項48之rAAV，其中該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【請求項51】

如請求項1至50中任一項之rAAV，其中該AAV係AAV8。

【請求項52】

如請求項1至50中任一項之rAAV，其中該AAV係AAV9。

【請求項53】

一種醫藥組成物，其包含如請求項1至52中任一項之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項54】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項55】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，其中該骨-肝串聯啟動子包含骨特異性啟動子及肝特異性啟動子，且其中該編碼骨-肝串聯啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項56】

如請求項55之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項57】

如請求項54至56中任一項之聚核苷酸，其中該骨特異性啟動子係Sp7/Osx啟動子。

【請求項58】

如請求項57之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項59】

如請求項57之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項60】

如請求項54至56中任一項之聚核苷酸，其中該骨特異性啟動子係最小Sp7/Osx啟動子。

【請求項61】

如請求項60之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項62】

如請求項60之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項63】

如請求項54至62中任一項之聚核苷酸，其中該肝特異性啟動子係hAAT (ΔATG)啟動子。

【請求項64】

如請求項63之聚核苷酸，其中該hAAT (ΔATG)啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 22至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 22至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 22至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 22至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 22至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【請求項65】

如請求項63之聚核苷酸，其中該hAAT (ΔATG)啟動子包含與SEQ ID NO: 22達100%一致之核苷酸序列。

【請求項66】

如請求項54至65中任一項之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼ApoE強化子之核苷酸序列。

【請求項67】

如請求項54至65中任一項之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子進一步包含編碼包含ApoE強化子之肝控制區的核苷酸序列。

【請求項68】

如請求項66或67之聚核苷酸，其中該ApoE強化子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 20至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 20至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 20至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 20至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 20至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【請求項69】

如請求項66或67之聚核苷酸，其中該ApoE強化子包含與SEQ ID NO: 20達100%一致之核苷酸序列。

【請求項70】

如請求項67之聚核苷酸，其中該肝控制區：

(a) 包含與SEQ ID NO: 19至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 19至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 19至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 19至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 19至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【請求項71】

如請求項67之聚核苷酸，其中該肝控制區包含與SEQ ID NO: 19至少100%一致之核苷酸序列。

【請求項72】

如請求項54至56中任一項之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP1啟動子。

【請求項73】

如請求項72之聚核苷酸，其中該LBTP1啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 17至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 17至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 17至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 17至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 17至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【請求項74】

如請求項72之聚核苷酸，其中該LBTP1啟動子包含與SEQ ID NO: 17達100%一致之核苷酸序列。

【請求項75】

如請求項54至56中任一項之聚核苷酸，其中該骨-肝串聯啟動子係LBTP2啟動子。

【請求項76】

如請求項75之聚核苷酸，其中該LBTP2啟動子：

(a)包含與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【請求項77】

如請求項75之聚核苷酸，其中該LBTP2啟動子包含與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【請求項78】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因

之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項79】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項80】

如請求項79之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項81】

如請求項78至80中任一項之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 23至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 23至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 23至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 23至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 23至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項82】

如請求項78至80中任一項之聚核苷酸，其中該Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 23達100%一致之核苷酸序列。

【請求項83】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該

hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項84】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白，且其中該編碼最小Sp7/Osx啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項85】

如請求項84之聚核苷酸，其中該酸性寡肽係D8。

【請求項86】

如請求項83至85中任一項之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 24至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 24至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 24至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 24至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 24至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項87】

如請求項83至85中任一項之聚核苷酸，其中該最小Sp7/Osx啟動子包含與SEQ ID NO: 24達100%一致之核苷酸序列。

【請求項88】

如請求項54至87中任一項之聚核苷酸，其中該hGALNS表現卡匣進一步包含編碼內含子之核苷酸序列。

【請求項89】

如請求項88之聚核苷酸，其中該內含子係嵌合內含子。

【請求項90】

如請求項89之聚核苷酸，其中該嵌合內含子係β-球蛋白/Ig內含子。

【請求項91】

如請求項90之聚核苷酸，其中該β-球蛋白/Ig內含子：

(a) 包含與SEQ ID NO: 10至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 包含與SEQ ID NO: 10至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 包含與SEQ ID NO: 10至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 包含與SEQ ID NO: 10至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 包含與SEQ ID NO: 10至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【請求項92】

如請求項90之聚核苷酸，其中該β-球蛋白/Ig內含子包含與SEQ ID NO: 10達100%一致之核苷酸序列。

【請求項93】

如請求項54至92中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列經密碼子優化。

【請求項94】

如請求項54至93中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷

酸序列已耗盡CpG位點。

【請求項95】

如請求項54至94中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列：

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致；

(d) 與SEQ ID NO: 12至少95%一致；

(e) 與SEQ ID NO: 12至少98%一致；或

(f) 與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【請求項96】

如請求項54至94中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含編碼hGALNS之核苷酸序列，該核苷酸序列與SEQ ID NO: 12達100%一致。

【請求項97】

如請求項54至96中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含聚腺苷酸化信號。

【請求項98】

如請求項97之聚核苷酸，其中該聚腺苷酸化信號係β-球蛋白聚腺苷酸化信號。

【請求項99】

如請求項98之聚核苷酸，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號：

(a) 包含與SEQ ID NO: 25至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 25至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 25至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 25至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 25至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【請求項100】

如請求項98之聚核苷酸，其中該β-球蛋白聚腺苷酸化信號包含與SEQ ID NO: 25達100%一致之核苷酸序列。

【請求項101】

如請求項97之聚核苷酸，其中該聚腺苷酸化信號係兔球蛋白聚A位點。

【請求項102】

如請求項101之聚核苷酸，其中該兔球蛋白聚A位點：

(a)包含與SEQ ID NO: 9至少80%一致之核苷酸序列；

(b)包含與SEQ ID NO: 9至少85%一致之核苷酸序列；

(c)包含與SEQ ID NO: 9至少90%一致之核苷酸序列；

(d)包含與SEQ ID NO: 9至少95%一致之核苷酸序列；

(e)包含與SEQ ID NO: 9至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【請求項103】

如請求項101之聚核苷酸，其中該兔球蛋白聚A位點包含與SEQ ID NO: 9達100%一致之核苷酸序列。

【請求項104】

如請求項54至103中任一項之聚核苷酸，其中該AAV係AAV8。

【請求項105】

如請求項54至103中任一項之聚核苷酸，其中該AAV係AAV9。

【請求項106】

一種rAAV質體，其包含如請求項54至105中任一項之聚核苷酸。

【請求項107】

一種離體細胞，其包含如請求項54至105中任一項之聚核苷酸或如請求項106之rAAV質體。

【請求項108】

一種製備rAAV之方法，其包括用如請求項106之rAAV質體及一或多個輔助質體轉染離體細胞，該一或多個輔助質體共同包含AAV基因Rep、Cap、VA、E2a及E4之核苷酸序列。

【請求項109】

一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與如請求項1至52中任一項之rAAV或如請求項53之醫藥組成物。

【請求項110】

一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與如請求項1至24中任一項或當直接或間接地從屬於請求項1至24中任一項時如請求項35至52中任一項之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨及肝。

【請求項111】

如請求項110之方法，其中該hGALNS或該融合蛋白藉由在肝細胞中產生並自其分泌而經甘露糖-6-磷酸糖基化。

【請求項112】

一種用於治療經診斷患有MPS IVA之人類個體的方法，其包括藉由向該人類個體投與如請求項25至34中任一項或當直接或間接地從屬於請求項25至34中任一項時如請求項35至52中任一項之rAAV，將治療有效量之hGALNS或hGALNS與酸性寡肽融合之融合蛋白遞送至該人類個體之骨。

【請求項113】

一種rAAV，其包含：

(a) AAV殼體；及

(b)重組AAV基因體，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸序列，其中該轉殖基因編碼hGALNS，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項114】

如請求項13之rAAV，其中該AAV殼體係AAV8殼體或其變異體。

【請求項115】

如請求項13之rAAV，其中該AAV殼體係AAV9殼體或其變異體。

【請求項116】

一種聚核苷酸，其包含側接AAV-ITR之hGALNS表現卡匣，該hGALNS表現卡匣包含編碼啟動子之核苷酸序列及編碼轉殖基因之核苷酸

序列，且其中該編碼啟動子之核苷酸序列可操作地連接至該編碼轉殖基因之核苷酸序列。

【請求項117】

如請求項113至115中任一項之rAAV或如請求項116之聚核苷酸，其中該啟動子係TBG。

【請求項118】

如請求項113至115或117中任一項之rAAV或如請求項116至117中任一項之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 6至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 6至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 6至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 6至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 6至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 6達100%一致之核苷酸序列。

【請求項119】

如請求項113至115中任一項之rAAV或如請求項116之聚核苷酸，其中該啟動子係CAG。

【請求項120】

如請求項113至115或119中任一項之rAAV或如請求項116或119中任一項之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 28至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 28至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 28至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 28至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 28至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 28達100%一致之核苷酸序列。

【請求項121】

如請求項113至115中任一項之rAAV或如請求項116之聚核苷酸，其中該啟動子係LSPX1。

【請求項122】

如請求項113至115或121中任一項之rAAV或如請求項116或121中任一項之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a)與SEQ ID NO: 13至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 13至少85%一致之核苷酸序列；

(c)與SEQ ID NO: 13至少90%一致之核苷酸序列；

(d)與SEQ ID NO: 13至少95%一致之核苷酸序列；

(e)與SEQ ID NO: 13至少98%一致之核苷酸序列；或

(f)與SEQ ID NO: 13達100%一致之核苷酸序列。

【請求項123】

如請求項113至115中任一項之rAAV或如請求項116之聚核苷酸，其中該啟動子係LMTP6。

【請求項124】

如請求項113至115或123中任一項之rAAV或如請求項116或124中任一項之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a)與SEQ ID NO: 16至少80%一致之核苷酸序列；

(b)與SEQ ID NO: 16至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 16至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 16至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 16至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 16達100%一致之核苷酸序列。

【請求項125】

如請求項113至115中任一項之rAAV或如請求項116之聚核苷酸，其中該啟動子係LBTP2。

【請求項126】

如請求項113至115或125中任一項之rAAV或如請求項116或125中任一項之聚核苷酸，其中該編碼啟動子之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 18至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 18至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 18至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 18至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 18至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 18達100%一致之核苷酸序列。

【請求項127】

如請求項113至115或117至126中任一項之rAAV或如請求項116至126中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 27至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 27至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 27至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 27至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 27至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 27達100%一致之核苷酸序列。

【請求項128】

如請求項113至115或117至126中任一項之rAAV或如請求項116至126中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 3至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 3至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 3至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 3至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 3至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 3達100%一致之核苷酸序列。

【請求項129】

如請求項113至115或117至126中任一項之rAAV或如請求項116至126中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 12至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 12至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 12至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 12至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 12達100%一致之核苷酸序列。

【請求項130】

如請求項113至115或117至126中任一項之rAAV或如請求項116至126中任一項之聚核苷酸，其中該編碼轉殖基因之核苷酸序列包含：

(a) 與SEQ ID NO: 2至少80%一致之核苷酸序列；

(b) 與SEQ ID NO: 2至少85%一致之核苷酸序列；

(c) 與SEQ ID NO: 2至少90%一致之核苷酸序列；

(d) 與SEQ ID NO: 2至少95%一致之核苷酸序列；

(e) 與SEQ ID NO: 2至少98%一致之核苷酸序列；或

(f) 與SEQ ID NO: 2達100%一致之核苷酸序列。

【請求項131】

如請求項113至115或117至130中任一項之rAAV或如請求項116至130中任一項之聚核苷酸，其中該AAV-ITR係AAV2-ITR。

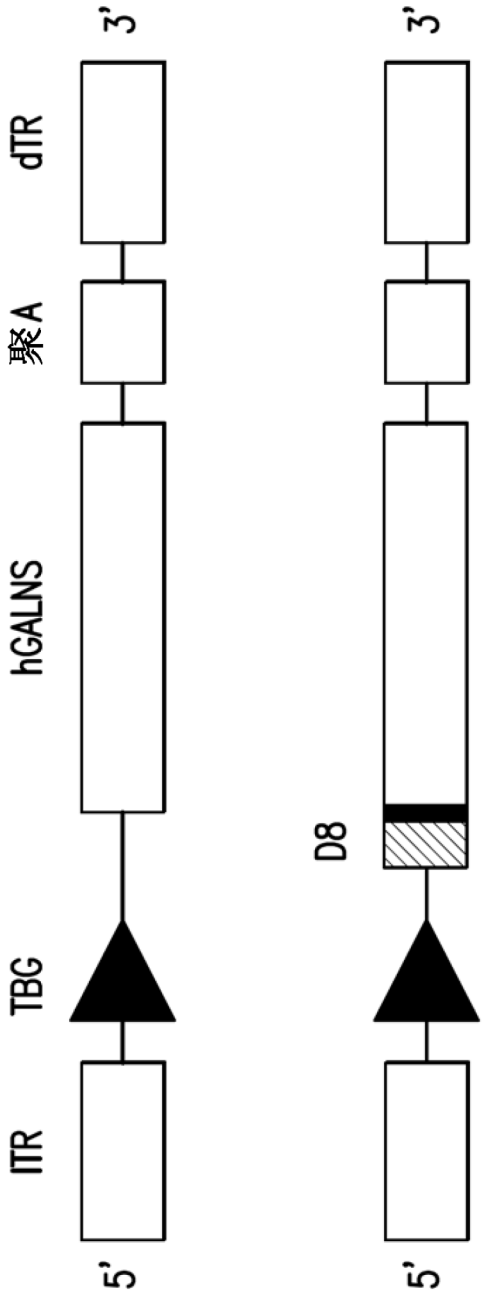
【請求項132】

一種醫藥組成物，其包含如請求項113至115或117至131中任一項之rAAV及醫藥學上可接受之載劑。

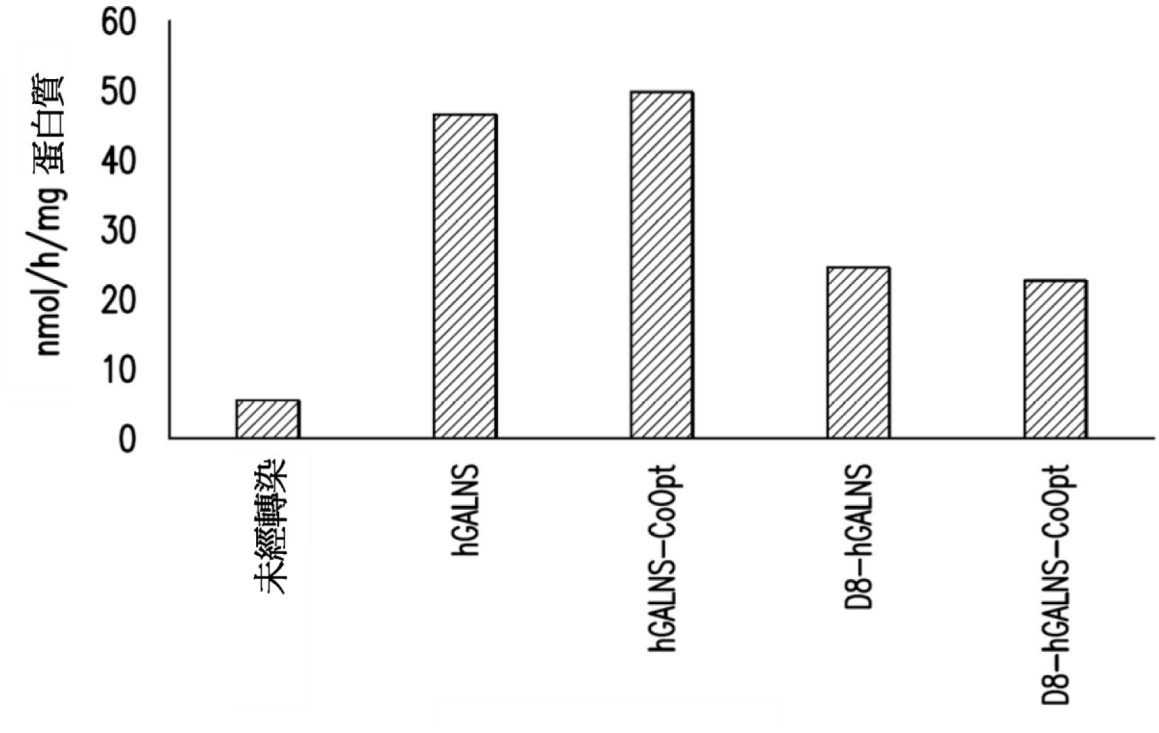
【請求項133】

一種用於治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)之人類個體的方法，其包括向該人類個體投與如請求項113至115或117至131中任一項之rAAV或如請求項132之醫藥組成物。

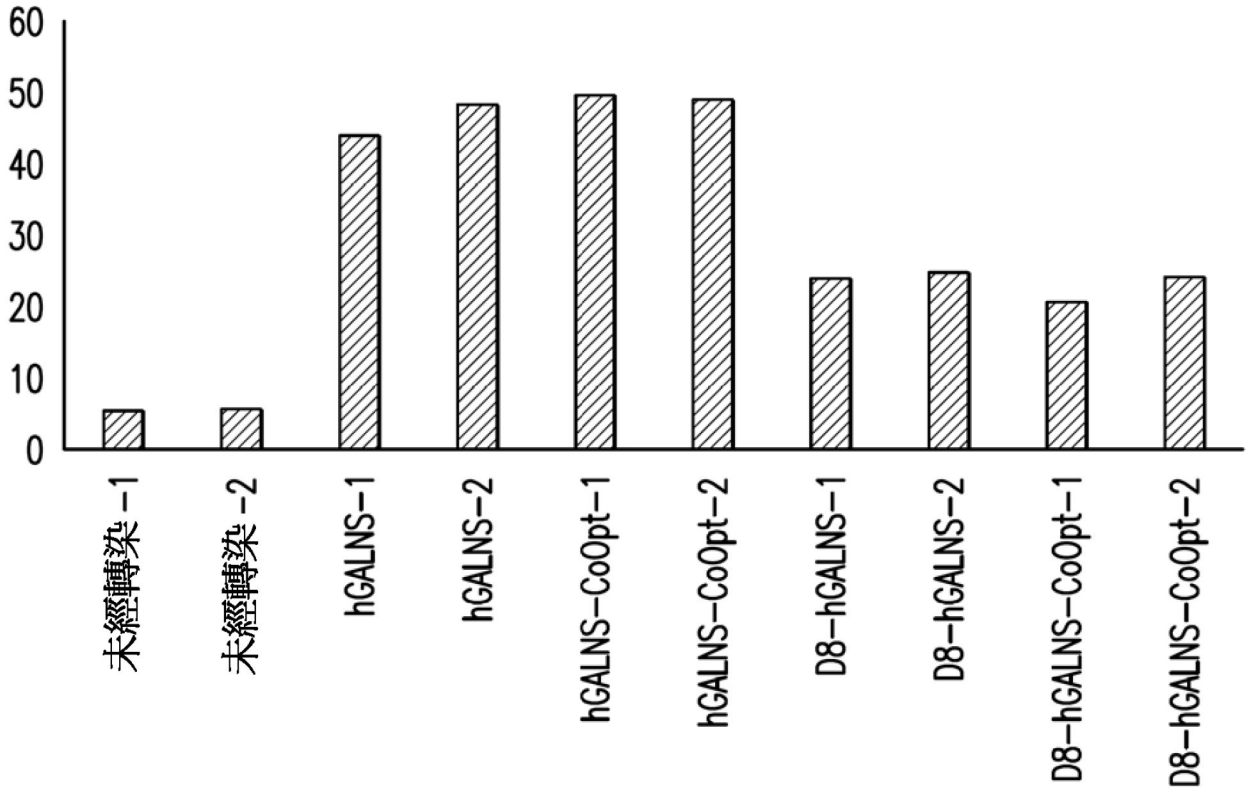
【發明圖式】



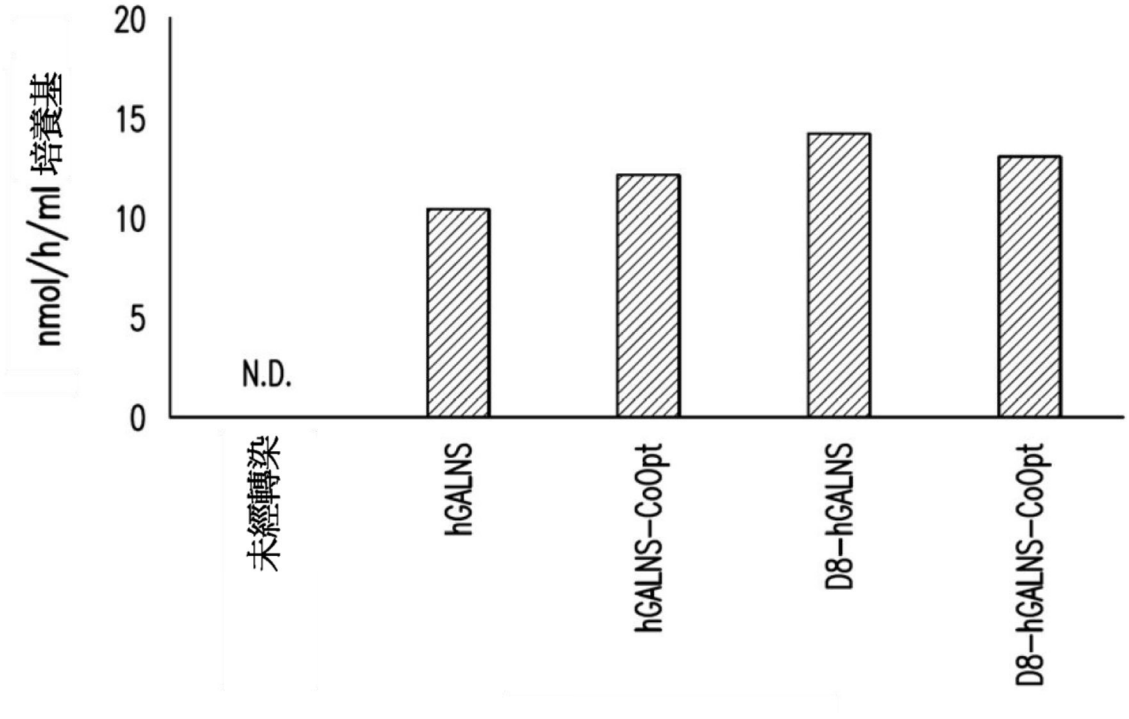
【圖 1】


nmol/h/mg 蛋白質
60
50
40
30
20
10
0
未經轉染
hGALNS
hGALNS-CoOpt
D8-hGALNS
D8-hGALNS-CoOpt

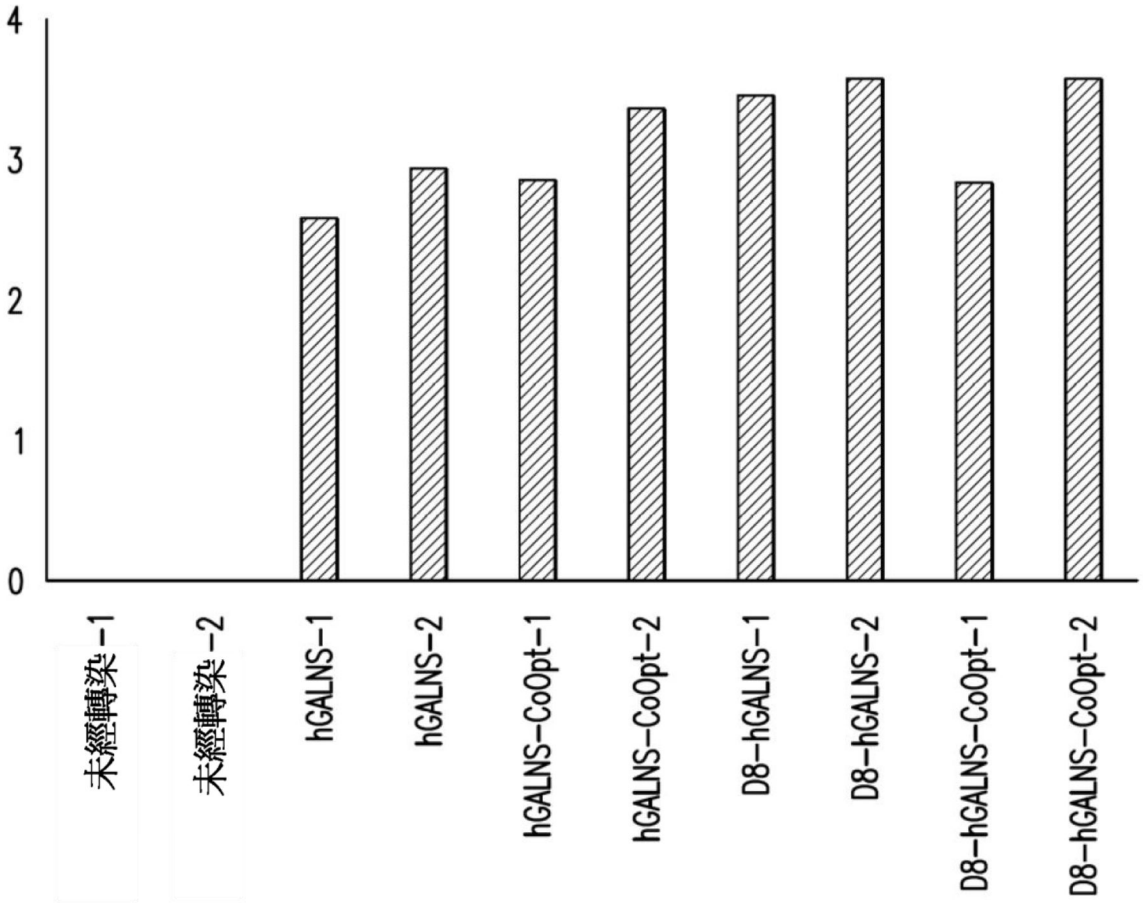
【圖 2A】


60
50
40
30
20
10
0
未經轉染-1
未經轉染-2
hGALNS-1
hGALNS-2
hGALNS-CoOpt-1
hGALNS-CoOpt-2
D8-hGALNS-1
D8-hGALNS-2
D8-hGALNS-CoOpt-1
D8-hGALNS-CoOpt-2

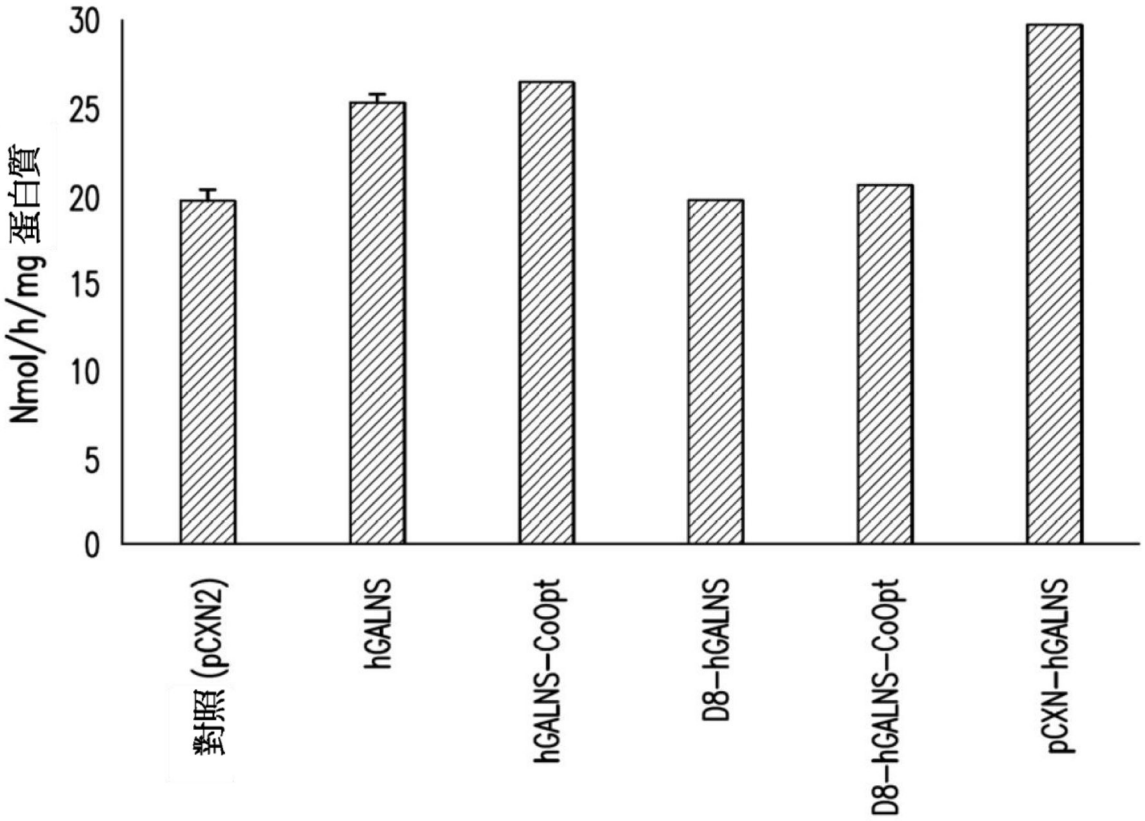
【圖 2B】


nmol/h/ml 培養基
20
15
10
5
0
N.D.
未經轉染
hGALNS
hGALNS-CoOpt
D8-hGALNS
D8-hGALNS-CoOpt

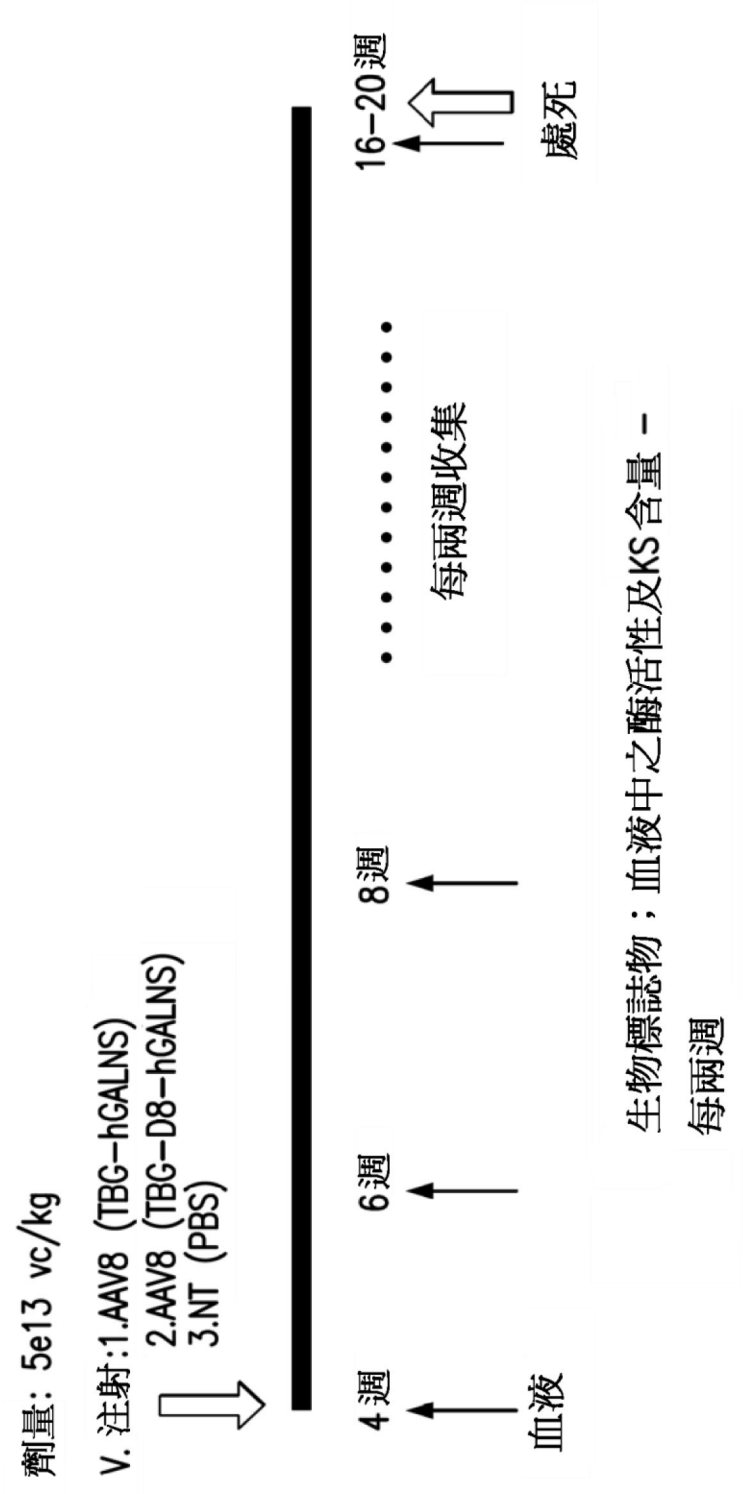
【圖 2C】


4
3
2
1
0
未經轉染-1
未經轉染-2
hGALNS-1
hGALNS-2
hGALNS-CoOpt-1
hGALNS-CoOpt-2
D8-hGALNS-1
D8-hGALNS-2
D8-hGALNS-CoOpt-1
D8-hGALNS-CoOpt-2

