



(21)申請案號：109105680

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl. : *C12N15/861 (2006.01)*
A61P25/28 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/22 美國
2019/10/21 美國
2020/02/02 美國

62/809,329

62/923,812

62/969,108

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

(72)發明人：亨德勒 克里斯欽 HINDERER, CHRISTIAN (US)；米勒 尼羅 MILLER, NIMROD (IL)；威爾森 詹姆士 M WILSON, JAMES M. (US)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：14 共 168 頁

(54)名稱

用於治療 GRN 相關的成年發病型神經系統退化症之重組腺相關病毒

(57)摘要

提供一種重組 AAV(rAAV)，其適用於治療由顆粒蛋白(GRN)單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症，例如顆粒蛋白前體(PGRN)相關的額顳葉失智症(FTD)。該 rAAV 包含(a)腺相關病毒 1 衣殼，及(b)包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。亦提供一種治療患有由顆粒蛋白(GRN)單套缺失引起的 PGRN-FTD 及其它成年發病型神經系統退化症之人類病患之方法，其包含將具有腺相關病毒 1(AAV1)衣殼之重組腺相關病毒(rAAV)遞送至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

A recombinant AAV (rAAV) suitable for use in treating adult onset neurodegeneration caused by granulin (GRN) haploinsufficiency, such as progranulin (PGRN) - related frontotemporal dementia (FTD), is provided. The rAAV comprises (a) an adeno-associated virus 1 capsid, and (b) a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats, a coding sequence for human progranulin, and regulatory sequences which direct expression of the progranulin. Also provided are a method for treating a human patient with PGRN-FTD and other adult onset neurodegeneration caused by granulin (GRN) haploinsufficiencies, comprising delivering to the central nervous system (CNS) a recombinant adeno-associated virus (rAAV) having an adeno-associated virus 1 (AAV1) capsid, said rAAV further comprising a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats, a coding sequence for human progranulin, and regulatory sequences which direct expression of the progranulin.



202045730

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療 GRN 相關的成年發病型神經系統退化症之重組腺相關病毒

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR TREATMENT OF GRN-ASSOCIATED ADULT-ONSET NEURODEGENERATION

【中文】

提供一種重組 AAV(rAAV)，其適用於治療由顆粒蛋白 (GRN)單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症，例如顆粒蛋白前體(PGRN)相關的額顳葉失智症(FTD)。該 rAAV 包含 (a)腺相關病毒 1 衣殼，及(b)包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。亦提供一種治療患有由顆粒蛋白 (GRN)單套缺失引起的 PGRN-FTD 及其它成年發病型神經系統退化症之人類病患之方法，其包含將具有腺相關病毒 1(AAV1)衣殼之重組腺相關病毒(rAAV)遞送至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【英文】

A recombinant AAV (rAAV) suitable for use in treating adult onset neurodegeneration caused by granulin (GRN) haploinsufficiency, such as progranulin (PGRN) - related frontotemporal dementia (FTD), is provided. The rAAV comprises (a) an adeno-associated virus 1 capsid, and (b) a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats, a coding sequence for human progranulin, and regulatory sequences which direct expression of the progranulin. Also provided are a method for treating a human patient with PGRN-FTD and other adult onset neurodegeneration caused by granulin (GRN) haploinsufficiencies, comprising delivering to the central nervous system (CNS) a recombinant adeno-associated virus (rAAV) having an adeno-associated virus 1 (AAV1) capsid, said rAAV further comprising a vector genome packaged in the AAV capsid, said vector genome comprising AAV inverted terminal repeats, a coding sequence for human progranulin, and regulatory sequences which direct expression of the progranulin.

【指定代表圖】

無。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療 GRN 相關的成年發病型神經系統退化症之重組腺相關病毒

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR TREATMENT OF GRN-ASSOCIATED ADULT-ONSET NEURODEGENERATION

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種用於治療 GRN 相關的成年發病型神經系統退化症(GRN-associated adult-onset neurodegeneration)之重組腺相關病毒。

[相關申請案的交叉參考]

【0002】本申請案主張美國臨時申請號 62/809,329(2019 年 2 月 22 日申請)、62/923,812(2019 年 10 月 21 日申請)及 62/969,108(2020 年 2 月 2 日申請)之權益及優先權，本文藉由引用將其整體併入用於所有之目的。

【先前技術】

【0003】額顳葉失智症(Frontotemporal dementia；FTD)是一種致命的神經退行性疾病，其通常於六、七十歲表現，具有執行功能、行為、言語或語言理解能力不足。這些徵狀與影響額葉皮質及顳葉皮質之腦萎縮的特徵性模式有關。病患普遍表現一種進行性的病程，從徵狀發作開始平均存活 8 年(Coyle-Gilchrist IT, et al. Neurology. 2016;86(18):1736-43)。

【0004】FTD 為高度遺傳性，約 40%的病患具有陽性家族史(Rohrer JD, et al. Neurology. 2009;73(18):1451-6.)。在 5-

10% FTD 病患中，致病性功能喪失突變可在編碼顆粒蛋白前體 (progranulin ; PGRN)(一種普遍存在的溶酶體蛋白質)的顆粒蛋白 (granulin ; GRN) 基因中鑑定 (Rohrer JD, et al. *Neurology*. 2009;73(18):1451-6)。GRN 突變攜帶者表現出迅速且廣泛的腦萎縮，並可能存在其它神經退行性疾病的臨床特徵，例如進行性核上神經麻痺症 (progressive supranuclear palsy)、皮質基底核綜合症 (corticobasal syndrome)、帕金森氏症 (Parkinson's disease)、路易氏體失智症 (dementia with Lewy bodies) 或阿茲海默氏病 (Alzheimer's disease) (Le Ber I, et al. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131(3):732-46.)。GRN 突變以體染色體顯性方式遺傳，到 70 歲時外顯率大於 90% (Gass J, et al. *Human molecular genetics*. 2006;15(20):2988-3001)。雖然單一 GRN 突變的遺傳會導致 FTD 及其它遲發性神經退行性疾病，但具有同基因型組合之功能喪失突變 (homozygous loss-of-function mutations) 的病患在生命中更早顯現出神經性類蠟脂褐質病 (neuronal ceroid lipofuscinosis ; NCL，巴登氏病 (Batten disease)，特徵為自體螢光物質 (脂褐質 (lipofuscin)) 在神經元溶酶體中積累、快速的認知能力下降及視網膜退化 (Smith Katherine R, et al. *American Journal of Human Genetics*. 2012;90(6):1102-7)。儘管 GRN 突變的異基因型組合 (heterozygous) 病患的徵狀發作甚晚，但它們最終在腦和視網膜中發展出與 NCL 病患相同的溶酶體儲積病灶，且同樣經歷進行性神經系統退化症 (Ward ME, et al. *Science Translational Medicine*. 2017;9(385) ; Gotzl JK, et al. *Acta neuropathologica*. 2014;127(6):845-

60)。最近發現顆粒蛋白前體藉由促進溶酶體酸化並充當溶酶體蛋白酶(包括細胞自溶酵素 D (cathepsin D) ; CTSD)的伴護蛋白(chaperone)，在溶酶體功能中扮演關鍵角色(Beel S, et al Human molecular genetics. 2017 Aug 1;26(15):2850-2863 ; Tanaka Y, et al. 人類 molecular genetics. 2017;26(5):969-88)。編碼 CTSD 的基因中的突變亦導致 NCL 表型，支持與溶酶體蛋白酶活性不足有關的常見病理生理學(Siintola E, et al. Brain : a journal of neurology. 2006;129(Pt 6):1438-45)。

【0005】目前尚無針對由 GRN 單套缺失(GRN haploinsufficiency)引起的成年發病型神經系統退化症的疾病的改良療法。疾病管理包括目標在降低疾病相關的行為、認知及/或運動的支持治療及藥品仿單標示外(off-label)治療(Tsai and Boxer, 2016, J Neurochem. 138 Suppl 1:211-21)。再者，以篩檢具有失智症家族史的個體，更多的病患可在早期被聯繫到，但有鑑於缺乏治療，顯示此篩檢並非是必要的。因此，此疾病譜表示高度未滿足醫療需求的領域。

【0006】對於與 GRN 單套缺失相關的成年發病型神經退化性疾病及其相關徵狀的治療有所需求。

【發明內容】

【0007】提供一種重組 AAV (rAAV)，其適用於治療由與 GRN 單套缺失相關之顆粒蛋白前體(PGRN)相關的額顳葉失智症(FTD)及其它成年發病型神經退化性疾病所引起的神經系統退化症。rAAV 包含腺相關病毒 1 衣殼(capsid)及包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複

(inverted terminal repeats ; ITRs)、編碼人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現的調控序列。在某些實施方式中，載體基因體包含 AAV 5'反向末端重複(ITR)、人類 PGRN 編碼序列及指導其表現之調控元件、及 AAV 5' ITR。

【0008】亦提供一種包含水性液體及重組 AAV (rAAV)之醫藥組成物。在某些實施方式中，該水性液體包含具有表面活性劑的人工腦脊髓液，其適用於鞘內投予。

【0009】提供一種治療具有由 GRN 單套缺失所引起之顆粒蛋白前體相關之額顳葉失智症(FTD)神經系統退化症或另一成年發病型神經系統退化症疾病之人類病患的方法。該方法包含將包括人類顆粒蛋白前體編碼序列之 rAAV 遞送至中樞神經系統(CNS)，該重組腺相關病毒(rAAV)具有腺相關病毒 1 (AAV1)衣殼，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體之編碼序列及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0010】提供一種 rAAV1.hPGRN，其用於用以治療患有由 GRN 單套缺失所引起之 PGRN-FTD 或另一成年發病型神經系統退化症疾病之人類病患的方法。該方法包含投予具有腺相關病毒 1 衣殼之 rAAV 至 CNS，該衣殼編碼靶向髓腔膜細胞(ependymal cell)的人類顆粒蛋白前體。rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體之編碼序列、及指導顆粒蛋白前體在室管膜細胞中表現之調節序列。在一實施方式中，在遞送 rAAV1 基因治療後，表現可分泌的人類顆粒蛋白前體。

【0011】提供一種用於治療患有腦損傷之人類病患的方法，該腦損傷與由 GRN 單套缺失引起之顆粒蛋白前體相關的額顳葉失智症(FTD)神經系統退化症或另一成年發病型神經系統退化症疾病有關。該方法包含將具有腺相關病毒 1(AAV1)衣殼之重組腺相關病毒(rAAV)投予至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體之編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0012】在某些實施方式中，本文所提供之方法可進一步包含(a)非侵入式評估病患視網膜儲積病灶(retinal storage lesions)之減少作為腦損傷(brain lesions)減少的預測，(b)進行磁共振成像以評估腦容量，及/或(c)測量 CSF 中顆粒蛋白前體濃度之濃度。

【0013】由以下本發明的詳細描述，本發明的這些及其它態樣將顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1 為 AAV1.hPGRN 載體基因體之線性圖譜。AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG 載體基因體包含在普遍存在的 CB7 啟動子控制下的人類 PGRN 編碼序列，其由 CMV IE 增強子和雞 β -肌動蛋白啟動子之間的混雜構成。縮寫：BA， β -肌動蛋白；bp，鹼基對；CMV IE，細胞巨大病毒立即初期(cytomegalovirus immediate-early)；ITR，反向末端重複；PolyA，多腺核苷酸化；rBG，兔 β -球蛋白。

圖 2 為攜帶載體基因體之 cis 質體的線性載體圖譜。

圖 3A-圖 3D 提供 $GRN^{-/-}$ 小鼠大腦中脂褐質蓄積和己糖胺酶(hexosaminidase)活性的自然史。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在指定的年齡(每個時間點 $n=10$)犧牲。對未染色的大腦切片進行海馬體、丘腦及額葉皮質中的自體螢光物質(脂褐質)成像，並由三位盲校閱者對脂褐質沉積物進行定量並取平均值(圖 3A-圖 3C)。脂褐質計數以相對於感興趣區域的總面積表示。測定大腦樣本中的己糖胺酶活性，並以總蛋白濃度標準化(圖 3D)，數值表示為與野生型對照組的比率。

圖 4A-圖 4G 顯示經由 AAV-媒介 PGRN 表現，修正年輕成年 $GRN^{-/-}$ 小鼠大腦中之溶酶體病理學。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在 2 個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類 PGRN (10^{11} GC)的 AAVhu68 載體之單次 ICV 注射治療(每組 $n=10$)。在注射 60 天後犧牲動物，並藉由 ELISA 測量 CSF(圖 4A)及腦額葉(圖 4B)中之人類 PGRN。測量腦樣本中己糖胺酶活性(圖 4C)。將腦 PGRN 濃度及 Hex 活性標準化成總蛋白質，對未染色的大腦切片進行海馬體、丘腦及額葉皮質中之自體螢光物質(脂褐質)成像。海馬體、丘腦及額葉皮質中之脂褐質沉積物經盲校閱者定量(圖 4D-圖 4H)。脂褐質計數以每一高倍鏡檢(high power field)表示。每組 $N=10$ ，除了 KO+PBS 海馬體 $n=8$ 。 $*p<0.05$ ， $**p<0.005$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，進行單因子變異數分析(One-way ANOVA)，之後杜凱氏(Tukey)多重比較試驗。量測血清中之己糖胺酶活性(圖 4G)。

圖 5A-圖 5D 顯示藉由人類 PGRN 的 AAV-媒介表現，修正老年 $GRN^{-/-}$ 小鼠腦中的溶酶體病理學。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在 7 個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類

PGRN(10^{11} GC)的 AAVhu68 載體之單次 ICV 注射治療。在注射 4 個月後犧牲動物。量測大腦樣本中之己糖胺酶活性(圖 5A)，並經盲校閱者定量海馬體、丘腦及皮質中之脂褐質沉積物(圖 5B-圖 5D)。脂褐質計數以每一高倍鏡檢表示。 $*p<0.05$ ， $**p<0.005$ ，進行單因子變異數分析，之後杜凱氏多重比較試驗。

圖 6A-圖 6C 顯示藉由 AAV-媒介 PGRN 表現，修正老年 GRN^{-/-}小鼠的腦小膠質細胞增生(brain microgliosis)。GRN^{-/-}小鼠(KO)或 GRN^{+/+}(WT)對照組在 7 個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類 PGRN(10^{11} GC)的 AAVhu68 載體之單次 ICV 注射治療。在注射 4 個月後犧牲動物，並將腦切片對 CD68 染色。海馬體、丘腦及額葉皮質影像中的 CD68 陽性面積使用 ImageJ 軟體經盲校閱者定量(圖 6A-圖 6C)。面積以每一高倍鏡檢表示。 $*p<0.05$ ， $**p<0.005$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，進行單因子變異數分析，之後杜凱氏多重比較試驗。

圖 7A-圖 7C 顯示在 AAV 遞送後恆河獼猴(rhesus macaque)中的人類 PGRN 表現。在研究的第 0 天將由雞 β 肌動蛋白啟動子表現人類 PGRN 的 AAV1、AAV5 或 AAVhu68 載體(3×10^{13} GC)藉由 ICM 注射投予成年恆河獼猴(每一載體 $n=2$)。二隻額外的獼猴被投予由泛蛋白 C(ubiquitin C)啟動子表現 hPGRN 的 AAVhu68 載體(AAVhu68 V2)。於螢光透視導引(fluoroscopic guidance)下進行 ICM 注射。藉由螢光透視檢查和 CSF 確認針頭放置後，顯影劑(contrast material)的回注證實了在小腦延髓池(cisterna magna)內的分佈。在隨後的載體輸注過程中，顯影(contrast)的位移很明顯。藉由 ELISA，

在經治療的獼猴(圖 7A)及健康的成年人受試者(圖 7B)的 CSF 中及在經治療的獼猴的血清中(圖 7C)量測人類 PGRN。在圖 7A 及圖 7B 中，虛線係指在 1 : 5 稀釋的 CSF 中 hPGRN 的定量極限。

圖 8A-圖 8C 顯示在經載體治療的非人類靈長類動物中對人類 PGRN 的免疫反應。在以 ICM 投予由雞 β 肌動蛋白啟動子或泛蛋白 C 啟動子(AAVhu68 V2)表現人類 PGRN 的 AAV1、AAV5 或 AAVhu68 載體(3×10^{13} GC)後，每週收集 CSF 用於化學和細胞學分析。大多數動物中白血球計數增加(主要是小淋巴細胞)明顯(圖 8A)。藉由 ELISA 在以 AAVhu68 或 AAV1 治療之動物的 CSF(圖 8B)和血清(圖 8C)中測量對人類 PGRN 的抗體反應。在經 AAV5 治療之動物的血清或 CSF 樣本中，並未評估針對人類 PGRN 的抗體。

圖 9 顯示 ICM 投予 AAV1 及 AAVhu68 載體至非人類靈長類動物後的腦轉導(brain transduction)水平。將成年恆河獼猴藉由 ICM 注射投予由雞 β 肌動蛋白啟動子表現 GFP 之 3×10^{13} GC AAVhu68(n=2)或 AAV1(n=2)載體。投予載體後 28 天，對動物進行屍體剖檢，並藉由 GFP 免疫組織化學或免疫螢光對 GFP 及 DAPI 進行染色，分析大腦右半球五個區域的切片。以特定細胞類型的標記(NeuN、GFAP 及 Olig2)同時染色(Costaining)可用於定量轉導的星狀細胞(astrocyte)及寡樹突細胞(oligodendrocyte)。計算所有樣本腦區域的各細胞類型的平均轉導，誤差槓=五個部分的 SEM。

圖 10 提供一張表格，其顯示 ICM 投予 AAV1(動物 ID 1826 和 2068)及 AAVhu68(動物 ID 1518 和 2076)載體至非人

類靈長類動物後，神經元、星狀細胞和寡樹突細胞轉導的百分比。將成年恆河獼猴在研究第 0 天 ICM 注射投予由雞 β 肌動蛋白啟動子表現 GFP 之 3×10^{13} GC AAVhu68(n=2)或 AAV1(n=2)載體。投予載體後 28 天，對動物進行屍體剖檢，並藉由 GFP 免疫螢光對特定細胞類型(NeuN、GFAP 及 Olig2)同時染色，分析大腦右半球五個區域的切片，使用 HALO 軟體定量每種細胞類型的總細胞和每種類型的 GFP 表現細胞的數量，顯示各區域的各細胞類型轉導的百分比。對於某些動物，從區域 5 分析兩個部分。

圖 11A-圖 11B 顯示非人類靈長類動物中的正中感覺神經傳導研究的結果。Y 軸代表在投予三種不同劑量(3×10^{12} GC、 1×10^{13} GC 或 3×10^{13} GC 之 rAAV1.hPGRN 或媒劑對照組)後，隨時間(x 軸)所測量的自發作到峰值幅度(峰值潛伏期)的潛伏期。

圖 12A-圖 12B 顯示以 rAAV1.hPGRN 治療 90 天後，非人類靈長類動物(NHP)中的背根節(dorsal root ganglia; DRG)、正中神經(median nerve)和脊髓(SC)的神經病理學研究結果。

圖 13 顯示用於載體生產的製造方法流程圖。縮寫：AEX，陰離子交換；CRL，查爾斯河實驗室(Charles River Laboratories)；ddPCR，微滴數位化聚合酶連鎖反應；DMEM，達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's modified Eagle medium)；DNA，去氧核糖核酸；FFB，最終調配緩衝液；GC，基因體拷貝數；HEK293，人類胚腎 293 細胞；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；PEI，聚乙烯亞胺；

SDS-PAGE，十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳；TFF，切向流過濾(tangential flow filtration)；USP，美國藥典；WCB，工作細胞庫。

圖 14 顯示載體調配物的製造方法流程圖，生產 GTP-205 藥品的製造方法。縮寫：Ad5，腺病毒血清型 5；AUC，分析型超高速離心；BDS，大批原料藥；BSA，牛血清白蛋白；CZ，Crystal Zenith；ddPCR，微滴數位化聚合酶連鎖反應；E1A，早期區域 1A (基因)；ELISA，酶聯免疫吸附分析法；FDP，最終藥品；GC，基因體拷貝數；HEK293，人類胚腎 293 細胞；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；KanR，康黴素抗性 (基因)；MS，質譜法；NGS，次世代定序法；qPCR，定量聚合酶連鎖反應；SDS-PAGE，十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳；TCID50，50%組織培養感染劑量；UPLC，超高效液相層析；USP，美國藥典。

【實施方式】

【0015】提供適用於治療與 GRN-單套缺失有關之神經退行性症狀(例如顆粒蛋白前體(PGRN)相關之額顳葉失智症(FTD))的重組 AAV(rAAV)及含其之醫藥組成物。在某些較佳的實施方式中，rAAV 包含腺相關病毒 1 衣殼及包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。在某些實施方式中，該載體基因體包含 AAV 5'反向末端重複(ITR)、人類 PGRN 編碼序列及指導其表現之調控元件、及 AAV 3' ITR。亦提供一種包含水性液體及重組 AAV (rAAV)之醫藥組成物。在某些實施方式中，該水性液體包含具有表面活

性劑之人工腦脊髓液，其適於鞘內投予。亦提供用以治療患有 PGRN-FTD 之人類病患及/或治療患有與 PGRN-FTD 相關之腦損傷之病患的方法。在某些實施方式中，所提供的是用於治療或降低病患小膠質細胞增生的方法，該方法包含遞送 rAAV.PGRN 至中樞神經系統(CNS)。在某些實施方式中，本文所提供之方法可進一步包含監測治療，其藉由(a)非侵入式評估病患視網膜儲積病灶之減少作為腦損傷減少的預測，(b)進行磁共振成像以評估腦容量，及/或(c)測量 CSF 中 PGRN 之濃度。可選擇地，可測量血漿中 PGRN 的濃度。

【0016】如本文中所使用，術語「AAV.hPGRN」或「rAAV.hPGRN」用於指稱重組腺相關病毒，其具有一其中含載體基因體的 AAV 衣殼，該載體基因體包含在調節序列控制下的人類顆粒蛋白前體編碼序列。可以指定特定的衣殼類型，舉例而言，例如 AAV1.hPGRN，其係指具有 AAV1 衣殼之重組 AAV；AAVhu68.hPGRN，其係指具有 AAVhu68 衣殼之重組 AAV；AAV5.hPGRN 係指具有 AAV5 衣殼之重組 AAV。

【0017】「重組 AAV」或「rAAV」為一種 DNA 酶抗性病毒顆粒，包含 AAV 衣殼及載體基因體兩個元件，該載體基因體至少含有包裝在 AAV 衣殼內的非 AAV 編碼序列。除非另有說明，否則該術語可與短語「rAAV 載體」互換使用。rAAV 為一種「複製缺陷型病毒」或「病毒載體」，因為其缺少任何功能性 AAV rep 基因或功能性 AAV cap 基因且不能產生子代。在某些實施方式中，唯一的 AAV 序列是 AAV 反向末端重複序列(ITRs)，其通常位於載體基因體的 5'和 3'末端，以使位於 ITR 之間的基因和調節序列包裝在 AAV 衣殼內。

【0018】如本文中所使用，「載體基因體」係指包裝在形成病毒顆粒的 rAAV 衣殼內部的核酸序列。此核酸序列含有 AAV 反向末端重複序列(ITRs)。在本文實施例中，載體基因體由 5' 至 3' 含有(最低限度)AAV 5' ITR、編碼序列及 AAV 3' ITR。可選擇來自 AAV2(與衣殼之來源 AAV 不同)之 ITR，或除了全長以外的 ITR。在某些實施方式中，ITR 係來自與生產過程中提供 rep 功能的 AAV 相同的 AAV 來源或反式互補 AAV。再者，可使用其它 ITR。此外，載體基因體含有指導基因產物表現的調節序列。載體基因體的適當成分於本文中更詳細地討論。

【0019】

治療性蛋白質及編碼序列：

rAAV 包括人類顆粒蛋白前體(hPGRN)蛋白質之編碼序列或其執行 hPGRN 的一或多種生物學功能的變異體。此蛋白質之編碼序列被工程化至載體基因體內，以於中樞神經系統 (CNS) 中表現。

【0020】HuPGRN1 最常以 GenBank NP_002078 的 593 個胺基酸序列表示特徵，其再現於 SEQ ID NO：1。此序列包含在位置 1 至 17 的訊息肽，以及包含胺基酸 18 至約 593 之分泌的顆粒蛋白前體蛋白質或分泌的顆粒蛋白。此蛋白質可裂解成 8 條鏈：顆粒蛋白 1(aka 顆粒蛋白 G：約胺基酸 58 至約胺基酸 113)、顆粒蛋白 2(約胺基酸 123 至約 179)、顆粒蛋白 3(約胺基酸 206 至約胺基酸 261)、顆粒蛋白 4(約胺基酸 281 至約胺基酸 336)、顆粒蛋白 5(約胺基酸 364 至約胺基酸 417)、顆粒蛋白 6(約胺基酸 442 至約胺基酸 496)及顆粒蛋白 7(約胺基酸

518 至約胺基酸 573)，參照 SEQ ID NO：1 的編號。在某些實施方式中，異源訊息肽可取代天然訊息肽。然而，其它實施方式可包含顆粒蛋白前體與外源訊息肽(例如，人類 IL2 引導子(leader))。亦參見例如，
www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia
 。因此，考量含有顆粒蛋白前體及/或其片段的融合蛋白質，此類融合蛋白質可包含一或多種活性 GRN(例如，GRN 1、2、3、4、4、6 或 7)及其相互之不同組合，或一或多種這些肽可與全長 PGRN 或另一蛋白質或肽(例如，另一活性蛋白質或肽及/或外源於人類 PGRN 之訊息肽)結合。

【0021】載體基因體可被工程化以攜帶此蛋白質之編碼序列，並在人類細胞中表現蛋白質，特別是在中樞神經系統。在某些實施方式中，該編碼序列可為天然序列，見於 GenBank：NM_002087.3，其再現於 SEQ ID NO：2。

【0022】在某些實施方式中，編碼序列提供於 SEQ ID NO：3。某些其它實施方式將包含與 SEQ ID NO：3 具有 95% 至 99.9% 或 100% 同一性的編碼序列，包括它們之間的值。在一些實施方式中，為了更好的治療效果將編碼序列進行密碼子優化，例如，在哺乳動物細胞中增強表現。可在具有訊息(引導子)序列之全長顆粒蛋白前體的編碼序列上、在不具有訊息(引導子)序列的顆粒蛋白前體上、或在如本文所定義之融合蛋白質的編碼序列的長度上評估同一性。在某些實施方式中，編碼序列被提供於 SEQ ID NO：3。某些其它實施方式將包含與 SEQ ID NO：4 具有 95% 至少於 100% 同一性的編碼序列。可在具有訊息(引導子)序列之全長顆粒蛋白前體的編碼序列上、在不具

有訊息(引導子)序列的顆粒蛋白前體上、或在如本文所定義之融合蛋白質的編碼序列的長度上評估同一性。

【0023】適當地，這些編碼序列編碼全長顆粒蛋白前體。然而，其它實施方式中，可包含活性顆粒蛋白鏈與異源訊息肽(例如，人類 IL2 引導子)。亦參見例如，www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia。

【0024】在某些實施方式中，可使用人類 PGRN 之編碼序列(例如，SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：4)的片段，或與其約 95%至 99.9%或 100%相同之序列，此類片段可編碼活性人類 GRN (aa 18-593)，或編碼含具有活性人類 GRN 之異源訊息肽的融合肽。在某些實施方式中，用於一或多種活性 GRN(例如，GRN1、2、3、4、4、6 或 7)之一或多種編碼序列可以其等之彼此各種組合包括於載體基因體中，或一或多種這些肽可與全長 PGRN 或另一編碼序列組合。

【0025】不希望受到理論的束縛，據信在中樞神經系統(例如，室管膜細胞)的細胞亞群中 AAV-媒介的 PGRN 表現提供分泌蛋白質的儲存庫。分泌的 PGRN 蛋白質(及/或一或多種 GRN)被其它細胞藉由分揀蛋白(sortilin)或甘露糖-6-磷酸(mannose-6-phosphate)受體吸收，隨後被轉運至溶酶體。在某些實施方式中，該分泌蛋白質為顆粒蛋白前體。在某些實施方式中，該分泌蛋白質為顆粒蛋白。在某些實施方式中，該分泌蛋白質包括顆粒蛋白前體與顆粒蛋白之混合物。

【0026】在某些實施方式中，除了顆粒蛋白前體編碼序列外，可包括另一非 AAV 編碼序列，例如，目的肽、多肽、蛋白

質、功能性 RNA 分子(例如，miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。有用的基因產物可包括 miRNA。miRNA 及其它小干擾核酸藉由標靶 RNA 轉錄本裂解/降解或標靶信使 RNA(mRNA)的轉譯抑制來調節基因表現。miRNA 被自然地表現，通常作為最終的 19-25 個非轉譯 RNA 產物，miRNA 通過與標靶 mRNA 的 3'非轉譯區(UTR)的序列特異性相互作用來展現其活性。這些內源表現的 miRNA 形成髮夾型前體(hairpin precursors)，隨後被加工成 miRNA 雙鏈體(miRNA duplex)，進而加工成「成熟的」單鏈 miRNA 分子。這種成熟的 miRNA 引導一種多蛋白質複合物 miRISC，其基於與成熟 miRNA 的互補性來識別標靶 mRNA 的靶位，例如在 3' UTR 區域。

【0027】在某些實施方式中，表現匣(expression cassette)進一步包含一或多個可抑制 hPGRN 在背根節(drg)中表現的 miRNA 靶序列。在某些實施方式中，該表現匣包含 drg-特異性 miRNA 靶序列的至少兩個串接重複序列，其中該至少兩個串接重複序列包含至少一個第一 miRNA 靶序列及至少一個第二 miRNA 靶序列，其等可為相同或相異。在某些實施方式中，該串接 miRNA 靶序列是連續的或由 1 至 10 個核酸間隔子(spacer)隔開，其中該間隔子並非 miRNA 靶序列。在某些實施方式中，至少有二個 drg-特異性 miRNA 靶序列位於 hPGRN 編碼序列 3'處。在某些實施方式中，該至少兩個 drg-特異性 miRNA 串接重複序列的第一者起始於距離 hPGRN-編碼序列的 3'末端 20 個核苷酸內。在某些實施方式中，該至少兩個 drg-特異性 miRNA 串接重複序列的第一者起始於距離 hPGRN-編碼序列的

3'末端至少 100 個核苷酸內。在某些實施方式中，該 miRNA 串接重複序列包含長度 200 至 1200 個核苷酸。在某些實施方式中，至少有二個 drg-特異性 miRNA 靶序列位於 5'至 hPGRN 編碼序列。在某些實施方式中，至少二個 drg-特異性 miRNA 靶序列位於 5'及 3'至 hPGRN 編碼序列處。在某些實施方式中，表現匣 mRNA 或 DNA 正股的至少第一及/或至少第二 miRNA 靶序列的該 miRNA 靶序列選自(i) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO : 32) ; (ii) AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA (SEQ ID NO : 33) ; (iii) AGTGTGAGTTCTACCAT TGCCAAA (SEQ ID NO : 34) ; 及(iv) AGGGATTCCTGGGAAA ACTGGAC (SEQ ID NO : 35)。在某些實施方式中，二或多個連續 miRNA 靶序列為連續的且未被間隔子分隔開。在某些實施方式中，二或多個 miRNA 靶序列被間隔子分隔開且各間隔子獨立選自一或多種(A) GGAT ; (B) CACGTG ; 或(C) GCATGC。在某些實施方式中，位於 miRNA 靶序列之間の間隔子可位於 3'至第一 miRNA 靶序列及/或 5'至最後的 miRNA 靶序列。在某些實施方式中，miRNA 靶序列之間の間隔子是相同的。參見美國臨時專利申請號 62/783,956，2018 年 12 月 21 日申請，及國際專利申請號 PCT/US19/67872，2020 年 2 月 12 日申請，其等藉由引用併入本文。

【0028】

AAV1

來自演化支 F(Clade F)的 AAVhu68 可用於製造在 CNS 中靶向並表現 hPGRN 的載體。然而，未預期地觀察到，即使觀察

到相當的血漿濃度，與 AAVhu68 相比，AAV1-媒介 PGRN 遞送在 CNS 中提供了更好的 PGRN 表現。本案發明人等發現，rAAV1.PGRN 的鞘內遞送是本文所述療法的有吸引力的遞送途徑。因此，在特別理想的實施方式中，選擇 AAV1 衣殼。

【0029】在某些實施方式中，提供一種組成物，其包含適於鞘內注射的水性液體及具有 AAV 衣殼的 rAAV 原液(stock)，該衣殼優先靶向室管膜細胞，其中 rAAV 進一步包含載體基因體，其具有用於遞送至中樞神經系統(CNS)的 PGRN 編碼序列。在某些實施方式中，醫藥組成物被調配用於枕骨下注射至小腦延髓池(小腦延髓池內)中。在某些實施方式中，藉由電腦斷層掃描攝影(computed tomography；CT)導向的 rAAV 注射來投予 rAAV。在某些實施方式中，病患被投予單劑量的醫藥組成物。

【0030】AAV1 衣殼係指具有 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質的衣殼。在特定實施方式中，AAV1 衣殼包含約 1:1:10 預定比例的 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質組裝成 60 個總 vp 蛋白質的 T1 二十面體衣殼。AAV1 衣殼能夠包裝基因體序列以形成 AAV 顆粒(例如，重組 AAV，其中基因體是載體基因體)。一般而言，編碼最長的 vp 蛋白質(即，VP1)的衣殼核酸序列在製造具有 AAV1 衣殼的 rAAV 的過程中反式(*trans*)表現，敘述於例如，美國專利號 6,759,237、美國專利號 7,105,345、美國專利號 7,186,552、美國專利號 8,637,255 及美國專利號 9,567,607，其等藉由引用併入本文。

【0031】衣殼編碼序列並不存在於最終組裝的

rAAV1.hPGRN 中。然而，此序列用於生產重組 AAV。在某些實施方式中，AAV1 衣殼編碼序列為編碼 SEQ ID NO：26 的全長 AAV1 VP1 蛋白質或其 VP2 或 VP3 區域的任何核酸序列。參見例如，美國專利號 6,759,237、美國專利號 7,105,345、美國專利號 7,186,552、美國專利號 8,637,255 及美國專利號 9,567,607，其等藉由引用併入本文。在某些實施方式中，AAV1 衣殼編碼序列為 SEQ ID NO：25。在一些實施方式中，AAV1 衣殼為由 SEQ ID NO：25 編碼序列所生產且具有或不具有轉譯後修飾的蛋白質。然而，此編碼序列的變體可被工程化及/或其它編碼序列可使用 AAV1 VP1、AAV1 VP2 及/或 AAV VP3 胺基酸序列反轉譯(backtranslated)成所需的表現系統。

【0032】在某些實施方式中，含重組 AAV1 之醫藥組成物具有衣殼，其中 AAV1 包含高度去醯胺化(N57、N383、N512 及 N718)的五個胺基酸，基於再現於 SEQ ID NO：26 的 AAV1 VP1 的初級序列之編號。

【0033】

AAV1 修飾								
酵素		胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶
%覆蓋率	N+1	97.6	84.2	92.4	87.4	90.4	85.2	88.9
N35+去醯胺化	Q	9.5						
~N57+去醯胺化	G	100.0	100.0	100.0	92.0	89.3	86.1	85.5
~N94+去醯胺化	H				2.3	3.7	4.9	2.2
N113+去醯胺化	L		5.6					
~N214+去醯胺化	N				0.9	0.4	1.0	0.7
~N223+去醯胺化	A	21.4		25.9				
N227+去醯胺化	W	4.9		3.1				
~N253+去醯胺化	H		29.7					
Q259+去醯胺化	I	24.6		14.2				
~N269+去醯胺化	D			21.6			5.2	
~N271+去醯胺化	H	27.7						
N286+去醯胺化	R	5.4		5.2				
~N302+去醯胺化	<u>N</u> NN	43.7	48.6	18.8	12.4	28.7	16.3	11.9
~N303+去醯胺化	N <u>N</u> N		50.8	19.3				
~N383+去醯胺化	G	88.5	86.9	82.5	82.1	84.6	83.4	92.3
~N408+去醯胺化	N	58.2	43.2	40.5	30.1	25.7	28.3	22.8
~N451+去醯胺化	Q	20.5						
~Q452+去醯胺化	S	1.7						
N477+去醯胺化	W	4.4	3.1	39.7	1.2	1.3	1.1	1.8
~N496+去醯胺化	<u>N</u> NN	1.1		69.9				
N512+去醯胺化	G	93.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.3
N651+去醯胺化	T	2.0	2.1	1.6	0.6			
N691+去醯胺化	S			57.1				
~N704+去醯胺化	Y		9.4					
N718+去醯胺化	G	98.7	98.1	98.2	89.5	91.9	92.3	87.4

【0034】在某些實施方式中，AAV1 的特徵為一種 VP 同功型(VP isoforms)的雜族群(heterogenous population)的衣殼醫藥組成物，該 VP 同功型係如下表中所定義之去醯胺化，根據衣殼中 VP 蛋白質的總量(使用質譜法確定)。在某些實施方式中，AAV 衣殼在一或多個下列位置位置進行修飾，在以下所提供的範圍內(使用質譜法確定)，殘基編號基於公開的 AAV1 序列，該序列於 SEQ ID NO：26 中再現。

【0035】

表 A	
基於 VP1 編號的 AAV1 衣殼位置	%
N35+去醯胺化	1-15、5-10
~N57+去醯胺化	65-90、70-95、80-95、75-100、80-100 或 90-100
N113+去醯胺化	0-8
~N223+去醯胺化	0-30、0、20-28
N227+去醯胺化	0、1-5
~N253+去醯胺化	0、1-35
Q259+去醯胺化	0、10-25
~N269+去醯胺化	0-25
~N271+去醯胺化	0-25
N286+去醯胺化	2-10
~N302+去醯胺化	10-50
~N303+去醯胺化	0-55
~N383+去醯胺化	65-90、70-95、80-95、75-100、80-100 或 90-100
~N408+去醯胺化	30-65
~N451+去醯胺化	0-25
~Q452+去醯胺化	0-5
N477+去醯胺化	0-45
~N496+去醯胺化	0-75
N512+去醯胺化	75-100、80-100、90-100
N651+去醯胺化	0-3
N691+去醯胺化	0、1-60
~N704+去醯胺化	0-10
N718+去醯胺化	75-100、80-100、90-100

