I856016

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I856016 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：108121156 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 06 月 18 日

(51)Int. Cl.： ***C12N15/861 (2006.01)*** ***A61K48/00 (2006.01)***

(30)優先權：2018/06/18 美國 62/686,668

2018/10/02 美國 62/740,402

2018/10/30 美國 62/752,841

2019/03/25 美國 62/823,649

2019/06/11 美國 62/860,220

2019/06/17 世界智慧財產權組織 PCT/US2019/037489

(71)申請人：美國全美兒童醫院之研究學會 (美國) RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL (US)

美國

(72)發明人：羅帝諾 克拉帕克 路易斯 RODINO-KLAPAC, LOUISE (US)；麥德爾 傑瑞 R MENDELL, JERRY R. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2017/181015A1

期刊 Maja Z Salva et al , "Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle", Mol Ther. 2007 Feb;15(2): 320-9.

期刊 Dongsheng Duan, "Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy", Mol Ther, Review, 2018 Oct 3; 26 (10):2337-2356. Epub 2018 Jul 17.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：15 共 150 頁

(54)名稱

腺相關病毒載體遞送肌肉特異性微小肌縮蛋白以治療肌肉萎縮症

(57)摘要

本發明提供表現小型化人微小肌縮蛋白基因之基因療法載體，諸如腺相關病毒（AAV）載體，以及在患有肌肉萎縮症之個體中使用此等載體在包含隔膜及心臟肌肉之骨胳肌肉中表現微小肌縮蛋白，並防止肌纖維損傷，增加肌肉力量以及減少及/或預防纖維化的方法。

The invention provides gene therapy vectors, such as adeno-associated virus (AAV) vectors, expressing a miniaturized human micro-dystrophin gene and method of using these vectors to express micro-dystrophin in skeletal muscle s including diaphragm and cardiac muscle and to protect muscle fibers from injury, increase muscle strength and reduce and/or prevent fibrosis in subjects suffering from muscular dystrophy.

指定代表圖：

TW I856016 B

【圖1】

公告本

I856016

【發明摘要】

【中文發明名稱】

腺相關病毒載體遞送肌肉特異性微小肌縮蛋白以治療肌肉萎縮症

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF MUSCLE SPECIFIC MICRO-DYSTROPHIN TO TREAT MUSCULAR DYSTROPHY

【中文】

本發明提供表現小型化人微小肌縮蛋白基因之基因療法載體，諸如腺相關病毒（AAV）載體，以及在患有肌肉萎縮症之個體中使用此等載體在包含隔膜及心臟肌肉之骨胳肌肉中表現微小肌縮蛋白，並防止肌纖維損傷，增加肌肉力量以及減少及/或預防纖維化的方法。

【英文】

The invention provides gene therapy vectors, such as adeno-associated virus (AAV) vectors, expressing a miniaturized human micro-dystrophin gene and method of using these vectors to express micro-dystrophin in skeletal muscle s including diaphragm and cardiac muscle and to protect muscle fibers from injury, increase muscle strength and reduce and/or prevent fibrosis in subjects suffering from muscular dystrophy.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

腺相關病毒載體遞送肌肉特異性微小肌縮蛋白以治療肌肉萎縮症

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF MUSCLE SPECIFIC MICRO-DYSTROPHIN TO TREAT MUSCULAR DYSTROPHY

【技術領域】

【0001】本申請案主張2018年6月18日提交的美國臨時專利申請案第62/686,668號；2018年10月2日提交的美國臨時專利申請案第62/740,402號；2018年10月30日提交的美國臨時專利申請案第62/752,841號；2019年3月25日提交的美國臨時專利申請案第62/823,649號；及2019年6月11日提交的美國臨時專利申請案第62/860,220號的優先權；及2019年6月17日提交的國際申請案第PCT/US2019/037489號，其各自以全文引用的方式併入本文中。

以引用的方式併入以電子方式提交的材料

【0002】本申請案含有呈電腦可讀形式之序列表作為本揭示案之獨立部分，該序列表以全文引用的方式併入本文中且標識如下：檔案名：53169ARTW_Seqlisting.txt；創建大小：60,103位元組；2019年6月17日。

【0003】本發明提供表現小型化人微小肌縮蛋白（micro-dystrophin）基因之基因療法載體，諸如腺相關病毒（AAV）載體，以及在患有肌肉萎縮症之個體中使用此等載體在包含隔膜及心臟肌肉之骨胳肌肉中表現微小肌縮蛋白，並防止肌纖維損傷，增加肌肉力量以及減少及/

或預防纖維化的方法。

【先前技術】

【0004】 肌肉質量及力量對於每日活動，諸如行動及呼吸，及對於整個身體代謝的重要性不言而喻。肌肉功能缺陷引起肌肉萎縮（MD），其特徵在於肌肉無力及消瘦且對生活品質具有嚴重影響。表徵最充分之MD係由編碼肌縮蛋白相關蛋白質複合物（DAPC）成員之基因突變引起。此等MD係與缺失由DAPC引起的肌纖維膜-細胞骨架繫栓相關之膜脆弱性引起。杜興氏肌肉萎縮症（Duchenne Muscular Dystrophy；DMD）係最具破壞性的肌肉疾病之一，每5000個新生男性中即有1個受影響。

【0005】 DMD係由DMD基因突變導致mRNA減少以及不存在肌縮蛋白引起，肌縮蛋白係一種與肌縮蛋白相關蛋白質複合物（DAPC）有關的427 kD肌纖維膜蛋白質（Hoffman等人，《細胞（*Cell*）》51(6):919-28, 1987）。DAPC係由肌肉肌纖維膜處之多種蛋白質構成，這些蛋白質經由肌縮蛋白（一種肌動蛋白結合蛋白）及α-肌縮蛋白聚糖（dystroglycan）（一種層黏連蛋白結合蛋白）在細胞外基質（ECM）與細胞骨架之間形成結構連接。此等結構連接用於使肌肉細胞膜在收縮期間穩定並且防止收縮誘發的損傷。當肌縮蛋白缺失時，膜脆弱性引起肌纖維膜撕裂及鈣內流，由此觸發鈣活化之蛋白酶及區段性纖維壞死（Straub等人，《神經學新見（*Curr Opin. Neurol.*）》10(2): 168-75, 1997）。這種不受控制的肌肉退化與再生循環最終會耗盡肌肉幹細胞群（Sacco等人，《細胞》，2010. 143(7): 第1059-71頁； Wallace等人，《生理學年評（*Annu Rev Physiol*）》，2009. 71: 第37-57頁），導致進行性肌無力、肌內膜炎症及纖維化疤痕形成。

【0006】 若沒有肌縮蛋白或微小肌縮蛋白使膜穩定，則DMD將顯現不受控制的組織損傷與修復循環，最終經由結締組織增殖用纖維化瘢痕組織替代損失之肌纖維。纖維化係以包含膠原蛋白及彈性蛋白在內之ECM基質蛋白過量沈積為特徵。ECM蛋白質主要由諸如TGFβ之細胞介素產生，所述TGFβ係由活化之纖維母細胞對應激及炎症起反應而釋放。儘管DMD之主要病理特徵係肌纖維變性及壞死，但纖維化作為病理性後果具有相同影響。在DMD患者中，纖維化組織之過量產生將限制肌肉再生且造成進行性肌肉無力。在一項研究中，在10年隨訪時，在初始DMD肌肉活體組織切片上纖維化之存在與不良運動後果高度相關（Desguerre等人，《神經病理學與實驗神經病學雜誌（*J Neuropathol Exp Neurol*）》, 2009. 68(7): 第762-7頁）。此等結果指出，纖維化係DMD肌肉功能障礙之主要促成因素且突出顯示在明顯纖維化之前對早期干預之需求。

【0007】 需要增加患有DMD之患者的肌肉力量且防止肌肉損傷之治療。

【發明內容】

【0008】 本發明係關於在包含隔膜及心臟肌肉之骨骼肌中表現微小肌縮蛋白基因以防止肌纖維損傷、增加肌肉力量以及減少及/或預防纖維化的基因療法載體，例如AAV。

【0009】 本發明提供使用基因療法載體遞送微小肌縮蛋白以解決在DMD中所觀察到的基因缺陷，由此增加肌肉力量及/或增加肌肉質量的療法及方法。實例2描述關於杜興氏肌肉萎縮症的全身基因遞送臨床試驗，在本研究中，個體接受2×1014 vg/kg AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。實例3中描述的臨床研究提供一種新穎的關鍵臨床方案，該方案包含隨機

化雙盲安慰劑對照之設計。在研究開始時，對個體隨機分組並使其接受2×10^{14} vg/kg AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白或乳酸林格氏溶液（lactated ringers）。

【0010】本發明提供了包括SEQ ID NO:3、8或9之核苷酸序列的核酸分子。本發明亦提供包括具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021之核酸序列的rAAV，及包括具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021之核酸序列的rAAV粒子。

【0011】本發明之另一態樣提供組合物，其包括含SEQ ID NO:3、8或9之核苷酸序列的核酸分子；含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021之核酸序列的rAAV；以及含具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021之核酸序列的rAAV粒子。本文所揭示方法中之任一種均可用此等組合物進行。

【0012】本發明提供治療有需要人類個體之肌肉萎縮症的方法，所述方法包括投與重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白之步驟，其中所述rAAV係藉由全身投與途徑以約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg之劑量投與。所述肌肉萎縮症可為杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症。

【0013】舉例而言，投與的rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{13}

vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{13} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或1.5×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至

5.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.75×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約2.0×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg。

【0014】在一個實施例中，本發明之方法包括全身投與rAAV，其中所述全身投與途徑係靜脈內途徑且投與的rAAV之劑量係約2.0×10^{14} vg/kg。在另一個實施例中，本發明之方法包括全身投與rAAV，其中所述全身投與途徑係靜脈內途徑且投與的rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg、或約6.0×10^{12} vg/kg、或約7.0×10^{12} vg/kg、或約8.0×10^{12} vg/kg、或約9.0×10^{12} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg、或約1.25×10^{13} vg/kg、或約1.5×10^{13} vg/kg、或約1.75×10^{13} vg/kg、或約2.25×10^{13} vg/kg、或約

2.5×10^{13} vg/kg、或約2.75×10^{13} vg/kg、或約3.0×10^{13} vg/kg、或約3.25×10^{13} vg/kg、或約3.5×10^{13} vg/kg、或約3.75×10^{13} vg/kg、或約4.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg、或約6.0×10^{13} vg/kg、或約7.0×10^{13} vg/kg、或約8.0×10^{13} vg/kg、或約9.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg、或約2.25×10^{14} vg/kg、或約2.5×10^{14} vg/kg、或約2.75×10^{14} vg/kg、或約3.0×10^{14} vg/kg、或約3.25×10^{14} vg/kg、或約3.5×10^{14} vg/kg、或約3.75×10^{14} vg/kg、或約4.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{14} vg/kg、或約6.0×10^{14} vg/kg、或約1×10^{15} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白或AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0015】在本發明方法中之任一種中，投與的rAAV之劑量可以為約5 mL/kg至約15 mL/kg、或約8 mL/kg至約12 mL/kg、或8 mL/kg至約10 mL/kg、或5 mL/kg至約10 mL/kg、或約10 mL/kg至12 mL/k、或約10 mL/kg至15 mL/kg、或10 mL/kg至約20 mL/kg。在一個特定實施例中，投與的劑量或rAAV係約10 mL/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白或AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係具有SEQ

ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0016】 在本發明方法中之任一種中，rAAV之劑量可藉由注射、輸注或植入投與。舉例而言，rAAV之劑量係藉由經約一小時輸注投與。此外，rAAV之劑量係藉由靜脈內途徑，經由周邊肢體靜脈，諸如周邊臂靜脈或周邊腿靜脈投與。或者，輸注可以在約30分鐘、或約1.5小時、或約2小時、或約2.5小時或約3小時內投與。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0017】 藉由本發明方法中之任一種投與的rAAV可包括SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子序列。此外，藉由本發明方法中之任一種投與的rAAV包括SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子序列。舉例而言，rAAV可包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977

或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。

【0018】在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0019】在本發明方法中之任一種中，所投與的rAAV具有血清型AAVrh7.4。

【0020】在一些實施例中，本發明之方法治療杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症。例示性實施例係一種治療有需要人類個體之杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症的方法，所述方法包括投與一定劑量的重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白之步驟，其中投與途徑係靜脈內輸注且在約一小時內投與約2×10^{14} vg/kg劑量之rAAV，且其中rAAV載體包括具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977、或ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0021】在一個實施例中，本發明提供rAAV，其包括肌肉特異性控制元件核苷酸序列，及編碼微小肌縮蛋白蛋白質之核苷酸序列。舉例而

言，核苷酸序列編碼功能性微小肌縮蛋白蛋白質，其中所述核苷酸與SEQ ID NO: 1具有例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、更通常至少90%、91%、92%、93%或94%且甚至更通常至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性，其中所述蛋白質保持微小肌縮蛋白活性。微小肌縮蛋白蛋白質使肌肉膜在肌肉收縮期間具有穩定性，例如微小肌縮蛋白在肌肉收縮期間充當減震器。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0022】本發明亦提供rAAV，其中核苷酸序列包括在嚴格條件下與SEQ ID NO:1之核酸序列或其補體雜交的核苷酸序列，且編碼功能性微小肌縮蛋白蛋白質。

【0023】在一個實施例中，rAAV係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的非複製性重組腺相關病毒（AAV），稱為AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。此載體基因組含有基因表現所需的最小元件，包含AAV2反向末端重複序列（ITR）、微小肌縮蛋白、SV40內含子（SD/SA）及合成聚腺苷酸化（Poly A）信號，所有這些皆在

MHCK7啟動子/強化子控制下。載體基因組及表現卡匣之示意圖示於圖1中。AAVrh74血清型可用以在IV投與後實現骨骼及心臟肌肉中之高效基因轉移。

【0024】 術語「嚴格」用於指本領域中通常理解為嚴格的條件。雜交嚴格度主要由溫度、離子強度及諸如甲醯胺之變性劑的濃度決定。用於雜交及洗滌之嚴格條件的實例係65-68℃下0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉，或在42℃下0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉及50%甲醯胺。參見Sambrook等人，《分子選殖實驗指南（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）》，第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, (紐約冷泉港（Cold Spring Harbor, N.Y.） 1989)。亦可使用更嚴格的條件（諸如更高的溫度、更低的離子強度、更高濃度的甲醯胺或其他變性劑），不過，雜交速率將受到影響。在涉及脫氧寡核苷酸雜交的情況下，其他例示性嚴格雜交條件包含在37℃（針對14個鹼基之寡核苷酸）、48℃（針對17個鹼基之寡核苷酸）、55℃（針對20個鹼基之寡核苷酸）及60℃（針對23個鹼基之寡核苷酸）下在6× SSC 0.05%焦磷酸鈉中洗滌。

【0025】 出於減少非特異性及/或背景雜交之目的，可以在雜交及洗滌緩衝液中包含其他試劑。實例係0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙烯基-吡咯啶酮、0.1%焦磷酸鈉、0.1%十二烷基硫酸鈉、NaDodSO4（SDS）、菲科爾（ficoll）、鄧哈特氏溶液（Denhardt's solution）、音波處理之鮭魚精DNA（或其他非互補DNA）及硫酸葡聚糖，但亦可使用其他適合之試劑。可以在基本上不影響雜交條件嚴格度的情況下改變這些添加劑的濃度及類型。雜交實驗通常在pH 6.8-7.4下進行，然而，在典型離子強度條件下，雜交速率基本上與pH無關。參見Anderson等人，《核酸雜交實踐方法

（Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach）》，第4章，IRL Press Limited (英格蘭牛津（Oxford, England）)。雜交條件可以由本領域中熟習此項技術者調整，以便適應這些變數且允許具有不同序列相關性的DNA形成雜交體。

【0026】 術語「肌肉特異性控制元件」係指調控在肌肉組織中特異性表現的編碼序列之表現的核苷酸序列。此等控制元件包含強化子及啟動子。本發明提供包括肌肉特異性控制元件MCKH7啟動子、MCK啟動子及MCK強化子之構築體。

【0027】 術語「可操作地連接」係指定位調控元件核苷酸序列，例如啟動子核苷酸序列，以使所述調控元件能夠表現所述核苷酸序列。

【0028】 在一個態樣中，本發明提供一種rAAV，其中肌肉特異性控制元件係人骨骼肌動蛋白基因元件、心臟肌動蛋白基因元件、肌細胞特異性強化子結合因子（MEF）、肌肉肌酸激酶（MCK）、截短之MCK（tMCK）、肌凝蛋白重鏈（MHC）、雜交α-肌凝蛋白重鏈強化子-啟動子/MCK強化子-啟動子（MHCK7）、C5-12、鼠類肌酸激酶強化子元件、骨骼快速抽動肌鈣蛋白c基因元件、緩慢抽動心臟肌鈣蛋白c基因元件、緩慢抽動肌鈣蛋白i基因元件、低氧誘導性核因子、類固醇誘導性元件或糖皮質激素反應元件（GRE）。

【0029】 舉例而言，肌肉特異性控制元件係MHCK7啟動子核苷酸序列SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7，或肌肉特異性控制元件係MCK核苷酸序列SEQ ID NO: 4。此外，在本發明之rAAV載體中之任一種中，肌肉特異性控制元件核苷酸序列，例如MHCK7或MCK核苷酸序列，可操作地連接至編碼微小肌縮蛋白蛋白質之核苷酸序列。舉例而言，如圖1或圖2

（SEQ ID NO: 3）或圖13（SEQ ID NO: 9）中所提供之構築體中所陳述，MHCK7啟動子核苷酸序列（SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7）可操作地連接至人微小肌縮蛋白編碼序列（SEQ ID NO: 1）。在另一個實例中，如圖5或圖6（SEQ ID NO: 5）中所提供之構築體中所陳述，MCK啟動子（SEQ ID NO: 4）可操作地連接至人微小肌縮蛋白編碼序列（SEQ ID NO: 1）。在另一態樣中，本發明提供一種rAAV載體，其包括SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2，或SEQ ID NO:1及SEQ ID NO: 7之核苷酸序列。本發明亦提供一種rAAV載體，其包括SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【0030】 在另一態樣中，本發明提供一種包含在質體中之rAAV構築體，其包括SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。舉例而言，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體包括在SEQ ID NO:3內且包含該序列之ITR在內之核苷酸序列且示於圖2中。rAAV載體包括5’ ITR、MHCK7啟動子、嵌合內含子序列、人微小肌縮蛋白基因之編碼序列、多聚腺苷酸及3' ITR。在一個實施例中，所述載體包括SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021。SEQ ID NO:3中陳述之質體進一步包括安比西林（ampicillin）抗性及具有pBR322複製起點之pGEX質體主鏈。

【0031】 在另一態樣中，本發明提供包括SEQ ID NO: 9之核苷酸序列的rAAV。舉例而言，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體構築體包括SEQ ID NO: 9之核苷酸序列且顯示於圖13中。此rAAV載體構築體包括MHCK7啟動子、嵌合內含子序列、人微小肌縮蛋白基因之編碼序列及多聚腺苷酸。在一個實施例中，rAAV載體構築體進一步包括在所述啟動子

5'端之ITR及在所述多聚腺苷酸3'端之ITR。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74。

【0032】 在另一態樣中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體包括在SEQ ID NO: 8內且包含該序列之ITR在內之核苷酸序列且示於圖15中。rAAV載體包括5'ITR、MHCK7啟動子、嵌合內含子序列、人微小肌縮蛋白基因之編碼序列、多聚腺苷酸及3' ITR。在一個實施例中，所述載體包括SEQ ID NO:9之核苷酸1-4977。SEQ ID NO:3中陳述之質體進一步包括卡那黴素（kanamycin）抗性及具有pBR322複製起點之pGEX質體主鏈。

【0033】 在另一態樣中，本發明提供包括AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體構築體之質體。在一個實施例中，所述質體包括5' ITR、MHCK7啟動子、嵌合內含子序列、人微小肌縮蛋白基因之編碼序列、多聚腺苷酸及3'ITR。在一個實施例中，所述質體包括卡那黴素抗性且視情況包括具有pBR322複製起點之pGEX質體主鏈。在一個特定實施例中，所述質體陳述於SEQ ID NO: 8中且示於圖14及15中。

【0034】 本發明提供一種重組AAV載體，其包括SEQ ID NO: 1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列。此rAAV載體係AAV血清型AAVrh.74。

【0035】 本發明亦提供一種rAAV，其包括在SEQ ID NO:3內且包含該序列中之ITR在內的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列、在SEQ ID NO: 8內且包含該序列中之ITR在內的核苷酸序列或如SEQ ID NO: 9中所述之核苷酸序列。此rAAV載體係AAV血清型AAVrh.74。

【0036】 本發明之rAAV載體可為任何AAV血清型，諸如血清型AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、

AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13。

【0037】 本發明亦提供包括本發明之rAAV載體中之任一種的醫藥組合物（或有時在本文中簡稱為「組合物」）。

【0038】 在另一個實施例中，本發明提供製造rAAV載體粒子之方法，其包括培養已用任何本發明之rAAV載體轉染之細胞及自經轉染細胞之上清液回收rAAV粒子。本發明亦提供包括本發明之重組AAV載體中之任一種的病毒粒子。

【0039】 在治療肌肉萎縮症之方法中之任一種中，在投與rAAV之後，個體之細胞中微小肌縮蛋白基因之表現量增加。所述細胞中微小肌縮蛋白基因之表現係藉由用西方墨點法（Western blot）量測在投與所述rAAV前後切片檢查之肌肉中所述微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測。確切地說，在投與rAAV之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與rAAV之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%到至少約80%、或至少約70%到至少約90%、或至少約80%到至少約90%。舉例而言，在投與rAAV之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與rAAV之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%、或至少約71%、或至少約72%、或至少約73%、或至少約74%、或至少約75%、或至少約76%、或至少約77%、或至少約78%、或至少約79%、或至少約80%、或至少約81%、或至少約82%、或至少約83%、或至少約84%、或至少約85%。

【0040】 此外，所述細胞中微小肌縮蛋白基因之表現係藉由用免疫組織化學法量測在投與所述rAAV前後肌肉活體組織切片中所述微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測。在投與rAAV之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與rAAV之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%到至少約

80%、或至少約70%到至少約90%、或至少約80%到至少約90%。舉例而言，在投與rAAV之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與rAAV之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%、或至少約71%、或至少約72%、或至少約73%、或至少約74%、或至少約75%、或至少約76%、或至少約77%、或至少約78%、或至少約79%、或至少約80%、或至少約81%、或至少約82%、或至少約83%、或至少約84%、或至少約85%。

【0041】在治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準有所降低。舉例而言，在投與rAAV之後60天該個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約65%至約90%、或約65%至約95%、或約75%至約90%、或約80%至約90%、或約85%至約95%、或約87%至約95%、或約87%至約90%。確切地說，在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約87%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約72%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約73%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約78%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約95%。在治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與所述rAAV之後所

述個體之肌肉組織中微小肌縮蛋白陽性纖維之數量相較於在投與所述rAAV之前微小肌縮蛋白陽性纖維之數量有所增加。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV前後肌肉活體組織切片上微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測微小肌縮蛋白陽性纖維之數量。

【0042】 在治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，投與rAAV使諸如α-肌聚糖或β-肌聚糖之類DAPC蛋白質的表現上調。舉例而言，在投與rAAV之後所述個體中之α-肌聚糖水準相較於在投與rAAV之前的α-肌聚糖水準有所增加。此外，在投與rAAV之後所述個體中之β-肌聚糖水準相較於在投與rAAV之前的β-肌聚糖水準有所增加。α-肌聚糖或β-肌聚糖之水準係藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測投與rAAV前後肌肉活體組織切片上α-肌聚糖或β-肌聚糖之蛋白質水準來偵測。

【0043】 在治療肌肉萎縮症之方法的任一種中，如藉由以下任一種所量測，所述個體之疾病進展在投與所述rAAV之後延遲：六分鐘步行測試、起身時間（time to rise）、登高4級台階（ascend 4 steps）、登高及下降4級台階（ascend and descend 4 steps）、北極星移動評估（North Star Ambulatory Assessment，NSAA）、10公尺計時測試、100公尺計時測試、手持肌力測定法（HHD）、計時起立行走（Timed Up and Go）及/或大肌肉動作分測試量表（Gross Motor Subtest Scaled）（Bayley-III）分數。

【0044】 舉例而言，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的NSAA分數相較於在投與rAAV之前的NSAA分數有至少6分的改善。另外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的起身時間相較於在投與rAAV之前的起身時間有至少約0.8秒的改善。

此外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的登高4級台階測試的時間相較於在投與rAAV之前登高4級台階測試的時間有至少約1.2秒的改善。另外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的100 m計時測試相較於在投與rAAV之前的100 m計時測試有至少約7秒的改善。

【0045】 在另一個實施例中，本發明提供在患者細胞中表現微小肌縮蛋白基因之方法，其包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體前後肌肉活體組織切片中微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測患者細胞中微小肌縮蛋白基因之表現。此外，亦藉由偵測每個核中載體基因組之數量增加來量測患者中微小肌縮蛋白基因之表現，其中每個核中1個載體基因組有約50%微小肌縮蛋白表現且每個核中超過1個複本符合微小肌縮蛋白表現量。舉例而言，所述細胞每個核有1.2個載體複本、或每個核有1.3個載體複本、或每個核有1.4個載體複本、或每個核有1.5個載體複本、或每個核有1.6個載體複本、或每個核有1.7個載體複本、或每個核有1.8個載體複本、或每個核有1.9個載體複本。