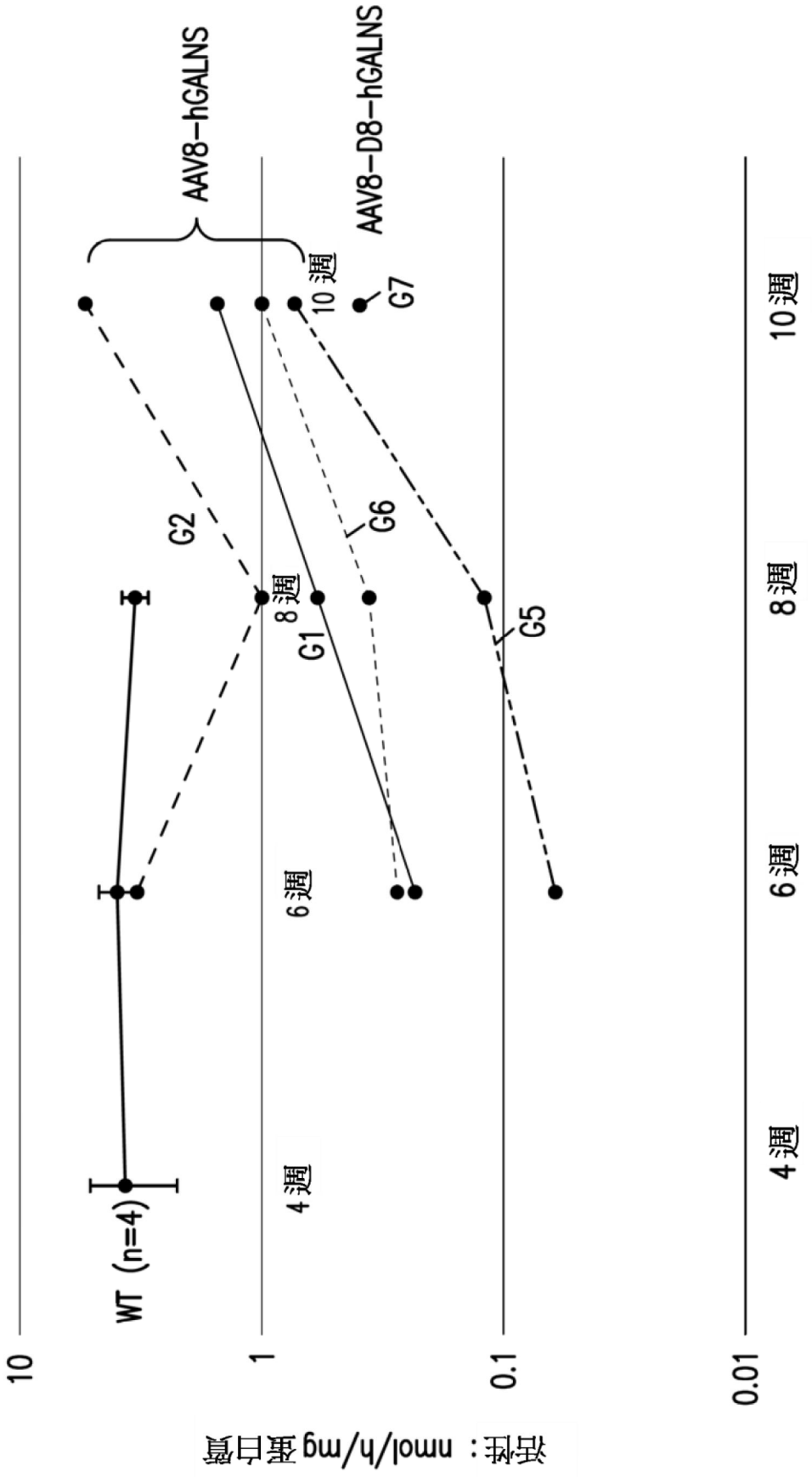
【圖 2D】


Nmol/h/mg 蛋白質
30
25
20
15
10
5
0
對照 (pCXN2)
hGALNS
hGALNS-CoOpt
D8-hGALNS
D8-hGALNS-CoOpt
pCXN-hGALNS

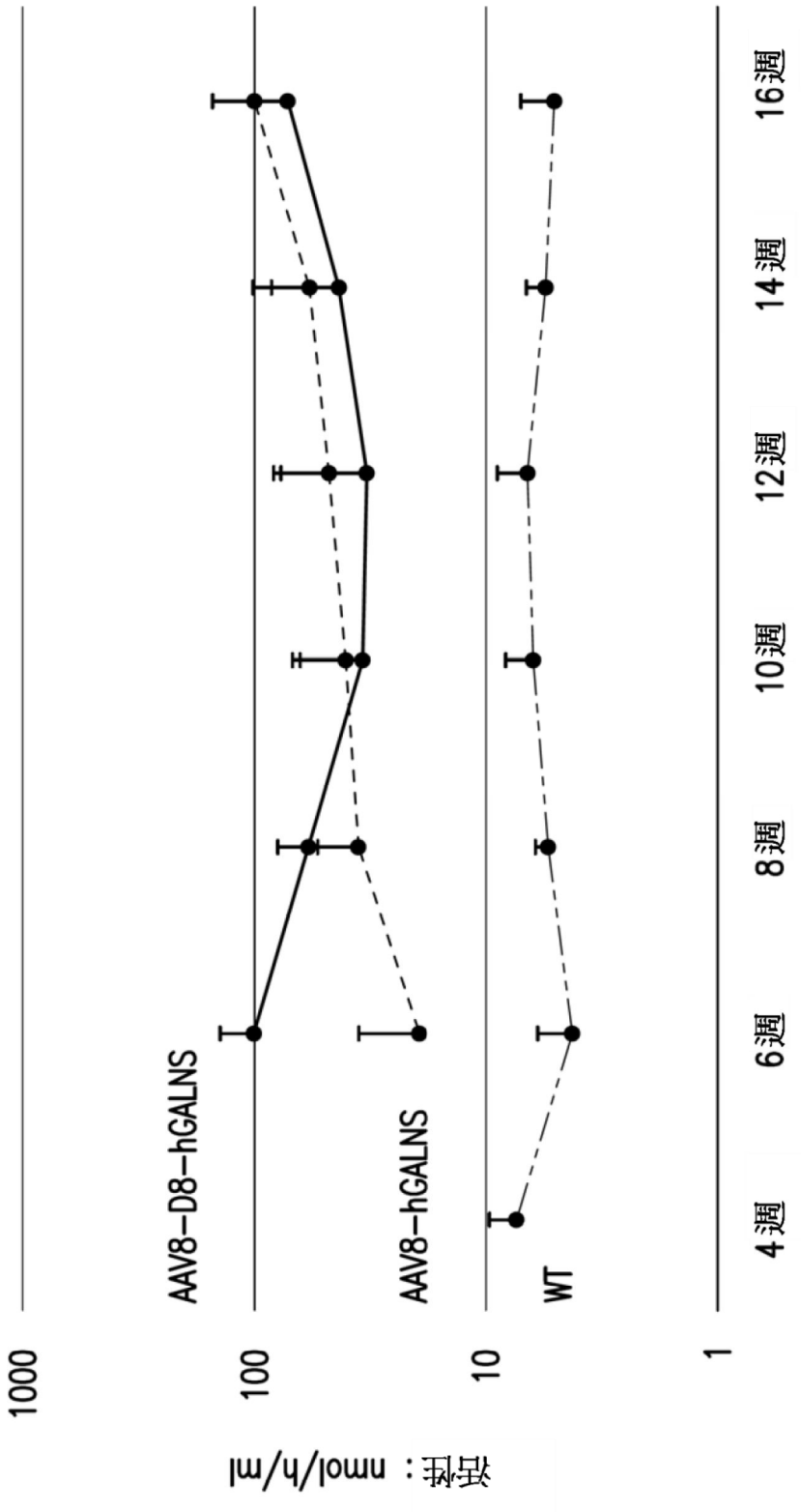
【圖 3】


劑量：5e13 vc/kg
V. 注射:1.AAV8 (TBG-hGALNS)
2.AAV8 (TBG-D8-hGALNS)
3.NT (PBS)
4週
6週
8週
16-20週
血液
每兩週收集
處死
生物標誌物；血液中之酶活性及KS含量 -
每兩週

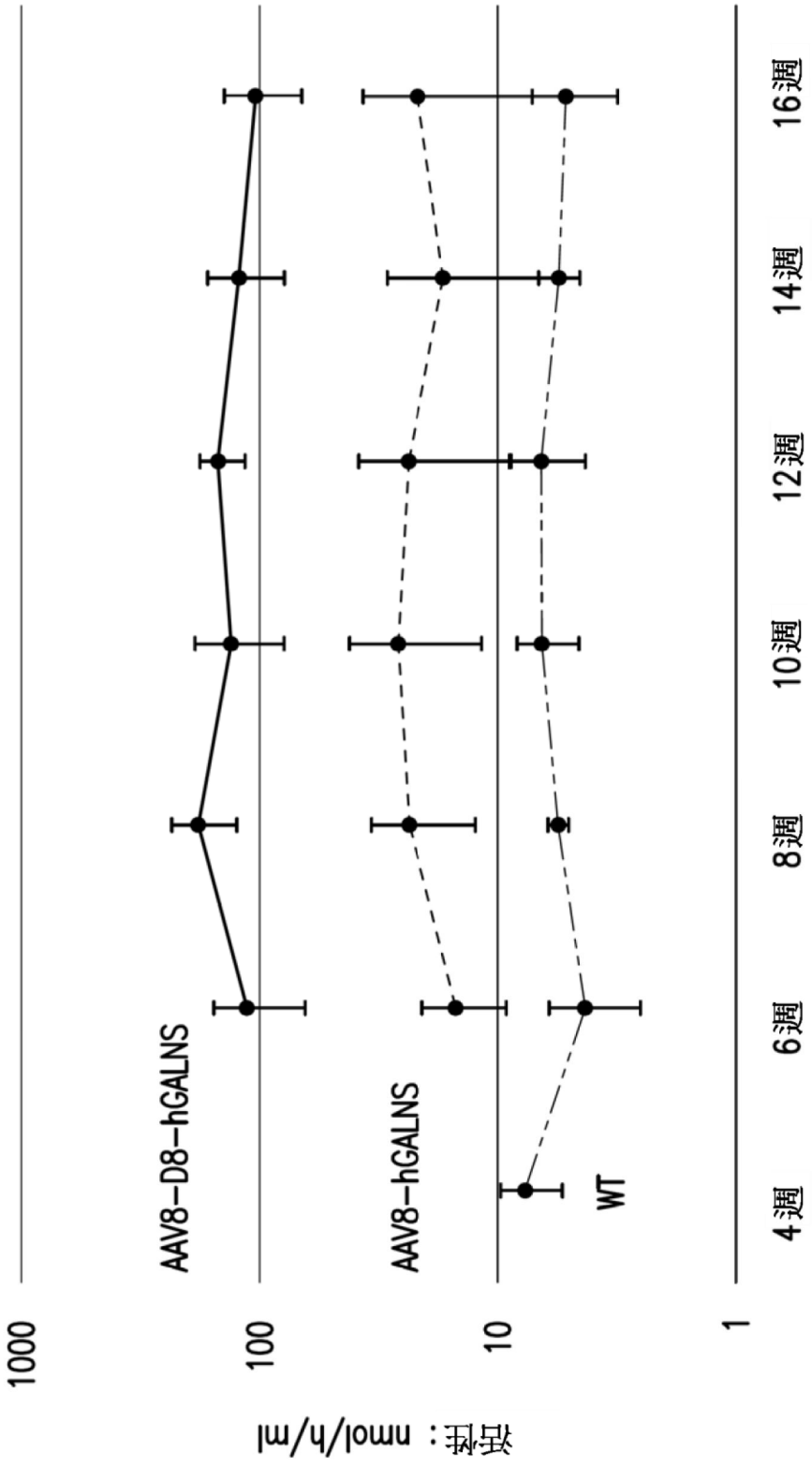
【圖 4】


AAV8−hGALNS
AAV8−D8−hGALNS
10 週
G7
G2
G6
8 週
G1
G5
6 週
4 週
WT (n=4)
10
1
0.1
0.01
4 週
6 週
8 週
10 週
活性：nmol/h/mg 蛋白質

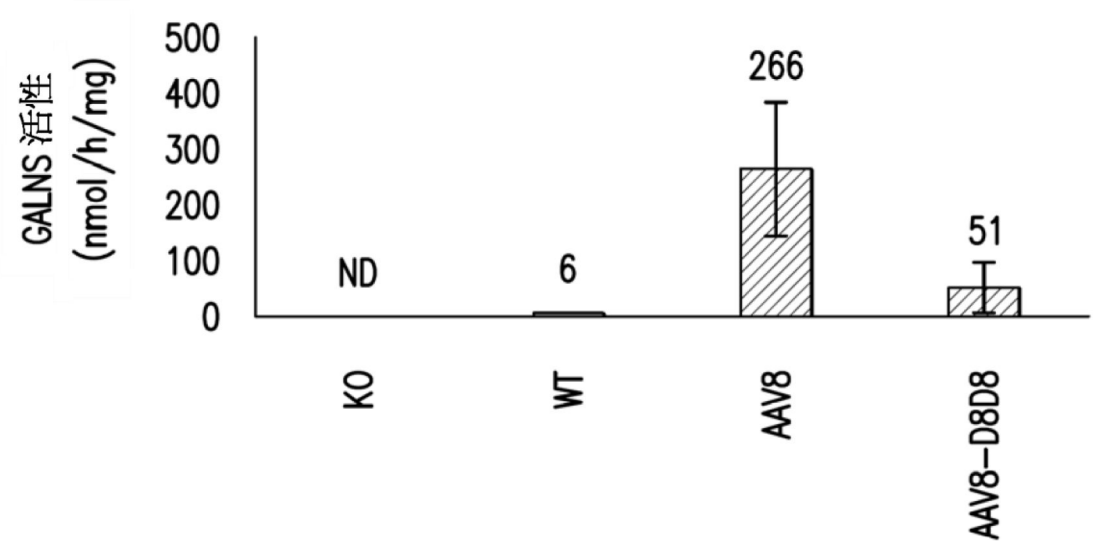
【圖 5A】


活性：nmol/h/ml
1000
100
10
1
AAV8-D8-hGALNS
AAV8-hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週

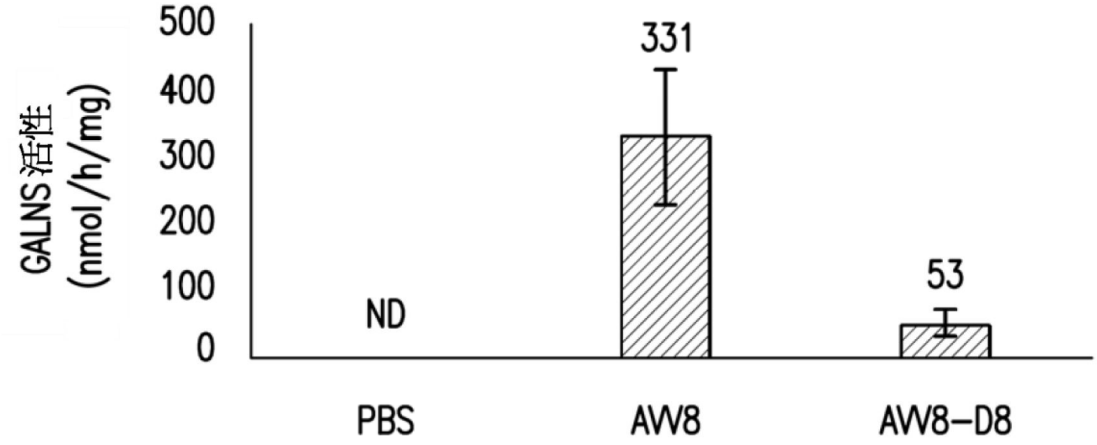
【圖 5B】


活性：nmol/h/ml
1000
100
10
1
AAV8−D8−hGALNS
AAV8−hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週

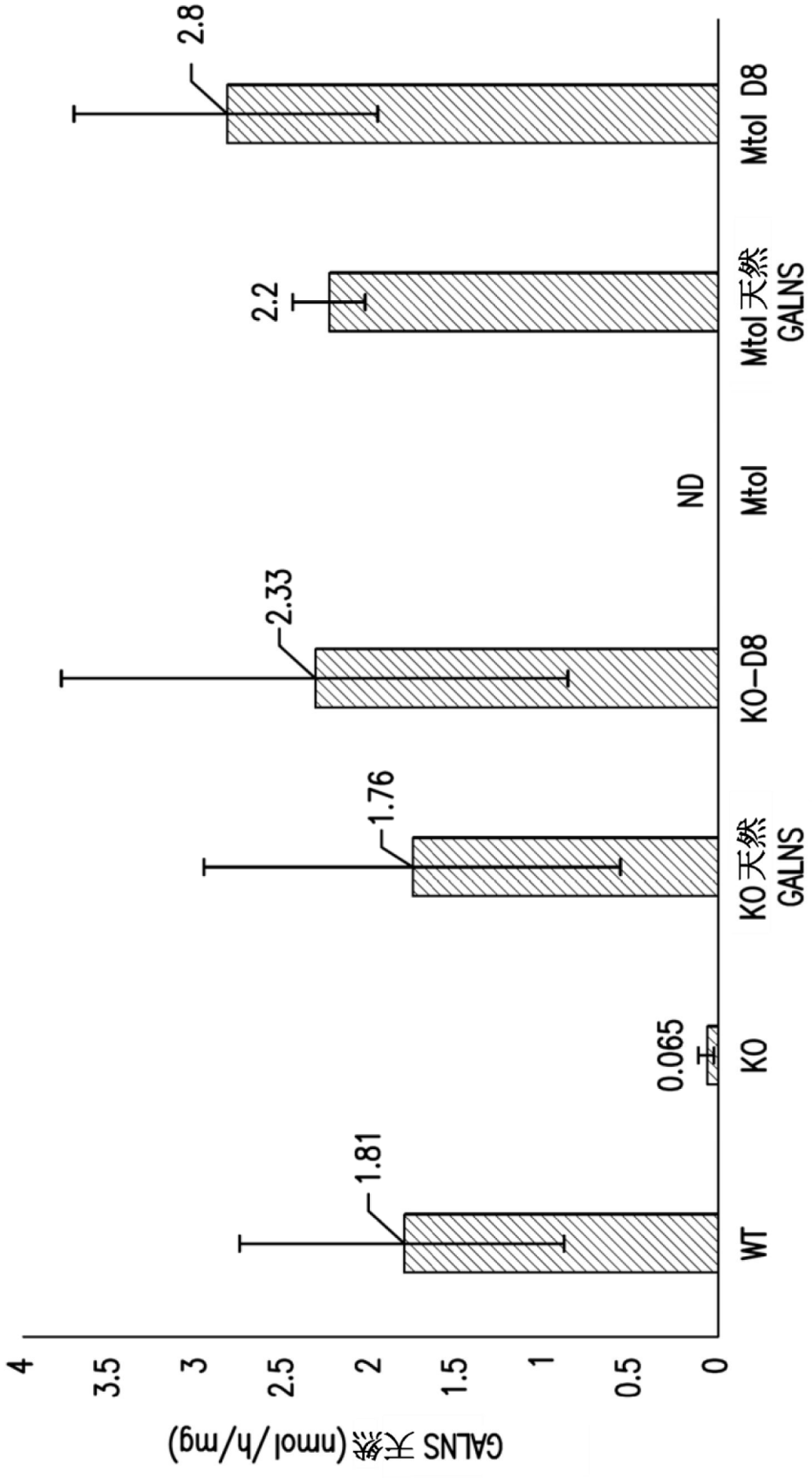
【圖 6】


GALNS 活性
(nmol/h/mg)
500
400
300
200
100
0
ND
6
266
51
KO
WT
AAV8
AAV8-D8D8

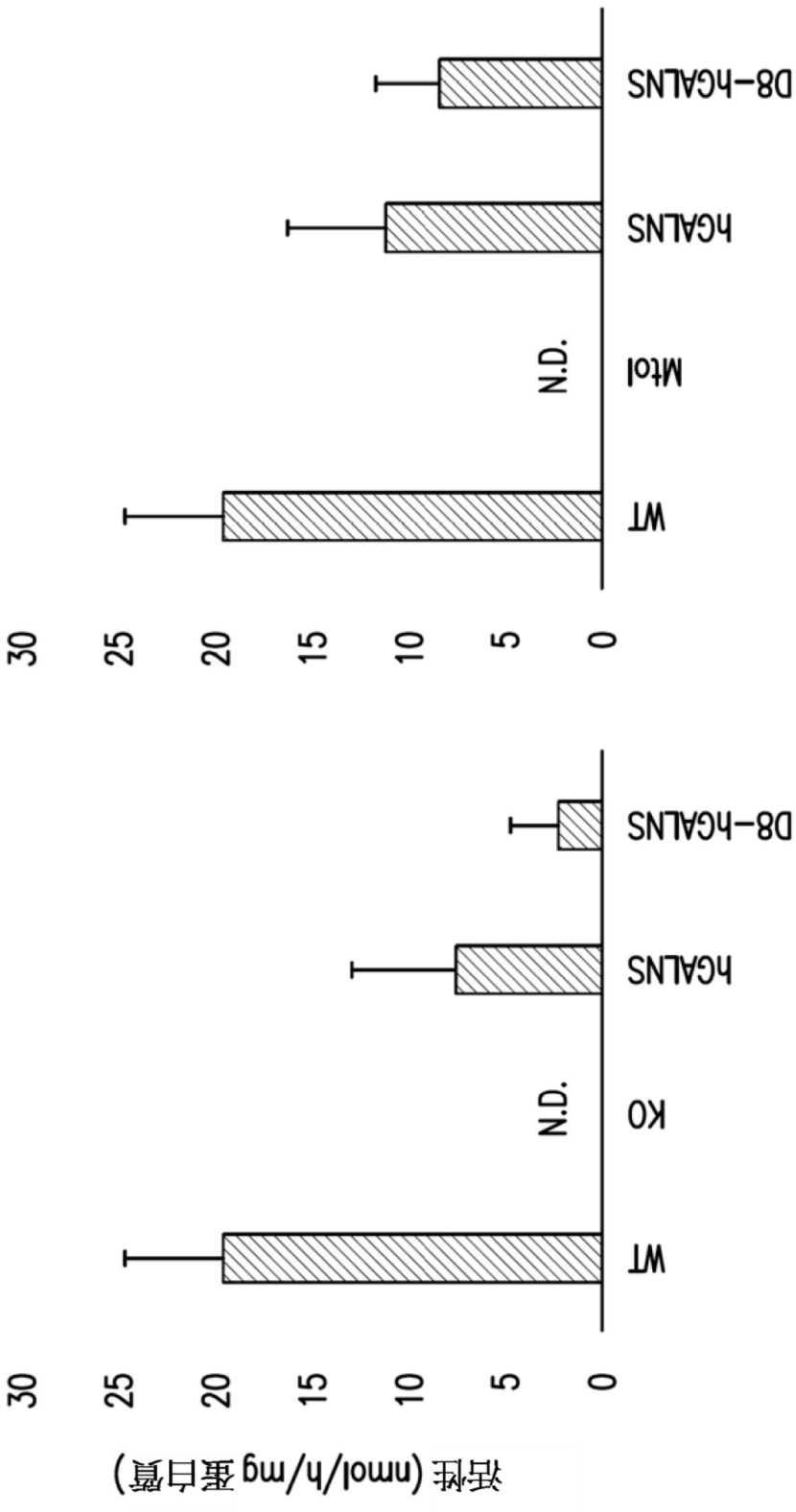
【圖 7A】


GALNS活性
(nmol/h/mg)
500
400
300
200
100
0
ND
331
53
PBS
AAV8
AAV8-D8

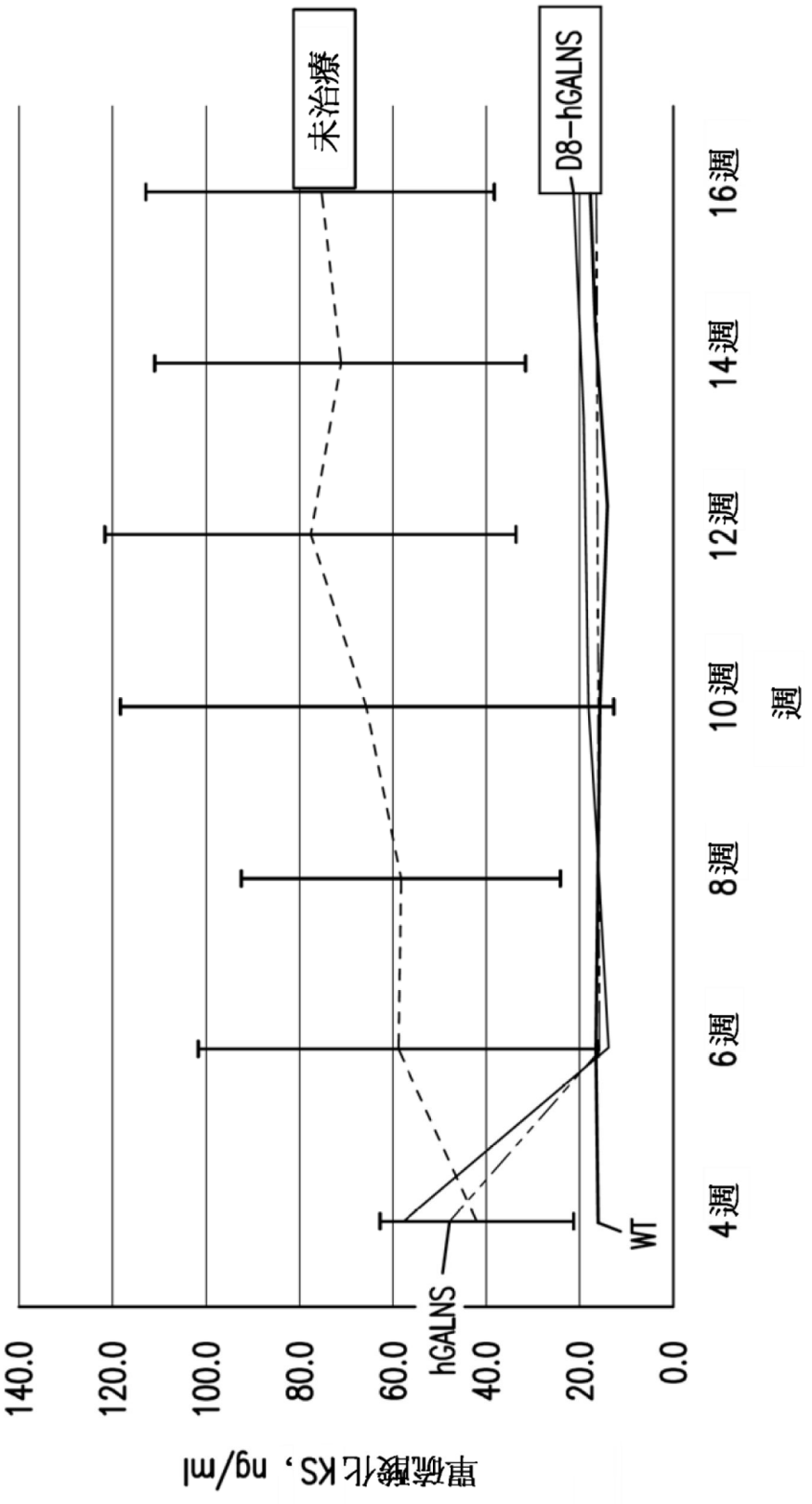
【圖 7B】


GALNS 天然 (nmol/h/mg)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.81
0.065
1.76
2.33
ND
2.2
2.8
WT
KO
KO 天然 GALNS
KO-D8
Mtol
Mtol 天然 GALNS
Mtol D8

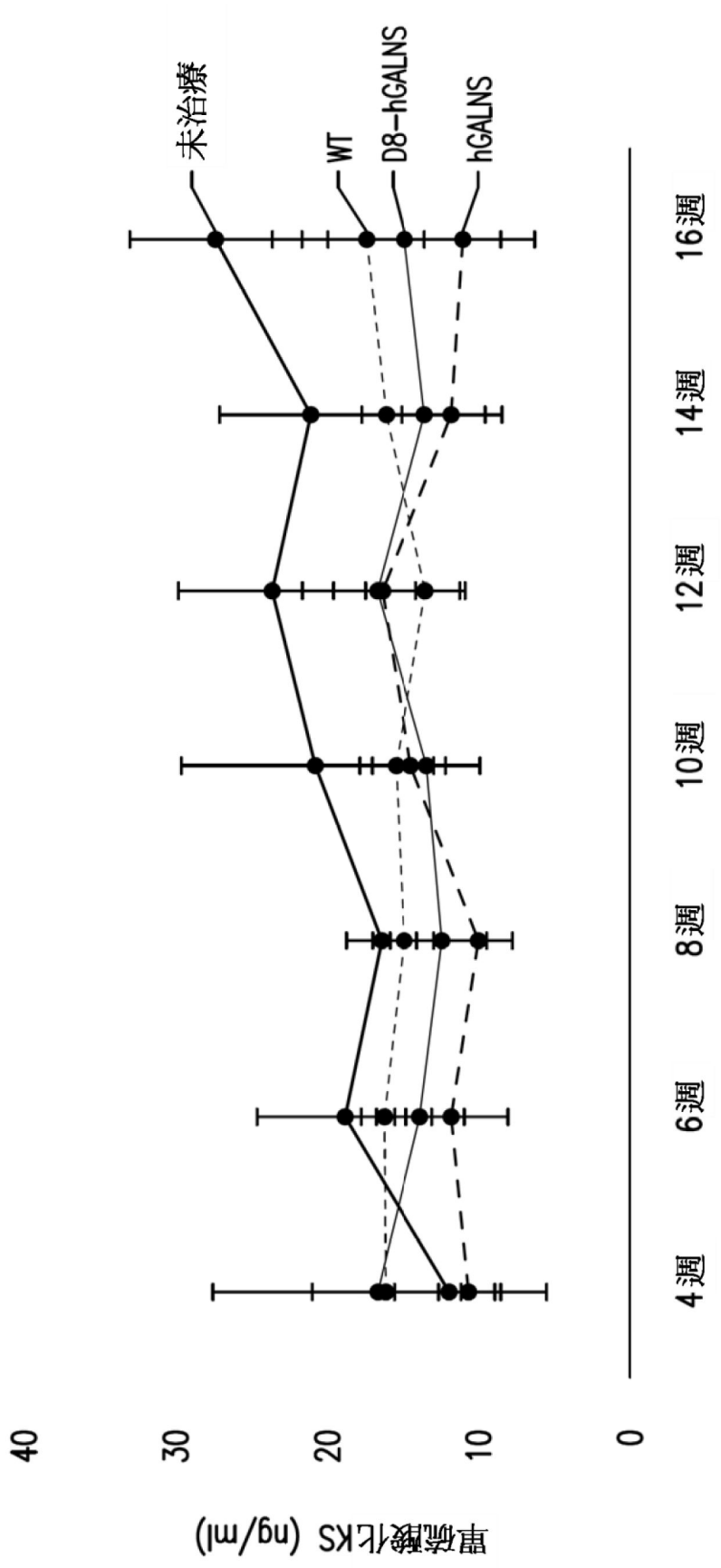
【圖 7C】


活性 (nmol/h/mg 蛋白質)
0
5
10
15
20
25
30
WT
KO
hGALNS
DB-hGALNS
N.D.
WT
Mtol
hGALNS
DB-hGALNS
N.D.