【0036】適當的修飾包括彼等描述於以上段落中標記為去醯胺化調控者，其被併入本文中。在某些實施方式中，一或多個下列位置或 N 之後的甘胺酸如本文所述被修飾。在某些實施方式中，構築 AAV1 突變體，其中保留在 57、383、512 及/或 718 位置的 N 之後的甘胺酸(即保持未修飾的狀態)。在某些實施方式中，在前一句子中所確定的四個位置的 NG 以天然序列保留。殘基編號係基於公佈的 AAV1 VP1，其再現於 SEQ ID NO：26。在某些實施方式中，人工 NG 被導入不同於上表中所標識的位置之一的位置。

【0037】

rAAV 載體

如上所指，具有 AAV1 衣殼的重組 AAV 為本文所述用於治療 FTD 的較佳載體。在某些實施方式中，例如，在下列實例中(例如，AAVhu68 或 AAV5)，其它 AAV 衣殼可用於產生 rAAV。在某些實施方式中，可選擇 AAV1 衣殼且含 hPGRN 編碼序列之載體基因體的一或多個元件可被取代。

【0038】如本文中所使用，AAVhu68 衣殼係指一種如 WO 2018/160582 (藉由引用併入本文)所定義之衣殼。如本文所述，rAAVhu68 具有由 AAVhu68 核酸(例如，SEQ ID NO：30)表現衣殼的生產系統中所生產的 rAAVhu68 衣殼，該核酸編碼 SEQ ID NO：31 之 vp1 胺基酸序列及可選擇地例如編碼不含 vp1 及/或 vp2 獨特區域的 vp3 蛋白質之另外的核酸序列。使用單一核酸序列 vp1 產生的 rAAVhu68 產生了 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及 vp3 蛋白質的雜族群。更明確而言，AAVhu68 衣殼包含 vp1 蛋白質內、vp2 蛋白質內及 vp3 蛋白質內的亞群，

這些亞群具有來自 SEQ ID NO：31 中預期的胺基酸殘基的修飾。這些亞群包括(最低限度)去醯胺化天冬醯胺酸(N 或 Asn)殘基。例如，天冬醯胺酸-甘胺酸對中的天冬醯胺酸被高度去醯胺化。在一實施方式中，AAVhu68 vp1 核酸序列具有 SEQ ID NO：30 序列，或與其互補之股，例如，對應 mRNA 或 tRNA。在某些實施方式中，vp2 及/或 vp3 蛋白質可以另外地或替代地從不同於 vp1 的核酸序列中表現，例如以改變所選擇的表現系統中 vp 蛋白質的比例。某些實施方式中，亦提供一種核酸序列，其編碼不具有 vp1-獨特區域(約 aa 1 至約 aa 137)及/或 vp2-獨特區域(約 aa 1 至約 aa 202)之 SEQ ID NO：31 的 AAVhu68 vp3 胺基酸序列(約 aa 203 至 736)，或與其互補之股，對應的 mRNA 或 tRNA (SEQ ID NO：30 的約 nt 607 至約 nt 2211)。在某些實施方式中，亦提供一種核酸序列，其編碼不具有 vp1-獨特區域(約 aa 1 至約 137)之 SEQ ID NO：31 的 AAVhu68 vp2 胺基酸序列(約 aa 138 至 736)，或與其互補之股，對應的 mRNA 或 tRNA (SEQ ID NO：30 的 nt 411 至 2211)。

【0039】如本文中所使用，AAV5 衣殼具有預期的 SEQ ID NO：29 胺基酸序列。在某些實施方式中，自 SEQ ID NO：28 核酸序列表現 AAV5 衣殼。

【0040】包裝於 AAV 衣殼中並遞送到宿主細胞的基因體序列通常由(最低限度)轉殖基因及其調節序列和 AAV 反向末端重複(ITR)組成。單股 AAV 及自我互補(self-complementary；sc) AAV 二者皆包含在 rAAV 中。轉殖基因為一種與載體序列異源之核酸編碼序列，其編碼目的多肽、蛋白質、功能性 RNA 分子

(例如，miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。核酸編碼序列係以允許轉殖基因在標靶組織的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與調節成分可操作地連接。

【0041】載體的 AAV 序列通常包含順式作用(cis-acting)的 5'及 3'反向末端重複序列(參見例如，B. J. Carter, in “Handbook of Parvoviruses”, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990))。ITR 序列長度約為 145 bp。較佳地，實質上編碼 ITR 的整個序列都使用在分子中，儘管這些序列的某些程度上的微小修飾是允許的。修飾這些 ITR 序列的能力是在本領域的技術範圍內(參見例如，例如文獻 Sambrook et al, “Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)；及 K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996))。在本發明中使用的這種分子的實例為含有轉殖基因的「順式作用」質體，其中所選擇的轉殖基因序列和相關的調控元件位於 5'和 3' AAV ITR 序列的兩側。在一實施方式中，ITR 來自與提供衣殼的 AAV 不同的 AAV。在一實施方式中，ITR 序列來自 AAV2。已經描述被稱為 Δ ITR 的 5' ITR 的簡化版本，其中刪除了 D-序列和末端解析位點(terminal resolution site；trs)。在其它實施方式中，使用全長 AAV 5'及 3' ITR。然而，可選擇來自其它 AAV 來源的 ITR。當 ITR 的來源是 AAV2，而 AAV 衣殼來自另一 AAV 來源時，所生成的載體可稱為假型化的(pseudotyped)。然而，這些元件的其它配置可能是適當的。

【0042】除了上述確定的重組 AAV 載體的主要元件外，該載體亦包括必需的習知控制元件，其以允許轉殖基因在用質體載

體轉染或用本發明所製造的病毒感染的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與轉殖基因可操作地連接。如本文中所使用，「可操作地連接的」序列包括與目的基因相鄰的表現控制序列、及反向或遠距離起作用以控制目的基因的表現控制序列。

【0043】調節控制元件通常包含啟動子序列作為表現控制序列的一部分，例如，位於所選擇的 5' ITR 序列及編碼序列之間。可以使用組成性啟動子(constitutive promoter)、調節性啟動子(regulatable promoter)[參見例如，WO 2011/126808 及 WO 2013/04943]、組織特異性啟動子或對生理提示有反應的啟動子可被用於本文所述的載體。啟動子可選自不同來源，例如，人類細胞巨大病毒(CMV)立即早期增強子/啟動子、SV40 早期增強子/啟動子、JC 多瘤病毒(JC polyomavirus)啟動子、髓鞘鹼性蛋白(myelin basic protein；MBP)或膠質纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein；GFAP)啟動子、單純疱疹病毒(HSV-1)潛伏相關啟動子(latency associated promoter；LAP)、勞斯氏肉瘤病毒(rouse sarcoma virus；RSV)長末端重複(long terminal repeat；LTR)啟動子、神經元特異性啟動子(neuron-specific promoter；NSE)、血小板衍生生長因子(platelet derived growth factor；PDGF)啟動子、hSYN、黑色素濃縮激素(melanin-concentrating hormone；MCH)啟動子、CBA、基質金屬蛋白啟動子(matrix metalloprotein promoter；MPP)及雞 β -肌動蛋白啟動子。除了啟動子之外，載體可含有一或多種其它適當的轉錄起始、終止、增強子序列、有效的 RNA 處理訊息，例如剪接及多腺核苷酸化(polyA)訊息；穩定細胞質 mRNA 的序列，例如 WPRE；

增強轉譯效率的序列(即，Kozak 一致序列)；增強蛋白質穩定性的序列；及當需要時，增強經編碼產物分泌的序列。適當的增強子之實例為 CMV 增強子。其它適當的增強子包括那些適於所欲標的組織指示者。在一實施方式中，表現匣包含一或多種表現增強子。在一實施方式中，表現匣含有二或多個表現增強子。這些增強子可為相同或相異。例如，增強子可包括 CMV 立即早期增強子。此增強子可存在於彼此相鄰的兩個拷貝中。或者，增強子的雙重拷貝可藉由一或多序列分開。在另外的實施方式中，表現匣進一步含有內含子，例如，雞 β -肌動蛋白內含子。其它適當的內含子包括技術領域中所知者，舉例而言，例如 WO 2011/126808 中所述者。適當的 polyA 序列之實例包括例如，SV40、SV50、牛生長激素(bovine growth hormone；bGH)、人類生長激素及合成 polyA。可選擇地，可選擇一或多種序列以穩定 mRNA，這些序列的實例為經修飾之 WPRE 序列，其可被工程化於 polyA 序列的上游及編碼序列之下游[參見例如，MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16：605-619]。

【0044】在一實施方式中，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的增強子、可選擇的內含子、人類 PGRN 或包含其之融合蛋白質的編碼序列、poly A 及 AAV 3' ITR。在某些實施方式中，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的增強子、可選擇的內含子、人類 PGRN 或包含其之融合蛋白質的編碼序列、poly A 及 AAV 3' ITR。在某些實施方式中，載體基因體包含：AAV 5' ITR、啟動子、可選擇的增強子、可選擇的內含子、huPGRN 編碼序列、poly A 及 AAV 3'

ITR。在某些實施方式中，載體基因體包含：AAV2 5' ITR、EF1a 啟動子、可選擇的增強子、可選擇的啟動子、huPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3' ITR。在某些實施方式中，載體基因體為 AAV2 5' ITR、UbC 啟動子、可選擇的增強子、可選擇的內含子、huPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3' ITR。在某些實施方式中，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、huPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3' ITR。在某些實施方式中，載體基因體為 AAV2 5' ITR、CB7 啟動子、內含子、huPGRN、兔 β 球蛋白 poly A 及 AAV2 3' ITR。參見例如，SEQ ID NO：22 (EF1a.huPGRN.SV40)、SEQ ID NO：23 (UbC.PI.huPGRN.SV40)或 SEQ ID NO：24 (CB7.CI.hPGRN1.rGB)。huPGRN 編碼序列選自本說明書中所定義者。參見例如，SEQ ID NO：3 或與其 95%至 99.9%同一性之序列或 SEQ ID NO：4 或與其 95%至 99.9%同一性之序列，或如本文所定義之其等之片段。下述提供實施例中所使用之載體元件的說明性序列，例如，於 SEQ ID NO：6(兔球蛋白 polyA)、AAV ITRs(SEQ ID NO：7 及 8)、人類 CMV IE 啟動子(SEQ ID NO：9)、CB 啟動子(SEQ ID NO：10)、嵌合內含子(SEQ ID NO：11)、UbC 啟動子(SEQ ID NO：12)、EF-1a 啟動子(SEQ ID NO：17)、內含子(SEQ ID NO：13)及 SV40 晚期 poly A(SEQ ID NO：14)。對於本發明的某些實施方式，可選擇載體基因體的其它元件或在這些序列上的改變用於載體基因體。

【0045】

載體生產

為了用於生產 AAV 病毒載體(例如，重組 AAV)，可將表現匣攜帶在遞送至包裝宿主細胞(packaging host cell)的任何適當的載體(例如質體)上。可用於本發明的質體可被工程化，從而使其適於在原核細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞等活體外複製及包裝。適當的轉染技術和包裝宿主細胞是已知的，及/或可被熟悉技術者容易地設計。

【0046】用於產生和分離用作載體之 AAV 的方法是技術領域中已知的。通常參見例如，Grieger & Samulski, 2005, “Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications,” *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, “Recent developments in adeno-associated virus vector technology,” *J. Gene Med.* 10:717-733；及下文引用之參考文獻，其等各藉由引用將其整體併入本文。為了將轉殖基因包裝到病毒顆粒中，在與含表現匣的核酸分子相同結構中，ITR 是順式中唯一所需的 AAV 成分，cap 及 rep 基因可以反式提供。

【0047】在一實施方式中，本文所述之表現匣工程化至遺傳元件(例如，穿梭質體(shuttle plasmid))中，將攜帶在其上的免疫球蛋白構築體序列轉移至包裝宿主細胞中以生產病毒載體。在一實施方式中，所選擇的遺傳元件可以適當方法遞送至 AAV 包裝細胞，包括以轉染、電穿孔、脂質體遞送、膜融合技術、高速 DNA 包覆小丸(high velocity DNA-coated pellet)、病毒感染及原生質體融合。穩定的 AAV 包裝細胞亦可被製造。或者，表現匣可用於產生 AAV 以外的病毒載體，或用

於活體外抗體混合物之製造。用於製造此類構築體的方法是核酸操作且包括遺傳工程、重組工程及合成技術的技術人員已知的。參見例如，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。

【0048】術語「AAV 中間體」或「AAV 載體中間體」係指一種組裝的 rAAV 衣殼，其缺少包裝在其中的所欲基因體序列。這些亦可稱為「空」衣殼。此類衣殼可不包含表現匣的可檢測基因體序列，或僅包含不足以達到基因產物表現的部分包裝基因體序列。這些空衣殼對於將目的基因轉移到宿主細胞是沒有功能的。

【0049】本文所述之重組腺相關病毒(AAV)可使用已知的技術產生。參見例如，WO 2003/042397；WO 2005/033321、WO 2006/110689；US 7588772 B2。此類方法包括培養包含編碼 AAV 衣殼蛋白質之核酸序列的宿主細胞；功能性 rep 基因；(最低限度)由 AAV 反向末端重複(ITR)和轉基因所組成的表現匣；及足夠的輔助功能，以允許將表現匣包裝至 AAV 衣殼蛋白質中。產生衣殼的方法、其所用之編碼序列以及製造 rAAV 病毒載體的方法已被描述，參見例如，Gao, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003)及 US 2013/0045186A1。

【0050】在一實施方式中，提供用於產生重組 AAV 的生產細胞培養物。此類細胞培養物包含在宿主細胞中表現 AAV 衣殼蛋白質的核酸；適於包裝至 AAV 衣殼中的核酸分子，例如包含 AAV ITR 及編碼基因產物的非 AAV 核酸序列的載體基因體，

該非 AAV 核酸序列可操作連接至與指導產物在宿主細胞中表現的序列；及足夠的 AAV rep 功能和腺病毒輔助功能，以允許將核酸分子包裝至重組 AAV 衣殼中。在一實施方式中，細胞培養物由哺乳動物細胞(例如人類胚腎 293 細胞等)或昆蟲細胞(例如桿狀病毒(baculovirus))組成。

【0051】通常，rep 功能來自於與提供位於載體基因體側面之 ITR 的 AAV 相同的 AAV 來源。在本文實施例中，選擇 AAV2 ITRs 並使用 AAV2 rep。編碼序列再現於 SEQ ID NO：27。可選擇地，可選擇其它 rep 序列或另一 rep 來源(及可選擇地另一 ITR 來源)，例如，rep 可為，但不限於 AAV1 rep 蛋白質、AAV2 rep 蛋白質；或 rep 78、rep 68、rep 52、rep 40、rep68/78 及 rep40/52；或其片段；或另一來源。可選擇地，於細胞培養物中 rep 及 cap 序列在相同遺傳元件上。在 rep 序列和 cap 基因之間可存在間隔子。這些 AAV 或突變體 AAV 衣殼序列中的任何一種可在指導其在宿主細胞中表現的外源調節控制序列的控制下。

【0052】在一實施方式中，細胞在合適的細胞培養(例如，HEK 293)細胞中製造，製造本文所述之基因療法載體的方法包括技術領域中熟知的方法，例如產生用於製造基因療法載體的質體 DNA、產生載體及純化載體。在一些實施方式中，基因療法載體為 AAV 載體，且所產生的質體為編碼 AAV 基因體及目的基因的 AAV 順式質體、包含 AAV rep 及 cap 基因的 AAV 反式質體、及腺病毒輔助質體。載體產生方法可包括以下方法步驟：例如開始細胞培養、繼代細胞、細胞接種、以質體 DNA 轉染細胞、將轉染後培養基更換為無血清培養基以及收穫含載體的細胞和培養基。

【0053】在某些實施方式中，用於 rAAV.hPGRN 的製造方法涉及以質體 DNA 來瞬時轉染 HEK293 細胞。在 PALLiCELLis 生物反應器中藉由 HEK293 細胞之 PEI-媒介三重轉染，單一批次或多批次製造。在可能的情況下，藉由在可拋棄式、封閉式生物處理系統中，淨化、TFF、親和性層析及陰離子交換層析依次純化所收穫的 AAV 材料。

【0054】所收穫的含載體之細胞及培養基在本文中係指粗製細胞收穫物。在另一系統中，藉由以基於桿狀病毒載體感染將基因療法載體導入昆蟲細胞中。關於這些生產系統的綜述，通常參見例如，Zhang et al., 2009, “Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,” Human Gene Therapy 20:922-929，其各自的內容通過引用整體併入本文。製造和使用這些和其它 AAV 生產系統的方法亦敘述於下列美國專利案中，其各自內容藉由引用整體併入本文：5,139,941；5,741,683；6,057,152；6,204,059；6,268,213；6,491,907；6,660,514；6,951,753；7,094,604；7,172,893；7,201,898；7,229,823；及 7,439,065，其等藉由引用併入本文。

【0055】之後，粗製細胞收穫物可施以以下額外方法步驟，例如載體收穫物的濃縮、載體收穫物的透析濃縮 (diafiltration)、載體收穫物的微射流體法 (microfluidization)、載體收穫物的核酸酶消化、微射流體化中間體的過濾、藉由層析之粗製物純化、藉由超速離心的粗製物純化、藉由切向流過濾的緩衝液交換，及/或調配及過濾以製備大量載體。

【0056】可使用高鹽濃度下的兩步驟親和性層析純化然後使用陰離子交換樹脂層析以純化載體藥品並除去空衣殼。這些方法更詳細描述於 2016 年 12 月 9 日申請之國際專利申請號 PCT/US2016/065970，其藉由引用併入本文。關於 AAV8 的純化方法，2016 年 12 月 9 日申請之國際專利申請號 PCT/US2016/065976，及關於 rh10，2016 年 12 月 9 日申請之國際專利申請號 PCT/US16/66013，標題為“Scalable Purification Method for AAVrh10”的同樣申請於 2015 年 12 月 11 日，及關於 AAV1，2016 年 12 月 9 日申請之國際專利申請號 PCT/US2016/065974，關於“Scalable Purification Method for AAV1”，申請於 2015 年 12 月 11 日，其等全部藉由引用併入本文中。

【0057】為了計算空顆粒和完整顆粒含量，將所選擇的樣本的 VP3 帶體積(band volume) (例如，在本文實施例中，碘克沙醇(iodixanol)梯度純化的製劑，其中 GC#=顆粒#)相對於裝載的 GC 顆粒作圖。將所產生的線性方程($y=mx+c$)用於計算測試製品峰的帶體積中的顆粒數。然後將每 20 μ L 裝載的顆粒數(pt)乘以 50，得到顆粒(pt)/mL。Pt/mL 除以 GC/mL 得到顆粒與基因體拷貝數的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL 得到空 pt/mL。空 pt/mL 除以 pt/mL 並 x 100 得到空顆粒的百分比。

【0058】一般而言，用於測定空衣殼及具有包裝的基因體之 AAV 載體顆粒的方法是技術領域中已知的。參見例如，Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128。為了測試變性衣殼，該方法包括使經處理的 AAV 原液(stock)受 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電

泳，其由能夠分離三種衣殼蛋白質的任何凝膠組成，例如，在緩衝液中含有 3-8% Tris-乙酸鹽的梯度凝膠，然後進行凝膠直至樣本材料分離，並將凝膠轉印到尼龍或硝化纖維素膜上，較佳為尼龍。然後使用抗 AAV 衣殼抗體作為與變性衣殼蛋白質結合的初級抗體，較佳為抗 AAV 衣殼單株抗體，最佳為 B1 抗 AAV-2 單株抗體(Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293)。然後使用二級抗體，一種與初級抗體結合的抗體並包含用於檢測與初級抗體結合之方法，更佳為包含與其共價結合之檢測分子的抗 IgG 抗體，最佳為與辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase)共價連接的綿羊抗小鼠 IgG 抗體。將用於檢測結合的方法用於半定量測定初級及二級抗體之間的結合，較佳為能夠檢測放射性同位素發射、電磁輻射或比色變化的檢測方法，最佳為化學發光檢測套組，例如，對於 SDS-PAGE，來自管柱餾分的樣本可被取出並在含有還原劑(例如 DTT)的 SDS-PAGE 裝載樣本緩衝液中加熱，並在預製的梯度聚丙稀醯胺凝膠(例如 Novex)上分離衣殼蛋白質。可使用 SilverXpress (Invitrogen, CA)，根據製造商的說明書或其它適當的染色方法，即，SYPRO 紅寶石或考馬斯(Coomassie)染色進行銀染色。在一實施方式中，可藉由定量即時 PCR (Q-PCR)測量管柱餾分中 AAV 載體基因體(vg)的濃度。將樣本稀釋並用 DNA 酶 I(或另一適當核酸酶)消化以除去外源 DNA。在核酸酶去活化後，將樣本進一步稀釋並使用引子和對引子之間的 DNA 序列具有特異性的 TaqMan™ 螢光探針進行擴增。在 Applied Biosystems Prism 7700 序列檢測系統上測量各樣本達到確定螢光水平所需的循環數(閾值循環，Ct)。將含有與

AAV 載體中所含序列之相同序列的質體 DNA 用於在 Q-PCR 反應中產生標準曲線。從樣本獲得的循環閾值(Ct)數值用於藉由將其相對於質體標準曲線的 Ct 值進行歸一化來確定載體基因體力價。亦可使用基於數位 PCR 的終點分析(End-point assay)。

【0059】在一方面，使用優化的 q-PCR 方法，其利用廣譜絲胺酸蛋白酶，例如蛋白酶 K (例如可從 Qiagen 商購獲得)。更具體而言，優化的 qPCR 基因體力價分析與標準分析相似，除了在 DNA 酶 I 消化之後，將樣本以蛋白酶 K 緩衝液稀釋並以蛋白酶 K 處理，然後加熱去活化。適當地，將樣本以等量於樣本大小的蛋白酶 K 緩衝液稀釋。蛋白酶 K 緩衝液可濃縮至 2 倍或更高。通常，蛋白酶 K 處理約為 0.2 mg/mL，但可在 0.1 mg/mL 至約 1 mg/mL 之間變化。處理步驟通常在約 55°C 下進行約 15 分鐘，但可在較低溫度(例如，約 37°C 至約 50°C)下進行較長一段時間(例如，約 20 分鐘至約 30 分鐘)，或在較高溫度(例如，高至約 60°C)下進行較短一段時間(例如，約 5 至 10 分鐘)。類似地，加熱去活化通常在約 95°C 下保持約 15 分鐘，但溫度可降低(例如，約 70°C 至約 90°C)並延長時間(例如，約 20 分鐘至約 30 分鐘)。然後將樣本稀釋(例如，1000 倍)並如標準分析中所述進行 TaqMan 分析。

【0060】另外或可替代地，可使用微滴數位化 PCR(ddPCR)。例如，藉由 ddPCR 確定單股及自我互補 AAV 載體基因體力價的方法已被敘述。參見例如，M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14。

【0061】簡而言之，用於分離具有經包裝之基因體序列的 rAAV 顆粒與缺少基因體的 AAV 中間體的方法涉及對包含重組 AAV 病毒顆粒及 AAV 衣殼中間體的懸浮液進行快速表現液相層析(fast performance liquid chromatography)，其中 AAV 病毒顆粒和 AAV 中間體與在高 pH 平衡的強陰離子交換樹脂結合，並進行鹽度梯度，同時在約 260 和約 280 下監測洗提液的紫外吸收。pH 可根據所選擇之 AAV 調整。參見例如，WO 2017/160360 (AAV9)、WO2017/100704 (AAVrh10)、WO 2017/100676 (例如，AAV8)及 WO 2017/100674 (AAV1)，其等藉由引用併入本文。在此方法中，當 A260/A280 的比率達到轉折點時，自被洗提的餾分中收集 AAV 全部衣殼。在一實例中，關於親和性層析步驟，可將透析濃縮的產物施用於有效捕獲 AAV2 血清型的 Capture Select™ Poros-AAV2/9 親和性樹脂(Life Technologies)。在這些離子條件下，顯著百分比的殘留細胞 DNA 及蛋白質流過管柱，而 AAV 顆粒被有效捕獲。

【0062】

組成物

本文提供包含至少一種 rAAV.hPGRN 原液(例如 rAAV 原液)及可選擇的載劑(carrier)、賦形劑及/或防腐劑的組成物。rAAV 原液係指多個相同的 rAAV 載體，例如，如於下文討論的濃度及劑量單位中所述的量。

【0063】在某些實施方式中，組成物包含一種適用於用以治療顆粒蛋白前體相關額顳葉失智症(FTD)的重組 AAV(rAAV)的病毒原液，該 rAAV 包含：(a)腺相關病毒 1 衣殼，及(b)包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重

複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。在某些實施方式中，該載體基因體包含啟動子、增強子、內含子、人類 PGRN 編碼序列及多腺核苷酸化訊息。在某些實施方式中，內含子由雞 β 肌動蛋白剪接供體及兔 β 剪接受體(rabbit β splice acceptor)元件所組成。在某些實施方式中，載體基因體進一步包含 AAV2 5' ITR 及 AAV2 3' ITR，其位在載體基因體的所有元件的側面。

【0064】較佳地懸浮於生理相容性載劑中的 rAAV.hPGRN 可投予人類或非人類哺乳動物病患。在某些實施方式中，用於投予人類病患，rAAV 適合懸浮在含有生理鹽水、表面活性劑及生理相容性鹽或鹽類混合物的水溶液中。適當地，將調配物調整至生理上可接受的 pH，例如範圍在 pH 6 至 9、或 pH 6.5 至 7.5、pH 7.0 至 7.7 或 pH 7.2 至 7.8。由於腦脊髓液的 pH 約為 7.28 至約 7.32 或 pH 為 7.2 至 7.4，對於鞘內遞送，可能需在此 pH 範圍內；而對於靜脈內遞送，可能需要 pH 約 6.8 至約 7.2。然而，可選擇最寬範圍和這些子範圍內的其它 pH 用於其它遞送途徑。

【0065】在某些實施方式中，調配物可包含不含碳酸氫鈉的緩衝生理鹽水溶液。此類調配物可包含緩衝生理鹽水溶液，其包含水中含磷酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂及其混合物中一或多種，例如哈佛氏(Harvard)緩衝液。水溶液可進一步包含 Kolliphor® P188，一種可從 BASF 商購的泊洛沙姆(poloxamer)，先前以商品名 Lutrol® F68 出售。水溶液可具有 pH 7.2 或 pH 7.4。

【0066】在另一實施方式中，調配物可含有含 1 mM 磷酸鈉 (Na_3PO_4)、150 mM 氯化鈉 (NaCl)、3 mM 氯化鉀 (KCl)、1.4 mM 氯化鈣 (CaCl_2)、0.8 mM 氯化鎂 (MgCl_2) 及 0.001% Kolliphor®188 的緩衝生理鹽水溶液。參見例如，harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html。在某些實施方式中，較佳為哈佛氏緩衝液。

【0067】在其它實施方式中，調配物可含有一或多種滲透增強劑。適當的滲透增強劑之實例可包括例如，甘露醇、甘胺膽酸鈉、牛磺膽酸鈉、脫氧膽酸鈉、水楊酸鈉、辛酸鈉、癸酸鈉、十二烷基硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂基醚或 EDTA。

【0068】在另一實施方式中，組成物包括載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。鑑於轉移病毒所針對的適應症，本領域技術人員可易於選擇適當的載劑，例如，一種適當的載劑包括生理鹽水，可用多種緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝生理鹽水)配製。其它例示性載劑包括無菌生理鹽水、乳糖、蔗糖、磷酸鈣、明膠、葡聚糖、瓊脂、果膠、花生油、芝麻油和水。緩衝劑/載劑應包括防止 rAAV 黏附到輸液管上，但在活體內不干擾 rAAV 結合活性的成分。

【0069】可選擇地，除了 rAAV 和載劑之外，組成物可包含其它習知醫藥成分，例如防腐劑或化學穩定劑。適當的例示性防腐劑包括氯丁醇、山梨酸鉀、山梨酸、二氧化硫、沒食子酸丙酯、對羥基苯甲酸酯、乙基香草醛、甘油、苯酚及對氯苯酚。適當的化學穩定劑包括明膠和白蛋白。

【0070】如本文中所使用，「載劑」包括任何及所有的溶劑、分散介質、媒劑、塗料、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等

滲及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體等。此類用於醫藥活性物質的介質及試劑的用途為技術領域中所熟知的。補充活性成分亦可摻入組成物中。詞語「醫藥上可接受的」係指當投予宿主時不會產生過敏或類似不良反應的分子實體及組成物。遞送媒劑，例如脂質體、奈米膠囊、微粒、微球、脂質顆粒、囊泡等可用於將本發明之組成物導入適當的宿主細胞中。特別是，可將 rAAV 載體遞送轉殖基因調配用於遞送包封在脂質顆粒、脂質體、囊泡、奈米球或奈米顆粒等之中。

【0071】在一實施方式中，組成物包括適於遞送至受試者的最終調配物，例如，為緩衝至生理相容性 pH 及鹽濃度的水性液體懸浮劑。可選擇地，一或多種表面活性劑可存在於調配物中。在另一實施方式中，組成物可作為濃縮物輸送，將其稀釋後投予受試者。在另一實施方式中，組成物可被凍乾並在投予時重構(reconstituted)。

【0072】適當的表面活性劑或表面活性劑之組合物可選自無毒非離子表面活性劑之中。在一實施方式中，選擇終止於一級羥基的雙官能嵌段共聚物表面活性劑，例如 Pluronic® F68 [BASF]，也稱為泊洛沙姆 188，其具有中性 pH，平均分子量為 8400。可以選擇其它表面活性劑和其它泊洛沙姆，即由兩側是兩個聚氧乙烯(聚(環氧乙烷))親水鏈的聚氧丙烯(聚(環氧丙烷))中央疏水鏈所構成的非離子三嵌段共聚物、SOLUTOL HS 15 (聚乙二醇(Macrogol)-15 羥基硬脂酸酯)、LABRASOL (聚氧基辛基甘油酯(Polyoxy caprylic glyceride))、聚氧基 10 油基醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯)、乙醇和聚

乙二醇。在一實施方式中，調配物包含泊洛沙姆。這些共聚物通常用字母「P」(用於泊洛沙姆)跟三個數字命名：前兩個數字 $\times 100$ 給出聚氧丙烯核心的近似分子量，最後一個數字 $\times 10$ 給出聚氧乙烯含量百分比。在一實施方式中，選擇泊洛沙姆 188。表面活性劑可以以懸浮液的高至約 0.0005% 至約 0.001% 的量存在。

【0073】以足夠的量將載體投予轉染細胞並提供足夠程度的基因轉移和表現，以提供治療益處而沒有不適當的副作用，或具有醫學上可接受的生理作用，這可由醫學領域的技術人員確定。可選擇地，可使用鞘內投予以外的途徑，舉例而言，例如直接遞送至所欲之器官(例如，肝臟(可選擇地藉由肝動脈)、肺臟、心臟、眼睛、腎臟)、口服、吸入、鼻內、鞘內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌肉內、皮下、皮內和其它腸胃外投予途徑。若需要，可組合投予途徑。

【0074】病毒載體的劑量將取決於例如所欲治療的症狀、患者的年齡、體重和健康等因素，因此可能因患者而異。例如，病毒載體的治療有效人類劑量範圍通常為約 25 至約 1000 微升至約 100 mL 的含濃度約 1×10^9 至 1×10^{16} 基因體病毒載體的溶液(治療平均體重 70 公斤的受試者)，包括該範圍內的所有整數或分數量，並對於人類病患較佳為 1.0×10^{12} GC 至 1.0×10^{14} GC。在一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 或 9×10^9 GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 或

9×10^{10} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 或 9×10^{11} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 或 9×10^{12} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 或 9×10^{13} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 或 9×10^{14} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一實施方式中，將組成物調配成每劑量含至少 1×10^{15} 、 2×10^{15} 、 3×10^{15} 、 4×10^{15} 、 5×10^{15} 、 6×10^{15} 、 7×10^{15} 、 8×10^{15} 或 9×10^{15} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在一實施方式中，對於人類施用，劑量可為每劑量 1×10^{10} 至約 1×10^{12} GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。

【0075】在某些實施方式中，劑量範圍約 1×10^9 GC/g 腦質量至約 1×10^{12} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量範圍約 1×10^{10} GC/g 腦質量至約 3.33×10^{11} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量範圍約 3.33×10^{11} GC/g 腦質量至約 1.1×10^{12} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量範圍約 1.1×10^{12} GC/g 腦質量至約 3.33×10^{13} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量低於 3.33×10^{11} GC/g 腦質量。在某些實施方式

中，劑量低於 1.1×10^{12} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量低於 3.33×10^{13} GC/g 腦質量。

【0076】在某些實施方式中，劑量約 1×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 2×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 2×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 3×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 4×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 5×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 6×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 7×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 8×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 9×10^{10} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 1×10^{11} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 2×10^{11} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 3×10^{11} GC/g 腦質量。在某些實施方式中，劑量約 4×10^{11} GC/g 腦質量。

【0077】在某些實施方式中，作為固定劑量(flat dose)投予人類之劑量範圍約 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 之 rAAV。在某些實施方式中，作為固定劑量投予人類之劑量範圍約 1.44×10^{13} 至 2×10^{14} GC 之 rAAV。在某些實施方式中，作為固定劑量投予人類之劑量範圍約 3×10^{13} 至 1×10^{14} GC 之 rAAV。在某些實施方式中，作為固定劑量投予人類之劑量範圍約 5×10^{13} 至 1×10^{14} GC 之 rAAV。

【0078】在一些實施方式中，組成物可調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍約 1×10^{13} 至 8×10^{14} GC 之 rAAV。在一些實施方式中，組成物可調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍約 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 之 rAAV。在一些實

施方式中，組成物可調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍約 3×10^{13} 至 1×10^{14} GC 之 rAAV。在一些實施方式中，組成物可調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍約 5×10^{13} 至 1×10^{14} GC 之 rAAV。

【0079】在某些實施方式中，rAAV 以單劑量投予受試者。在某些實施方式中，需要多劑量(例如 2 個劑量)。

【0080】將劑量調節以平衡治療益處與任何副作用，且此類劑量可根據所採用重組載體的治療應用而變化。可監測轉殖基因的表現程度以確定產生病毒載體的劑量頻率，該病毒載體較佳為包含袖珍基因(minigene)的 AAV 載體。可選擇地，相似於所述用於治療目的劑量方案可用於使用本發明藥物組成物進行免疫。

【0081】如本文中所使用，術語「鞘內遞送」或「鞘內投予」係指藥物藉由注射入脊髓管的投予途徑，更具體而言為進入蜘蛛膜下腔以使其到達腦脊髓液(CSF)。鞘內遞送可包括腰椎穿刺、室內(包括腦室內(ICV))、枕骨下/腦池內及/或 C1-2 穿刺。例如，可以藉由腰椎穿刺方法導入物質以在整個蜘蛛膜下腔擴散。在另一實例中，注射可進入小腦延髓池或藉由腦實質內(intraparenchymal)遞送。在某些實施方式中，藉由電腦斷層掃描攝影(CT)導向的枕骨下注射到小腦延髓池(內小腦延髓池)中來投予 rAAV。在某些實施方式中，該病患被投予單劑量。

【0082】如本文中所使用，術語「腦池內遞送」或「腦池內投予」係指藥物直接進入小腦延髓池小腦延髓(cisterna magna cerebellomedullaris)之腦脊髓液的投予途徑，更具體而言為藉

由枕骨下穿刺或藉由直接注射至小腦延髓池中或藉由永久定位的管體。

【0083】在某些實施方式中，rAAV.hPGRN的原液在鞘內最終調配緩衝液(ITFFB；0.001% Pluronic F-68 的人工 CSF)中配製。將批料冷凍，隨後解凍，必要時合併，調整至目標濃度，通過 0.22 μm 過濾器進行無菌過濾，並填充小瓶。在某些實施方式中，將含調配物緩衝液的懸浮液 rAAV1.hPGRN 調整至 pH 7.2 至 7.4。

【0084】在一實施方式中，本文提供的 rAAV1.hPGRN 的劑量遞送的體積、及濃度可由本領域熟悉技術者確定。例如，可選擇體積約 1 μL 至 150 mL，對於成年人選擇更高體積。通常，對於新生兒，適當的體積約為 0.5 mL 至約 10 mL，對於較大的嬰兒，可選擇約 0.5 mL 至約 15 mL。對於幼兒，可選擇約 0.5 mL 至約 20 mL 的體積。對於兒童，可選擇最高至約 30 mL 的體積。對於少年和青少年，可以選擇最高至約 50 mL 的容量。在另外其它實施方式中，病患可選擇接受鞘內投予的量約 5 mL 至約 15 mL，或約 7.5 mL 至約 10 mL，可確定其它適當的體積及劑量。將調節劑量以平衡治療益處與任何副作用，且這種劑量可根據所採用重組載體的治療應用而變化。

【0085】在某些實施方式中，組成物包含：rAAV.EF1a.huPGRN.SV40、rAAV.UbC.PI.huPGRN.SV40 或 rAAVCB7.CI.hPGRN1.rGB。其中 rAAV 衣殼為 AAVhu68, AAV5 或 AAV1 的組成物於下述實施例中說明。在特佳的實施方式中，rAAV 為 AAV1。在某些實施方式中，huPGRN 編碼序列選自本說明中所定義者。參見例如，SEQ ID NO：3 或與

其 95%至 99.9%同一性之序列，或 SEQ ID NO：4 或與 95%至 99.9%同一性之序列，或如本文所定義之其等的片段。提供用於下述實施例之載體元件的說明性的序列，例如，在 SEQ ID NO：6(兔球蛋白 polyA)、AAV ITRs (SEQ ID NO：7 及 8)、人類 CMV IE 啟動子 (SEQ ID NO：9)、CB 啟動子(SEQ ID NO：10)、嵌合內含子(SEQ ID NO：11)、UbC 啟動子(SEQ ID NO：12)、EF-1a 啟動子(SEQ ID NO：17)、內含子(SEQ ID NO：13)及 SV40 晚期 poly A(SEQ ID NO：14)。