【0046】 在另一個實施例中，本發明提供降低有需要患者中之血清CK水準之方法，所述方法包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。舉例而言，在投與rAAV之後60天患者中之血清CK水準相較於在投

與rAAV之前的血清CK水準降低至少約65%至約90%、或約65%至約95%、或約75%至約90%、或約80%至約90%、或約85%至約95%、或約87%至約95%、或約87%至約90%。確切地說，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約87%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約72%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約73%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約78%，或在本發明的治療肌肉萎縮症之方法中的任一種中，在投與rAAV之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低約95%。

【0047】 本發明亦提供增加患者肌肉組織中之微小肌縮蛋白陽性纖維之方法，其包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV前後肌肉活體組織切片上肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測微小肌縮蛋白陽性纖維之數量。此外，亦藉由偵測每個核中載體基因組之數量增加來量測患者中微小肌縮蛋白基因之表現，其中每個核中1個載體基因組有約50%微小肌縮蛋白表現且每個核中超過1個複本符合微小肌縮蛋白表現量。舉例而言，所述細胞每個核有1.2個載體複本、或每個核有1.3個載體複本、或每個核有1.4個

載體複本、或每個核有1.5個載體複本、或每個核有1.6個載體複本、或每個核有1.7個載體複本、或每個核有1.8個載體複本、或每個核有1.9個載體複本。

【0048】 在另一個實施例中，本發明提供增加有需要患者中α-肌聚糖之表現的方法，其包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV前後肌肉活體組織切片上α-肌聚糖之蛋白質水準來偵測α-肌聚糖之水準。

【0049】 此外，本發明提供增加有需要患者中β-肌聚糖之表現的方法，其包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV前後肌肉活體組織切片上β-肌聚糖之蛋白質水準來偵測β-肌聚糖之水準。

【0050】 本發明亦提供治療患有杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症之患者的方法，其包括向所述患者投與具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列，使得如藉由以下任一種所量測，患者之疾病進展延遲：六分鐘步行測試、起身時間、登高4級台階、登高及下降4級台階、北極星移動評估（NSAA）、10公尺計時測試、100公尺計時測試、手持肌力測定法（HHD）、計時起立行走及/或大肌肉動作分測試量表（Bayley-III）分

數。

【0051】舉例而言，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的NSAA分數相較於在投與rAAV之前的NSAA分數有至少6分的改善。另外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的起身時間相較於在投與rAAV之前的起身時間有至少約0.8秒的改善。此外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的登高4級台階測試的時間相較於在投與rAAV之前登高4級台階測試的時間有至少約1.2秒的改善。另外，在任何一種方法中，所述個體在投與rAAV之後至少270天的100 m計時測試相較於在投與rAAV之前的100 m計時測試有至少約7秒的改善。

【0052】「纖維化」係指組織在損傷後細胞外基質（ECM）組分過量的或不受調控的沈積以及異常修復過程，所述組織包含骨胳肌肉、心臟肌肉、肝、肺、腎臟及胰臟。沈積之ECM組分包含纖維結合蛋白及膠原蛋白，例如膠原蛋白1、膠原蛋白2或膠原蛋白3。

【0053】本發明亦提供減少或預防患有肌肉萎縮症之個體中之纖維化的方法，其包括投與治療有效量的包括SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列的rAAV；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV載體。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在另一個實施例中，

AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在另一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5066的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在另一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0054】在另一個實施例中，本發明提供預防有需要個體之纖維化的方法，其包括投與治療有效量的SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAV74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV載體。舉例而言，可以將本發明之rAAV中的任一種投與患有肌肉萎縮症之個體以預防纖維化，例如在所述個體中觀察在纖維化之前投與的表現人微小肌縮蛋白蛋白質的本發明之rAAV。此外，亦可將表現人微小肌縮蛋白基因的本發明之rAAV投與有發展纖維化之風險的個體，諸如患有或經診斷患有肌肉萎縮症，例如DMD的個體。本發明之rAAV可投與患有肌肉萎縮症之個體以便預防此等個體中出現新的纖維化。

【0055】本發明涵蓋在個體中觀察到纖維化之前投與rAAV。另外，亦可將rAAV投與有發展纖維化風險之個體，諸如患有或經診斷患有肌肉萎縮症，例如DMD的個體。rAAV可投與已發展纖維化的患有肌肉萎縮症之個體以便預防此等個體中出現新的纖維化。

【0056】 本發明亦提供增加患有肌肉萎縮症之個體之肌肉力量及/或肌肉質量的方法，其包括投與治療有效量的SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV。

【0057】 本發明涵蓋在所述個體中觀察到纖維化之前或在肌肉力量減小之前或在肌肉質量降低之前向診斷患有DMD之個體投與rAAV載體。

【0058】 本發明亦涵蓋向已發展纖維化的患有肌肉萎縮症之個體投與SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV，以便預防在這些個體中出現新的纖維化或減少這些個體中之纖維化。本發明亦提供向肌肉力量已減小或肌肉質量已降低的患有肌肉萎縮症之個體投與SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV載體，以便防止肌肉進一步損傷。

【0059】 在本發明方法中之任一種中，個體可患有肌肉萎縮症，諸如DMD，或任何其他肌縮蛋白相關肌肉萎縮症。

【0060】 在本文所描述的本發明方法中之任一種的其他實施例中，

在投與rAAV之後所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的所述血清CK水準降低選自由以下組成之群組的百分比水準：

a)在所述投與之後90、180或270天降低至少78%；

b)在所述投與之後270天降低至少46、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70或85%；

c)在所述投與之後180天降低至少72、73、74或95%；

d)在所述投與之後90天降低至少87、88、93或95%；

e)在所述投與之後270天降低至少70%；

f)在所述投與之後90、180或270天降低70至95%；

g)在投與之後90、180或270天降低至少56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%；以及

h)在投與之後90、180或270天降低至少56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%。

【0061】在另一個實施例中，本發明提供用於治療有需要人類個體之肌肉萎縮症的組合物，其中所述組合物包括一定劑量的重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白，其中組合物係調配用於全身投與途徑且rAAV之劑量係約1×10^{14} vg/kg至約4×10^{14} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之

核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0062】舉例而言，本發明之組合物包括的rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{13} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約

3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或1.5×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.75×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約2.0×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14}

vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0063】在一個實施例中，本發明之組合物係調配用於靜脈內投與且包括約2.0×10^{14} vg/kg劑量之rAAV。在另一個實施例中，本發明之組合物係調配用於靜脈內投與且包括的rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg、或約6.0×10^{12} vg/kg、或約7.0×10^{12} vg/kg、或約8.0×10^{12} vg/kg、或約9.0×10^{12} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg、或約1.25×10^{13} vg/kg、或約1.5×10^{13} vg/kg、或約1.75×10^{13} vg/kg、或約2.25×10^{13} vg/kg、或約2.5×10^{13} vg/kg、或約2.75×10^{13} vg/kg、或約3.0×10^{13} vg/kg、或約3.25×10^{13} vg/kg、或約3.5×10^{13} vg/kg、或約3.75×10^{13} vg/kg、或約4.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg、或約6.0×10^{13} vg/kg、或約7.0×10^{13} vg/kg、或約8.0×10^{13} vg/kg、或約9.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg、或約2.25×10^{14} vg/kg、或約2.5×10^{14} vg/kg、或約2.75×10^{14} vg/kg、或約3.0×10^{14} vg/kg、或約3.25×10^{14} vg/kg、或約3.5×10^{14} vg/kg、或約3.75×10^{14} vg/kg、或約4.0×10^{14} vg/kg、或約

5.0×10^{14} vg/kg、或約6.0×10^{14} vg/kg、或約1×10^{15}。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在另一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0064】 在本發明組合物中之任一種中，遞送的rAAV之劑量係約5 mL/kg至約15 mL/kg、或約8 mL/kg至約12 mL/kg、或8 mL/kg至約10 mL/kg、或5 mL/kg至約10 mL/kg、或約10 mL/kg至12 mL/kg、或約10 mL/kg至15 mL/kg、或10 mL/kg至約20 mL/kg。在一個特定實施例中，所述組合物包括遞送約10 mL/kg劑量之rAAV。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在另一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0065】 本發明之組合物係調配用於藉由注射、輸注或植入投與。舉例而言，所述組合物係調配用於藉由經約一小時輸注來投與。此外，本發明之組合物係調配用於經由周邊肢體靜脈，諸如周邊臂靜脈或周邊腿靜

脈經靜脈內投與。或者，輸注可以在約30分鐘、或約1.5小時、或約2小時、或約2.5小時或約3小時內投與。

【0066】 本發明組合物中之任一種包括含SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子序列的rAAV，或含具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的rAAV載體。

【0067】 確切地說，本發明之組合物係用於治療杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症。舉例而言，本發明提供用於治療有需要人類個體之杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症的組合物，其中所述組合物包括一定劑量的重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白，其中所述組合物係調配用於藉由經約一小時靜脈內輸注來投與且投與的rAAV之劑量係約2×10^{14} vg/kg，且其中所述rAAV包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。

【0068】 在另一個實施例中，本發明亦提供一種包括rAAV之組合物，其用於減少有需要個體中之纖維化。此外，本發明亦提供一種包括rAAV載體之組合物，其用於預防患有肌肉萎縮症之個體之纖維化。

【0069】 本發明亦提供包括rAAV之組合物，其用於增加患有肌肉萎縮症之個體之肌肉力量及/或肌肉質量。在另一個實施例中，本發明提供包括本發明之rAAV中之任一種的組合物，其用於治療肌肉萎縮症。

【0070】 在本發明組合物中之任一種的其他實施例中，在將所述組

合物投與需要治療肌肉萎縮症之人類個體之後，所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物之前的血清CK水準降低選自由以下組成之群組的百分比水準：

a)在所述投與之後90、180或270天降低至少78%；

b)在所述投與之後270天降低至少46、55、70或85%；

c)在所述投與之後180天降低至少72、73、74或95%；

d)在所述投與之後90天降低至少87、99、93或95%；

e)在所述投與之後270天降低至少70%；

f)在所述投與之後90、180或270天降低70至95%；

g)在所述投與之後90、180或270天降低至少69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%；以及

h)在所述投與之後90、180或270天降低69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%。

【0071】 在另一個實施例中，本發明提供一定劑量的重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白的用途，其用於製備供治療有需要人類個體之肌肉萎縮症用的藥劑，其中所述藥劑係調配用於全身投與途徑且rAAV之劑量係約1×10^{14} vg/kg至約4×101^{4} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係

AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0072】舉例而言，所述藥劑包括的rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約2.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{12} vg/kg至約1.0×10^{13} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或5.0×10^{13} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約6.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約5.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或1.0×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg

至6.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.25×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.25×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或1.5×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或1.75×10^{14} vg/kg至約1.0×10^{15} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至4.0×10^{14}、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約3.0×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.75×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.25×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg至約2.0×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至1.0×10^{15}、或約2.0×10^{14} vg/kg至6.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至5.0×10^{14}、或約2.0×10^{14} vg/kg至約4.0×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.75×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.5×10^{14} vg/kg、或約2.0×10^{14} vg/kg至約3.25×10^{14} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮

蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0073】 在一個實施例中，本發明之方法係調配用於全身投與一定劑量的rAAV，其中所述全身投與途徑係靜脈內途徑且投與的rAAV之劑量係約2.0×10^{14} vg/kg。在另一個實施例中，本發明之藥劑係調配用於全身投與一定劑量的rAAV，其中所述全身投與途徑係靜脈內途徑且rAAV之劑量係約5.0×10^{12} vg/kg、或約6.0×10^{12} vg/kg、或約7.0×10^{12} vg/kg、或約8.0×10^{12} vg/kg、或約9.0×10^{12} vg/kg、或約1.0×10^{13} vg/kg、或約1.25×10^{13} vg/kg、或約1.5×10^{13} vg/kg、或約1.75×10^{13} vg/kg、或約2.25×10^{13} vg/kg、或約2.5×10^{13} vg/kg、或約2.75×10^{13} vg/kg、或約3.0×10^{13} vg/kg、或約3.25×10^{13} vg/kg、或約3.5×10^{13} vg/kg、或約3.75×10^{13} vg/kg、或約4.0×10^{13} vg/kg、或約5.0×10^{13} vg/kg、或約6.0×10^{13} vg/kg、或約7.0×10^{13} vg/kg、或約8.0×10^{13} vg/kg、或約9.0×10^{13} vg/kg、或約1.0×10^{14} vg/kg、或約1.25×10^{14} vg/kg、或約1.5×10^{14} vg/kg、或約1.75×10^{14} vg/kg、或約2.25×10^{14} vg/kg、或約2.5×10^{14} vg/kg、或約2.75×10^{14} vg/kg、或約3.0×10^{14} vg/kg、或約3.25×10^{14} vg/kg、或約3.5×10^{14} vg/kg、或約3.75×10^{14} vg/kg、或約4.0×10^{14} vg/kg、或約5.0×10^{14} vg/kg、或約6.0×10^{14} vg/kg、或約1×10^{15} vg/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在

一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0074】在本發明之用途中的任一個中，所述藥劑包括的rAAV之劑量係約5 mL/kg至約15 mL/kg、或約8 mL/kg至約12 mL/kg、或8 mL/kg至約10 mL/kg、或5 mL/kg至約10 mL/kg、或約10 mL/kg至12 mL/k、或約10 mL/kg至15 mL/kg、或10 mL/kg至約20 mL/kg。在一個特定實施例中，所述劑量或rAAV係約10 mL/kg。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，rAAV係AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。在一個實施例中，AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白係具有SEQ ID NO:5之核苷酸56-4820的AAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白。

【0075】在本發明之用途中的任一個中，所述藥劑係調配用於藉由注射、輸注或植入投與。舉例而言，所述藥劑係調配用於藉由經約一小時輸注來投與。此外，所述藥劑係調配用於經由周邊肢體靜脈，諸如周邊臂靜脈或周邊腿靜脈經靜脈內投與。或者，輸注可以在約30分鐘、或約1.5小時、或約2小時、或約2.5小時或約3小時內投與。

【0076】 在本發明之用途中之任一個中，所述藥劑包括rAAV，其包括SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子序列，或具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。

【0077】 本發明之特定用途係用於製備供治療杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症用之藥劑。舉例而言，本發明提供一定劑量重組腺病毒相關（rAAV）rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白之用途，其係用於製備供治療有需要人類個體之杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症用之藥劑，其中所述藥劑係調配用於藉由經約一小時靜脈內輸注來投與且投與的rAAV之劑量係約2×10^{14} vg/kg，且其中所述rAAV包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。

【0078】 在另一個實施例中，本發明提供rAAV之用途，其用於製備供減少有需要個體中之纖維化用的藥劑。舉例而言，所述有需要個體可能患有肌肉萎縮症，諸如DMD或任何其他肌縮蛋白相關肌肉萎縮症。

【0079】 在另一個實施例中，本發明提供rAAV之用途，其用於製備供預防患有肌肉萎縮症之個體之纖維化的藥劑。

【0080】 此外，本發明提供rAAV之用途，其用於製備供增加患有肌肉萎縮症之個體之肌肉力量及/或肌肉質量的藥劑。

【0081】 本發明亦提供rAAV之用途，其用於製備供治療肌肉萎縮症用的藥劑。

【0082】 本發明提供包括SEQ ID NO:1之人微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:2或SEQ ID NO: 7之MHCK7啟動子核苷酸序列之rAAV載體的用途，其用於製備供治療肌肉萎縮症用之藥劑；或包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022之AAVrf74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列之rAAV載體的用途，其用於治療肌肉萎縮症。

【0083】 在本發明之用途中之任一個的其他實施例中，在向個體投與rAAV之後所述個體中之血清CK水準相較於在投與rAAV之前的血清CK水準降低選自由以下組成之群組的百分比水準：

a)在所述投與之後90、180或270天降低至少78%；

b)在所述投與之後270天降低至少46、55、70或95%；

c)在所述投與之後180天降低至少72、73、74或95%；

d)在所述投與之後90天降低至少87、88、93或95%；

e)在所述投與之後270天降低至少70%；

f)在所述投與之後90、180或270天降低70至95%；

g)在所述投與之後90、180或270天降低至少69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%；以及

h)在所述投與之後90、180或270天降低69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%。

【0084】 在用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後，個體之細胞中微

小肌縮蛋白基因表現之水準增加。所述細胞中微小肌縮蛋白基因之表現係藉由用西方墨點法量測在投與所述組合物或藥劑前後切片檢查之肌肉中所述微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測。確切地說，在投與所述組合物或藥劑之後微小肌縮蛋白蛋白質之水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%到至少約80%、或至少約70%到至少約90%、或至少約80%到至少約90%。舉例而言，在投與所述組合物之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%、或至少約71%、或至少約72%、或至少約73%、或至少約74%、或至少約75%、或至少約76%、或至少約77%、或至少約78%、或至少約79%、或至少約80%、或至少約81%、或至少約82%、或至少約83%、或至少約84%、或至少約85%。

【0085】 此外，亦藉由用免疫組織化學法量測在投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片中所述微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測所述細胞中微小肌縮蛋白基因之表現。在投與rAAV之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%到至少約80%、或至少約70%到至少約90%、或至少約80%到至少約90%。舉例而言，在投與所述組合物或藥劑之後微小肌縮蛋白之蛋白質水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前微小肌縮蛋白之水準增加至少約70%、或至少約71%、或至少約72%、或至少約73%、或至少約74%、或至少約75%、或至少約76%、或至少約77%、或至少約78%、或至少約79%、或至少約80%、或至少約81%、或至少約82%、或至少約83%、或至少約84%、或至少約85%。

【0086】 在用於治療肌肉萎縮症之組合物中的任一種中，在投與

rAAV之後所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準有所降低。舉例而言，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低約65%至約90%、或約65%至約95%、或約75%至約90%、或約80%至約90%、或約85%至約95%、或約87%至約95%、或約87%至約90%。確切地說，在本發明的用於治療肌肉萎縮症之組合物中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清水準降低約87%，或在本發明的用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低約72%，或在本發明的用於治療肌肉萎縮症之組合物中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低約73%，或在本發明的用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物之前的血清CK水準降低約78%，或在本發明的用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低約95%。在用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，在投與所述組合物或藥劑之後所述個體之肌肉組織中微小肌縮蛋白陽性纖維之數量相較於在投與所述組合物或藥劑之前的微小肌縮蛋白陽性纖維之數量有所增加。舉例而言，藉由用西方

墨點法或免疫組織化學法量測在投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片上微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測微小肌縮蛋白陽性纖維之數量。

【0087】 在用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，投與所述組合物或藥劑使諸如α-肌聚糖或β-肌聚糖之類蛋白質之表現上調。舉例而言，在投與所述組合物或藥劑之後所述個體中之α-肌聚糖水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的α-肌聚糖水準有所增加。此外，在投與所述組合物或藥劑之後所述個體中之β-肌聚糖水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的β-肌聚糖水準有所增加。α-肌聚糖或β-肌聚糖之水準係藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片上α-肌聚糖或β-肌聚糖之蛋白質水準來偵測。

【0088】 在用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種中，如藉由以下任一種所量測，所述個體之疾病進展在投與所述組合物或藥劑之後延遲：六分鐘步行測試、起身時間、登高4級台階、登高及下降4級台階、北極星移動評估（NSAA）、10公尺計時測試、100公尺計時測試、手持肌力測定法（HHD）、計時起立行走及/或大肌肉動作分測試量表（Bayley-III）分數。

【0089】 舉例而言，在投與用於治療肌肉萎縮症之組合物或藥劑用於治療肌肉萎縮症之用途中的任一種之後，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的NSAA分數相較於在投與rAAV之前的NSAA分數有至少6分的改善。另外，在任何一種方法中，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的起身時間相較於在投與所述組合物或藥劑之前的起身時間有至少約0.8秒的改善。此外，在本發明之方法或用途中的任一

種中，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的登高4級台階測試的時間相較於在投與所述組合物或藥劑之前的登高4級台階測試的時間有至少約1.2秒的改善。此外，在本發明之方法或用途中的任一種中，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的100 m計時測試相較於在投與所述組合物或藥劑之前的100 m計時測試有至少約7秒的改善。

【0090】 在另一個實施例中，本發明提供用於在患者細胞中表現微小肌縮蛋白基因之組合物，其包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。在另一個實施例中，本發明提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供在患者細胞中表現微小肌縮蛋白基因用之藥劑。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體前後肌肉活體組織切片中微小肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測患者細胞中微小肌縮蛋白基因之表現。此外，亦藉由偵測每個核中載體基因組之數量增加來量測患者中微小肌縮蛋白基因之表現，其中每個核中1個載體基因組有約50%微小肌縮蛋白表現且每個核中超過1個複本符合微小肌縮蛋白表現量。舉例而言，所述細胞每個核有1.2個載體複本、或每個核有1.3個載體複本、或每個核有1.4個載體複本、或每個核有1.5個載體複本、或每個核有1.6個載體複本、或每個核有1.7個載體複本、或每個核有1.8個載體複本、或每個核有1.9個載體複本。

【0091】 在另一個實施例中，本發明提供用於降低有需要患者中之

血清CK水準的組合物，所述組合物包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。此外，本發明亦提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022之AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供降低有需要患者中之血清CK水準用的藥劑。舉例而言，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述患者中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低至少約65%至約90%、或約65%至約95%、或約75%至約90%、或約80%至約90%、或約85%至約95%、或約87%至約95%、或約87%至約90%。確切地說，在投與所述組合物或藥劑之後60天所述個體中之血清CK水準相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清CK水準降低約87%，或在投與所述組合物或藥劑之後60天相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清水準降低約72%，或在投與所述組合物或藥劑之後60天相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清水準降低約73%，或在投與所述組合物或藥劑之後60天相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清水準降低約78%，或在投與所述組合物或藥劑之後60天相較於在投與所述組合物或藥劑之前的血清水準降低約95%。

【0092】 本發明亦提供用於增加患者肌肉組織中之微小肌縮蛋白陽性纖維的組合物，其包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。此外，本發明亦提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ

ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供增加患者肌肉組織中之微小肌縮蛋白陽性纖維用的藥劑。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片上肌縮蛋白之蛋白質水準來偵測微小肌縮蛋白陽性纖維之數量。此外，亦藉由偵測每個核中載體基因組之數量增加來量測患者中微小肌縮蛋白基因之表現，其中每個核中1個載體基因組有約50%微小肌縮蛋白表現且每個核中超過1個複本符合微小肌縮蛋白表現量。舉例而言，所述細胞每個核有1.2個載體複本、或每個核有1.3個載體複本、或每個核有1.4個載體複本、或每個核有1.5個載體複本、或每個核有1.6個載體複本、或每個核有1.7個載體複本、或每個核有1.8個載體複本、或每個核有1.9個載體複本。

【0093】 在另一個實施例中，本發明提供用於增加有需要患者中之α-肌聚糖表現的組合物，其包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。本發明亦提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供增加有需要患者中之α-肌聚糖表現用的藥劑。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片上α-肌聚糖之蛋白質水準來偵測α-肌聚糖之水準。

【0094】 此外，本發明亦提供用於增加有需要患者中之β-肌聚糖表

現的組合物，其包括具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列。本發明亦提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供增加有需要患者中之β-肌聚糖表現用的藥劑。舉例而言，藉由用西方墨點法或免疫組織化學法量測在投與所述組合物或藥劑前後肌肉活體組織切片上β-肌聚糖之蛋白質水準來偵測β-肌聚糖之水準。

【0095】 本發明亦提供一定劑量具有SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021、SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977或SEQ ID NO:6之核苷酸56-5022的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體核苷酸序列的用途，其用於製備供治療患有杜興氏肌肉萎縮症或貝克氏肌肉萎縮症之患者用的藥劑，使得如藉由以下任一種所量測，投與所述藥劑使患者之疾病進展延遲：六分鐘步行測試、起身時間、登高4級台階、登高及下降4級台階、北極星移動評估（NSAA）、10公尺計時測試、100公尺計時測試、手持肌力測定法（HHD）、計時起立行走及/或大肌肉動作分測試量表（Bayley-III）分數。

【0096】 舉例而言，所述個體在投與所述所述組合物或藥劑之後至少270天的NSAA分數相較於在投與所述組合物或藥劑之前的NSAA分數有至少6分的改善。另外，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的起身時間相較於在投與所述組合物或藥劑之前的起身時間有至少約0.8秒的改善。此外，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天

的登高4級台階測試的時間相較於在投與所述組合物或藥劑之前的登高4級台階測試的時間有至少約1.2秒的改善。此外，所述個體在投與所述組合物或藥劑之後至少270天的100 m計時測試相較於在投與所述組合物或藥劑之前的100 m計時測試有至少約7秒的改善。

【圖式簡單說明】

【0097】 **圖1**示出rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體。在此構築體中，cDNA表現卡匣側接AAV2反向末端重複序列（ITR）。構築體之特徵在於框內桿缺失（R4-R23），同時鉸鏈1、2及4（H_1、H_2及H_4）以及富含半胱胺酸之結構域仍產生138 kDa蛋白質。微小肌縮蛋白（3579 bp）之表現係由MHCK7啟動子（795 bp）引導。內含子及5' UTR源自質體pCMVβ（Clontech）。微小肌縮蛋白卡匣具有共同Kozak剛好在ATG起點前，及用於mRNA終止的小的53 bp合成多聚腺苷酸信號。如Harper等人（《自然-醫學（*Nature Medicine*）》 8, 253-261 (2002)）先前所描述，人微小肌縮蛋白卡匣含有（R4-R23/Δ71-78）結構域。

【0098】 **圖2**提供AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之核酸序列（SEQ ID NO: 3）。