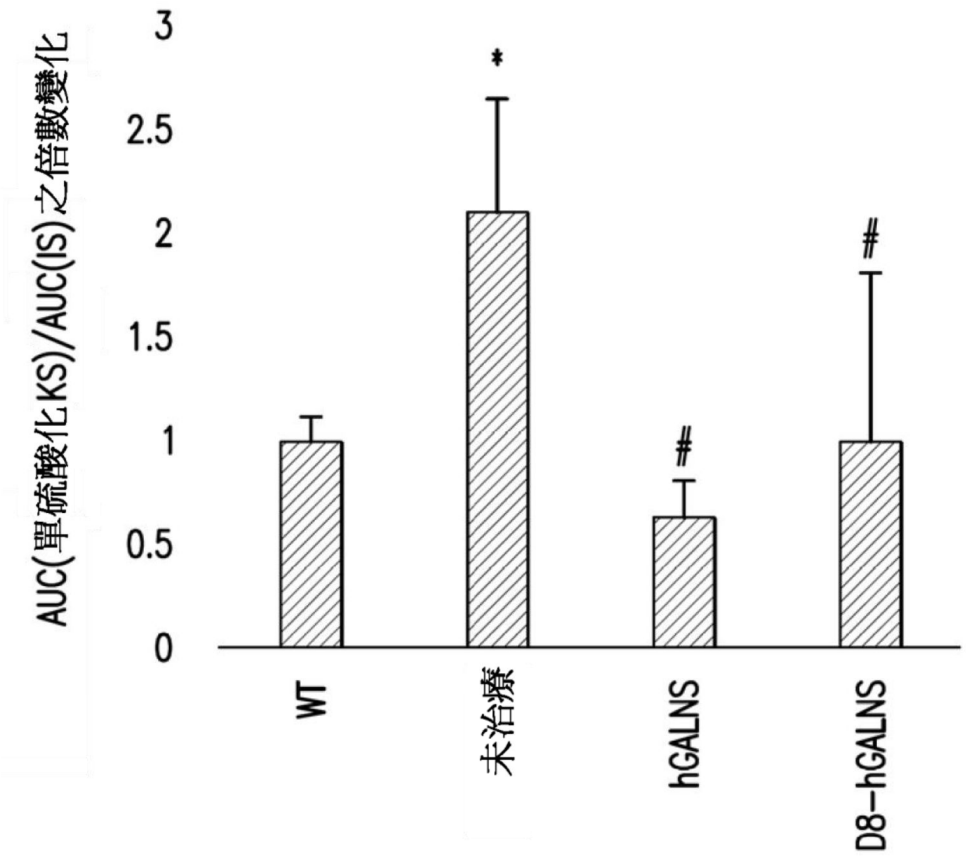
【圖 7D】


未治療
D8-hGALNS
hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週
週
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
120.0
140.0
單磺酸化KS，ng/ml

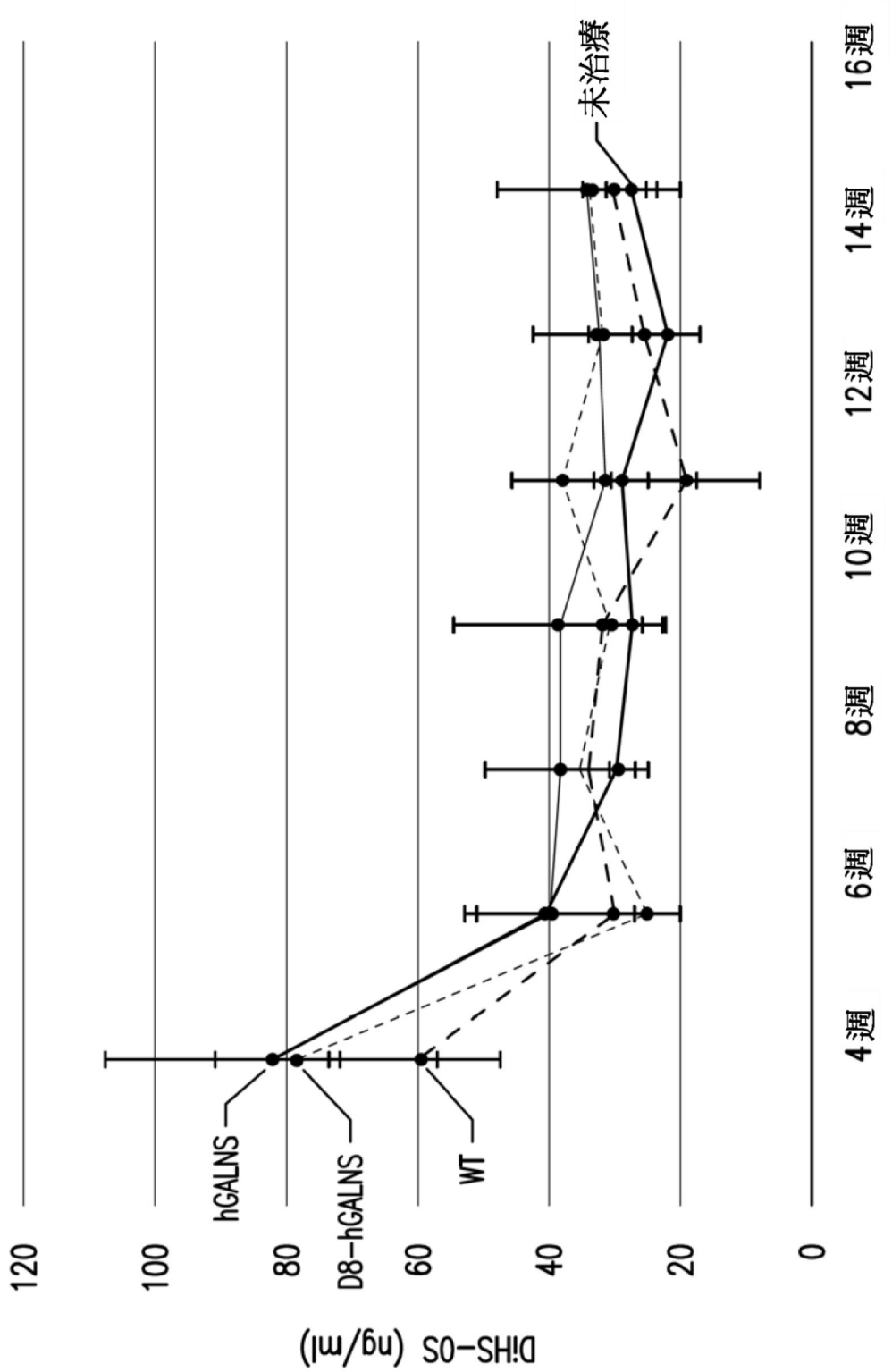
【圖 8】


未治療
WT
D8-hGALNS
hGALNS
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週
0
10
20
30
40
單硫酸化KS (ng/ml)

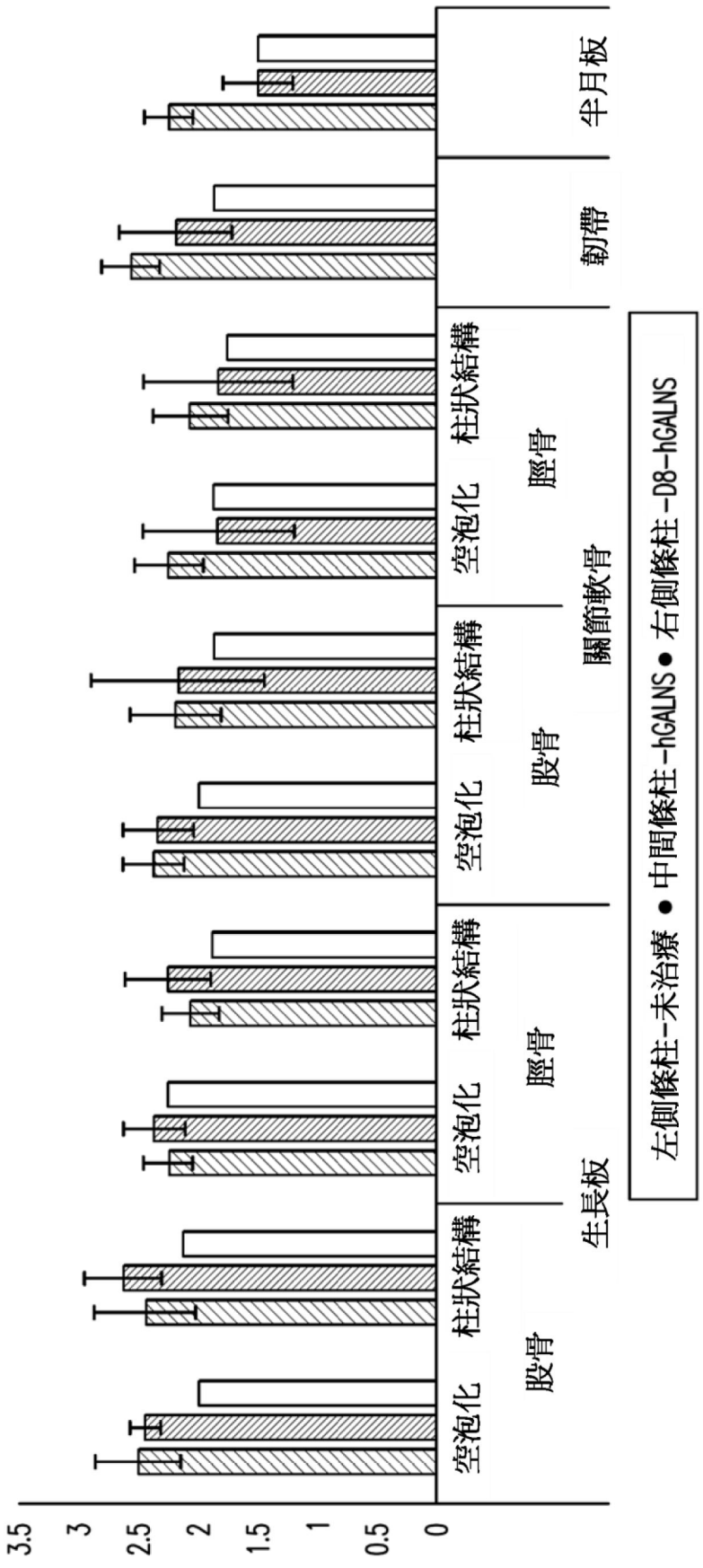
【圖 9A】



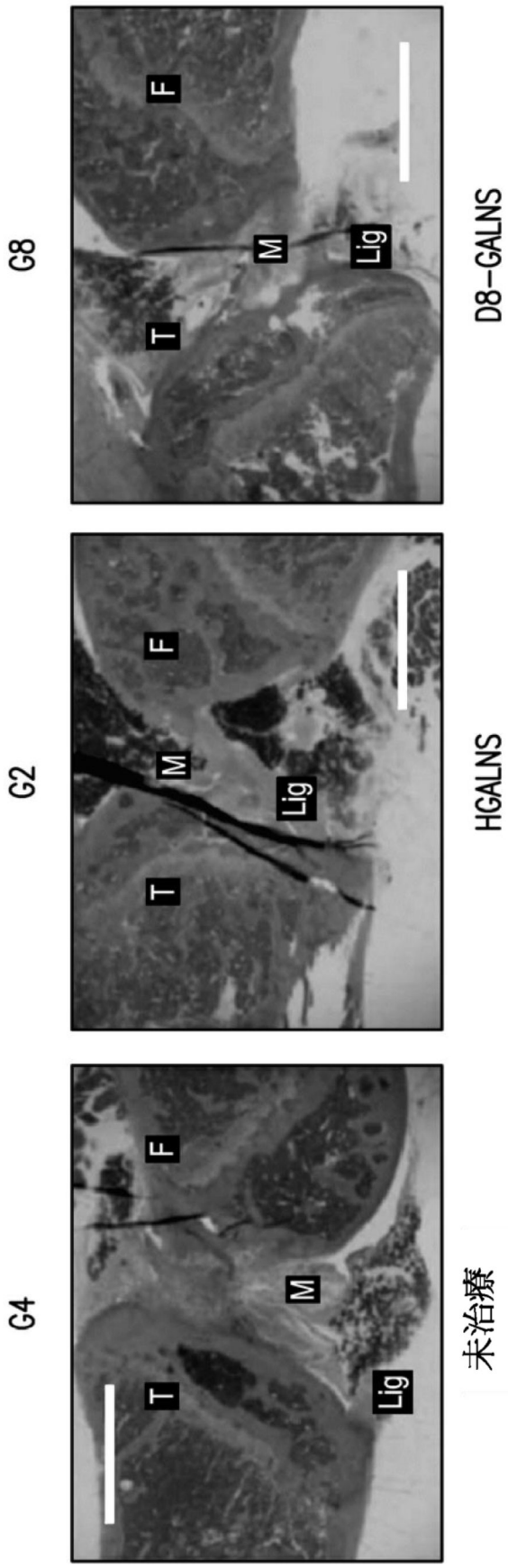
【圖 9B】


未治療
hGALNS
D8-hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週
0
20
40
60
80
100
120
DiHS-OS (ng/ml)

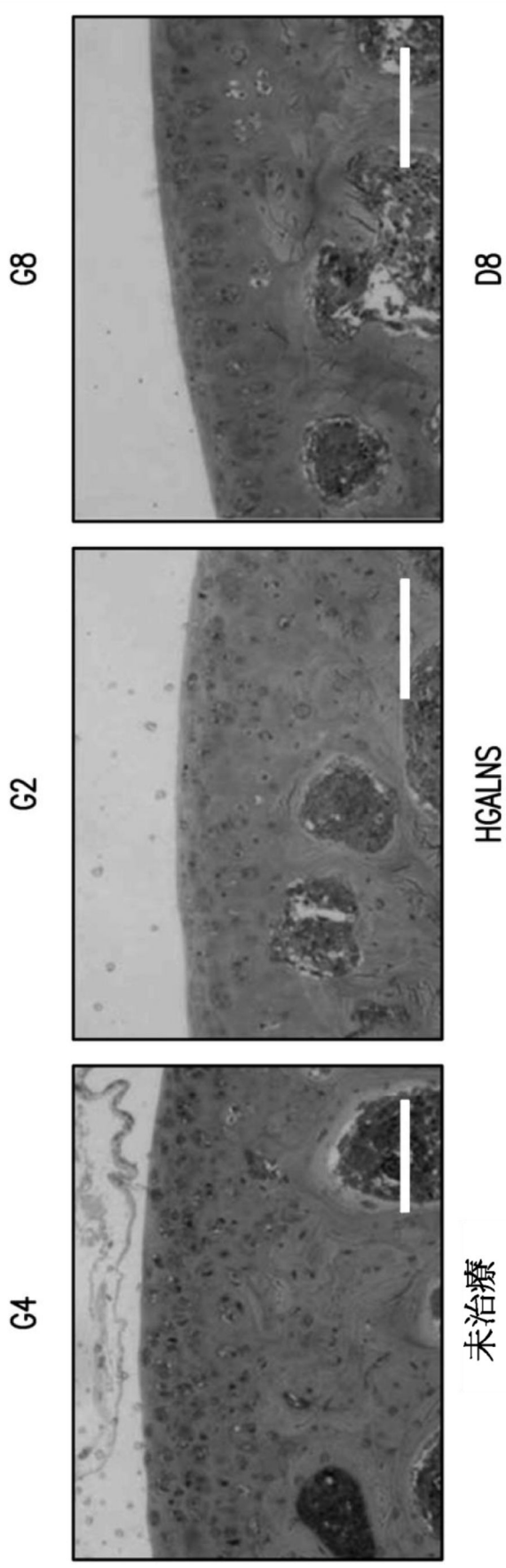
【圖 10】


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
空泡化
柱狀結構
股骨
空泡化
柱狀結構
脛骨
生長板
空泡化
柱狀結構
股骨
空泡化
柱狀結構
脛骨
關節軟骨
韌帶
半月板
左側條柱-未治療 ● 中間條柱-hGALNS ● 右側條柱-D8-hGALNS