【0086】

用途

如本文中所使用，PGRN 單套缺失係指具有 PGRN 基因突變的病患，導致 PGRN 及/或 GRN 水平不足。rAAV1-PGRN 治療的目標族群包括患有 PGRN 單套缺失的病患及/或 PGRN 不足或 GRN 水平不足的病患。在某些實施方式中，對於 PGRN 突變，病患是異基因型組合的。在另一其它實施方式中，該病患是來自 PGRN 突變的同基因型組合。在某些實施方式中，給予病患一種免疫抑制方案合併本文所提供的 rAAV1-媒介 hPGRN 療法。

【0087】在某些實施方式中，rAAV1.PGRN 用於治療具有 GRN 單套缺失的病患，此類病患可已被診斷患有由 GRN 單套缺失引發之成年發病型神經系統退化症或可為徵狀發生前。rAAV1.PGRN 可以單劑量投予，經由電腦斷層掃描攝影(CT)導向的枕骨下注射至小腦延髓池(內小腦延髓池(ICM))中。單劑量係以預定劑量水平投予。在 NHP 中以單次 ICM 注射所達成之優異腦傳導導致選擇此種投予途徑。在某些實施方式中，與另

一投予途徑(例如，注射至側腦室內)相較之下，投予載體至 ICM 亦造成降低的抗 PGRN T 細胞反應。曾經是一種常見的手術，以前已經藉由腰椎穿刺代替了 ICM 注射(亦稱為枕骨下穿刺)。然而，可選擇及/或使用其它劑量水平和遞送途徑與此 rAAV1-媒介 hPGRN 療法合併。

【0088】在某些實施方式中，本文所述的 rAAV1-媒介療法可以為沒有 GRN 突變(單套缺失)的人類提供大約平均、正常、生理水平的 PGRN 表現。然而，該治療可提供治療效果，即使 PGRN 表現的增加低於正常水平，亦可提供正常平均水平的 40%至 99%，例如，35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或這些範圍之間的其它值。在某些實施方式中，這可能是由於 PGRN 水平比治療前的病患表現水平高出至少 5%至 70%或更高。在某些實施方式中，當投予 rAAV1-媒介 hPGRN 導致 CSF 中 PGRN 的水平升高(例如，比正常水平高 10 到 40 倍)時，該治療可提供治療效果。

【0089】在某些實施方式中，藉由下列一或多種評估效果：CSF 中 PGRN 蛋白質的增加水平及/或大腦皮質厚度變化。在某些實施方式中，在投予單次 ICM 劑量後，藉由下列一或多種方法測量評估 rAAV1-媒介療法的效果：藉由微型精神狀態檢查(Mini-Mental State Exam；MMSE)、臨床總體印象變化(Clinical Global Impression of Change；CGI-C)、額葉功能測試(Frontal Assessment Battery；FAB)、額顳葉失智症分期量表(Frontotemporal Dementia Rating Scale；FRS)、額葉行為量表(Frontal Behavioral Inventory；FBI)、統一帕

金森氏症評定量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale；UPDRS)、語言能力測試、用於額顳葉型退化加總計分之臨床失智評估量表(Clinical Dementia Rating for Frontotemporal Lobar Degeneration Sum of Boxes；CDR-FTLD sb)、及/或神經精神評估量表(Neuropsychiatric Inventory；NPI)評估延長生存期、及改善臨床徵狀和日常功能。在某些實施方式中，藉由改善的神經纖維絲輕鏈(NFL)、tau、磷酸化 tau 及炎症標記的 CSF 水平及/或增加的 PGRN 之血漿水平可證明功效。在某些實施方式中，藉由測量小膠質細胞增生水平的降低或逆轉來評估功效。

【0090】在某些實施方式中，藉由改善 GRN 病患相關之一或多種臨床徵狀來衡量功效，包括例如，行為缺陷(抑制解除、冷漠、失去同情心或同理心、強迫或刻板印象的行為，或多食(hyperorality))和認知缺陷(執行功能下降，對情景記憶或視覺空間技能無重大影響)。

【0091】在某些實施方式中，在其它一些非典型的徵狀中觀察到改善，包括精神病學特徵(妄想、幻覺和強迫行為)及/或其它認知缺陷(發作性記憶障礙、運用失能症(apraxia)及視覺空間功能障礙)。可使用可以評估的 FTDC 標準執行評估，包括大腦成像檢查額葉及/或顳骨退化的跡象、對臨床評定量表的下降進行評估(例如用於額顳葉型失智症之臨床失智評估量表[CDR-FTLD]、額葉行為量表[FBI]、神經精神評估量表[NPI]及額顳葉失智症評定量表[FRS])、最終，遺傳測試以確認致病性 GRN 突變。可使用腦脊髓液(CSF)生物標記物(包括 tau 和類澱粉蛋白- β)以及類澱粉蛋白質正電子發射斷層掃描(正子斷層造影；PET)成像。

【0092】在某些實施方式中，在具有原發性進行性失語症(PPA)的 *GRN* 突變帶原者中觀察到改善，其特徵在於與說話及語言有關的徵狀。可使用基於 Mesulam 標準的準則來診斷它們，該準則區分 PPA 的三種臨床變異型：語義變異型 PPA(semantic variant PPA；svPPA)、非流利變異型 PPA(nonfluent variant PPA；nfvPPA)及語彙減少變異型 PPA(logopenic variant PPA；lvPPA) (Gorno-Tempini et al., (2011). "Classification of primary progressive aphasia and its variants." *Neurology*. 76(11):1006-14)。nfvPPA 的語義表達能力存在缺陷，且其核心特徵包括語言表達、主動說話及語言失用的語言缺失。svPPA 在理解字彙含義的能力上存在缺陷，其核心特徵包括字彙命名和單詞理解能力受損。lvPPA 的特徵在於說話時很難找到適當的字彙，但不會伴隨字彙理解能力的下降。lvPPA 的核心特徵是字彙檢索不足和重複句子的能力。*GRN* 突變帶原者最常存在 nfvPPA；然而，他們可在 PPA 臨床譜內擁有更廣泛的徵狀，從而診斷為「PPA-未另行規定(PPA-not otherwise specified)」(Gorno-Tempini et al., 2011；Woollacott and Rohrer, 2016)。

【0093】提供一種治療患有與 *GRN* 單套缺失相關之神經退行性病的人類病患的方法。在某些實施方式中，此症狀為顆粒蛋白前體相關性額顳葉失智症(FTD)。該方法包含藉由具有腺相關病毒 1(AAV1)衣殼之重組腺相關病毒(rAAV)遞送顆粒蛋白前體之編碼序列至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0094】提供一種用於治療患有與腦損傷相關之顆粒蛋白前體相關性額顳葉失智症或與 GRN 單套缺失相關之另一神經退行性症狀之人類病患的方法。該方法包含藉由具有腺相關病毒 1(AAV1)衣殼之重組腺相關病毒(rAAV)而將顆粒蛋白前體之編碼序列投予至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0095】在某些實施方式中，本文所提供之方法可進一步包含監測治療，其藉由(a)非侵入式評估病患的視網膜儲積病灶的減少，作為腦損傷降低之預測因子，(b)進行磁共振成像以評估腦容量，及/或(c)測量 CSF 中顆粒蛋白前體的濃度。可選擇地，可評估血漿中的顆粒蛋白前體濃度。

【0096】在某些實施方式中，透過一或多種下列主要認知、主要行為或認知/其它方法的評估 rAAV.hPGRN 組成物的功效，以下描述適當的評估。

【0097】主要認知評估包括口語流利度測試、FTLD 的臨床失智率或微型精神狀態檢查(MMSE)。口語流利度測試很可能是藉由對每位受試者展示相同的圖片/照片並要求口頭描述來進行，在描述過程中，將對說話速度(字/分鐘)進行計數，記錄並最終與反映出神經正常成年人的速率進行比較。CDR-FTLD 是典型 CDR 的擴展版本，歷史上一直用於評估阿茲海默氏症頻譜障礙的嚴重程度。評估包括 CDR 的原始 6 個領域(記憶、定向、判斷及解決問題、社群事務、家庭及嗜好、個人護理)以及另外兩個領域：語言及行為，從而在檢測 FTLD 下降方面更加敏

感。等級「0」表示正常行為或語言，而等級「1」、「2」或「3」表示輕度至重度缺陷。「加總計分」或各別領域得分的總和用於確定整體失智的嚴重程度。MMSE 是一種 11-問題總體認知評估，廣泛用於臨床和研究實施中，詢問例如「哪年?哪一季節?哪一日?一週中的哪天?哪月?」的問題並且在每個正確答案給一個分數，且對於每個問題提供最高分。最高總分為 30 分，其中兩個分值分別為 24 和 27，這些分值是認知能力下降的指標。

【0098】主要運動評估包括例如，統一帕金森氏症評定量表(UPDRS)，該 UPDRS 為一種關於帕金森氏症相關之數種領域的 42-項、4-部分的評估，例如心理、行為和情緒及日常生活活動。每一項目包括評定量表，範圍通常從 0(通常表示無損害)到 4(通常表示最嚴重的損害)。記錄每一部分的得分以提供疾病嚴重程度的指標，最高得分為 199，表示最嚴重/最大的總殘疾。

【0099】主要行為評估包括例如，神經精神評估量表(NPI)或額葉行為量表(FBI)，NPI 用於闡明存在於患有腦部疾病的病患的心理病理學。最初，其被開發用於阿茲海默氏症族群；然而，評估其它情況下的行為變化可能是有用的。評估由 10 個行為領域及 2 個神經植物人化區域(neurovegetative areas)組成，其中有 4 種積分：頻率、嚴重程度、整體和護理人員困擾。NPI 總分是藉由將行為領域的領域得分相加，減去護理人員困擾得分得出的。FBI 是一種 24-項目的評估，旨在評估與 bvFTD 特定相關的行為及性格變化，及鑑別 FTD 與其它失智症，其與助要護理人員的面對面訪談執行，因為以 bvFTD 診斷的病患通常對這些類型的變化沒有足夠的了解。它著重在數個

行為及人格相關的區域，每個問題的評分從 0(無)到 3(嚴重/大部分時間)，總分提供深入了解疾病的嚴重程度，並可用於評估隨時間的變化。

【0100】其它/認知及運動評估均包括例如，哥倫比亞-自殺嚴重程度評定量表(C-SSRS)、臨床總體印象變化(Clinical Global Impression of Change；CGI-C)、額葉功能測試(Frontal Assessment Battery；FAB)及/或額顳葉失智症評定量表(FDR)。C-SSRS 為一種 3-部分量表，透過評估自殺意念和行為的問題來衡量自殺意念、意念強度和自殺行為。此評估結果由直接從量表所得之自殺行為殺傷力等級、自殺意念得分和自殺意念強度等級組成，根據評估準則，大於 0 的意念得分可表示需要介入。強度等級的範圍是 0 到 25，其中 0 表示不支持自殺意念。CGI-C 是一種簡短、廣泛使用的評估的三個部分之一，該評估由 3 個項目組成，這些項目均經過臨床醫師觀察員評定。CGI-C 的評分為 7 分制，從研究登記開始，無論任何改善是否是完全由於治療引起的，範圍從 1(大大改善)到 7(非常差)。FAB 為一種簡短的評估，可幫助鑑別具有額葉功能異常表型的失智症和阿茲海默氏症型的失智症，在輕度失智的病患(MMSE>24)中特別有用。評估由 6 個部分組成，分別針對認知、運動和行為領域，總分為 18 分及更高積分表明較佳之表現。FDR 是針對患有額顳葉失智症的病患所進行的簡短分期評估，可檢測出 FTD 亞型隨時間推移的疾病進展差異。此簡短的訪談是由主要護理人員引導，由 30 個項目組成，被分類為從不、有時或始終發生。然後計算百分比分數，並將其轉換為對數分數，並最終轉換為嚴重性分數，嚴重性評分的範圍從非常輕度到嚴重。

【0101】其它功效的量測包括，從診斷角度出發，在徵狀發作後增加的生存期，為一種功效的量測。目前，被診斷為由 *GRN* 突變引起的神經系統退化症的病患從徵狀發作起的預期壽命為 7-11 年。功效的另一種量測為在中額葉皮質和頂葉區域厚度的穩定萎縮及/或增加萎縮，該區域為目標人群中所有臨床表現中最常見的大腦區域，這可使用 MRI 或其它成像技術進行評估，其它評估包括生化生物標誌物。測量 CSF 和血漿中 PGRN 蛋白質的水平，作為 AAV 轉導的讀數，並預期在投予 rAAV1.hPGRN 後在病患中會增加。在其它實施方式中，評估神經纖維絲輕鏈(NFL)、tau、磷酸化 tau 及其它炎症標記物的 CSF 水平。在某些實施方式中，這些生物標誌物水平的調節及/或降低與功效有關。

【0102】儘管以下實施例著重治療與異基因型組合之 *GRN* 單套缺失相關的某些症狀，在某些實施方式中，本文所述載體及組成物可用於治療其它疾病，例如，與 *GRN* 基因同基因型組合突變有關之疾病，例如神經性類蠟脂褐質病、癌症(例如，卵巢癌、乳癌、腎上腺癌及/或胰臟癌)、動脈粥樣硬化、第 2 型糖尿病及代謝性疾病。

【0103】如本文中所使用，術語電腦斷層掃描攝影(CT)係指放射線照相術，其中身體結構的三維影像係藉由電腦從沿軸線製作的一系列平面橫截面影像所構建。

【0104】當提及核酸或其片段時，術語「實質上同源(substantial homology)」或「實質上相似(substantial similarity)」表示：當利用適當的核苷酸插入或刪除與另一核酸(或其互補股)最佳對齊時，經對齊的序列中存在至少約 95%

至 99% 的核苷酸序列同一性。較佳地，同源是在全長序列、或其開讀框、或長度為至少 15 個核苷酸的另一適當片段上，本文描述了適當片段的實例。

【0105】在核酸序列的情況下，術語「序列同一性」、「序列同一性百分比」或「同一性百分比」係指：當用於最大對應對齊時，兩個序列中相同的殘基。序列同一性比較的長度可超過基因體的全長、基因編碼序列的全長或至少約 500 至 5000 個核苷酸的片段是受期望的。然而，亦受期望的是較小片段之間的同一性，例如至少約 9 個核苷酸、通常至少約 20 至 24 個核苷酸、至少約 28 至 32 個核苷酸、至少約 36 個或更多個核苷酸。類似地，對於胺基酸序列，可在蛋白質的全長或其片段上容易地確定「序列同一性百分比」。適當地，片段長度為至少約 8 個胺基酸，並且可以多至約 700 個胺基酸。本文描述了適當片段的實例。

【0106】當提及胺基酸或其片段時，術語「實質上同源」或「實質上相似」表示：當利用適當的胺基酸插入或刪除與另一胺基酸(或其互補鏈)最佳對齊時，經對齊的序列中存在至少約 95% 至 99% 的胺基酸序列同一性。較佳地，同源是在全長序列、或其蛋白質，例如 **cap** 蛋白質、**rep** 蛋白質，或長度為至少 8 個胺基酸，或更理想地為其長度至少 15 個胺基酸的片段。本文描述了合適片段的實例。

【0107】術語「高度保守的」是指至少 80% 同一性，較佳為至少 90% 同一性，更佳為大於 97% 同一性。藉由本領域技術人員已知的運算法和電腦程式，本領域技術人員可易於確定同一性。

【0108】一般而言，當於兩不同腺相關病毒之間指「同一性」、「同源性」或「相似性」時，「同一性」、「同源性」或「相似性」係由「排列比對的(aligned)」序列來測定。「排列比對的」序列或「排列比對」係指多個核酸序列或蛋白質(胺基酸)序列，與參考序列相比，通常包含缺失或額外的鹼基或胺基酸的校正。在實施例中，使用公開的 AAV9 序列作為參考點的 AAV 排列比對為較佳。使用許多公開或市售 Multiple Sequence Alignment Programs 進行排列比對。這類程式之實例包括「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」及「MEME」，其等可透過網際網路上的 Web 伺服器進行訪問。此類程式的其它來源是本領域技術人員已知的。或者，亦可使用載體 NTI 公用程式。還有許多技術領域中已知可用於測量核苷酸序列同一性的算法，包括上述程序中包含的演算法。作為另一實例，可使用 Fasta™(GCG 版本 6.1 中的程序)比較多核苷酸序列，Fasta™提供在查詢和搜尋序列之間最佳重疊區域的排列比對和百分比序列同一性。例如，核酸序列之間的百分比序列同一性可使用 Fasta™及其默認參數決定(字組大小為 6 及用於得分矩陣的 NOPAM 因數)，如 GCG 版本 6.1 中所提供，藉由引用併入本文。胺基酸序列也可使用多序列排序比對程式，例如，「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」及「Match-Box」程式。一般而言，此等程式之任一者皆於內定值下使用，儘管本項技術領域中具通常知識者可根據需要改變這些設定。或者，熟悉技術者可以利用提供至少由參考的算法及程式提供的同一性的程度或排列比對之另一算法或電腦程

式。參見，例如，J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13) : 2682-2690(1999)。

【0109】應注意的是，術語「一(a/an)」係指一個(種)或多個(種)。因此，術語「一(或一個(種))」、「一或多個(種)」及「至少一個(種)」在本文中可互換使用。

【0110】詞語「包含(comprise/comprises/comprising)」應包含性而非排他性地解釋。詞語「由...組成」、「由...構成」及其變化應排他性地而不是包含性地解釋。雖然說明書中的多個實施方式使用「包含」語句來呈現，但在其它情況下，相關實施方式亦旨在使用「由...組成」或「實質上由...組成」語句來解釋和描述。

【0111】如本文中所使用，除非另有指明，術語「約」意指與給定參考值間有 10%(±10%，例如，±1、±2、±3、±4、±5、±6、±7、±8、±9、±10，或其等之間的值)的變化。

【0112】如本文中所使用，「疾病」、「失調」及「症狀」可互換使用，以指示受試者的不正常狀態。

【0113】除非在本說明書中另有定義，否則本文所使用的技術和科學術語具有與本領域中具有通常知識者所通常理解的含義相同，並且藉由參考公開的文本，其為本領域技術人員提供了本申請案中使用的術語的一般的準則。

【0114】術語「表現」在本文中以其最廣泛的含義使用，且包含 RNA 或 RNA 及蛋白質的產生。關於 RNA，術語「表現」或「轉譯」特別涉及肽或蛋白質的產生。表現可為一時的或可為穩定的。

【0115】如本文中所使用，「表現匣」係指包含編碼序列、啟動子並且可包括其它調節序列的核酸分子。該表現匣可藉由遺傳元件(例如，質體)遞送至包裝宿主細胞，並包裝到病毒載體(例如，病毒顆粒)的衣殼中。通常，此類用於產生病毒載體的表現匣包含本文所述基因產物的編碼序列，其兩側是病毒基因組的包裝訊息及其它表達控制序列，例如本文所述的那些。

【0116】如本文中所使用，術語「可操作地連接」係指相鄰於目的基因的表現控制序列及反向或在遠距離起作用以控制目的基因的表現控制序列二者。

【0117】當涉及蛋白質或核酸使用時，術語「異源的」表示蛋白質或核酸包含在自然界中彼此之間沒有相同關係的兩個或更多個序列或子序列。例如，核酸通常是重組產生的，具有二或多個來自無關基因的序列，其排列以產生新的功能性核酸。例如，在一實施方式中，該核酸具有來自一個基因的啟動子，其被安排為指導來自不同基因的編碼序列的表現。因此，參照編碼序列，啟動子是異源的。

【0118】在本發明的上下文中，術語「轉譯」係關於核醣體的過程，其中 mRNA 股控制胺基酸序列的組裝以產生蛋白質或肽。

【0119】以下實施例僅為說明性的，並不意圖限制本發明。

【0120】

實 施 例

縮寫	描述
A	吸光度(Absorbance)
aa	胺基酸
AAV	腺相關病毒
AAV1	腺相關病毒血清型 1
AAV2	腺相關病毒血清型 2
AAV5	腺相關病毒血清型 5
AAVhu68	腺相關病毒血清型 hu68
ACMG	美國醫學遺傳學暨基因體學學會(American College of Medical Genetics)
AD	阿茲海默氏症
AD & FDM	阿茲海默氏症及額顳葉失智症變異資料庫 (Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database)
Ad5	腺病毒血清型 5(Adenovirus Serotype 5)
AE	不良事件(Adverse Events)
AEX	陰離子交換(Anion Exchange)
<i>AmpR</i>	安比西林(Ampicillin)抗性(基因)
ANOVA	變異數分析
ARTFL	額顳葉型退化之前瞻研究與治療 (Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration)
AUC	分析型超高速離心(Analytical Ultracentrifugation)
BA	β-肌動蛋白
BCA	二喹啉甲酸(Bicinchoninic Acid)
BDS	大批原料藥(Bulk Drug Substance)
BMCB	細菌主細胞庫(Bacterial Master Cell Bank)
bp	鹼基對
BRF	批次紀錄表(Batch Record Form)
BSA	牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)
BSE	牛海綿狀腦病變(Bovine spongiform encephalopathy)
BSC	生物安全櫃(Biological Safety Cabinet)

縮寫	描述
bvFTD	行為變異型額顳葉失智症(Behavioral Variant Frontotemporal Dementia)
BWCB	細菌工作細胞庫(Bacterial Working Cell Bank)
<i>C9orf72</i>	染色體 9 開讀框 72 (基因，人類)
<i>cap</i>	衣殼 (基因)
CB7	雞 β -肌動蛋白啟動子及 CMV 增強子
CBC	全血細胞計數(Complete Blood Count)
CBER	生物製品評估與研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research)
CBS	皮質基底核綜合症(Corticobasal Syndrome)
CDR-FTLD sb	用於額顳葉型退化加總計分之臨床失智評估(CDR)量表
CFR	聯邦法規(Code of Federal Regulations)
CFU	菌落形成單位(Colony Forming Units)
CGI-C	臨床總體印象變化
CI	嵌合內含子(Chimeric Intron)
CMC	化學製造與控制(Chemistry Manufacturing and Controls)
CMO	受託製造機構(Contract Manufacturing Organization)
CMV IE	細胞巨大病毒立即早期增強子(Cytomegalovirus Immediate-Early Enhancer)
CNS	中樞神經系統
COA	檢驗證明書(Certificate of Analysis)
CPE	細胞病變作用(Cytopathic Effects)
CRL	查爾斯河實驗室
CRO	受託研究機構(Contract Research Organization)
CSF	腦脊髓液(Cerebrospinal Fluid)
C-SSRS	哥倫比亞-自殺嚴重程度評定量表(Columbia-Suicide Severity Rating Scale)
CT	電腦斷層掃描攝影(Computed Tomography)
CTL	胞毒型 T 淋巴球(Cytotoxic T Lymphocyte)
CTSD	細胞自溶酵素 D(Cathepsin D)
ddPCR	微滴數位化聚合酶連鎖反應(Droplet Digital Polymerase Chain Reaction)

縮寫	描述
DLS	動態光散射(Dynamic Light Scattering)
DMEM	達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco’s Modified Eagle Medium)
DMF	原料藥主檔案(Drug Master File)
DNA	去氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)
DO	溶氧(Dissolved Oxygen)
DP	藥品(Drug Product)
DRG	背根節(Dorsal Root Ganglia)
DS	原料藥(Drug Substance)
<i>E1A</i>	早期區域 1A (基因)
ECG	心電圖(Electrocardiogram)
EDTA	伸乙二胺四乙酸
ELISA	酶聯免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ELISpot	酶聯免疫斑點法(Enzyme-Linked Immunospot)
EU	內毒素單位
F	女性
F/U	追蹤(Follow-Up)
FAB	額葉功能測試(Frontal Assessment Battery)
FBI	額葉行為量表(Frontal Behavioral Inventory)
FBS	胎牛血清(Fetal Bovine Serum)
FDA	食品藥物管理局(Food and Drug Administration)
FDP	填充藥品(Filled Drug Product)
FFB	最終調配緩衝液(Final Formulation Buffer)
FIH	第一期人體試驗(First-in-Human)
FRS	額顳葉失智症評定量表(Frontotemporal Dementia Rating Scale)
FTD	額顳葉失智症(Frontotemporal Dementia)
FTLD	額顳葉退化(Frontotemporal Lobar Degeneration)
FTDC	國際行為變異型額顳葉失智症標準聯盟 (International Behavioral Variant FTD Criteria Consortium)

縮寫	描述
GC	基因體拷貝數(Genome Copies)
GENFI	遺傳性額顳葉失智症倡議(Genetic Frontotemporal Dementia Initiative)
GLP	優良實驗室操作規範(Good Laboratory Practice)
GMP	優良藥品製造規範(Good Manufacturing Practice)
<i>GRN</i>	顆粒蛋白前體(Granulin Precursor)(基因，人類)
<i>Grn</i>	顆粒蛋白前體(基因，小鼠)
GTP	基因治療項目(Gene Therapy Program)
HCDNA	宿主細胞去氧核糖核酸
HCP	宿主細胞蛋白
HEK293	人類胚腎 293
HEX	己糖胺酶(蛋白)
hPGRN	人類顆粒蛋白前體 (Human Progranulin)
hPGRN v2	人類顆粒蛋白前體 2 版
ICH	國際藥品法規協和會(International Conference on Harmonization)
ICM	小腦延髓池內(Intra-Cisterna Magna)
ICP	顱內壓(Intracranial Pressure)
ICV	腦室內(Intracerebroventricular)
IDS	己醛醣酸鹽硫酸脂酵素(Iduronate-2-Sulfatase)
IDUA	艾杜糖醛酸酶(Iduronidase)
IFN- γ	干擾素 γ
IND	研究中新藥(Investigational New Drug)
IT	鞘內(Intrathecally)
ITFFB	鞘內最終調配緩衝液(Intrathecal Final Formulation Buffer)
ITR	反向末端重複(Inverted Terminal Repeat)
IU	感染單位(Infectious Unit)
IV	靜脈內(Intravenous)
<i>KanR</i>	康黴素抗性(Kanamycin Resistance) (基因)

縮寫	描述
kb	千鹼基(kilobases)
KO	剔除(Knockout)
LAL	蠶阿米巴樣細胞溶解物(Limulus Amoebocyte Lysate)
LBD	路易氏體失智症 (Lewy Body Dementia)
LEFFTDS	家族額顳葉失智症受試者縱向評估 (Longitudinal Evaluation of Familial Frontotemporal Dementia Subjects)
LFTs	肝功能檢查(Liver Function Tests)
LLOQ	最低定量極限
LOD	偵測極限
LP	腰椎穿刺(Lumbar Puncture)
LTFU	長期追蹤(Long-Term Follow-Up)
lvPPA	語彙減少變異型原發性進行性失語症 (Logopenic Variant Primary Progressive Aphasia)
M	男性
<i>MAPT</i>	微管相關 tau 蛋白質(Microtubule-Associated Protein Tau) (基因，人類)
MBR	主批次紀錄(Master Batch Record)
MCB	主細胞庫(Master Cell Bank)
MED	最小有效劑量(Minimum Effective Dose)
MMSE	微型精神狀態檢查(Mini-Mental State Exam)
MRI	磁共振成像
mRNA	信使核糖核酸
MS	質譜法
MTD	最大耐受劑量
N	受試者或動物數量
N/A	不適用
NAbs	中和抗體
NCL	神經性類蠟脂褐質病(Neural Ceroid Lipofuscinosis)
nvPPA	非流利變異型原發性進行性失語症(Nonfluent Variant Primary Progressive Aphasia)
NFL	神經纖維絲輕鏈(Neurofilament Light Chain)

縮寫	描述
NGS	次世代定序法(Next-Generation Sequencing)
NHP	非人類靈長類(Non-Human Primate)
NHS	自然史研究(Natural History Study)
NPI	神經精神評估量表(Neuropsychiatric Inventory)
NSAID	非類固醇類消炎藥(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug)
OL	開放性(Open-Label)
PBS	磷酸鹽緩衝生理鹽水
PD	帕金森氏症(Parkinson’s Disease)
PEI	聚乙烯亞胺
PES	聚醚砜
PET	正子斷層造影(Positron Emission Tomography)
PGRN	顆粒蛋白前體(蛋白質)
PI	計畫主持人(Principal Investigator)
POC	概念驗證(Proof-of-Concept)
poly A	多腺核苷酸化(Polyadenylation)
PPA	原發性進行性失語症(Primary Progressive Aphasia)
PSP	進行性核上神經麻痺症(Progressive Supranuclear Palsy)
QA	品質保證(Quality Assurance)
QC	品質管制(Quality Control)
qPCR	定量聚合酶連鎖反應
rAAV	重組腺相關病毒
ROA	投予途徑(Route of Administration)
rcAAV	具複製能力腺相關病毒(Replication-Competent Adeno-Associated Virus)
rBG	兔 β-球蛋白
rDNA	核醣體去氧核糖核酸
rep	複製酶(基因)
RNA	核糖核酸

縮寫	描述
SA	單臂(Single Arm)
SAE	嚴重不良事件(Serious Adverse Events)
SDS	十二烷基硫酸鈉
SDS-PAGE	十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳
SOP	標準作業程序
SRT	安全性審核觸發(Safety Review Trigger)
ssDNA	單股去氧核糖核酸
svPPA	語義變異型原發性進行性失語症(Semantic Variant Primary Progressive Aphasia)
TBD	待確定(To Be Determined)
TCID ₅₀	50% 組織培養感染劑量
TDP-43	TAR DNA-結合蛋白 43 (蛋白質)
TE	Tris-EDTA
TFF	切向流過濾(Tangential Flow Filtration)
UbC	泛蛋白 C(Ubiquitin C)
UCSF	加州大學舊金山分校(University of California at San Francisco)
UPenn	賓州大學(University of Pennsylvania)
UPenn-GTP	賓州大學-基因治療項目 (University of Pennsylvania Gene Therapy Program)
UPDRS	統一帕金森氏症評定量表(Unified Parkinson’s Disease Rating Scale)
UPLC	超高效液相層析
US	美國
USP	美國藥典(United States Pharmacopeia)
WCB	工作細胞庫(Working Cell Bank)
WT	野生型(Wild Type)

【0121】

實施例 1：材料和方法

【0122】

載體

將工程化人類 PGRN cDNA 選殖到含有雞 β 肌動蛋白啟動子與細胞巨大病毒早期增強子、嵌合內含子及兔 β -球蛋白多腺核苷酸化序列的表現構築體中(圖 1)。將第二工程化人類 PGRN cDNA 選殖到含有人類泛蛋白 C 啟動子之表現構築體中。該表現構築體的側翼為 AAV2 反向末端重複。如前所述((Lock M, et al. Hum Gene Ther. 2010;21(10):1259-71)，藉由三重轉染 HEK 293 細胞和碘克沙醇純化，由此構築體產生腺相關病毒血清型 1、5 及人類 68 (AAVhu68)。

【0123】

動物程序

所有動物方案均由賓州大學的機構動物護理和使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准。GRN 剔除小鼠的繁殖對購自 Jackson Laboratory(庫存編號 #013175)並在賓州大學保留了一個族群。野生型 C57BL/6(庫存編號#000664)作為對照。在第一項研究中，將二月齡小鼠以異氟烷(isoflurane)麻醉，並以體積 5 μ L 之 1×10^{11} 載體基因體拷貝數(GC)注射於側腦室(ICV)。注射 60 日後，在氯胺酮(ketamine)/賽拉嗪(xylazine)麻醉下放血安樂死小鼠，並經頸椎脫臼確認死亡。在第二項研究中，小鼠在 7 月齡時接受治療，並在 11 月齡時犧牲。在屍體剖檢時，藉由心臟穿刺收集血清並藉由枕骨下穿刺用 32 號針連接到聚乙烯配管收集 CSF。在乾冰上立即冷凍血清及 CSF 樣本並儲存於 -80 度直至分析。收集額葉皮質用於生物化學處理，並立即在乾冰上冷凍，而其餘的大腦則以 10% 福馬林固定以進行組織學檢查。

3-4 歲之恆河獼猴購自 Covance。關於載體投予，用肌內投予右美托咪啉(dexmedetomidine)及氯胺酮對動物進行鎮靜，並以單一小腦延髓池內(ICM)注射在 1 mL 人工 CSF 中的 3×10^{13} GC 之 AAV 載體。如前所述(Katz N, et al. Hum Gene Ther Methods. 2018 Oct;29(5):212-219)，藉由使用螢光鏡(OEC9800 C-Arm, GE)的脊髓造影確認針頭位置。以過量巴比妥酸鹽(barbiturate)將動物安樂死，將所收集的組織立即在乾冰上冷凍或固定在 10%福馬林中進行組織學檢查。

【0124】

組織學和影像學

將小鼠大腦固定於 10%福馬林中，冷凍保存在蔗糖中，嵌入最佳切削溫度(optimal cutting temperature; OCT)化合物中，並低溫切片，拍攝感興趣區域的自體螢光物質(脂褐質)的低倍影像，使用 Image J 軟體以盲法對脂褐質沉積物進行定量。非人類靈長類組織固定於 10%福馬林中，石蠟包埋並以蘇木精-伊紅((Hematoxylin and Eosin; H&E)染色載玻片經認證的獸醫病理學家(ELB)審查。對於以 GFP 載體治療的動物，將腦切片用針對 olig2、GFAP 或 NeuN 的抗體染色，所有切片均與 DAPI 和針對 GFP 的抗體共同染色，然後再進行螢光二級抗體染色。在 Leica Aperio Versa 200 玻片掃描儀上掃描玻片，並從 eSlide Manager 下載，然後在 HALO 成像軟體(Indica Labs)上進行分析。對每隻動物右腦半球取樣五個區域，並對具有每種細胞類型標記的細胞進行定量，藉由調整以下設定來檢測細胞：在細胞核檢測片下的「最小核強度」、「核大小」、「核分節攻擊性(nuclear segmentation

aggressiveness)」及「最小核圓度」。然後，對於每種單獨的染料定義標準，以進一步鑑定細胞並為每種標記產生定量的總細胞數。根據檢測所需細胞類型的敏感性和可靠性依據經驗確定設置；在一些情況下，設定例如細胞質中的 NeuN 檢測並不能反映標記的真正細胞內定位，但可以提供更高的檢測的特異性和靈敏度。藉由自動方式檢測到的所有細胞均經過手動驗證。對於神經元，在「染料 1」片下，調整「細胞核陽性閾值」及「細胞質陽性閾值」以便只檢測在細胞核和細胞質中都存在 NeuN 的細胞。對於星狀細胞，選擇 DAPI 和 GFAP 標記，且兩者都必須存在於細胞核及細胞質中才能將其包括在計數中。對於寡樹突細胞，如果 DAPI 和 olig2 皆存在於細胞核但均不存在於細胞質中，則對細胞計數。對於共定位，使用相同的設定，但是 GFP 作為額外染料包含在神經元的細胞核中，並在星狀細胞的細胞核和細胞質中。藉由使用細胞核或細胞質「遮蔽」功能對其進行「遮蔽」，從所產生之結果表中消除不表現所有選定標記的細胞，由於缺少與 olig2 共同定位的 GFP 陽性細胞，因此需要手動對轉導的寡樹突細胞進行計數。在一些情況下，脈絡叢(choroid plexus)的血管或部分呈現自體螢光，並使用「裁剪」工具手動勾勒出輪廓並排除，所得之值表示為每種細胞類型標記的 GFP 陽性細胞的百分比。

【0125】

用於己糖胺酶(Hex)分析之樣本製備

血清直接用於 Hex 活性分析，而大腦樣本則在溶解緩衝液(0.2% Triton-X100，0.9% NaCl，pH 4.0)中勻質化，然後進行三個凍融循環並離心澄清，藉由布拉德福(Bradford)分析測

定蛋白質濃度。如前所述進行 Hex 活性測量(Hinderer C, et al. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014;22(12):2018-27)。

【0126】

ELISA

使用帶有些許修飾的 DuoSet ELISA 套組(R&D # DY2420)測量人類 PGRN。簡而言之，將高結合力的聚苯乙烯 ELISA 平板在 4°C 下以稀釋於磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)的 5 ug/ml 人類 PGRN 捕獲抗體塗布隔夜。洗滌後，將平板用以具有 1%牛血清白蛋白(BSA)之 PBS 中封阻 2 小時，然後將樣品培養 1 小時。人類及非人類靈長類 CSF 以 1：5 稀釋，而鼠類 CSF 樣本則以 PBS 1:40 稀釋。大腦樣本在溶解緩衝液稀釋成 2 mg/ml 總蛋白質濃度，用生物素化小鼠抗人顆粒蛋白前體抗體及鏈親和素(Streptavidin)-HRP 偵測結合的抗體，在 450 nm 進行吸光度測量之前，使用四甲基聯苯胺(tetramethylbenzidine)基質將平板顯影 20 分鐘，然後用 2N 硫酸終止反應。

【0127】

中和抗體分析

如前所述評估抗 AAVhu68 的中和抗體(Calcedo R, et al. *J Infect Dis*. 2009;199(3):381-90)。

【0128】

統計

使用單因子變異數分析(one-way ANOVA)，然後藉由事後杜凱氏(Tukey)多重比較試驗，對野生型、GRN 剔除和經 AAV

處理的 GRN 剔除小鼠中 Hex 酶活性、脂褐質計數和 CD68+面積進行比較。

【0129】

實施例 2：在鼠類疾病模型中的人類 GRN 轉殖基因之 AAV-媒介遞送

使用例如 WO 2018/160582 所述之發表的三重轉染技術，在控制 CB7 啟動子及嵌合內含子(CB7.CI.hPGRN.rBG)下，產生具有表現人類 PGRN(SEQ ID NO：3)之 AAVhu68 衣殼的重組 AAV 載體。

【0130】在 GRN 剔除小鼠模型中評估人類 GRN 轉殖基因的 AAV-媒介遞送。用於 GRN 突變($GRN^{+/-}$)的小鼠異基因型組合並未呈現與 GRN 相關的神經退行性疾病的病理學特徵，可能是因為小鼠的壽命未能允許發展出 GRN 單套缺失的後遺症，而 GRN 單套缺失在人類數十年後才首次出現。相較之下， $GRN^{-/-}$ 小鼠中完全 PGRN 缺失則概括了在人類中 GRN 單套缺失的幾個早期特徵，例如溶酶體功能受損、自身螢光溶酶體貯積物質(脂褐質)的蓄積及小神經膠質細胞的活化，隨然 $GRN^{-/-}$ 小鼠直至兩歲都沒有呈現神經元損失(Lui H, et al. Cell. 2016;165(4):921-35；Ward ME, et al. Sci Transl Med. 2017 Apr 12;9(385):pii：eaah5642)。據報導， $GRN^{+/-}$ 和 $GRN^{-/-}$ 小鼠均表現出行為異常，但各組之間的發現不一致(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010;177(1):311-24；Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76；Ghoshal N, et al. Neurobiology of Disease. 2012;45(1):395-408；Filiano AJ, et al. The Journal of

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013;33(12):5352-61; Yin F, et al. The FASEB Journal. 2010;24(12):4639-47)。同樣地，一些報告表明 GRN^{-/-}小鼠的生存期降低，而另一些報告則表明 GRN^{-/-}小鼠的壽命正常，這與我們的經驗一致(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010;177(1):311-24; Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76)。儘管 GRN^{-/-}小鼠並未呈現明顯的神經系統退化症或神經病學跡象，但與人類中 GRN 單套缺失的顯著生物化學和組織學相似，使其成為評估新穎療法的潛在訊息模型，因此，將分析聚焦於在 GRN^{-/-}小鼠中的這些生化和組織學上的發現。

【0131】這項研究的目的為評估將人類 GRN 基因遞送至大腦是否可以在 GRN^{-/-}小鼠中消除現有的溶酶體存儲物質並正常化溶酶體的功能。對於溶酶體儲積的反應，細胞上調溶酶體酵素的表現，其可用作溶酶體儲積病的生物標記(Hinderer C, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014;22(12):2018-27; Gurda BL, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(2):206-16; Karageorgos LE, et al. Experimental Cell Research. 1997;234(1):85-97)。評估來自不同年齡的 GRN^{-/-}和 GRN^{+/+}小鼠的腦組織中的溶酶體酵素己糖胺酶的活性、以及皮質、海馬體和丘腦中的脂褐質沉積物(圖 3A-圖 3D)。在整個生命中，己糖胺酶活性的升高是明顯的，而脂褐質則呈現漸進的蓄積。脂褐質早在 2 個月齡時就很明顯，此與先前的發現一致(Klein ZA, et al. Neuron.