【0099】 **圖3**提供pNLREP2-Caprh74 AAV輔助質體圖譜。

【0100】 **圖4**提供Ad輔助質體pHELP。

【0101】 **圖5**示出rAAV.MCK.微小肌縮蛋白質體構築體。

【0102】 **圖6**提供rAAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白之核酸序列（SEQ ID NO: 5）。

【0103】 **圖7**展示如藉由免疫細胞化學法量測的腓腸肌活體組織切片之肌纖維中的微小肌縮蛋白基因表現。

【0104】 **圖8A-8C**提供展示在校正分子量下微小肌縮蛋白蛋白質表現之西方墨點。在圖8C中，當在初始分析中超過ULDQ（>80%）時，將受試者4樣品（*）以1:4稀釋（至線性範圍），並用平均值乘以稀釋度校正因子，得到相較於正常值的最終值。相對於正常值的平均微小肌縮蛋白表現在方法1中為182.7%且在方法2中為222.0%。

【0105】 **圖9A-9C**展示投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白使DAPC蛋白質、α-肌聚糖及β-肌聚糖之表現上調。

【0106】 **圖10**展示藉由投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白引起的肌酸激酶（CK）之持續顯著減少。

【0107】 **圖11**提供自基線至第270天的平均CK變化。此資料展示，在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後，CK隨時間明顯減少。

【0108】 **圖12**提供自基線至第270天的平均NSAA變化及平均CK變化。此資料展示，在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後，NSAA隨時間明顯增加。

【0109】 **圖13**提供AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之核酸序列（SEQ ID NO: 9）。

【0110】 **圖14**示出AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白質體構築體。

【0111】 **圖15**提供AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白質體構築體之核酸序列（SEQ ID NO: 8），其包括卡那黴素抗性基因。

【實施方式】

【0112】 本發明提供過度表現人微小肌縮蛋白之基因療法載體，例如rAAV載體，及減少及預防肌肉萎縮症患者中之纖維化之方法。在診斷患有DMD之最早時期採集之肌肉活體組織切片展現顯著的結締組織增

殖。肌肉纖維化以多種方式引起有害作用。其減少肌內膜養分穿過結締組織屏障之正常運輸，減小血流量且剝奪肌肉中來源於血管之營養成分，並經由肢體攣縮而在功能上造成早期無法步行。隨時間推移，治療難度因肌肉中之明顯纖維化而成倍增加。這可在肌肉活體組織切片中藉由比較連續時間點時結締組織之增殖觀察到。所述過程不斷加劇，導致無法步行且加速失控，尤其是在依賴輪椅之患者中。

【0113】 若不進行早期治療，包含減少纖維化之並行方法，則不太可能完全實現外顯子跳躍、終止密碼子通讀或基因替代療法之益處。若沒有減少肌肉纖維化之方法，即使是小分子或蛋白質替代策略亦可能會失敗。先前用AAV.微小肌縮蛋白治療發生纖維化之老年*mdx*小鼠的研究展示，吾人無法實現完全功能復原（Liu, M.等人，《分子治療（*Mol Ther*）》 11, 245-256 (2005)）。亦已知DMD心肌病之進展伴隨著心室壁中疤痕形成及纖維化。

【0114】 如本文所使用，術語「AAV」係腺相關病毒之標準縮寫。腺相關病毒係僅在由共感染輔助病毒提供某些功能之細胞中生長之單股DNA小病毒。當前有十三種得到表徵之AAV血清型。關於AAV之總體資訊及綜述可見於例如Carter, 1989, 《細小病毒手冊（Handbook of Parvoviruses）》，第1卷，第169-228頁，及Berns, 1990, 《病毒學（Virology）》, 第1743-1764頁, Raven Press, (紐約)中。然而，完全可以預料到此等相同原理將適用於其他AAV血清型，因為眾所周知，各種血清型在結構上及功能上關聯極其緊密，甚至是在基因層面上亦如此。（參見例如Blacklowe, 1988, 《細小病毒及人類疾病（Parvoviruses and Human Disease）》，第165-174頁，J. R. Pattison編；及Rose, 《綜合病毒學

（Comprehensive Virology）》 3:1-61 (1974)）。舉例而言，所有AAV血清型表觀上展現極其類似的由同源rep基因介導之複製特性；且全部皆帶有三種相關衣殼蛋白，諸如在AAV2中表現之該等蛋白質。相關性程度藉由沿基因組長度在各血清型之間展現廣泛交叉雜交的異雙螺旋分析；及在對應於「反向末端重複序列」（ITR）之末端處類似自黏接區段之存在進一步表明。類似感染性模式亦表明各血清型中之複製功能受到類似調節控制。

【0115】 如本文所使用，「AAV載體」係指包括一或多個所關注聚核苷酸（或轉殖基因）側接AAV末端重複序列（ITR）之載體。當感染性病毒粒子存在於用編碼及表現rep及cap基因產物之載體轉染的宿主細胞中時，此類AAV載體可複製及包裝至感染性病毒粒子中。

【0116】 「AAV病毒體」或「AAV病毒粒子」或「AAV載體粒子」係指由至少一個AAV衣殼蛋白及衣殼包裹之聚核苷酸AAV載體構成的病毒粒子。若所述粒子包括異源聚核苷酸（亦即，除野生型AAV基因組，諸如待遞送至哺乳動物細胞之轉殖基因以外的聚核苷酸），則其通常稱為「AAV載體粒子」或簡稱為「AAV載體」。因此，AAV載體粒子之製造必定包含AAV載體之製造，由此載體被包含在AAV載體粒子內。

AAV

【0117】 腺相關病毒（AAV）係複製缺陷型細小病毒，其單股DNA基因組係約4.7 kb長度，包含145個核苷酸之反向末端重複序列（ITR）。有多種AAV血清型。已知AAV血清型之基因組的核苷酸序列。舉例而言，AAV血清型2（AAV2）基因組之核苷酸序列呈現於如由Ruffing等人，《普通病毒學雜誌（*J Gen Virol*）》，75: 3385-3392 (1994)修正之

Srivastava等人，《病毒學雜誌（*J Virol*）》，45: 555-564 (1983)中。作為其他實例，AAV-1之完整基因組提供於GenBank寄存編號NC_002077中；AAV-3之完整基因組提供於GenBank寄存編號NC_1829中；AAV-4之完整基因組提供於GenBank寄存編號NC_001829中；AAV-5基因組提供於GenBank寄存編號AF085716中；AAV-6之完整基因組提供於GenBank寄存編號NC_00 1862中；AAV-7及AAV-8基因組之至少部分分別提供於GenBank寄存編號AX753246及AX753249中（關於AAV-8亦參見美國專利第7,282,199號及第7,790,449號）；AAV-9基因組提供於Gao等人，《病毒學雜誌》，78: 6381-6388 (2004)中；AAV-10基因組提供於《分子治療》，13(1): 67-76 (2006)中；且AAV-11基因組提供於《病毒學》，330(2): 375-383 (2004)中。AAVrh.74血清型之選殖描述於Rodino-Klapac.等人，《轉化醫學雜誌（*Journal of translational medicine*）》**5**, 45 (2007)中。引導病毒DNA複製（rep）、衣殼包裹/包裝及宿主細胞染色體整合之順式作用序列係包含在ITR內。三個AAV啟動子（針對其相關圖譜位置命名為p5、p19及p40）驅動編碼兩個AAV內部開放閱讀框架之rep及cap基因的表現。兩個rep啟動子（p5及p19）與單個AAV內含子之差異性剪接偶合（例如在AAV2核苷酸2107及2227處）使得由rep基因產生四種rep蛋白質（rep 78、rep 68、rep 52及rep 40）。Rep蛋白質具有最終負責複製病毒基因組的多種酶特性。cap基因由p40啟動子表現，且其編碼三種衣殼蛋白VP1、VP2及VP3。替代性剪接及非共同轉譯起始位點負責產生三種相關衣殼蛋白。單個共同聚腺苷酸化位點係位於AAV基因組之圖譜位置95處。在Muzyczka，《微生物學及免疫學之當前課題（*Current Topics in Microbiology and Immunology*）》，*158*: 97-129 (1992)中評述

AAV之生命週期及遺傳。

【0118】 AAV具有獨特特徵，使得其成為例如基因療法中用於將外來DNA遞送至細胞的引人注目之載體。AAV在培養物中感染細胞係不致細胞病變的，且對人類及其他動物之天然感染為沉默且無症狀的。此外，AAV感染多種哺乳動物細胞，使得有可能在活體內靶向多種不同組織。另外，AAV緩慢地轉導分裂細胞及非分裂細胞，且在該等細胞之生命期內可基本上保持轉錄活性細胞核游離基因體（染色體外元件）形式。AAV前病毒基因組作為質體中選殖之DNA具有感染性，使得構築重組基因組變得可行。此外，由於引導AAV複製、基因組衣殼包裹及整合之信號係包含在AAV基因組之ITR內，故固有的大約4.3 kb之基因組（編碼複製及結構性衣殼蛋白，rep-cap）中的一些或全部可經外來DNA，諸如含有啟動子、所關注DNA及聚腺苷酸化信號之基因卡匣替代。rep及cap蛋白質可以反式提供。AAV之另一個顯著特徵在於其係極其穩定且充滿活力之病毒。其容易地承受用於滅活腺病毒（在56℃至65℃下保持數小時）的條件，使得AAV之低溫保藏不那麼重要。甚至能將AAV凍乾。最後，經AAV感染之細胞對重複感染不具抗性。

【0119】 多項研究展示出肌肉中長期（＞ 1.5年）重組AAV介導之蛋白質表現。參見Clark等人，《人類基因療法（*Hum Gene Ther*）》，*8*: 659-669(1997)；Kessler等人，《美國國家科學院院刊（*Proc Nat.Acad Sc.USA*）》，*93*: 14082-14087 (1996)；及Xiao等人，《病毒學雜誌》，*70*: 8098-8108 (1996)。亦參見Chao等人，《分子治療》，*2*:619-623 (2000)及Chao等人，《分子治療》，4:217-222 (2001)。此外，如Herzog等人，《美國國家科學院院刊》，*94*: 5804-5809 (1997)及Murphy等人，《美國國家

科學院院刊》，*94*: 13921-13926 (1997)中所描述，由於肌肉高度血管化，故在肌肉內注射後，重組AAV轉導使得在全身循環中出現轉殖基因產物。另外，Lewis等人，《病毒學雜誌》，*76*: 8769-8775 (2002)展示，骨骼肌纖維具有正確抗體糖基化、摺疊及分泌所必需的細胞因子，表明肌肉能夠穩定表現分泌的蛋白質治療劑。

【0120】 本發明之重組AAV基因組包括本發明之核酸分子及一或多個側接核酸分子之AAV ITR。rAAV基因組中之AAV DNA可來自能衍生出重組病毒之任何AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAVrh.74、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及AAV-13。假模式化rAAV之製造揭示於例如WO 01/83692中。亦涵蓋其他類型之rAAV變異體，例如具有衣殼突變之rAAV。參見例如Marsic等人，《分子治療（*Molecular Therapy*）》，22(11): 1900-1909 (2014)。如以上先前技術部分中所述，各種AAV血清型之基因組之核苷酸序列係此項技術中已知的。為促進骨骼肌肉特異性表現，可使用AAV1、AAV6、AAV8或AAVrh.74。

【0121】 本發明之DNA質體包括本發明之rAAV基因組。將DNA質體轉移至容許用AAV之輔助病毒（例如腺病毒、E1缺失之腺病毒或疱疹病毒）感染之細胞中，用於將rAAV基因組組裝至感染性病毒粒子中。製造rAAV粒子之技術係此項技術中之標準技術，在所述技術中，將待包裝之AAV基因組、rep及cap基因以及輔助病毒功能提供至細胞。rAAV之製造需要在單個細胞（本文中稱為包裝細胞）內存在以下組分：rAAV基因組、與rAAV基因組分開（亦即，不在該基因組中）之AAV rep及cap基因以及輔助病毒功能。AAV rep及cap基因可來自能衍生出重組病毒之任何

AAV血清型，且可來自與rAAV基因組ITR不同的AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAVrh.74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及AAV-13。假模式化rAAV之製造揭示於例如WO 01/83692中，其以全文引用的方式併入本文中。

【0122】一種產生包裝細胞之方法係產生穩定表現AAV粒子製造所必需之所有組分的細胞株。舉例而言，將包括不含AAV rep及cap基因之rAAV基因組、與rAAV基因組分開之AAV rep及cap基因以及可選擇標記物（諸如新黴素（neomycin）抗性基因）之一個質體（或多個質體）整合至細胞基因組中。已藉由諸如以下程序將AAV基因組引入細菌質體中：GC加尾（Samulski等人，1982，《美國國家科學院院刊》，79:2077-2081）、添加含有限制性內切核酸酶裂解位點之合成連接子（Laughlin等人，1983，《基因（Gene）》，23:65-73）或藉由直接平末端連接（Senapathy及Carter，1984，《生物化學雜誌（J. Biol. Chem.）》，259:4661-4666）。接著，包裝細胞株經諸如腺病毒之輔助病毒感染。此方法之優勢在於，此等細胞係可選擇的且適合於大規模製造rAAV。適合方法之其他實例採用腺病毒或桿狀病毒而非質體將rAAV基因組及/或rep及cap基因引入至包裝細胞中。

【0123】rAAV製造之一般原理評述於例如Carter，1992，《生物技術之當前觀點（Current Opinions in Biotechnology）》，1533-539；及Muzyczka，1992，《微生物學及免疫學當前課題》，158:97-129）中。各種方法在Ratschin等人，《分子與細胞生物學（*Mol.Cell.Biol.*）》 4:2072 (1984)；Hermonat等人，《美國國家科學院院刊》，81:6466 (1984)；

Tratschin等人,《分子與細胞生物學》,5:3251 (1985);McLaughlin等人,《病毒學雜誌》,62:1963 (1988);及Lebkowski等人,《分子與細胞生物學》,7:349 (1988);Samulski等人,《病毒學雜誌》,63:3822-3828 (1989);美國專利第5,173,414號;WO 95/13365及相應美國專利第5,658.776號、第WO 95/13392號、第WO 96/17947號、第PCT/US98/18600號、第WO 97/09441號(PCT/US96/14423)、第WO 97/08298號(PCT/US96/13872)、第WO 97/21825號(PCT/US96/20777)、第WO 97/06243號(PCT/FR96/01064)、第WO 99/11764號;Perrin等人,《疫苗》13:1244-1250 (1995);Paul等人,《人類基因療法》,4:609-615 (1993);Clark等人,《基因療法(*Gene Therapy*)》3:1124-1132 (1996);美國專利第5,786,211號;美國專利第5,871,982號;及美國專利第6,258,595號中有描述。前述文獻以全文引用之方式併入本文中,其中特別強調文獻中與rAAV製造相關之該等部分。

【0124】因此,本發明提供產生感染性rAAV之包裝細胞。在一個實施例中,包裝細胞可為穩定轉型之癌細胞,諸如HeLa細胞、293細胞及PerC.6細胞(同源293株)。在另一個實施例中,包裝細胞係不為經轉型癌細胞之細胞,諸如低傳代次數293細胞(經腺病毒之E1轉型之人胚腎細胞)、MRC-5細胞(人胚纖維母細胞)、WI-38細胞(人胚纖維母細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚肺細胞)。

【0125】本發明之重組AAV(亦即,感染性衣殼化rAAV粒子)包括rAAV基因組。在例示性實施例中,兩個rAAV之基因組均缺乏AAV rep及cap DNA,亦即,在基因組之ITR之間不存在AAV rep或cap DNA。可構築成包括本發明之核酸分子的rAAV之實例陳述於國際專利申請案第

PCT/US2012/047999號（WO 2013/016352）中，其以全文引用的方式併入本文中。

【0126】 在一個例示性實施例中，本發明之重組AAV載體係藉由三重轉染方法（Xiao等人，《病毒學雜誌》**72**, 2224-2232(1998)，使用AAV載體質體rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白、pNLRep2-Caprh74及pHelp製造，rAAV含有側接AAV2反向末端重複序列（ITR）之微小肌縮蛋白基因表現卡匣。正是此序列經衣殼包裹至AAVrh74病毒體中。所述質體含有微小肌縮蛋白序列以及具有肌肉特異性啟動子之MHCK7強化子及核心啟動子元件，用以驅動基因表現。表現卡匣亦含有SV40內含子（SD/SA）以促進高水準基因表現，及牛生長激素聚腺苷酸化信號用於高效的轉譯終止。

【0127】 pNLREP2-Caprh74係編碼來自血清型rh74之4種野生型AAV2 rep蛋白質及3種野生型AAV VP衣殼蛋白的AAV輔助質體。pNLREP2-Caprh74質體之示意性圖譜示於圖3中。

【0128】 pHELP腺病毒輔助質體係11,635 bp且獲自Applied Viromics。所述質體含有腺病毒基因組中對AAV複製至關重要的區域，即E2A、E4ORF6及VA RNA（腺病毒E1功能係由293細胞提供）。此質體中存在之腺病毒序列僅佔腺病毒基因組之約40%，且不含複製必不可少的順式元件，諸如腺病毒末端重複序列。因此，預期此類製造系統不能產生感染性腺病毒。pHELP質體之示意性圖譜示於圖4中。

【0129】 rAAV可藉由此項領域中之標準方法，諸如藉由管柱層析法或氯化銫梯度純化。自輔助病毒純化出rAAV載體之方法係此項領域中已知的，且包含例如Clark等人，《人類基因療法》，*10*(6): 1031-1039

(1999)；Schenpp及Clark,《分子生物學方法（*Methods Mol. Med.*）》, *69* 427-443 (2002)；美國專利第6,566,118號及WO 98/09657中揭示之方法。

【0130】在另一個實施例中，本發明涵蓋包括本發明之rAAV之組合物。本發明之組合物包括rAAV及醫藥學上可接受之載劑。所述組合物亦可包括其他成分，諸如稀釋劑及佐劑。可接受之載劑、稀釋劑及佐劑對接受者無毒且在所採用劑量及濃度下較佳呈惰性，且包含緩衝劑及諸如普朗尼克（pluronics）之界面活性劑。

【0131】在本發明之方法中投與的rAAV之效價將取決於例如特定rAAV、投與模式、治療目標、個體及所靶向之細胞類型而變化，且可藉由此項技術中之標準方法測定。rAAV之效價可在每毫升約1×10^{6}、約1×10^{7}、約1×10^{8}、約1×10^{9}、約1×10^{10}、約1×10^{11}、約1×10^{12}、約1×10^{13}至約1×10^{14}或更高DNA酶抗性粒子（DRP）之範圍內。劑量亦可以病毒基因組之單位數表示（vg）。測定衣殼包裹之載體基因組效價之一種例示性方法使用了定量PCR，諸如（Pozsgai等人,《分子治療》25(4):855-869, 2017）中所描述之方法。

【0132】本發明涵蓋在活體內或活體外用rAAV轉導目標細胞之方法。活體內方法包括向有需要之動物（包含人類）投與一次有效劑量或多次有效劑量的包括本發明之rAAV之組合物的步驟。若在發展病症/疾病之前投與所述劑量，則投與係預防性的。若在發展病症/疾病之後投與所述劑量，則投與係治療性的。在本發明之實施例中，有效劑量係緩解（消除或減少）與所治療病症/疾病狀態有關之至少一種症狀、減緩或預防病症/疾病狀態之進展、減緩或預防病症/疾病狀態之進展、減輕疾病之程度、

使疾病緩解（局部或總體）及/或延長存活期的劑量。預期用本發明之方法預防或治療之疾病的實例係DMD。

【0133】 本發明亦涵蓋組合療法。如本文所使用，組合包含同時治療及依序治療兩種。特定地涵蓋本發明方法與標準醫學治療（例如皮質類固醇）之組合，以及其與新穎療法之組合。

【0134】 有效劑量之組合物可藉由此項技術中之標準途徑投與，包含但不限於肌肉內、非經腸、靜脈內、經口、經頰、經鼻、經肺、顱內、骨內、眼內、經直腸或經陰道投與。本領域中熟習此項技術者考慮所治療之感染及/或疾病狀態以及用於表現微小肌縮蛋白之目標細胞/組織可選擇及/或匹配本發明之rAAV（尤其是AAV ITR及衣殼蛋白）的投與途徑及AAV組分之血清型。

【0135】 本發明提供局部投與及全身投與有效劑量的本發明之rAAV及組合物。舉例而言，全身投與係投與至循環系統中，以使整個身體均受影響。全身投與包含經腸投與，諸如經由胃腸道吸收，及經由注射、輸注或植入非經腸投與。

【0136】 特定言之，實際投與本發明之rAAV可藉由使用將rAAV重組載體輸送至動物之目標組織中的任何物理方法實現。根據本發明之投與包含但不限於注射至肌肉中及注射至血流中。經展示，簡單地將rAAV再懸浮於磷酸鹽緩衝生理食鹽水中足以提供可用於肌肉組織表現之媒劑，且對於可與rAAV共投與之載劑或其他組分並無已知限制（不過，在利用rAAV之正常方式中應避免降解DNA之組合物）。rAAV之衣殼蛋白可經修飾，以使得rAAV靶向所關注之特定目標組織，諸如肌肉。參見例如WO 02/053703，其揭示內容以引用之方式併入本文中。醫藥組合物可製備成

可注射調配物或製備成擬藉由經皮輸送遞送至肌肉中的局部調配物。先前已開發出眾多用於肌肉內注射及經皮輸送之調配物，且可用於本發明之實踐中。為投與及處置簡易性起見，rAAV可與任何醫藥學上可接受之載劑一起使用。

【0137】在本發明之一個實施例中，本文所描述的AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白係在含有20 mM Tris（pH 8.0）、1 mM氯化鎂（$MgCl_2$）、200 mM氯化鈉（NaCl）及0.001%泊洛沙姆（poloxamer）188之緩衝液中調配。

【0138】在本文所揭示之方法中投與的rAAV之劑量將取決於例如特定rAAV、投與模式、治療目標、個體及所靶向之細胞類型而變化，且可藉由此項技術中之標準方法測定。所投與各rAAV之效價可在每毫升約1×10^{6}、約1×10^{7}、約1×10^{8}、約1×10^{9}、約1×10^{10}、約1×10^{11}、約1×10^{12}、約1×10^{13}、1×10^{14}或2×10^{14}至約1×10^{15}或更多個DNA酶抗性粒子（DRP）的範圍內。劑量亦可以病毒基因組之單位數（vg）表示（亦即，分別為1×10^{7} vg、1×10^{8} vg、1×10^{9} vg、1×10^{10} vg、1×10^{11} vg、1×10^{12} vg、1×10^{13} vg、1×10^{14} vg、2×10^{14} vg、1×10^{15} vg）。劑量亦可以每公斤（kg）體重病毒基因組之單位數（vg）表示（亦即，分別為1×10^{10} vg/kg、1×10^{11} vg/kg、1×10^{12} vg/kg、1×10^{13} vg/kg、1×10^{14} vg/kg、1.25×10^{14} vg/kg、1.5×10^{14} vg/kg、1.75×10^{14} vg/kg、2.0×10^{14} vg/kg、2.25×10^{14} vg/kg、2.5×10^{14} vg/kg、2.75×10^{14} vg/kg、3.0×10^{14} vg/kg、3.25×10^{14} vg/kg、3.5×10^{14} vg/kg、3.75×10^{14} vg/kg、4.0×10^{14} vg/kg、1×10^{15} vg/kg）。用於滴定AAV之方法描述於Clark等人，《人類基因療法》，*10*: 1031-1039 (1999)中。

【0139】 特定言之，實際投與本發明之rAAV可藉由使用將rAAV重組載體輸送至動物之目標組織中的任何物理方法實現。根據本發明之投與包含但不限於注射至肌肉中及注射至血流中。經展示，簡單地將rAAV再懸浮於磷酸鹽緩衝生理食鹽水中足以提供可用於肌肉組織表現之媒劑，且對於可與rAAV共投與之載劑或其他組分並無已知限制（不過，在利用rAAV之正常方式中應避免降解DNA之組合物）。rAAV之衣殼蛋白可經修飾，以使得rAAV靶向所關注之特定目標組織，諸如肌肉。參見例如WO 02/053703，其揭示內容以引用之方式併入本文中。醫藥組合物可製備成可注射調配物或製備成擬藉由經皮輸送遞送至肌肉中的局部調配物。先前已開發出眾多用於肌肉內注射及經皮輸送之調配物，且可用於本發明之實踐中。為投與及處置簡易性起見，rAAV可與任何醫藥學上可接受之載劑一起使用。

【0140】 出於肌肉內注射之目的，可採用在諸如芝麻油或花生油之佐劑中或在水性丙二醇中之溶液，以及無菌水溶液。必要時，此類水溶液可經緩衝，且先用生理食鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑等張。可在適當地混有諸如羥丙基纖維素之界面活性劑的水中製備呈游離酸（DNA含有酸性磷酸根基）或藥理學上可接受之鹽形式之rAAV的溶液。亦可在甘油、液態聚乙二醇及其混合物中以及在油中製備rAAV之分散液。在普通的儲存及使用條件下，此等製劑含有防腐劑，用以防止微生物生長。就這一點而言，所採用的無菌水性介質皆可容易地藉由本領域中熟習此項技術者熟知之標準技術獲得。

【0141】 適合於注射使用之醫藥載劑、稀釋劑或賦形劑包含無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。在所

有情況下，所述形式必須為無菌的且就存在易於注射性而言，必須為流體。其在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須防止諸如細菌及真菌之類微生物的污染作用。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液體聚乙二醇及其類似物）、其適合混合物及植物油之溶劑或分散介質。適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之類包衣、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。微生物作用之預防可藉由各種抗細菌劑及抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及其類似物來實現。在多數情況下，其較佳地包含等張劑，例如糖或氯化鈉。可注射醫藥組合物之吸收延長可藉由使用延遲吸收之試劑，例如單硬脂酸鋁及明膠實現。