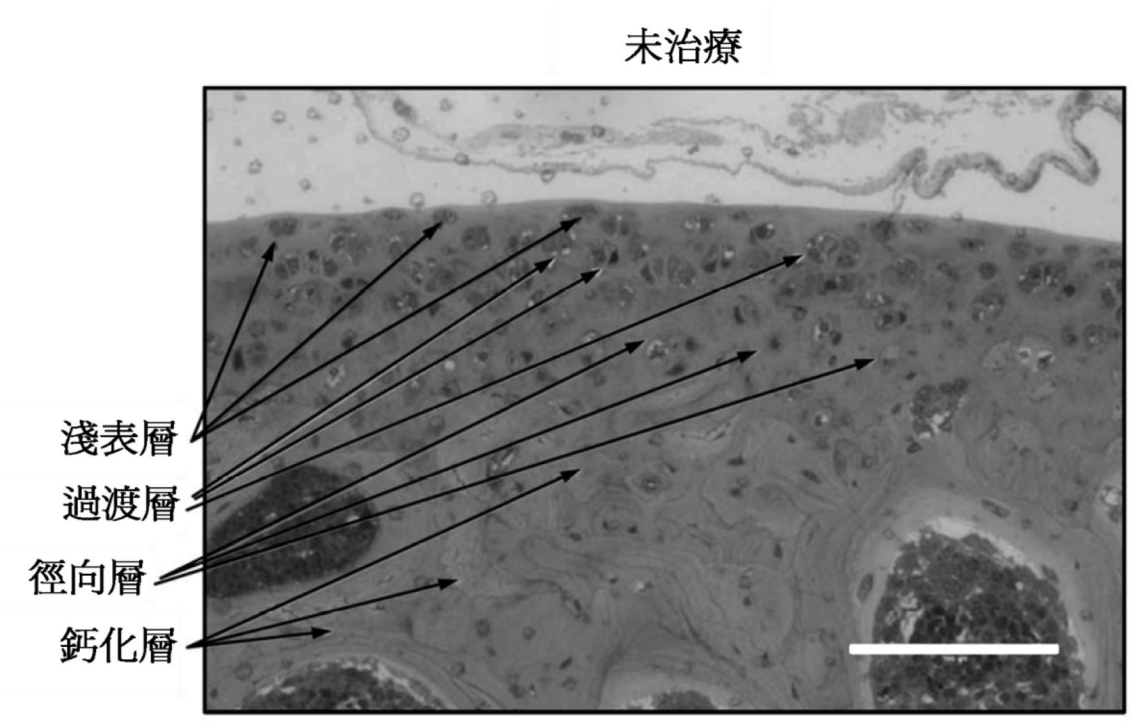
【圖 11A】



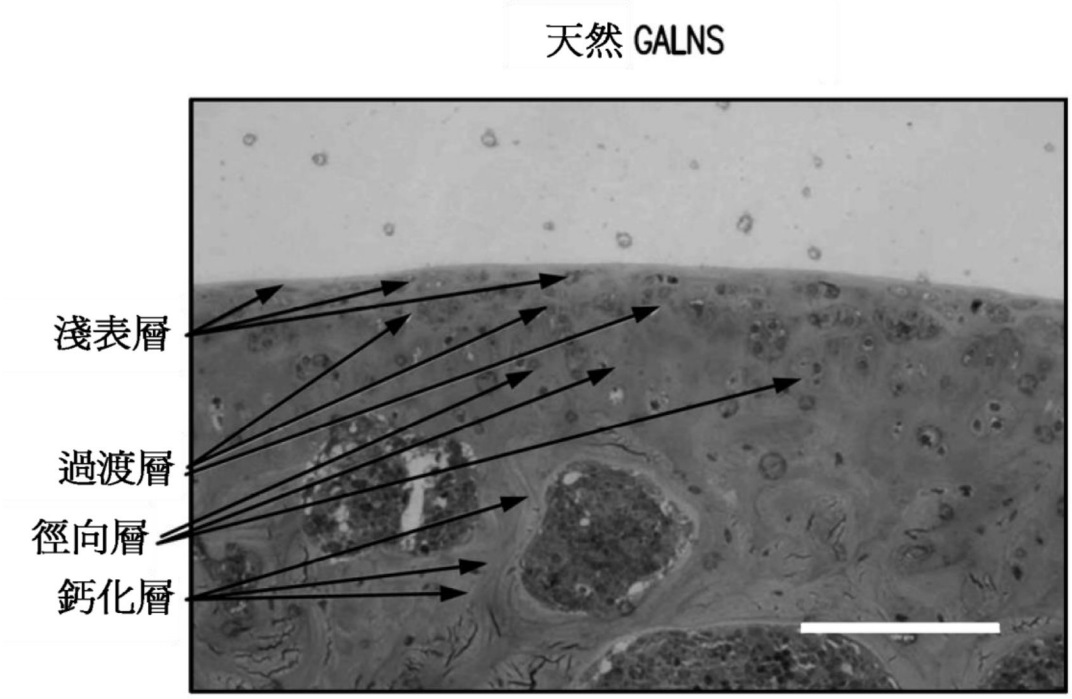
【圖 11B】



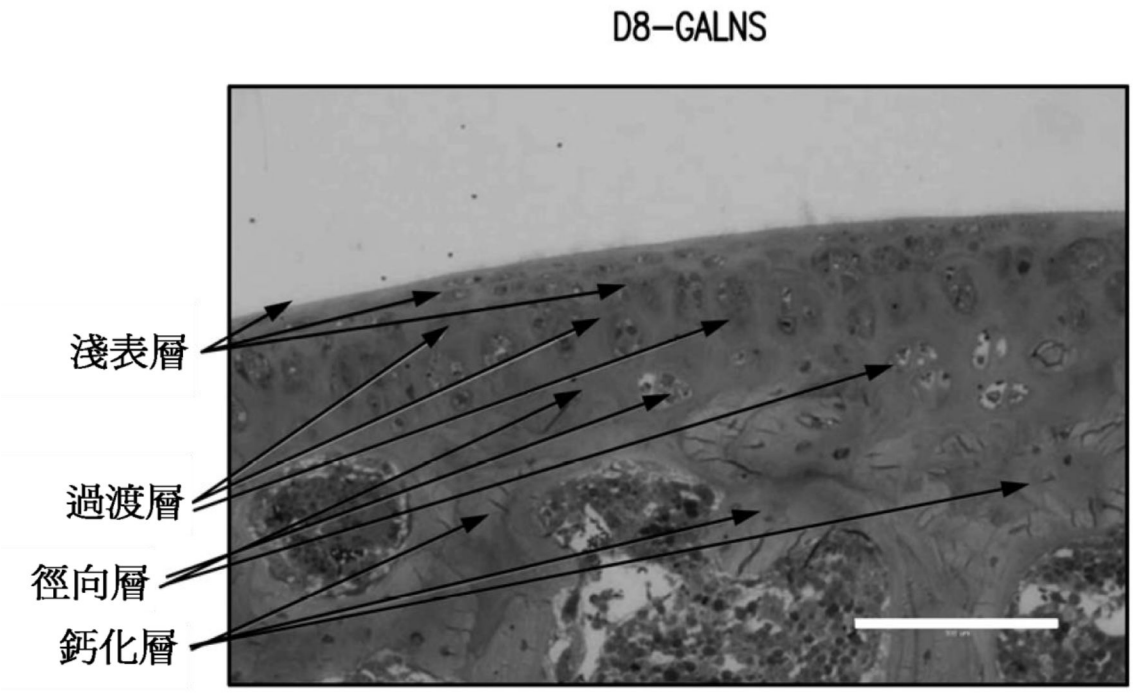
【圖 11C】



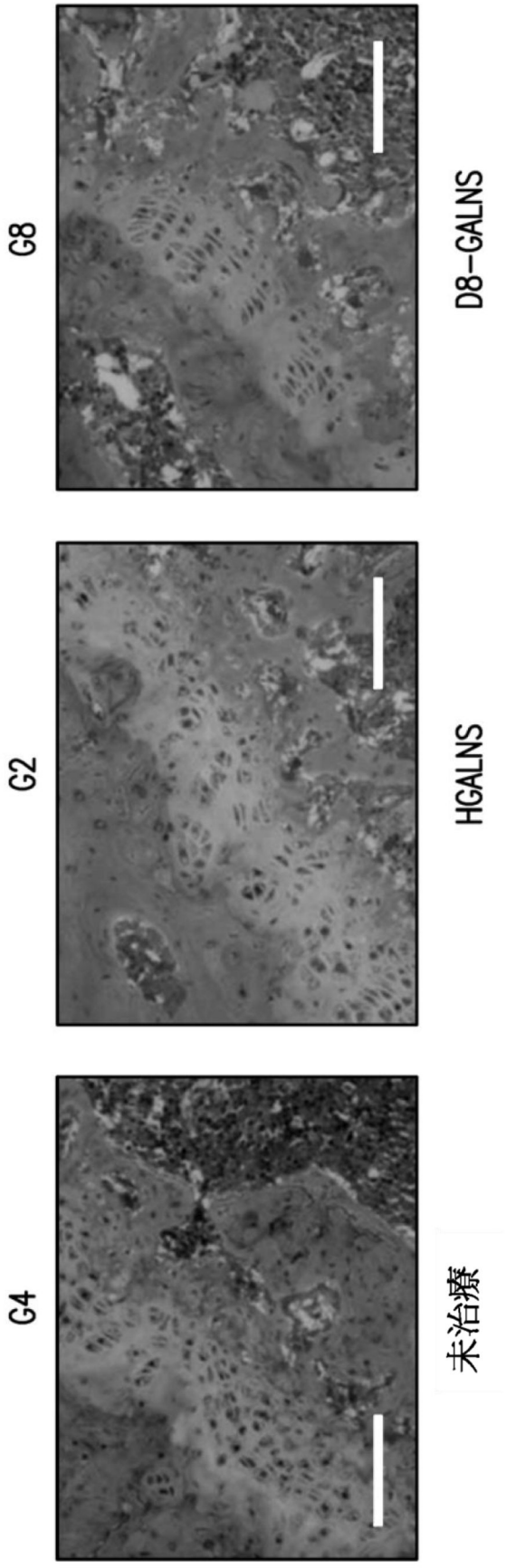
【圖 11D】



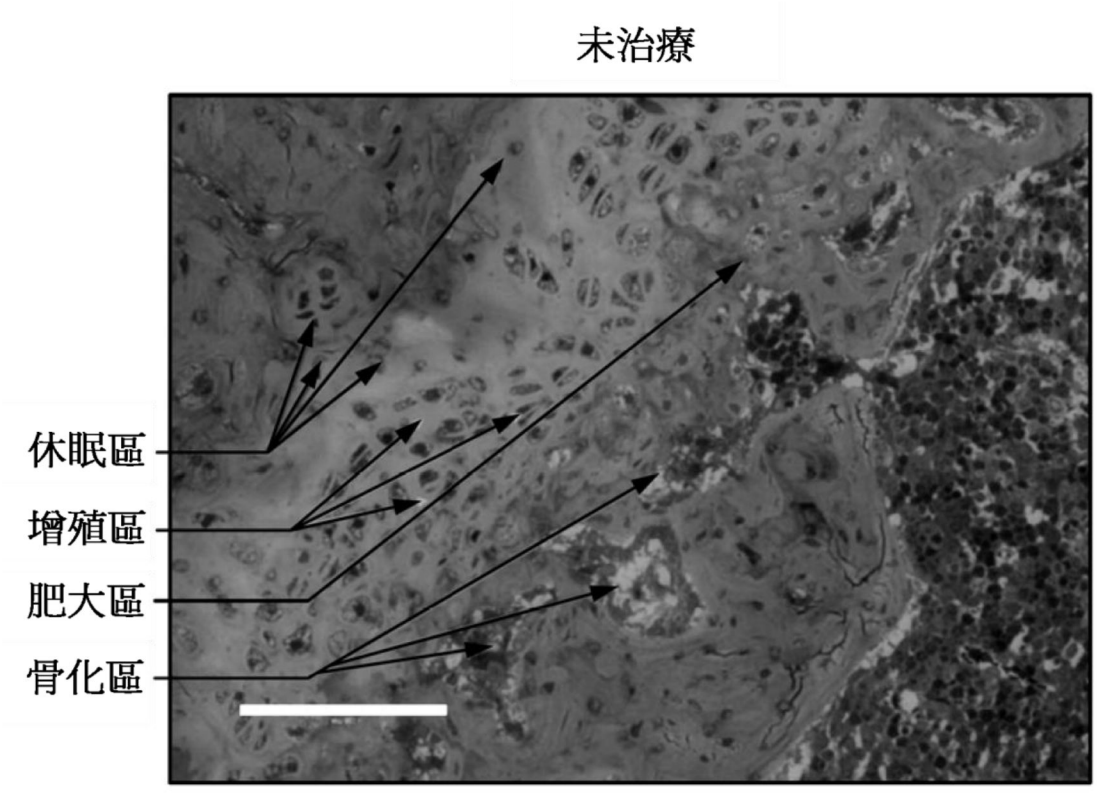
【圖 11E】



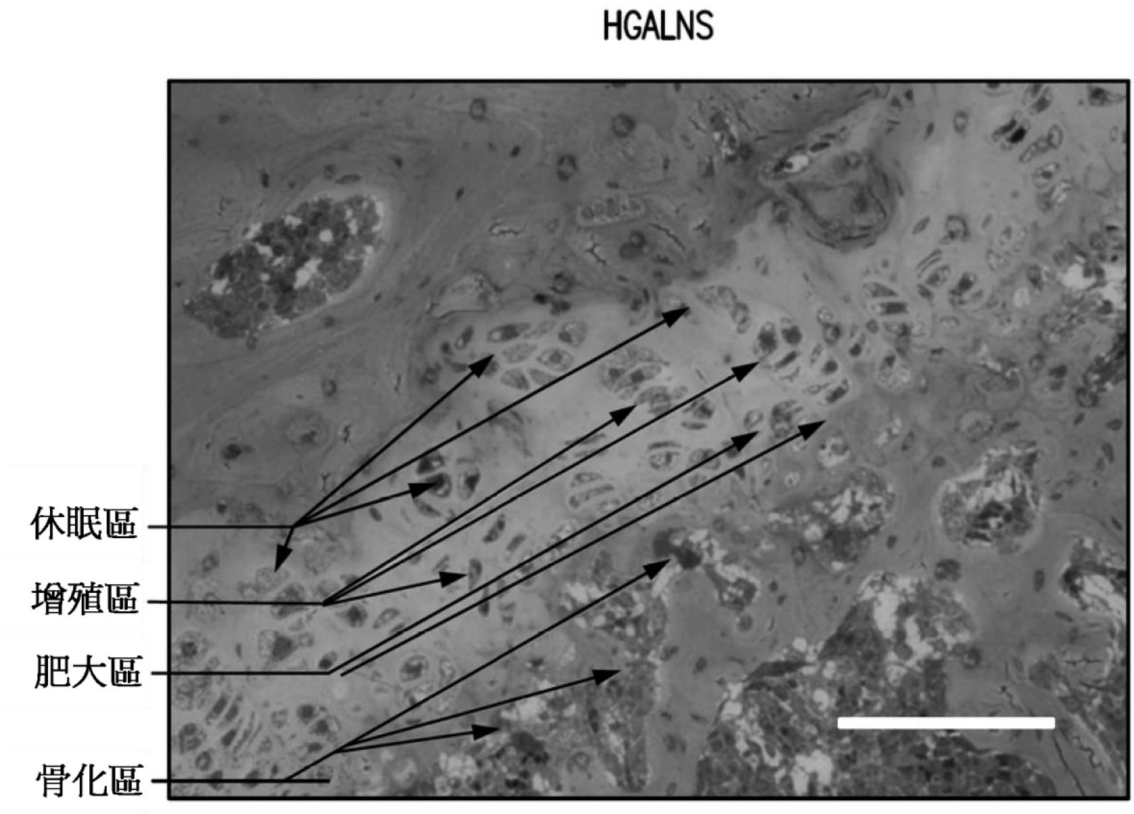
【圖 11F】



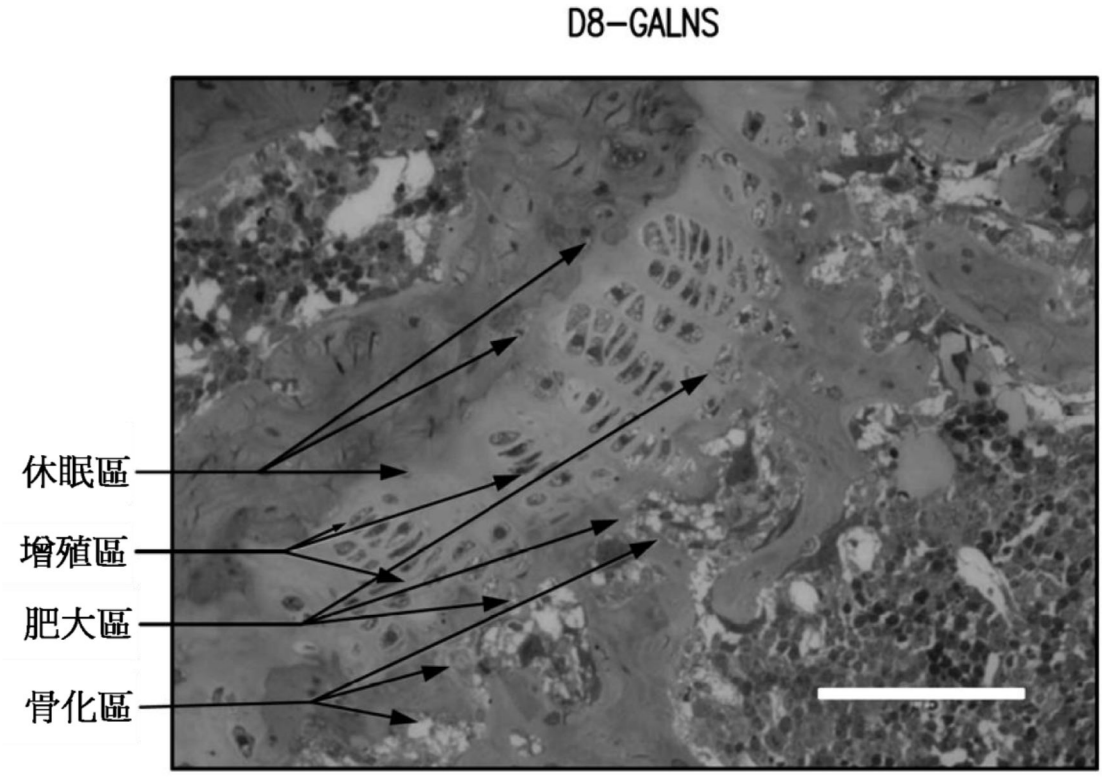
【圖 11G】



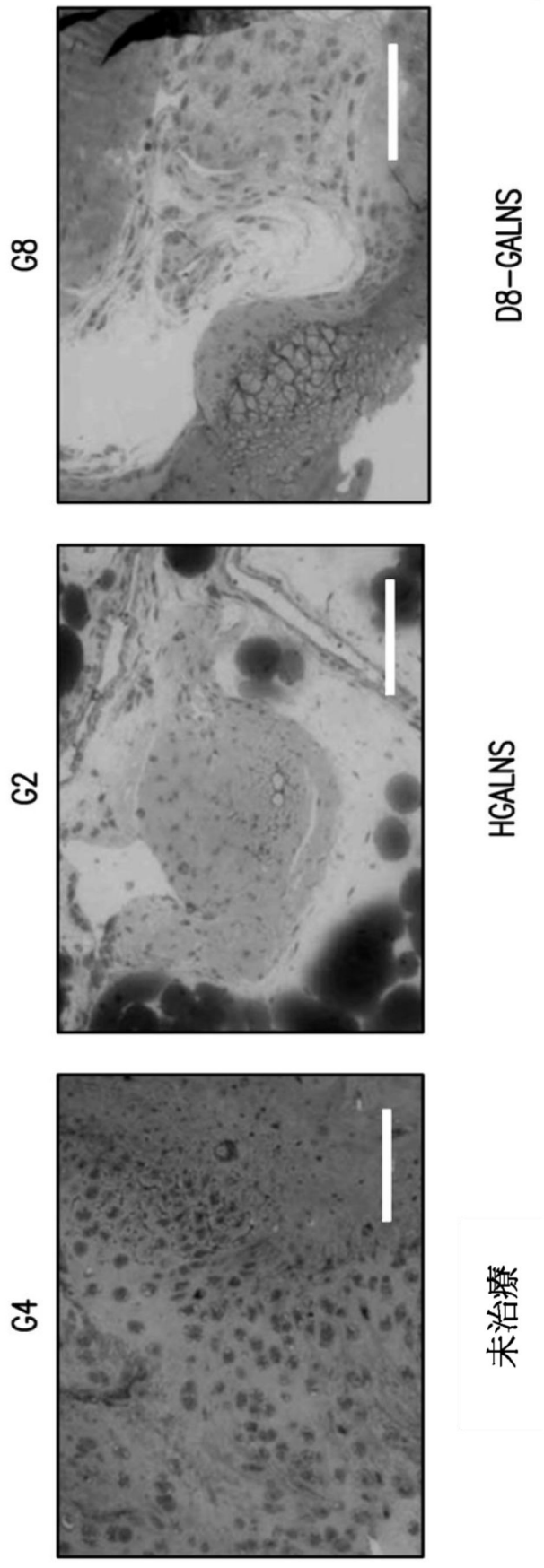
【圖 11H】



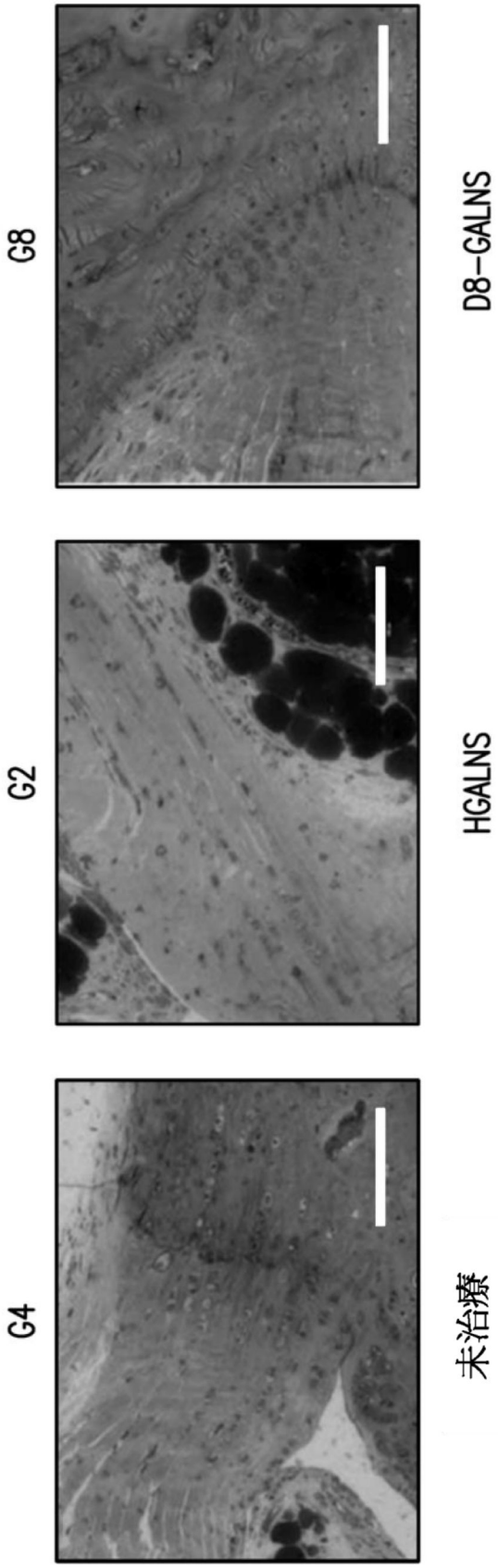
【圖 11I】



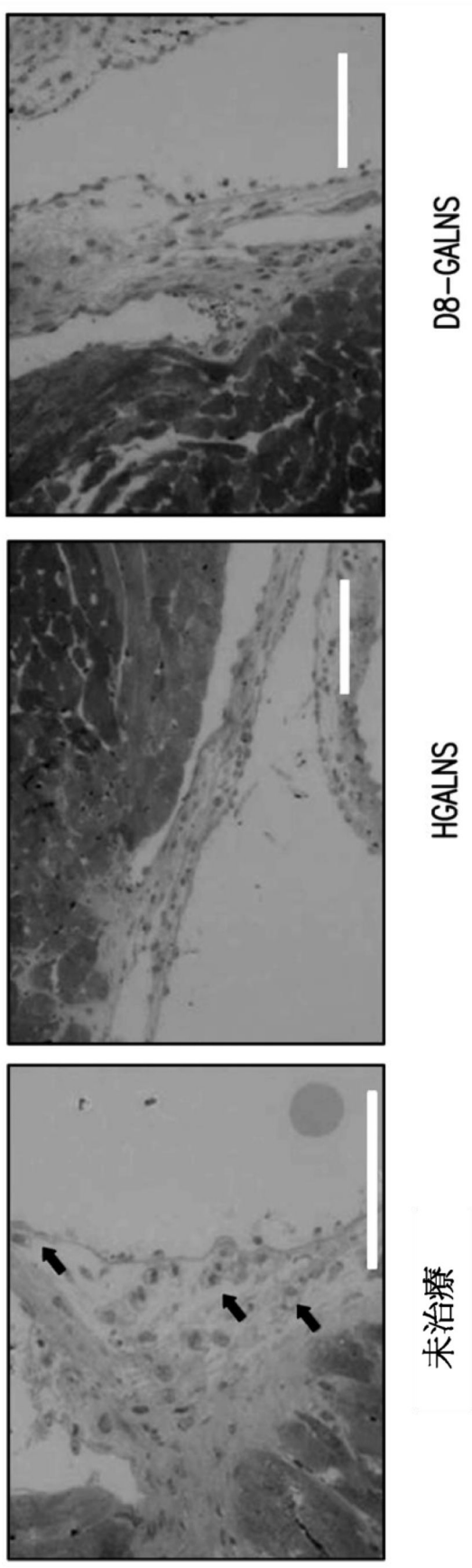
【圖 11J】



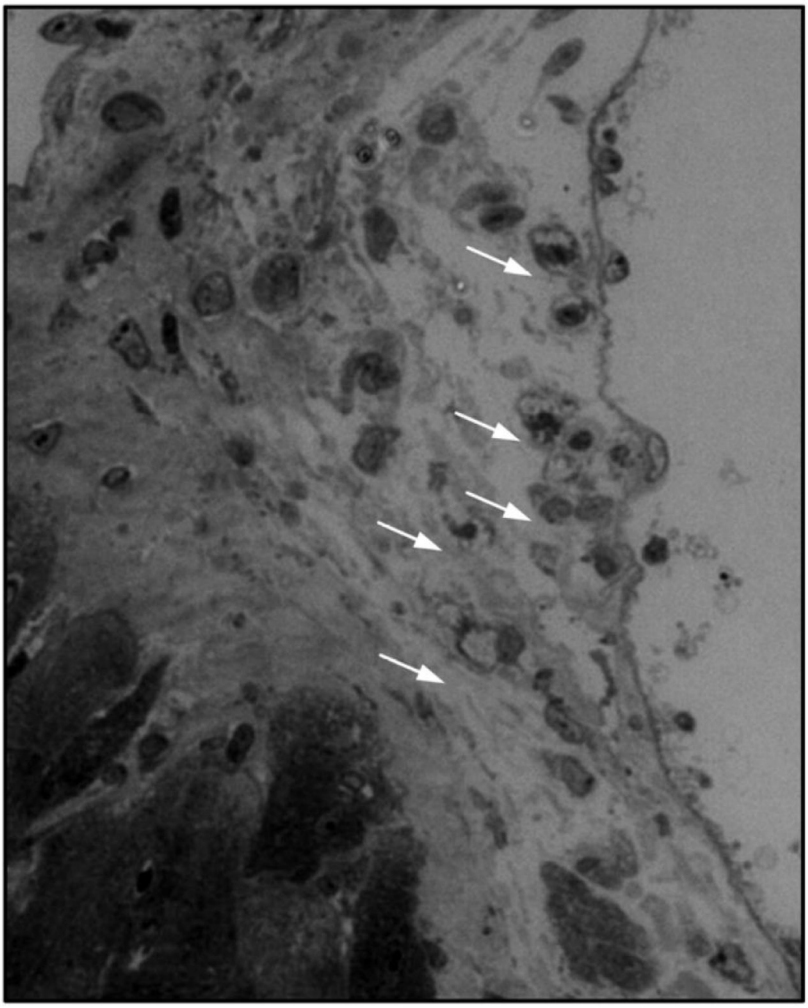
【圖 11K】



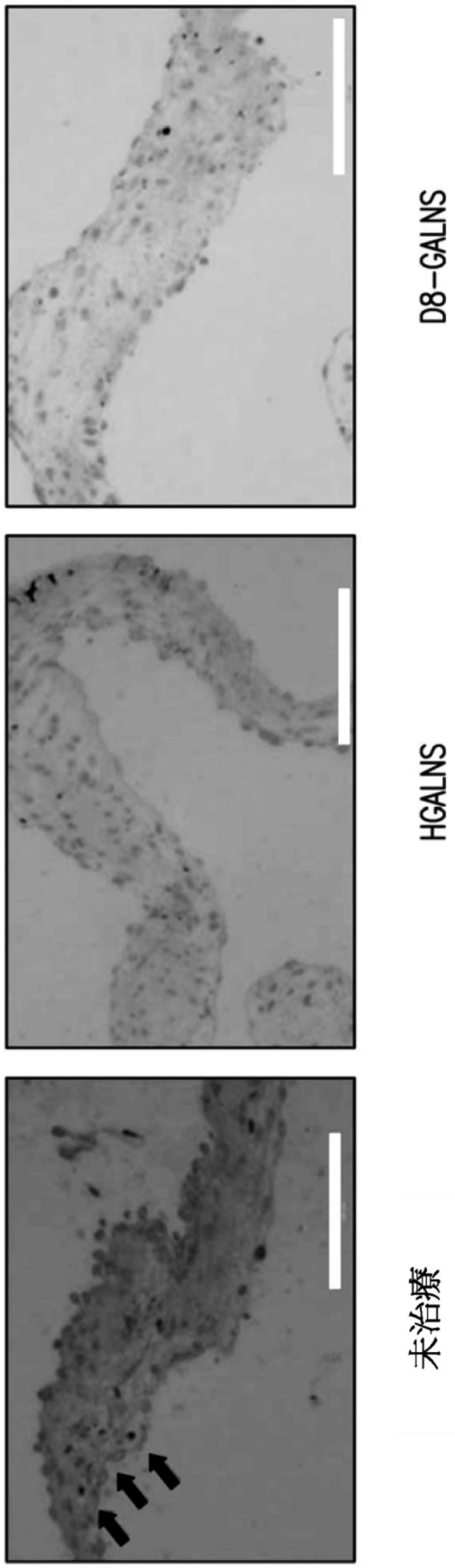
【圖 11L】



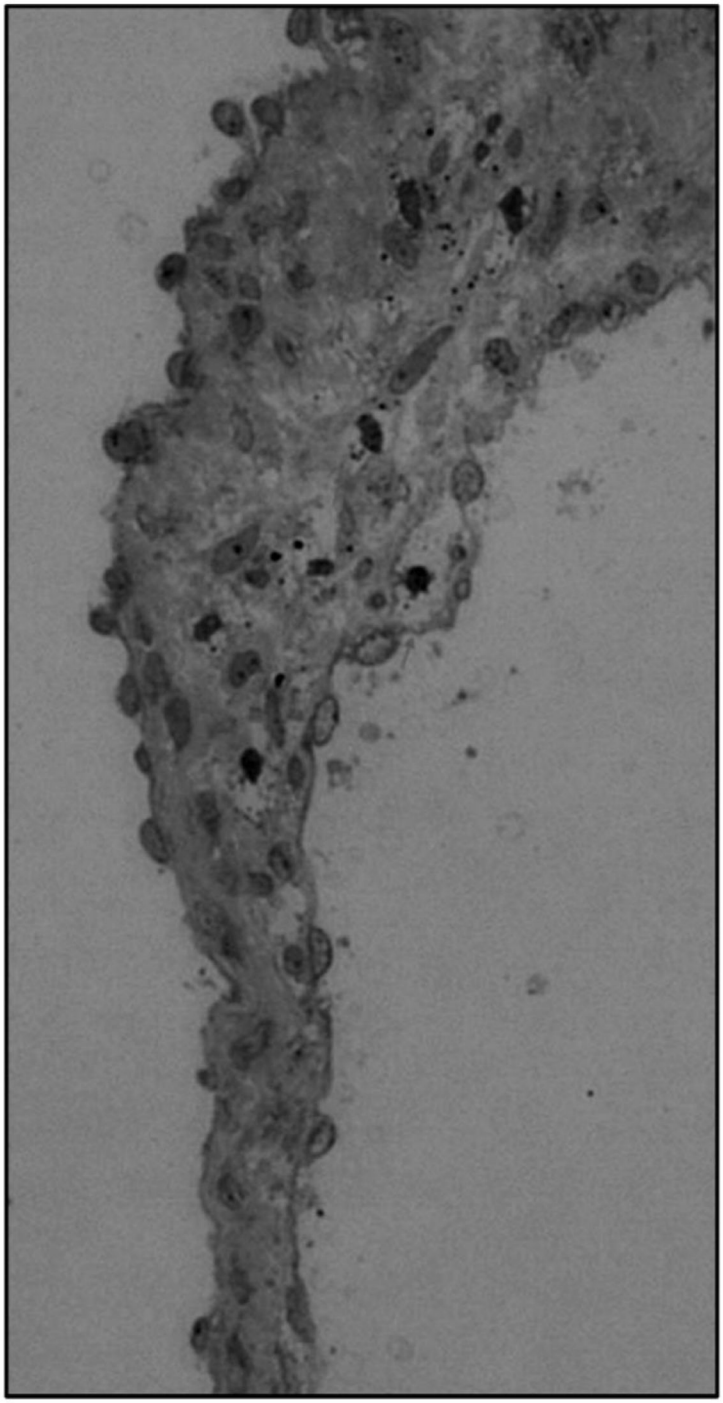
【圖 11M】



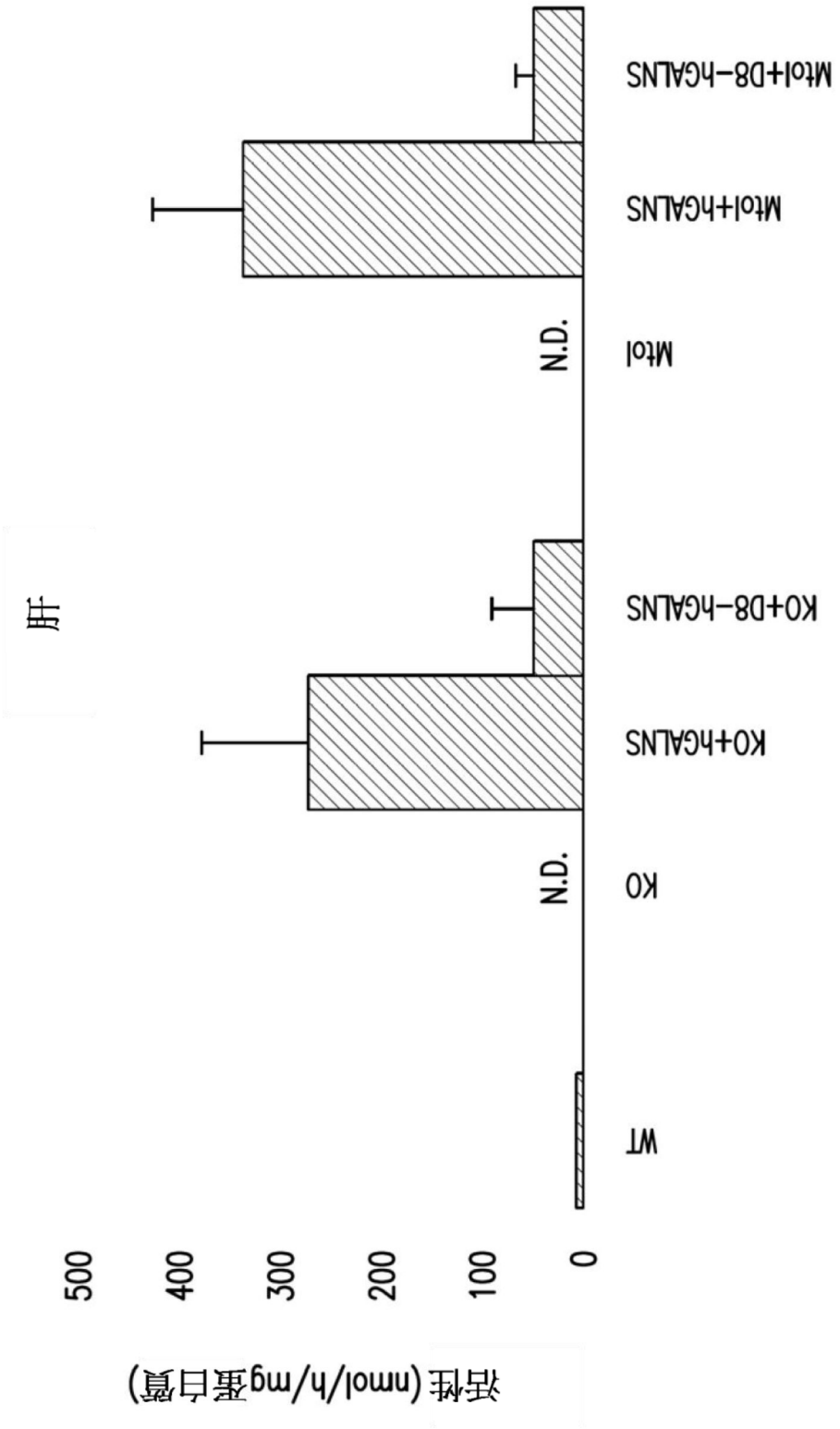
【圖 11N】



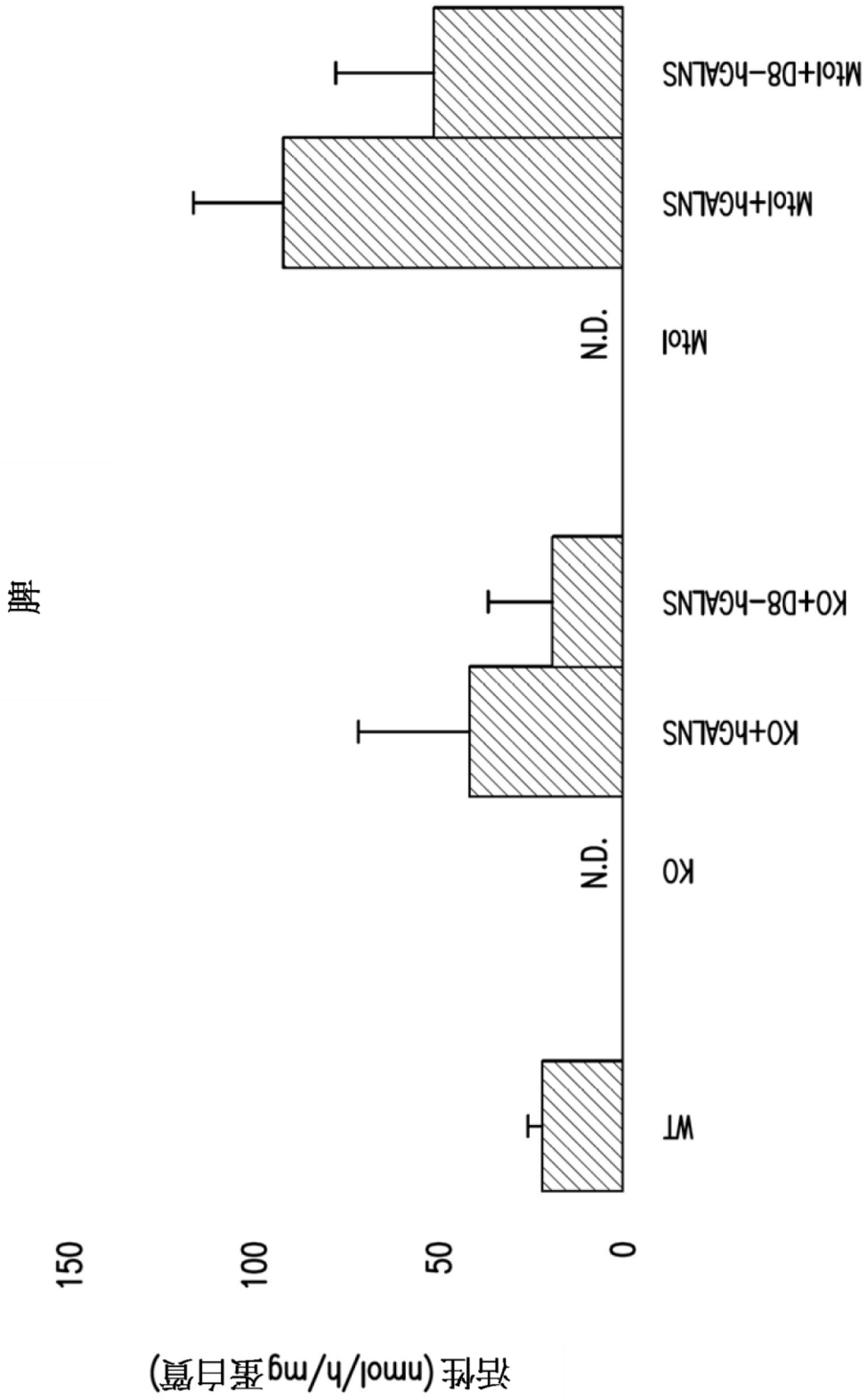
【圖 11O】



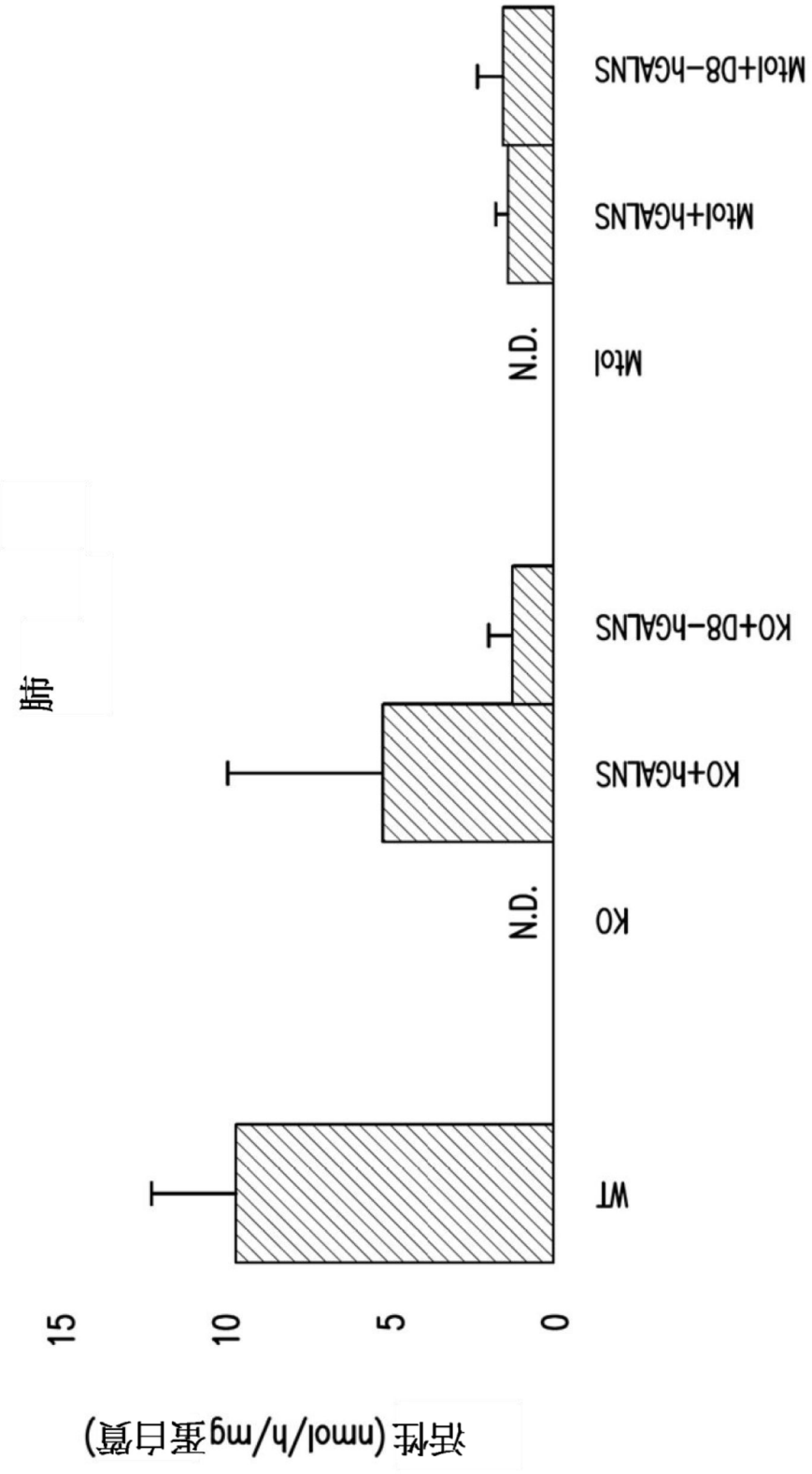
【圖 11P】


肝
活性(nmol/h/mg蛋白質)
500
400
300
200
100
0
WT
KO
KO+hGALNS
KO+DB-hGALNS
Mtol
Mtol+hGALNS
Mtol+DB-hGALNS
N.D.
N.D.

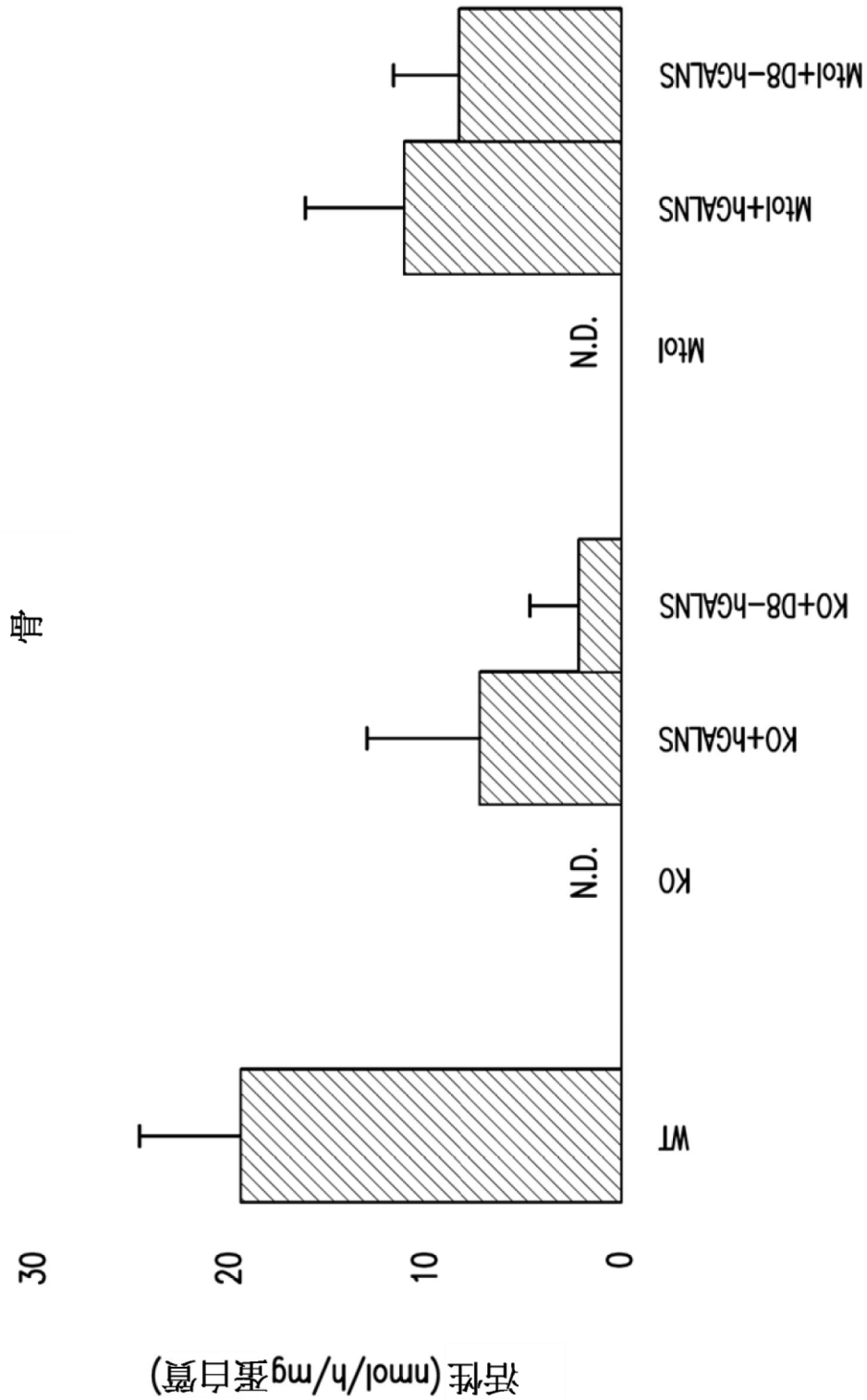
【圖 12A】


活性 (nmol/h/mg蛋白質)
0
50
100
150
WT
N.D.
KO
KO+hGALNS
KO+DB-hGALNS
Mtol
N.D.
Mtol+hGALNS
Mtol+DB-hGALNS

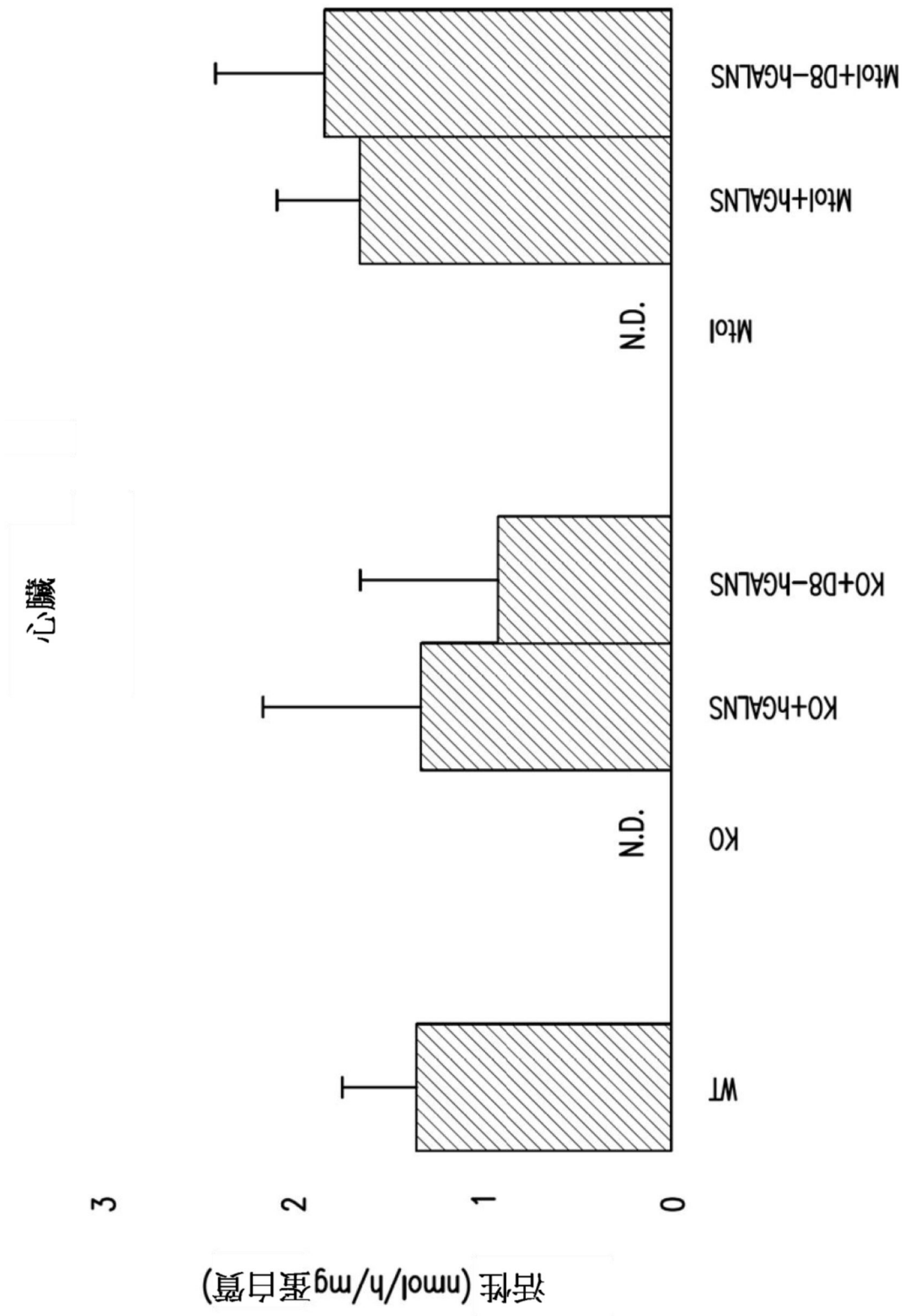
【圖 12B】


活性 (nmol/h/mg蛋白質)
0
5
10
15
WT
KO
KO+hGALNS
KO+D8-hGALNS
Mtol
Mtol+hGALNS
Mtol+D8-hGALNS
N.D.
N.D.