2017;95(2):281-96 e6)。以基於天然分離物 AAVhu68 的 AAV 載體進行初步研究，該分離物與進化枝 F 分離物 AAV9 密切相關。以腦室內(ICV)注射表現人類 GRN 的 AAVhu68 載體或媒劑(PBS)治療 2-3 月齡之 GRN^{-/-}小鼠(每組 N=10)。此外，以媒劑注射同齡群的野生型小鼠(N=10)。因為 2 月齡小鼠的小尺寸難以通過 ICM 途徑而可靠地投予載體，所以使用 ICV ROA(包含將 AAV 載體直接注射到腦室的 CSF 中)，這是 ROA 用於 NHP 研究和擬議的 FIH 臨床試驗。先前的研究證實，以本研究選擇的劑量(10^{11} GC)，AAVhu68 之 ICV 投予，造成轉導作用僅限於注射腦室的附近大腦區域，使其成為一種有用系統，評估是否可透過藉由小細胞族群分泌 PGRN 而實現全面改善腦損傷。

【0132】投予載體兩個月後，對動物實施安樂死，並收集大腦、CSF 和血清。大腦中人類 PGRN 蛋白質水平的定量證實 AAV 治療組的轉導(圖 4A-圖 4F)，PGRN 是一種可在 CSF 中測定的分泌蛋白質，且在人類 GRN 突變載劑的 CSF 中會降低(Lui H, et al. Cell. 2016;165(4):921-35; Meeter LH, et al. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2016;6(2):330-40)。因此，評估經 AAV 治療的 GRN^{-/-}小鼠之 CSF 中 PGRN 蛋白質的水平，其顯示平均 CSF 濃度為 14 ng/mL，而在經媒劑治療之組別中，人類 PGRN 低於檢測水平(圖 4A-圖 4F)，PGRN 的表現伴隨著溶酶體酵素表現的正常化，在經 AAV 治療的 GRN^{-/-}小鼠的大腦中 Hex 活性水平恢復到接近正常水平(圖 4A-圖 4F)。

【0133】確認 PGRN 在 GRN^{-/-}小鼠的大腦中表現後，評估 PGRN 表現是否減少海馬體、丘腦和皮層中脂褐質沉積物的數

量。為此目的，將未染色的經固定之大腦切片置於蓋玻片上，並以盲測法對自體螢光脂褐質進行成像並定量。與經媒劑治療的 $GRN^{-/-}$ 小鼠相比，經 AAV 治療之 $GRN^{-/-}$ 小鼠在所有腦區域均呈現降低的脂褐質，且與年齡相仿的野生型對照組的水平相似(圖 4A-圖 4F)。

【0134】概念研究的初步驗證證明，當貯積物質剛開始出現在大腦中時，早期治療的小鼠中 AAV-媒介 PGRN 表達的治療活性，隨後評估基因轉移對具有早已存在更嚴重之病理學的老年小鼠的影響。在此研究中，7 月齡之 $GRN^{-/-}$ 小鼠接受單次 ICV 注射表現人類 PGRN 之 AAVhu68 載體或媒劑，並於 11 月齡時犧牲。除了廣泛的腦脂褐質沉積物外(圖 5A-圖 5D)，11 月齡的 $GRN^{-/-}$ 小鼠呈現廣泛的小膠質細胞增生，類似於由 GRN 突變引起的 FTD 病患(圖 6A-圖 6D) (Ahmed Z, et al. Journal of neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2007 Feb 11;4:7)。GRN 基因的轉移減少了老年小鼠的腦 Hex 活性和脂褐質沉積物，這與幼小動物的發現相似(圖 5A-圖 5D)。此外，小神經膠質細胞的大小及數量在經治療的小鼠大腦中是正常的(圖 6A-圖 6D)。

【0135】在累計上，將表現人類 PGRN 之 AAV 載體以 ICV 遞送到 $GRN^{-/-}$ 小鼠清除了脂褐質聚集體，且幾乎完全正常化了溶酶體酵素活性，表明 PGRN 基因遞送可有效改正 GRN 相關性神經退行性疾病的潛在病理生理學的關鍵方面。

【0136】

實施例 3：AAV-媒介 GRN 基因轉移至非人類靈長類動物

GRN^{-/-}小鼠中的發現證實，將 AAV 載體遞送到 CSF 中可達到足夠的腦轉導，以產生治療水平的 PGRN 並防止或逆轉與 PGRN 缺乏相關的生化及組織學發現。為了將此途徑轉化至人類，已在非人類靈長類動物中使用 ICM 遞送進行研究，ICM 遞送是一種臨床相關的載體投予途徑。藉由注射至小腦延髓池中的鞘內 AAV 遞送是一種微創方法，與藉由腰椎穿刺投予相比，可產生更廣泛的腦轉導(Hinderer C, et al. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2014;1:14051)。使用 3 至 10 歲的 NHP，因為該年齡代表預期的成年病患族群。在雞 BA 啟動子及 CMV IE 增強子(簡稱為 CB7 啟動子)的控制下，對恆河獼猴(每組 N=2)進行單一影像引導之 ICM 注射，注射由表現人類 GRN 之 AAV1、AAV5 或 AAVhu68 載體，該載體表現來自稱為 hPGRN (SEQ ID NO：3)之轉殖基因的人類 GRN，另一組以攜帶由泛蛋白 C 啟動子(UbC)表現的不同工程化轉殖基因序列(hPGRN v2，SEQ ID NO：4)的 AAVhu68 載體治療，每週測量 CSF 中的人類顆粒蛋白前體水平，注射後 35 天犧牲動物以進行組織病理學分析。進行初步安全性分析，包括日常籠側觀察、連續體檢、全血細胞計數、血清化學檢測、CSF 化學和細胞學檢查及以顯微鏡評估大腦和脊髓的完整屍體剖檢。治療組總結於下表中。

【0137】

衣殼	轉殖基因	啟動子	種別	N	ROA	劑量	注射體積
AAVhu68	hPGRN	CB7	成年恆河獼猴	2	ICM	3.00 x 10 ¹³ GC	1 mL
AAVhu68	hPGRN v2	UbC		2			
AAV1	hPGRN	CB7		2			
AAV5	hPGRN	CB7		2			

【0138】投予載體後，在所有 NHP 的 CSF 中檢測到了健全的 PGRN 表現(圖 7A)。以 AAVhu68 載體治療的兩隻動物呈現的 CSF 人類 PGRN 水平比健康人類對照組高出 10 倍，且類似於逆轉 GRN^{-/-}小鼠大腦中溶酶體異常的水平。AAV5 治療產生的 CSF 表達水平與 AAVhu68 大致相當，人類 PGRN 的表現在以 AAV1 載體治療的動物中最大，達到正常人類水平的 40 倍以上。測試來自以 AAVhu68 及 AAV1 載體治療之 NHP 的 CSF 及血漿樣品用於抗人 PGRN 之抗體。所有四隻動物都對人類轉殖基因產物產生了抗體(圖 8A–圖 8C)，此可解釋研究結束時衰退的表現水平，CSF 中抗人類 PGRN 抗體反應的發生與轉殖基因表現水平相關，在 AAV1 組中更早達到高峰。

【0139】ICM AAV 遞送在所有治療組別中耐受性良好，在日常觀察、體檢、全血細胞計數或血清化學檢查中未發現與治療有關的異常，相似於利用異源轉殖基因的其它 ICM AAV 研究 (Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10(79-88))，CSF 分析顯示，注射後 7-21 天，所有載體血清型均發生無徵狀的淋巴球增多，此反映了抗體對轉殖基因產物的反應(圖 8A–圖 8C)，對於大多數動物，屍體剖檢時 CSF 細胞計數均從峰值水平下降，但仍保持是升高的。對 AAV1 和

AAVhu68 治療組的大腦和脊髓的組織病理學進行評估，發現與先前的 ICM AAV 研究類似(Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:79-88 ; Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:68-78)，在腦膜和脈絡叢中偶見極少的淋巴球浸潤，及在一些背根節(DRG)及脊髓切片中感覺神經元及其相關軸突的退化。如同先前的 ICM AAV 研究，感覺神經元發現的嚴重程度一般很小至輕度，與臨床症狀無關(Gurda BL, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(2):206-16; Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:79-88; Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:68-78)。沒有在任何動物的腦實質中發現與載體相關的異常。

【0140】

ICM 投予 AAV1 及 AAVhu68 載體至非人類靈長類動物後 CNS 轉導的不同模式

以 AAV1 載體治療的 NHP 的 CSF 中表現明顯較高 PGRN，促使進一步探索 AAV1、AAV5 及 AAVhu68 載體轉導模式的差異。對 NHP 進行單次 ICM 注射表現 GFP 報導基因的 AAV1、AAV5 或 AAVhu68 載體(3×10^{13} GC，每種載體 n=2)，注射後 28 天犧牲動物用於腦轉導的組織學分析。

【0141】免疫組織化學顯示，以 AAV1 及 AAVhu68 載體治療的 NHP 大腦遍及瀰漫性、片狀轉導(未顯示)，在接受 AAV5 載體的動物大腦中，最小的轉導是明顯的。為了更準確地表徵 AAV1 與 AAVhu68 之間的轉導差異，開發一種半自動方法從多

個大腦區域所收集的切片中量化轉導細胞。使用針對 GFP 的螢光標記抗體染色的切片及特定細胞類型的標記，分別藉由 NeuN、olig2 及 GFAP 染色對神經元、寡樹突細胞及星狀細胞的總數進行定量，之後定量各類型的 GFP 表現細胞(圖 9、圖 10)。在所有檢測的區域中，AAV1 及 AAVhu68 對於各種細胞類型各自轉導不到百分之一，兩種載體之間神經元的轉導幾乎相等，而 AAVhu68 似乎適度轉導了更多數量的星狀細胞和寡樹突細胞。

【0142】鑑於以 AAV1 達到的 CSF PGRN 水平明顯更高，用 AAV1 和 AAVhu68 載體所觀察到的大致等效的腦轉導是出乎意料的。藉由免疫組織化學在以 AAVhu68 治療的動物及以 AAV1 治療的動物 RA1826 的側腦室和第四腦室的多個區域中評估室管膜細胞的轉導。令人感興趣的是，來自經 AAV1 治療的動物(RA1826)的多個腦切片(包含部分腦室系統)證實沿腦室排列的室管膜細胞的廣泛轉導，其在經 AAVhu68 治療的動物中均未觀察到(未顯示)。在所有採樣區域，包括外側腦室和第四腦室的額角、顳角及枕角，平均轉導 48%的室管膜細胞。相反地，在給予 AAVhu68 載體之動物的相同大腦區域中，只有 1-2%的室管膜細胞被轉導。在第二隻經 AAV1 治療的動物中，僅可評估一個側腦室的小片段，該動物顯示出大約 1%的室管膜細胞轉導，儘管分析僅限於小的取樣區域。這些發現表明，在相似兩個血清型之間其它類型的細胞轉導的情況下，在經 AAV1 治療的動物中高轉導的室管膜細胞可能是 CSF 中高水平 PGRN 的來源。由分泌的 PGRN 介導的旁觀者效應(bystander effect)使得由 GRN 突變引起的 FTD 特別適於 AAV 基因治療。由於細

胞外 PGRN 可被神經元吸收，因此以 AAV1 載體達到高 CSF PGRN 水平(顯然由強健的室管膜細胞轉導介導)使 AAV1 成為一種 GRN 基因治療的理想選擇。

【0143】

實施例 4：重組 AAV1.PGRN

藉由 HEK293 細胞之三重質體轉染，利用以下產生 rAAV1.PGRN：1)編碼位於 AAV ITR 兩側的轉殖基因表現盒的 AAV *cis* 質體(稱為 pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR)，2)編碼 AAV2 *rep* 及 AAV1 *cap* 基因的 AAV 反向質體(稱為 pAAV2/1.KanR)，及 3)輔助腺病毒質體(稱為 pAdΔF6.KanR)。rAAV1.PGRN 包裝的載體基因體的大小為 4129 個鹼基。

【0144】

A. AAV 載體基因體質體序列元件

來自順式質體(稱為 pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR (p4862))中的載體基因體的線性圖譜。參見圖 2。

【0145】

順式質體含有以下載體基因體序列元件：

1.反向末端重複(ITR)：ITR 為源自 AAV2 之相同、反向互補序列(130 個鹼基對[bp]，GenBank：NC_001401)，其位於載體基因體所有成分的側面。當反式提供 AAV 及腺病毒輔助功能時，ITR 功能為載體 DNA 複製的起源與載體基因體的包裝訊息二者，從而，ITR 序列代表載體基因體複製及包裝所需的唯一順式序列。

2. **人類細胞巨大病毒立即早期增強子(CMV IE)**：獲自人類衍生之 CMV 的此增強子序列(382 bp，GenBank：K03104.1)增加下游轉殖基因的表現。

3. **雞 β -肌動蛋白啟動子(BA)**：選擇此普遍存在的啟動子(282 bp，GenBank：X00182.1)來驅動任何 CNS 細胞類型中轉殖基因表現。

4. **嵌合內含子(CI)**：雜合的內含子由雞 β -肌動蛋白剪接供體(973 bp，GenBank：X00182.1)與兔 β -球蛋白剪接受體元件組成。內含子被轉錄，但藉由剪接將其從成熟的 mRNA 中移除，從而將其任一側的序列匯集在一起，已顯示在表現匣中內含子的存在可促進 mRNA 從細胞核到細胞質的轉運，因此增強用於轉譯之 mRNA 之穩定水平的蓄積，此為欲增加基因表現水平的基因載體的共同特徵。

5. **編碼序列**：人類 GRN 基因的工程化 cDNA 編碼人類 PGRN(hPGRN)蛋白，其涉及溶酶體功能和其它神經系統作用(1785 bp，GenBank：NM_002087.3；593 個胺基酸[aa]，GenBank：NP_002078)。

6. **兔 β -球蛋白多腺核苷酸化訊息(rBG PolyA)**：rBG polyA 訊息(127 bp，GenBank：V00882.1)促進順式轉殖基因 mRNA 的高效多腺核苷酸化，此元件用作轉錄終止的訊息、在初期轉錄本的 3'端的特異性裂解事件及添加長多腺核苷酸尾。

【0146】

B. AAV1 反向質體：pAAV2/1.KanR (p0069)

AAV2/1 反向質體為 pAAV2/1.KanR (p0069)，pAAV2/1.KanR 質體為 8113 bp 長且編碼於複製和包裝 AAV

載體基因體所需的四種野生型 AAV2 複製酶(Rep)蛋白，pAAV2/1.KanR 亦編碼三種野生型 AAV1 病毒顆粒蛋白衣殼(Cap)蛋白，其等組裝成 AAV 血清型 1(AAV1)的病毒顆粒外殼，以容納 AAV 載體基因體。包含於 pAAV2/1.KanR 中的 AAV1 *cap* 基因係從猿猴來源中分離。

【0147】為了創建 pAAV2/1.KanR 構築體，將來自 p5E18(2/2)的 3.0 kb 片段、來自 pAV1H 的 2.3-kb 片段及來自 p5E18(2/2)的 1.7kb 片段合併以形成 pAAV2/1(p0001)，其在安比西林抗性(AmpR)匣中包含 AAV2 *rep* 及 AAV1 *cap* (在文獻中稱為 p5E18[2/1])，此種編碼策略亦將 AAV p5 啟動子序列(通常驅動 *rep* 表現)從 *rep* 的 5'端遷移至 *cap* 的 3'端，在 *rep* 的上游留下一個截短的 p5 啟動子，此截短的啟動子可下調 *rep* 的表達，從而使載體的產量最大化(Xiao et al., (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 73(5):3994-4003)。

【0148】為了產生用於臨床產品生產的 pAAV2/1.KanR，將 pAAV2/1 主鏈序列中的安比西林抗性(AmpR)基因替換為康黴素抗性(KanR)基因，反向質體的所有組成部分均已通過直接定序驗證。

【0149】

C. 腺病毒輔助質體：pAdDeltaF6(KanR)

質體 pAdDeltaF6(KanR)在賓夕法尼亞大學的 James M. Wilson 博士及其同事的實驗室中構築而成，大小為 15,774 bp。該質體含有對 AAV 複製很重要的腺病毒基因體區域；即，*E2A*、*E4* 及 *VA* RNA (腺病毒 E1 之功能由 HEK293 細胞提

供)。然而，該質體並不含有其它腺病毒複製或結構基因。該質體並不含有對複製重要的 *cis* 元件，例如腺病毒 ITR；因此，預期不會產生感染性腺病毒。質體源自 Ad5 之 E1、E3 缺失分子植株(pBHG10，一種 pBR322 系質體)。將缺失導入至 Ad5 中以去除不必要之腺病毒基因的表現並將腺病毒 DNA 的量從 32 kb 減少到 12 kb。最後，以康黴素(kanamycin)抗性基因替換安比西林(ampicillin)抗性基因，以產生 pAdeltaF6 (KanR)。保留在此質體中的 E2、E4 及 VAI 腺病毒基因，以及存在於 HEK293 細胞中的 E1，對於 AAV 載體生產都是必需的。載體是根據依照圖 13 及圖 14 中所示的流程圖生產的。

【0150】根據 USP <791>確定，最終產物的 pH 值應在 6.2 至 7.7 範圍內，根據 USP<785>確定的滲透壓成分應為 260 至 320 mOsm/kg，且藉由 ddPCR 測定，GC 力價大於或等於 2.5×10^{13} GC/mL (Lock et al, (2014). “Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR.” Hum Gene Ther Methods. 25(2):115-25)。

【0151】
實施例 5：確定 rAAV1.PGRN 於 GRN^{-/-}小鼠模型之最小有效劑量

● 劑量 ● (GC/g 腦質量)	● 小鼠(GC)	● NHP (GC)	● 人類 (GC)
3.33 x 10 ¹¹	1.30 x 10 ¹¹	3.00 x 10 ¹³	4.33 x 10 ¹⁴
1.11 x 10 ¹¹	4.40 x 10 ¹⁰	1.00 x 10 ¹³	1.44 x 10 ¹⁴
3.33 x 10 ¹⁰	1.30 x 10 ¹⁰	3.00 x 10 ¹²	4.33 x 10 ¹³
1.11 x 10 ¹⁰	4.40 x 10 ⁹	-	1.44 x 10 ¹³

【0152】如下評估不同劑量的 rAAV1.PGRN 對 $Grn^{-/-}$ 小鼠模型中 CNS 病灶的影響，功效通過腦貯積病理學(脂褐質)的減少程度來評估，該病理學係作與疾病病理生理學直接相關的定量結果指標。此外，包括用於全血細胞計數和血清化學檢查的末端採血及目標器官的組織病理學，以確定 NHP 毒理學研究中可能未檢測到的疾病-特定毒性。當在患有 GRN 單套缺失的老年受試者中存在大量脂褐質貯積以複製疾病狀態時，對小鼠進行 5-6 個月的治療。 $Grn^{-/-}$ 小鼠經由 ICV 注射(每組 N=15)接受四種 rAAV1.PGRN 劑量(1.30×10^{11} GC、 4.40×10^{10} GC、 1.30×10^{10} GC 或 4.40×10^9 GC)中的一種、或媒劑(ITFFB[含 0.001% Pluronic F-68 之人工 CSF])。以媒劑治療之 $Grn^{+/+}$ 小鼠(N=15)作為正常對照組。在治療後 90 天犧牲動物，收取大腦並切片，並量化脂褐質病灶。相對於經媒劑治療之 $Grn^{-/-}$ 小鼠而言，藉由腦儲積病灶中顯示顯著減少的劑量來確定 MED，且顯著性係使用單因子 ANOVA 和隨後的杜凱氏多重比較試驗($\alpha=0.05$)確定(如果適用)。

【0153】

實施例 6：於非人類靈長類動物中之毒物學研究

rAAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG 為一種由血清型 AAV1 組成的非複製重組腺相關(AAV)載體，其包含工程化人類顆粒蛋白前體(PGRN) cDNA，其受控於具有細胞巨大病毒增強之雞 β 肌動蛋白啟動子及兩側為 AAV 血清型 2 反向末端重複的兔 β 球蛋白多腺苷核苷酸化序列，調配於鞘內最終調配緩衝液(ITFFB)。ddPCR 力價為 2.04×10^{13} GC/mL，將 ITFFB 之 pH 調整至 pH 7.4 以最大化測試物品產品的溶解度。在給藥當天準

備對照物品。將稀釋的物品放在濕的冰上或在 2-8°C 下保存，直到給藥的同一天。

【0154】在成年恆河獼猴進行一項為期 90 天的 GLP-順從性安全研究，研究 ICM 投予後 rAAV1.PGRN 的毒理學。本研究使用 3 至 10 歲的 NHP，因為此年齡代表所預期的成年人類病患族群。選擇 90 天評估期是因為這樣可使 ICM AAV 投予後有足夠的時間使分泌的轉殖基因產物達到穩定的高原水平。恆河獼猴接受總計 3.00×10^{12} GC、總計 1.00×10^{13} GC 或總計 3.00×10^{13} GC 之 rAAV1.hPGRN 三種劑量水平中之一種(每劑量 N=3)或媒劑(ITFFB；N=2)。選擇的劑量水平等於所計劃的最小有效劑量(MED)研究中按腦質量(假設小鼠大腦為 0.4 g，獼猴為 90 g)進行換算的劑量水平。進行基線神經系統檢查、臨床病理學(細胞差別計數、臨床化學和凝血操作盤)、CSF 化學及 CSF 細胞學檢查，投予 rAAV1.PGRN 或媒劑後，每日監測動物的不適及異常行為跡象。

【0155】投予 rAAV1.PGRN 或媒劑後，每週進行 30 天的血液和 CSF 臨床病理學評估及神經系統檢查，在此之後每 30 日一次。在基線及此後的每個 30 天時間，藉由干擾素 γ (IFN- γ)酶聯免疫斑點法(ELISpot)分析來評估抗 AAV1 中和抗體(Nabs)及胞毒型 T 淋巴球(CTL)對 AAV1 及 rAAV1.PGRN 轉殖基因產物的反應。

【0156】

種別	<i>Macaca mulatta</i> (恆河獼猴)
同義語	恆河獼猴
研究開始時的動物年齡	3-8 歲
開始研究時的動物體重	3.0-10.0 kg
使用的動物數量	總共 11 隻 6 隻雄性 5 隻雌性

【0157】

組別名	1	2	3	4
rAAV1.PGRN/ ITFFB	媒劑(ITFFB)	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN	rAAV1.PGRN
rAAV1.PGRN 劑量(GC)	N/A	3.0x10 ¹²	1.0x10 ¹³	3.0x10 ¹³
獼猴數量	2	3	3	3
性別	二者	二者	二者	二者
ROA	ICM	ICM	ICM	ICM
投予體積 (mL)	多至 2.0	多至 2.0	多至 2.0	多至 2.0
屍體剖檢日	90±5	90±5	90±5	90±5

【0158】投予 rAAV1.PGRN 或媒劑後 90 日，將動物安樂死，並收集組織進行全面性顯微組織病理學檢查。此外，屍體剖檢時，從肝臟、脾臟和骨髓中收集淋巴細胞以評估這些器官中對衣殼及轉殖基因產物皆有反應的 T 細胞的存在。

【0159】藉由 qPCR 評估組織樣本中的載體生物分佈，亦對血清及腦脊髓液樣本中的載體基因體進行定量，藉由對尿液及糞便中檢測到的載體基因體的分析來評估載體的排泄。這些分析僅針對最高劑量同齡群進行，因為先前的研究證實，ICM 投予後載體分佈的模式與劑量無關，且基於 qPCR 的生物分佈分析中較高的載體劑量產生更大的總體訊息，允許在檢測目標組織中的載體沉積的最高靈敏度(Hordeaux et al., 2018b)。

【0160】*神經傳導速度評估*

以氯胺酮/右旋美托嘧啶之組合使動物鎮靜，將鎮靜的動物置於手術台上，使其側臥或背臥，並用加熱袋保持體溫。不建議使用電子加熱設備，因為可能會干擾電子訊息的採集。

【0161】為了進行感覺神經傳導研究(NCS)，以陰極最靠近記錄部位將刺激探針置於正中神經上方，在第二趾的遠側趾骨(參考電極)和近側趾骨(記錄電極)的水平處在皮下插入兩個針狀電極，同時將接地電極置於在刺激探針(陰極)的近端，使用兒科刺激器，引起的反應被差異放大並顯示在監視器上。初始採集刺激強度設定為 0.0 mA 以確認沒有背景電子信號。為了找到最佳的刺激位置，將刺激強度增加至 10.0 mA，並當探針沿正中神經移動時產生一系列刺激，直到以決定性的波形確定最佳位置為止。將探頭保持在最佳位置，刺激強度以逐步的方式逐漸增加，直到峰值幅度反應不再增加，記錄每一刺激反應並儲存於軟體中。將對於正中神經最多 10 個最大刺激平均並彙報。測量從記錄部位至刺激陰極之間的距離(cm)並將其輸入軟體中，並使用反應的起始潛伏期和距離(cm)來計算傳導速度，彙報傳導速度及感覺神經動作電位(SNAP)幅度之平均值二者。雙邊測試正中神經，儀器所產生的所有原始數據均保留為研究文件的一部分。

【0162】圖 11A 和圖 11B 顯示 NHP 的正中感覺神經傳導研究的結果。在投予劑量下未觀察到對正中感覺神經傳導的影響。初步的組織學分析顯示主要在 DRG、TRG、脊髓背側白質束及周邊神經內的發現(圖 12A-圖 12D)。這些發現包括

DRG/TRG 內的神經元退化及脊髓和周邊神經的背側白質束內的軸突退化(即軸突病變(axonopathy))。總體而言，在所有治療組別中均觀察到這些發現；然而，在兩個時間點，中劑量組及高劑量組之個體動物的發生率和嚴重性趨向較高。

【0163】考慮到 GRN 相關的神經退行性疾病的嚴重性，ICM 投予 rAAV1.PGRN 的益處/風險輪廓預期仍將是有利的。

【0164】

實施例 7：人體試驗

在患有 GRN 基因突變所引起之成年發病型神經退行性疾病的病患(參見下表)中，進行單次投予 rAAV1.hPGRN 之第一期人體試驗 FIH 期 1/2 劑量遞增研究，rAAV1.hPGRN 被設計成替代 GRN 基因。此項 FIH 研究評估安全性和耐受性，並收集有關功效的初步數據。以 rAAV1.hPGRN 治療多達 12 例有症狀的異基因型組合的 GRN 突變帶原者病患，最初追蹤 2 年(24 個月)，給藥後持續長期追蹤 5 年。這項研究提供數據以支持開始使用試驗期 1/2 最大耐受劑量(MTD)的登錄研究，此登錄研究評估 rAAV1.hPGRN 在臨床結果及與該疾病相關的生物標記物上的作用。所有試驗包括在患有 GRN 相關的神經退行性疾病的成年病患中投予單一 ICM 劑量的 rAAV1.hPGRN。

【0165】

計畫名稱：	臨床 1/2 期開放性、多中心劑量遞增研究以評估將單劑量 rAAV1.hPGRN 遞送至患有在顆粒蛋白前體(<i>GRN</i>)基因中異基因型組合突變所引起之成年發病型神經退行性疾病的成年病患小腦延髓池(ICM)中的安全性及耐受性
受試者數量：	最多至 12 個可評估之受試者
目標：	主要： - 經由投予單一 ICM 劑量後 2 年(24 個月)內，經由評估下列以評價 rAAV1.hPGRN 之知安全性及耐受性： - 不良事件(AE)及嚴重不良事件(SAE) - 生命跡象及身體檢查 - 心電圖(ECG) - 感覺神經傳導研究 - 實驗室評估(血清化學、血液學、凝血研究、肝功能檢查[LFTs]、尿液分析及 CSF 化學及細胞學) - 載體及轉殖基因產物的免疫原性 次要(探索功效): - 投予單一 ICM 劑量 2 年(24 個月)後，基於以下端點評價 rAAV1.hPGRN 的藥效學及生物活性： - rAAV1.hPGRN 對 CSF 中 PGRN 蛋白質水平的影響 - rAAV1.hPGRN 對腦皮質厚度變化的影響
	- 投予單一 ICM 劑量後 2 年(24 個月)內，如下述量測評估 rAAV1.hPGRN 的療效： - rAAV1.hPGRN 對存活的影响 - rAAV1.hPGRN 對臨床徵狀和日常功能的影響，如藉由微型精神狀態檢查(MMSE)、臨床總體印象變化(CGI-C)、額葉功能測試(FAB)、額顳葉失智症評定量表(FRS)、額葉行為量表(FBI)、統一帕金森氏症評定量表(UPDRS)、語文流暢性試驗、用於額顳葉型退化加總計分之臨床失智評估量表(CDR-FTLD sb)及神經精神評估量表(NPI)評估。 探索： - 為了進一步評估 rAAV1.hPGRN 單一 ICM 劑量後 2 年(24 個月)的藥效學作用，如以下量測： - 神經纖維絲輕鏈(NFL)、tau、磷酸化 tau 及炎症標記的 CSF 水平 - PGRN 的血漿水平

研究設計：	此為在患有因 GRN 單套缺失引起的成年發病型神經退行性疾病的成年受試者中，經單次 ICM 注射投予 rAAV1.hPGRN 的臨床 1/2 期、FIH、多中心、開放性、單臂劑量遞增研究。在 2 年內評估安全性和耐受性、藥效學和臨床功效，並在投予 rAAV1.hPGRN 後追蹤 5 年，對所有受試者進行安全性和耐受性、藥效學和臨床結果的長期評估。 該研究包括篩選階段以確定從大約第 35 天前到第 7 天前的每個潛在受試者的資格。在確認受試者的資格和參與研究後，受試者將接受基礎評估，包括腦部 MRI 成像(MRI)、CSF 採集之 LP、抽血、尿液採集、肺活量、ECG、體檢及臨床評估。基礎評估發生在投予 rAAV1.hPGRN 的第 6 天前至第 0 天(包含)之間。在治療階段，受試者在第 1 天早晨入院，受試者在第 1 天接受單一 ICM 劑量的 rAAV1.hPGRN，並在給藥後留院觀察至少 24 小時。後續研究訪視是在給藥後第 7 天、第 14 天、第 30 天及 6 個月，然後在給藥後的前 2 年每 6 個月一次。 以每 12 個月一次頻率 LTFU 訪視額外 3 年，給藥後從頭至尾 5 年。
	該研究由以單次 ICM 注射投予 rAAV1.hPGRN 的三個同齡群組成： ● 同齡群 1 (低劑量)：依次招募三名合格受試者，並投予低劑量的 rAAV1.hPGRN，每位受試者之間有 4 週的安全觀察期。若未觀察到安全性審核觸發(SRT)，則在同齡群 1 中的第三名受試者投予 rAAV1.hPGRN 後 4 週，由安全委員會評估所有可用的安全數據。 ● 同齡群 2 (高劑量)：若決定繼續進行，則依次招募三名合格受試者，並在每名受試者之間進行 4 週安全觀察期的情況下，投予高劑量的 hAAV1.hPGRN。若未觀察到 SRT，則在向第三名受試者同齡群 2 投予 rAAV1.HPGRN 後 4 週，由安全委員會評估所有可用的安全性數據。 ● 同齡群 3 (MTD)：在安全委員會提出正面建議之前，招募另外 6 名受試者，並對其投予 MTD 劑量的 rAAV1.hPGRN。在每位受試者之間的 4 週安全觀察期內，給藥並未錯開。 在累積上，預期高劑量或低劑量同齡群中總共登記 9 名受試者，總共登記 12 位受試者(所有劑量)。
入選標準：	1.在登記時年齡≥35 歲及≤75 歲 2.由異基因型組合的 GRN 突變所引起的成年發病型神經退行性疾病的確診臨床診斷 3.藉由以下標準之一確認 GRN 突變是否為因果關係： a. 遵循美國醫學遺傳學會(American College of Medical Genetics；ACMG)發布的準則(Richards et al., (2015). “Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.” Genet Med. 17(5):405-24)，藉由阿茲海默氏症及額顳葉失智症突變變異資料庫(AD&FTDMDB)歸類為

	致病性突變(AD&FTDMDB and Cruts, (2019). "Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database." Retrieved January 16, 2019，來自 www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByQuery&Query=tblContexts.GeneSymbol%20In%20(%27GRN%27)&Selection=Gene%20In%20(GRN).) b.根據 ACMG 準則，在 AD&FDMDB 中被歸類為「病因性質不明」或「不確定意義的變異」，並且該病患具有相同或相關的神經退行性疾病的家族史 4.CDR-FTLD 整體得分 > 0.5 且 ≤ 1
排除標準：	1.無法提供完整的同意或欠缺與可提供同意的法律授權監護人的充分聯繫 2.對於 MRI、ICM 遞送或 LP 之禁忌症(例如，局部感染、血小板減少症、凝血障礙、顱內壓升高([ICP]由於佔位性病變) 3.在 AD&FDMDB 中，將 GRN 突變分類為「非致病性」、「可能是良性變異」或「良性變異」 4.免疫功能不全病患 5.對於人類免疫缺陷病毒(HIV)或 C 型肝炎檢測結果呈陽性的病患 6.非 GRN 突變引起的其它惡性腫瘤或慢性 CNS 疾病 7.調查人員認為可能會對該病患構成危險的藥物，例如免疫抑製藥物或全身性皮質類固醇，若在篩檢前以穩定劑量服用 30 天，則可以接受使用非類固醇類消炎藥 (NSAID)，並同意在試驗期間保持相同劑量 8.惡性腫瘤(局部皮膚癌除外)或遺傳性癌症徵候群的紀錄病史，經主持人或被指定人討論並批准後，可以納入先前經成功治療惡性腫瘤並有足夠追蹤以排除復發的受試者(基於腫瘤醫師的意見)。 9.調查人員認為可能導致與 GRN 突變無關的認知障礙的任何並發疾病，包括神經梅毒、水腦症、中風、小血管缺血性疾病、不受控制的甲狀腺功能減退或維生素缺乏症 10.對於有生育能力的女性，在篩檢訪視時藉由血清妊娠試驗確認為陽性尿液、在投予研究產物的第 1 天前藉由血清結果確認為陽性尿液、或不願意在研究期間進行其它妊娠試驗 11.對於有生育能力的男性和女性，從篩檢日起至載體投予後 52 週，不願意使用醫學上認可的雙重屏障避孕方法(例如與避孕藥一起使用的避孕套/隔膜)或禁慾 12.調查人員認為會給受試者帶來不必要風險的任何症狀(例如，任何疾病病史、任何當前疾病的證據、體檢的任何發現或任何實驗室異常)，或者會干擾受試者對研究產品的評估或對受試者安全性或研究結果的解釋 13.在治療後 30 天內需要住院的任何急性疾病

【0166】

投予途徑及製程

在第 1 日，藉由 CT 引導的枕骨下注射，將 rAAV1.hPGRN 以單劑量投予至小腦延髓池中。在第 1 日，與研究相關的研究藥房準備含 5.6 mL 適當力價的 rAAV1.hPGRN 的注射器，並送至手術室。

【0167】在研究藥物給藥之前，先將受試者麻醉，插管，並使用無菌技術將注射部位備妥並用布蓋好。執行 LP 以去除預定體積的 CSF，然後 IT 注射碘化造影劑以幫助可視化小腦延髓池的相關解剖結構。IV 造影劑可在插入針頭之前或期間投予，以代替 IT 造影劑。使用 IV 或 IT 造影劑的決定由執行該過程的介入醫師自行決定。在螢光鏡引導下，將一根脊柱針(22-25 G)推入小腦延髓池，較大的導引針可用於輔助針頭放置，確認針頭位置後，將延伸套件連接到脊柱針上，並使其充滿 CSF。根據介入醫師的判斷，可以在延伸套件上連接含造影劑的注射器，並少量注入以確認針頭在小腦延髓池中的位置。確認針頭放置後，將包含 rAAV1.hPGRN 的注射器連接到延伸套件，在 1-2 分鐘期間緩慢注入注射器中的內容物，遞送 5.0 mL 的體積。