【0142】 無菌可注射溶液係藉由以下製備：將所需量之rAAV與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，視需要，隨後過濾滅菌。一般而言，藉由將滅菌之活性成分併入含有基礎分散介質及來自上文所列成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，較佳之製備方法係真空乾燥及冷凍乾燥技術，由此自其預先無菌過濾之溶液產生活性成分加任何額外所需成分之粉末。

【0143】 用rAAV轉導亦可在活體外進行。在一個實施例中，自個體移出所需目標肌肉細胞，經rAAV轉導且再引入個體中。替代地，可使用同基因型或異種肌肉細胞，在此情況下，該等細胞在個體中將不會產生不當的免疫反應。

【0144】 用於轉導並將經轉導細胞再引入個體中之適合方法係此項技術中已知的。在一個實施例中，可在活體外，藉由在例如適當介質中將rAAV與肌肉細胞組合，並使用習知技術，諸如南方墨點法（Southern

blots）及/或PCR，或藉由使用可選擇標記物篩選帶有所關注DNA之細胞，來轉導細胞。接著，經轉導細胞可調配成醫藥組合物，且將所述組合物藉由各種技術，諸如藉由肌肉內、靜脈內、皮下及腹膜內注射，或藉由使用例如導管注射至平滑及心臟肌肉中來引入個體中。

【0145】用本發明之rAAV轉導細胞引起微小肌縮蛋白之持續表現。因此，本發明提供將表現微小肌縮蛋白之rAAV投與/遞送至動物，較佳人類的方法。此等方法包含用本發明之一或多種rAAV轉導組織（包含但不限於組織，諸如肌肉；器官，諸如肝及腦；及腺體，諸如唾液腺）。轉導可以用包括組織特異性控制元件之基因卡匣進行。舉例而言，本發明之一個實施例提供轉導由肌肉特異性控制元件引導之肌肉細胞及肌肉組織之方法，所述肌肉特異性控制元件包含但不限於源自肌動蛋白及肌凝蛋白基因家族，諸如源自myoD基因家族（參見Weintraub等人，《科學（*Science*）》，*251*: 761-766 (1991)）之控制元件、肌細胞特異性強化子結合因子MEF-2（Cserjesi及Olson，《分子與細胞生物學》，11: 4854-4862 (1991)）、源自人骨骼肌動蛋白基因之控制元件（Muscat等人，《分子與細胞生物學》，*7*: 4089-4099 (1987)）、心臟肌動蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件（參見Johnson 等人，《分子與細胞生物學》，*9*:3393-3399 (1989)）及鼠類肌酸激酶強化子（mCK）元件、源自骨骼快速抽動肌鈣蛋白C基因、緩慢抽動心臟肌鈣蛋白C基因及緩慢抽動肌鈣蛋白I基因之控制元件：低氧誘導性核因子（Semenza等人，《美國國家科學院院刊》，*88*: 5680-5684 (1991)）、類固醇誘導性元件及包含糖皮質激素反應元件（GRE）之啟動子（參見Mader及White，《美國國家科學院院刊》，90: 5603-5607 (1993)），及其他控制元件。

【0146】 肌肉組織係活體內DNA遞送的引人注目之目標，因為其並非生命器官且容易獲取。本發明涵蓋由經轉導之肌纖維持續表現微小肌縮蛋白。

【0147】 「肌肉細胞」或「肌肉組織」意謂源自任何種類肌肉（例如骨胳肌及平滑肌，例如來自消化道、膀胱、血管或心臟組織之骨胳肌及平滑肌）之細胞或細胞群。此類肌肉細胞可為分化或未分化的，諸如肌母細胞、肌細胞、肌管、心肌細胞及心肌母細胞。

【0148】 術語「轉導」用以指在活體內或活體外經由本發明之複製缺陷型rAAV將微小肌縮蛋白之編碼區投與/遞送至受體細胞，使得受體細胞表現微小肌縮蛋白。

【0149】 因此，本發明提供將有效劑量（或基本上同時投與之多次劑量或以一定時間間隔給與之多次劑量）的編碼微小肌縮蛋白之rAAV投與有需要之個體的方法。

【0150】 以下**實例**係以說明而非限制之方式提供。所描述的數字範圍包含各範圍內之每一整數值且包含最小及最大的所陳述整數在內。

實例

實例1

A) 產生AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體

【0151】 AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白質體含有側接AAV2反向末端重複序列（ITR）之人微小肌縮蛋白cDNA表現卡匣（參見圖1）。微小肌縮蛋白構築體之特徵在於框內桿缺失（R4-R23），同時鉸鏈1、2及4以及富含半胱胺酸之結構域仍產生138 kDa蛋白質。微小肌縮蛋白蛋白質（3579 bp）之表現係由MHCK7啟動子（792 bp）引導。由rAAV.MCK.

微小肌縮蛋白質體，藉由移除MCK啟動子並插入MHCK7啟動子來構築所述質體。在核心啟動子之後，存在53 bp之內源性小鼠MCK外顯子1（非轉譯）用於高效轉譯起始，隨後為SV40晚期16S/19S剪接信號（150 bp）及小5'UTR（61 bp）。內含子及5' UTR源自質體pCMVβ（Clontech）。微小肌縮蛋白卡匣具有共同Kozak剛好在ATG起點前，及用於mRNA終止的小的53 bp合成多聚腺苷酸信號。如Harper等人（《自然-醫學》**8**, 253-261(2002)）先前所描述，人微小肌縮蛋白卡匣含有（R4-R23/Δ71-78）結構域。互補DNA針對人類使用進行密碼子優化且由GenScript（新澤西州皮斯卡塔威（Piscataway, NJ））（《分子治療》**18**, 109-117 (2010)）合成。此載體中所包含的唯一病毒序列係AAV2反向末端重複序列，其為病毒DNA複製及包裝所需的。微小肌縮蛋白卡匣具有用於mRNA終止的小的53 bp合成多聚腺苷酸信號。

【0152】 先前的研究已驗證使用MHCK7啟動子（Salva等人，《分子治療》**15**, 320-329 (2007)）及AAVrh74進行心臟表現，實現骨骼、隔膜及心臟肌肉表現（Sondergaard等人，《臨床與轉化神經病學年鑒（*Annals of clinical and Transl Neurology*）》 ***2***, 256-270 (2015)），圖1中構築體之序列經衣殼包裹於AAVrh.74病毒體中。自恆河猴淋巴結選殖AAVrh.74血清型之分子純系且其論述於Rodino-Klapac等人，《轉化醫學雜誌》**5**, 45 (2007)中。

表1顯示質體AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白（SEQ ID NO: 3）之分子特徵

表1.質體rAAV.MHCK7.微小肌縮蛋白之分子特徵				
類型	起點	終點	名稱	描述
區域	55	182	5' ITR	野生型AAV2反向末端重複序列
區域	244	1035	MHCK7	小鼠肌凝蛋白重鏈複合物-E盒肌肉肌酸激酶融合強化子/啟動子
區域	1045	1194	嵌合內含子	來自人β-血球蛋白基因之5'供體位點以及來自IgG重鏈可變區之分支點及3'剪接受體位點
基因	1205	4783	huDys cDNA	人微小肌縮蛋白cDNA
區域	4786	4838	多聚腺苷酸	合成多聚腺苷酸
區域	4894	5021	3' ITR	野生型AAV2反向末端重複序列
基因	6760	7619	AmpR	β-內醯胺酶基因
區域	7823	8442	Ori	質體複製起點

B) 由及編碼卡那黴素（Kan）抗性之質體產生AAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體

【0153】藉由自MHCK7.μDys.AMP質體分離出MHCK7.μDys片段及卡那黴素主鏈，並使用NEBuilder選殖工作流程將其黏接在一起來達成MHCK7.μDys.KAN之選殖。MHCK7.μDys片段係經由用SnaBI消化限制酶來分離。在37℃下，在1×CutSmart緩衝液（NEB）及1 μL SnaBI中以50 μL總反應物進行消化，持續1小時。使用1%瓊脂糖凝膠，經由電泳在105伏特下跑膠1.5小時，分離所得片段。切下對應於MHCK7.μDys插入物的條帶並使用凝膠純化套組（Macherey-Nagel）進行純化。所得片段的DNA濃度為10 ng/μL。在37℃下，在50 μL反應物中，在1×CutSmart緩衝液（NEB）及1 μL XbaI存在下經由XbaI限制酶消化1小時，分離出Kan主鏈片段。使用1%瓊脂糖凝膠，經由電泳在105伏特下跑膠1.5小時，分離所得片段。切下對應於Kan主鏈之條帶並經由凝膠純化套組（Macherey-Nagel）進行純化。所得片段的DNA濃度為8.1 ng/μL。使用NEB選殖工作流程黏接所述兩個片段，該選殖工作流程能夠利用重疊序列

接合兩個片段。根據製造商的方案，在1×NEBuilder HiFi DNA組裝主混合物中使用1:1比率之MHCK7.μDys比卡那黴素主鏈，在50℃下執行NEBuilder選殖反應15分鐘，總反應體積為20 μL。藉由將2.5 μL選殖產物添加至細胞中，隨後在冰上保持30分鐘，接著在42℃下保持30秒且在冰上再保持5分鐘，將所得純系轉型至NEB®穩定感受態大腸桿菌（C3040）中。轉型之後，將950 μL生長培養基添加至細胞中並在225rpm振盪下，使其在30℃下生長1.5小時。在生長之後，將450 μL該等細胞塗鋪於50 μg/mL卡那黴素LB瓊脂盤上並在乾燥恆溫箱中在30℃下培育過夜。自此盤中揀取集落並使其在含有50 μg/mL卡那黴素之LB中生長過夜。使用QIAprep® Spin Miniprep套組（Qiagen）自3 mL此培養物中分離出DNA。使用此DNA確定選殖產物。經由用PmeI、MscI及SmaI進行限制酶消化，隨後凝膠電泳來確定選殖產物。另外，經由測序確定選殖產物。所得質體陳述於SEQ ID NO: 8中且示於圖14及15中。如上文所描述，將對應於SEQ ID NO: 9及SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977之序列的圖13之構築體序列用衣殼包裹於AAVrh.74病毒體中。

實例2

關於杜興氏肌肉萎縮症之全身基因遞送臨床試驗

【0154】此係使用具有SEQ ID NO:3之核苷酸55-5021的rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白針對DMD受試者進行的單劑量對照試驗。第A組將包含年齡自3個月至3歲的六位受試者，且第B組將包含年齡自4歲至7歲的六位受試者。所有受試者將經靜脈內接受微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，10 mL/kg）。在含有20 mM Tris（pH 8.0）、1 mM氯化鎂（$MgCl_2$）、200 mM氯化鈉（NaCl)及0.001%泊洛沙姆188之緩衝液中

調配rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白。

【0155】 在本研究中，經由周邊臂靜脈輸注rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白，以使其可以到達體內所有肌肉。招收第A組中年齡自3個月至3歲的六位DMD受試者，及第B組中年齡自4歲至7歲的六位DMD受試者。所有受試者經靜脈內接受微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，10 mL/kg）。使用定量PCR，使用Prism 7500 Taqman偵測器系統（PE Applied Biosystems），用針對MHCK7啟動子之引子，相較於超螺旋DNA質體標準品測定所投與之劑量中衣殼包裹之載體基因組效價（Pozsgai等人，《分子治療》 25(4):855-869, 2017）。

【0156】 受試者在全國兒童醫院（Nationwide Children's Hospital）之兒科加護病室（PICU）接受1小時之輸液。在基因療法之前，在篩查訪視時執行肌肉切片檢查。在遞送後90天，受試者將經歷第二次肌肉切片檢查以確定所述基因是否能替代缺失之肌縮蛋白蛋白質。在基因轉移之後，小心地監測患者的任何治療副作用。此監測包含在篩查訪視期間以及在第0天、第1天、第7天、第14天、第30天、第60天、第90天及第180天、及在9個月、12個月、18個月、24個月、30個月及36個月進行血液及尿液測試，以及體檢，以確保無基因注射引起之副作用。

【0157】 第A組受試者（n=6位）在3個月至3歲之間，並經靜脈內接受rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，10 mL/kg）。在基因轉移前一天，第A組中的受試者以1 mg/kg潑尼松（prednisone）或地夫可特（deflazacort）起始並維持30天，同時監測免疫反應。若在第30天呈陰性，則在1週內中斷類固醇。若對AAV或微小肌縮蛋白起反應之T細胞>125 SFC/106個PBMC，則維持類固醇，直至水準降低至此臨限值

以下。

【0158】 第B組受試者（n=6位）之年齡在4歲至7歲之間，並經靜脈內接受rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，10 mL/kg）。這些受試者在整個試驗中維持穩定的皮質類固醇劑量，但在對AAV或微小肌縮蛋白起反應之T細胞>125 SFC/106 PBMC時，可以短時間增加劑量。

資格標準

【0159】 本研究之納入標準如下：

- 入選年齡：第A組：3個月至7歲且第B組：在4-7歲之間，包括端點。
- 具有含讀框轉移（缺失或複製）或在外顯子18至58之間含過早終止密碼子突變之DMD基因的分子表徵。
- CK升高 >1000 U/L
- 第A組受試者：在Bayley-III動作評估時大肌肉動作低於平均值，定義為量表分數≤9分
- 第B組：在100公尺計時測試時低於平均值，定義為＜80%預測值
- 任何種族之男性。
- 能夠配合動作評估測試。
- 第A組受試者：先前未用皮質類固醇治療。
- 第B組受試者：在篩查之前，口服穩定劑量的皮質類固醇等效物至少12週，並預期所述劑量在整個研究中保持恆定（為適應體重變化進行之修改除外）

【0160】 本研究之排除標準如下：

- 基於臨床觀察結果有活動性病毒感染。
- 心肌病之病徵，包含射血分數低於40%之心動回聲圖。
- 有HIV感染、或B型或C型肝炎感染之血清學證據。
- 自身免疫性疾病之診斷（或正經歷相應治療）。
- 被認為有臨床意義之異常實驗室值
- PI認為對基因轉移產生不必要風險之伴隨疾病或對慢性藥物治療之要求。
- 如藉由ELISA免疫分析所測定，AAVrh74或AAV8抗體效價>1:400之受試者。
- 研究者認為可能損害受試者遵守測試或程序所需之方案的能力或損害受試者之健康、安全性或臨床可解譯性的醫學病況或情有可原的情況。
- 在基因轉移訪視之前4週內有重度感染（例如肺炎、腎盂腎炎或腦膜炎）（入選可推遲）
- 在本研究篩查之前最後6個月內，接受過任何研究藥物（皮質類固醇除外）或外顯子跳躍藥物（包含ExonDys 51®）、實驗或其他藥物。
- 有過任何類型之基因療法、基於細胞之療法（例如幹細胞移植）或CRISPR/Cas9療法。
- 家人不希望主治醫師及其他醫療提供者披露患者參與研究的情況。

結果指標

【0161】 主要結果指標係基於出現不良事件之參與者之數量的安全性（時間範圍：3年）。監測不良作用並針對嚴重程度及與研究物之相關性

進行評分。

【0162】 次要結果指標如下：

【0163】 大肌肉動作分測試量表（Bayley-III）分數（時間範圍：篩查、第30天-3年）：以動作發展量測的大肌肉動作量表分數。在第30天開始至3年的每次隨訪時，利用Bayley-III大肌肉動作分測試對第A組評分。在篩查時，年齡為43-47個月（包括端點）之任何受試者皆具有與42個月大兒童之標準化資料相比較計算的量表分數。Bayley-III提供1-42個月年齡之兒童的標準化資料。

【0164】 物理療法評估100公尺計時測試（100 m）（時間範圍：篩查、第30天-3年）：100 m係第B組之主要動作結果。100公尺計時測試係在第A組中兒童達到3歲就開始的探索性結果。

【0165】 物理療法評估北極星移動評估（NSAA）（時間範圍：篩查、第30天-3年）：北極星移動評估（NSAA）係第A組中兒童達到四歲時以及針對第B組開始的探索性結果。NSAA度量患有杜興氏肌肉萎縮症之小男孩之移動品質。

【0166】 針對兒童修改的的物理療法評估計時起立行走（TUG）（時間範圍：篩查、第30天-3年）：第B組之探索性結果包含針對兒童修改的計時起立行走（TUG）。

【0167】 物理療法評估登高及下降4級台階（時間範圍：篩查、第30天-3年）：第B組之探索性結果將包含登高及下降4級台階。

【0168】 物理療法評估手持肌力測定法（HHD）（時間範圍：篩查、第30天-3年）：第B組之探索性結果包含針對膝伸肌及膝屈肌，以及肘屈肌及肘伸肌之手持肌力測定（HHD）。

【0169】 藉由免疫螢光法定量微小肌縮蛋白基因表現（時間範圍：篩查、第90天）：藉由免疫螢光法定量前後肌肉活體組織切片中之微小肌縮蛋白基因表現量並進行比較。

【0170】 藉由西方墨點法定量微小肌縮蛋白基因表現（時間範圍：篩查、第90天）：藉由西方墨點分析定量前後肌肉活體組織切片中之微小肌縮蛋白基因表現量並進行比較。

【0171】 在基因療法後CK減少（時間範圍：3年）：循環血液中之CK水準降低。

【0172】 心臟磁共振成像（1年時）。

微小肌縮蛋白基因表現

【0173】 分析並定量經由免疫螢光（IF）纖維強度得到的微小肌縮蛋白表現自基線之變化。如圖7中所示，受試者1（5歲）展示在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後腓腸肌活體組織切片之肌纖維中有78%之微小肌縮蛋白蛋白質表現，受試者2（4歲）展示在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後腓腸肌活體組織切片之肌纖維中有73.5%之微小肌縮蛋白蛋白質表現，且受試者3（6歲）展示在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後腓腸肌活體組織切片之肌纖維中有77.0%之微小肌縮蛋白蛋白質表現。受試者4（4歲）展示在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後腓腸肌活體組織切片之肌纖維中有96.2%之微小肌縮蛋白表現。如藉由免疫組織化學法所量測，所有患者均顯示經轉導微小肌縮蛋白之穩健表現，該表現完全地侷限於肌肉肌纖維膜。相較於正常對照，藉由微小肌縮蛋白陽性纖維之百分比量測的平均基因表現為76.2%且所述纖維之平均強度為74.5%。

受試者	平均強度	肌縮蛋白陽性纖維之百分比
1	82.0%	78.0%
2	59.0%	73.5%
3	83.0%	77.0%
4	160.0%	96.2%
平均值	96.0%	81.2%

【0174】 另外，藉由用西方墨點法量測切片檢查之肌肉組織定量微小肌縮蛋白之蛋白質表現來評估自基線至第60天微小肌縮蛋白基因表現之變化 。如圖8A及8B中所示，用西方墨點分析偵測受試者1（5歲）、受試者2（4歲）及受試者3（6歲）中之微小肌縮蛋白蛋白質表現。圖8C提供西方墨點分析偵測受試者4（4歲）中微小肌縮蛋白之蛋白質表現。如藉由西方墨點法所量測，所有治療後活體組織切片顯示穩固的微小肌縮蛋白水準，其中利用方法1，相較於正常值，受試者1-4之平均值為74.3，且依照調整用於脂肪及纖維化組織之方法2，相較於正常值為95.8%。

【0175】 對於每一受試者，量測每個肌纖維核中的載體基因組複本數。如表2中所示，在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後，對於每個受試者，每個核酸酶之載體基因組複本數大於1個。載體之一個複本指示有約50%之微小肌縮蛋白基因表現。在受試者1-3中量測到每個細胞核平均有1.6個載體複本，符合所觀察到的較高微小肌縮蛋白表現量。當受試者4之值包含在內時，每微克DNA之平均載體複本數>10^5個，其中每個細胞核平均有3.3個載體複本。

表2

受試者	載體複本數/μg DNA	每個核之複本數
1	>10^5	1.7
2	>10^5	1.3
3	>10^5	1.9

【0176】 藉由免疫組織化學法量測投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白前後肌肉切片檢查組織中α-肌聚糖及β-肌聚糖之蛋白質水準。投與rAAVrh74.MHCK7亦使受試者中之DAPC蛋白質上調。如圖9中所示，受

試者1（圖9A）、受試者2（圖9B）及受試者3（圖9C）中肌肉切片檢查組織中α-肌聚糖及β-肌聚糖之表現相較於在投與rAAVrh74.MHCK7之前肌肉活體組織切片中該等蛋白質之表現水準有所增加。

循環血清CK水準

【0177】 在藉由靜脈內輸注投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，10 mL/kg）之後每30天獲得血液樣品。在每次訪視時量測CK水準並與在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白（訪視第0天）之前獲得的基線水準相比較。基線血清CK水準（單位/公升）提供於下表3中。如圖10中所示，在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後2個月，循環血清CK之水準降低約87%。在治療後2個月，所有受試者均顯示血清肌酸激酶（CK）水準顯著降低，且平均CK降低超過87%（n=3）。CK係與肌肉損傷有關之酶且DMD患者一致地展現較高的CK水準。實際上，CK之明顯升高通常用作DMD之初步診斷工具，隨後進行確證基因測試。

【0178】 表4及圖10提供每一受試者之CK水準。圖11提供平均CK水準隨時間之變化，且展示平均CK水準在投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之後隨時間明顯降低。平均基線CK水準27,064 U/L（表3之平均值）降低約63%達到平均值9,982 U/L（平均值，第270天，表4）。

表3

受試者	年齡（歲）	在基線時之CK水準， 單位/公升（U/L）
1	5	20691
2	4	23414
3	6	34942
4	4	29210

表4：自基線至第270天之CK水準變化

受試者	基線	第30天	第60天	第90天	第180天	第270天	第360天
1	20691	-	2984	2444	18476	6317	-
2	23414	10427	4283	41920	6209	10494	-
3	34942	10430	2966	2546	9650	18855	6410
4	29210	7215	908	1382	2580	4262	-

功效評估

【0179】除微小肌縮蛋白及CK水準外，藉由以下功能測試量測功效：自地板起身之時間、登高4級台階、北極星移動評估（NSAA）、起身測試時間、爬4層樓梯測試、10公尺計時測試（10 m）及100公尺計時測試（100 m）。資料提供於下表5及6中，且此資料展示在投與rAAVrh74。MHCK7.微小肌縮蛋白之後9個月一致且持久的改善。圖12亦提供NSAA隨時間改善。

表5：自基線至第270天之NSAA變化

受試者	基線	第30天	第60天	第90天	第180天	第270天	自基線之變化
1	18	22	24	23	25	26	8
2	19	21	23	25	27	27	8
3	26	28	28	30	30	28	2
4	19	20	20	25	25	27	8
平均改善	20.5	22.75	23.75	25.75	26.75	27	6.5

表6：自基線至第270天之變化

受試者	評估	NSAA	起身時間	爬4層樓梯	100 m（秒）	10 m
1	基線	18	3.7	3.4	49.3	5.1
	第270天	26	3.0	2.3	43.2	4.3
2	基線	19	3.0	3.8	49.9	4.3
	第180天	27	3.7	2.6	48.6	3.9
	第270天	27	3.3	2.7	50.3	
3	基線	26	3.9	1.9	59.3	4.7
	第180天	30	3.4	1.8	48.4	4.1
	第270天	28	2.8	1.9	50.7	
4	基線	19	4.1	4.8	67.2	5.4
	第90天	25	2.3	2.2	50.7	4.4
	第270天	27	2.4	2.2	49.7	
平均值	自基線之變化	6.5分改善	.8秒 改善	1.2秒 改善	7.95秒改善	14% 改善

安全性評估

【0180】 在本研究中未觀察到嚴重不良事件（SAE）。三位受試者具有升高的γ-麩胺醯基轉移酶（GGT），GGT升高在一週內藉由增加類固醇解決且恢復至基線水準。不存在其他有臨床意義之實驗室研究結果。患者一般在第一週療法期間出現短暫的噁心，同時增加類固醇劑量。此與肝酶升高或任何其他異常不相關。

實例3

隨機化雙盲安慰劑對照的全身基因遞送第I/IIa期臨床試驗

【0181】 此係在DMD受試者中使用rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白進行的隨機化雙盲單次劑量試驗。本研究包含年齡為4至7歲之二十四位受試者。受試者在入選時隨機分入治療組或安慰劑組。十二位受試者經靜脈內接受rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白載體（2×10^{14} vg/kg，約10 mL/kg），且十二位受試者將接受10 mL/kg安慰劑（乳酸林格氏溶液）。安慰劑受試者將繼續進行治療，該治療將在最後一次治療之受試者給藥之後一年以與12位先前治療之受試者相同之方式給與。受試者經約1小時輸注帶有微小肌縮蛋白之rAAV或乳酸林格氏溶液。在治療前後（90天）對腓腸肌進行穿刺肌肉切片檢查。

【0182】 本研究之主要目的係評估經由周邊肢體靜脈，對DMD受試者靜脈內投與rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白之安全性。藉由血液學、血清化學、尿分析之變化、針對rAAVrh74及微小肌縮蛋白之免疫反應、以及報告的病史及症狀觀察結果評估安全性終點。肌縮蛋白基因表現用作主要結果指標以及安全性。使用驗證之免疫螢光法及免疫墨點分析進行定量。基因療法後CK之降低用作次要結果。藉由以下功能性測試量測功效：起身時間、登高4級台階、北極星移動評估（NSAA）、10公尺計時測