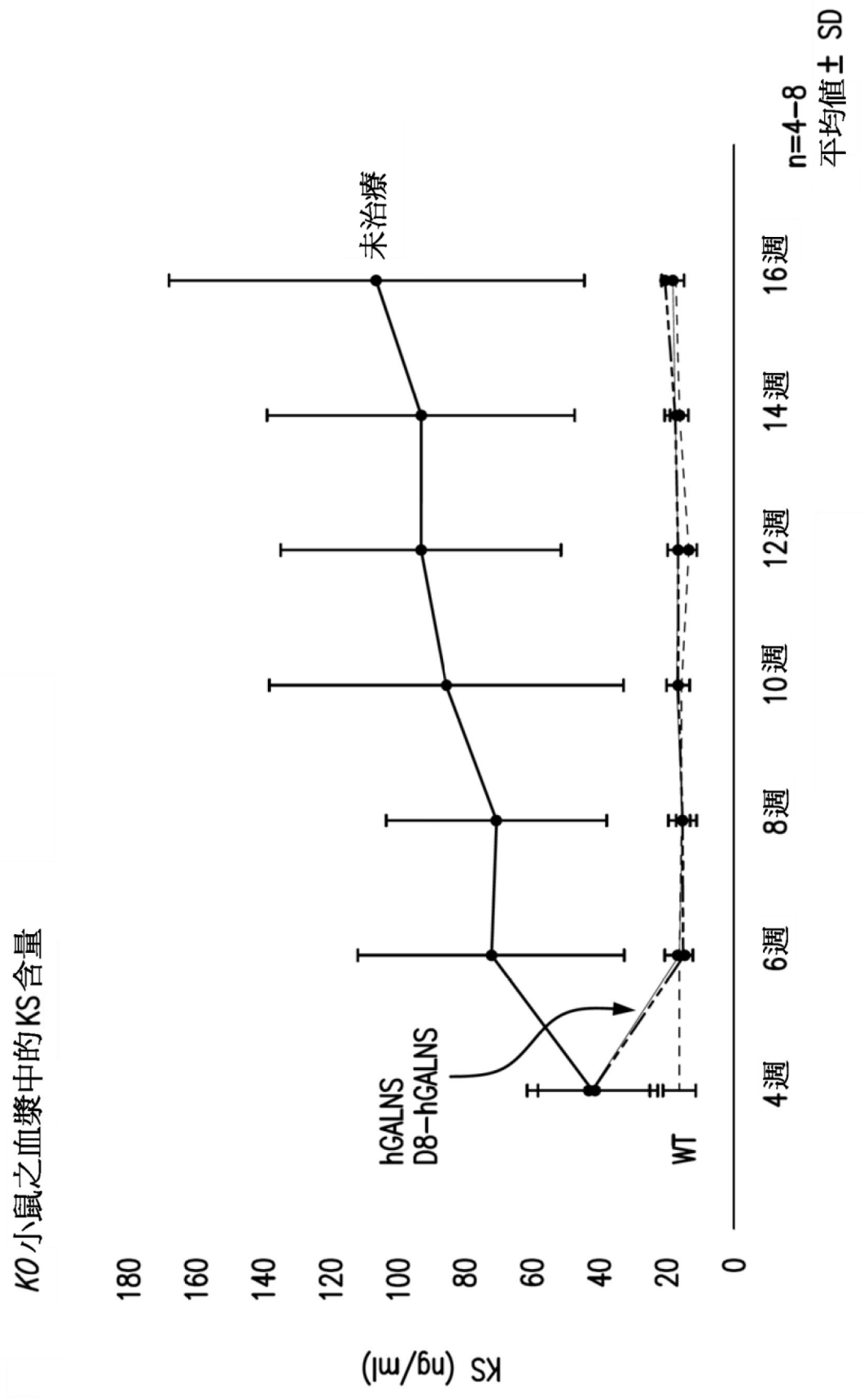
【圖 12C】


活性(nmol/h/mg蛋白質)
0
10
20
30
量
WT
KO
KO+hGALNS
KO+DB-hGALNS
Mtol
Mtol+hGALNS
Mtol+DB-hGALNS
N.D.
N.D.

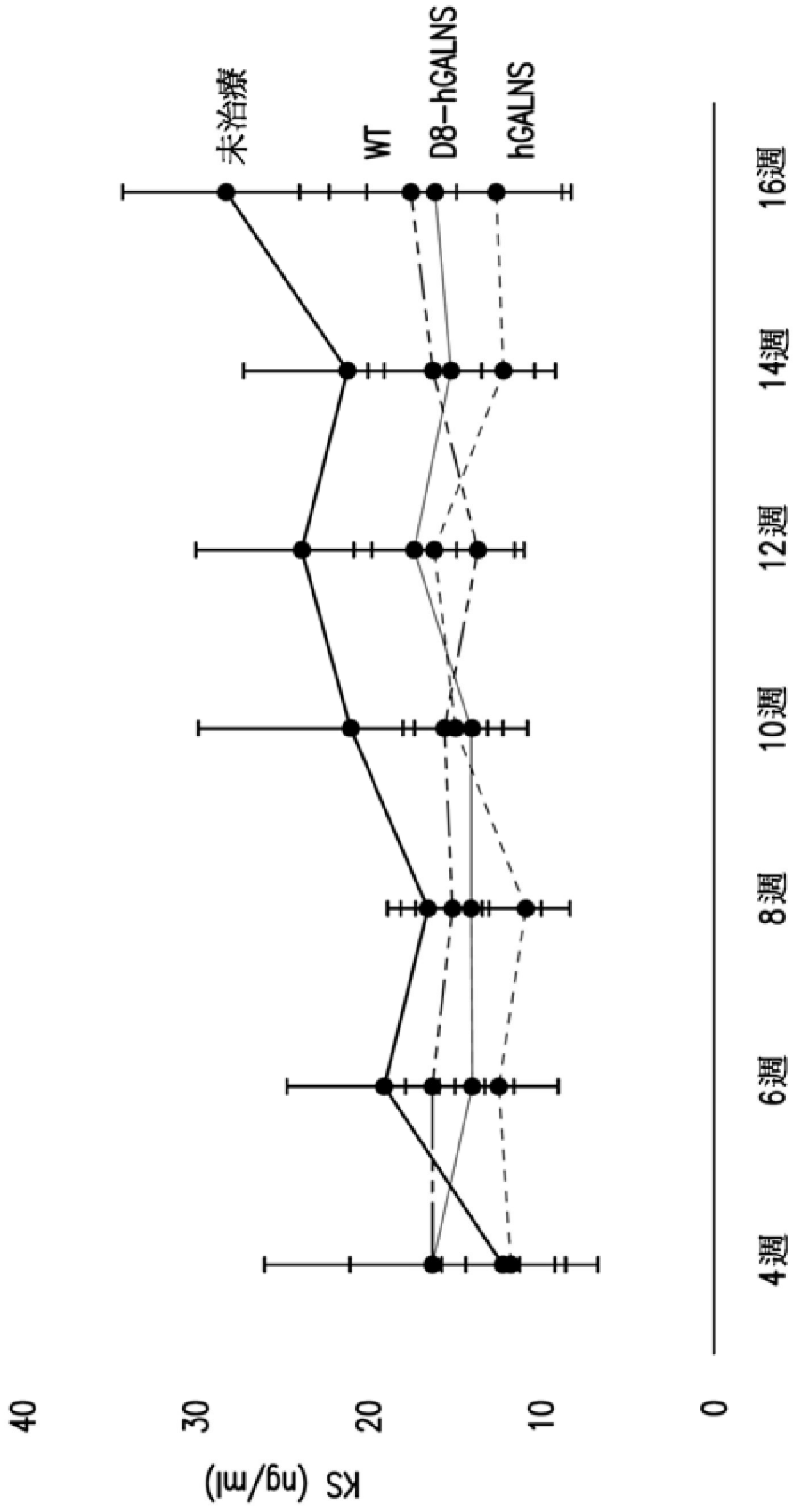
【圖 13A】


心臟
活性 (nmol/h/mg蛋白質)
0
1
2
3
WT
KO
KO+hGALNS
KO+DB-hGALNS
Mtol
Mtol+hGALNS
Mtol+DB-hGALNS
N.D.
N.D.

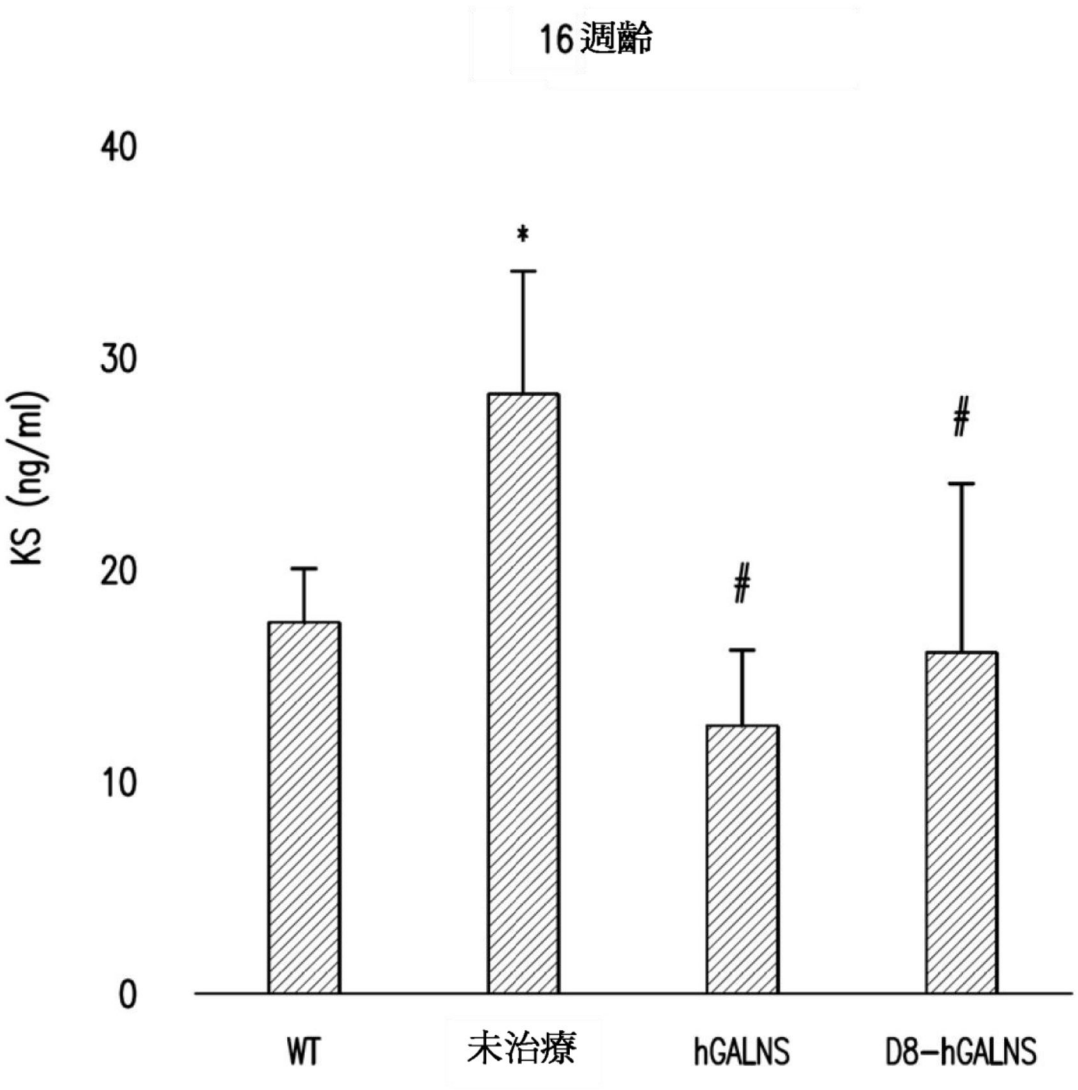
【圖 13B】


KO小鼠之血漿中的KS含量
KS (ng/ml)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
WT
n=4-8
平均值 ± SD

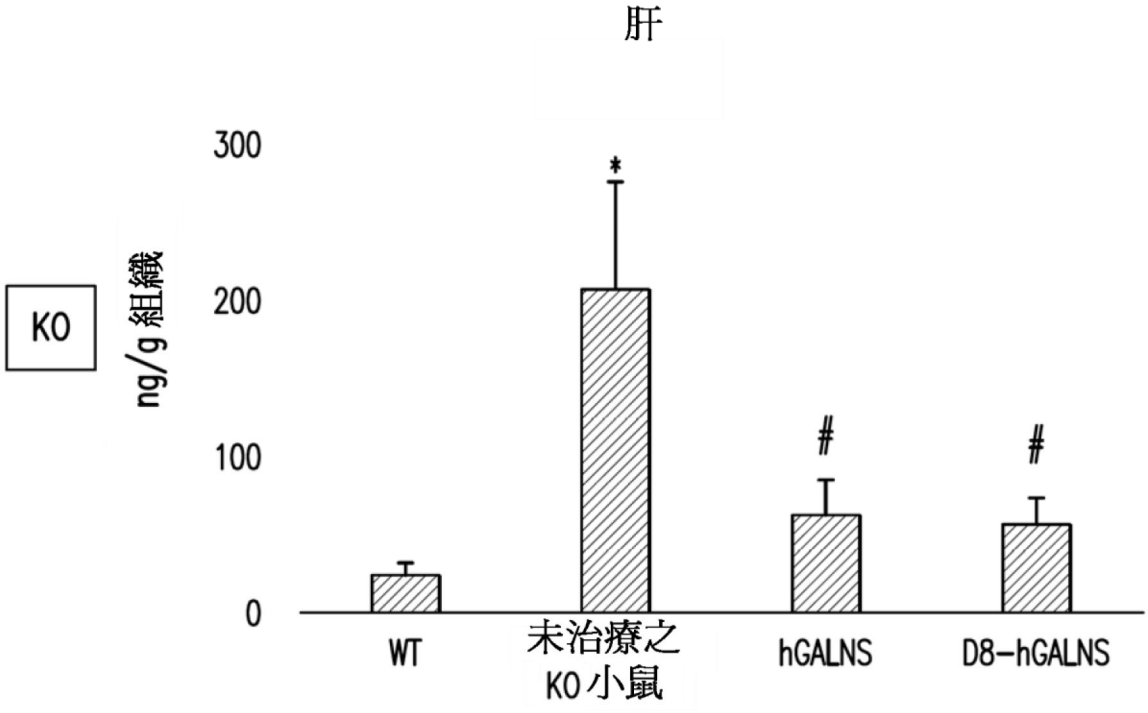
【圖 14】


未治療
WT
D8−hGALNS
hGALNS
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週
0
10
20
30
40
KS (ng/ml)

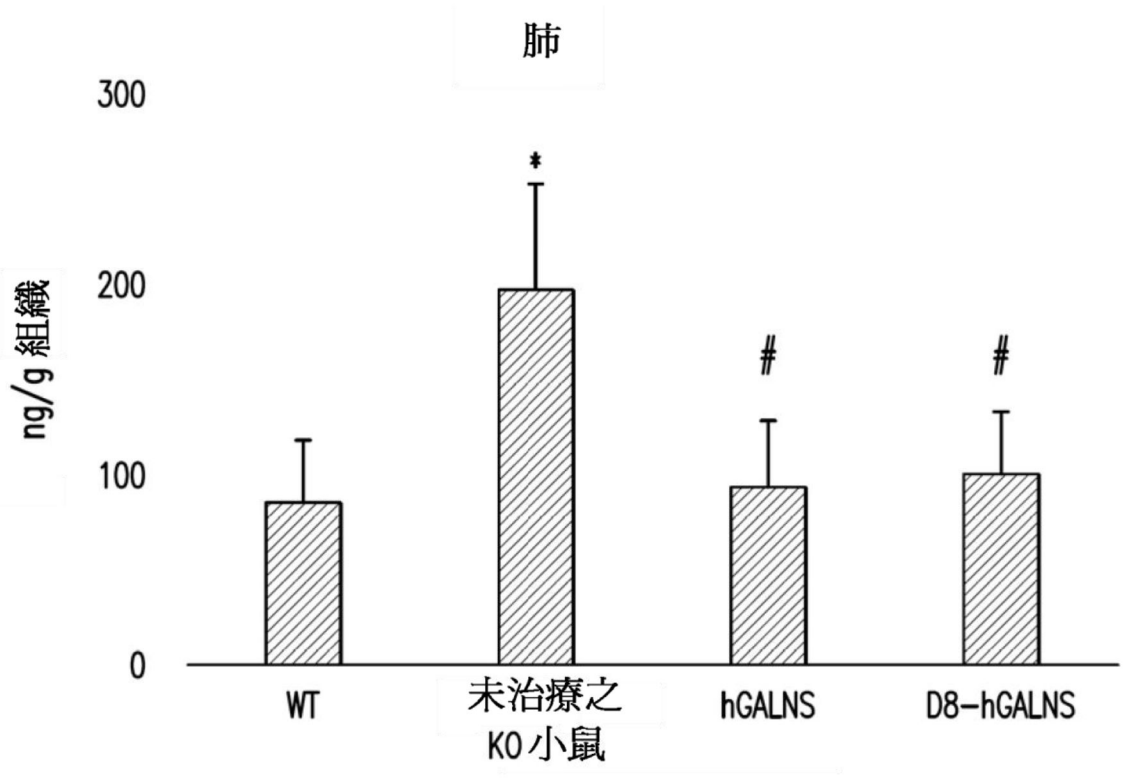
【圖 15A】



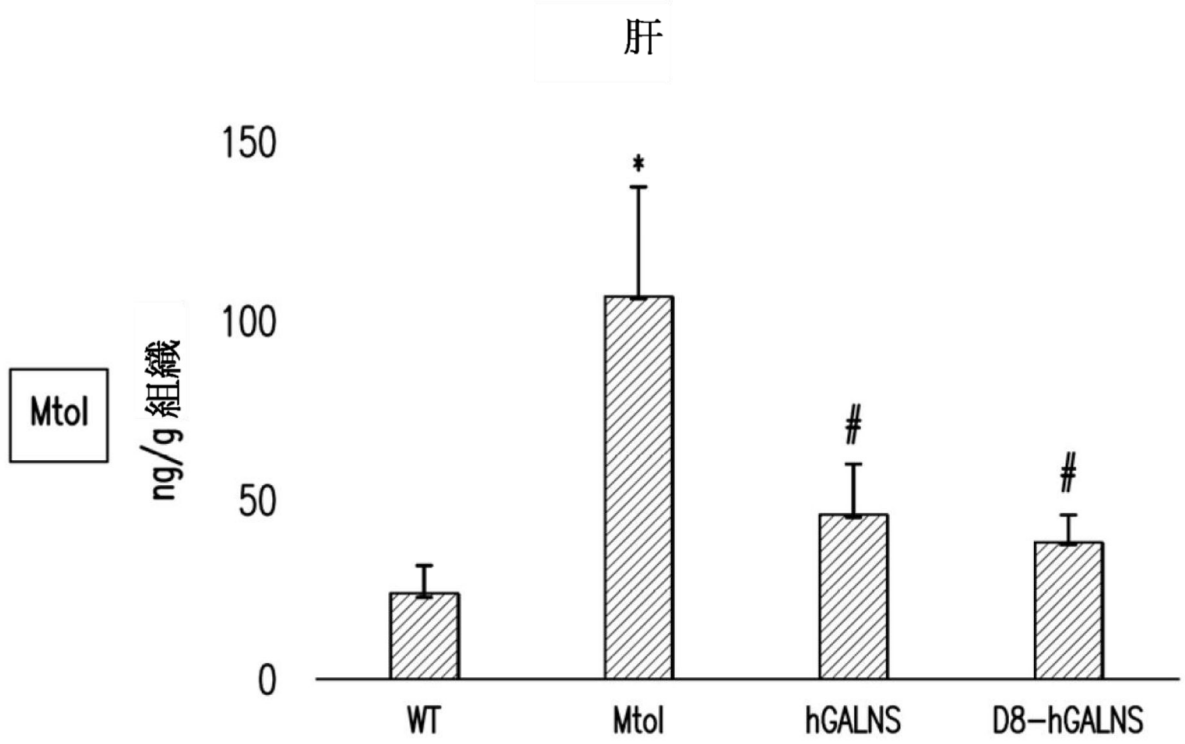
【圖 15B】



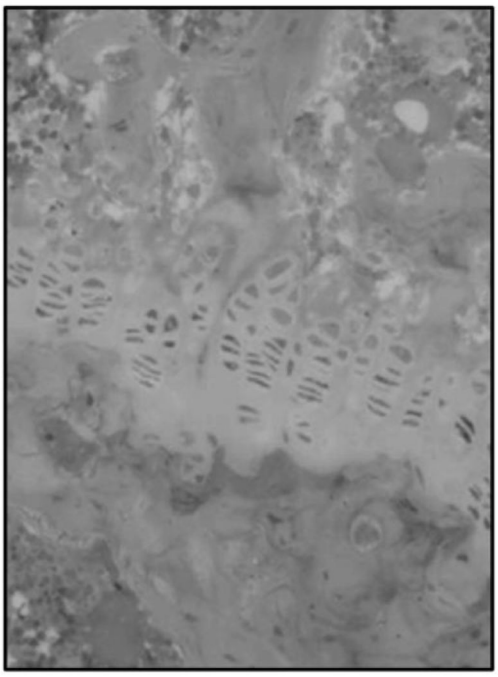
【圖 16A】



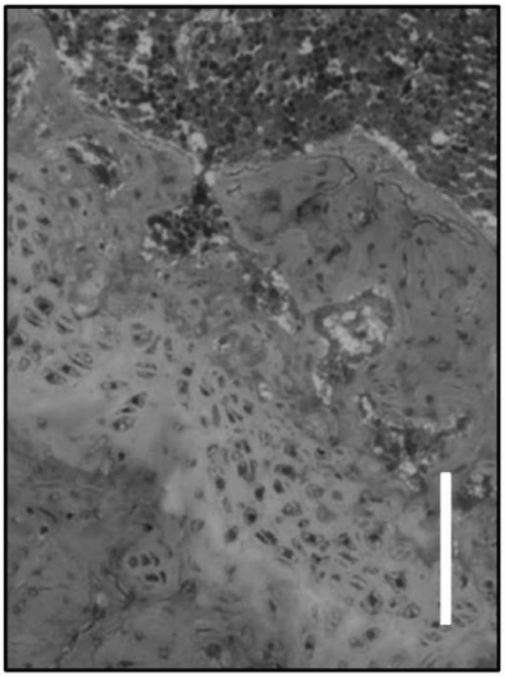
【圖 16B】



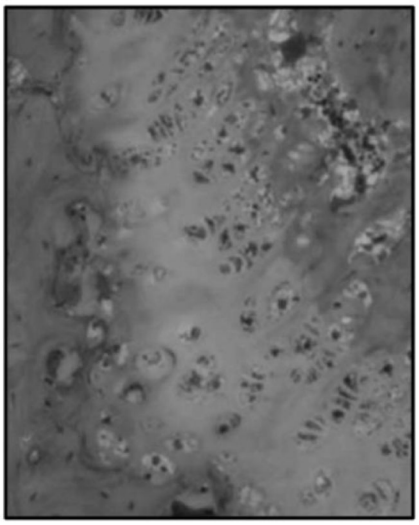
【圖 16C】



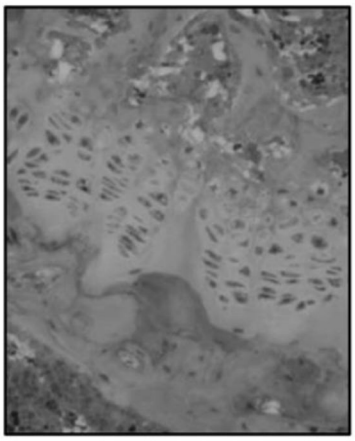
【圖 17A】



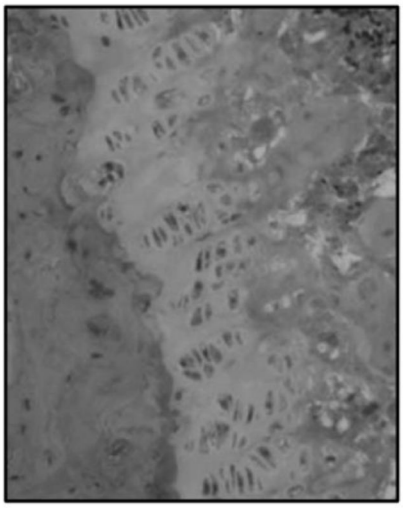
【圖 17B】



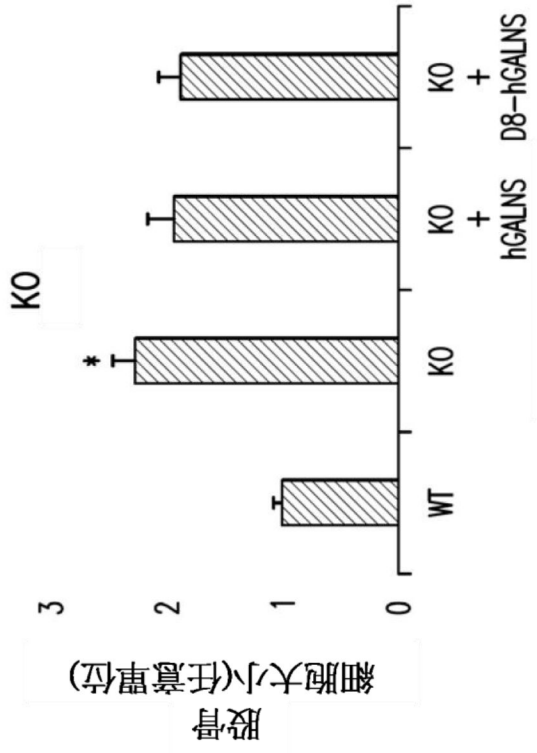
【圖 17C】



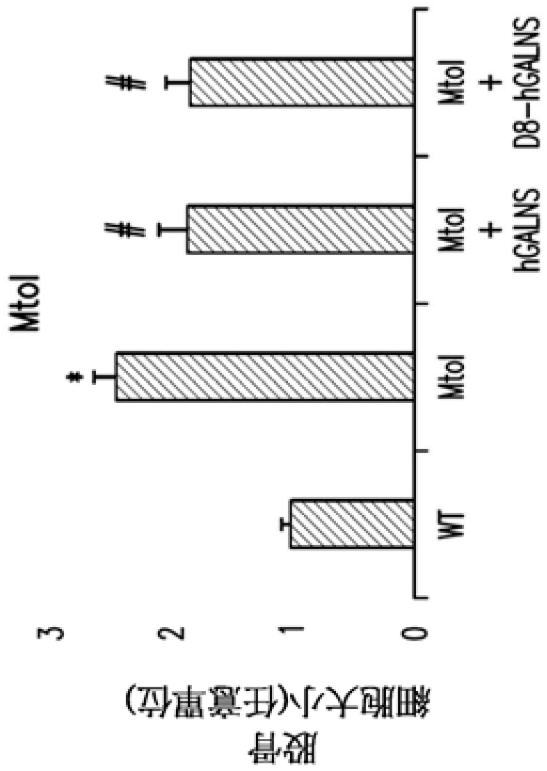
【圖 17D】



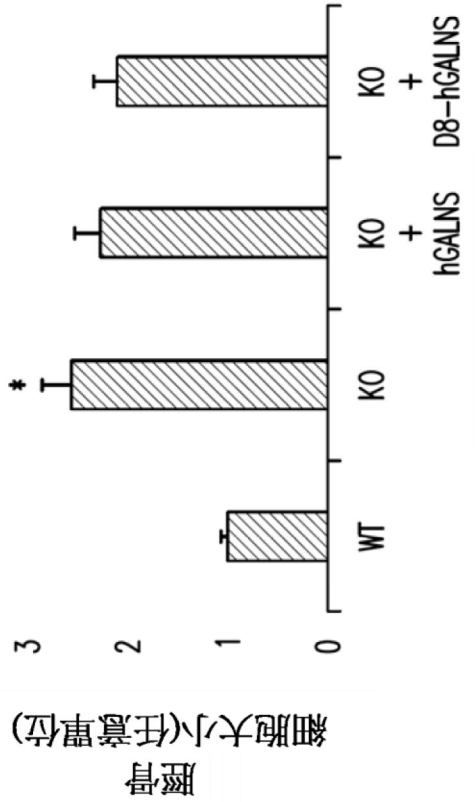
【圖 17E】


股骨
細胞大小(任意單位)
0
1
2
3
WT
KO
*
KO
KO
+
hGALNS
KO
+
D8−hGALNS

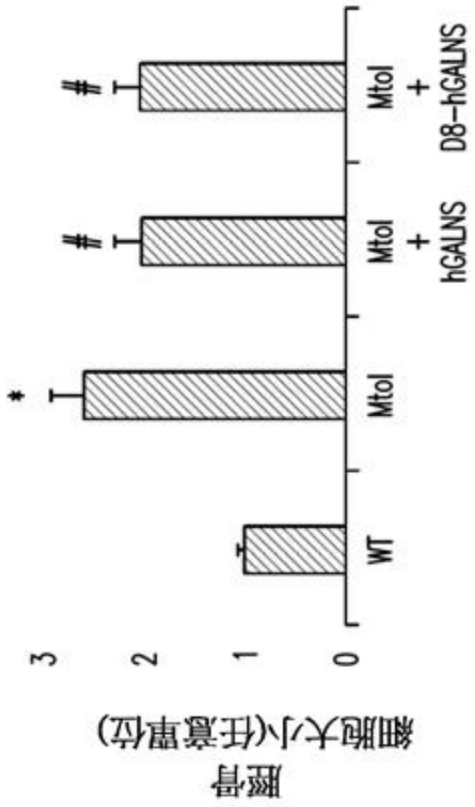
【圖 18A】


股骨
細胞大小(任意單位)
0
1
2
3
WT
Mtol
*
Mtol
Mtol
+
hGALNS
#
Mtol
+
D8−hGALNS
#

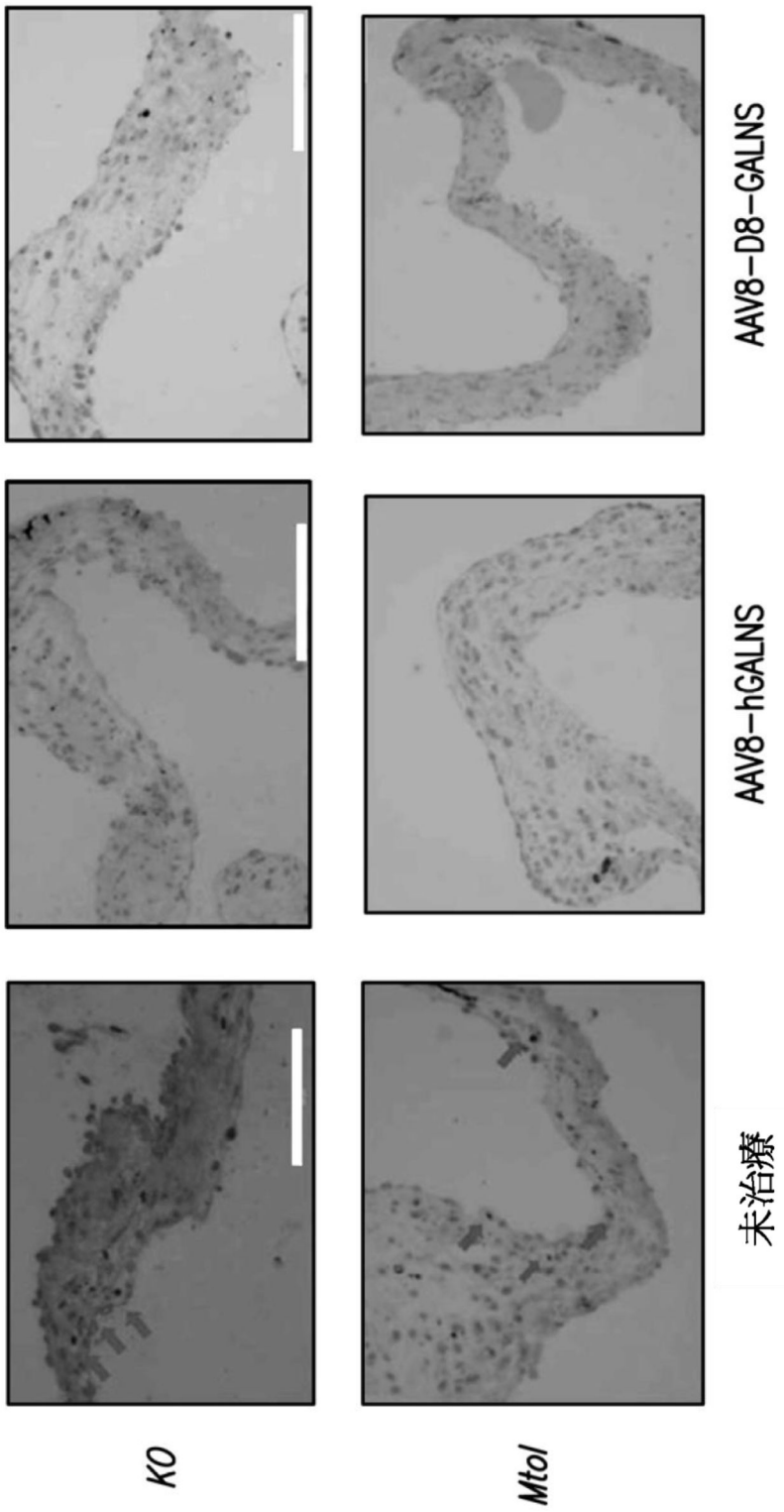
【圖 18B】


WT
KO
KO + hGALNS
KO + D8-hGALNS
*
0
1
2
3
脛骨
細胞大小(任意單位)