【0168】安全性評估，包括不良事件(AE)的收集、身體/神經學檢查、生命體徵、臨床實驗室(血清化學、血液學、凝血、LFT、尿液分析)、ECG、神經傳導研究及 CSF 細胞學和化學(細胞計數、蛋白質、葡萄糖)在研究時間表中所指定的時間進行。

【0169】沒有計劃進行安全性評估的統計比較；所有結果僅是描述性的，列出數據並生成匯總表。

【0170】對次要及探索終點進行統計比較，將每個時間點的測量值與每個受試者的基線值比較，且來自健康志願者和 GRN 病患的自然歷史數據與可用於每個終點的可比較同齡群特徵進行比較，所有數據都顯示在受試者數據列表中。使用頻率和百分比匯總類別變數(categorical variable)，並使用敘述統計學(無缺失觀測值的數量，均值，標準差，中位數，最小值和最大值)匯總連續變數(continuous variable)，圖形顯示是適當的。

【0171】由 GRN 單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症的早期臨床表現是異質性的，這種異質性導致各種診斷，隨著疾病的發展還會出現另外的徵狀。由於病患通常會在徵狀發作後迅速退化，因此只要病患具有確認的病原異基因型組合的 GRN 突變，診斷出任何神經系統退化症的病患可進行治療。可以利用 CDR-FTLD 總體評分來篩選病患，此評定量表被設計成以 FTLD 頻譜診斷來評估病患的疾病嚴重程度。由於與其它 GRN 相關診斷的患者在 FTLD 相關症狀方面的重疊，及 CDR-FTLD 總體評分(記憶力、定向力、判斷力和解決問題的能力、社群事務、家庭及嗜好、個人護理、行為和語言)中捕獲的領域數量，該量表可用於診斷。CDR-FTLD 總體評分大於 0.5 (包括輕微有徵狀的病患)及小於或等於 1 將允許在神經系統退化症的早期階段對有徵狀的病患治療，其中基因治療的益處可能被最大化。在此早期階段治療病患可以隨後檢測出疾病進展的變化或穩定，以及其它徵狀的延遲發作。然而，在此族群中最低 0.5 CDR-FTLD 總評分的要求排除了運動突出診斷的參與，因為該量表並未針對捕捉運動表型缺陷進行優化。

【0172】預期此基因療法不會導致高於生理水平的 PGRN 表現，在非臨床 NHP 研究中使用的 rAAV1.hPGRN 劑量高於 FIH 試驗中使用的劑量，發現在 rAAV1.hPGRN ICM 投予後，PGRN 在血清中的表現接近正常水平。因為參加 FIH 試驗的受試者最初的循環 PGRN 水平約為正常水平的 30%，所以預計循環血清 PGRN 水平可恢復到正常水平。病患的血液檢查經由全血細胞計數(CBC)篩檢，並在後續時間點藉由 MRI 對大腦和上脊柱的釗造影劑對患者進行腫瘤監測，追蹤 5 年。

【0173】除了測量安全性和耐受性作為主要終點外，基於當前文獻並與專門研究 GRN 相關的神經系統退化症的主要臨床醫生諮詢，為此研究選擇次要和探索功效終點，這些終點跟踪臨床結果和疾病生物標記，目的是為隨後的登錄試驗(registrational trial)確定合適的終點。

【0174】因為由 GRN 突變引起的神經系統退化症最終導致死亡，所以 rAAV1.hPGRN 對病患存活率的影響亦為此研究的功效終點。然而，研究的持續時間和樣本量可能不足以證明其生存效益，因為大多數病患從徵狀發作起的預期壽命為 7-11 年。

【0175】評估 rAAV1.hPGRN 對病患的臨床徵狀和日常功能的影響。由於目標病患族群表現出表型異質性，因此採用功能性量表及在臨床呈現範圍內捕捉所表現之徵狀進展的臨床量表。所提出的研究利用 FAB、FRS、MMSE、CGI-C、NPI 和 FBI 來量測隨時間的變化，這些量表主要測量認知、語言、神經心理學行為及與日常功能有關的能力，可告知疾病各種臨床表現的進展或穩定情況。亦包括 UPDRS 以捕捉運動徵狀的變

化。在 FIH 中，這些功效評估本質上是探索性的，欲在隨時間捕捉 rAAV.hPGRN 在徵狀上將衰退穩定的能力。來自 FIH，在具有不同臨床表現的患者的各種臨床參數間進一步衰退的速率的數據，被用於進一步告知適當終點的選擇，並為登錄試驗確定具有臨床意義的變化。

【0176】每個臨床量表的簡要說明如下：

【0177】

主要測量認知功能的臨床量表

CDR-FTLD：CDR-FTLD 是典型臨床失智症等級(CDR)量表的擴展版本，其歷史上一一直用於評估 AD 頻譜疾病的嚴重程度，評估包括 CDR 的原始六個領域(記憶力、定向力、判斷力和解決問題的能力、社群事務、家庭及嗜好、個人護理)，奇異包括語言和行為二個額外領域，其可使得在檢測 FTLD 頻譜病患衰退方面具有更高的靈敏度，等級得分 0 表示正常行為或語言，而得分 1、2 或 3 表示輕度到嚴重缺陷。對於 CDR-FTLD 加總計分(CDR-FTLD sb)代表各個領域的總和，並用於確定整體失智的嚴重程度。

MMSE：MMSE 是一種 11-問題總體認知評估，廣泛用於臨床和研究實施中，詢問例如「哪年?哪一季節?哪一日?一週中的哪天?哪月?」的問題並且在每個正確答案給一個分數，且對於每個問題提供最高分。最高總分為 30 分，其中兩個分值分別為 24 和 27，這些分值是認知能力下降的指標。

語文流暢性測試：儘管不是所提議的探索性功效終點之一，但在整個 FIH 試驗中都進行語文流暢性測試，其很可能是藉由對每位受試者展示相同的照片並要求口頭描述來進行，在

描述過程中，將對說話速度(字/分鐘)進行計數、記錄並最終與反映出神經正常成年人的速率進行比較。

【0178】

主要測量運動功能的臨床量表

UPDRS：UPDRS 為一種關於帕金森氏症相關之數種領域的 42-項、4-部分的評估，例如心理、行為和情緒及日常生活活動，每一項目包括評定量表，範圍從 0(表示無損害)到 4(表示最嚴重的損害)，記錄每一部分的得分以提供疾病嚴重程度的指標，最高得分為 199，表示最嚴重/最大的總殘疾。

【0179】

主要測量行為之臨床量表

NPI：NPI 用於闡明存在於患有腦部疾病的病患的心理病理學。最初，其被開發用於 AD 族群；然而，相信有用於評估其它情況下的行為變化。評估由 10 個行為領域及 2 個神經植物人化區域(neurovegetative areas)組成，其中有 4 種積分：頻率、嚴重程度、整體和護理人員困擾。NPI 總分是藉由將行為領域的領域得分相加，減去護理人員困擾得分得出的。

FBI：FBI 是一種 24-項目的行為及性格變化的評估，專門針對 bvFTD，以區分 bvFTD 與其它失智症。其與助要護理人員的面對面訪談執行，因為以 bvFTD 診斷的病患通常對這些類型的變化沒有足夠的了解。它著重在數個行為及人格相關的區域，每個問題的評分從 0(無)到 3(嚴重/大部分時間)，總分提供深入了解疾病的嚴重程度，並可用於評估隨時間的變化。

【0180】

測量認知功能和運動功能的臨床量表

CGI-C：CGI-C 是一種簡短、廣泛使用的評估的三個部分之一，其由 3 個項目組成，這些項目均經過臨床醫師觀察員評定。CGI-C 的評分為 7 分制，從研究登記開始，無論任何改善是否是完全由於治療引起的，範圍從 1(大大改善)到 7(非常差)。

FAB：FAB 為一種簡短的評估，可幫助鑑別具有額葉功能異常表型的失智症和阿茲海默氏症型的失智症，在輕度失智的病患(MMSE>24)中特別有用。評估由 6 個部分組成，分別針對認知、運動和行為領域，總分為 18 分及更高積分表明較佳之表現。

FDR：FDR 是針對患有額顳葉失智症(FTD)亞型(即，bvFTD 或任何 PPA 亞型)的病患所進行的簡短分期評估，FDR 可檢測出 FTD 亞型隨時間推移的疾病進展差異。此簡短的訪談是由主要護理人員引導，由 30 個項目組成，被分類為從不、有時或始終發生。然後計算百分比分數，並將其轉換為對數分數，並最終轉換為嚴重性分數，嚴重性評分的範圍從「非常輕度」到「嚴重」。

哥倫比亞-自殺嚴重程度評定量表 (C-SSRS)：儘管 C-SSRS 分數不是 FIH 的探索性功效終點，但這項評估是在整個研究過程中進行的。C-SSRS 為一種 3-部分量表，衡量自殺意念、意念強度和自殺行為，此評估結果由直接從量表所得之自殺行為殺傷力等級、自殺意念得分和自殺意念強度等級組成，根據評估準則，大於 0 的意念得分可表示需要介入。強度等級的範圍是 0 到 25，其中 0 表示不支持自殺意念。

【0181】作為另一個探索性終點，評估病患的生存率。然而，被診斷為由 GRN 單套缺失引起的神經系統退化症的病患從徵狀發作起的預期壽命為 7-11 年。因此，研究的持續時間、樣本量及納入處於疾病早期階段的受試者可能不足以證明其生存獲益。

【0182】投予 rAAV1.hPGRN 可將主要是在額葉和顳葉及因 GRN 相關的單套缺失引起的整個腦容量隨時間的萎縮衰退(神經元細胞喪失)穩定下來。MRI 可用於追蹤中額葉皮質及頂葉區域厚度的變化。

【0183】亦評估生物化學的生物標記。測量 CSF 及血漿中 PGRN 蛋白的程度，作為 AAV 轉導的示值讀數，並於 rAAV1.hPGRN 投予後於病患中增加。亦追蹤神經纖維絲輕鏈(NFL)、tau、磷酸化的 tau、及其它炎症標記的 CSF 程度。NFL 被認為係神經元損失或損傷的一般指標。Tau 及磷酸化的 tau 與 AD、PD、及一些型式的 FTD 中觀察到的病理學有關。

【0184】透過全血細胞計數(CBC)組篩選病患的血液檢查，並於後續時間點經由以腦及上脊柱的釐對照物的 MRI，監測病患腫瘤 5 年。

【0185】投予後，rAAV1.hPGRN 之單次投予為安全且可耐受的。於藉由病患的臨床徵狀及日常功能評估時，rAAV1.hPGRN 之單次投予提高存活率，及/或減少疾病進展。治療減緩神經認知功能的喪失。

【0186】(序列表之非關鍵詞文字)

對於包含在數字識別號<223>下的非關鍵詞文字的序列，
提供下列資訊。

SEQ ID NO	在<223>下的非關鍵詞文字
3	<223> 工程化人類 PGRN1 編碼序列
4	<223>工程化 hPGRN2 編碼序列 <220> <221> CDS <222> (1)..(1779)
5	<223> 合成構築體
6	<223> 兔球蛋白 polyA
7	<223> 3’ AAV ITR
8	<223> 5’ AAV ITR
9	<223> 人類 CMV IE 增強子
10	<223> CB 啟動子
11	<223> 嵌合內含子
12	<223> UbC 啟動子
13	<223> 內含子
14	<223> SV40 晚期 polyA
15	<223> 安比西林抗性基因
16	<223> COL E1 起源
17	<223> EF-1a 啟動子
18	<223> F1 ori
19	<223> 康黴素抗性基因
20	<223> P5 啟動子
21	<223> LacZ 啟動子
22	<223> EF1a.huPGRN.SV40 <220> <221> 重複區域 <222> (1)..(130)
23	<223> Ubc.PI.huPGRN.SV40
24	<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG <220> <221> misc_特徵 <222> (1)..(130) <223> 5’ ITR <220>

	<221> misc_特徵 <222> (198)..(579) <223> CMV IE 增強子 <220> <221> misc_特徵 <222> (582)..(863) <223> 雞 β-肌動蛋白啟動子 <220> <221> misc_特徵 <222> (958)..(1930) <223> 嵌合內含子 <220> <221> misc_特徵 <222> (1942)..(3726) <223> hPGRN <220> <221> misc_特徵 <222> (3787)..(3913) <223> 兔 β 球蛋白 poly A <220> <221> misc_特徵 <222> (4002)..(4131) <223> 3' ITR
25	<223> AAV1 VP1 基因 <220> <221> CDS <222> (1)..(2208)
26	<223> 合成構築體
27	<223> AAV2 rep
28	<223> AAV5 衣殼 VP1 基因 <220> <221> CDS <222> (1)..(2172)
29	<223> 合成構築體
30	<223> AAVhu68 VP1 衣殼 <220> <221> CDS <222> (1)..(2211)
31	<223> 合成構築體
32	<223> miRNA 靶序列
33	<223> miRNA 靶序列
34	<223> miRNA 靶序列
35	<223> miRNA 靶序列

本說明書中引用的所有文獻皆藉由引用併入本文。2019 年 2 月 22 日申請之美國臨時專利申請案 No. 62/809,329、2019 年 10 月 21 日申請之美國臨時專利申請案 No. 62/923,812、及 2020 年 2 月 2 日申請之美國臨時專利申請案 No. 62/969,108，藉由引述而與其序列表一起完整併入。此處提交的序列表命名為「18-8663PCT_ST25.txt」且序列及正文藉由引用而併入。儘管已參考特定實施方式而描述本發明，應理解於不脫離本發明的精神下可進行修改。意圖使此種修改落入所附申請專利範圍的範圍內。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 賓州大學委員會

<120> 用於治療GRN相關的成年發病型神經系統退化症之重組腺相關病毒

<130> 18-8663PCT

<150> US 62/809, 329
<151> 2019-02-22

<150> US 62/923, 812
<151> 2019-10-21

<150> US 62/969, 108
<151> 2020-02-02

<160> 35

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 593
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met	Trp	Thr	Leu	Val	Ser	Trp	Val	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Val	Ala	
1				5					10					15		
Gly	Thr	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys	Pro	Val	Ala	Cys	Cys	Leu	
			20					25					30			
Asp	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	Tyr	Ser	Cys	Cys	Arg	Pro	Leu	Leu	Asp	Lys	
		35					40					45				
Trp	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Arg	His	Leu	Gly	Gly	Pro	Cys	Gln	Val	Asp	
	50					55					60					
Ala	His	Cys	Ser	Ala	Gly	His	Ser	Cys	Ile	Phe	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	
65					70					75					80	
Ser	Ser	Cys	Cys	Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Cys	Gly	Asp	Gly	His	
				85					90					95		
His	Cys	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe	His	Cys	Ser	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	
			100					105					110			

Phe	Gln	Arg	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Gln	Cys	Pro	Asp	
		115					120					125				
Ser	Gln	Phe	Glu	Cys	Pro	Asp	Phe	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Met	Val	Asp	
	130					135					140					
Gly	Ser	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Ser	Cys	Cys	Glu	Asp	
145					150					155					160	
Arg	Val	His	Cys	Cys	Pro	His	Gly	Ala	Phe	Cys	Asp	Leu	Val	His	Thr	
				165					170					175		
Arg	Cys	Ile	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	
			180					185					190			
Ala	Gln	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Cys	
		195					200					205				
Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Cys	Cys	Glu	Leu	
	210					215					220					
Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Asn	Ala	Thr	Cys	Cys	
225					230				235						240	
Ser	Asp	His	Leu	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Leu	Ile	
				245					250					255		
Gln	Ser	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Thr	
			260					265					270			
Lys	Leu	Pro	Ala	His	Thr	Val	Gly	Asp	Val	Lys	Cys	Asp	Met	Glu	Val	
		275					280					285				
Ser	Cys	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Cys	Cys	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Trp	
	290					295					300					
Gly	Cys	Cys	Pro	Phe	Thr	Gln	Ala	Val	Cys	Cys	Glu	Asp	His	Ile	His	
305					310					315					320	
Cys	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Thr	Cys	Asp	Thr	Gln	Lys	Gly	Thr	Cys	Glu	
				325					330					335		
Gln	Gly	Pro	His	Gln	Val	Pro	Trp	Met	Glu	Lys	Ala	Pro	Ala	His	Leu	

340																345																350															
Ser	Leu	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Leu	Lys	Arg	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Asn																																
		355					360					365																																			
Val	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Ser	Asp	Thr	Cys	Cys	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly																																
		370					375					380																																			
Glu	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Ile	Pro	Glu	Ala	Val	Cys	Cys	Ser	Asp	His																																
385					390					395																																					
Gln	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Gly	Tyr	Thr	Cys	Val	Ala	Glu	Gly	Gln	Cys																																
				405					410																																						
Gln	Arg	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	Met	Pro	Ala	Arg																																
			420					425					430																																		
Arg	Ala	Ser	Leu	Ser	His	Pro	Arg	Asp	Ile	Gly	Cys	Asp	Gln	His	Thr																																
		435					440					445																																			
Ser	Cys	Pro	Val	Gly	Gln	Thr	Cys	Cys	Pro	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp																																
		450					455					460																																			
Ala	Cys	Cys	Gln	Leu	Pro	His	Ala	Val	Cys	Cys	Glu	Asp	Arg	Gln	His																																
465					470					475																																					
Cys	Cys	Pro	Ala	Gly	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ser	Cys	Glu																																
				485					490					495																																	
Lys	Glu	Val	Val	Ser	Ala	Gln	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Pro																																
				500					505					510																																	
His	Val	Gly	Val	Lys	Asp	Val	Glu	Cys	Gly	Glu	Gly	His	Phe	Cys	His																																
		515					520					525																																			
Asp	Asn	Gln	Thr	Cys	Cys	Arg	Asp	Asn	Arg	Gln	Gly	Trp	Ala	Cys	Cys																																
		530					535					540																																			
Pro	Tyr	Arg	Gln	Gly	Val	Cys	Cys	Ala	Asp	Arg	Arg	His	Cys	Cys	Pro																																
545					550					555																																					
Ala	Gly	Phe	Arg	Cys	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Lys	Cys	Leu	Arg	Arg	Glu																																
				565					570					575																																	

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

Leu

<210> 2
<211> 1782
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
atgtggaccc tggtagctg ggtggcotta acagcagggc tggtagctgg aacgcggtgc 60
ccagatggtc agttctgccc tgtggcctgc tgcctggacc cggaggagc cagctacagc 120
tgctgccgtc cccttctgga caaatggccc acaacactga gcaggcatct gggtagggccc 180
tgccaggttg atgcccactg ctctgccggc cactcctgca tctttaccgt ctcagggact 240
tccagttgct gccccttccc agaggccgtg gcatgcgggg atggccatca ctgctgccc 300
cggggccttc actgcagtgc agacggggca tcctgcttcc aaagatcagg taacaactcc 360
gtgggtgcca tccagtgcc tgatagtcag ttcgaatgcc cggacttctc cacgtgctgt 420
gttatggtcg atggctcctg ggggtgctgc cccatgcccc aggcttcctg ctgtgaagac 480
agggtgcact gctgtccgca cgggtgccttc tgcgacctgg ttcacaccgc ctgcatcaca 540
cccacgggca cccaccccct ggcaaagaag ctccctgccc agaggactaa cagggcagtg 600
gccttgtcca gctcggatc gtgtccggac gcacgggtccc ggtgccctga tggttctacc 660
tgctgtgagc tgcccagtgg gaagtatggc tgctgcccac tgcccacgc cacctgctgc 720
tccgatcacc tgcactgctg cccccaagac actgtgtgtg acctgatcca gagtaagtgc 780
ctctccaagg agaacgctac cacggacctc ctactaagc tgcctgcgca cacagtgggg 840
gatgtgaaat gtgacatgga ggtgagctgc ccagatggct atacctgctg ccgtctacag 900
tcgggggcct ggggctgctg cccttttacc caggctgtgt gctgtgagga ccacatacac 960
tgctgtcccg cgggggtttac gtgtgacacg cagaagggtc cctgtgaaca ggggccccac 1020
caggtgccct ggatggagaa ggccccagct cacctcagcc tgccagaccc acaagccttg 1080
aagagagatg tcccctgtga taatgtcagc agctgtccct cctccgatac ctgctgccc 1140
ctcacgtctg gggagtgggg ctgctgtcca atcccagagg ctgtctgctg ctgggaccac 1200
cagcactgct gccccaggg ctacacgtgt gtagctgagg ggcagtgtca gcgaggaagc 1260

gagatcgtgg ctggactgga gaagatgcct gcccgccggg cticcattatc ccaccccaga 1320
gacatcggct gtgaccagca caccagctgc ccggtggggc agacctgctg cccgagcctg 1380
ggtgggagct gggcctgctg ccagttgccc catgctgtgt gctgcgagga tcgccagcac 1440
tgctgcccgg ctggctacac ctgcaacgtg aaggctcgat cctgcgagaa ggaagtggtc 1500
tctgcccagc ctgccacctt cctggcccgt agccctcacg tgggtgtgaa ggacgtggag 1560
tgtggggaag gacacttctg ccatgataac cagacctgct gccgagacaa ccgacagggc 1620
tgggcctgct gtccctaccg ccagggcgtc tgttgtgctg atcggcgcca ctgctgtcct 1680
gctggcttcc gctgcgcagc caggggtacc aagtgtttgc gcagggaggc cccgcgctgg 1740
gacgcccctt tgagggaacc agccttgaga cagctgctgt ga 1782

<210> 3
<211> 1785
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 工程化人類PRGN1編碼序列

<400> 3
atgtggaccc tgggtgtcttg ggttgcaactg acagctggac tgggtggccgg cacaagatgt 60
cctgacggcc agttttgccc cgtggcctgc tgtcttgatc ctggcggagc cagctacagc 120
tgctgcagac ctctgctgga taagtggccc accacactga gcagacacct cggaggacct 180
tgtcaggtgg acgcccactg ttctgcccga cacagctgca tctttaccgt gtctggcacc 240
tccagctgct gtccatttcc tgaggctgtg gcctgcggag acggccacca ctgttgtcct 300
agaggcttcc actgtagcgc cgacggcaga agctgctttc agagaagcgg caacaatagc 360
gtgggcgcca tccagtgtcc tgacagccag ttcgagtgcc ccgacttcag cacctgttgc 420
gtgatggtgg acggcagctg gggctgttgt ccaatgcctc aggctagctg ctgcgaggac 480
agagtgcact gttgccctca cggcgccttt tgcgatctgg tgcacacccg gtgcatcacc 540
ccaacaggca cacatcctct ggccaagaag ctgcctgctc agcggaccaa tagagccgtg 600
gctctgagca gcagcgtgat gtgccctgac gccagatcca ggtgtccaga cggctccaca 660
tgttgcgaac tgcccagcgg caaatacggc tgctgcccc a tgccctaacgc cacatgctgt 720
agcgaccatc ttactgctg ccacaaagac accgtgtgcg acctgatcca gagcaagtgc 780
ctgagcaaag agaacgccac caccgacctg ctgaccaaac tgccagctca caccgtggga 840

gatgtgaagt gcgacatgga agtgtcttgc cccgacggct atacctgctg tagactgcaa 900
tctggcgcct ggggctgctg ccctttttaca caagctgtgt gttgcgagga ccacatccat 960
tgctgccctg ccggcttcac ctgtgacaca cagaaaggca cctgcgagca gggccctcat 1020
caggtgccat ggatggaaaa agcccctgct cacctgagcc tgcctgatcc tcaagctctg 1080
aagagggacg tgccctgcga caatgtgtct agctgcccta gcagcgacac ctgctgccag 1140
ctgacatctg gcgagtgggg ctgctgtcct ataccagagg ccgtgtgttg ttccgaccac 1200
cagcattgct gtccccaagg ctacacctgt gtggccgaag gccaatgtca acggggctct 1260
gaaattgtgg ccggcctgga aaagatgccc gccagaaggg cttctctgtc tcacccccgg 1320
gacatcggct gcgaccagca cacatcttgt cctgtgggcc agacctgttg tccctctctt 1380
ggtggatcct gggcttgctg tcagctgcct cacgccgtgt gctgcgaaga tagacaacac 1440
tgctgtcccg ccggatacac ctgtaacgtg aaggccagat cctgcgagaa agaagtgggtg 1500
tctgcccagc ctgccacctt cctggctaga agtcctcacg tgggcgtgaa ggacgtggag 1560
tgtggcgagg gccacttctg ccacgacaat cagacatgct gcagagacaa ccggcaaggc 1620
tgggcttggt gcccatatag acagggcgtg tgctgtgccg acagaaggca ctgttgtcca 1680
gccggcttta gatgtgccgc caggggcaca aagtgtctga gaagggaagc ccctaggtgg 1740
gacgcccctc tgagagatcc tgctctgaga cagctgctct gatga 1785

<210> 4
<211> 1779
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 工程化hPRGN2編碼序列

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1779)

<400> 4
atg tgg acc ctg gtt agc tgg gtg gcc ctg acc gcc ggc ctg gtg gcc 48
Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15
ggc acc agg tgc ccc gac ggc cag ttc tgc ccc gtg gcc tgc tgc ctg 96
Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30
gac ccc ggc ggc gcc agc tac agc tgc tgc aga ccc ctg ctg gac aag 144
Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys

35					40					45						
tgg	ccc	acc	acc	ctg	agc	aga	cac	ctg	ggc	ggc	ccc	tgc	cag	gtg	gac	192
Trp	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Arg	His	Leu	Gly	Gly	Pro	Cys	Gln	Val	Asp	
	50					55					60					
gcc	cac	tgc	agc	gcc	ggc	cac	agc	tgc	atc	ttc	acc	gtg	agc	ggc	acc	240
Ala	His	Cys	Ser	Ala	Gly	His	Ser	Cys	Ile	Phe	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	
65					70					75					80	
agc	agc	tgc	tgc	ccc	ttc	ccc	gag	gcc	gtg	gcc	tgc	ggc	gac	ggc	cac	288
Ser	Ser	Cys	Cys	Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Cys	Gly	Asp	Gly	His	
				85					90					95		
cac	tgc	tgc	ccc	aga	ggc	ttc	cac	tgc	agc	gcc	gac	ggc	aga	agc	tgc	336
His	Cys	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe	His	Cys	Ser	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	
			100					105					110			
ttc	cag	aga	agc	ggc	aac	aac	agc	gtg	ggc	gcc	atc	cag	tgc	ccc	gac	384
Phe	Gln	Arg	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Gln	Cys	Pro	Asp	
		115					120					125				
agc	cag	ttc	gag	tgc	ccc	gac	ttc	agc	acc	tgc	tgc	gtg	atg	gtg	gac	432
Ser	Gln	Phe	Glu	Cys	Pro	Asp	Phe	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Met	Val	Asp	
	130					135					140					
ggc	agc	tgg	ggc	tgc	tgc	ccc	atg	ccc	cag	gcc	agc	tgc	tgc	gag	gac	480
Gly	Ser	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Ser	Cys	Cys	Glu	Asp	
145					150					155					160	
aga	gtg	cac	tgc	tgc	ccc	cac	ggc	gcc	ttc	tgc	gac	ctg	gtg	cac	acc	528
Arg	Val	His	Cys	Cys	Pro	His	Gly	Ala	Phe	Cys	Asp	Leu	Val	His	Thr	
				165					170					175		
agg	tgc	atc	acc	ccc	acc	ggc	acc	cac	ccc	ctg	gcc	aag	aag	ctg	ccc	576
Arg	Cys	Ile	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	
			180					185					190			
gcc	cag	aga	acc	aac	aga	gcc	gtg	gcc	ctg	agc	agc	agc	gtg	atg	tgc	624
Ala	Gln	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Cys	
		195					200					205				
ccc	gac	gcc	aga	agc	agg	tgc	ccc	gac	ggc	agc	acc	tgc	tgc	gag	ctg	672
Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Cys	Cys	Glu	Leu	
	210					215					220					
ccc	agc	ggc	aag	tac	ggc	tgc	tgc	ccc	atg	ccc	aac	gcc	acc	tgc	tgc	720
Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Asn	Ala	Thr	Cys	Cys	
225					230					235					240	
agc	gac	cac	ctg	cac	tgc	tgc	ccc	caa	gac	acc	gtg	tgc	gac	ctg	atc	768
Ser	Asp	His	Leu	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Leu	Ile	
				245					250					255		
cag	agc	aag	tgc	ctg	agc	aag	gag	aac	gcc	acc	acc	gac	ctg	ctg	acc	816
Gln	Ser	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Thr	
			260					265					270			

aag Lys	ctg Leu	ccc Pro 275	gcc Ala	cac His	acc Thr	gtg Val	ggc Gly 280	gac Asp	gtg Val	aag Lys	tgc Cys	gac Asp 285	atg Met	gag Glu	gtt Val	864
agc Ser	tgt Cys 290	ccc Pro	gac Asp	ggc Gly	tac Tyr	acc Thr 295	tgc Cys	tgc Cys	aga Arg	ctg Leu	cag Gln 300	agc Ser	ggc Gly	gcc Ala	tgg Trp	912
ggc Gly 305	tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro	ttc Phe	acc Thr 310	caa Gln	gcc Ala	gtg Val	tgc Cys	tgc Cys 315	gag Glu	gac Asp	cac His	atc Ile	cac His 320	960
tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro	gcc Ala	ggc Gly 325	ttc Phe	acc Thr	tgc Cys	gac Asp	acc Thr 330	cag Gln	aag Lys	ggc Gly	acc Thr	tgc Cys 335	gag Glu	1008
cag Gln	ggc Gly	ccc Pro	cac His 340	cag Gln	gtg Val	ccc Pro	tgg Trp	atg Met 345	gag Glu	aag Lys	gcc Ala	ccc Pro	gcc Ala 350	cac His	ctg Leu	1056
agc Ser	ctg Leu	ccc Pro 355	gac Asp	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	ctg Leu 360	aag Lys	aga Arg	gac Asp	gtg Val	ccc Pro 365	tgc Cys	gac Asp	aac Asn	1104
gtt Val	agc Ser 370	agc Ser	tgc Cys	ccc Pro	agc Ser	agc Ser 375	gac Asp	acc Thr	tgc Cys	tgc Cys	cag Gln 380	ctg Leu	acc Thr	agc Ser	ggc Gly	1152
gag Glu 385	tgg Trp	ggc Gly	tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro 390	atc Ile	ccc Pro	gag Glu	gcc Ala	gtg Val 395	tgc Cys	tgc Cys	agc Ser	gac Asp	cac His 400	1200
cag Gln	cac His	tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro 405	caa Gln	ggc Gly	tac Tyr	acc Thr	tgc Cys 410	gtg Val	gcc Ala	gag Glu	ggc Gly	cag Gln 415	tgc Cys	1248
cag Gln	aga Arg	ggc Gly	agc Ser 420	gag Glu	atc Ile	gtg Val	gcc Ala	ggc Gly 425	ctg Leu	gag Glu	aag Lys	atg Met 430	ccc Pro	gcc Ala	aga Arg	1296
aga Arg	gcc Ala	agc Ser 435	ctg Leu	agc Ser	cac His	ccc Pro	aga Arg 440	gac Asp	atc Ile	ggc Gly	tgc Cys	gac Asp 445	cag Gln	cac His	acc Thr	1344
agc Ser	tgc Cys 450	ccc Pro	gtg Val	ggc Gly	cag Gln	acc Thr 455	tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro	agc Ser	ctg Leu 460	ggc Gly	ggc Gly	agc Ser	tgg Trp	1392
gcc Ala 465	tgc Cys	tgc Cys	cag Gln	ctg Leu	ccc Pro 470	cac His	gcc Ala	gtg Val	tgc Cys	tgc Cys 475	gag Glu	gac Asp	aga Arg	cag Gln	cac His 480	1440
tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro	gcc Ala	ggc Gly 485	tac Tyr	acc Thr	tgc Cys	aac Asn	gtg Val 490	aag Lys	gcc Ala	aga Arg	agc Ser	tgc Cys 495	gag Glu	1488

aag Lys	gag Glu	gtg Val	gtg Val	500	agc Ser	gcc Ala	cag Gln	ccc Pro	505	gcc Ala	acc Thr	ttc Phe	ctg Leu	gcc Ala	aga Arg	510	agc Ser	ccc Pro	1536
cac His	gtg Val	ggc Gly	gtg Val	515	aag Lys	gac Asp	gtg Val	gag Glu	520	tgc Cys	ggc Gly	gag Glu	ggc Gly	cac His	525	ttc Phe	tgc Cys	cac His	1584
gac Asp	aac Asn	cag Gln	acc Thr	530	tgc Cys	tgc Cys	aga Arg	gac Asp	535	aac Asn	aga Arg	cag Gln	ggc Gly	540	tgg Trp	gcc Ala	tgc Cys	tgc Cys	1632
ccc Pro	tac Tyr	aga Arg	cag Gln	545	ggc Gly	gtg Val	tgc Cys	tgc Cys	550	gcc Ala	gac Asp	aga Arg	aga Arg	555	cac His	tgc Cys	tgc Cys	ccc Pro	1680
gcc Ala	gga Gly	ttt Phe	agg Arg	565	tgc Cys	gcc Ala	gcc Ala	aga Arg	570	ggc Gly	acc Thr	aag Lys	tgc Cys	ctg Leu	aga Arg	575	aga Arg	gag Glu	1728
gcc Ala	ccc Pro	agg Arg	tgg Trp	580	gac Asp	gcc Ala	ccc Pro	ctg Leu	585	aga Arg	gac Asp	ccc Pro	gcc Ala	ctg Leu	aga Arg	590	cag Gln	ctg Leu	1776
ctg Leu																			1779

<210> 5
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5

Met 1	Trp	Thr	Leu	Val 5	Ser	Trp	Val	Ala	Leu 10	Thr	Ala	Gly	Leu	Val 15	Ala				
Gly	Thr	Arg	Cys 20	Pro	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys 25	Pro	Val	Ala	Cys 30	Cys	Leu				
Asp	Pro	Gly 35	Gly	Ala	Ser	Tyr	Ser 40	Cys	Cys	Arg	Pro	Leu 45	Leu	Asp	Lys				
Trp 50	Pro	Thr	Thr	Leu	Ser	Arg 55	His	Leu	Gly	Gly	Pro 60	Cys	Gln	Val	Asp				
Ala 65	His	Cys	Ser	Ala	Gly 70	His	Ser	Cys	Ile	Phe 75	Thr	Val	Ser	Gly	Thr 80				

Ser	Ser	Cys	Cys	Pro	Phe	Pro	Glu	Ala	Val	Ala	Cys	Gly	Asp	Gly	His	
				85					90					95		
His	Cys	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe	His	Cys	Ser	Ala	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	
			100					105					110			
Phe	Gln	Arg	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Gln	Cys	Pro	Asp	
		115					120					125				
Ser	Gln	Phe	Glu	Cys	Pro	Asp	Phe	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Met	Val	Asp	
	130					135					140					
Gly	Ser	Trp	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Ser	Cys	Cys	Glu	Asp	
145					150					155					160	
Arg	Val	His	Cys	Cys	Pro	His	Gly	Ala	Phe	Cys	Asp	Leu	Val	His	Thr	
				165					170					175		
Arg	Cys	Ile	Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	
			180					185					190			
Ala	Gln	Arg	Thr	Asn	Arg	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Met	Cys	
		195					200					205				
Pro	Asp	Ala	Arg	Ser	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Cys	Cys	Glu	Leu	
	210					215					220					
Pro	Ser	Gly	Lys	Tyr	Gly	Cys	Cys	Pro	Met	Pro	Asn	Ala	Thr	Cys	Cys	
225					230					235					240	
Ser	Asp	His	Leu	His	Cys	Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Leu	Ile	
				245					250					255		
Gln	Ser	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Leu	Leu	Thr	
			260					265					270			
Lys	Leu	Pro	Ala	His	Thr	Val	Gly	Asp	Val	Lys	Cys	Asp	Met	Glu	Val	
		275					280					285				
Ser	Cys	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Cys	Cys	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Trp	
	290					295					300					

Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305 310 315 320

Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
325 330 335

Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
355 360 365

Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380

Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400

Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415

Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445

Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460

Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480

Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495

Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510

His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525

Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
530 535 540

Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560

Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

Leu

<210> 6
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 兔球蛋白polyA

<400> 6
gatcttttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 60
tctggctaataaaggaatttatttttcattgcaatagtgtgttggaattttttgtgtctc 120
tcactcg 127

<210> 7
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3' AAV ITR

<400> 7
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgcccg ggccggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgag 130

<210> 8
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' AAV ITR

<400> 8
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct 130

<210> 9
<211> 382
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類CMV IE啟動子

<400> 9
ctagtcgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc 60
atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac 120
cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa 180
tagggacttt ccattgacgt caatgggttg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag 240
tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc 300
ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct 360
acgtattagt catcgctatt ac 382

<210> 10
<211> 282
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CB啟動子

<400> 10
tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctcccat ctccccccc tccccacccc 60
caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg gggggggggg 120
gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg aggcggagag 180
gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc 240
ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gg 282

<210> 11
<211> 973

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合内含子

<400> 11
gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg 60
cttgtttctt ttctgtggct gcgtaaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc 120
ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc 180
tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc 240
agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag 300
gggaacaaag gctgcgtgcg ggggtgtgtg gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg 360
tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag ttgctgagca cggcccggct 420
tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg ccgtgccggg cggggggtgg 480
cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag 540
gggcgcggcg gccccgggag cgccggcggc tgtcgaggcg cggcgagccg cagccattgc 600
cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt tgtcccaaatt ctgtgcggag 660
ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgggc gcggggcgaa gcggtgcggc 720
gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgcgc ccgtcccctt 780
ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc 840
agggcgggggt tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggtctta gagcctctgc taaccatgtt 900
catgccttct tctttttcct acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat 960
cattttggca aag 973

<210> 12
<211> 1227
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> UbC啟動子