試（10 m）、100公尺計時測試（100 m）。探索性指標包含針對膝伸肌和膝屈肌、以及肘屈肌及肘伸肌之手持肌力測定（HHD）。

【0183】 本研究之納入標準如下：

- 入選年齡：在4-7歲之間，包括端點。
- 具有含讀框轉移（缺失或複製）或在外顯子18至58之間含過早終止密碼子突變之DMD基因的分子表徵。
- 有症狀的肌肉萎縮症之指徵：CK升高>1000 U/L且低於100公尺步行測試之平均預測時間百分比
- 任何種族之男性均符合條件。
- 能夠配合動作評估測試。
- 在篩查之前，口服穩定劑量之皮質類固醇等效物至少12週，且預期該劑量在整個研究中保持恆定（為適應體重變化作出的可能修改除外）。

【0184】 本研究之排除標準如下：

- 基於臨床觀察結果有活動性病毒感染。
- 心肌病之病徵，包含射血分數低於40%之心動回聲圖。
- 有HIV感染、或B型或C型肝炎感染之血清學證據。
- 自身免疫性疾病之診斷（或正經歷相應治療）。
- 被認為有臨床意義之異常實驗室值（GGT>3XULN，膽紅素≥3.0 mg/dL，肌酸酐≥1.8 mg/dL，Hgb < 8或>18 g/Dl；WBC>18,500個/cmm），血小板≤50,000。
- PI認為對基因轉移產生不必要風險之伴隨疾病或對慢性藥物治療之要求。

● 如藉由ELISA免疫分析所測定，AAVrh74或AAV8抗體效價>1:400之受試者。若在篩查時，終點效價呈陽性，則在排除之前可以重複測試。

● 研究者認為可能損害受試者遵守測試或程序所需之方案的能力或損害受試者之健康、安全性或臨床可解譯性的醫學病況或情有可原的情況。

● 在基因轉移訪視之前4週內有重度感染（例如肺炎、腎盂腎炎或腦膜炎）（入選可推遲）

● 在本研究篩查之前最後6個月內，接受過任何研究藥物（皮質類固醇除外）或外顯子跳躍藥物（包含ExonDys 51®）、實驗或其他藥物。

● 有過任何類型之基因療法、基於細胞之療法（例如幹細胞移植）或CRISPR/Cas9療法。

● 家人不希望主治醫師及其他醫療提供者披露患者參與研究的情況。

功效評估

【0185】 肌縮蛋白基因表現用作主要結果指標以及安全性。使用驗證之免疫螢光法及免疫墨點分析進行定量。基因療法後CK之降低用作次要結果。此外，亦藉由以下功能性測試量測功效：自地板起身之時間、登高4級台階、北極星移動評估（NSAA）、10公尺計時測試（10 m）、100公尺計時測試（100 m）]。探索性指標包含針對膝伸肌和膝屈肌、以及肘屈肌及肘伸肌之手持肌力測定（HHD）。

【0186】 使用超音波指導之肌肉切片檢查定量轉殖基因表現，比較基線與第90天之表現。切片檢查係對與初始活體組織切片相同的肌肉但在相對腿上進行。在對所有受試者給藥後一年，安慰劑交叉受試者將在第1

次訪視時重新開始研究時間表。安慰劑受試者在第二次基線篩查時不會執行以下操作：心臟MRI及肌肉切片檢查。安慰劑受試者在第90天經歷肌肉切片檢查（總計3次肌肉切片檢查）。使用間接免疫螢光法（IF）對冷凍切片中之肌縮蛋白進行染色。進行全載片掃描並使用驗證之圖像掃描及MuscleMapTM分析演算法定量微小肌縮蛋白強度及陽性纖維百分比。肌肉形態測定係不知情之情況下執行，包含纖維尺寸直方圖。使用在不知情之情況下得到的冷凍肌肉活體組織切片刮屑（shavings），使用驗證之西方墨點方法執行微小肌縮蛋白之定量蛋白質分析。

【0187】 使用腓腸肌之肌肉穿刺活體組織切片（除非PI認為特定受試者禁忌此操作，在此情況下PI將選擇替代肌肉進行切片檢查）定量微小肌縮蛋白表現。

功效分析

【0188】 主要功效終點係如藉由西方墨點法量測的切片檢查之肌肉組織中微小肌縮蛋白之蛋白質表現之數量自基線至第90天的變化。利用共變異數（ANCOVA）模型分析，以治療作為固定因子及基線值作為共變數，評估主要功效終點之治療組差異。執行威爾卡森秩和檢驗（Wilcoxon rank-sum test）作為支持性分析。經由免疫螢光（IF）纖維強度，以類似方式分析微小肌縮蛋白表現自基線之變化。

【0189】 支持性功效終點包含自基線至關於自地板起身之時間、登高4級台階、NSAA、10公尺計時測試（10 m）、100公尺計時測試（100 m）及CK變化之每一預定評估的變化。探索性指標包含針對膝伸肌和膝屈肌、以及肘屈肌及肘伸肌之HHD。利用ANCOVA模型，以治療作為固定因子及基線值作為共變數，評估治療組差異。執行威爾卡森秩和檢驗作

為支持性分析。

實例4

【0190】 利用如SEQ ID NO: 9中所述；如SEQ ID NO: 8之核苷酸1-4977中所述；或如SEQ ID NO: 6之核苷酸56-5022中所述的rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白構築體替代地進行以上實例2及3中所描述的試驗及研究。

實例5

pAAV.MCK.微小肌縮蛋白構築體之產生

【0191】 藉由將驅動密碼子優化之人微小肌縮蛋白cDNA序列的MCK表現卡匣插入AAV選殖載體psub201中來構築pAAV.MCK.微小肌縮蛋白質體（Samulski等人，《病毒學雜誌》，61(10):3096-3101）。在所述構築體中包含肌肉特異性調控元件以驅動肌肉特異性基因表現。此調控元件包括小鼠MCK核心強化子（206 bp）與351 bp MCK核心啟動子（近端）之融合物。所述構築體在核心啟動子之後包括53 bp之內源性小鼠MCK外顯子1（非轉譯）用於高效轉譯起始，隨後為SV40晚期16S/19S剪接信號（97 bp）及小5'UTR（61 bp）。內含子及5' UTR源自質體pCMVβ（Clontech）。微小肌縮蛋白卡匣具有共同Kozak剛好在ATG起點前，及用於mRNA終止的小的53 bp合成多聚腺苷酸信號。如Harper等人《自然-醫學》，8(3):253-61, 2002先前所描述，人微小肌縮蛋白卡匣含有（R4-R23/Δ71-78）結構域。

【0192】 pAAV.MCK.微小肌縮蛋白質體含有側接AAV2反向末端重複序列（ITR）之人微小肌縮蛋白cDNA表現卡匣（參見圖5）。此序列經衣殼包裹於AAVrh.74病毒體中。自恆河猴淋巴結選殖AAVrh.74血清型之

分子純系且描述於Rodino-Klapac等人，《轉化醫學雜誌》，45 (2007)中。

參考文獻

1. Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr.及Kunkel, L.M., 肌縮蛋白：杜興氏肌肉萎縮症基因座之蛋白質產物（Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus.），《細胞（*Cell*）》 **51**, 919-928 (1987)。

2. Straub, V.& Campbell, K.P., 肌肉萎縮症及肌縮蛋白-醣蛋白複合物（Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex.），《神經學新見（*Curr Opin Neurol*）》 **10**, 168-175 (1997)。

3. Sacco, A.等人, mdx/mTR小鼠杜興氏肌肉萎縮症之短端粒及幹細胞耗竭模型（Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice.），《細胞（*Cell*）》 **143**, 1059-1071 (2010)。

4. Wallace, G.Q.及McNally, E.M., 肌肉萎縮症中之肌肉退化、再生及修復機制（Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies.），《生理學年鑒（*Annu Rev Physiol*）》 **71**, 37-57 (2009)。

5. Zhou, L.& Lu, H., 靶向杜興氏肌肉萎縮症中之纖維化（Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy.），《神經病理學與實驗神經病學雜誌（*J Neuropathol Exp Neurol*）》 **69**, 771-776 (2010)。

6. Desguerre, I.等人, 杜興氏肌肉萎縮症中之肌內膜纖維化：與巨噬細胞替代性活化有關之不良結果的標誌（Endomysial fibrosis in

Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation.），《神經病理學與實驗神經病學雜誌（*J Neuropathol Exp Neurol*）》 **68**, 762-773 (2009)。

7. DiPrimio, N., McPhee, S.W.及Samulski, R.J., 用於治療肌肉疾病之腺相關病毒：進入臨床試驗（Adeno-associated virus for the treatment of muscle diseases: toward clinical trials.），《分子治療學新見（*Curr Opin Mol Ther*）》 **12**, 553-560 (2010)。

8. Mendell, J.R.等人, 在第2D型肢帶性肌肉萎縮症中基因轉移之後的持續性α-肌聚糖基因表現（Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D.），《神經病學年刊（*Ann Neurol*）》 **68**, 629-638 (2010)。

9. Mendell, J.R.等人, 第2D型肢帶性肌肉萎縮症基因療法恢復α-肌聚糖及相關蛋白質（Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins.）《神經病學年刊（*Ann Neurol*）》 **66**, 290-297 (2009)。

10. Mendell, J.R.等人, 關於貝克氏肌肉萎縮症之第1/2a期卵泡抑素基因療法（A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy.），《分子治療：美國基因療法協會雜誌（*Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*）》 **23**, 192-201 (2015)。

11. Carnwath, J.W.及Shotton, D.M., mdx小鼠之肌肉萎縮症：比目魚肌及趾伸長肌之病理組織學（Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles.），

《神經科學雜誌（*J Neurol Sci*）》 **80**, 39-54 (1987)。

12. Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A.及Sloper, J.C., mdx小鼠骨胳肌肌病：I.組織學、形態測定學及生物化學研究（The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation.），《神經病理學與應用神經生物學（*Neuropathol Appl Neurobiol*）》 **14**, 53-70 (1988)。

13. Cullen, M.J.及Jaros, E., X染色體聯鎖肌肉萎縮（mdx）小鼠之骨胳肌超微結構與杜興氏肌肉萎縮症之比較（Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse.Comparison with Duchenne muscular dystrophy.），《神經病理學報（*Acta Neuropathol*）》 **77**, 69-81 (1988)。

14. Dupont-Versteegden, E.E.及McCarter, R.J., mdx小鼠之隔膜與後肢肌肉在肌肉萎縮症中之差異表現（Differential expression of muscular dystrophy in diaphragm versus hindlimb muscles of mdx mice.），《肌肉與神經（*Muscle Nerve*）》 **15**, 1105-1110 (1992)。

15. Stedman, H.H.等人, mdx小鼠隔膜再現杜興氏肌肉萎縮症之退行性變化（The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy.），《自然（*Nature*）》**352**, 536-539 (1991)。

16. Deconinck, A.E.等人, 肌營養相關蛋白-肌縮蛋白缺陷型小鼠作為杜興氏肌肉萎縮症之模型（Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy.），《細胞（*Cell*）》 **90**, 717-727 (1997)。

17. Grady, R.M.等人，缺乏肌營養相關蛋白及肌縮蛋白之小鼠的骨骼及心臟肌病：杜興氏肌肉萎縮症模型（Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy.），《細胞（*Cell*）》 **90**, 729-738 (1997)。

18. Love, D.R.等人，與肌縮蛋白同源之骨胳肌中的常染色體轉錄物（An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin.），《自然（*Nature*）》 **339**, 55-58 (1989)。

19. Tinsley, J.M.等人，肌縮蛋白相關蛋白質之一級結構（Primary structure of dystrophin-related protein.），《自然（*Nature*）》 **360**, 591-593 (1992)。

20. Tinsley, J.等人，全長肌營養相關蛋白之表現預防mdx小鼠之肌肉萎縮症（Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice.），《自然-醫學（*Nat Med*）》**4**, 1441-1444 (1998)。

21. Squire, S.等人，藉由表現肌營養相關蛋白預防mdx小鼠之病變：使用誘導性轉殖基因表現系統之分析（Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system.），《人類分子遺傳學（*Hum Mol Genet*）》 **11**, 3333-3344 (2002)。

22. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E.及Davies, K.E.，肌營養相關蛋白轉殖基因之骨胳肌特異性表現拯救肌營養相關蛋白-肌縮蛋白缺陷型小鼠（Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice.），《自

然-遺傳學（*Nat Genet*）》 **19**, 79-82 (1998)。

23. Zhou, L.等人, 肌營養相關蛋白基因之單倍不足使mdx小鼠之骨胳肌炎症及纖維化惡化（Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice.）, 《神經科學雜誌（*J Neurol Sci*）》 **264**, 106-111 (2008)。

24. Gutpell, K.M., Hrinivich, W.T.及Hoffman, L.M., mdx/utrn+/-小鼠之骨胳肌纖維化驗證其作為鼠類杜興氏肌肉萎縮症模型模型適用性（Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy.）, 《公共科學圖書館：綜合（*PloS one*）》 **10**, e0117306 (2015)。

25. Rodino-Klapac, L.R.等人, 微小肌縮蛋白及卵泡抑素共遞送使老齡DMD模型中之肌肉功能復原（Micro-dystrophin and follistatin co-delivery restores muscle function in aged DMD model.）, 《人類分子遺傳學（*Hum Mol Genet*）》 **22**, 4929-4937 (2013)。

26. Nevo, Y.等人, Ras拮抗劑法尼基硫代水楊酸（FTS）減少dy/dy小鼠肌肉萎縮症模型中之纖維化並提高肌肉力量（The Ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in dy/dy mouse model of muscular dystrophy.）, 《公共科學圖書館：綜合（*PloS one*）》 **6**, e18049 (2011)。

27. Rodino-Klapac, L.R.等人, 無需大體積或高壓而向肢體血管遞送微小肌縮蛋白基因以治療杜興氏肌肉萎縮症的轉化方法（A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne

muscular dystrophy.），《轉化醫學雜誌（*J Transl Med*）》**5**, 45 (2007)。

28. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G., Ittleman, F., Blanchard, E.M.及Alpert, N.R., 用2,3-丁二酮單肟保護人左心室心肌免受切割傷影響（Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime.），《循環研究（*Circ Res*）》 **65**, 1441-1449 (1989)。

29. Rodino-Klapac, L.R.等人, 在肌肉內及血管遞送後非人類靈長類動物中FLAG標記之微小肌縮蛋白的持久性表現（Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery.），《分子治療：美國基因療法協會雜誌（*Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*）》**18**, 109-117 (2010)。

30. Grose, W.E.等人, 在AAV5基因轉移之後同源重組介導的營養不良相關fer-1樣蛋白缺乏之功能恢復（Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer.），《公共科學圖書館：綜合（*PloS one*）》 **7**, e39233 (2012)。

31. Liu, M.等人, 腺相關病毒介導之微小肌縮蛋白表現保護年輕肌肉免受收縮誘導之損傷（Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury.），《分子治療（*Mol Ther*）》**11**, 245-256 (2005)。

32. Harper, S.Q.等人, 肌縮蛋白之模組化靈活性：杜興氏肌肉萎縮

症之基因療法的影響（Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy.），《自然-醫學（*Nat Med*）》**8**, 253-261 (2002)。

33. Rodino-Klapac, L.R.等人，在肌肉內及血管遞送後非人類靈長類動物中FLAG標記之微小肌縮蛋白的持久性表現（Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery.），《分子治療（*Mol Ther*）》 **18**, 109-117 (2010)。

34. Salva, M.Z.等人，骨骼及心臟肌肉中用於rAAV介導之高水準表現的組織特異性調控卡匣之設計（Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle.），《分子治療（*Mol Ther*）》 **15**, 320-329 (2007)。

35. Sondergaard, P.C.等人，AAV.營養不良相關fer-1樣蛋白重疊載體恢復營養不良相關fer-1樣蛋白病動物模型之功能（AAV.Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models.），《臨床與轉化神經學年評（*Annals of clinical and translational neurology*）》 **2**, 256-270 (2015)。

36. De, B.P.等人，儘管對常見人腺相關病毒具有預先存在之免疫性，但非人類靈長類動物血清型rh.10腺相關病毒介導α1-抗胰蛋白酶持久高水準表現（High levels of persistent expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses.），《分子治療（*Mol Ther*）》**13**, 67-76 (2006)。

37. Rodino-Klapac, L.R.等人, 無需大體積或高壓而向肢體血管遞送微小肌縮蛋白基因以治療杜興氏肌肉萎縮症的轉化方法（A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy.），《轉化醫學雜誌（*Journal of translational medicine*）》**5**, 45 (2007)。

38. Bulfield等人, 小鼠之X染色體聯鎖肌肉萎縮症（mdx）（X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse.），《美國國家科學院院刊（*Proc Natl Acad Sci U S A.*）》1984; **81**(4): 1189-1192。

39. Sicinski等人, mdx小鼠中肌肉萎縮症之分子基礎：點突變（The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation.），《科學（*Science*）》1989 **30**;244(4912):1578-80

【序列表】

<110> 美國全美兒童醫院之研究學會(RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL)

<120> 腺相關病毒載體遞送肌肉特異性微小肌縮蛋白以治療肌肉萎縮症

<130> 28335/53169

<140> TW 108121156
<141> 2019-06-18

<150> US 62/686,668
<151> 2018-06-18

<150> US 62/740,402
<151> 2018-10-02

<150> US 62/752,841
<151> 2018-10-30

<150> US 62/823,649
<151> 2019-03-25

<150> US 62/860,220
<151> 2019-06-11

<150> PCT/US2019/037489
<151> 2019-06-17

<160> 9

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 3579
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1
atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca gaagaagact 60

tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat cgagaatctg 120

ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact gactggccag 180

aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt gaacaaagct 240

ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac tgatatcgtg 300

gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca ctggcaggtg 360

aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga gaagatcctg 420

ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat taacttcact 480

acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag gcctgatctg 540

ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga acatgccttc 600

aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga tgtggacact 660

acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca ggtgctgcca 720

cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc ccccaaagtg 780

actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca gattaccgtg 840

agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa gtcctacgct 900

tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt tccatcccag 960

cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag cgaggtgaat 1020

ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag tgctgaagac 1080

acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga tcagttccac 1140

acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg caatatcctg 1200

cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga aacagaagtg 1260

caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc tagtatggag 1320

aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact gaaagagctg 1380

aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga gccactggga 1440

cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca ggaggatctg 1500

gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt ggacgaatct 1560

agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg ggaccggtgg 1620

gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat cctgctgaaa 1680

tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga gaaagaggac 1740

gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct gtctagcctg 1800

cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat gggcaaactg 1860

tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac ccagaagaca 1920

gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa actggagaaa 1980

agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac ccagacaacc 2040

gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa acatgcccag 2100

gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct gcaggagctg 2160

caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat taaggggtct 2220

tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga aaaggtgaag 2280

gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa cgatctggct 2340

agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac actggaggac 2400

ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg gcagctgcat 2460

gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc cgtgcagggg 2520

ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca cgagacccag 2580

accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc cgatctgaac 2640

aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca gaaggccctg 2700

tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca taatctgaag 2760

cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac tatctacgac 2820

aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga tatgtgcctg 2880

aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt gctgagtttt 2940

aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag gtacctgttc 3000

aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact gctgctgcat 3060

gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg atctaacatc 3120

gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat cgaggctgct 3180

ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc tgtgctgcac 3240

agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg caaggaatgt 3300

cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat ttgccagagc 3360

tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat ggtggaatat 3420

tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct gaagaataag 3480

tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc agtgcagaca 3540

gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtga 3579

<210> 2
<211> 810
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成啓動子

<400> 2
gtttaaacaa gcttgcatgt ctaagctaga cccttcagat taaaaataac tgaggtaagg 60

gcctgggtag gggaggtggt gtgagacgct cctgtctctc ctctatctgc ccatcggccc 120

tttggggagg aggaatgtgc ccaaggacta aaaaaaggcc atggagccag aggggcgagg 180

gcaacagacc tttcatgggc aaaccttggg gccctgctgt ctagcatgcc ccactacggg 240

tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct ggttataatt 300

aacccagaca tgtggctgcc ccccccccccc caacacctgc tgcctctaaa aataaccctg 360

tccctggtgg atcccctgca tgcgaagatc ttcgaacaag gctgtggggg actgagggca 420

ggctgtaaca ggcttggggg ccagggctta tacgtgcctg ggactcccaa agtattactg 480

ttccatgttc ccggcgaagg gccagctgtc ccccgccagc tagactcagc acttagttta 540

ggaaccagtg agcaagtcag cccttggggc agcccataca aggccatggg gctgggcaag 600

ctgcacgcct gggtccgggg tgggcacggt gcccgggcaa cgagctgaaa gctcatctgc 660

tctcaggggc ccctccctgg ggacagcccc tcctggctag tcacaccctg taggctcctc 720

tatataaccc aggggcacag gggctgccct cattctacca ccacctccac agcacagaca 780

gacactcagg agccagccag cggcgcgccc 810

<210> 3

<211> 8562
<212> DNA
<213> 腺相關病毒

<400> 3

gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgcgcgc 60

tcgctcgctc actgaggccg cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgacct ttggtcgccc 120

ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aactccatca ctaggggttc 180

cttgtagtta atgattaacc cgccatgcta cttatctacg tagccatgct ctagagttta 240

aacaagcttg catgtctaag ctagaccctt cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300

ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360

ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420

agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480

gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540

agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600

ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660

taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720

tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780

cagtgagcaa gtcagcccct ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840

cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900

ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960

aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020

tcaggagcag ccagcggcgc gcccaggtaa gtttagtctt tttgtctttt atttcaggtc 1080

ccggatccgg tggtggtgca aatcaaagaa ctgctcctca gtggatgttg cctttacttc 1140

taggcctgta cggaagtgtt acttctgctc taaaagctgc ggaattgtac ccgcggccgc 1200

caccatgctg tggtgggagg aggtggagga ttgttatgaa agggaggacg tgcagaagaa 1260

gacttttacc aagtgggtga acgctcagtt cagcaaattt gggaagcagc acatcgagaa 1320

tctgttttcc gacctgcagg atgggagacg gctgctggat ctgctggaag gactgactgg 1380

ccagaagctg cccaaagaga aggggagcac tagggtgcac gccctgaaca acgtgaacaa 1440

agctctgaga gtgctgcaga acaacaacgt ggatctggtg aatattggca gtactgatat 1500

cgtggacggg aaccacaaac tgacactggg cctgatctgg aacattattc tgcactggca 1560

ggtgaaaaat gtgatgaaga acatcatggc cgggctgcag cagaccaatt ccgagaagat 1620

cctgctgtct tgggtgcggc agagcacccg caactatccc caggtgaacg tgattaactt 1680

cactacatcc tggagcgacg ggctggccct gaatgctctg attcacagcc acaggcctga 1740

tctgttcgac tggaatagcg tggtgtgcca gcagtctgcc acacagcgcc tggaacatgc 1800

cttcaatatc gctcggtacc agctggggat cgaaaaactg ctggacccag aggatgtgga 1860

cactacatac ccagataaaa agtctattct gatgtacatt actagcctgt tccaggtgct 1920

gccacagcag gtgtctattg aagccattca ggaggtggaa atgctgcccc gccccccaa 1980

agtgactaaa gaggagcatt ttcagctgca tcatcagatg cattacagcc agcagattac 2040

cgtgagcctg gctcagggat atgagcgcac cagtagtcca aaaccacggt tcaagtccta 2100

cgcttatacc caggctgcct acgtgacaac tagcgaccct actagatccc cctttccatc 2160

ccagcacctg gaggccccag aggacaagag ctttgggtcc agcctgatgg aaagcgaggt 2220

gaatctggat cggtaccaga cagccctgga ggaggtgctg agctggctgc tgagtgctga 2280

agacacactg caggcccagg gcgaaatttc caatgacgtg gaagtggtga aggatcagtt 2340

ccacacacac gagggctata tgatggacct gacagctcac caggggcgcg tgggcaatat 2400

cctgcagctg ggctctaaac tgatcggcac cgggaaactg agtgaggacg aggaaacaga 2460

agtgcaggag cagatgaacc tgctgaacag ccgctgggag tgtctgagag tggctagtat 2520

ggagaagcag tccaacctgc accgggtgct gatggacctg cagaaccaga aactgaaaga 2580

gctgaacgac tggctgacaa agactgagga acgcacaagg aagatggagg aggagccact 2640

gggacccgac ctggaggatc tgaagagaca ggtgcagcag cataaggtgc tgcaggagga 2700

tctggaacag gagcaggtgc gggtgaactc cctgacacat atggtggtgg tggtggacga 2760

atctagtgga gatcacgcca ccgccgccct ggaggaacag ctgaaggtgc tgggggaccg 2820

gtgggccaac atttgccggt ggaccgagga caggtgggtg ctgctgcagg acatcctgct 2880

gaaatggcag aggctgaccg aggagcagtg tctgtttagt gcttggctga gcgagaaaga 2940

ggacgccgtg aacaagatcc acacaaccgg ctttaaggat cagaacgaaa tgctgtctag 3000

cctgcagaaa ctggctgtgc tgaaggccga tctggagaaa aagaagcaga gcatgggcaa 3060

actgtatagc ctgaaacagg acctgctgag caccctgaag aacaagagcg tgacccagaa 3120

gacagaagcc tggctggata actttgcccg ctgctgggac aacctggtgc agaaactgga 3180

gaaaagtaca gctcagatct ctcaggctgt gaccacaacc cagcctagcc tgacccagac 3240

aaccgtgatg gaaaccgtga ccaccgtgac aacccgcgaa cagatcctgg tgaaacatgc 3300

ccaggaagag ctgccacctc cacctcccca gaagaagaga accctggagc ggctgcagga 3360

gctgcaggaa gccactgacg aactggacct gaagctgagg caggccgaag tgattaaggg 3420

gtcttggcag cctgtgggcg atctgctgat tgattccctg caggaccacc tggaaaaggt 3480

gaaggctctg agaggcgaaa ttgctccact gaaggagaac gtgagtcatg tgaacgatct 3540

ggctagacag ctgacaacac tgggcatcca gctgagccca tacaatctga gcacactgga 3600

ggacctgaat accaggtgga agctgctgca ggtggctgtg gaagaccggg tgcggcagct 3660

gcatgaggcc catcgcgact tcggaccagc cagccagcac tttctgagca catccgtgca 3720

ggggccctgg gagagggcca tttctcccaa caaggtgccc tactatatta atcacgagac 3780

ccagaccact tgttgggacc atcccaagat gacagaactg taccagtccc tggccgatct 3840

gaacaacgtg aggtttagcg cttacagaac cgctatgaag ctgagacggc tgcagaaggc 3900

cctgtgcctg gatctgctgt ccctgtccgc cgcctgcgat gccctggatc agcataatct 3960

gaagcagaac gatcagccaa tggatatcct gcagatcatc aactgcctga ccactatcta 4020

cgacaggctg gagcaggagc acaacaacct ggtgaacgtg cctctgtgcg tggatatgtg 4080

cctgaactgg ctgctgaacg tgtatgacac tgggcgcacc ggccggatca gagtgctgag 4140

ttttaaaact gggattatct ccctgtgtaa ggcccacctg gaggacaagt acaggtacct 4200

gttcaagcag gtggctagta gcactggatt ttgtgaccag cgccgcctgg gactgctgct 4260

gcatgatagt atccagattc ctagacagct gggagaggtg gctagtttcg gaggatctaa 4320

catcgaaccc agcgtgcgca gctgtttcca gtttgccaat aacaaacctg aaatcgaggc 4380

tgctctgttc ctggattgga tgcgcctgga accacagagc atggtgtggc tgcctgtgct 4440

gcacagagtg gctgccgccg aaactgccaa gcaccaggct aaatgcaaca tctgcaagga 4500

atgtcccatt atcggctttc gctacaggag tctgaaacat tttaactacg atatttgcca 4560

gagctgcttc ttttccggaa gagtggccaa aggacacaag atgcactacc ctatggtgga 4620

atattgcacc ccaactacat ctggcgaaga tgtgcgcgat tttgccaagg tgctgaagaa 4680

taagtttcgg actaagaggt acttcgccaa gcacccccgc atggggtatc tgccagtgca 4740

gacagtgctg gaaggagaca atatggagac cgatacaatg tgagcggccg caataaaaga 4800

tctttatttt cattagatct gtgtgttggt tttttgtgtg tctagagcat ggctacgtag 4860

ataagtagca tggcgggtta atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca 4920

ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc 4980

cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagctggcgt aatagcgaag 5040

aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgattcc 5100

gttgcaatgg ctggcggtaa tattgttctg gatattacca gcaaggccga tagtttgagt 5160

tcttctactc aggcaagtga tgttattact aatcaaagaa gtattgcgac aacggttaat 5220

ttgcgtgatg gacagactct tttactcggt ggcctcactg attataaaaa cacttctcag 5280

gattctggcg taccgttcct gtctaaaatc cctttaatcg gcctcctgtt tagctcccgc 5340

tctgattcta acgaggaaag cacgttatac gtgctcgtca aagcaaccat agtacgcgcc 5400

ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 5460

tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc 5520

cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 5580

acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc 5640

ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 5700

gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 5760

tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 5820

ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta aatatttgct tatacaatct tcctgttttt 5880

ggggcttttc tgattatcaa ccggggtaca tatgattgac atgctagttt tacgattacc 5940

gttcatcgat tctcttgttt gctccagact ctcaggcaat gacctgatag cctttgtaga 6000

gacctctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac ggttgaatat 6060

catattgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc tttacctaca 6120

cattactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaatttta tccttgcgtt 6180

gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg tacaaccgat 6240

ttagctttat gctctgaggc tttattgctt aattttgcta attctttgcc ttgcctgtat 6300

gatttattgg atgttggaat cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta 6360

tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc 6420

agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat 6480

ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt 6540

catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttta taggttaatg 6600

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa 6660

cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac 6720

cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg 6780

tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 6840

tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg 6900

atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga 6960

gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 7020

aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag 7080

aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga 7140

gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg 7200

ctttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga 7260

atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt 7320

tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact 7380

ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt 7440

ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 7500

ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 7560

tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 7620

tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 7680

aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 7740

tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 7800

tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 7860

gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 7920

agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 7980

tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 8040

ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt 8100

cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 8160

tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 8220

acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg 8280

gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 8340

ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 8400

tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg 8460

attctgtgga taaccgtatt accgccttttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 8520

cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gc 8562

<210> 4
<211> 564
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成啓動子

<400> 4
cagccactat gggtctaggc tgcccatgta aggaggcaag gcctggggac acccgagatg 60

cctggttata attaacccag acatgtggct gctccccccc cccaacacct gctgcctgag 120

cctcaccccc accccggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 180

tctaaaaata accctgtccc tggtgggctg tgggggactg agggcaggct gtaacaggct 240

tgggggccag ggcttatacg tgcctgggac tcccaaagta ttactgttcc atgttcccgg 300

cgaagggcca gctgtccccc gccagctaga ctcagcactt agtttaggaa ccagtgagca 360

agtcagccct tggggcagcc catacaaggc catggggctg ggcaagctgc acgcctgggt 420

ccggggtggg cacggtgccc gggcaacgag ctgaaagctc atctgctctc aggggccccc 480

ccctggggac agcccctcct ggctagtcac accctgtagg ctcctctata taacccaggg 540

gcacaggggc tgcccccggg tcac 564

<210> 5
<211> 8409
<212> DNA
<213> 腺相關病毒

<400> 5
gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60

ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120

cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180

ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagacagcc 240

actatgggtc taggctgccc atgtaaggag gcaaggcctg gggacacccg agatgcctgg 300

ttataattaa cccagacatg tggctgctcc ccccccccaa cacctgctgc ctgagcctca 360

cccccacccc ggtgcctggg tcttaggctc tgtacaccat ggaggagaag ctcgctctaa 420

aaataaccct gtccctggtg ggctgtgggg gactgagggc aggctgtaac aggcttgggg 480

gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact gttccatgtt cccggcgaag 540

ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt aggaaccagt gagcaagtca 600

gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa gctgcacgcc tgggtccggg 660

gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg ctctcagggg cccctccctg 720

gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct ctatataacc caggggcaca 780

ggggctgccc ccgggtcacc accacctcca cagcacagac agacactcag gagccagcca 840

gccaggtaag tttagtcttt ttgtctttta tttcaggtcc cggatccggt ggtggtgcaa 900

atcaaagaac tgctcctcag tggatgttgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta 960

cttctgctct aaaagctgcg gaattgtacc cgcggccgcc accatgctgt ggtgggagga 1020

ggtggaggat tgttatgaaa gggaggacgt gcagaagaag acttttacca agtgggtgaa 1080

cgctcagttc agcaaatttg ggaagcagca catcgagaat ctgttttccg acctgcagga 1140

tgggagacgg ctgctggatc tgctggaagg actgactggc cagaagctgc ccaaagagaa 1200

ggggagcact agggtgcacg ccctgaacaa cgtgaacaaa gctctgagag tgctgcagaa 1260

caacaacgtg gatctggtga atattggcag tactgatatc gtggacggga accacaaact 1320

gacactgggc ctgatctgga acattattct gcactggcag gtgaaaaatg tgatgaagaa 1380

catcatggcc gggctgcagc agaccaattc cgagaagatc ctgctgtctt gggtgcggca 1440

gagcacccgc aactatcccc aggtgaacgt gattaacttc actacatcct ggagcgacgg 1500

gctggccctg aatgctctga ttcacagcca caggcctgat ctgttcgact ggaatagcgt 1560

ggtgtgccag cagtctgcca cacagcgcct ggaacatgcc ttcaatatcg ctcggtacca 1620

gctggggatc gaaaaactgc tggacccaga ggatgtggac actacatacc cagataaaaa 1680

gtctattctg atgtacatta ctagcctgtt ccaggtgctg ccacagcagg tgtctattga 1740

agccattcag gaggtggaaa tgctgccccg ccccccccaaa gtgactaaag aggagcattt 1800

tcagctgcat catcagatgc attacagcca gcagattacc gtgagcctgg ctcagggata 1860

tgagcgcacc agtagtccaa aaccacggtt caagtcctac gcttataccc aggctgccta 1920

cgtgacaact agcgacccta ctagatcccc ctttccatcc cagcacctgg aggccccaga 1980

ggacaagagc tttgggtcca gcctgatgga aagcgaggtg aatctggatc ggtaccagac 2040

agccctggag gaggtgctga gctggctgct gagtgctgaa gacacactgc aggcccaggg 2100

cgaaatttcc aatgacgtgg aagtggtgaa ggatcagttc cacacacacg agggctatat 2160

gatggacctg acagctcacc aggggcgcgt gggcaatatc ctgcagctgg gctctaaact 2220

gatcggcacc gggaaactga gtgaggacga ggaaacagaa gtgcaggagc agatgaacct 2280

gctgaacagc cgctgggagt gtctgagagt ggctagtatg gagaagcagt ccaacctgca 2340

ccgggtgctg atggacctgc agaaccagaa actgaaagag ctgaacgact ggctgacaaa 2400

gactgaggaa cgcacaagga agatggagga ggagccactg ggacccgacc tggaggatct 2460

gaagagacag gtgcagcagc ataaggtgct gcaggaggat ctggaacagg agcaggtgcg 2520

ggtgaactcc ctgacacata tggtggtggt ggtggacgaa tctagtggag atcacgccac 2580

cgccgccctg gaggaacagc tgaaggtgct gggggaccgg tgggccaaca tttgccggtg 2640

gaccgaggac aggtgggtgc tgctgcagga catcctgctg aaatggcaga ggctgaccga 2700

ggagcagtgt ctgtttagtg cttggctgag cgagaaagag gacgccgtga acaagatcca 2760

cacaaccggc tttaaggatc agaacgaaat gctgtctagc ctgcagaaac tggctgtgct 2820

gaaggccgat ctggagaaaa agaagcagag catgggcaaa ctgtatagcc tgaaacagga 2880

cctgctgagc accctgaaga acaagagcgt gacccagaag acagaagcct ggctggataa 2940

ctttgcccgc tgctgggaca acctggtgca gaaactggag aaaagtacag ctcagatctc 3000

tcaggctgtg accacaaccc agcctagcct gacccagaca accgtgatgg aaaccgtgac 3060

caccgtgaca acccgcgaac agatcctggt gaaacatgcc caggaagagc tgccacctcc 3120

acctccccag aagaagagaa ccctggagcg gctgcaggag ctgcaggaag ccactgacga 3180

actggacctg aagctgaggc aggccgaagt gattaagggg tcttggcagc ctgtgggcga 3240

tctgctgatt gattccctgc aggaccacct ggaaaaggtg aaggctctga gaggcgaaat 3300

tgctccactg aaggagaacg tgagtcatgt gaacgatctg gctagacagc tgacaacact 3360

gggcatccag ctgagcccat acaatctgag cacactggag gacctgaata ccaggtggaa 3420

gctgctgcag gtggctgtgg aagaccgggt gcggcagctg catgaggccc atcgcgactt 3480

cggaccagcc agccagcact ttctgagcac atccgtgcag gggccctggg agagggccat 3540

ttctcccaac aaggtgccct actatattaa tcacgagacc cagaccactt gttgggacca 3600

tcccaagatg acagaactgt accagtccct ggccgatctg aacaacgtga ggtttagcgc 3660

ttacagaacc gctatgaagc tgagacggct gcagaaggcc ctgtgcctgg atctgctgtc 3720

cctgtccgcc gcctgcgatg ccctggatca gcataatctg aagcagaacg atcagccaat 3780

ggatatcctg cagatcatca actgcctgac cactatctac gacaggctgg agcaggagca 3840

caacaacctg gtgaacgtgc ctctgtgcgt ggatatgtgc ctgaactggc tgctgaacgt 3900

gtatgacact gggcgcaccg gccggatcag agtgctgagt tttaaaactg ggattatctc 3960

cctgtgtaag gcccacctgg aggacaagta caggtacctg ttcaagcagg tggctagtag 4020

cactggattt tgtgaccagc gccgcctggg actgctgctg catgatagta tccagattcc 4080

tagacagctg ggagaggtgg ctagtttcgg aggatctaac atcgaaccca gcgtgcgcag 4140

ctgtttccag tttgccaata acaaacctga aatcgaggct gctctgttcc tggattggat 4200

gcgcctggaa ccacagagca tggtgtggct gcctgtgctg cacagagtgg ctgccgccga 4260

aactgccaag caccaggcta aatgcaacat ctgcaaggaa tgtcccatta tcggctttcg 4320

ctacaggagt ctgaaacatt ttaactacga tatttgccag agctgcttct tttccggaag 4380

agtggccaaa ggacacaaga tgcactaccc tatggtggaa tattgcaccc caactacatc 4440

tggcgaagat gtgcgcgatt ttgccaaggt gctgaagaat aagtttcgga ctaagaggta 4500

cttcgccaag cacccccgca tggggtatct gccagtgcag acagtgctgg aaggagacaa 4560

tatggagacc gatacaatgt gagcggccgc aataaaagat ctttattttc attagatctg 4620

tgtgttggtt ttttgtgtgt ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa 4680

tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 4740

cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 4800

cagtgagcga gcgagcgcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct 4860

tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggaagttcc agacgattga gcgtcaaaat 4920

gtaggtattt ccatgagcgt ttttcctgtt gcaatggctg gcggtaatat tgttctggat 4980

attaccagca aggccgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat 5040

caaagaagta ttgcgacaac ggttaatttg cgtgatggac agactctttt actcggtggc 5100

ctcactgatt ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttcctgtc taaaatccct 5160

ttaatcggcc tcctgtttag ctcccgctct gattctaacg aggaaagcac gttatacgtg 5220

ctcgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt 5280

ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt 5340

cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct 5400

ccctttaggg ttccgattta gtgatttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg 5460

tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga 5520

gtccacgttc tttaatagtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc 5580

ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga 5640

gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttaaat 5700

atttgcttat acaatcttcc tgtttttggg gcttttctga ttatcaaccg gggtacatat 5760

gattgacatg ctagttttac gattaccgtt catcgattct cttgtttgct ccagactctc 5820

aggcaatgac ctgatagcct ttgtagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg 5880

aatttatcag ctagaacggt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt 5940

tctcacccgt ttgaatcttt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag 6000

ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa ataaaggctt ctcccgcaaa agtattacag 6060

ggtcataatg tttttggtac aaccgattta gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat 6120

tttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat ttattggatg ttggaagttc ctgatgcggt 6180

attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat atggtgcact ctcagtacaa 6240

tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc 6300

cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga 6360

gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg 6420

tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg 6480

gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa 6540

atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 6600

agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcgg gcattttgcc 6660

ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 6720

gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 6780

gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 6840

tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 6900

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 6960

aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 7020

cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc 7080

gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 7140

cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 7200

tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 7260

tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7320

ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta 7380

tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7440

gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7500

ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 7560

tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 7620

agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa 7680

aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttte 7740

cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 7800

agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcgtac atacctcgct ctgctaatcc 7860

tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 7920

gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 7980

gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 8040

ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 8100

gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 8160

ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg cggagcctat 8220

ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 8280

acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gggtttgagt 8340

gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaccaag 8400

cggaagagc 8409

<210> 6
<211> 8611
<212> DNA
<213> 腺相關病毒

<400> 6
gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcgcg 60

ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 120

cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt 180

ccttgtagtt aatgattaac ccgccatgct aattatctac gtagccatgt ctagagttta 240

aacaagcttg catgtctaag ctagaccctt cagattaaaa ataactgagg taagggcctg 300

ggtaggggag gtggtgtgag acgctcctgt ctctcctcta tctgcccatc ggccctttgg 360

ggaggaggaa tgtgcccaag gactaaaaaa aggccatgga gccagagggg cgagggcaac 420

agacctttca tgggcaaacc ttggggccct gctgtctagc atgccccact acgggtctag 480

gctgcccatg taaggaggca aggcctgggg acacccgaga tgcctggtta taattaaccc 540

agacatgtgg ctgccccccc ccccccaaca cctgctgcct ctaaaaataa ccctgtccct 600

ggtggatccc ctgcatgcga agatcttcga acaaggctgt gggggactga gggcaggctg 660

taacaggctt gggggccagg gcttatacgt gcctgggact cccaaagtat tactgttcca 720

tgttcccggc gaagggccag ctgtcccccg ccagctagac tcagcactta gtttaggaac 780

cagtgagcaa gtcagcccct ggggcagccc atacaaggcc atggggctgg gcaagctgca 840

cgcctgggtc cggggtgggc acggtgcccg ggcaacgagc tgaaagctca tctgctctca 900

ggggcccctc cctggggaca gcccctcctg gctagtcaca ccctgtaggc tcctctatat 960

aacccagggg cacaggggct gccctcattc taccaccacc tccacagcac agacagacac 1020

tcaggagcca gccagcggcg cgcccaggta agtttagtct ttttgtcttt tatttcaggt 1080

cccggatccg gtggtggtgc aaatcaaaga actgctcctc agtggatgtt gcctttactt 1140

ctaggcctgt acggaagtgt tacttctgct ctaaaagctg cggaattgta cccgcggccg 1200

ccaccatgct gtggtgggag gaggtggagg attgttatga aagggaggac gtgcagaaga 1260

agacttttac caagtgggtg aacgctcagt tcagcaaatt tgggaagcag cacatcgaga 1320

atctgttttc cgacctgcag gatgggagac ggctgctgga tctgctggaa ggactgactg 1380

gccagaagct gcccaaagag aaggggagca ctagggtgca cgccctgaac aacgtgaaca 1440

aagctctgag agtgctgcag aacaacaacg tggatctggt gaatattggc agtactgata 1500

tcgtggacgg gaaccacaaa ctgacactgg gcctgatctg gaacattatt ctgcactggc 1560

aggtgaaaaa tgtgatgaag aacatcatgg ccgggctgca gcagaccaat tccgagaaga 1620

tcctgctgtc ttgggtgcgg cagagcaccc gcaactatcc ccaggtgaac gtgattaact 1680

tcactacatc ctggagcgac gggctggccc tgaatgctct gattcacagc cacaggcctg 1740

atctgttcga ctggaatagc gtggtgtgcc agcagtctgc cacacagcgc ctggaacatg 1800

ccttcaatat cgctcggtac cagctgggga tcgaaaaact gctggaccca gaggatgtgg 1860

acactacata cccagataaa aagtctattc tgatgtacat tactagcctg ttccaggtgc 1920

tgccacagca ggtgtctatt gaagccattc aggaggtgga aatgctgccc cgccccccca 1980

aagtgactaa agaggagcat tttcagctgc atcatcagat gcattacagc cagcagatta 2040

ccgtgagcct ggctcaggga tatgagcgca ccagtagtcc aaaaccacgg ttcaagtcct 2100

acgcttatac ccaggctgcc tacgtgacaa ctagcgaccc tactagatcc ccctttccat 2160

cccagcacct ggaggcccca gaggacaaga gctttgggtc cagcctgatg gaaagcgagg 2220

tgaatctgga tcggtaccag acagccctgg aggaggtgct gagctggctg ctgagtgctg 2280

aagacacact gcaggcccag ggcgaaattt ccaatgacgt ggaagtggtg aaggatcagt 2340

tccacacaca cgagggctat atgatggacc tgacagctca ccaggggcgc gtgggcaata 2400

tcctgcagct gggctctaaa ctgatcggca ccgggaaact gagtgaggac gaggaaacag 2460

aagtgcagga gcagatgaac ctgctgaaca gccgctggga gtgtctgaga gtggctagta 2520

tggagaagca gtccaacctg caccgggtgc tgatggacct gcagaaccag aaactgaaag 2580

agctgaacga ctggctgaca aagactgagg aacgcacaag gaagatggag gaggagccac 2640

tgggacccga cctggaggat ctgaagagac aggtgcagca gcataaggtg ctgcaggagg 2700

atctggaaca ggagcaggtg cgggtgaact ccctgacaca tatggtggtg gtggtggacg 2760

aatctagtgg agatcacgcc accgccgccc tggaggaaca gctgaaggtg ctgggggacc 2820

ggtgggccaa catttgccgg tggaccgagg acaggtgggt gctgctgcag gacatcctgc 2880

tgaaatggca gaggctgacc gaggagcagt gtctgtttag tgcttggctg agcgagaaag 2940

aggacgccgt gaacaagatc cacacaaccg gctttaagga tcagaacgaa atgctgtcta 3000

gcctgcagaa actggctgtg ctgaaggccg atctggagaa aaagaagcag agcatgggca 3060

aactgtatag cctgaaacag gacctgctga gcaccctgaa gaacaagagc gtgacccaga 3120

agacagaagc ctggctggat aactttgccc gctgctggga caacctggtg cagaaactgg 3180

agaaaagtac agctcagatc tctcaggctg tgaccacaac ccagcctagc ctgacccaga 3240

caaccgtgat ggaaaccgtg accaccgtga caacccgcga acagatcctg gtgaaacatg 3300

cccaggaaga gctgccacct ccacctcccc agaagaagag aaccctggag cggctgcagg 3360

agctgcagga agccactgac gaactggacc tgaagctgag gcaggccgaa gtgattaagg 3420

ggtcttggca gcctgtgggc gatctgctga ttgattccct gcaggaccac ctggaaaagg 3480

tgaaggctct gagaggcgaa attgctccac tgaaggagaa cgtgagtcat gtgaacgatc 3540

tggctagaca gctgacaaca ctgggcatcc agctgagccc atacaatctg agcacactgg 3600

aggacctgaa taccaggtgg aagctgctgc aggtggctgt ggaagaccgg gtgcggcagc 3660

tgcatgaggc ccatcgcgac ttcggaccag ccagccagca ctttctgagc acatccgtgc 3720

aggggccctg ggagagggcc atttctccca acaaggtgcc ctactatatt aatcacgaga 3780

cccagaccac ttgttgggac catcccaaga tgacagaact gtaccagtcc ctggccgatc 3840

tgaacaacgt gaggtttagc gcttacagaa ccgctatgaa gctgagacgg ctgcagaagg 3900

ccctgtgcct ggatctgctg tccctgtccg ccgcctgcga tgccctggat cagcataatc 3960

tgaagcagaa cgatcagcca atggatatcc tgcagatcat caactgcctg accactatct 4020

acgacaggct ggagcaggag cacaacaacc tggtgaacgt gcctctgtgc gtggatatgt 4080

gcctgaactg gctgctgaac gtgtatgaca ctgggcgcac cggccggatc agagtgctga 4140

gttttaaaac tgggattatc tccctgtgta aggcccacct ggaggacaag tacaggtacc 4200

tgttcaagca ggtggctagt agcactggat tttgtgacca gcgccgcctg ggactgctgc 4260

tgcatgatag tatccagatt cctagacagc tgggagaggt ggctagtttc ggaggatcta 4320

acatcgaacc cagcgtgcgc agctgtttcc agtttgccaa taacaaacct gaaatcgagg 4380

ctgctctgtt cctggattgg atgcgcctgg aaccacagag catggtgtgg ctgcctgtgc 4440

tgcacagagt ggctgccgcc gaaactgcca agcaccaggc taaatgcaac atctgcaagg 4500

aatgtcccat tatcggcttt cgctacagga gtctgaaaca ttttaactac gatatttgcc 4560

agagctgctt cttttccgga agagtggcca aaggacacaa gatgcactac cctatggtgg 4620

aatattgcac cccaactaca tctggcgaag atgtgcgcga ttttgccaag gtgctgaaga 4680

ataagtttcg gactaagagg tacttcgcca agcacccccg catggggtat ctgccagtgc 4740

agacagtgct ggaaggagac aatatggaga ccgatacaat gtgagcggcc gcaataaaag 4800

atctttattt tcattagatc tgtgtgttgg ttttttgtgt gtctagagca tggctacgta 4860

gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4920

actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4980

ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gccagctggc gtaatagcga 5040

agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggaagtt 5100

ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc gtttttcctg ttgcaatggc 5160

tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat agtttgagtt cttctactca 5220

ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca acggttaatt tgcgtgatgg 5280

acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac acttctcagg attctggcgt 5340

accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt agctcccgct ctgattctaa 5400

cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagcggcg 5460

cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc 5520

tagcgcccgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 5580

gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgattta cggcacctcg 5640

accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 5700

tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg 5760

gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt 5820

cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa 5880

tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt cctgtttttg gggcttttct 5940

gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt acgattaccg ttcatcgatt 6000

ctcttgtttg ctccagactc tcaggcaatg acctgatagc ctttgtagag acctctcaaa 6060

aatagctacc ctctccggca tgaatttatc agctagaacg gttgaatatc atattgatgg 6120

tgatttgact gtctccggcc tttctcaccc gtttgaatct ttacctacac attactcagg 6180

cattgcattt aaaatatatg agggttctaa aaatttttat ccttgcgttg aaataaaggc 6240

ttctcccgca aaagtattac agggtcataa tgtttttggt acaaccgatt tagctttatg 6300

ctctgaggct ttattgctta attttgctaa ttctttgcct tgcctgtatg atttattgga 6360

tgttggaagt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc 6420

atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac 6480

ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 6540

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 6600

cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 6660

atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 6720

ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 6780

cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 6840

ccctttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 6900

aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 6960

ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 7020

gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 7080

cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 7140

acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 7200

gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac 7260

aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 7320

ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 7380

ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 7440

gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 7500

aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 7560

aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 7620

aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 7680

gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag 7740

gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 7800

tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 7860

gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat 7920

caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 7980

actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcgt 8040

acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt 8100

cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 8160

gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 8220

cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg 8280

gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 8340

tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 8400

tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 8460

gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat 8520

aaccgtatta ccgggtttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 8580

agcgagtcag tgagcgacca agcggaagag c 8611

<210> 7
<211> 792
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成啓動子

<400> 7
aagcttgcat gtctaagcta gacccttcag attaaaaata actgaggtaa gggcctgggt 60

aggggaggtg gtgtgagacg ctcctgtctc tcctctatct gcccatcggc cctttgggga 120

ggaggaatgt gcccaaggac taaaaaaagg ccatggagcc agaggggcga gggcaacaga 180

cctttcatgg gcaaaccttg gggccctgct gtctagcatg ccccactacg ggtctaggct 240

gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc ctggttataa ttaacccaga 300

catgtggctg ccccccccccc cccaacacct gctgcctcta aaaataaccc tgtccctggt 360

ggatcccctg catgcgaaga tcttcgaaca aggctgtggg ggactgaggg caggctgtaa 420

caggcttggg ggccagggct tatacgtgcc tgggactccc aaagtattac tgttccatgt 480

tcccggcgaa gggccagctg tccccccgcca gctagactca gcacttagtt taggaaccag 540

tgagcaagtc agcccttggg gcagcccata caaggccatg gggctgggca agctgcacgc 600

ctgggtccgg ggtgggcacg gtgcccgggc aacgagctga aagctcatct gctctcaggg 660

gcccctcccc ggggacagcc cctcctggct agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac 720

ccaggggcac aggggctgcc ctcattctac caccacctcc acagcacaga cagacactca 780

ggagcagcca gc 792

<210> 8
<211> 8629
<212> DNA
<213> 腺相關病毒

<400> 8

gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60

tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagagggga gtggccaact ccatcactag 120

gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180

agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 240

ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 300

ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 360

ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420

gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480

taacccagac atgtggctgc ccccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 540

gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 600

aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 660

gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 720

aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780

gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840

ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct 900

ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960

agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020

caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 1080

tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 1140

ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200

gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260

cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320

gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt 1380

gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac 1440

tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500

ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560

gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat 1620

taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680

gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740

acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800

tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860

ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920

ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980

gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040

gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatccccctt 2100

tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag 2160

cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220

tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga 2280

tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340

caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400

aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460

tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520

gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580

gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640

ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt 2700

ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg 2760

ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820

cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880

gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940

gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000

gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060

ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120

actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180

ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240

acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300

gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360

taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420

aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480

cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540

actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600

gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660

cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720

cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780

cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840

gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900

taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960

tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020

tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080

gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140

gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact 4200

gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg 4260

atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320

cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc 4380

tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440

caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500

ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560

ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct 4620

gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680

agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740

aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca 4800

gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4860

gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4920

aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcagc 4980

tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg 5040

cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 5100

actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcaggggа taacgcagga aagaacatgt 5160

gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 5220

ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 5280

acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 5340

ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 5400

cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc 5460

tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 5520

gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 5580

ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 5640

acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 5700

gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 5760

ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 5820

tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 5880

gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 5940

tctaaagtat atatgagtaa aaatattccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag 6000

gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 6060

aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 6120

ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 6180

caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg 6240

gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 6300

cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag ctgtgctcga cgttgtcact 6360

gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatcc 6420

caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 6480

cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt 6540

actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6600

gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 6660

gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 6720

ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 6780

cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 6840

atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6900

accggtaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 6960

aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 7020

ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7080

ggcccttttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 7140

cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 7200

cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 7260

tactgagagt gcaccatatg cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 7320

gcatcaggcg attccaacat ccaataaatc atacaggcaa ggcaaagaat tagcaaaatt 7380

aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgta ccaaaaacat tatgaccctg 7440

taatactttt gcgggagaag cctttatttc aacgcaagga taaaaatttt tagaaccctc 7500

atatatttta aatgcaatgc ctgagtaatg tgtaggtaaa gattcaaacg ggtgagaaag 7560

gccggagaca gtcaaatcac catcaatatg atattcaacc gttctagctg ataaattcat 7620

gccggagagg gtagctattt ttgagaggtc tctacaaagg ctatcaggtc attgcctgag 7680

agtctggagc aaacaagaga atcgatgaac ggtaatcgta aaactagcat gtcaatcata 7740

tgtaccccgg ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga agattgtata agcaaatatt 7800

taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 7860

ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 7920

atagggttga gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 7980

aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc 8040

taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc 8100

ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 8160

gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 8220

acacccgccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtact atggttgctt tgacgagcac 8280

gtataacgtg ctttcctcgt tagaatcaga gcgggagcta aacaggaggc cgattaaagg 8340

gattttagac aggaacggta cgccagaatc ctgagaagtg tttttataat cagtgaggcc 8400

accgagtaaa agagtctgtc catcacgcaa attaaccgtt gtcgcaatac ttctttgatt 8460

agtaataaca tcacttgcct gagtagaaga actcaaacta tcggccttgc tggtaatatc 8520

cagaacaata ttaccgccag ccattgcaac ggaatcgcca ttcgccattc aggctgcgca 8580

actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagct 8629

<210> 9
<211> 4977
<212> DNA
<213> 腺相關病毒

<400> 9
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg 60

tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120

gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgctactta tctacgtagc catgctctag 180

agtttaaaca agcttgcatg tctaagctag acccttcaga ttaaaaataa ctgaggtaag 240

ggcctgggta ggggaggtgg tgtgagacgc tcctgtctct cctctatctg cccatcggcc 300

ctttggggag gaggaatgtg cccaaggact aaaaaaaggc catggagcca gaggggcgag 360

ggcaacagac ctttcatggg caaaccttgg ggccctgctg tctagcatgc cccactacgg 420

gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat 480

taacccagac atgtggctgc ccccccccccc ccaacacctg ctgcctctaa aaataaccct 540

gtccctggtg gatcccctgc atgcgaagat cttcgaacaa ggctgtgggg gactgagggc 600

aggctgtaac aggcttgggg gccagggctt atacgtgcct gggactccca aagtattact 660

gttccatgtt cccggcgaag ggccagctgt cccccgccag ctagactcag cacttagttt 720

aggaaccagt gagcaagtca gcccttgggg cagcccatac aaggccatgg ggctgggcaa 780

gctgcacgcc tgggtccggg gtgggcacgg tgcccgggca acgagctgaa agctcatctg 840

ctctcagggg cccctccctg gggacagccc ctcctggcta gtcacaccct gtaggctcct 900

ctatataacc caggggcaca ggggctgccc tcattctacc accacctcca cagcacagac 960

agacactcag gagcagccag cggcgcgccc aggtaagttt agtctttttg tcttttattt 1020

caggtcccgg atccggtggt ggtgcaaatc aaagaactgc tcctcagtgg atgttgcctt 1080

tacttctagg cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcggaa ttgtacccgc 1140

ggccgccacc atgctgtggt gggaggaggt ggaggattgt tatgaaaggg aggacgtgca 1200

gaagaagact tttaccaagt gggtgaacgc tcagttcagc aaatttggga agcagcacat 1260

cgagaatctg ttttccgacc tgcaggatgg gagacggctg ctggatctgc tggaaggact 1320

gactggccag aagctgccca aagagaaggg gagcactagg gtgcacgccc tgaacaacgt 1380

gaacaaagct ctgagagtgc tgcagaacaa caacgtggat ctggtgaata ttggcagtac 1440

tgatatcgtg gacgggaacc acaaactgac actgggcctg atctggaaca ttattctgca 1500

ctggcaggtg aaaaatgtga tgaagaacat catggccggg ctgcagcaga ccaattccga 1560

gaagatcctg ctgtcttggg tgcggcagag cacccgcaac tatccccagg tgaacgtgat 1620

taacttcact acatcctgga gcgacgggct ggccctgaat gctctgattc acagccacag 1680

gcctgatctg ttcgactgga atagcgtggt gtgccagcag tctgccacac agcgcctgga 1740

acatgccttc aatatcgctc ggtaccagct ggggatcgaa aaactgctgg acccagagga 1800

tgtggacact acatacccag ataaaaagtc tattctgatg tacattacta gcctgttcca 1860

ggtgctgcca cagcaggtgt ctattgaagc cattcaggag gtggaaatgc tgccccgccc 1920

ccccaaagtg actaaagagg agcattttca gctgcatcat cagatgcatt acagccagca 1980

gattaccgtg agcctggctc agggatatga gcgcaccagt agtccaaaac cacggttcaa 2040

gtcctacgct tatacccagg ctgcctacgt gacaactagc gaccctacta gatcccccct 2100

tccatcccag cacctggagg ccccagagga caagagcttt gggtccagcc tgatggaaag 2160

cgaggtgaat ctggatcggt accagacagc cctggaggag gtgctgagct ggctgctgag 2220

tgctgaagac acactgcagg cccagggcga aatttccaat gacgtggaag tggtgaagga 2280

tcagttccac acacacgagg gctatatgat ggacctgaca gctcaccagg ggcgcgtggg 2340

caatatcctg cagctgggct ctaaactgat cggcaccggg aaactgagtg aggacgagga 2400

aacagaagtg caggagcaga tgaacctgct gaacagccgc tgggagtgtc tgagagtggc 2460

tagtatggag aagcagtcca acctgcaccg ggtgctgatg gacctgcaga accagaaact 2520

gaaagagctg aacgactggc tgacaaagac tgaggaacgc acaaggaaga tggaggagga 2580

gccactggga cccgacctgg aggatctgaa gagacaggtg cagcagcata aggtgctgca 2640

ggaggatctg gaacaggagc aggtgcgggt gaactccctg acacatatgg tggtggtggt 2700

ggacgaatct agtggagatc acgccaccgc cgccctggag gaacagctga aggtgctggg 2760

ggaccggtgg gccaacattt gccggtggac cgaggacagg tgggtgctgc tgcaggacat 2820

cctgctgaaa tggcagaggc tgaccgagga gcagtgtctg tttagtgctt ggctgagcga 2880

gaaagaggac gccgtgaaca agatccacac aaccggcttt aaggatcaga acgaaatgct 2940

gtctagcctg cagaaactgg ctgtgctgaa ggccgatctg gagaaaaaga agcagagcat 3000

gggcaaactg tatagcctga aacaggacct gctgagcacc ctgaagaaca agagcgtgac 3060

ccagaagaca gaagcctggc tggataactt tgcccgctgc tgggacaacc tggtgcagaa 3120

actggagaaa agtacagctc agatctctca ggctgtgacc acaacccagc ctagcctgac 3180

ccagacaacc gtgatggaaa ccgtgaccac cgtgacaacc cgcgaacaga tcctggtgaa 3240

acatgcccag gaagagctgc cacctccacc tccccagaag aagagaaccc tggagcggct 3300

gcaggagctg caggaagcca ctgacgaact ggacctgaag ctgaggcagg ccgaagtgat 3360

taaggggtct tggcagcctg tgggcgatct gctgattgat tccctgcagg accacctgga 3420

aaaggtgaag gctctgagag gcgaaattgc tccactgaag gagaacgtga gtcatgtgaa 3480

cgatctggct agacagctga caacactggg catccagctg agcccataca atctgagcac 3540

actggaggac ctgaatacca ggtggaagct gctgcaggtg gctgtggaag accgggtgcg 3600

gcagctgcat gaggcccatc gcgacttcgg accagccagc cagcactttc tgagcacatc 3660

cgtgcagggg ccctgggaga gggccatttc tcccaacaag gtgccctact atattaatca 3720

cgagacccag accacttgtt gggaccatcc caagatgaca gaactgtacc agtccctggc 3780

cgatctgaac aacgtgaggt ttagcgctta cagaaccgct atgaagctga gacggctgca 3840

gaaggccctg tgcctggatc tgctgtccct gtccgccgcc tgcgatgccc tggatcagca 3900

taatctgaag cagaacgatc agccaatgga tatcctgcag atcatcaact gcctgaccac 3960

tatctacgac aggctggagc aggagcacaa caacctggtg aacgtgcctc tgtgcgtgga 4020

tatgtgcctg aactggctgc tgaacgtgta tgacactggg cgcaccggcc ggatcagagt 4080

gctgagtttt aaaactggga ttatctccct gtgtaaggcc cacctggagg acaagtacag 4140

gtacctgttc aagcaggtgg ctagtagcac tggattttgt gaccagcgcc gcctgggact 4200

gctgctgcat gatagtatcc agattcctag acagctggga gaggtggcta gtttcggagg 4260

atctaacatc gaacccagcg tgcgcagctg tttccagttt gccaataaca aacctgaaat 4320

cgaggctgct ctgttcctgg attggatgcg cctggaacca cagagcatgg tgtggctgcc 4380

tgtgctgcac agagtggctg ccgccgaaac tgccaagcac caggctaaat gcaacatctg 4440

caaggaatgt cccattatcg gctttcgcta caggagtctg aaacatttta actacgatat 4500

ttgccagagc tgcttctttt ccggaagagt ggccaaagga cacaagatgc actaccctat 4560

ggtggaatat tgcaccccaa ctacatctgg cgaagatgtg cgcgattttg ccaaggtgct 4620

gaagaataag tttcggacta agaggtactt cgccaagcac ccccgcatgg ggtatctgcc 4680

agtgcagaca gtgctggaag gagacaatat ggagaccgat acaatgtgag cggccgcaat 4740

aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcta gagtcgacca 4800

gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4860

gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4920

aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgc 4977

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺病毒相關（rAAV）血清型AAVrh.74的用途，所述rAAV包含SEQ ID NO:9之微小肌縮蛋白核苷酸序列及SEQ ID NO:9之5’反向末端重複序列（ITR）、啟動子序列、嵌合內含子序列、多聚腺苷酸（Poly A）序列及3' ITR，其係用於製備治療有需要人類個體之肌肉萎縮症的藥劑，其中所述藥劑係調配用於全身投與途徑且包括5.0×10^{12} vg/kg至1.0×10^{15} vg/kg劑量之rAAV。

【請求項2】

如請求項1的用途，其中所述藥劑係調配用於靜脈內投與且所述rAAV之劑量係約2×10^{14} vg/kg。

【請求項3】

如請求項1的用途，其中所述rAAV之劑量係調配用於以約10 mL/kg投與。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項的用途，其中所述藥劑係調配用於藉由經約一小時輸注來投與。

【請求項5】

如請求項1至3中任一項的用途，其中所述肌肉萎縮症係杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy)或貝克氏肌肉萎縮症(Becker’s muscular dystrophy)。

【請求項6】

一種重組腺病毒相關（rAAV）血清型AAVrh.74之用途，其係用於製

備治療有需要人類個體之杜興氏肌肉萎縮症的藥劑，其中所述藥劑係調配用於藉由經約一小時靜脈內輸注來投與，且包括約2×10^{14} vg/kg劑量之所述rAAV，且其中所述rAAV包括SEQ ID NO: 9之核苷酸序列。

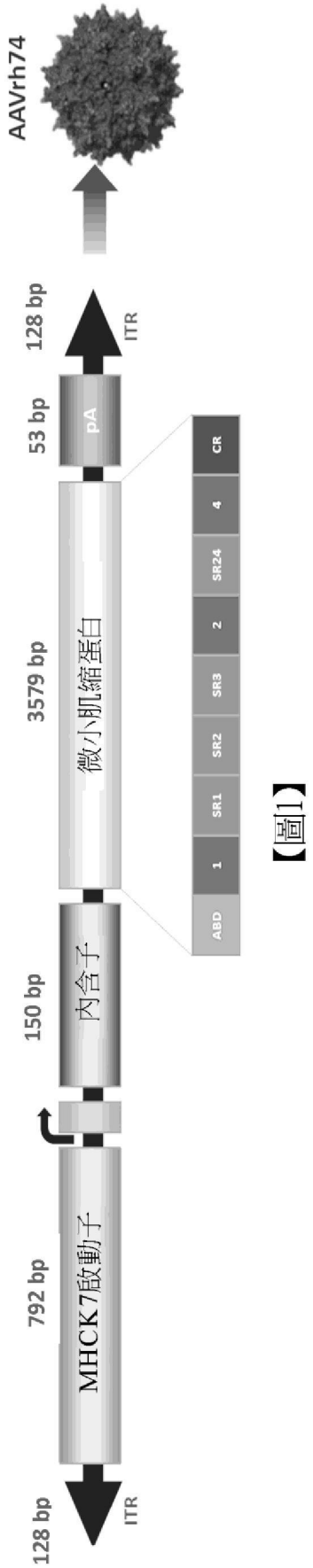
【請求項7】

如請求項1至3及6中任一項的用途，其中在向所述個體投與所述rAAV之後所述個體之血清肌酸激酶（CK）水準相較於在投與之前的血清CK水準降低。

【請求項8】

一種組合物，其包括SEQ ID NO: 9之核苷酸序列或包含SEQ ID NO: 9之核苷酸序列的rAAV。

【發明圖式】


AAVrh74
128 bp
ITR
53 bp
pA
3579 bp
微小肌縮蛋白
ABD
1
SR1
SR2
SR3
2
SR24
4
CR
150 bp
內含子
792 bp
MHCK7啟動子
128 bp
ITR

【圖1】

SEQ ID NO: 3

rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白

主要特徵:

ITR
MHCK7啟動子
嵌合內含子序列
人微小肌縮蛋白序列
多聚腺苷酸尾
安比西林抗性

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCT**GCG**
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA
ACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCT
ACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaagggcct
gggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggactaaaaaa
aggccatggagccagaggggcgagggcaacagacctttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacgggtcta
ggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgccccccccccccccaac
acctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggcaggctg
taacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtcccccgc
cagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaagctgcac
gcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcccctcctg
gctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcacagacagacact
caggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGAT
CCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG
GCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGCCGC
CACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGCAGA
AGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCAC
ATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAA
GGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACGCCCT
GAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTGGTGA
ATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCT
GGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGG
CTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCG
CAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGGCTGGC
CCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGT
GTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCA
GCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCCAGATA
AAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCAGGTGT

【圖2】

CTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAA
GAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGC
CTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGC
TTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTTCCATC
CCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCG
AGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTG
AGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGT
GAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCACCAGG
GGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTG
AGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCT
GGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTG
ATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAGACTGA
GGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTG
AAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGG
TGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGAT
CACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGGGCCAA
CATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAAT
GGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAG
GACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTC
TAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCAGAGCA
TGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACAAGAGC
GTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCT
GGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCC
AGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAACCCGC
GAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAA
GAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGAC
CTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCT
GCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGGCGAAA
TTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACA
ACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATAC
CAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGG
CCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCAGGGGC
CCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCC
AGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATC
TGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAG
AAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGATGCCCTGGATCAG
CATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTG
ACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCT
GTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGG
CCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCT
GGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTG
ACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGG
GAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCC
AGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATTGGATGCGCC
TGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAA
ACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTT

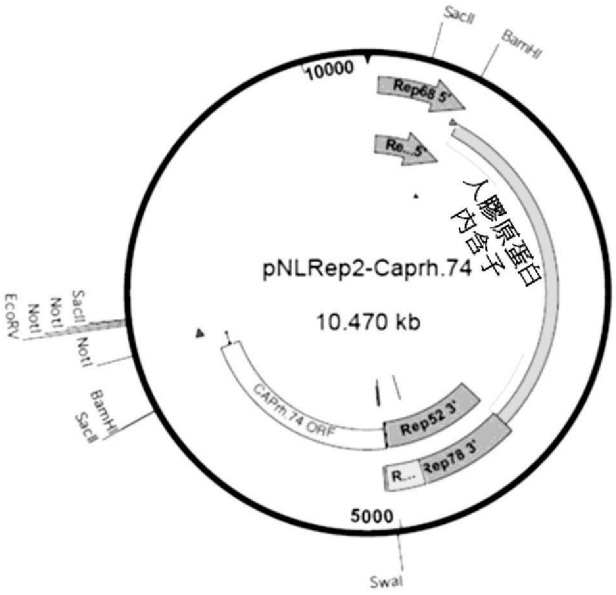
【圖2】(續)

CGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCG
GAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATATTGCACCCCA
ACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGG
ACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGT
GCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGtgaGCGGCCGCAATAAAAGATCT
TTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTCTAGAGCATGGCTACGTAGA
TAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG**
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT
CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGATTCCGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATA
TTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTA
ATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCG
GTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTA
AAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCA
CGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTC
AAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTG
CCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT
TTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTT
TGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATT
ACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTT
GTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGG
TTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATC
TTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTT
TATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTT
TTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATT
CTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAATCGCCTGATGCGGTATTTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCT
CTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCT
GACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGC
CTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA
TTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTT
GCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
AGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA

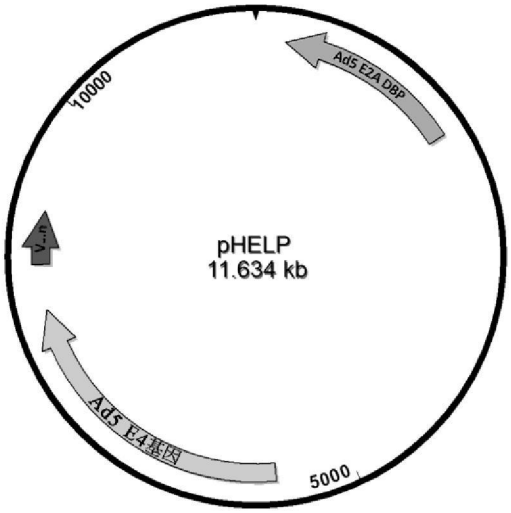
【圖2】(續)

GTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG
CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC
GCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT
ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT
AGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC
TTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTG
TCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCT
GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG
AGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG
CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC
CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATAC
CGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA
GAGC

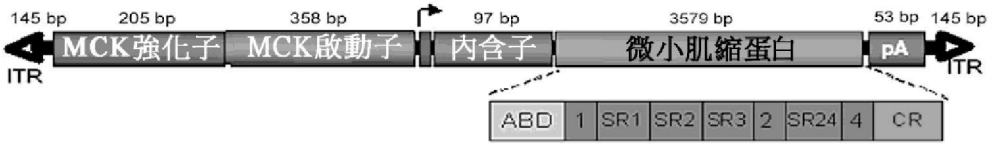
【圖2】(續)


SacII
BamHI
10000
Rep68 5'
Re... 5'
人膠原蛋白
內含子
pNLRep2-Caprh.74
10.470 kb
SacII
NotI
NotI
EcoRV
NotI
BamHI
SacII
CAPrh.74 ORF
Rep52 3'
R...
Rep78 3'
5000
SwaI

【圖3】



【圖4】


145 bp
205 bp
358 bp
97 bp
3579 bp
53 bp
145 bp
MCK強化子
MCK啟動子
內含子
微小肌縮蛋白
pA
ITR
ITR
ABD
1
SR1
SR2
SR3
2
SR24
4
CR

【圖5】

SEQ ID NO: 5

rAAVrh74.MCK.微小肌縮蛋白

主要特徵:
ITR
MCK啟動子
嵌合內含子序列
人密碼子優化之微小肌縮蛋白序列 -
多聚腺苷酸尾
安比西林抗性
具有 pBR322起點或複製之pGEX質體主鏈

GCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTG**GCGCGCTCGCTCGCTCACTGA**
GGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTAATTATCTACGTAGC
CATGTCTAGACAGCCACTATGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTG
GTTATAATTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCACCCCCACCCCGGTGCC
TGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGGCTGTGGGGG
ACTGAGGGCAGGCTGTAACAGGCTTGGGGGCCAGGGCTTATACGTGCCTGGGACTCCCAAAGTATTACTGTTCCA
TGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTAGTTTAGGAACCAGTGAGCAAGTCAG
CCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCATGGGGCTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCC
GGGCAACGAGCTGAAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCT
GTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCCCGGGTCACCACCACCTCCACAGCACAGACAGACA
CTCAGGAGCCAGCCAGCCAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAA
TCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTG
CGGAATTGTACCCGCGGCCGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAGCACATCGAGAATCTGTTTT
CCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTGGAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAG
GGGAGCACTAGGGTGCACGCCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCT
GGTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCTGATCTGGAACATTATTCT
GCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGGCCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGC
TGTCTTGGGTGCGGCAGAGCACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACG

【圖6】

GGCTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGCGTGGTGTGCCAGCAGT

CTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGGTACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAG

AGGATGTGGACACTACATACCCAGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACA

GCAGGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGACTAAAGAGGAGCATTT

TCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCGTGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAG

TCCAAAACCACGGTTCAAGTCCTACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCT

TTCCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGAAAGCGAGGTGAATCTG

GATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGCTGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGG

CGAAATTTCCAATGACGTGGAAGTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGC

TCACCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGAAACTGAGTGAGGACG

AGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAGCCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGA

GAAGCAGTCCAACCTGCACCGGGTGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGA

CAAAGACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGGATCTGAAGAGACA

GGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGAGCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGG

TGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTGGAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGAC

CGGTGGGCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCTGAAATGGCAGAG

GCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGAAAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAA

CCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATGCTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAA

AGAAGCAGAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACAAGAGCGTGACC

CAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGACAACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTAC

AGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCACAACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACC

GTGACAACCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCCCAGAAGAAGAGA

ACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAACTGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGAT

TAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGCGATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCT

GAGAGGCGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGG

GCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTG

TGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACAT

CCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCA

CTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTA

CAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGA

TGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACT

ATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGG

【圖6】(續)