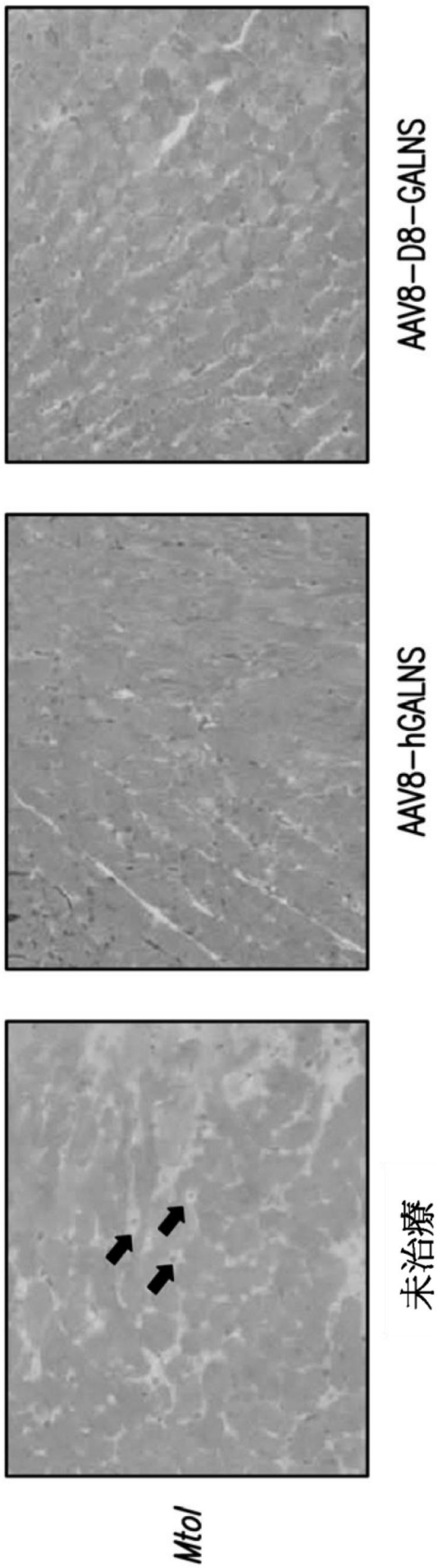
【圖 18C】


WT
Mtol
Mtol + hGALNS
Mtol + D8-hGALNS
*
#
#
0
1
2
3
脛骨
細胞大小(任意單位)

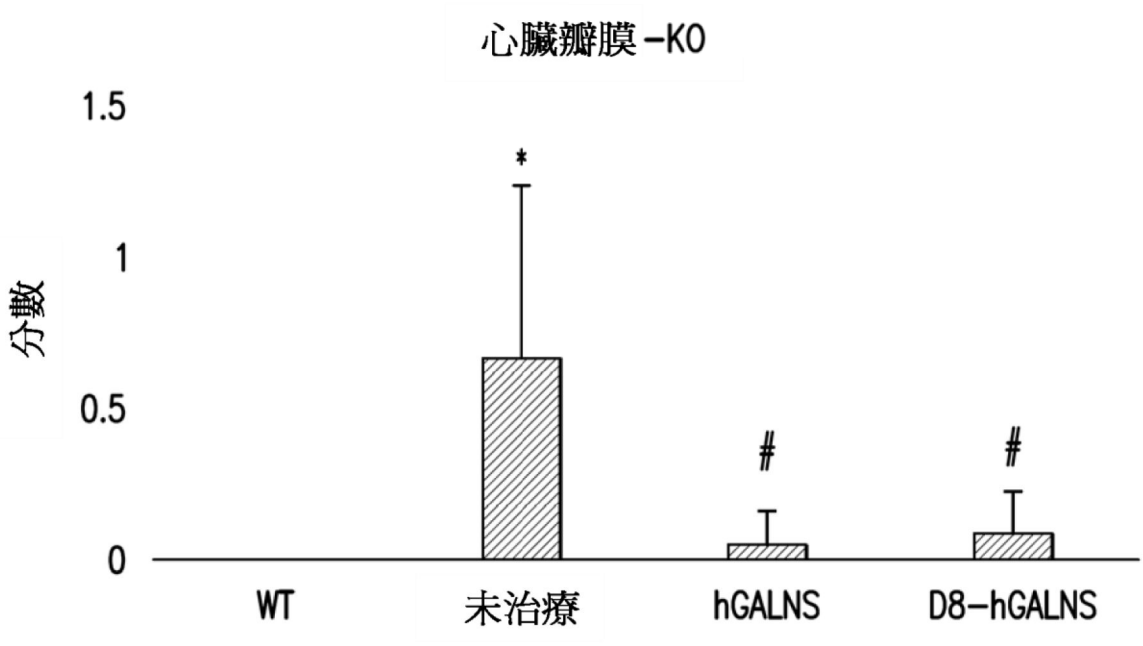
【圖 18D】



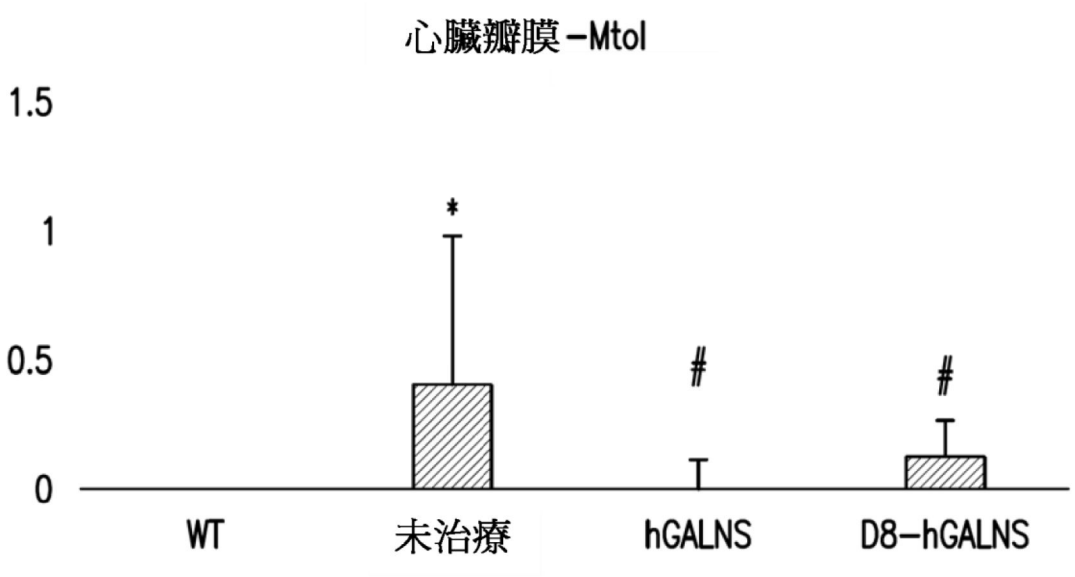
【圖 19】



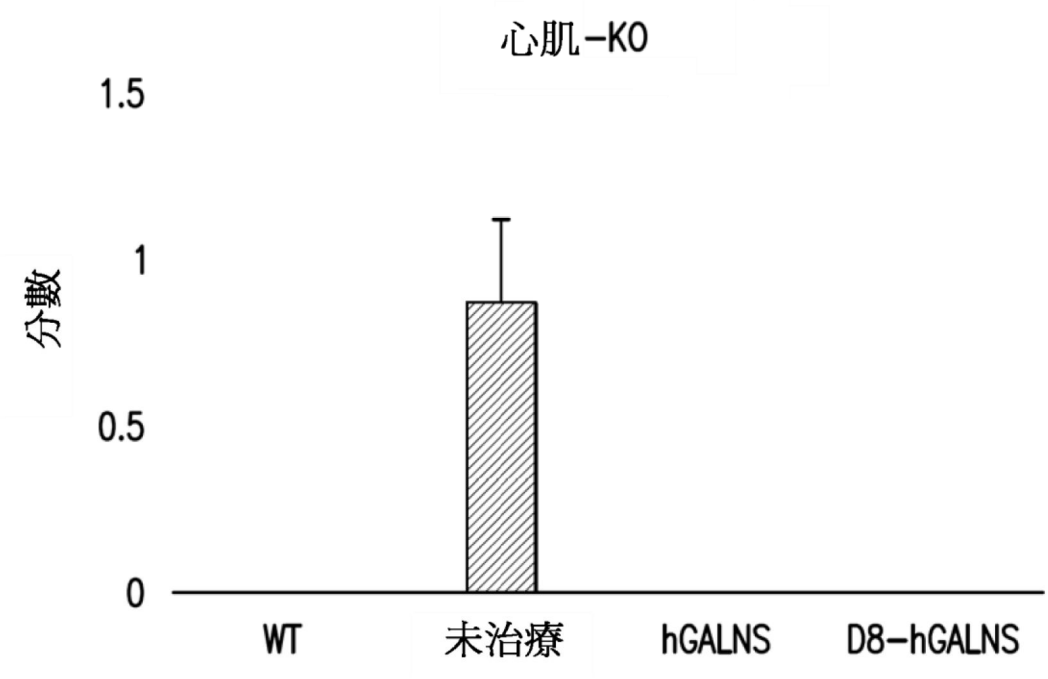
【圖 20】



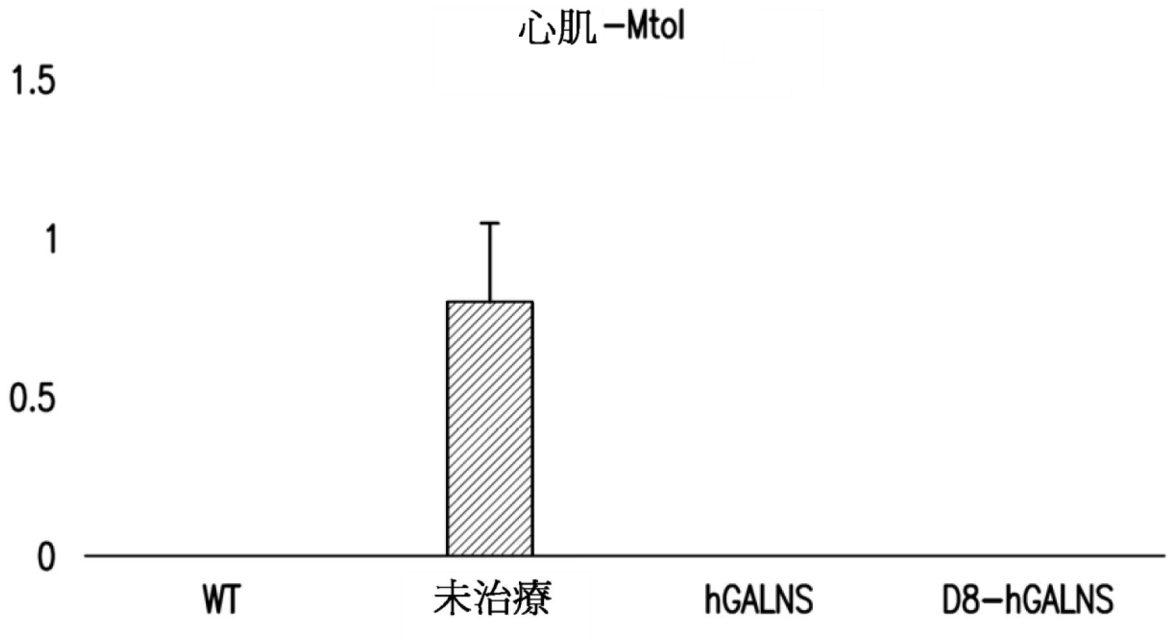
【圖 21A】



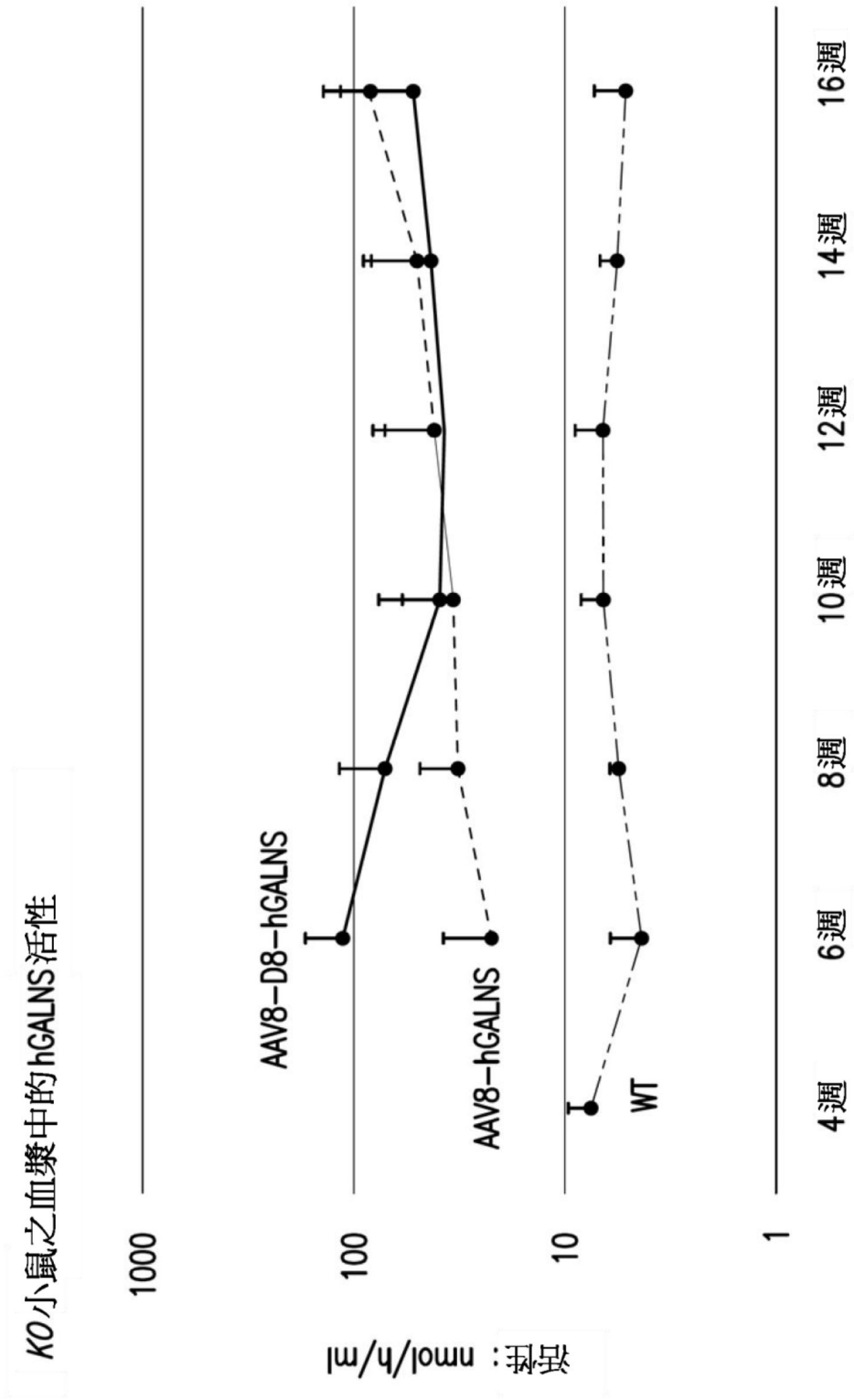
【圖 21B】



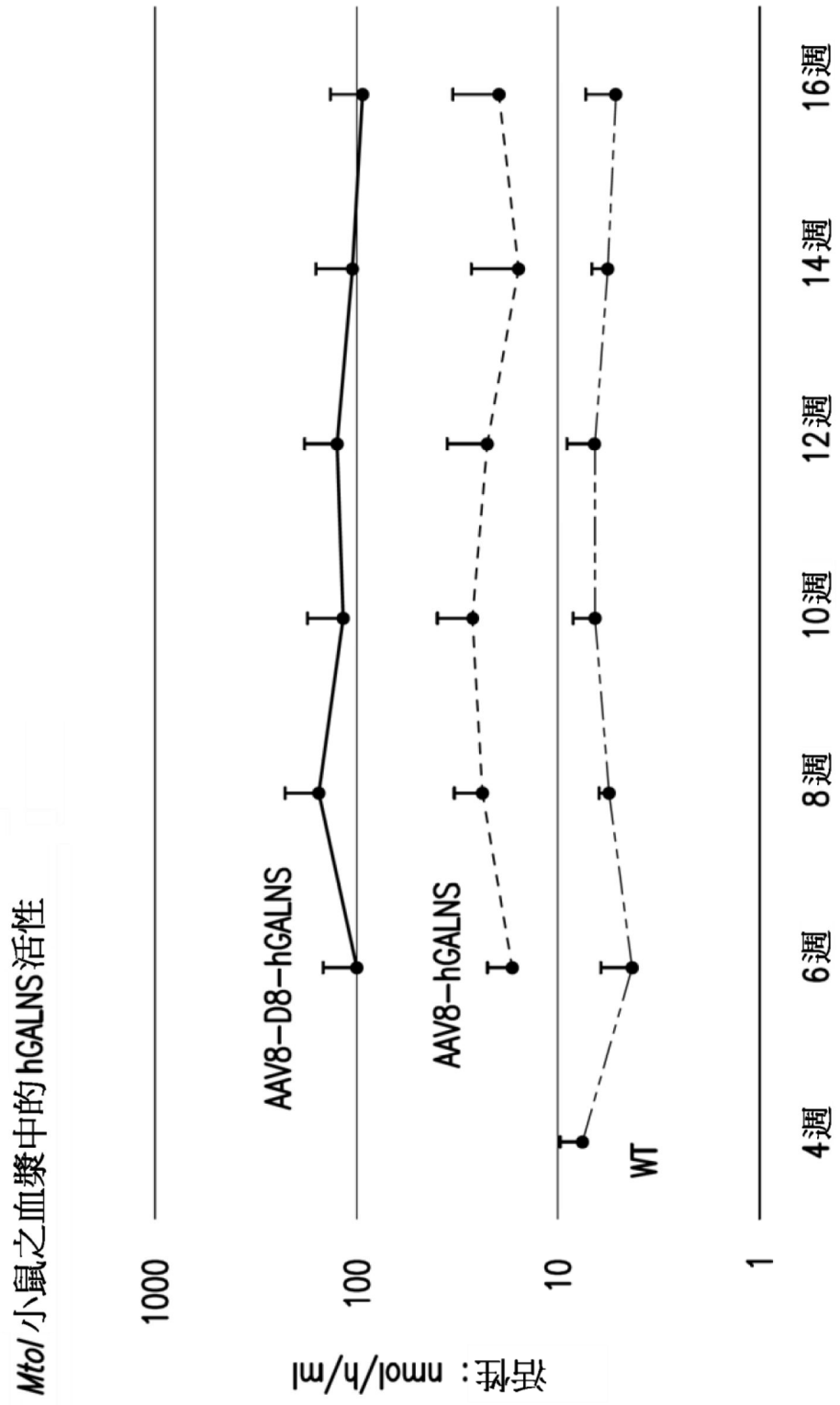
【圖 21C】



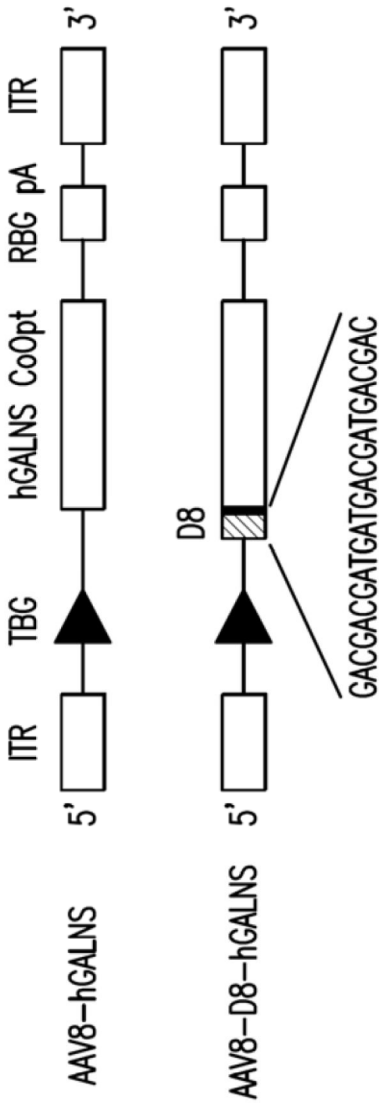
【圖 21D】


KO小鼠之血漿中的hGALNS活性
活性：nmol/h/ml
1000
100
10
1
AAV8-D8-hGALNS
AAV8-hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週

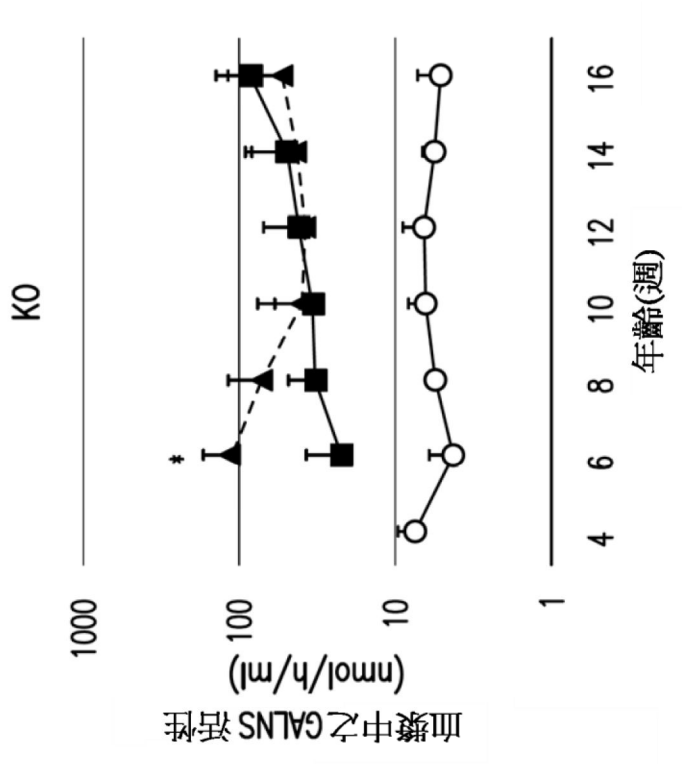
【圖 22】


Mtol小鼠之血漿中的hGALNS活性
活性：nmol/h/ml
1000
100
10
1
AAV8-D8-hGALNS
AAV8-hGALNS
WT
4週
6週
8週
10週
12週
14週
16週

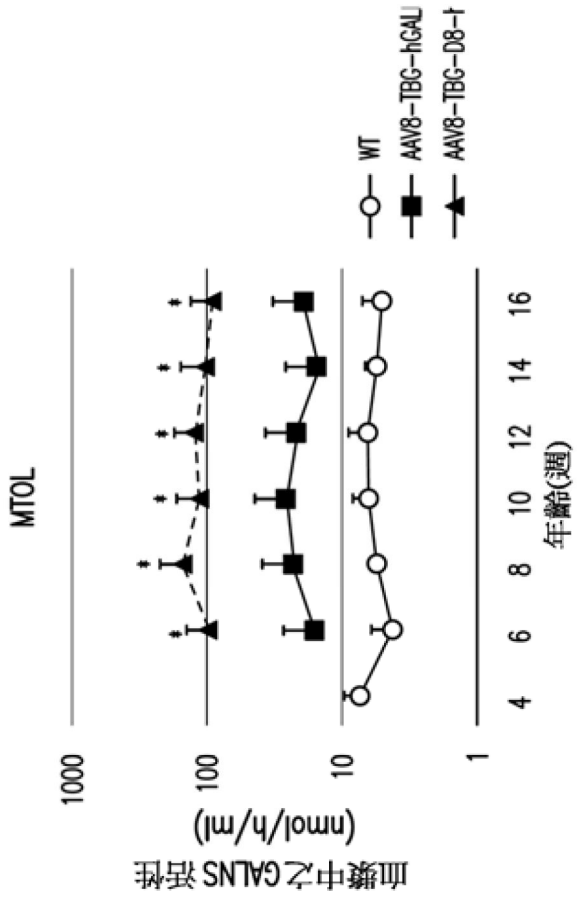
【圖 23】


AAV8-hGALNS
5'
ITR
TBG
hGALNS CoOpt
RBG pA
ITR
3'
AAV8-D8-hGALNS
5'
D8
GACGACGATGATGACGATGACGAC
3'

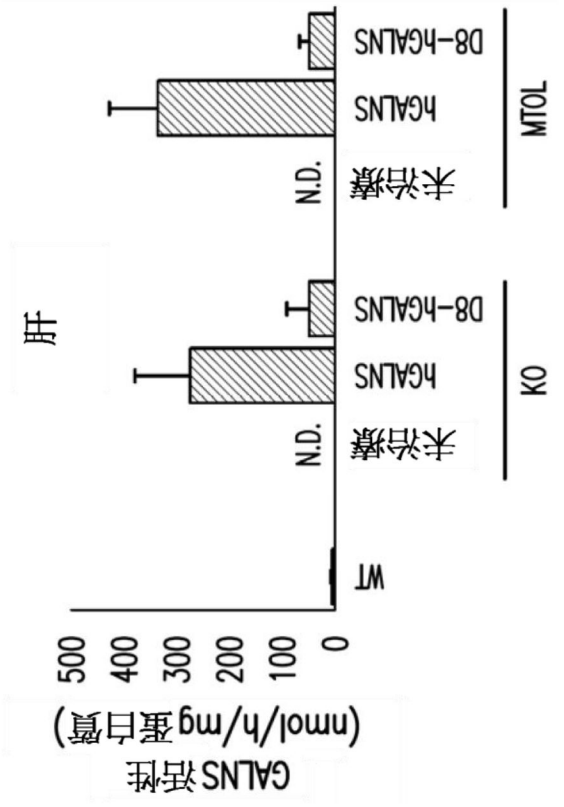
【圖 24A】


KO
血漿中之GALNS活性
(nmol/h/ml)
1000
100
10
1
4
6
8
10
12
14
16
年齡(週)

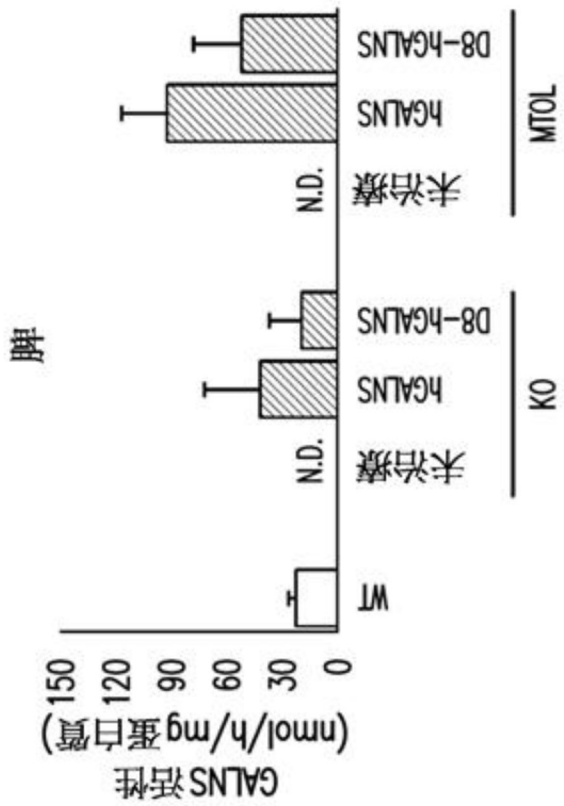
【圖 24B】


WT
AAV8-TBG-hGALNS
AAV8-TBG-D8-hGALNS
MTOL
血漿中之GALNS活性
(nmol/h/ml)
1000
100
10
1
4
6
8
10
12
14
16
年齡(週)

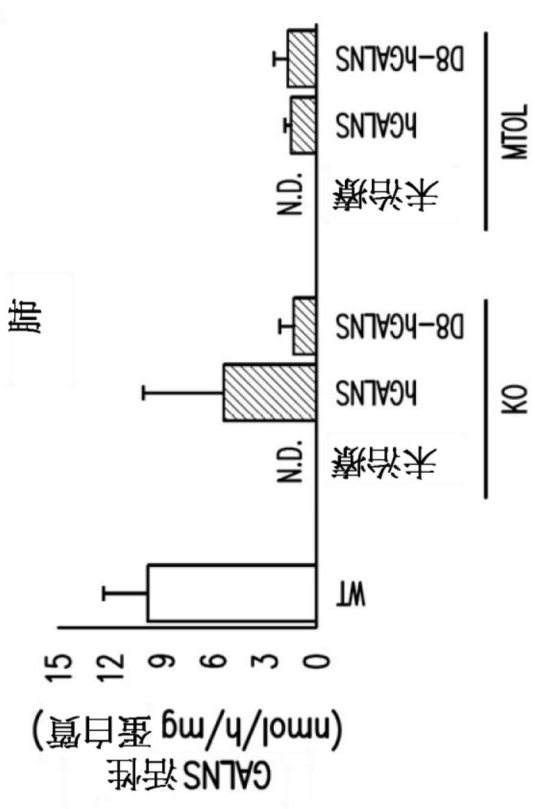
【圖 24C】


肝
WT
N.D.
hGALNS
D8-hGALNS
未治療
KO
MTOL
0
100
200
300
400
500
GALNS活性
(nmol/h/mg蛋白質)