<400> 12
ggcctccgcg ccgggttttg ggcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgtg 60
ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc 120
ggcccgcgtgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg 180

acgggacttg ggtgactota gggcactggt tttctttcca gagagcggaa caggcgagga 240
aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg 300
attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagtccg tcgcagccgg gatttgggtc 360
gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcaacttggtg agtagcgggc tgctgggctg 420
gccggggcctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgttg agagaccgcc 480
aagggtgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg gggggagcgc 540
agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc gggctgtgag 600
gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatgggtg gcggcaagaa cccaaggtct tgaggccttc 660
gctaatacgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct ggggaccctg 720
acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttcggg gcgggcagtt 780
atgcggtgcc gttgggcagt gcaccogtac ctttgggagc gcgcgcctc gtcgtgtcgt 840
gacgtcacc cttctgttgg cttataatgc aggggtggggc cacctgccgg taggtgtgcg 900
gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc tcctgaatcg 960
acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc tttggtcgg 1020
tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc gtcgggggtt 1080
ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat ttgggtcaat 1140
atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggttt 1200
tttgttagac gaagctttat tgcggtg 1227

<210> 13
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 内含子

<400> 13
gtaagtatca aggttacaag acaggtttta ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60
cagagaagac tcttgcggtt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120
tttctctcca cag 133

<210> 14
<211> 232
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SV40晚期polyA

<400> 14
cgagcagaca tgataagata cattgatgag ttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60
aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120
tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag 180
atgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat gtggtaaaat cg 232

<210> 15
<211> 858
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 安比西林抗性基因

<400> 15
atgagtattc aacatttcog tgcgcocctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 60
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 120
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 180
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 240
cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg 300
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 360
tgcagtgctg ccataaccat gaggataaac actgcggcca acttacttct gacaacgatac 420
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 480
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 540
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 600
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 660
tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 720
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct ccgatatcgt agttatctac 780
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 840
tcactgatta agcattgg 858

<210> 16
<211> 589
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> COL E1起源

<400> 16

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc	60
agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt	120
cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt	180
caagaactct gtagcacccg ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc	240
tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa	300
ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac	360
ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg	420
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga	480
gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact	540
tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa	589

<210> 17

<211> 1184

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EF-1a啟動子

<400> 17

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt	60
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg	120
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa	180
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa	240
gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt	300
gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg	360
ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg	420
cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg	480
ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt	540
tctggcaaga tagtcttgta aatgcggggc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg	600
gggccgcggg cggcgacggg gcccgctcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc	660

tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
tgccctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780
caccagttgc gtgagcgga agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
ggaggacgcg gcgctcgga gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900
ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgcgg tccaggcacc 960
tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020
cgatggagtt tccccacact gagggggtg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 18
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> F1 ori

<400> 18
acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 60
ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgtc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 120
cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 180
gtgcttttac gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc 240
catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg 300
gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat 360
aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 420
acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caattt 456

<210> 19
<211> 816
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 康黴素抗性基因

<400> 19
ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgcgac 240
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca 300
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaacccaaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480
ttctttctaata acctggaatg ctgtttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac 540
atcaggagta cggataaaat gottgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
caactctggc gcatcgggct tccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 720
attatcgca gcccatthtat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg 780
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcat 816

<210> 20
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> P5啟動子

<400> 20
gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat gtggtcacgc 60
tggttattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga ggtttgaacg 120
cgcagccgcc a 131

<210> 21
<211> 295
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LacZ啟動子

<400> 21
gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg 60
ottggcgtaa tcatggatcat agctgtttcc tgtgtgaaat tggtatccgc tcacaattcc 120
acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gaggagcta 180

actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca 240
gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgc 295

<210> 22
<211> 3852
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EF1a. huPGRN. SV40

<220>
<221> 重複區域
<222> (1)..(130)

<400> 22
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120
aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
aggaagatcc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctaggctttt 240
gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaata 300
gaccttctag gtcttgaaag gaggccctcg tgaggctccg gtgcccgtca gtgggcagag 360
cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc 420
tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgcottttt 480
cccgagggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc 540
aacgggtttg ccgccagaac acaggtaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcctggcctc 600
tttacgggtt atggcccttg cgtgccttga attacttcca cctggctgca gtacgtgatt 660
cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 720
gccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga 780
atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 840
ttttgatgac ctgctgcgac gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa 900
gatctgcaca ctggtatttc ggttttttggg gccgcgggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc 960
cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg 1020
tagtotcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgccgcogtg tatcgccccg 1080
ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaag atggccgctt 1140

cccggccctg	ctgcagggag	ctcaaaatgg	aggacgcggc	gctcgggaga	gcgggcgggt	1200
gagtcaccca	cacaaaggaa	aagggccttt	ccgtccctcag	ccgtcgcttc	atgtgactcc	1260
acggagtacc	gggcgccgtc	caggcacctc	gattagttct	cgagcttttg	gagtacgtcg	1320
tctttaggtt	ggggggaggg	gttttatgcg	atggagtttc	cccacactga	gtgggtggag	1380
actgaagtta	ggccagcttg	gcacttgatg	taattctcct	tggaatttgc	cctttttgag	1440
tttggatctt	ggttcattct	caagccctcag	acagtggttc	aaagtttttt	tcttccattt	1500
caggtgtcgt	gaggaattag	cttggtacta	atacgactca	ctatagggag	acccaagctg	1560
gctaggtaag	cttggtaccg	agctcggatc	aattcgccac	catgtggacc	ctggtgtctt	1620
gggttgcact	gacagctgga	ctggtggccg	gcacaagatg	tcctgaoggc	cagttttgcc	1680
ccgtggcctg	ctgtcttgat	cctggcggag	ccagctacag	ctgctgcaga	cctctgctgg	1740
ataagtggcc	caccacactg	agcagacacc	tcggaggacc	ttgtcagggtg	gacgcccact	1800
gttctgccgg	acacagctgc	atctttaccg	tgtctggcac	ctccagctgc	tgtccatttc	1860
ctgaggctgt	ggcctgcgga	gacggccacc	actgttgtcc	tagaggcttc	cactgtagcg	1920
ccgacggcag	aagctgcttt	cagagaagcg	gcaacaatag	cgtgggcgcc	atccagtgtc	1980
ctgacagcca	gttcgagtgc	cccgacttca	gcacctgttg	cgtgatgggtg	gacggcagct	2040
ggggctgttg	tccaatgcct	caggctagct	gctgcgagga	cagagtgcac	tgttgccctc	2100
acggcgcctt	ttgcgatctg	gtgcacaccc	ggtgcatcac	cccaacaggc	acacatcctc	2160
tggccaagaa	gctgcctgct	cagcggacca	atagagccgt	ggctctgagc	agcagcgtga	2220
tgtgccctga	cgccagatcc	aggtgtccag	acggctccac	atgttgcgaa	ctgcccagcg	2280
gcaaatacgg	ctgctgcccc	atgcctaacg	ccacatgctg	tagcgaccat	cttcaactgct	2340
gccacaaga	caccgtgtgc	gacctgatcc	agagcaagtg	cctgagcaaa	gagaacgcca	2400
ccaccgacct	gctgaccaaa	ctgccagctc	acaccgtggg	agatgtgaag	tgcgacatgg	2460
aagtgtcttg	ccccgacggc	tatacctgct	gtagactgca	atctggcgcc	tggggctgct	2520
gcccttttac	acaagctgtg	tgttgcgagg	accacatcca	ttgctgccct	gccggcttca	2580
cctgtgacac	acagaaaggc	acctgcgagc	agggccctca	tcaggtgcca	tggatggaaa	2640
aagcccctgc	tcacctgagc	ctgcctgatc	ctcaagctct	gaagaggggac	gtgccctgcg	2700
acaatgtgtc	tagctgccct	agcagcgaca	cctgctgcca	gctgacatct	ggcgagtggg	2760
gctgctgtcc	tataccagag	gccgtgtgtt	gttccgacca	ccagcattgc	tgtccccaag	2820

gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg	2880
aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc	2940
acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tgggtggatcc tgggcttgct	3000
gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca	3060
cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggg gtctgcccag cctgccacct	3120
tcctggctag aagtccctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct	3180
gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata	3240
gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg	3300
ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc	3360
ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggccctcagg	3420
ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg	3480
cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt	3540
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag	3600
ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat	3660
aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta	3720
caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga	3780
ggccgggcga ccaaaggctg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga	3840
gcgagcgcgc ag	3852

<210> 23
<211> 3972
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Ubc. PI. huPGRN. SV40

<400> 23	
ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctacgta gccatgctct	180
aggaagatct ggccctccgcg ccgggttttg ggcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg	240
gcgagcgctg ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggaagc	300
tcaggacagc ggcccgtgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg	360

acatttttagg	acgggacttg	ggtgactcta	gggcactggt	tttctttcca	gagagcggaa	420
caggcgagga	aaagtagtcc	cttctcggcg	attctgcgga	gggatctccg	tggggcggtg	480
aacgccgatg	attatataag	gacgcgccgg	gtgtggcaca	gctagttccg	tcgcagccgg	540
gatttgggtc	gcggttcttg	tttgtggatc	gctgtgatcg	tcacttggtg	agtagcgggc	600
tgctgggctg	gccggggcctt	tcgtggccgc	cgggccgctc	ggtgggacgg	aagcgtgtgg	660
agagaccgcc	aagggctgta	gtctgggtcc	gcgagcaagg	ttgccctgaa	ctgggggttg	720
gggggagcgc	agcaaaatgg	cggctgttcc	cgagtcttga	atggaagacg	cttgtgaggc	780
gggctgtgag	gtcgttgaaa	caaggtgggg	ggcatggtgg	gcggcaagaa	cccaaggtct	840
tgaggccttc	gctaatacgg	gaaagctctt	attcgggtga	gatgggctgg	ggcaccatct	900
ggggaccctg	acgtgaagtt	tgtcactgac	tggagaactc	ggtttgtcgt	ctgttgccgg	960
ggcggcagtt	atgcggtgcc	gttgggcagt	gcacccgta	ccttgggagc	gcgcgccctc	1020
gtcgtgtcgt	gacgtcacc	gttctgttgg	cttataatgc	agggtggggc	cacctgccgg	1080
taggtgtgcg	gtaggctttt	ctccgtcgca	ggacgcaggg	ttcgggccta	gggtaggctc	1140
tcctgaatcg	acaggcgccg	gacctctggt	gaggggaggg	ataagtgagg	cgtcagtttc	1200
tttggtcgg	tttatgtacc	tatcttctta	agtagctgaa	gctccggttt	tgaactatgc	1260
gctcgggggtt	ggcgagtgtg	ttttgtgaag	tttttttaggc	accttttgaa	atgtaatcat	1320
ttgggtcaat	atgtaatttt	cagtgttaga	ctagtaaatt	gtccgctaaa	ttctggccgt	1380
ttttggcttt	tttgttagac	gaagctttat	tgcggtagtt	tatcacagtt	aaattgctaa	1440
cgcagtcagt	gcttctgaca	caacagtctc	gaacttaagc	tgcagaagtt	ggtcgtgagg	1500
cactgggcag	gtaagtatca	aggttacaag	acaggtttaa	ggagaccaat	agaaactggg	1560
cttgctgaga	cagagaagac	tcttgcgttt	ctgataggca	cctattggtc	ttactgacat	1620
ccactttgcc	tttctctcca	caggtgtcca	ctcccagttc	aattacagct	cttaaggcta	1680
gagtacttaa	tacgactcac	tataggctag	aattcgccac	catgtggacc	ctggtgtctt	1740
gggttgcact	gacagctgga	ctggtggccg	gcacaagatg	tcctgacggc	cagttttgcc	1800
ccgtggcctg	ctgtcttgat	cctggcggag	ccagctacag	ctgctgcaga	cctctgctgg	1860
ataagtggcc	caccacactg	agcagacacc	tcggaggacc	ttgtcaggtg	gacgccact	1920
gttctgccgg	acacagctgc	atctttaccg	tgtctggcac	ctccagctgc	tgtccatttc	1980
ctgaggctgt	ggcctgcgga	gacggccacc	actgttgtcc	tagaggcttc	cactgtagcg	2040

ccgacggcag aagctgcttt cagagaagcg gcaacaatag cgtggggcgcc atccagtgtc	2100
ctgacagcca gttcgagtgc cccgacttca gcacctgttg cgtgatgggtg gacggcagct	2160
ggggctgttg tccaatgcct caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc	2220
acggcgcctt ttgcgatctg gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc	2280
tggccaagaa gctgcctgct cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga	2340
tgtgccctga cgccagatcc aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg	2400
gcaaatacgg ctgctgcccc atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct	2460
gccacaaga caccgtgtgc gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca	2520
ccaccgacct gctgaccaaa ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg	2580
aagtgtcttg ccccgacggc tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct	2640
gcccttttac acaagctgtg tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca	2700
cctgtgacac acagaaaggc acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa	2760
aagcccctgc tcacctgagc ctgcctgato ctcaagctct gaagaggggac gtgccctgcg	2820
acaatgtgtc tagctgccct agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg	2880
gctgctgtcc tataccagag gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag	2940
gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg	3000
aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc	3060
acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tgggtggatcc tgggcttgct	3120
gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca	3180
cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggg gtctgcccag cctgccacct	3240
tcctggctag aagtcctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct	3300
gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata	3360
gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg	3420
ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc	3480
ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgaccggggc ggcctcgagg	3540
ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg	3600
cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt	3660
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag	3720
ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat	3780

aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta 3840
caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga 3900
ggccggggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga 3960
gcgagcgcgc ag 3972

<210> 24
<211> 4131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CB7. CI. hPGRN1. rBG

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1).. (130)
<223> 5' ITR

<220>
<221> misc_特徵
<222> (198).. (579)
<223> CMV IE增強子

<220>
<221> misc_特徵
<222> (582).. (863)
<223> 雞β-肌動蛋白啟動子

<220>
<221> misc_特徵
<222> (958).. (1930)
<223> 嵌合內含子

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1942).. (3726)
<223> hPGRN

<220>
<221> misc_特徵
<222> (3787).. (3913)
<223> 兔β球蛋白poly A

<220>
<221> misc_特徵
<222> (4002).. (4131)
<223> 3' ITR

<400> 24
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
aggggttcct tgtagttaat gattaaccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	240
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta	420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtcgagg tgagccccac	600
gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat	660
tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgcagggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttctttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggccctataa	840
aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgt gccttcgccc cgtgccccgc	900
tccgccgccg cctcgcgccg ccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg	960
agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt	1020
gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg	1080
gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc	1140
gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt	1200
gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg	1260
aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg	1320
gtcgggctgc aacccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg ccgggcttcg	1380
ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctgcgcg tgccgggcgg ggggtggcgg	1440
caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggcgg gggagggctc gggggagggg	1500
cgcggcggcc ccgggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt	1560
ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg	1620
aatctggga ggcgccgcg cccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc	1680
ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgcg tccccttctc	1740
cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acggggcagg	1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat	1860
gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat	1920
tttggcaaag aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt gggttgcact gacagctgga	1980
ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc ccgtggcctg ctgtcttgat	2040
cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg ataagtggcc caccacactg	2100
agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact gttctgocgg acacagctgc	2160
atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc ctgaggctgt ggctgcgga	2220
gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg ccgacggcag aagctgcttt	2280
cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc ctgacagcca gttcgagtgc	2340
cccgacttca gcacctgttg cgtgatggcg gacggcagct ggggctgttg tccaatgcct	2400
caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc acggcgccctt ttgcgatctg	2460
gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc tggccaagaa gctgcctgct	2520
cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga tgtgccctga cgccagatcc	2580
aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg gcaaatacgg ctgctgcccc	2640
atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct gccacaaga caccgtgtgc	2700
gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca ccaccgacct gctgaccaa	2760
ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg aagtgtcttg ccccgacggc	2820
tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct gcccttttac acaagctgtg	2880
tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca cctgtgacac acagaaaggc	2940
acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa aagcccctgc tcacctgagc	3000
ctgcctgata ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg acaatgtgtc tagctgccct	3060
agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg gctgctgtcc tataccagag	3120
gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag gctacacctg tgtggccgaa	3180
ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg aaaagatgcc cgccagaagg	3240
gcttctctgt ctacccccg ggacatcggc tgcgaccagc acacatcttg tcctgtgggc	3300
cagacctgtt gtccctctct tggatggatcc tgggcttgct gtcagctgcc tcacgccgtg	3360
tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca cctgtaacgt gaaggccaga	3420
tcctgcgaga aagaagtggg gtctgcccag cctgccacct tcctggctag aagtccctac	3480

gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct gccacgacaa tcagacatgc 3540
tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata gacagggcgt gtgctgtgcc 3600
gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg ccaggggcac aaagtgtctg 3660
agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc ctgctctgag acagctgctc 3720
tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggccctcgagg acggggtgaa ctacgcctga 3780
ggatccgata tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 3840
ctgacttctg gctaataaag gaaattttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaattttttg 3900
tgtctctcac tcggaagcaa ttcgttgatc tgaatttcga ccaccataa taccoattac 3960
cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 4020
gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggctgc 4080
ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca g 4131

<210> 25
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV1 VP1基因

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2208)

<400> 25
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc tct 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

gag ggc att cgc gag tgg tgg gac ttg aaa cct gga gcc ccg aag ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

aaa gcc aac cag caa aag cag gac gac ggc cgg ggt ctg gtg ctt cct 144
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

ggc tac aag tac ctc gga ccc ttc aac gga ctc gac aag ggg gag ccc 192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

gtc aac gcg gcg gac gca gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

cag Gln	cag Gln	ctc Leu	aaa Lys	gcg Ala 85	ggt Gly	gac Asp	aat Asn	ccg Pro	tac Tyr 90	ctg Leu	cgg Arg	tat Tyr	aac Asn	cac His 95	gcc Ala	288
gac Asp	gcc Ala	gag Glu	ttt Phe 100	cag Gln	gag Glu	cgt Arg	ctg Leu	caa Gln 105	gaa Glu	gat Asp	acg Thr	tct Ser	ttt Phe 110	ggg Gly	ggc Gly	336
aac Asn	ctc Leu	ggg Gly 115	cga Arg	gca Ala	gtc Val	ttc Phe	cag Gln 120	gcc Ala	aag Lys	aag Lys	cgg Arg	gtt Val 125	ctc Leu	gaa Glu	cct Pro	384
ctc Leu	ggt Gly 130	ctg Leu	gtt Val	gag Glu	gaa Glu	ggc Gly 135	gct Ala	aag Lys	acg Thr	gct Ala	cct Pro 140	gga Gly	aag Lys	aaa Lys	cgt Arg	432
ccg Pro 145	gta Val	gag Glu	cag Gln	tcg Ser	cca Pro 150	caa Gln	gag Glu	cca Pro	gac Asp	tcc Ser 155	tcc Ser	tcg Ser	ggc Gly	atc Ile	ggc Gly 160	480
aag Lys	aca Thr	ggc Gly	cag Gln	cag Gln 165	ccc Pro	gct Ala	aaa Lys	aag Lys	aga Arg 170	ctc Leu	aat Asn	ttt Phe	ggt Gly	cag Gln 175	act Thr	528
ggc Gly	gac Asp	tca Ser	gag Glu 180	tca Ser	gtc Val	ccc Pro	gat Asp	cca Pro 185	caa Gln	cct Pro	ctc Leu	gga Gly	gaa Glu 190	cct Pro	cca Pro	576
gca Ala	acc Thr	ccc Pro 195	gct Ala	gct Ala	gtg Val	gga Gly	cct Pro 200	act Thr	aca Thr	atg Met	gct Ala	tca Ser 205	ggc Gly	ggt Gly	ggc Gly	624
gca Ala 210	cca Pro	atg Met	gca Ala	gac Asp	aat Asn	aac Asn 215	gaa Glu	ggc Gly	gcc Ala	gac Asp	gga Gly 220	gtg Val	ggt Gly	aat Asn	gcc Ala	672
tca Ser 225	gga Gly	aat Asn	tgg Trp	cat His	tgc Cys 230	gat Asp	tcc Ser	aca Thr	tgg Trp	ctg Leu 235	ggc Gly	gac Asp	aga Arg	gtc Val	atc Ile 240	720
acc Thr	acc Thr	agc Ser	acc Thr	cgc Arg 245	acc Thr	tgg Trp	gcc Ala	ttg Leu	ccc Pro 250	acc Thr	tac Tyr	aat Asn	aac Asn	cac His 255	ctc Leu	768
tac Tyr	aag Lys	caa Gln	atc Ile 260	tcc Ser	agt Ser	gct Ala	tca Ser	acg Thr 265	ggg Gly	gcc Ala	agc Ser	aac Asn	gac Asp 270	aac Asn	cac His	816
tac Tyr	ttc Phe	ggc Gly 275	tac Tyr	agc Ser	acc Thr	ccc Pro	tgg Trp 280	ggg Gly	tat Tyr	ttt Phe	gat Asp	ttc Phe 285	aac Asn	aga Arg	ttc Phe	864
cac His 290	tgc Cys	cac His	ttt Phe	tca Ser	cca Pro	cgt Arg 295	gac Asp	tgg Trp	cag Gln	cga Arg	ctc Leu 300	atc Ile	aac Asn	aac Asn	aat Asn	912
tgg	gga	ttc	cgg	ccc	aag	aga	ctc	aac	ttc	aaa	ctc	ttc	aac	atc	caa	960

Trp 305	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys 310	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys 315	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln 320	
gtc Val	aag Lys	gag Glu	gtc Val	acg Thr 325	acg Thr	aat Asn	gat Asp	ggc Gly	gtc Val 330	aca Thr	acc Thr	atc Ile	gct Ala	aat Asn 335	aac Asn	1008
ctt Leu	acc Thr	agc Ser	acg Thr 340	gtt Val	caa Gln	gtc Val	ttc Phe	tgc Ser 345	gac Asp	tgc Ser	gag Glu	tac Tyr	cag Gln 350	ctt Leu	ccg Pro	1056
tac Tyr	gtc Val	ctc Leu 355	ggc Gly	tct Ser	gcg Ala	cac His	cag Gln 360	ggc Gly	tgc Cys	ctc Leu	cct Pro	ccg Pro 365	ttc Phe	ccg Pro	gcg Ala	1104
gac Asp 370	gtg Val	ttc Phe	atg Met	att Ile	ccg Pro	caa Gln 375	tac Tyr	ggc Gly	tac Tyr	ctg Leu	acg Thr 380	ctc Leu	aac Asn	aat Asn	ggc Gly	1152
agc Ser 385	caa Gln	gcc Ala	gtg Val	gga Gly	cgt Arg 390	tca Ser	tcc Ser	ttt Phe	tac Tyr	tgc Cys 395	ctg Leu	gaa Glu	tat Tyr	ttc Phe	cct Pro 400	1200
tct Ser	cag Gln	atg Met	ctg Leu	aga Arg 405	acg Thr	ggc Gly	aac Asn	aac Asn	ttt Phe 410	acc Thr	ttc Phe	agc Ser	tac Tyr	acc Thr 415	ttt Phe	1248
gag Glu	gaa Glu	gtg Val	cct Pro 420	ttc Phe	cac His	agc Ser	agc Ser	tac Tyr 425	gcg Ala	cac His	agc Ser	cag Gln	agc Ser 430	ctg Leu	gac Asp	1296
cgg Arg	ctg Leu	atg Met 435	aat Asn	cct Pro	ctc Leu	atc Ile	gac Asp 440	caa Gln	tac Tyr	ctg Leu	tat Tyr	tac Tyr 445	ctg Leu	aac Asn	aga Arg	1344
act Thr 450	caa Gln	aat Asn	cag Gln	tcc Ser	gga Gly	agt Ser 455	gcc Ala	caa Gln	aac Asn	aag Lys	gac Asp 460	ttg Leu	ctg Leu	ttt Phe	agc Ser	1392
cgt Arg 465	ggg Gly	tct Ser	cca Pro	gct Ala	ggc Gly 470	atg Met	tct Ser	gtt Val	cag Gln	ccc Pro 475	aaa Lys	aac Asn	tgg Trp	cta Leu	cct Pro 480	1440
gga Gly	ccc Pro	tgt Cys	tat Tyr	cgg Arg 485	cag Gln	cag Gln	cgc Arg	gtt Val	tct Ser 490	aaa Lys	aca Thr	aaa Lys	aca Thr	gac Asp 495	aac Asn	1488
aac Asn	aac Asn	agc Ser	aat Asn 500	ttt Phe	acc Thr	tgg Trp	act Thr	ggt Gly 505	gct Ala	tca Ser	aaa Lys	tat Tyr	aac Asn 510	ctc Leu	aat Asn	1536
ggg Gly	cgt Arg	gaa Glu 515	tcc Ser	atc Ile	atc Ile	aac Asn	cct Pro 520	ggc Gly	act Thr	gct Ala	atg Met	gcc Ala 525	tca Ser	cac His	aaa Lys	1584
gac Asp	gac Asp	gaa Glu	gac Asp	aag Lys	ttc Phe	ttt Phe	ccc Pro	atg Met	agc Ser	ggt Gly	gtc Val	atg Met	att Ile	ttt Phe	gga Gly	1632

530	535	540	
aaa gag agc gcc gga gct tca aac act gca ttg gac aat gtc atg att Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile 545 550 555 560			1680
aca gac gaa gag gaa att aaa gcc act aac cct gtg gcc acc gaa aga Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg 565 570 575			1728
ttt ggg acc gtg gca gtc aat ttc cag agc agc agc aca gac cct gcg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala 580 585 590			1776
acc gga gat gtg cat gct atg gga gca tta cct ggc atg gtg tgg caa Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln 595 600 605			1824
gat aga gac gtg tac ctg cag ggt ccc att tgg gcc aaa att cct cac Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His 610 615 620			1872
aca gat gga cac ttt cac ccg tct cct ctt atg ggc ggc ttt gga ctc Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu 625 630 635 640			1920
aag aac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac acg cct gtt cct gcg Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala 645 650 655			1968
aat cct ccg gcg gag ttt tca gct aca aag ttt gct tca ttc atc acc Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr 660 665 670			2016
caa tac tcc aca gga caa gtg agt gtg gaa att gaa tgg gag ctg cag Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln 675 680 685			2064
aaa gaa aac agc aag cgc tgg aat ccc gaa gtg cag tac aca tcc aat Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn 690 695 700			2112
tat gca aaa tct gcc aac gtt gat ttt act gtg gac aac aat gga ctt Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu 705 710 715 720			2160
tat act gag cct cgc ccc att ggc acc cgt tac ctt acc cgt ccc ctg Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu 725 730 735			2208

<210> 26
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<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 Asp 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 Lys 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 Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160

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

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

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

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala

210					215					220					
Ser 225	Gly	Asn	Trp	His	Cys 230	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu 235	Gly	Asp	Arg	Val	Ile 240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg 245	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro 250	Thr	Tyr	Asn	Asn	His 255	Leu
Tyr	Lys	Gln	Ile 260	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 265	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp 270	Asn	His
Tyr	Phe	Gly 275	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp 280	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe 285	Asn	Arg	Phe
His	Cys 290	His	Phe	Ser	Pro	Arg 295	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu 300	Ile	Asn	Asn	Asn
Trp 305	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys 310	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys 315	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln 320
Val	Lys	Glu	Val	Thr 325	Thr	Asn	Asp	Gly	Val 330	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn 335	Asn
Leu	Thr	Ser	Thr 340	Val	Gln	Val	Phe	Ser 345	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln 350	Leu	Pro
Tyr	Val	Leu 355	Gly	Ser	Ala	His	Gln 360	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro 365	Phe	Pro	Ala
Asp 370	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln 375	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr 380	Leu	Asn	Asn	Gly
Ser 385	Gln	Ala	Val	Gly	Arg 390	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys 395	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro 400
Ser	Gln	Met	Leu	Arg 405	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe 410	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr 415	Phe
Glu	Glu	Val	Pro 420	Phe	His	Ser	Ser	Tyr 425	Ala	His	Ser	Gln	Ser 430	Leu	Asp
Arg	Leu	Met 435	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp 440	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr 445	Leu	Asn	Arg

Thr	Gln	Asn	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Ser
450						455					460				
Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro
465					470					475					480
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Asn
				485					490					495	
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asn
			500					505					510		
Gly	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys
		515					520					525			
Asp	Asp	Glu	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Met	Ile	Phe	Gly
	530					535					540				
Lys	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile
545					550					555					560
Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg
				565					570					575	
Phe	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Asn	Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Asp	Pro	Ala
			580					585					590		
Thr	Gly	Asp	Val	His	Ala	Met	Gly	Ala	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	His	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Leu
625					630					635					640
Lys	Asn	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala
				645					650					655	
Asn	Pro	Pro	Ala	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ala	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 Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

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

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

<210> 27
<211> 1863
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV2 rep

<400> 27
atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60
ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120
tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga gaagctgcag 180
cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggctct tttctttgtg 240
caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccgggggtg 300
aatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360
taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420
gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctcccaaaa 480
accagcctg agctccagtg ggcgtaggact aatatggaac agtattttaag cgctgtttg 540
aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600
gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggatgatcag atcaaaaact 660
tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtaggaca aggggattac ctcgagagaag 720
cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780
tcccaaatac aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840
cccgactacc tggtagggcca gcagcccggtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900
attttgaac taaacgggta cgatccccaa tatgoggctt ccgtctttct gggatgggcc 960

acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggccctgcaac taccgggaag 1020
accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080
aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctgggtg ggaggagggg 1140
aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200
gtggaccaga aatgcaagtc ctcggccag atagaccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260
aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320
ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc accgcgcgtc tggatcatga ctttggaag 1380
gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cgggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440
gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gaccgcgcc cagtgcgca 1500
gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560
gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620
aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc 1680
ttcactcacg gacagaaaga ctgttttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaaccggtt 1740
tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaaggtg 1800
ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860
caa 1863

<210> 28
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV5衣殼VP1基因

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2172)

<400> 28
atg tct ttt gtt gat cac cct cca gat tgg ttg gaa gaa gtt ggt gaa 48
Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

ggt ctt cgc gag ttt ttg ggc ctt gaa gcg ggc cca ccg aaa cca aaa 96
Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

ccc aat cag cag cat caa gat caa gcc cgt ggt ctt gtg ctg cct ggt 144

Pro	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Gln	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	Gly	
		35					40					45				
tat	aac	tat	ctc	gga	ccc	gga	aac	ggt	ctc	gat	cga	gga	gag	cct	gtc	192
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	
	50					55					60					
aac	agg	gca	gac	gag	gtc	gcg	cga	gag	cac	gac	atc	tcg	tac	aac	gag	240
Asn	Arg	Ala	Asp	Glu	Val	Ala	Arg	Glu	His	Asp	Ile	Ser	Tyr	Asn	Glu	
65					70					75					80	
cag	ctt	gag	gcg	gga	gac	aac	ccc	tac	ctc	aag	tac	aac	cac	gcg	gac	288
Gln	Leu	Glu	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala	Asp	
				85					90					95		
gcc	gag	ttt	cag	gag	aag	ctc	gcc	gac	gac	aca	tcc	ttc	ggg	gga	aac	336
Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Lys	Leu	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn	
			100					105					110			
ctc	gga	aag	gca	gtc	ttt	cag	gcc	aag	aaa	agg	gtt	ctc	gaa	cct	ttt	384
Leu	Gly	Lys	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	Phe	
		115					120					125				
ggc	ctg	gtt	gaa	gag	ggt	gct	aag	acg	gcc	cct	acc	gga	aag	cgg	ata	432
Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Lys	Arg	Ile	
	130					135					140					
gac	gac	cac	ttt	cca	aaa	aga	aag	aag	gcc	cgg	acc	gaa	gag	gac	tcc	480
Asp	Asp	His	Phe	Pro	Lys	Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Thr	Glu	Glu	Asp	Ser	
145					150					155					160	
aag	cct	tcc	acc	tcg	tca	gac	gcc	gaa	gct	gga	ccc	agc	gga	tcc	cag	528
Lys	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Asp	Ala	Glu	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Gln	
				165					170					175		
cag	ctg	caa	atc	cca	gcc	caa	cca	gcc	tca	agt	ttg	gga	gct	gat	aca	576
Gln	Leu	Gln	Ile	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Thr	
			180					185					190			
atg	tct	gcg	gga	ggt	ggc	ggc	cca	ttg	ggc	gac	aat	aac	caa	ggt	gcc	624
Met	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Leu	Gly	Asp	Asn	Asn	Gln	Gly	Ala	
		195					200					205				
gat	gga	gtg	ggc	aat	gcc	tcg	gga	gat	tgg	cat	tgc	gat	tcc	acg	tgg	672
Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Asp	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	
	210					215					220					
atg	ggg	gac	aga	gtc	gtc	acc	aag	tcc	acc	cga	acc	tgg	gtg	ctg	ccc	720
Met	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Thr	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Val	Leu	Pro	
225					230					235					240	
agc	tac	aac	aac	cac	cag	tac	cga	gag	atc	aaa	agc	ggc	tcc	gtc	gac	768
Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Ser	Val	Asp	
				245					250					255		
gga	agc	aac	gcc	aac	gcc	tac	ttt	gga	tac	agc	acc	ccc	tgg	ggg	tac	816
Gly	Ser	Asn	Ala	Asn	Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	

	260					265					270						
	ttt	gac	ttt	aac	cgc	ttc	cac	agc	cac	tgg	agc	ccc	cga	gac	tgg	caa	864
	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	Ser	His	Trp	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	
			275					280					285				
	aga	ctc	atc	aac	aac	tac	tgg	ggc	ttc	aga	ccc	cgg	tcc	ctc	aga	gtc	912
	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	
		290					295					300					
	aaa	atc	ttc	aac	att	caa	gtc	aaa	gag	gtc	acg	gtg	cag	gac	tcc	acc	960
	Lys	Ile	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Val	Gln	Asp	Ser	Thr	
	305					310					315					320	
	acc	acc	atc	gcc	aac	aac	ctc	acc	tcc	acc	gtc	caa	gtg	ttt	acg	gac	1008
	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	
					325				330						335		
	gac	gac	tac	cag	ctg	ccc	tac	gtc	gtc	ggc	aac	ggg	acc	gag	gga	tgc	1056
	Asp	Asp	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Gly	Thr	Glu	Gly	Cys	
				340				345						350			
	ctg	ccg	gcc	ttc	cct	ccg	cag	gtc	ttt	acg	ctg	ccg	cag	tac	ggt	tac	1104
	Leu	Pro	Ala	Phe	Pro	Pro	Gln	Val	Phe	Thr	Leu	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	
			355					360					365				
	gcg	acg	ctg	aac	cgc	gac	aac	aca	gaa	aat	ccc	acc	gag	agg	agc	agc	1152
	Ala	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	
		370					375					380					
	ttc	ttc	tgc	cta	gag	tac	ttt	ccc	agc	aag	atg	ctg	aga	acg	ggc	aac	1200
	Phe	Phe	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	Lys	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	
	385					390					395					400	
	aac	ttt	gag	ttt	acc	tac	aac	ttt	gag	gag	gtg	ccc	ttc	cac	tcc	agc	1248
	Asn	Phe	Glu	Phe	Thr	Tyr	Asn	Phe	Glu	Glu	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	
					405				410						415		
	ttc	gct	ccc	agt	cag	aac	ctc	ttc	aag	ctg	gcc	aac	ccg	ctg	gtg	gac	1296
	Phe	Ala	Pro	Ser	Gln	Asn	Leu	Phe	Lys	Leu	Ala	Asn	Pro	Leu	Val	Asp	
				420					425					430			
	cag	tac	ttg	tac	cgc	ttc	gtg	agc	aca	aat	aac	act	ggc	gga	gtc	cag	1344
	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Phe	Val	Ser	Thr	Asn	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Gln	
			435					440					445				
	ttc	aac	aag	aac	ctg	gcc	ggg	aga	tac	gcc	aac	acc	tac	aaa	aac	tgg	1392
	Phe	Asn	Lys	Asn	Leu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ala	Asn	Thr	Tyr	Lys	Asn	Trp	
		450					455					460					
	ttc	ccg	ggg	ccc	atg	ggc	cga	acc	cag	ggc	tgg	aac	ctg	ggc	tcc	ggg	1440
	Phe	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Arg	Thr	Gln	Gly	Trp	Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	
	465					470					475					480	
	gtc	aac	cgc	gcc	agt	gtc	agc	gcc	ttc	gcc	acg	acc	aat	agg	atg	gag	1488
	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	Ala	Phe	Ala	Thr	Thr	Asn	Arg	Met	Glu	
					485					490					495		

ctc Leu	gag Glu	ggc Gly	gcg Ala 500	agt Ser	tac Tyr	cag Gln	gtg Val	ccc Pro 505	ccg Pro	cag Gln	ccg Pro	aac Asn	ggc Gly 510	atg Met	acc Thr	1536
aac Asn	aac Asn	ctc Leu 515	cag Gln	ggc Gly	agc Ser	aac Asn	acc Thr 520	tat Tyr	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu	aac Asn 525	act Thr	atg Met	atc Ile	1584
ttc Phe	aac Asn 530	agc Ser	cag Gln	ccg Pro	gcg Ala	aac Asn 535	ccg Pro	ggc Gly	acc Thr	acc Thr	gcc Ala 540	acg Thr	tac Tyr	ctc Leu	gag Glu	1632
ggc Gly 545	aac Asn	atg Met	ctc Leu	atc Ile	acc Thr 550	agc Ser	gag Glu	agc Ser	gag Glu	acg Thr 555	cag Gln	ccg Pro	gtg Val	aac Asn	cgc Arg 560	1680
gtg Val	gcg Ala	tac Tyr	aac Asn	gtc Val 565	ggc Gly	ggg Gly	cag Gln	atg Met	gcc Ala 570	acc Thr	aac Asn	aac Asn	cag Gln	agc Ser 575	tcc Ser	1728
acc Thr	act Thr	gcc Ala	ccc Pro 580	gcg Ala	acc Thr	ggc Gly	acg Thr	tac Tyr 585	aac Asn	ctc Leu	cag Gln	gaa Glu	atc Ile 590	gtg Val	ccc Pro	1776
ggc Gly	agc Ser	gtg Val 595	tgg Trp	atg Met	gag Glu	agg Arg	gac Asp 600	gtg Val	tac Tyr	ctc Leu	caa Gln	gga Gly 605	ccc Pro	atc Ile	tgg Trp	1824
gcc Ala 610	aag Lys	atc Ile	cca Pro	gag Glu	acg Thr	ggg Gly 615	gcg Ala	cac His	ttt Phe	cac His	ccc Pro 620	tct Ser	ccg Pro	gcc Ala	atg Met	1872
ggc Gly 625	gga Gly	ttc Phe	gga Gly	ctc Leu	aaa Lys 630	cac His	cca Pro	ccg Pro	ccc Pro	atg Met 635	atg Met	ctc Leu	atc Ile	aag Lys	aac Asn 640	1920
acg Thr	cct Pro	gtg Val	ccc Pro	gga Gly 645	aat Asn	atc Ile	acc Thr	agc Ser	ttc Phe 650	tcg Ser	gac Asp	gtg Val	ccc Pro	gtc Val 655	agc Ser	1968
agc Ser	ttc Phe	atc Ile	acc Thr 660	cag Gln	tac Tyr	agc Ser	acc Thr	ggg Gly 665	cag Gln	gtc Val	acc Thr	gtg Val	gag Glu 670	atg Met	gag Glu	2016
tgg Trp	gag Glu	ctc Leu 675	aag Lys	aag Lys	gaa Glu	aac Asn	tcc Ser 680	aag Lys	agg Arg	tgg Trp	aac Asn	cca Pro 685	gag Glu	atc Ile	cag Gln	2064
tac Tyr 690	aca Thr	aac Asn	aac Asn	tac Tyr	aac Asn	gac Asp 695	ccc Pro	cag Gln	ttt Phe	gtg Val	gac Asp 700	ttt Phe	gcc Ala	ccg Pro	gac Asp	2112
agc Ser 705	acc Thr	ggg Gly	gaa Glu	tac Tyr	aga Arg 710	acc Thr	acc Thr	aga Arg	cct Pro	atc Ile 715	gga Gly	acc Thr	cga Arg	tac Tyr	ctt Leu 720	2160

acc cga ccc ctt
Thr Arg Pro Leu

2172

<210> 29
<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
165 170 175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
420 425 430