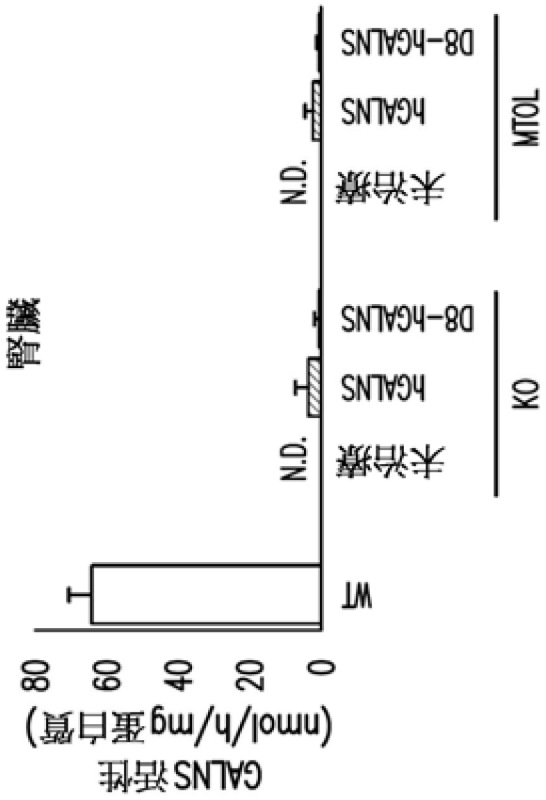
【圖 24D】


腎
WT
N.D.
hGALNS
D8-hGALNS
未治療
KO
MTOL
0
30
60
90
120
150
GALNS活性
(nmol/h/mg蛋白質)

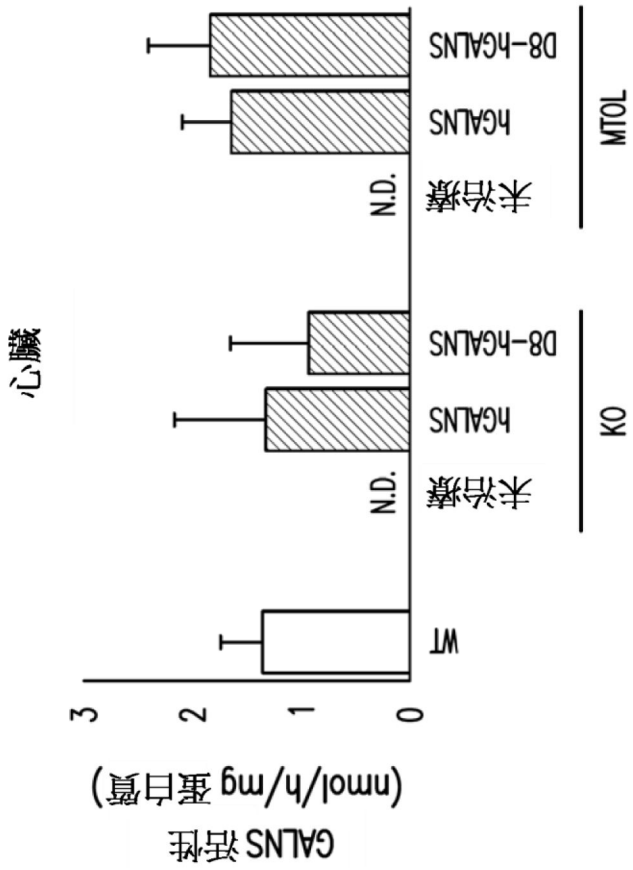
【圖 24E】


GALNS活性
(nmol/h/mg 蛋白質)
0
3
6
9
12
15
肺
WT
KO
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
MTOL

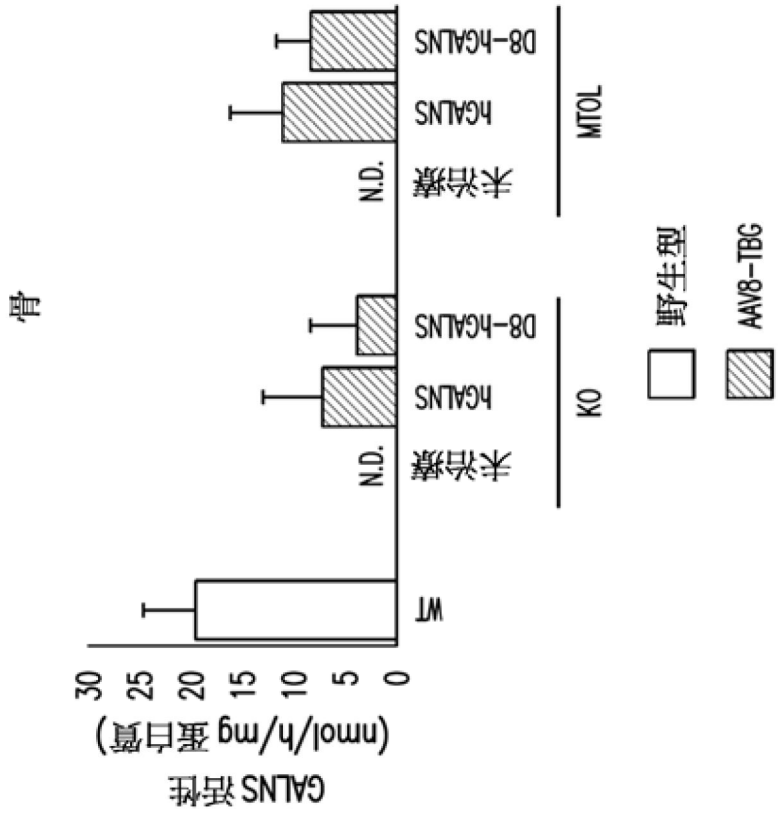
【圖 24F】


GALNS活性
(nmol/h/mg 蛋白質)
0
20
40
60
80
腎臟
WT
KO
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
MTOL

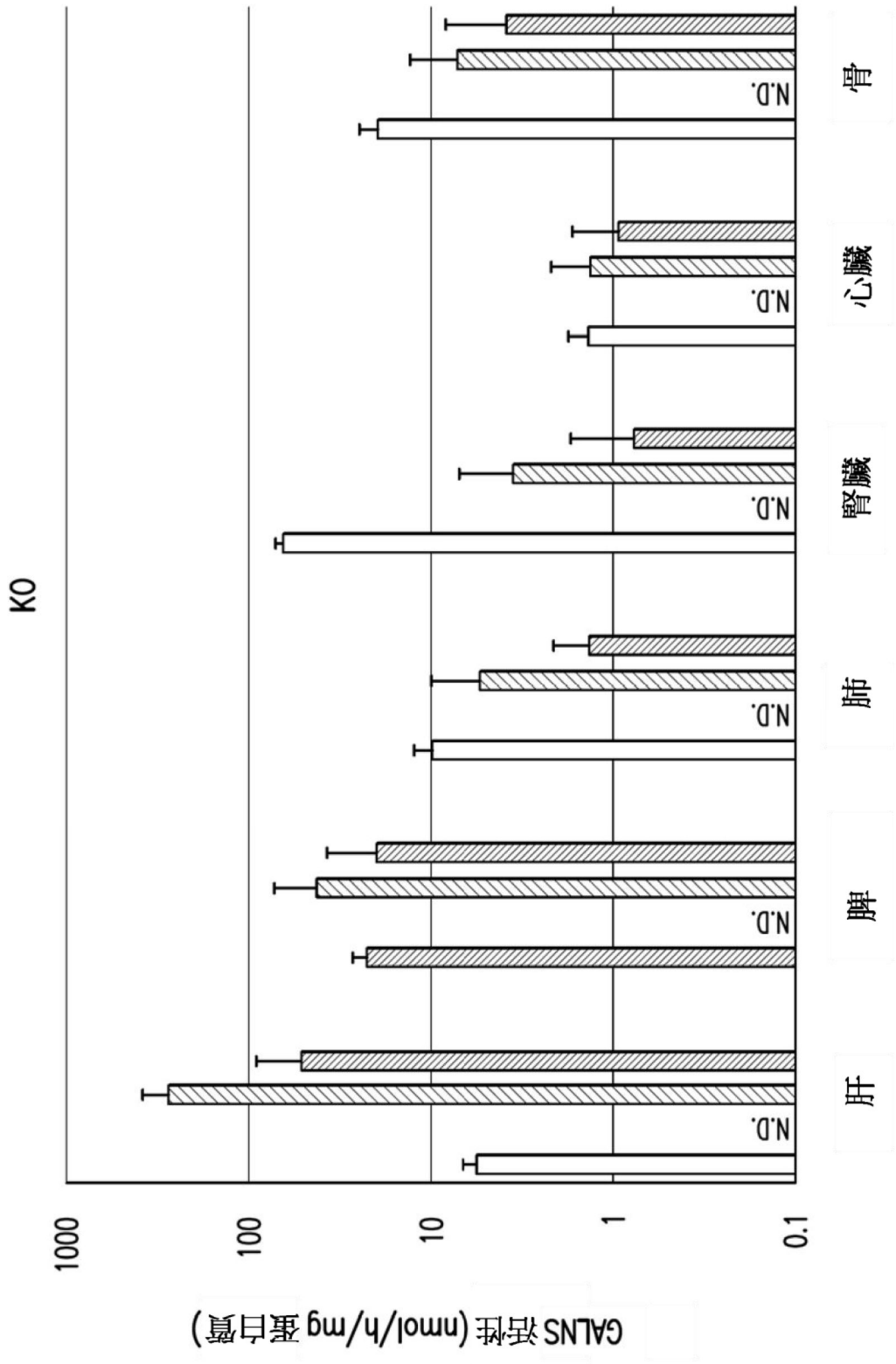
【圖 24G】


心臟
GALNS 活性
(nmol/h/mg 蛋白質)
0
1
2
3
WT
N.D.
未治療
hGALNS
DB-hGALNS
KO
MTOL

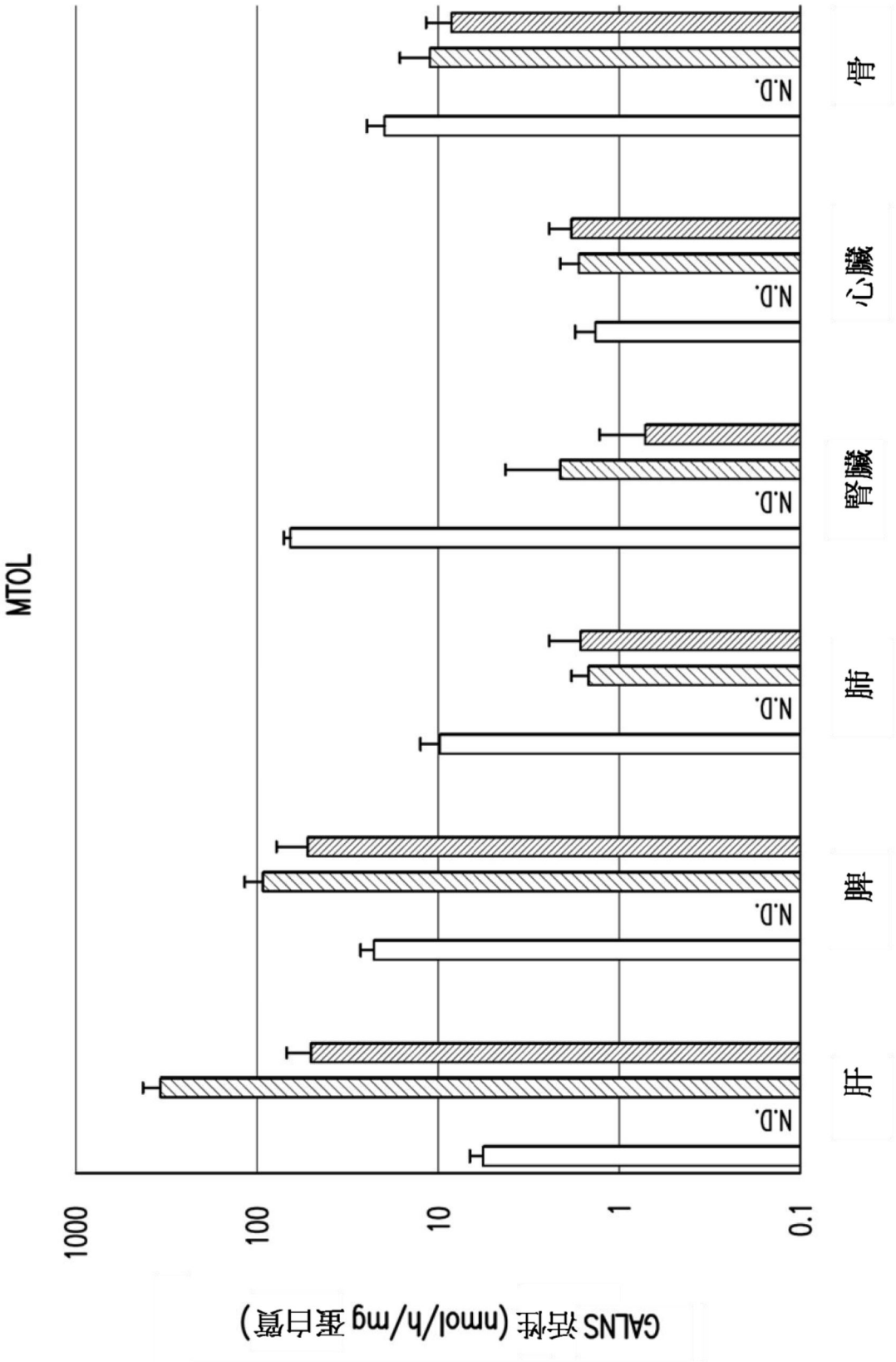
【圖 24H】


骨
GALNS 活性
(nmol/h/mg 蛋白質)
0
5
10
15
20
25
30
WT
N.D.
未治療
hGALNS
DB-hGALNS
KO
MTOL
野生型
AAV8-TBG

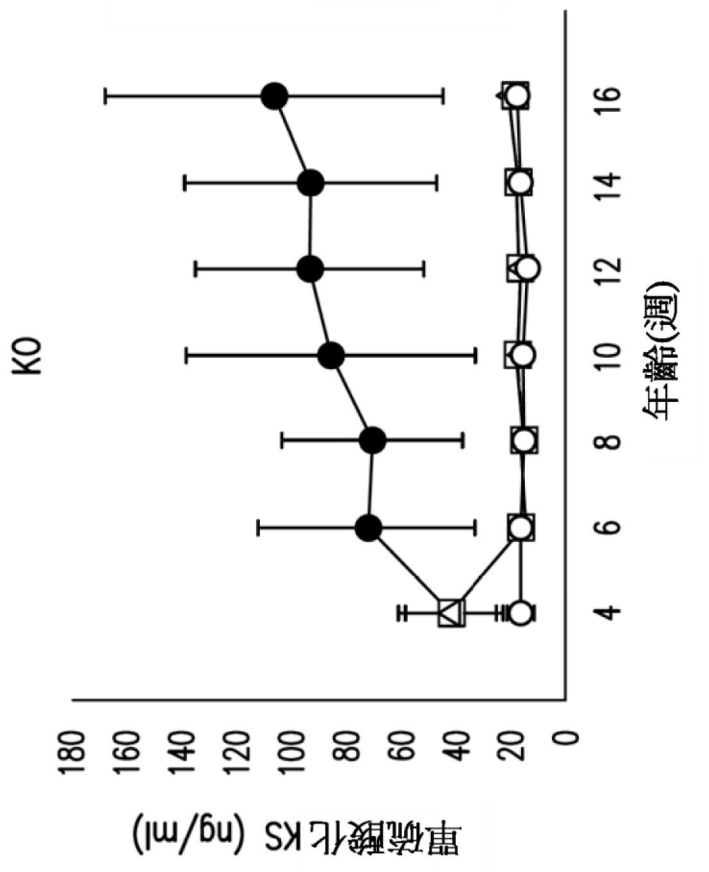
【圖 24I】



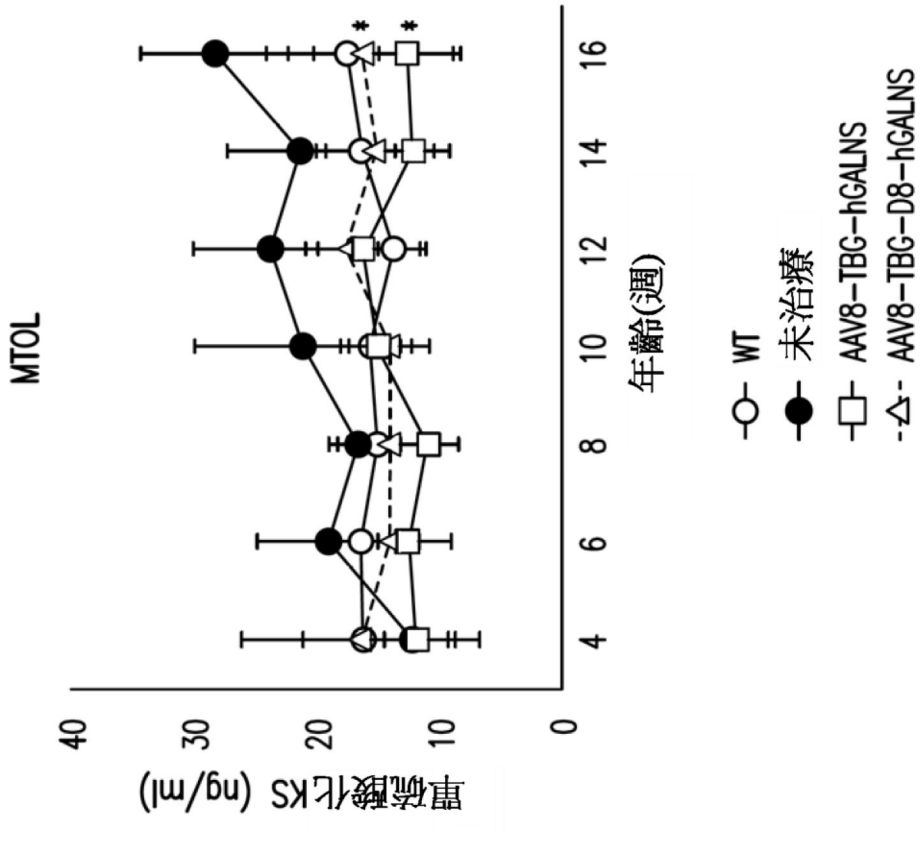
【圖 24J】


MTOL
1000
100
10
1
0.1
GALNS 活性 (nmol/h/mg 蛋白質)
肝
N.D.
脾
N.D.
肺
N.D.
腎臟
N.D.
心臟
N.D.
骨

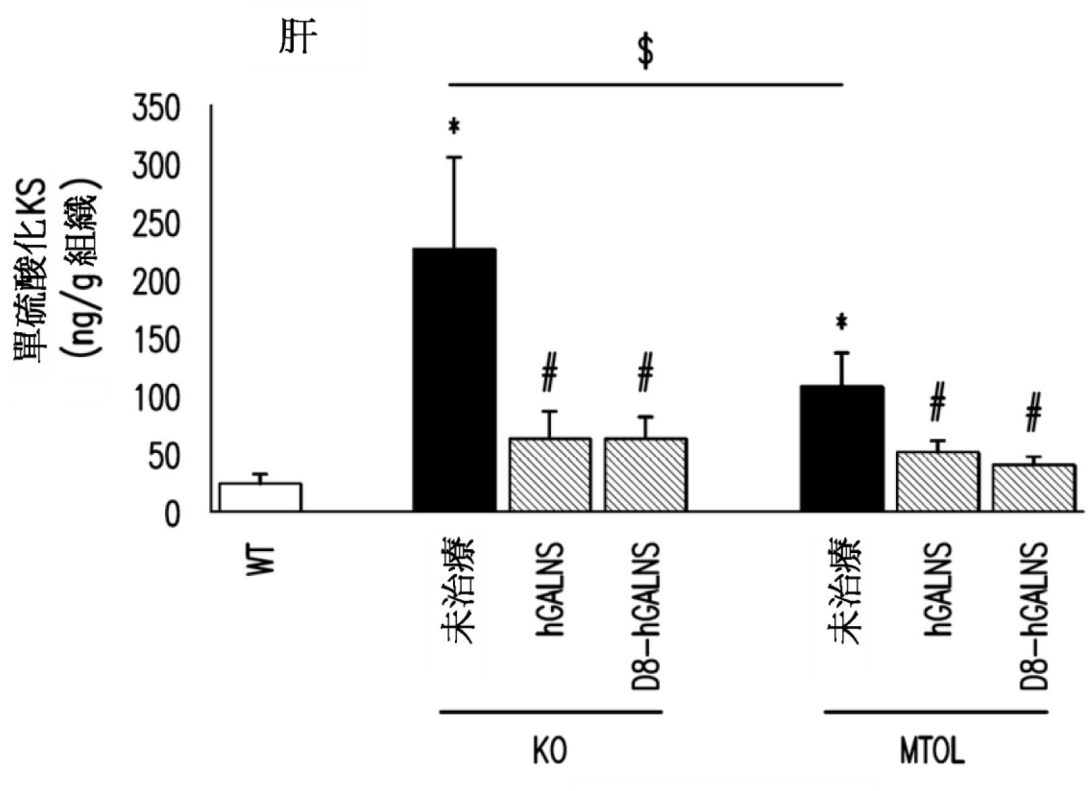
【圖 24K】


KO
單磺酸化KS (ng/ml)
年齡(週)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
4
6
8
10
12
14
16

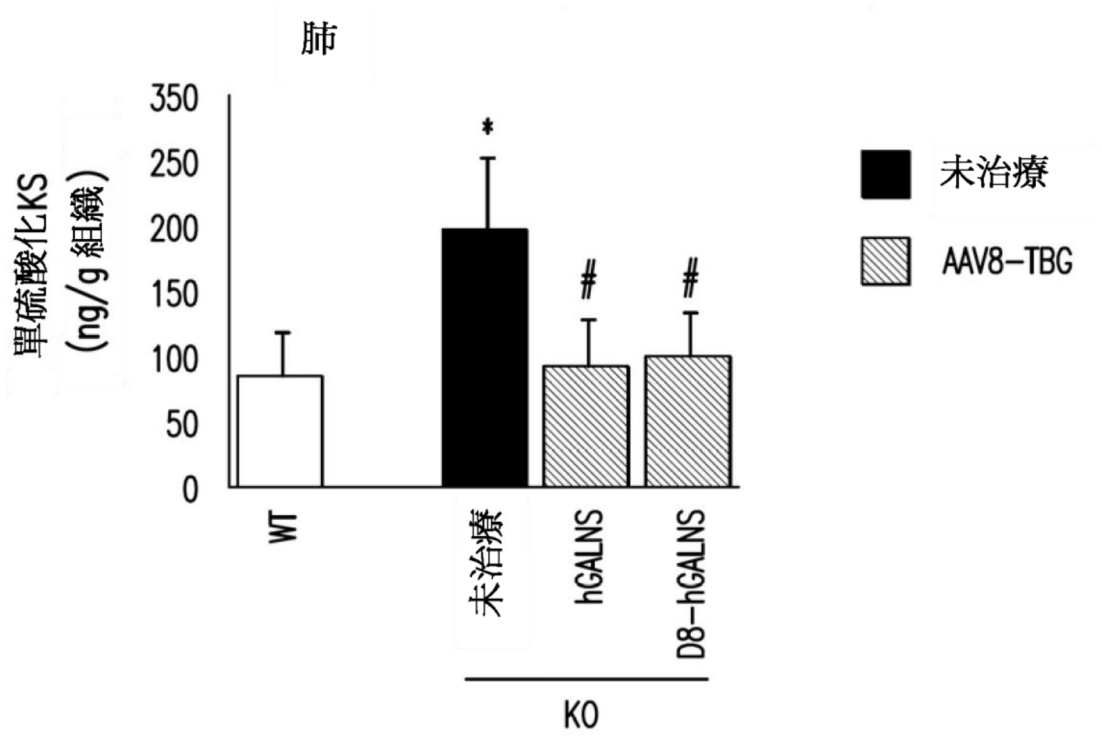
【圖 25A】


MTOL
單磺酸化KS (ng/ml)
年齡(週)
0
10
20
30
40
4
6
8
10
12
14
16
WT
未治療
AAV8-TBG-hGALNS
AAV8-TBG-D8-hGALNS

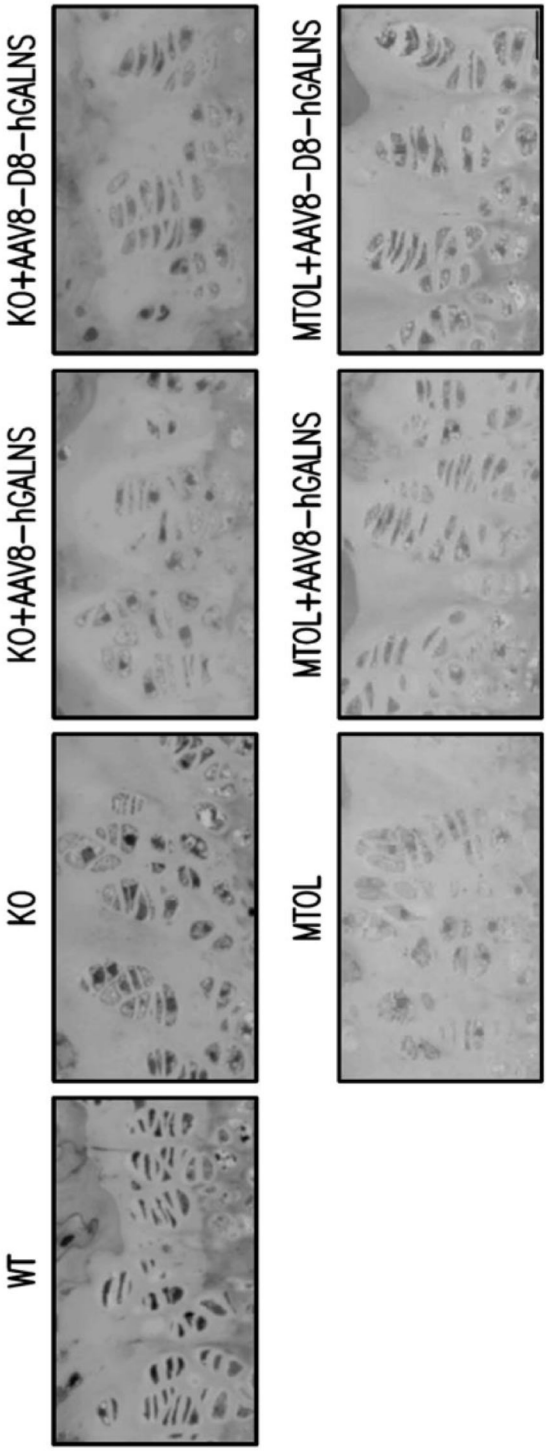
【圖 25B】


肝
$
*
#
#
*
#
#
350
300
250
200
150
100
50
0
單硫酸化KS
(ng/g 組織)
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
MTOL

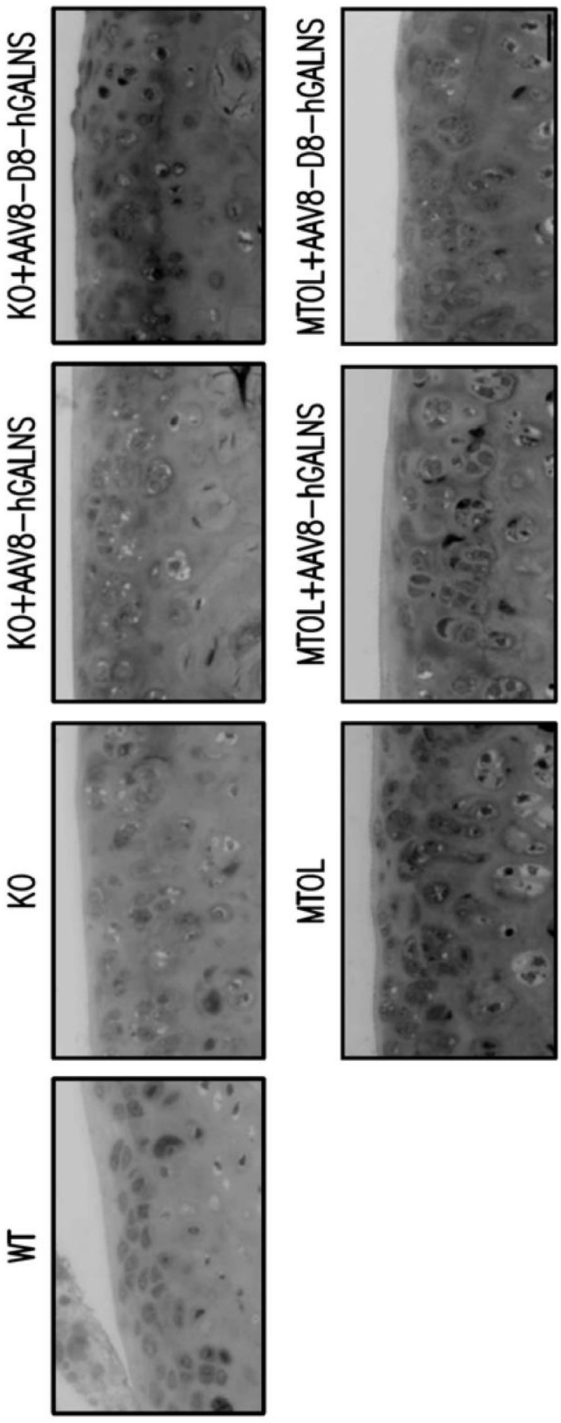
【圖 25C】


肺
*
#
#
350
250
200
150
100
50
0
單硫酸化KS
(ng/g 組織)
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
未治療
AAV8-TBG

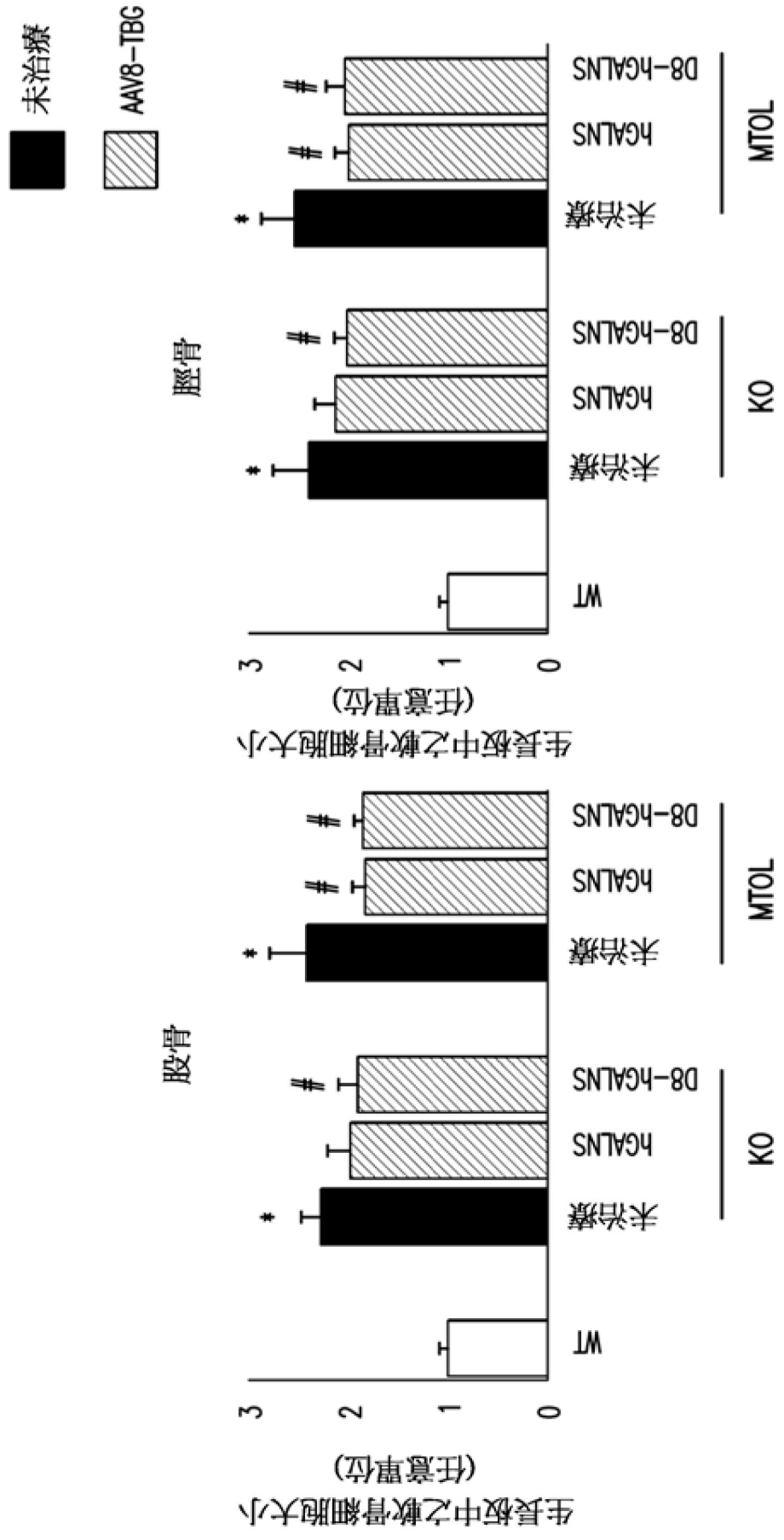
【圖 25D】


KO+AAV8−D8−hGALNS
KO+AAV8−hGALNS
KO
WT
MTOL+AAV8−D8−hGALNS
MTOL+AAV8−hGALNS
MTOL

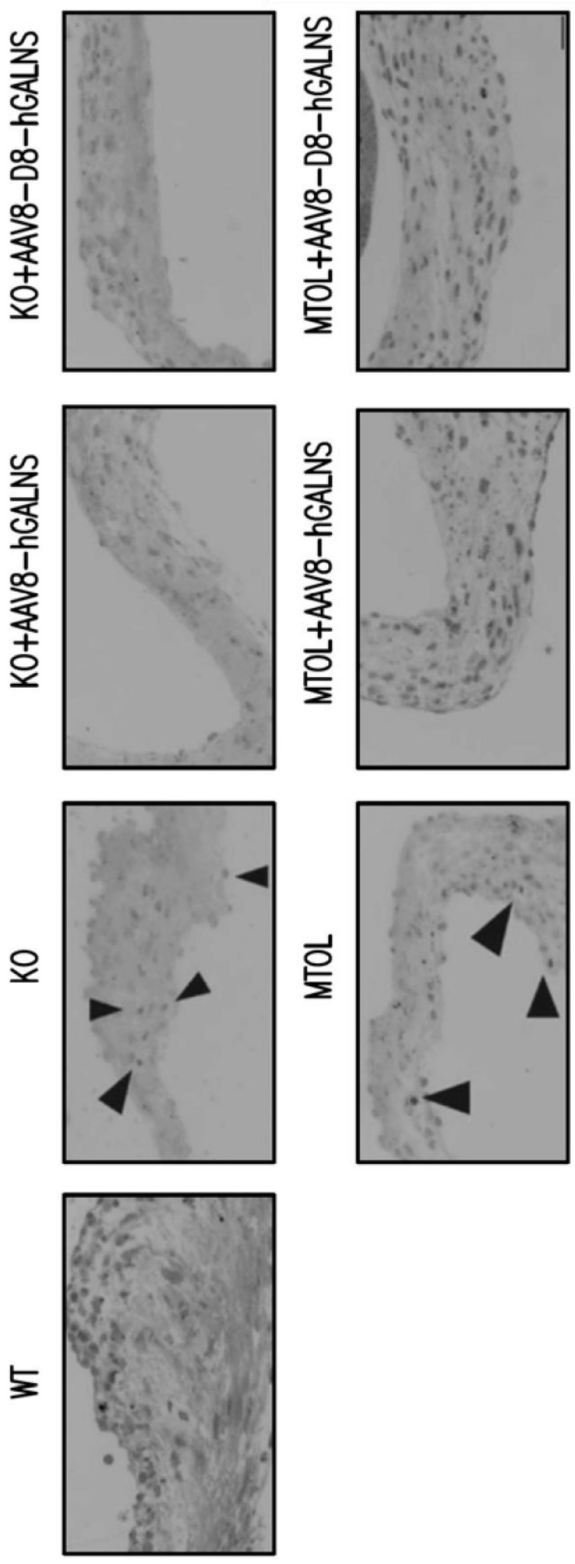
【圖 26A】


KO+AAV8-D8-hGALNS
MTOL+AAV8-D8-hGALNS
KO+AAV8-hGALNS
MTOL+AAV8-hGALNS
KO
MTOL
WT

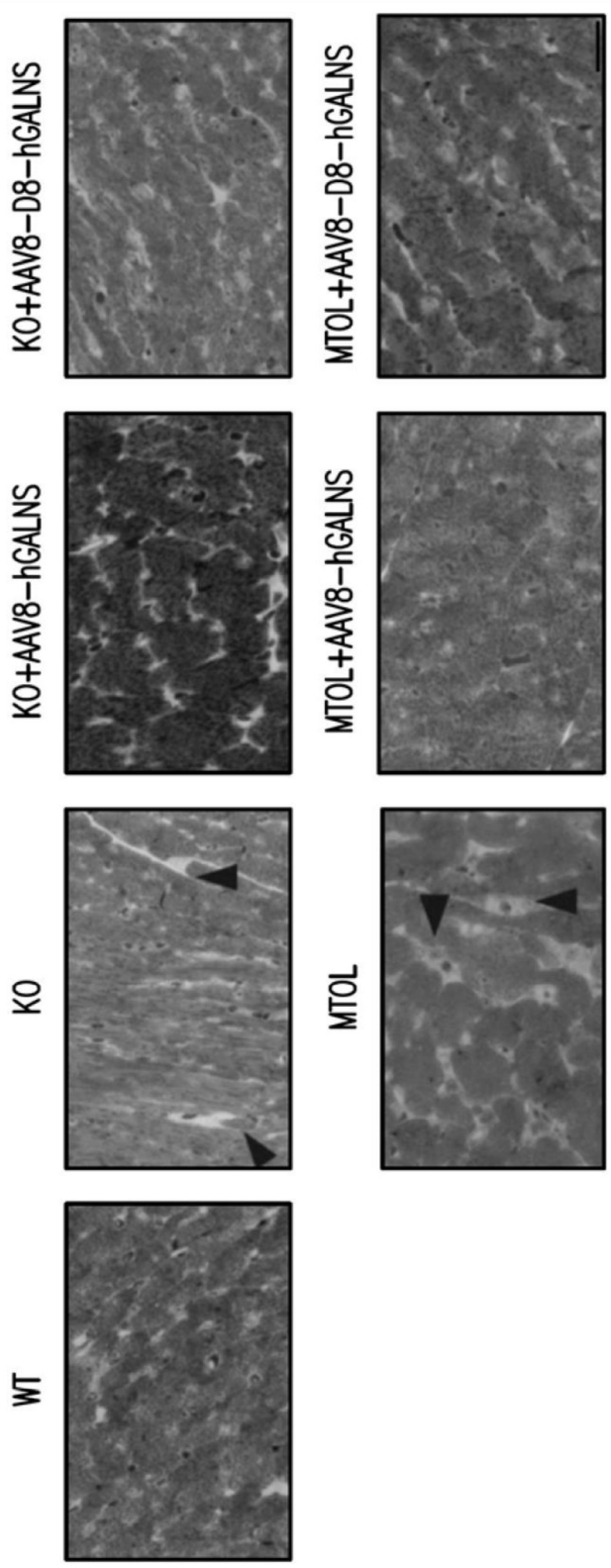
【圖 26B】


未治療
AAV8-TBG
股骨
脛骨
生長板中之軟骨細胞大小
(任意單位)
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
MTOL
0
1
2
3
*
#

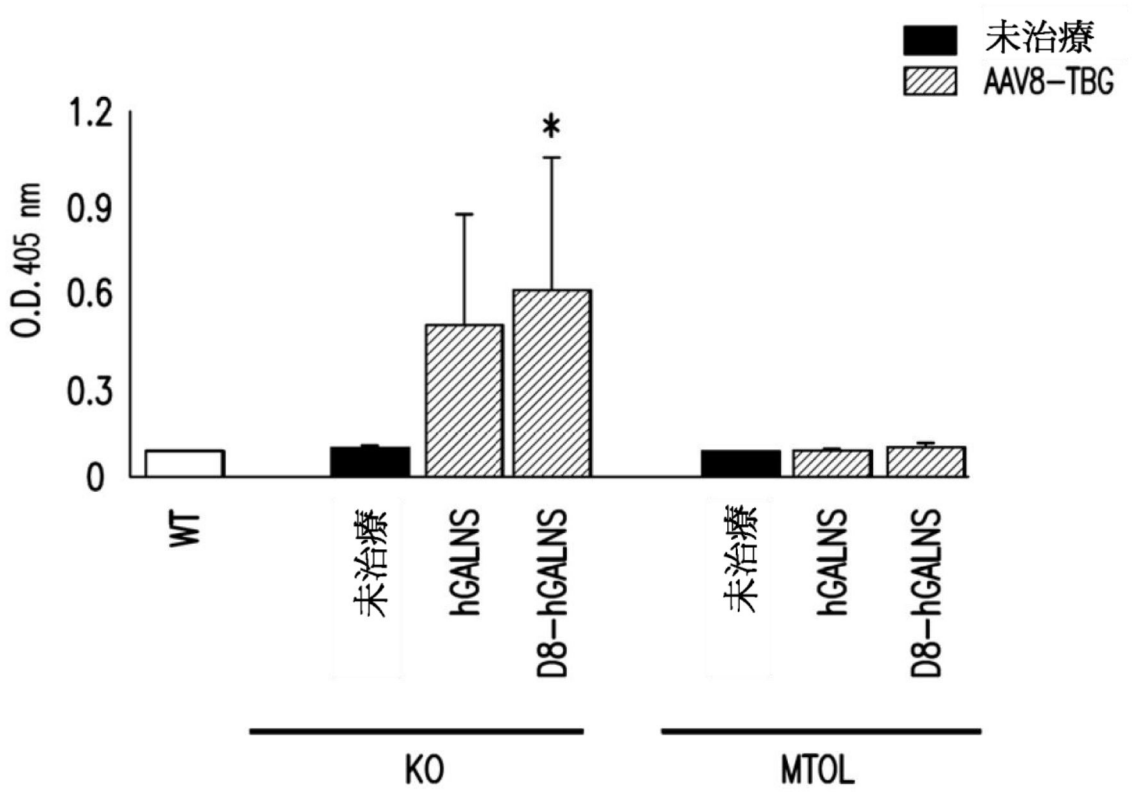
【圖 26C】


KO+AAV8-D8-hGALNS
MTOL+AAV8-D8-hGALNS
KO+AAV8-hGALNS
MTOL+AAV8-hGALNS
KO
MTOL
WT

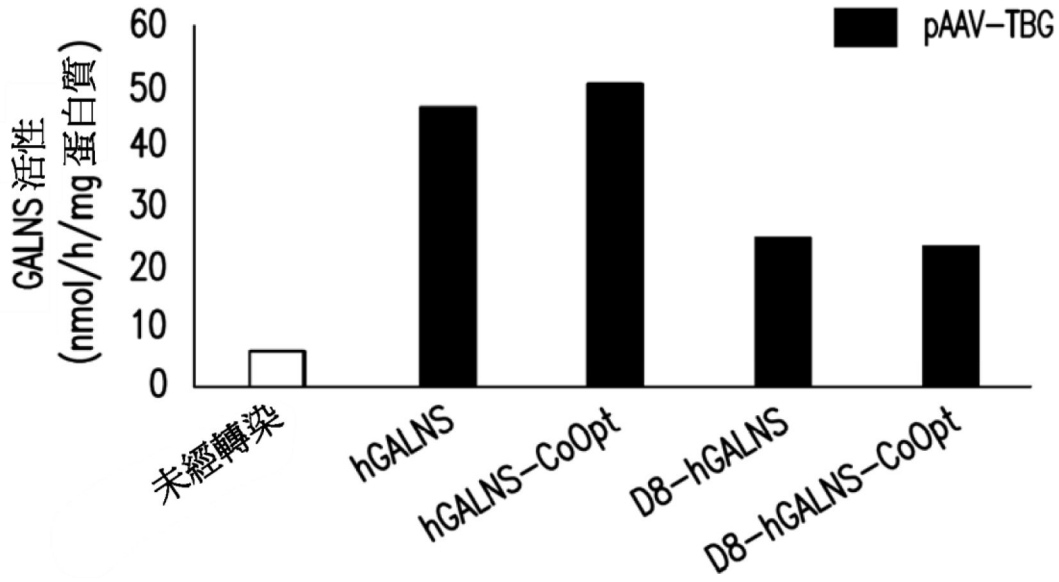
【圖 27A】


KO+AAV8−D8−hGALNS
MTOL+AAV8−D8−hGALNS
KO+AAV8−hGALNS
MTOL+AAV8−hGALNS
KO
MTOL
WT

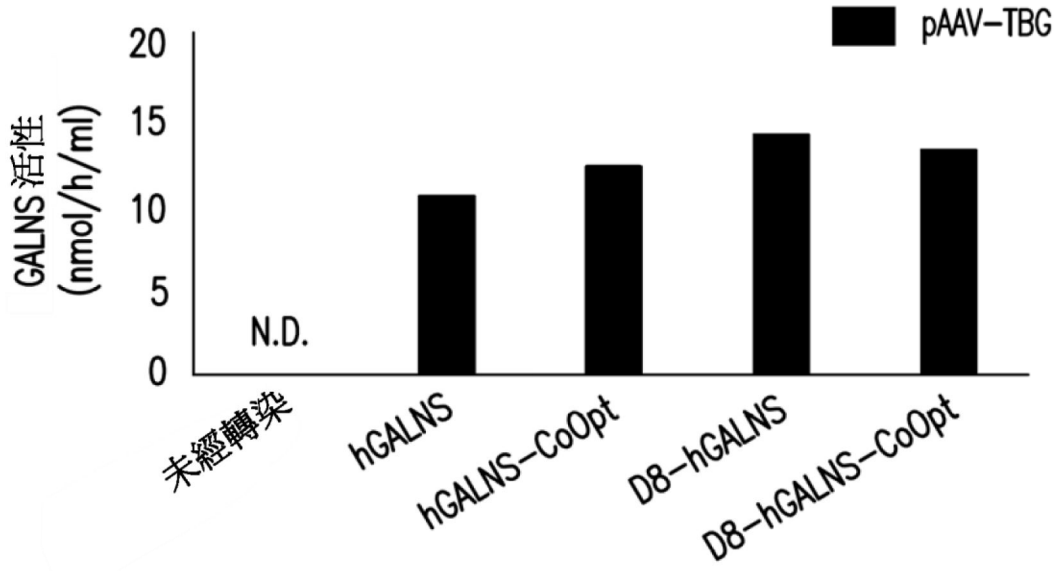
【圖 27B】


未治療
AAV8-TBG
O.D.405 nm
1.2
0.9
0.6
0.3
0
*
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
MTOL

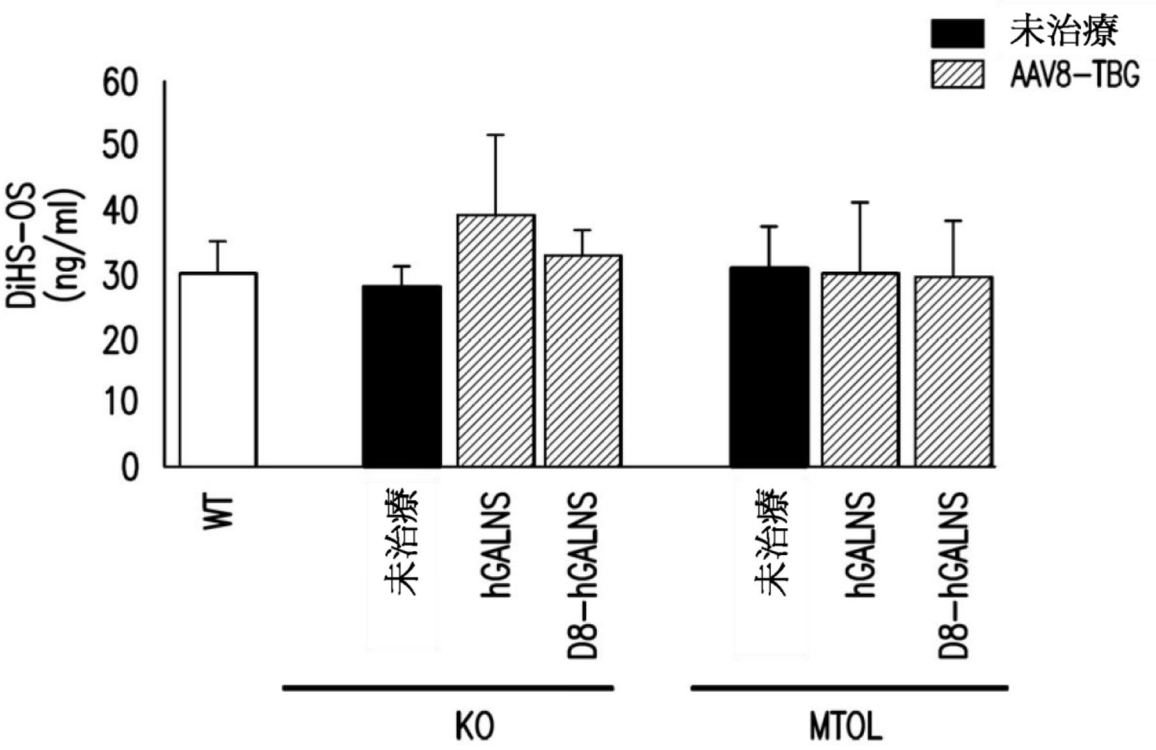
【圖 28】


pAAV–TBG
GALNS 活性
(nmol/h/mg 蛋白質)
60
50
40
30
20
10
0
未經轉染
hGALNS
hGALNS–CoOpt
D8–hGALNS
D8–hGALNS–CoOpt

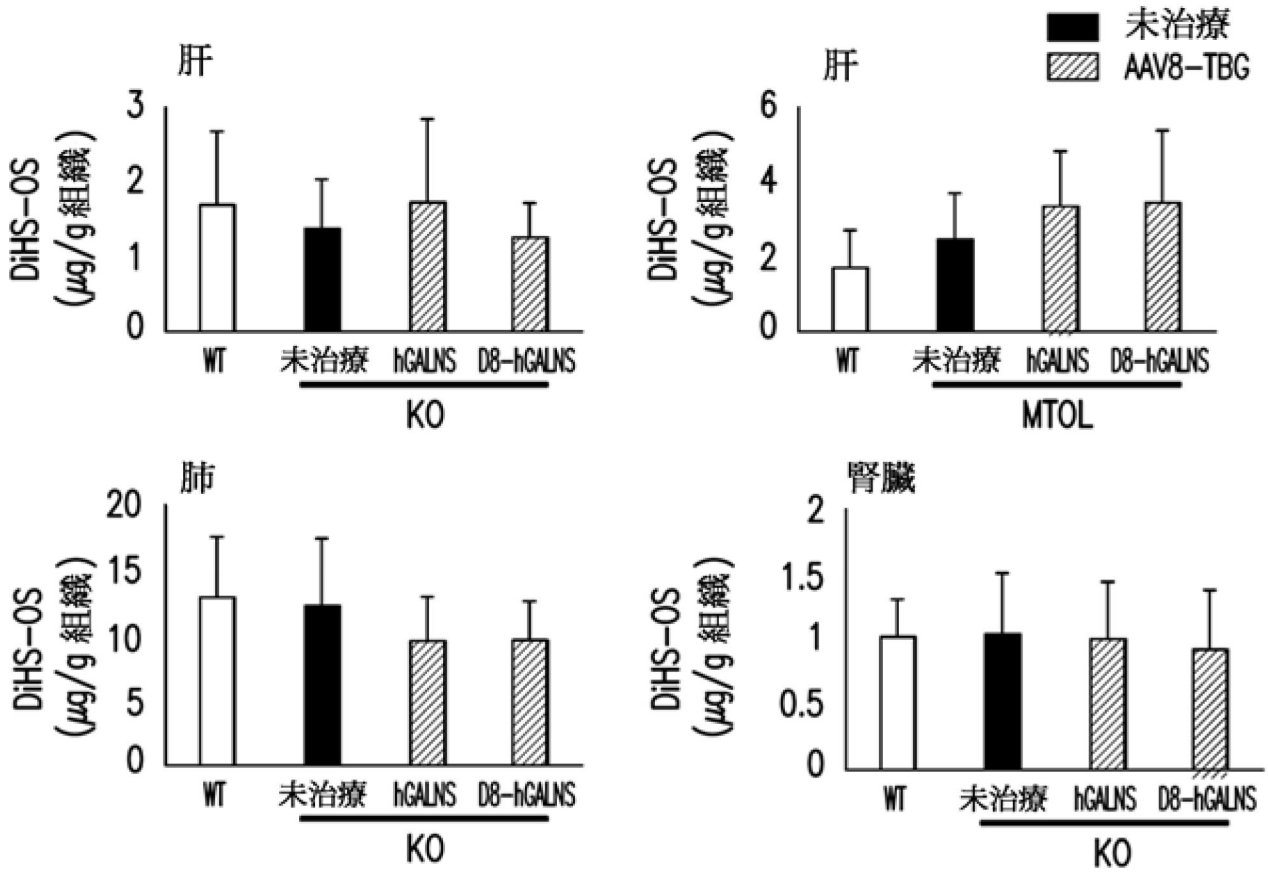
【圖 29A】


pAAV–TBG
GALNS 活性
(nmol/h/ml)
20
15
10
5
0
N.D.
未經轉染
hGALNS
hGALNS–CoOpt
D8–hGALNS
D8–hGALNS–CoOpt

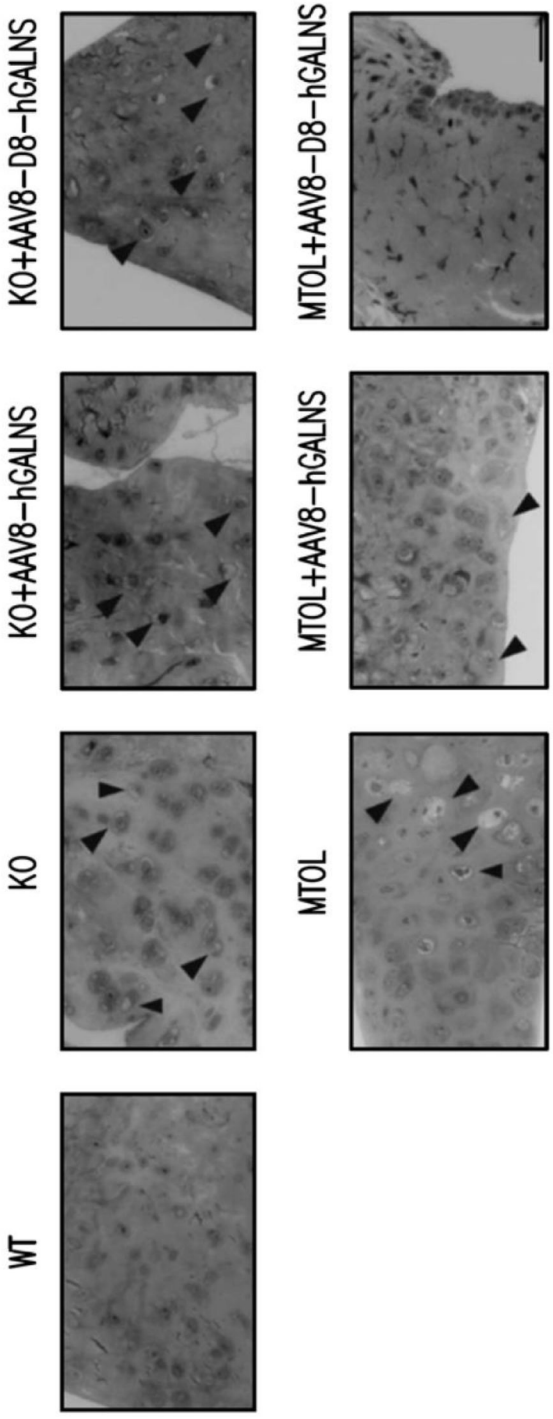
【圖 29B】


未治療
AAV8-TBG
DiHS-OS (ng/ml)
60
50
40
30
20
10
0
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
MTOL

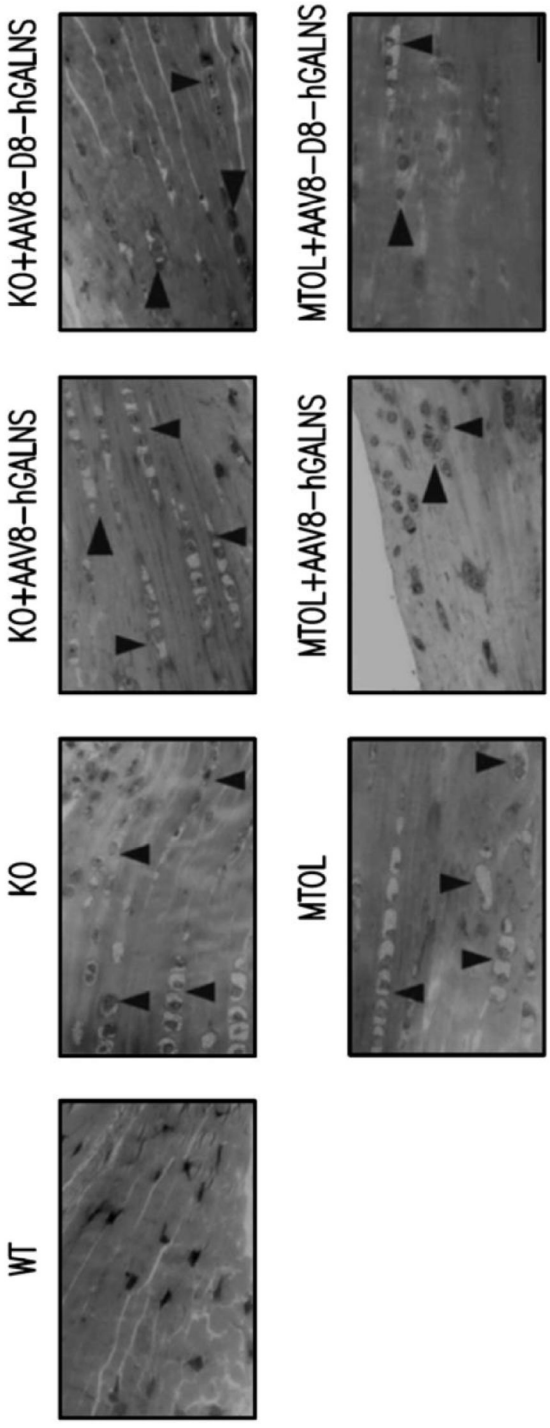
【圖 30】


肝
DiHS-OS (μg/g 組織)
3
2
1
0
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
未治療
AAV8-TBG
肝
DiHS-OS (μg/g 組織)
6
4
2
0
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
MTOL
肺
DiHS-OS (μg/g 組織)
20
15
10
5
0
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO
腎臟
DiHS-OS (μg/g 組織)
2
1.5
1
0.5
0
WT
未治療
hGALNS
D8-hGALNS
KO

【圖 31】


KO+AAV8-D8-hGALNS
MTOL+AAV8-D8-hGALNS
KO+AAV8-hGALNS
MTOL+AAV8-hGALNS
KO
MTOL
WT

【圖 32A】


KO+AAV8-D8-hGALNS
MTOL+AAV8-D8-hGALNS
KO+AAV8-hGALNS
MTOL+AAV8-hGALNS
KO
MTOL
WT

【圖 32B】


250
500
750
1000
1250
LBTP1
肝控制區
Sp7/Osx 啓動子
hAAT(Δ)啓動子
ApoE 強化子

【圖 33】


500
1000
1500
2000
LBTP2啓動子卡匣
Sp7/Osx 啓動子
hAAT(Δ)啓動子
肝控制區
ApoE 強化子

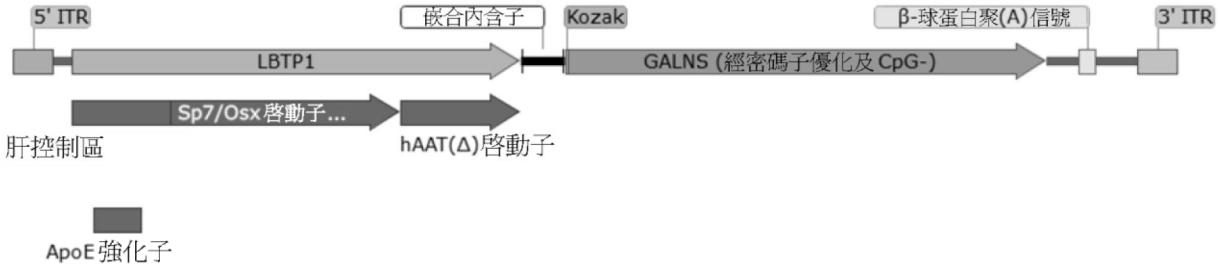
【圖 34】


5' ITR
嵌合內含子
Kozak
β-球蛋白聚(A)信號
3' ITR
Sp7/Osx 啓動子 (-1269/+91)
GALNS (經密碼子優化及CpG-)

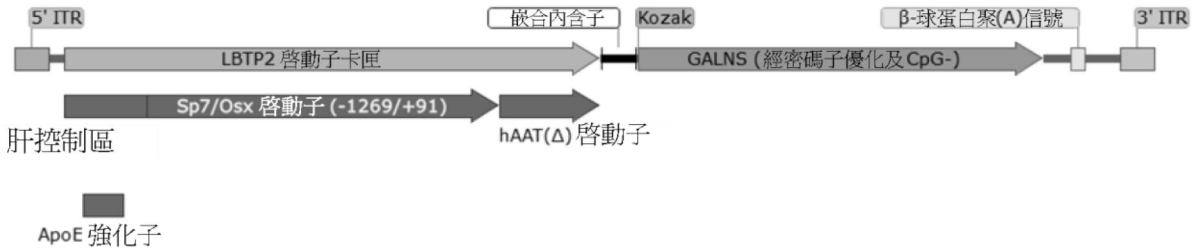
【圖 35】


Kozak
嵌合內含子
Sp7/Osx 啓動子(-665/+91)
5' ITR
3' ITR
β-球蛋白聚(A)信號
GALNS (經密碼子優化及CpG-)

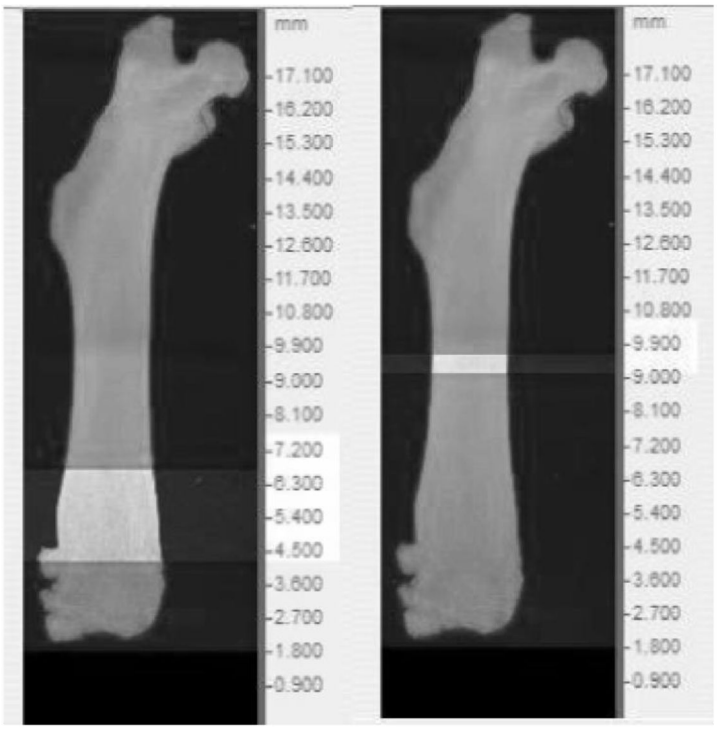
【圖 36】


5' ITR
嵌合內含子
Kozak
β-球蛋白聚(A)信號
3' ITR
LBTP1
GALNS (經密碼子優化及 CpG-)
Sp7/Osx啓動子...
肝控制區
hAAT(Δ)啓動子
ApoE強化子

【圖 37】


5' ITR
嵌合內含子
Kozak
β-球蛋白聚(A)信號
3' ITR
LBTP2 啓動子卡匣
GALNS (經密碼子優化及CpG-)
Sp7/Osx 啓動子 (-1269/+91)
肝控制區
hAAT(Δ)啓動子
ApoE 強化子

【圖 38】


mm
17.100
16.200
15.300
14.400
13.500
12.600
11.700
10.800
9.900
9.000
8.100
7.200
6.300
5.400
4.500
3.600
2.700
1.800
0.900
mm
17.100
16.200
15.300
14.400
13.500
12.600
11.700
10.800
9.900
9.000
8.100
7.200
6.300
5.400
4.500
3.600
2.700
1.800
0.900

【圖 39】