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465 470 475 480

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
485 490 495

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
500 505 510

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
515 520 525

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
530 535 540

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545 550 555 560

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
565 570 575

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

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 30
<211> 2211
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAVhu68 VP1衣殼

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (2211)

<400> 30
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg 144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg 192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

gtc Val 65	aac Asn	gaa Glu	gca Ala	gac Asp	gcg Ala 70	gcg Ala	gcc Ala	ctc Leu	gag Glu	cac His 75	gac Asp	aag Lys	gcc Ala	tac Tyr	gac Asp 80	240
cag Gln	cag Gln	ctc Leu	aag Lys	gcc Ala 85	gga Gly	gac Asp	aac Asn	ccg Pro	tac Tyr 90	ctc Leu	aag Lys	tac Tyr	aac Asn	cac His 95	gcc Ala	288
gac Asp	gcc Ala	gag Glu	ttc Phe 100	cag Gln	gag Glu	cgg Arg	ctc Leu	aaa Lys 105	gaa Glu	gat Asp	acg Thr	tct Ser	ttt Phe 110	ggg Gly	ggc Gly	336
aac Asn	ctc Leu	ggg Gly 115	cga Arg	gca Ala	gtc Val	ttc Phe	cag Gln 120	gcc Ala	aaa Lys	aag Lys	agg Arg	ctt Leu 125	ctt Leu	gaa Glu	cct Pro	384
ctt Leu	ggt Gly 130	ctg Leu	gtt Val	gag Glu	gaa Glu	gcg Ala 135	gct Ala	aag Lys	acg Thr	gct Ala	cct Pro 140	gga Gly	aag Lys	aag Lys	agg Arg	432
cct Pro 145	gta Val	gag Glu	cag Gln	tct Ser	cct Pro 150	cag Gln	gaa Glu	ccg Pro	gac Asp	tcc Ser 155	tcc Ser	gtg Val	ggt Gly	att Ile	ggc Gly 160	480
aaa Lys	tcg Ser	ggt Gly	gca Ala	cag Gln 165	ccc Pro	gct Ala	aaa Lys	aag Lys	aga Arg 170	ctc Leu	aat Asn	ttc Phe	ggt Gly	cag Gln 175	act Thr	528
ggc Gly	gac Asp	aca Thr	gag Glu 180	tca Ser	gtc Val	ccc Pro	gac Asp	cct Pro 185	caa Gln	cca Pro	atc Ile	gga Gly	gaa Glu	cct Pro 190	ccc Pro	576
gca Ala	gcc Ala	ccc Pro 195	tca Ser	ggt Gly	gtg Val	gga Gly	tct Ser 200	ctt Leu	aca Thr	atg Met	gct Ala	tca Ser 205	ggt Gly	ggt Gly	ggc Gly	624
gca Ala 210	cca Pro	gtg Val	gca Ala	gac Asp	aat Asn	aac Asn 215	gaa Glu	ggt Gly	gcc Ala	gat Asp	gga Gly 220	gtg Val	ggt Gly	agt Ser	tcc Ser	672
tcg Ser 225	gga Gly	aat Asn	tgg Trp	cat His	tgc Cys 230	gat Asp	tcc Ser	caa Gln	tgg Trp	ctg Leu 235	ggg Gly	gac Asp	aga Arg	gtc Val	atc Ile 240	720
acc Thr	acc Thr	agc Ser	acc Thr	cga Arg 245	acc Thr	tgg Trp	gcc Ala	ctg Leu	ccc Pro 250	acc Thr	tac Tyr	aac Asn	aat Asn	cac His 255	ctc Leu	768
tac Tyr	aag Lys	caa Gln	atc Ile 260	tcc Ser	aac Asn	agc Ser	aca Thr	tct Ser 265	gga Gly	gga Gly	tct Ser	tca Ser	aat Asn 270	gac Asp	aac Asn	816
gcc Ala	tac Tyr	ttc Phe 275	ggc Gly	tac Tyr	agc Ser	acc Thr	ccc Pro 280	tgg Trp	ggg Gly	tat Tyr	ttt Phe	gac Asp 285	ttc Phe	aac Asn	aga Arg	864

ttc	cac	tgc	cac	ttc	tca	cca	cgt	gac	tgg	caa	aga	ctc	atc	aac	aac	912
Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	
	290					295					300					
aac	tgg	gga	ttc	cgg	cct	aag	cga	ctc	aac	ttc	aag	ctc	ttc	aac	att	960
Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	
305					310					315					320	
cag	gtc	aaa	gag	gtt	acg	gac	aac	aat	gga	gtc	aag	acc	atc	gct	aat	1008
Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn	
				325					330					335		
aac	ctt	acc	agc	acg	gtc	cag	gtc	ttc	acg	gac	tca	gac	tat	cag	ctc	1056
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu	
			340					345					350			
cCG	tac	gtg	ctc	ggg	tCG	gct	cac	gag	ggc	tgc	ctc	cCG	cCG	ttc	cca	1104
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	
		355					360					365				
gcg	gac	gtt	ttc	atg	att	cct	cag	tac	ggg	tat	cta	acg	ctt	aat	gat	1152
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	
	370					375					380					
gga	agc	caa	gcc	gtg	ggt	cgt	tCG	tcc	ttt	tac	tgc	ctg	gaa	tat	ttc	1200
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	
385					390					395					400	
cCG	tCG	caa	atg	cta	aga	acg	ggt	aac	aac	ttc	cag	ttc	agc	tac	gag	1248
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	
				405					410					415		
ttt	gag	aac	gta	cct	ttc	cat	agc	agc	tat	gct	cac	agc	caa	agc	ctg	1296
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	
			420					425					430			
gac	cga	ctc	atg	aat	cca	ctc	atc	gac	caa	tac	ttg	tac	tat	ctc	tca	1344
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
		435					440					445				
aag	act	att	aac	ggt	tct	gga	cag	aat	caa	caa	acg	cta	aaa	ttc	agt	1392
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	
	450					455					460					
gtg	gcc	gga	ccc	agc	aac	atg	gct	gtc	cag	gga	aga	aac	tac	ata	cct	1440
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	
465					470					475					480	
gga	ccc	agc	tac	cga	caa	caa	cgt	gtc	tca	acc	act	gtg	act	caa	aac	1488
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
				485					490					495		
aac	aac	agc	gaa	ttt	gct	tgg	cct	gga	gct	tct	tct	tgg	gct	ctc	aat	1536
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
			500					505					510			
gga	cgt	aat	agc	ttg	atg	aat	cct	gga	cct	gct	atg	gcc	agc	cac	aaa	1584

Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
gaa	gga	gag	gac	cgt	ttc	ttt	cct	ttg	tct	gga	tct	tta	att	ttt	ggc	1632
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					
aaa	caa	gga	act	gga	aga	gac	aac	gtg	gat	gcg	gac	aaa	gtc	atg	ata	1680
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
acc	aac	gaa	gaa	gaa	att	aaa	act	acc	aac	cca	gta	gca	acg	gag	tcc	1728
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	
				565					570					575		
tat	gga	caa	gtg	gcc	aca	aac	cac	cag	agt	gcc	caa	gca	cag	gcg	cag	1776
Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	
			580					585					590			
acc	ggc	tgg	gtt	caa	aac	caa	gga	ata	ctt	cgc	ggt	atg	gtt	tgg	cag	1824
Thr	Gly	Trp	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	
		595					600					605				
gac	aga	gat	gtg	tac	ctg	caa	gga	ccc	att	tgg	gcc	aaa	att	cct	cac	1872
Asp	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	
	610					615					620					
acg	gac	ggc	aac	ttt	cac	cct	tct	cgc	ctg	atg	gga	ggg	ttt	gga	atg	1920
Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	
625					630					635					640	
aag	cac	cgc	cct	cct	cag	atc	ctc	atc	aaa	aac	aca	cct	gta	cct	gcg	1968
Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	
				645					650					655		
gat	cct	cca	acg	gct	ttc	aac	aag	gac	aag	ctg	aac	tct	ttc	atc	acc	2016
Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Phe	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	Ser	Phe	Ile	Thr	
			660					665					670			
cag	tat	tct	act	ggc	caa	gtc	agc	gtg	gag	att	gag	tgg	gag	ctg	cag	2064
Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln	
		675					680					685				
aag	gaa	aac	agc	aag	cgc	tgg	aac	cgc	gag	atc	cag	tac	act	tcc	aac	2112
Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn	
	690					695					700					
tat	tac	aag	tct	aat	aat	gtt	gaa	ttt	gct	gtt	aat	act	gaa	ggt	gtt	2160
Tyr	Tyr	Lys	Ser	Asn	Asn	Val	Glu	Phe	Ala	Val	Asn	Thr	Glu	Gly	Val	
705					710					715					720	
tat	tct	gaa	ccc	cgc	ccc	att	ggc	acc	aga	tac	ctg	act	cgt	aat	ctg	2208
Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asn	Leu	
				725					730					735		
taa																2211

<210> 31
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31

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

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

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

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

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala 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 Val Gly Ile Gly
145 150 155 160

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

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

Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	
		195					200					205				
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	
	210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	
225					230					235					240	
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	
				245					250					255		
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn	
			260					265					270			
Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	
		275					280					285				
Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	
	290					295					300					
Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	
305					310					315					320	
Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn	
				325					330					335		
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu	
			340					345					350			
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	
		355					360					365				
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	
	370					375					380					
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	
385					390					395					400	
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	
				405					410					415		

Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	
		420						425					430			
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
		435					440					445				
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	
	450					455					460					
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
				485					490					495		
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
			500					505					510			
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	
				565					570					575		
Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	
			580					585					590			
Thr	Gly	Trp	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	
		595					600					605				
Asp	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	
	610					615					620					
Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	
625					630					635					640	

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

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA靶序列

<400> 32
agtgaattct accagtgcc a ta 22

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA靶序列

<400> 33
agcaaaaatg tgctagtgcc aaa 23

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA靶序列

<400> 34

agtgtagtt ctaccattgc caaa

24

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA靶序列

<400> 35
agggattcct gggaaaactg gac

23

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種重組 AAV (rAAV)，其包含：

(a)來自腺相關病毒 1 的 AAV 衣殼，及

(b)包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITRs)、人類顆粒蛋白前體(human progranulin)的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【請求項 2】如請求項 1 之 rAAV，其中該編碼序列編碼 SEQ ID NO：1 之人類顆粒蛋白前體蛋白質。

【請求項 3】如請求項 1 或 2 之 rAAV，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與其至少 95%至 99.9%相同之序列。

【請求項 4】如請求項 1 至 3 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含啟動子、增強子、內含子、人類顆粒蛋白前體編碼序列、及多腺核苷酸化訊息(polyadenylation signal)。

【請求項 5】如請求項 1 至 4 中任一項之 rAAV，其中該內含子係由雞 β 肌動蛋白剪接供體及兔 β 剪接受體元件構成。

【請求項 6】如請求項 1 至 5 中任一項之 rAAV，其中該 AAV 反向末端重複(ITRs)為 AAV2 5' ITR 及 AAV2 3' ITR，其位於顆粒蛋白前體編碼序列及調節序列的側面。

【請求項 7】如請求項 1 至 6 中任一項之 rAAV，其中該載體基因體包含(a)EF-1a 啟動子及 SV40 晚期 poly A，(b)UbC 啟動子、內含子、及 SV40 晚期 poly A，或(c)CB7 啟動子、嵌合內含子、及兔球蛋白 poly A。

【請求項 8】如請求項 7 之 rAAV，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24 之序列。

【請求項 9】一種醫藥組成物，其包含適於鞘內投予之水性液體及適於治療由 GRN-單套缺失(GRN-haploinsufficiency)引起的神經系統退化症之重組 AAV (rAAV)，該 rAAV 包含：

(a)來自腺相關病毒 1 的 AAV 衣殼，及

(b)包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITRs)、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【請求項 10】如請求項 9 之組成物，其中該編碼序列編碼 SEQ ID NO：1 之人類顆粒蛋白前體蛋白質。

【請求項 11】如請求項 9 或 10 之組成物，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 之至少胺基酸 18-593 之至少 95%至 99.9%相同的序列。

【請求項 12】如請求項 9 至 11 中任一項之組成物，其中該載體基因體包含啟動子、增強子、內含子、人類顆粒蛋白前體編碼序列、及多腺核苷酸化訊息。

【請求項 13】如請求項 9 至 12 中任一項之組成物，其中該內含子係由雞 β 肌動蛋白剪接供體及兔 β 剪接受體元件所構成。

【請求項 14】如請求項 9 至 13 中任一項之組成物，其中該 AAV 反向末端重複(ITRs)為 AAV2 5' ITR 及 AAV2 3' ITR，其位於顆粒蛋白前體編碼序列及載體基因體之調節序列的側面。

【請求項 15】如請求項 9 至 14 中任一項之組成物，其中該載體基因體包含(a)EF-1a 啟動子及 SV40 晚期 poly A，(b)UbC 啟動子、內含子、及 SV40 晚期 poly A，或(c)CB7 啟動子、嵌合內含子、及兔球蛋白 poly A。

【請求項 16】如請求項 15 之 rAAV，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24 之序列。

【請求項 17】如請求項 9 至 16 中任一項之組成物，其中該組成物包含具表面活性劑之人工腦脊髓液。

【請求項 18】如請求項 17 之組成物，其中該表面活性劑為 Pluronic F-68。

【請求項 19】如請求項 1 至 8 中任一項之重組 AAV(rAAV)或如請求項 9 至 18 中任一項之醫藥組成物，其用於用以治療具有由 GRN-單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症(adult-onset neurodegeneration)的病患之方法。

【請求項 20】一種如請求項 1 至 8 中任一項之重組 AAV(rAAV)或如請求項 9 至 18 中任一項之醫藥組成物之用途，其係用於製造用以治療具有由 GRN-單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症的病患之醫藥。

【請求項 21】如請求項 19 或 20 之用途，其中該醫藥組成物被調配成劑量為 1×10^{10} GC/g 腦質量至 3.33×10^{11} GC/g 腦質量之 rAAV 而經鞘內投予。

【請求項 22】如請求項 19 或 20 之用途，其中該病患為人類成人且被投予劑量為 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 之 rAAV。

【請求項 23】如請求項 19 至 22 中任一項之用途，其中該 rAAV 或組成物可投予於一方案，其進一步包含一或多種之(a)非侵入式評估病患的視網膜儲積病灶的減少，作為腦損傷降低之預測因子，(b)進行磁共振成像以評估腦容量，及/或(b)測量 CSF 中顆粒蛋白前體濃度的濃度。

【請求項 24】如請求項 19 至 23 中任一項之用途，其中該 rAAV 包含顆粒蛋白前體的編碼序列被鞘內遞送，經由腦室內遞送 (intracerebroventricular delivery) 或經由腦實質內遞送 (intraparenchymal delivery)。

【請求項 25】如請求項 19 至 23 中任一項之用途，其中該組成物呈單劑量被投予，經由電腦斷層掃描攝影-(CT-)導向的枕骨下注射(sub-occipital injection)至小腦延髓池(cisterna magna)(小腦延髓池內(intra-cisterna magna))。

【請求項 26】如請求項 19 至 25 中任一項之用途，其中該病患具有顆粒蛋白前體-額顳葉失智症(progranulin-frontotemporal dementia)。

【請求項 27】一種治療具由顆粒蛋白(GRN)單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症的人類病患之方法，其包含將具腺相關病毒 1(AAV1)之 AAV 衣殼的重組腺相關病毒(rAAV)遞送至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【請求項 28】一種治療具由顆粒蛋白(GRN)單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症的人類病患之方法，其包含將具腺相關病毒 1(AAV1)之 AAV 衣殼的重組腺相關病毒(rAAV)投予至中樞神經系統(CNS)，該衣殼靶向室管膜細胞(ependymal cell)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體編碼序列、及指導室管膜細胞中顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【請求項 29】一種治療具與由顆粒蛋白單套缺失引起的成年發病型神經系統退化症有關的腦損傷的人類病患之方法，該方法包含將具腺相關病毒 1(AAV1)之 AAV 衣殼的重組腺相關病毒(rAAV)投予至中樞神經系統，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 衣殼中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體編碼序列、及指導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【請求項 30】如請求項 27 至 29 中任一項之方法，其中該病患被投予如請求項 1 至 8 中任一項之 rAAV 或如請求項 9 至 18 中任一項之醫藥組成物。

【請求項 31】如請求項 27 至 30 中任一項之方法，其中該病患被鞘內投予劑量為 1×10^{10} GC/g 腦質量至 3.33×10^{11} GC/g 腦質量之 rAAV。

【請求項 32】如請求項 27 至 30 中任一項之方法，其中該病患人類成人且被投予一劑 1.44×10^{13} 至 4.33×10^{14} GC 之 rAAV。

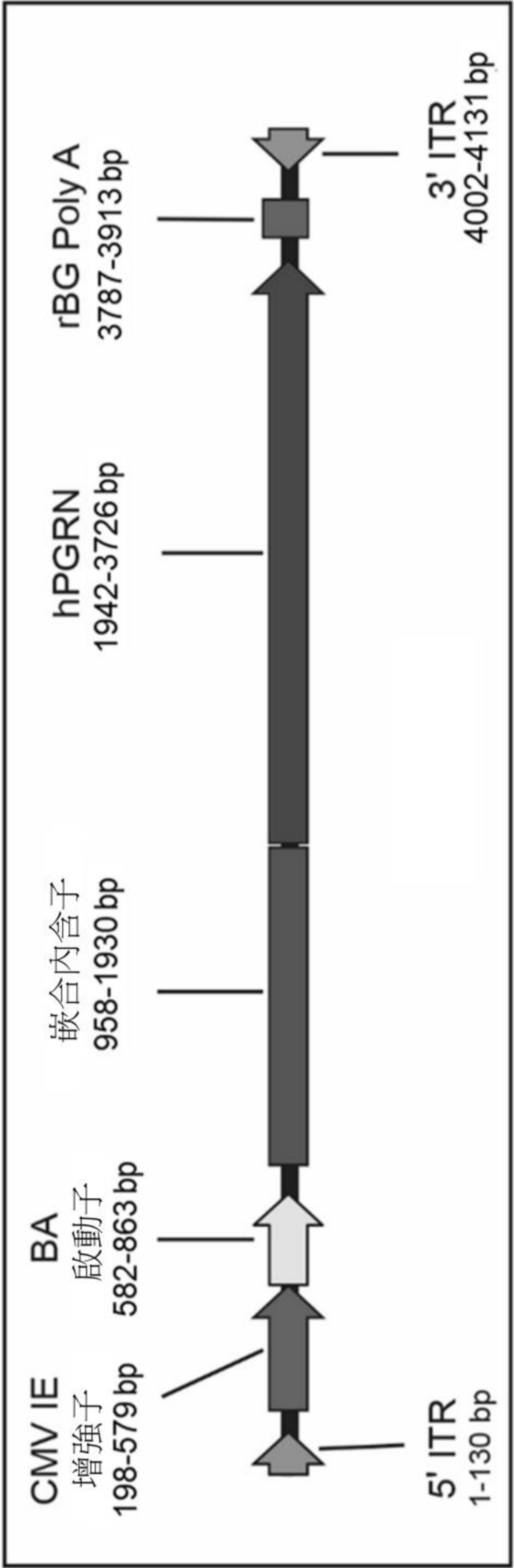
【請求項 33】如請求項 27 至 32 中任一項之方法，其進一步包含一或多種之(a)非侵入式評估病患視網膜儲積病灶之減少作為腦損傷減少的預測，(b)進行磁共振成像以評估腦容量，及/或(c)測量 CSF 中顆粒蛋白前體濃度之濃度。

【請求項 34】如請求項 27 至 33 中任一項之方法，其中該包含顆粒蛋白前體編碼序列的 rAAV 被鞘內遞送，經由腦室內遞送或經由腦實質內遞送。

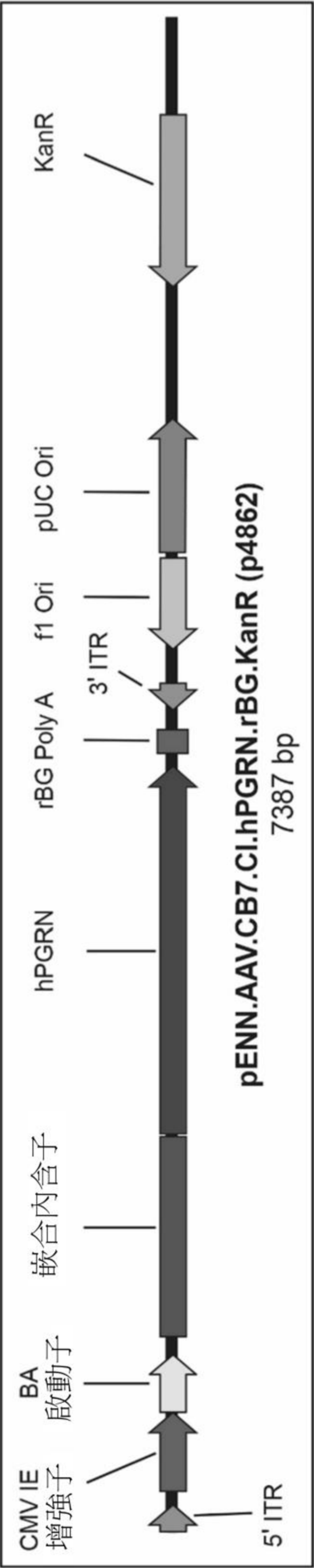
【請求項 35】如請求項 27 至 33 中任一項之方法，其中該 rAAV 呈單劑量被投予，經由電腦斷層掃描攝影-(CT-)導向的枕骨下注射至小腦延髓池(小腦延髓池內)。

【請求項 36】如請求項 27 至 35 中任一項之方法，其中該病患具有顆粒蛋白前體相關的額顳葉失智症(progranulin-related frontotemporal dementia，FTD)。

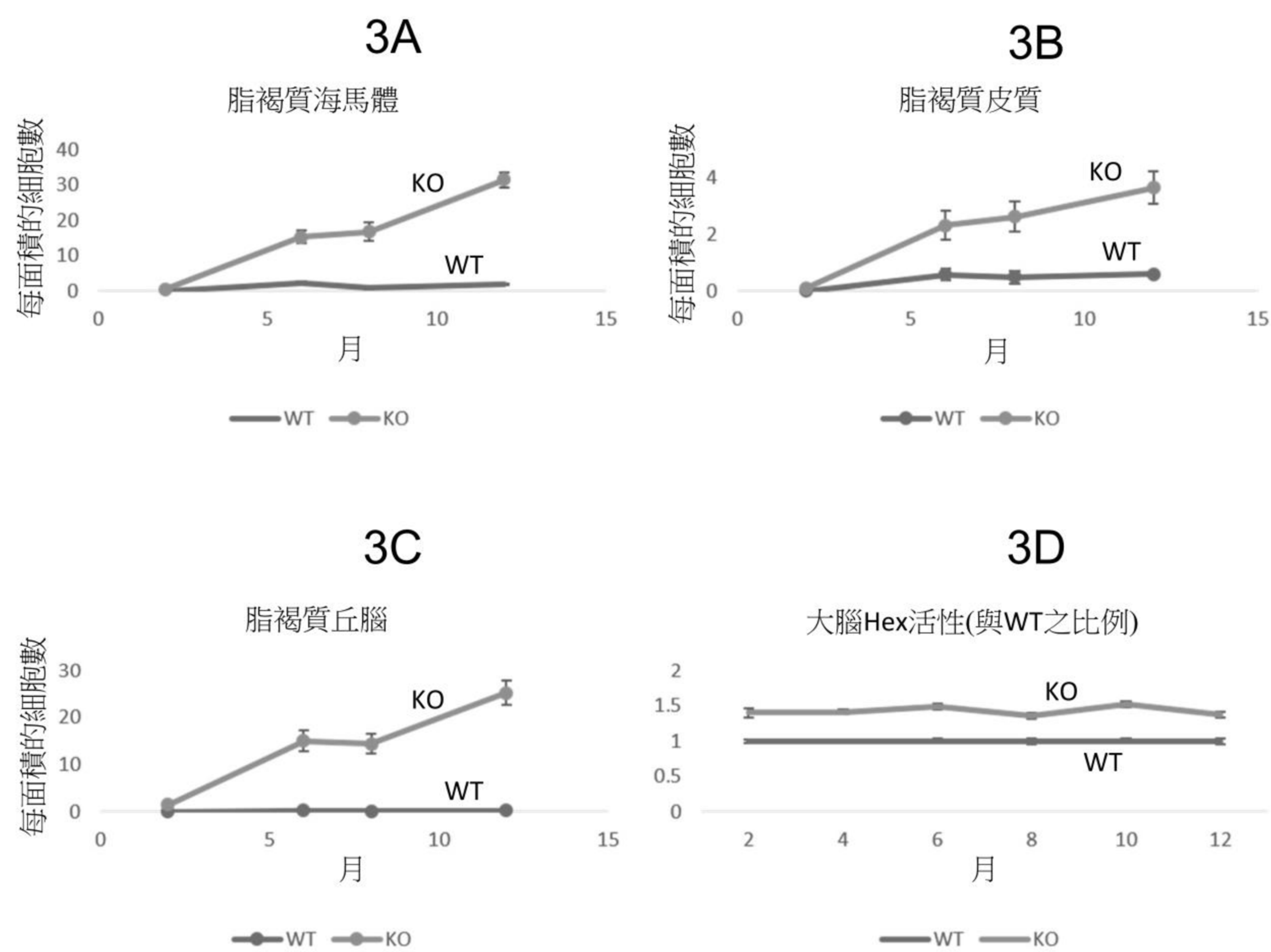
【發明圖式】



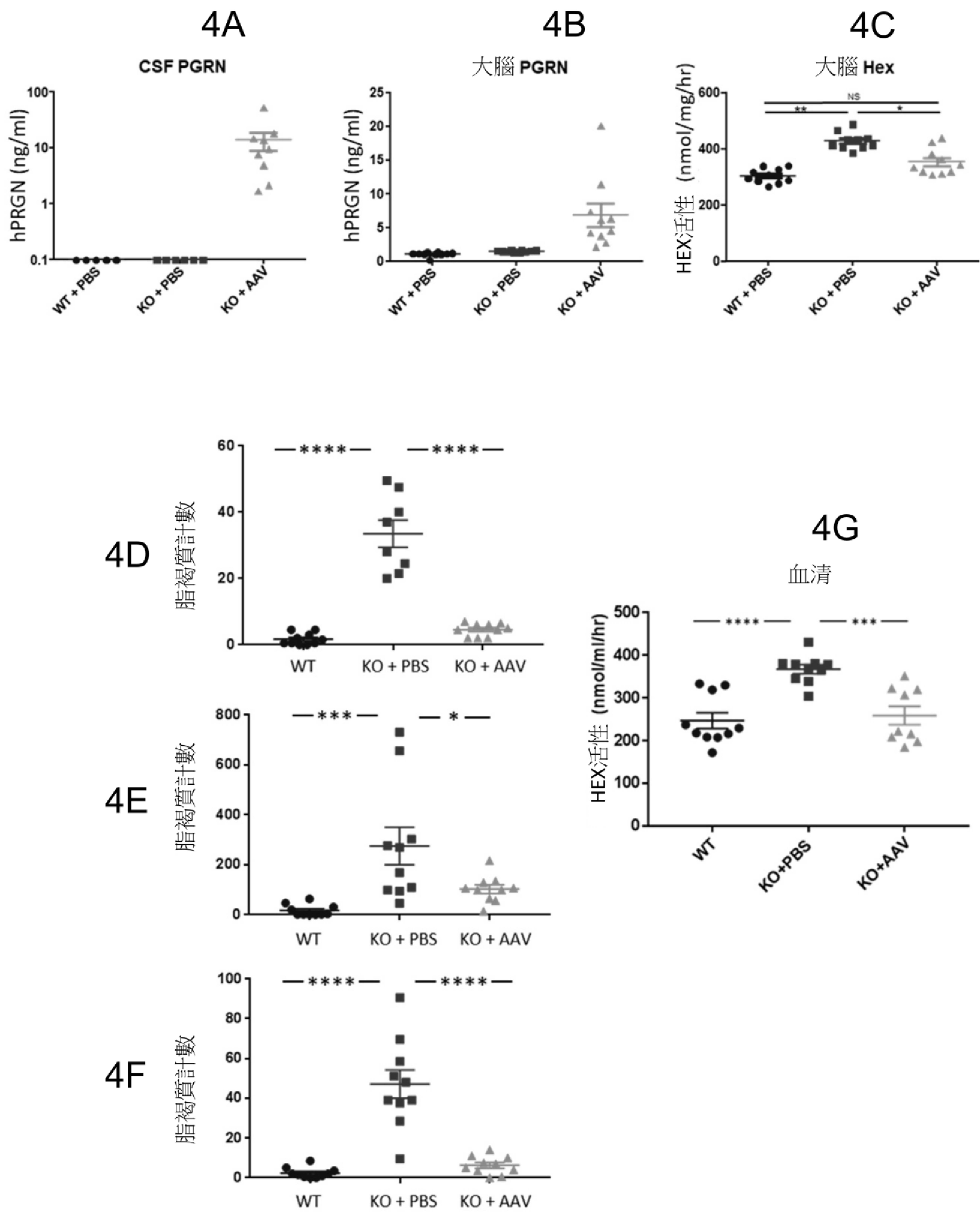
【圖 1】



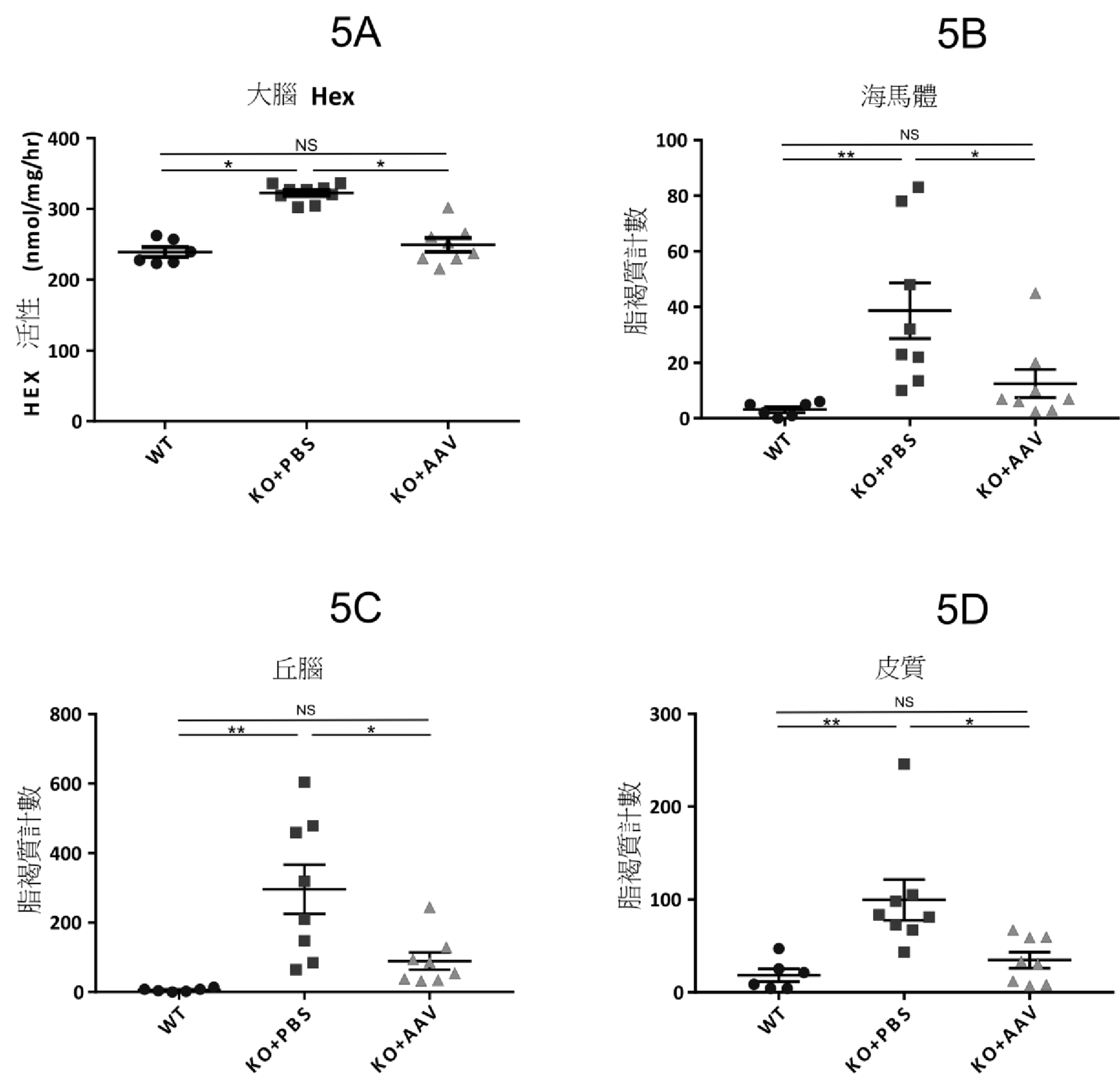
【圖 2】



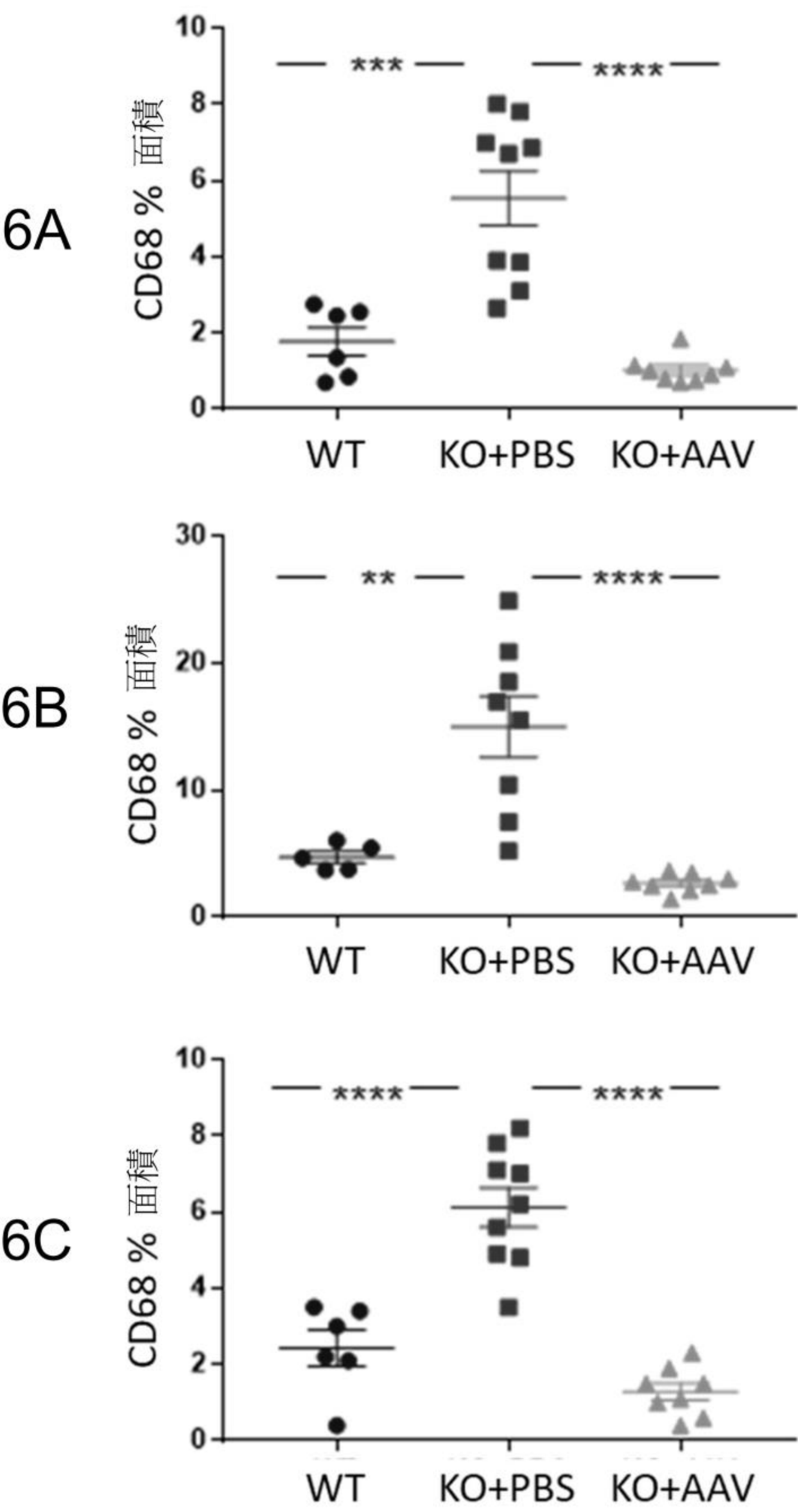
【圖 3A-3D】



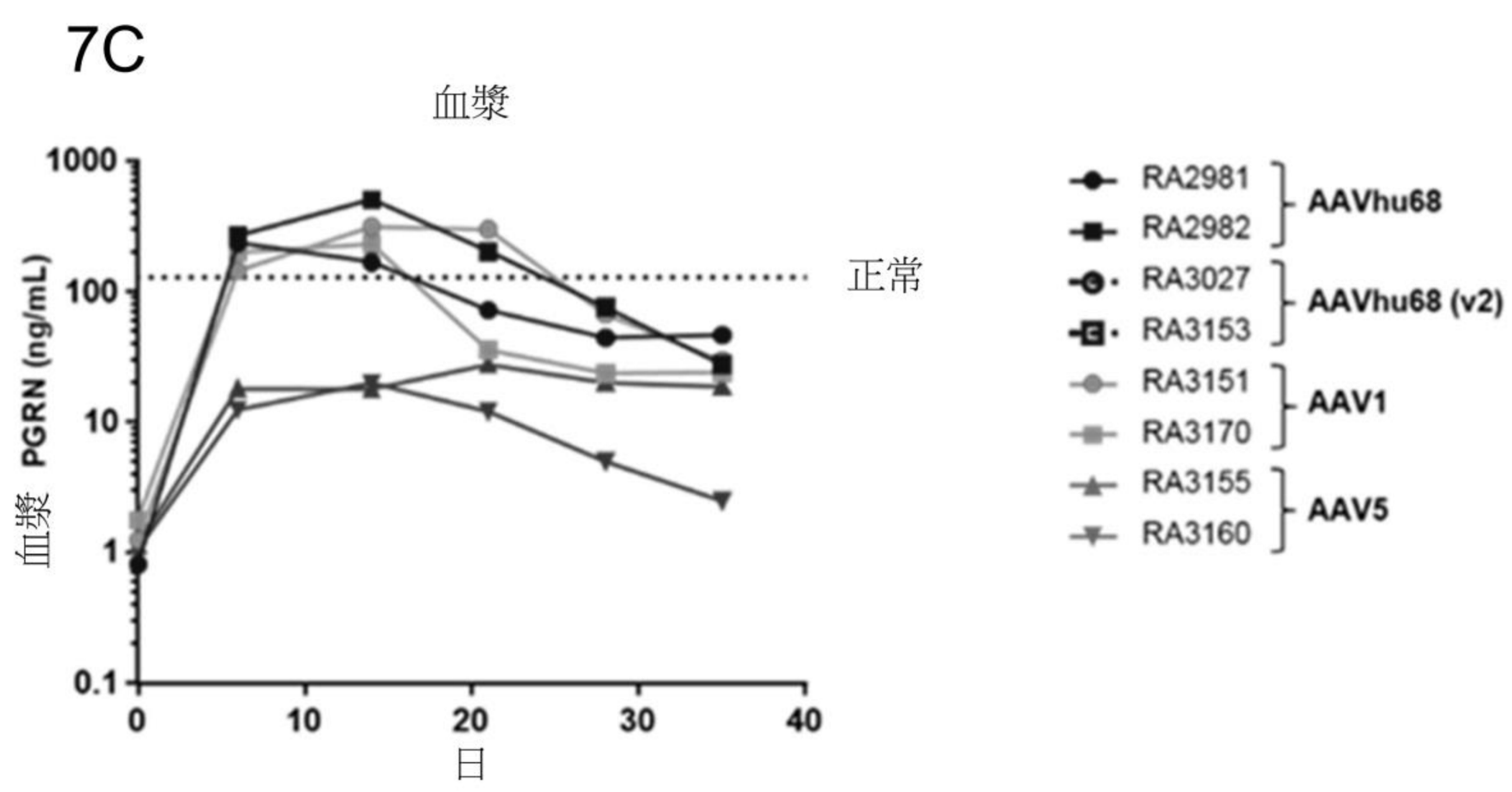
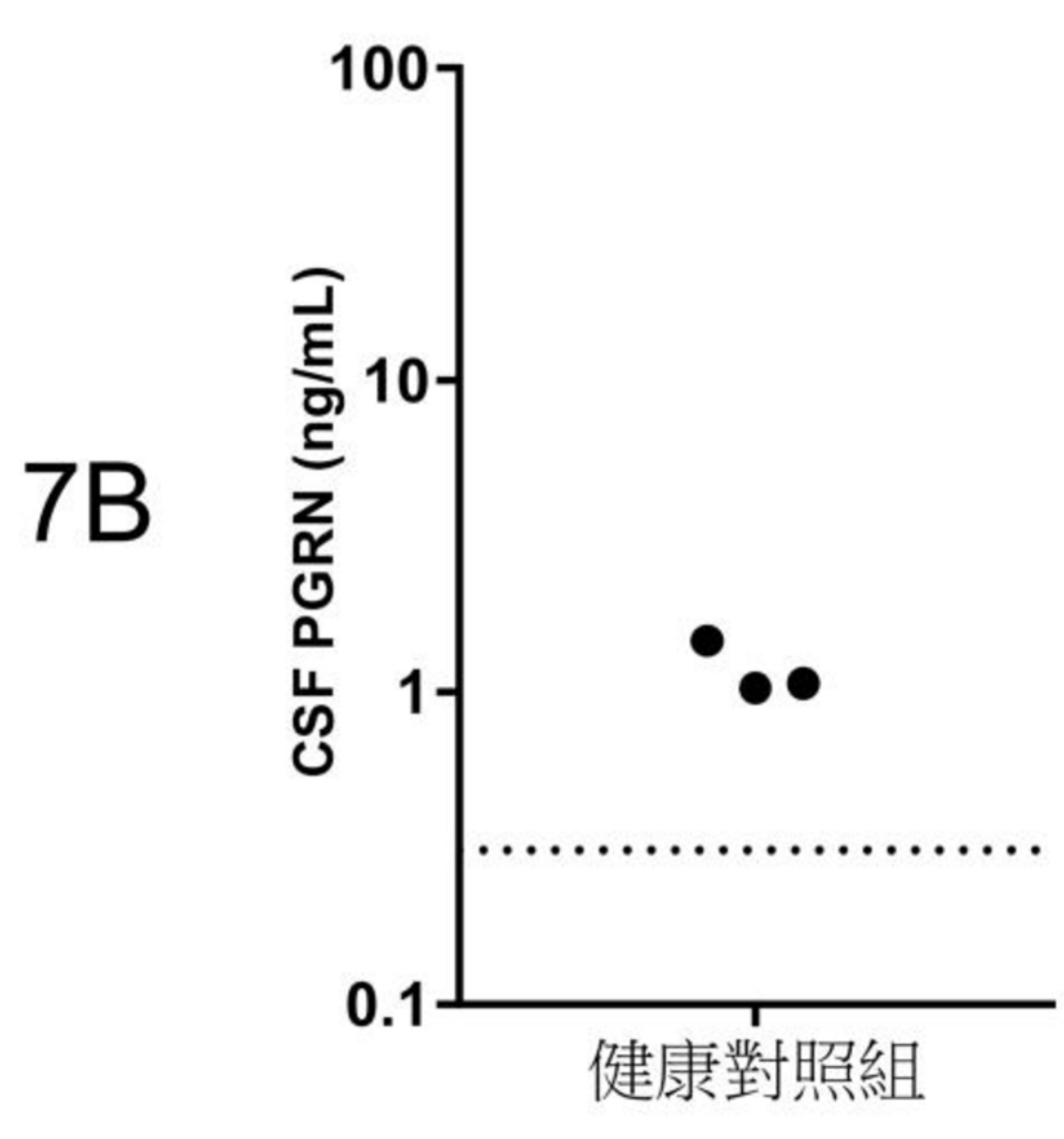
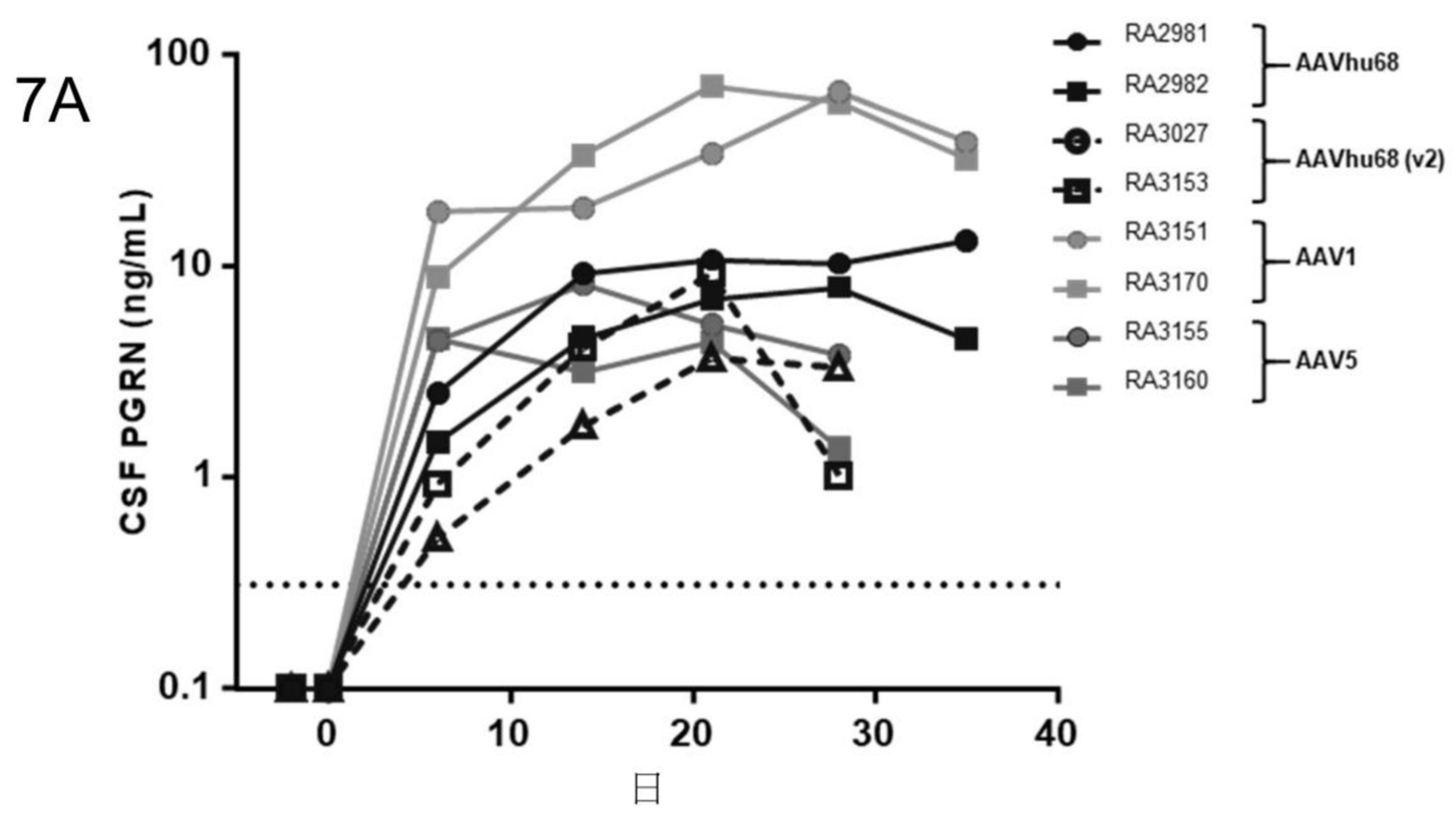
【圖 4A-4G】



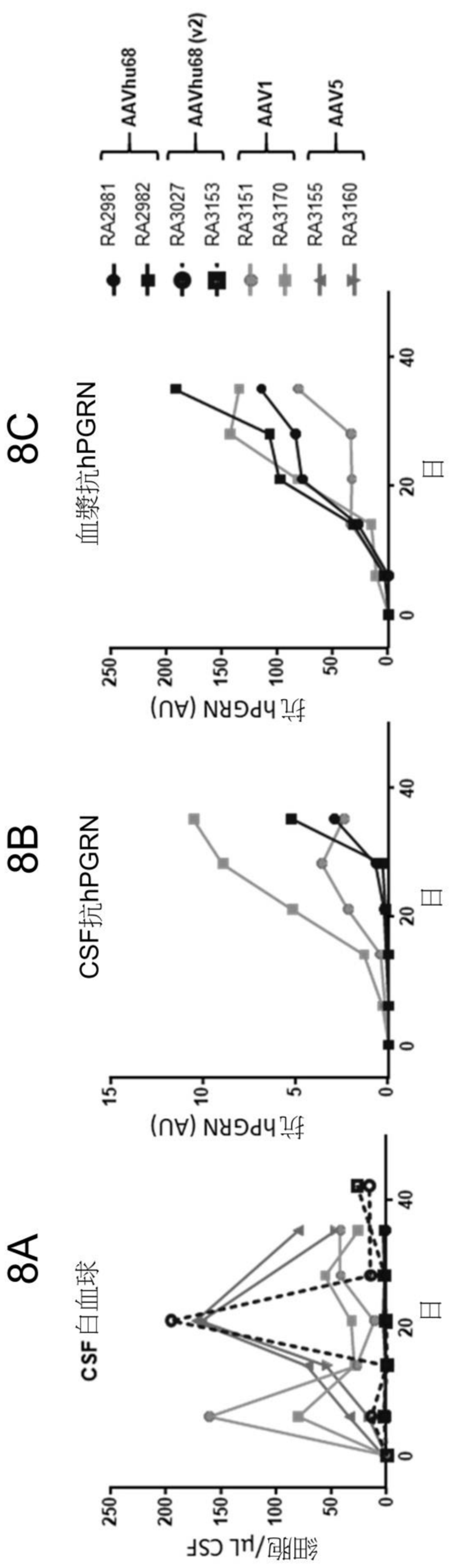
【圖 5A-5D】



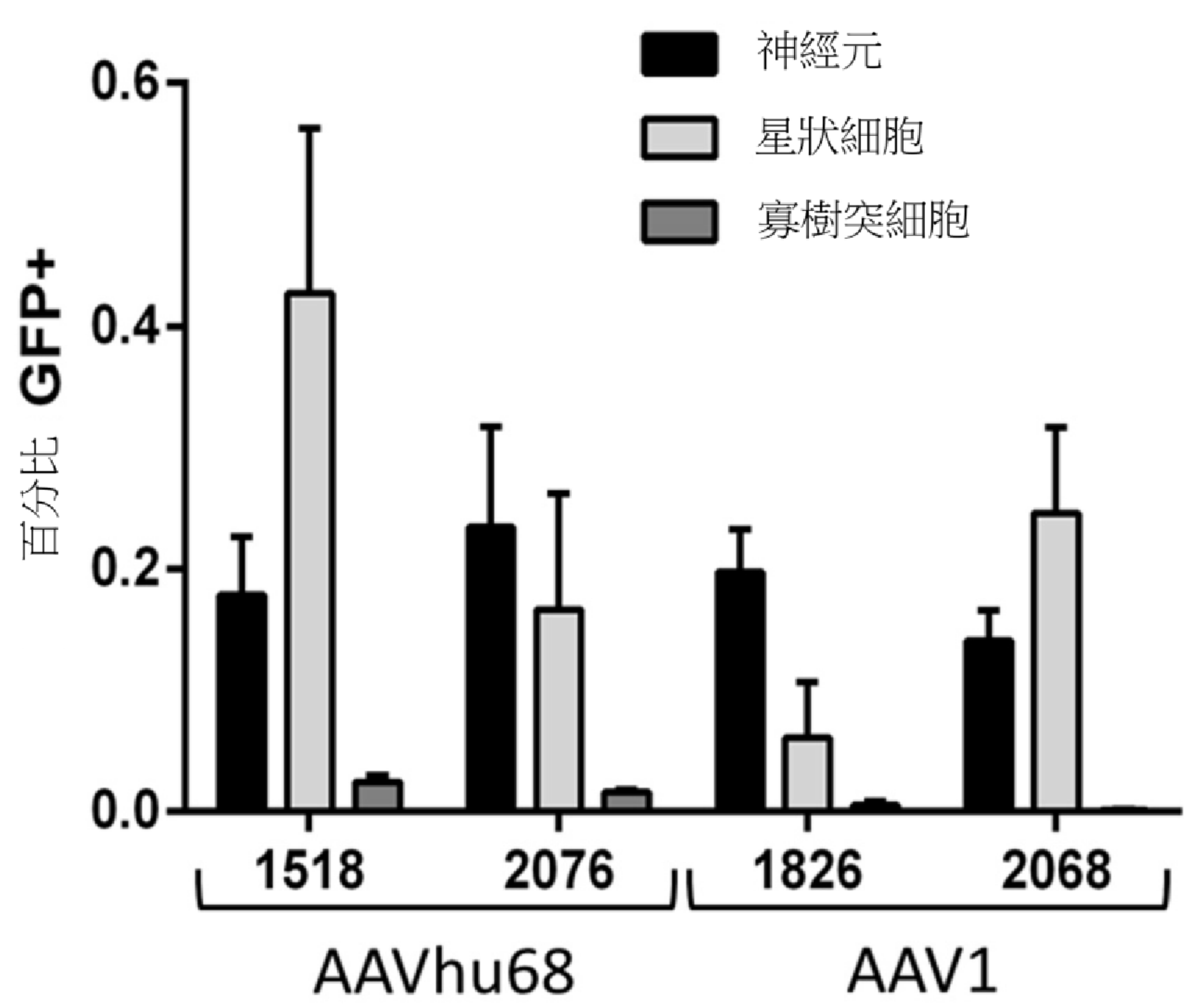
【圖 6A-6C】



【圖 7A-7C】



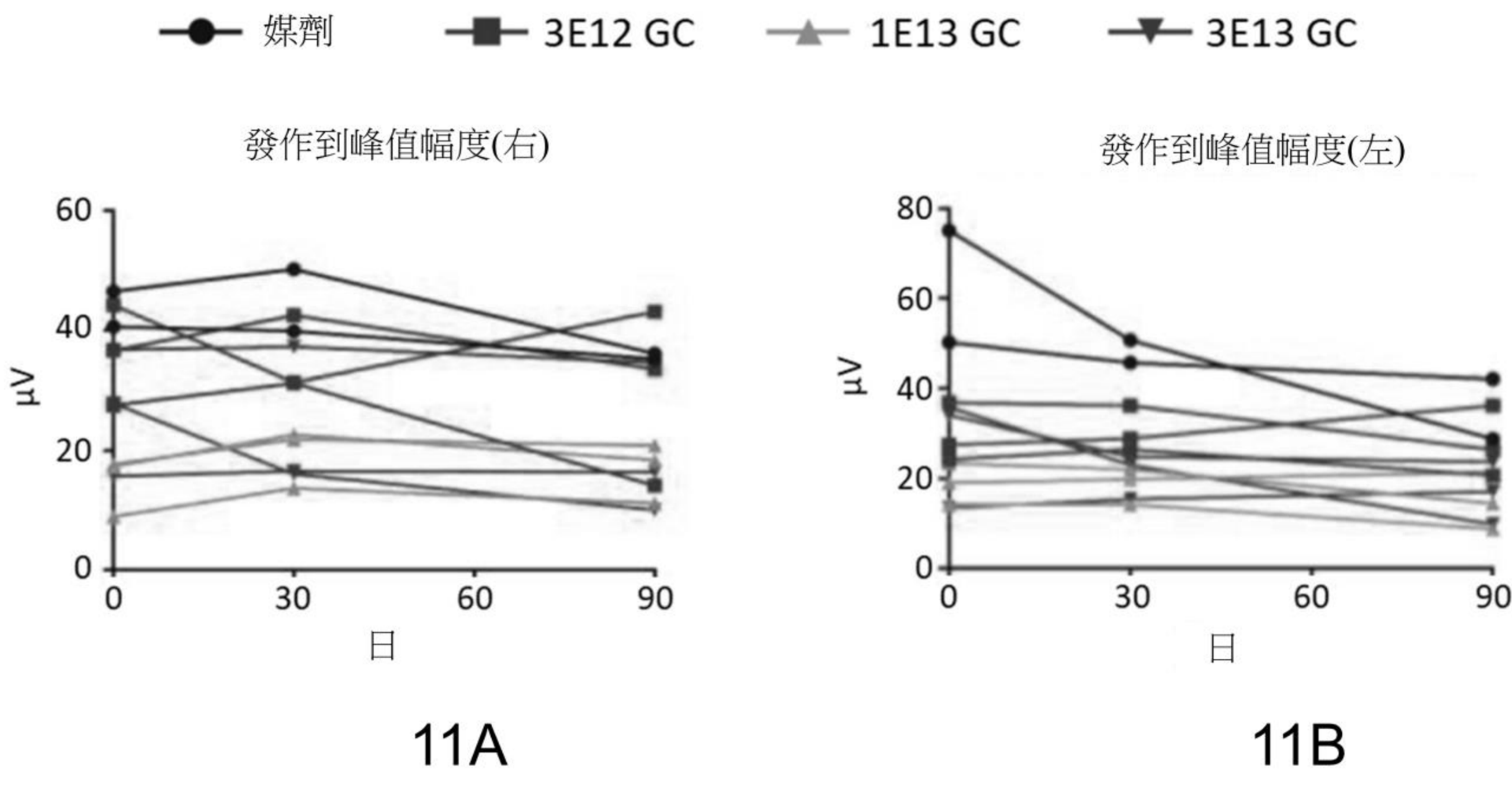
【圖 8A-8C】



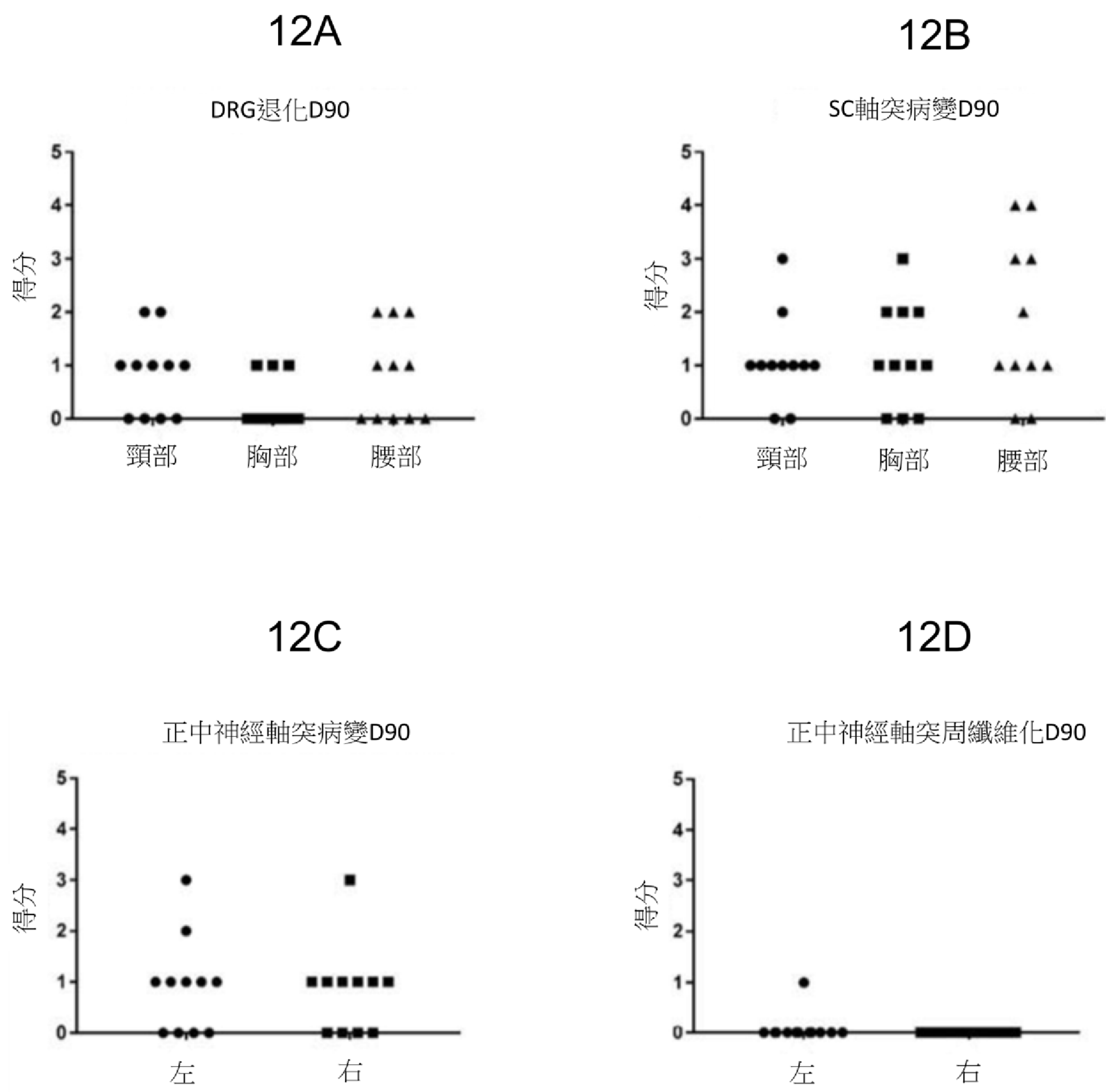
【圖 9】

		區域						
細胞標記	動物ID	1	2	3	4	5		平均
NeuN	1518	0.13	N/A	0.205	0.34	0.167	0.049	0.178
	2076	0.106	0.227	0.258	0.528	0.053	N/A	0.234
	1826	0.1	0.318	0.195	0.202	0.171	N/A	0.197
	2068	0.218	N/A	0.153	0.141	0.128	0.065	0.141
GFAP	1518	0.152	N/A	0.202	0.914	0.39	0.476	0.427
	2076	0.011	0.064	0.235	0.511	0.011	N/A	0.166
	1826	0.019	0.013	0.021	0.244	0.007	N/A	0.061
	2068	0.066	N/A	0.245	0.13	0.459	0.33	0.246
Olig2	1518	0.02	N/A	0.03	0.04	0.009	0.023	0.024
	2076	0.02	0.023	0.011	0.013	0.013	N/A	0.016
	1826	0	0.001	0.008	0.016	N/A	0.001	0.005
	2068	0.002	0	N/A	0.001	0.002	0.002	0.001

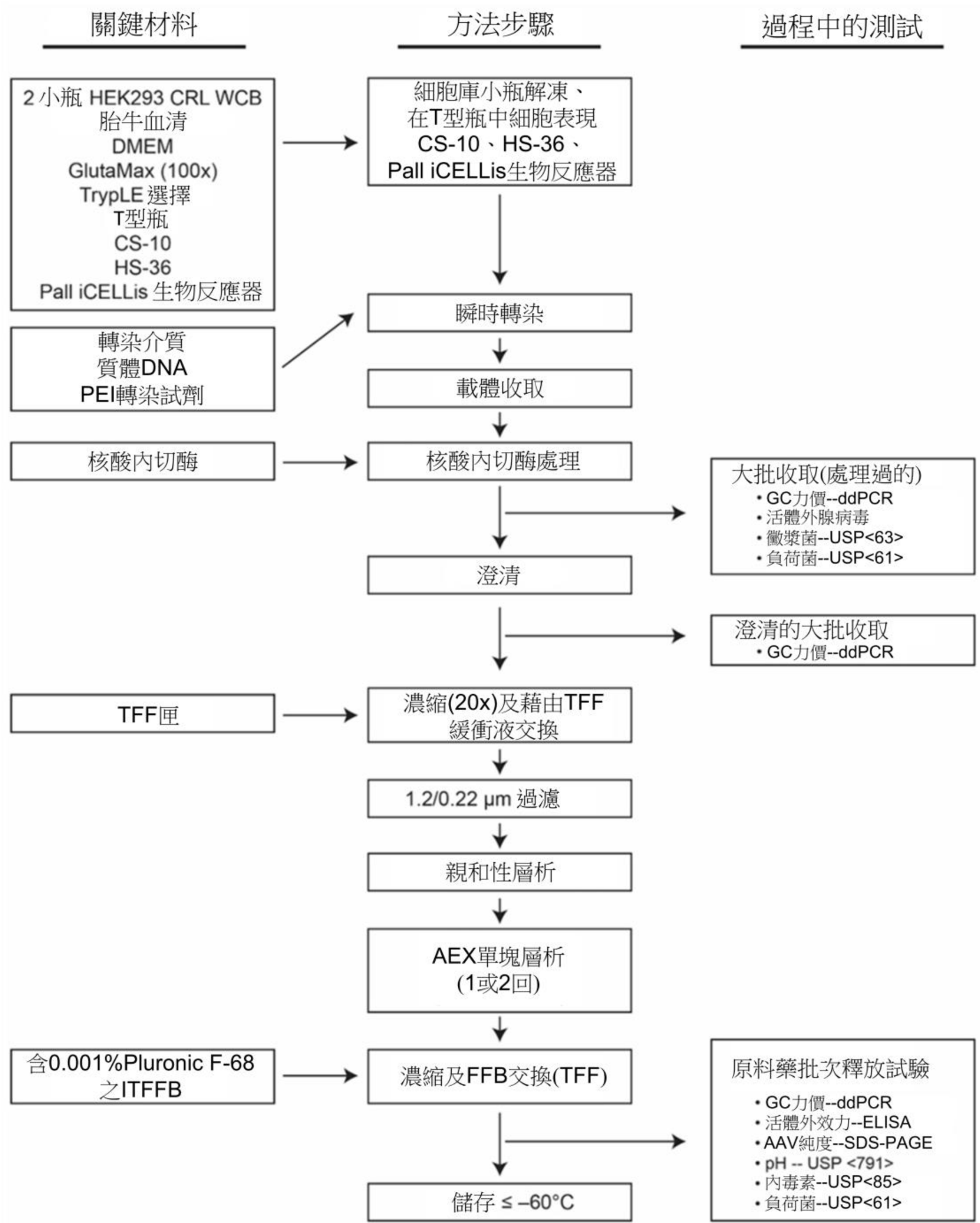
【圖 10】



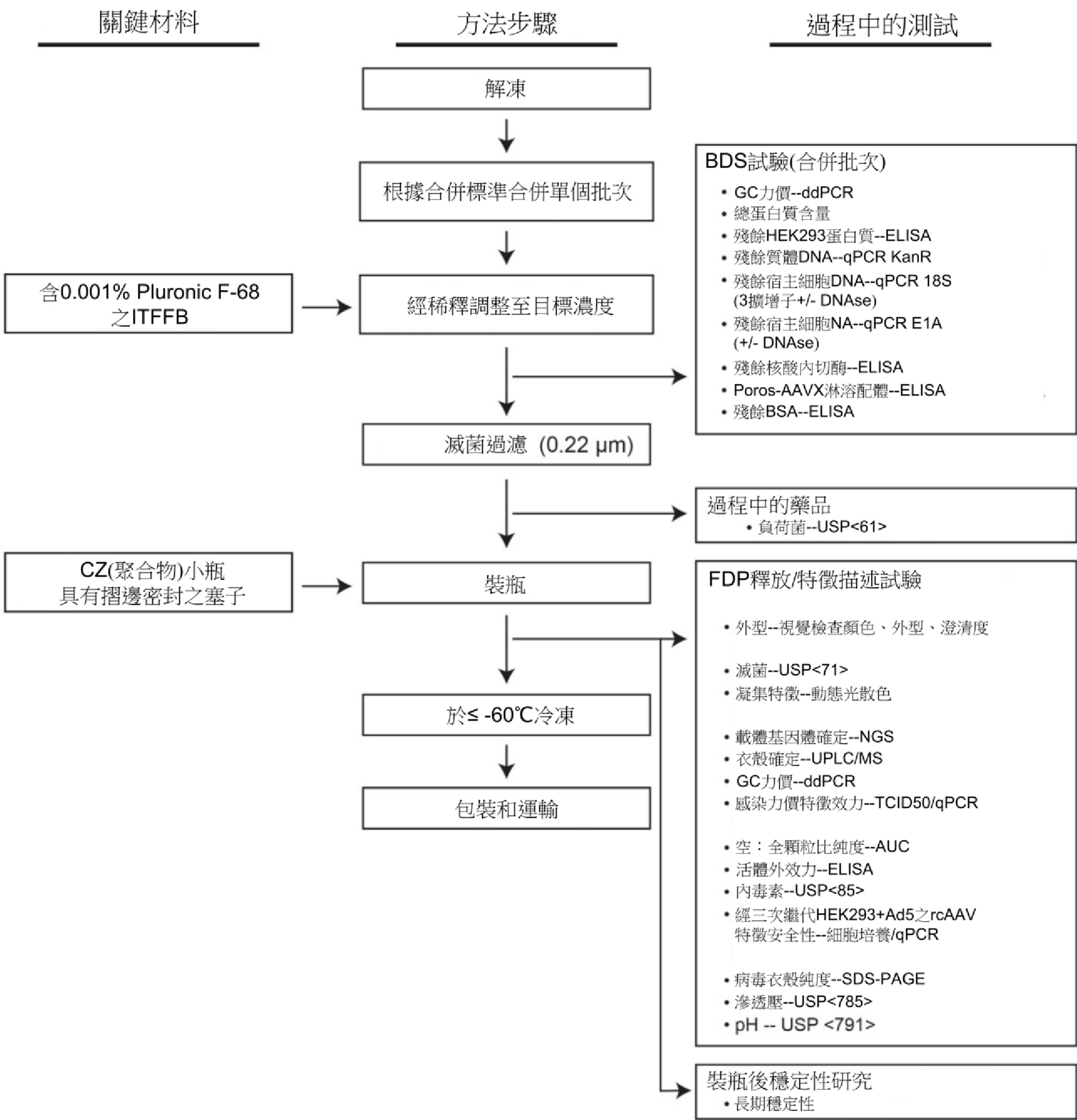
【圖 11A-11B】



【圖 12A-12D】



【圖 13】



【圖 14】

圖 3A-圖 3D 提供 $GRN^{-/-}$ 小鼠大腦中脂褐質蓄積和己糖胺酶(hexosaminidase)活性的自然史。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在指定的年齡(每個時間點 $n=10$)犧牲。對未染色的大腦切片進行海馬體、丘腦及額葉皮質中的自體螢光物質(脂褐質)成像，並由三位盲校閱者對脂褐質沉積物進行定量並取平均值(圖 3A-圖 3C)。脂褐質計數以相對於感興趣區域的總面積表示。測定大腦樣本中的己糖胺酶活性，並以總蛋白濃度標準化(圖 3D)，數值表示為與野生型對照組的比率。

圖 4A-圖 4G 顯示經由 AAV-媒介 PGRN 表現，修正年輕成年 $GRN^{-/-}$ 小鼠大腦中之溶酶體病理學。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在 2 個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類 PGRN (10^{11} GC)的 AAVhu68 載體之單次 ICV 注射治療(每組 $n=10$)。在注射 60 天後犧牲動物，並藉由 ELISA 測量 CSF(圖 4A)及腦額葉(圖 4B)中之人類 PGRN。測量腦樣本中己糖胺酶活性(圖 4C)。將腦 PGRN 濃度及 Hex 活性標準化成總蛋白質，對未染色的大腦切片進行海馬體、丘腦及額葉皮質中之自體螢光物質(脂褐質)成像。海馬體、丘腦及額葉皮質中之脂褐質沉積物經盲校閱者定量(圖 4D-圖 4G)。脂褐質計數以每一高倍鏡檢(high power field)表示。每組 $N=10$ ，除了 KO+PBS 海馬體 $n=8$ 。 $*p<0.05$ ， $**p<0.005$ ， $***p<0.001$ ， $****p<0.0001$ ，進行單因子變異數分析(One-way ANOVA)，之後杜凱氏(Tukey)多重比較試驗。量測血清中之己糖胺酶活性(圖 4G)。

圖 5A-圖 5D 顯示藉由人類 PGRN 的 AAV-媒介表現，修正老年 $GRN^{-/-}$ 小鼠腦中的溶酶體病理學。 $GRN^{-/-}$ 小鼠(KO)或 $GRN^{+/+}$ (WT)對照組在 7 個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類

量。為此目的，將未染色的經固定之大腦切片置於蓋玻片上，並以盲測法對自體螢光脂褐質進行成像並定量。與經媒劑治療的 $GRN^{-/-}$ 小鼠相比，經 AAV 治療之 $GRN^{-/-}$ 小鼠在所有腦區域均呈現降低的脂褐質，且與年齡相仿的野生型對照組的水平相似(圖 4A-圖 4F)。

【0134】概念研究的初步驗證證明，當貯積物質剛開始出現在大腦中時，早期治療的小鼠中 AAV-媒介 PGRN 表達的治療活性，隨後評估基因轉移對具有早已存在更嚴重之病理學的老年小鼠的影響。在此研究中，7 月齡之 $GRN^{-/-}$ 小鼠接受單次 ICV 注射表現人類 PGRN 之 AAVhu68 載體或媒劑，並於 11 月齡時犧牲。除了廣泛的腦脂褐質沉積物外(圖 5A-圖 5D)，11 月齡的 $GRN^{-/-}$ 小鼠呈現廣泛的小膠質細胞增生，類似於由 GRN 突變引起的 FTD 病患(圖 6A-圖 6C) (Ahmed Z, et al. Journal of neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2007 Feb 11;4:7)。GRN 基因的轉移減少了老年小鼠的腦 Hex 活性和脂褐質沉積物，這與幼小動物的發現相似(圖 5A-圖 5D)。此外，小神經膠質細胞的大小及數量在經治療的小鼠大腦中是正常的(圖 6A-圖 6C)。

【0135】在累計上，將表現人類 PGRN 之 AAV 載體以 ICV 遞送到 $GRN^{-/-}$ 小鼠清除了脂褐質聚集體，且幾乎完全正常化了溶酶體酵素活性，表明 PGRN 基因遞送可有效改正 GRN 相關性神經退行性疾病的潛在病理生理學的關鍵方面。

【0136】