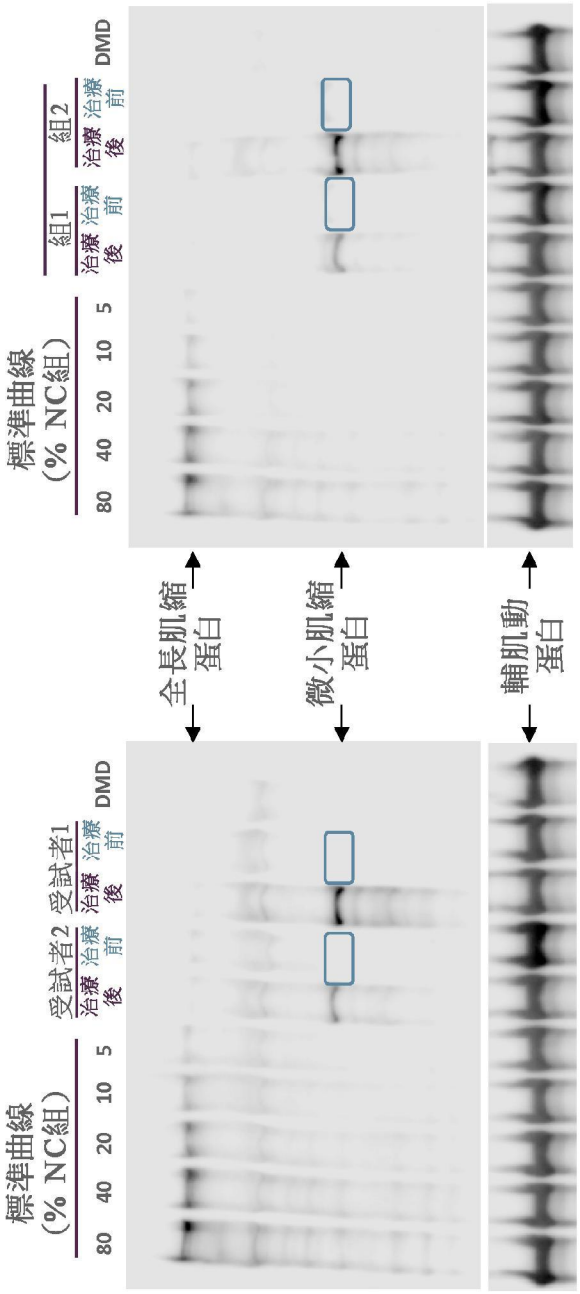
CTGCTGAACGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGT
GTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGC
GCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGAT
CTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCT
GGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTG
CCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTT
TAACTACGATATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTG
GAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTA
AGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAG
ACCGATACAATGTGAGC**GGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGT**CTA
GAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACA**AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC**
CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCG
GGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA
CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAGTTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTT
TTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCA
GGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTC
GGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCT
CCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCC
CTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
GCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT
CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGATTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT
AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTT
ATACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTAC
CGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAG
CTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTT
TCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTAT
CCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTT
ATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAAGTTCCTG
ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT
GCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCAT

【圖6】(續)

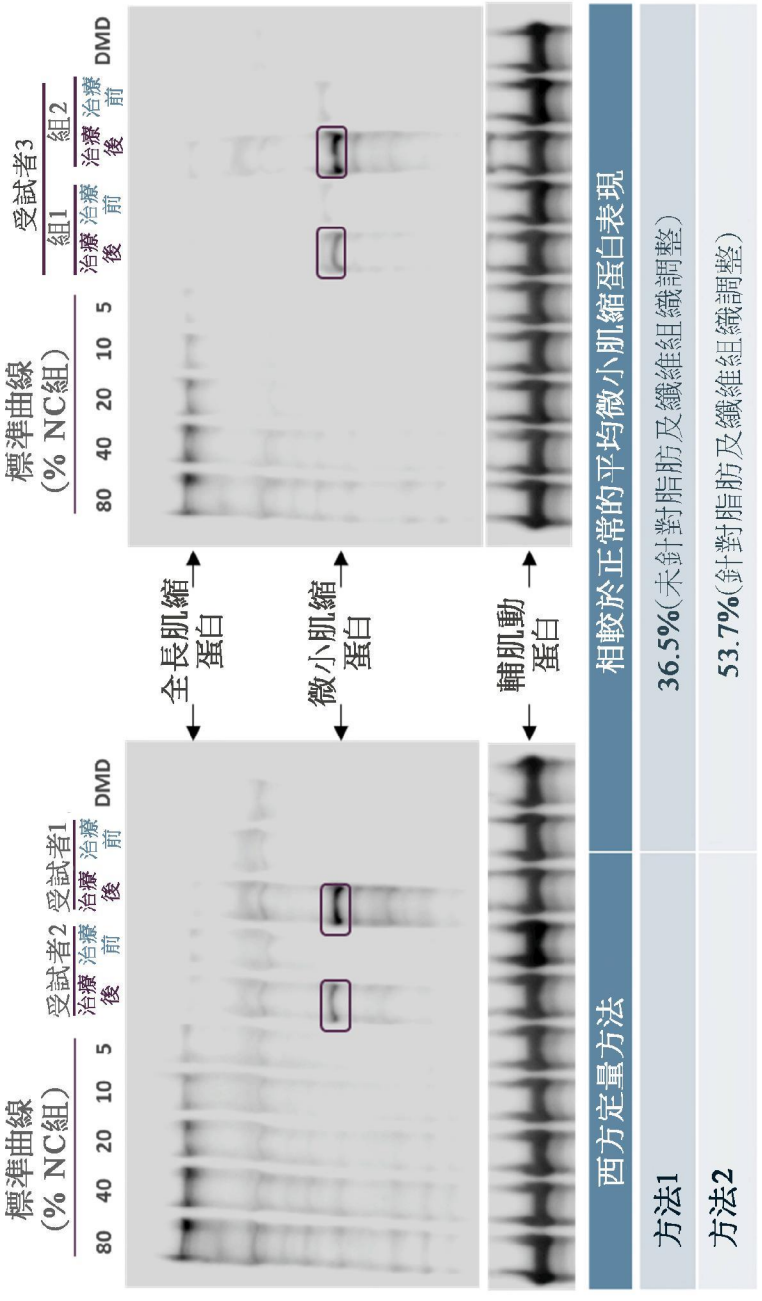
CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGC
GAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC
CTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAA
GATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGC
AAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTT
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAAC
AACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC
GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA
AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA
AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACC
AGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
CCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCGTACATACCTCGC
TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAG
TTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTAT
AGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA
AAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTAT
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGGGTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGC
GCAGCGAGTCAGTGAGCGACCAAGCGGAAGAGC

【圖6】(續)

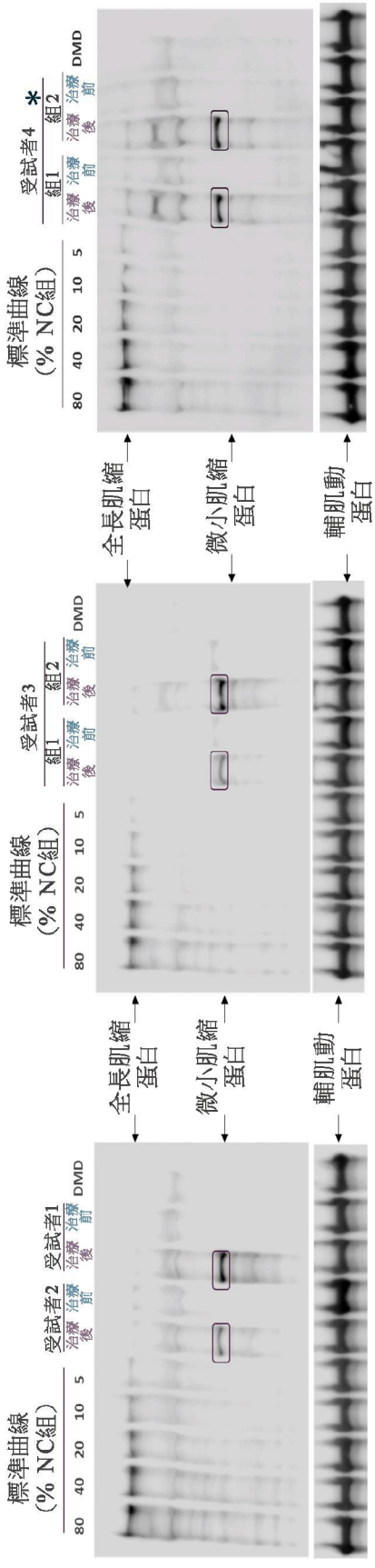
【圖7】


標準曲線
(% NC組)
80
40
20
10
5
受試者2 治療後
受試者2 治療前
受試者1 治療後
受試者1 治療前
DMD
全長肌縮蛋白
微小肌縮蛋白
輔肌動蛋白
組1 治療後
組1 治療前
組2 治療後
組2 治療前
DMD

【圖8A】

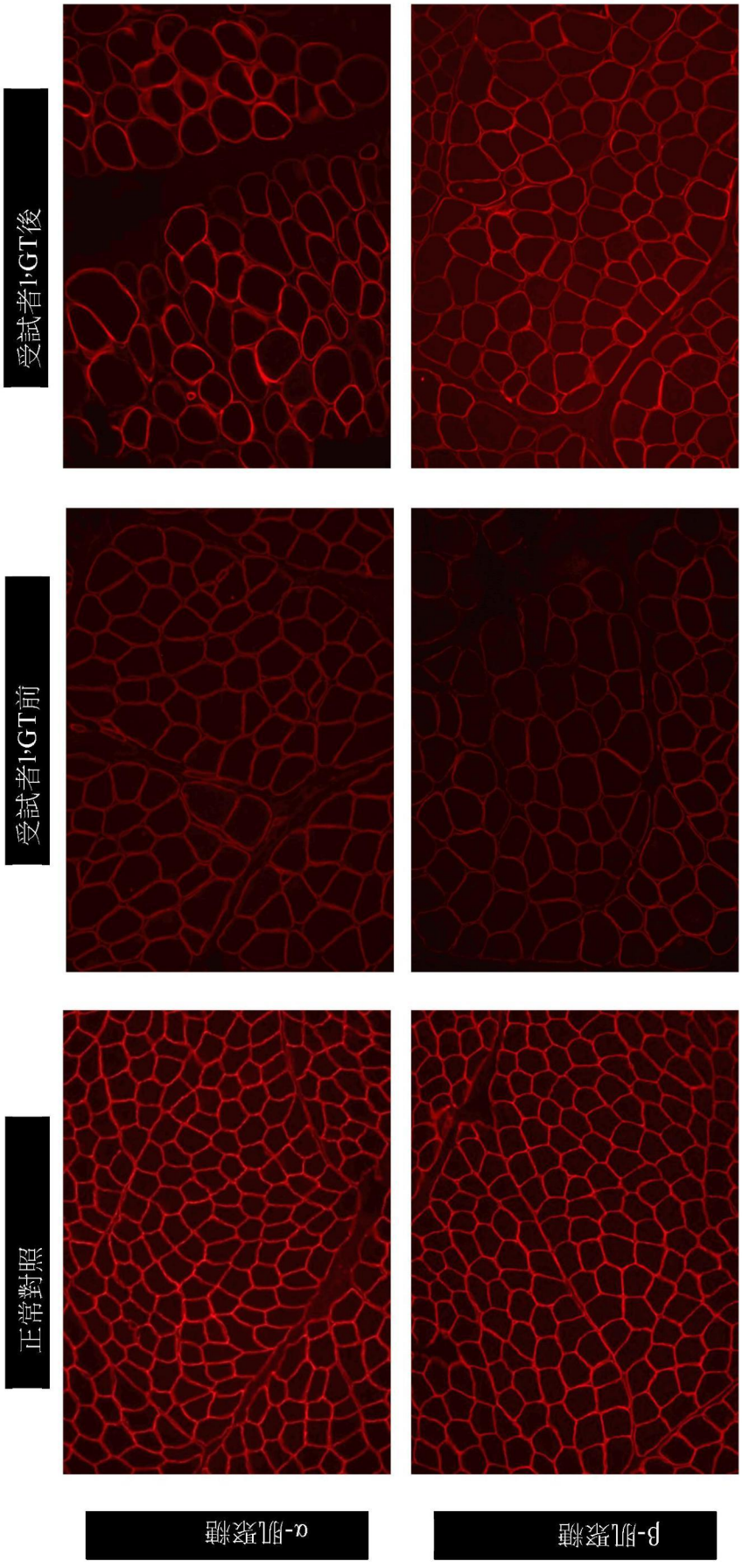

標準曲線
(% NC組)
80 40 20 10 5
受試者2 治療後 治療前
受試者1 治療後 治療前
DMD
全長肌縮蛋白
微小肌縮蛋白
輔肌動蛋白
受試者3
組1 治療後 治療前
組2 治療後 治療前
DMD
西方定量方法
相較於正常的平均微小肌縮蛋白表現
方法1
36.5%(未針對脂肪及纖維組織調整)
方法2
53.7%(針對脂肪及纖維組織調整)

【圖8B】

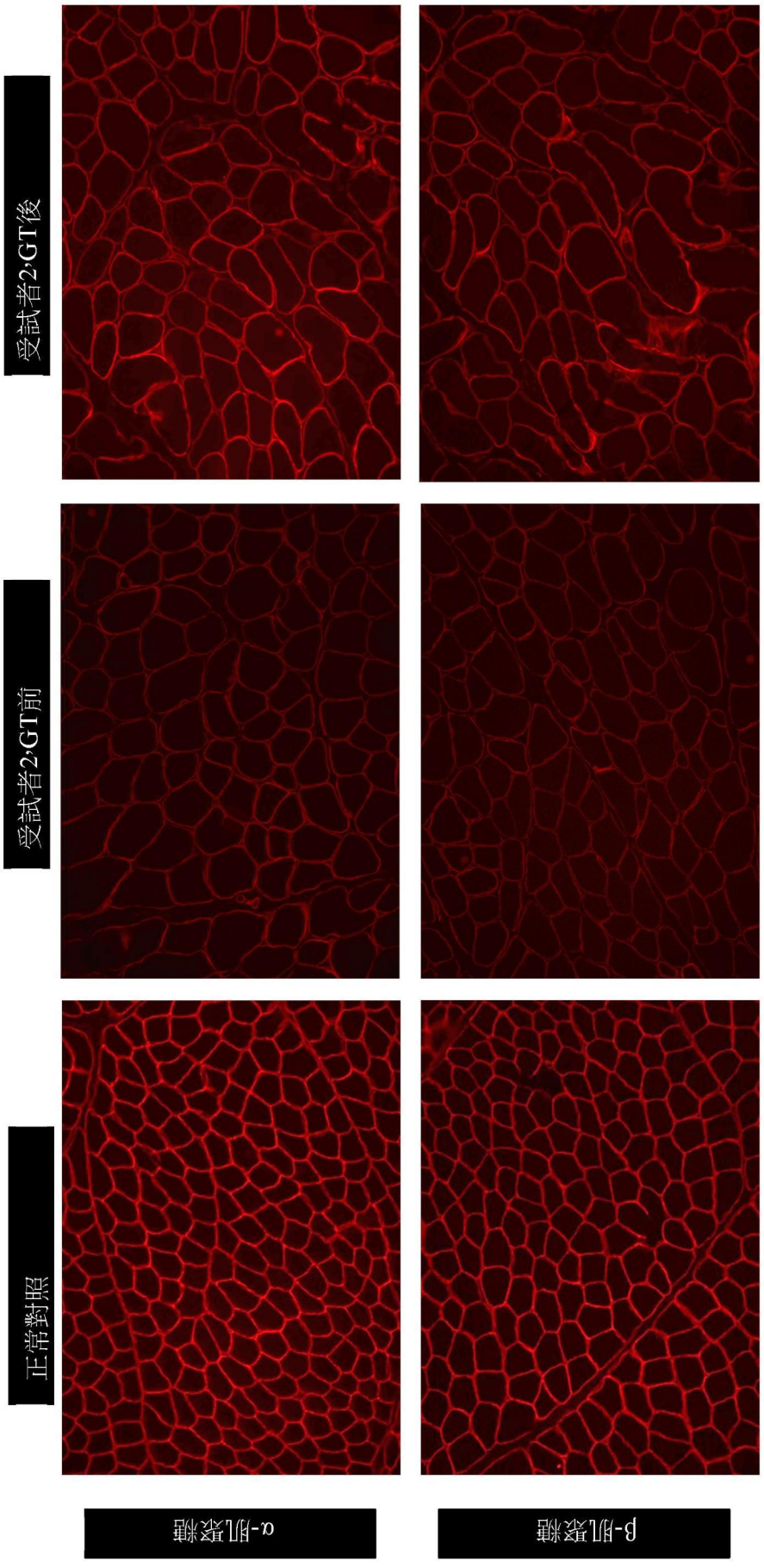


西方定量方法	相對於正常的平均微小肌縮蛋白表現(N=4)
方法1	**74.3%**(未針對脂肪及纖維組織調整)
方法2	**95.8%**(針對脂肪及纖維組織調整)

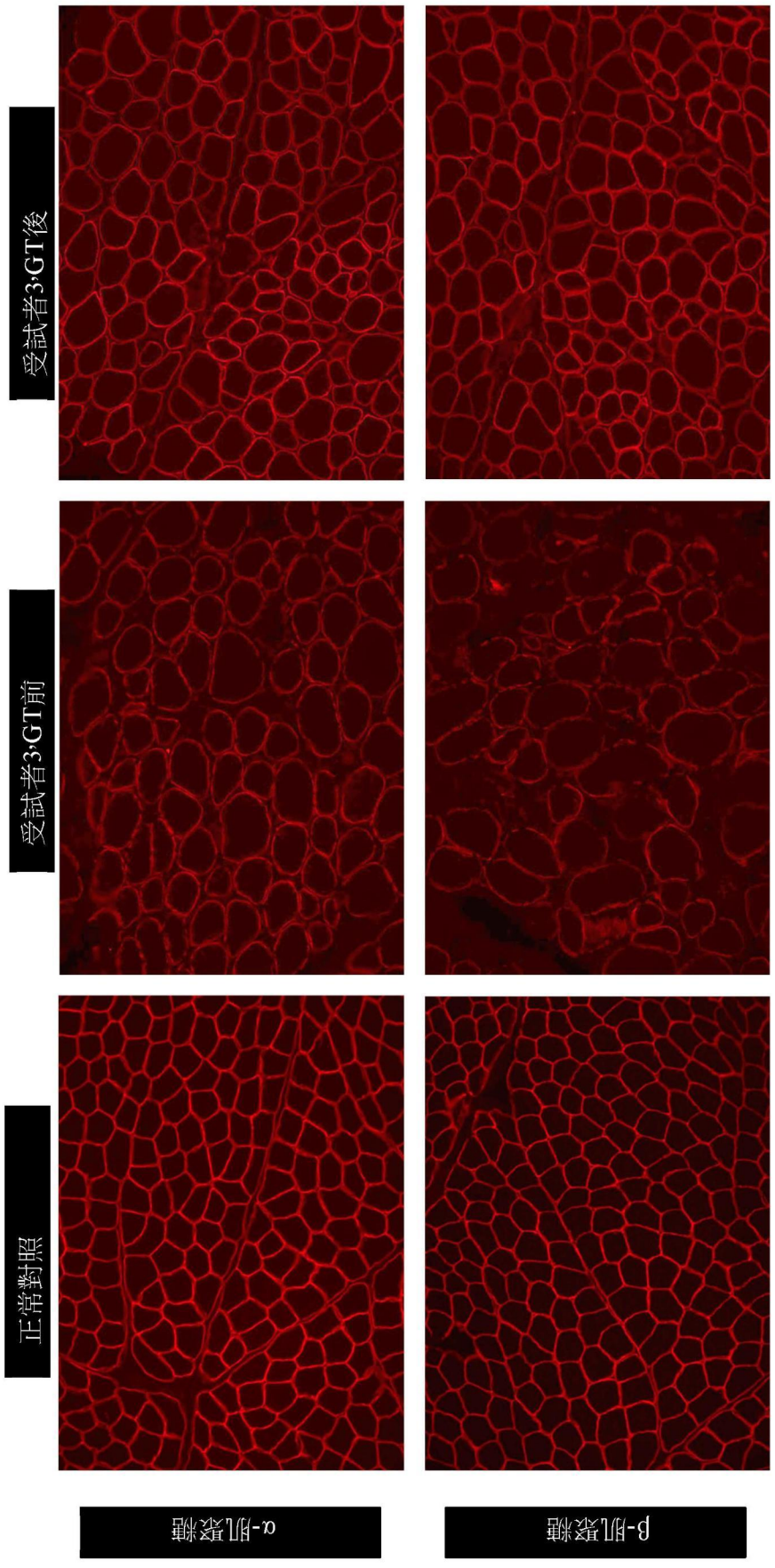
【圖8C】



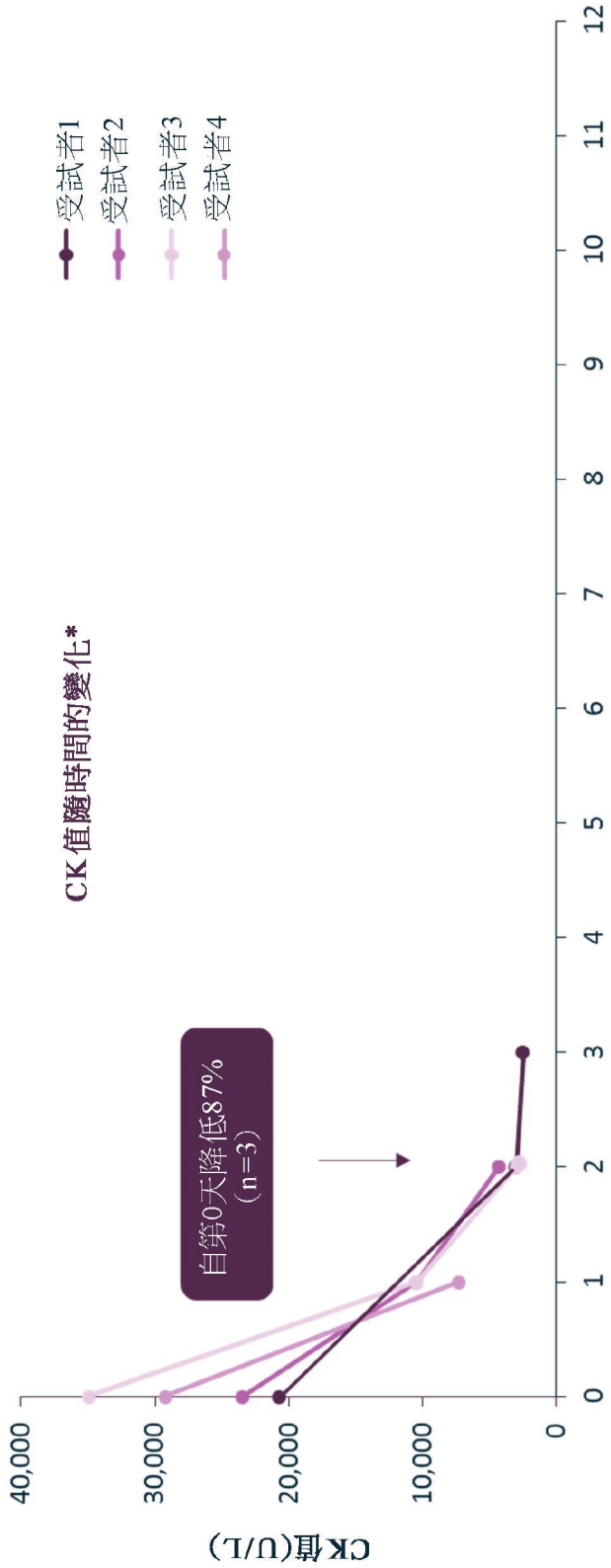
【圖9A】



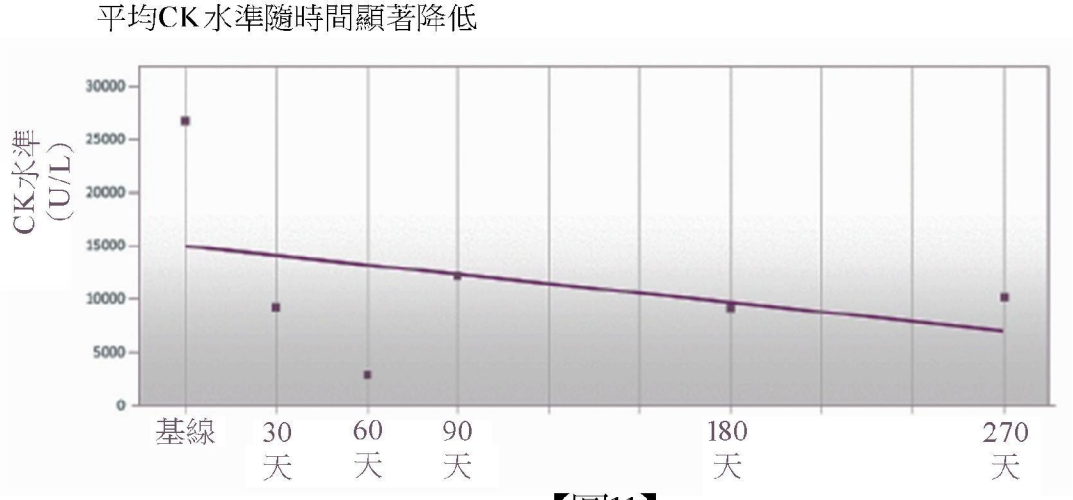
【圖9B】



【圖9C】

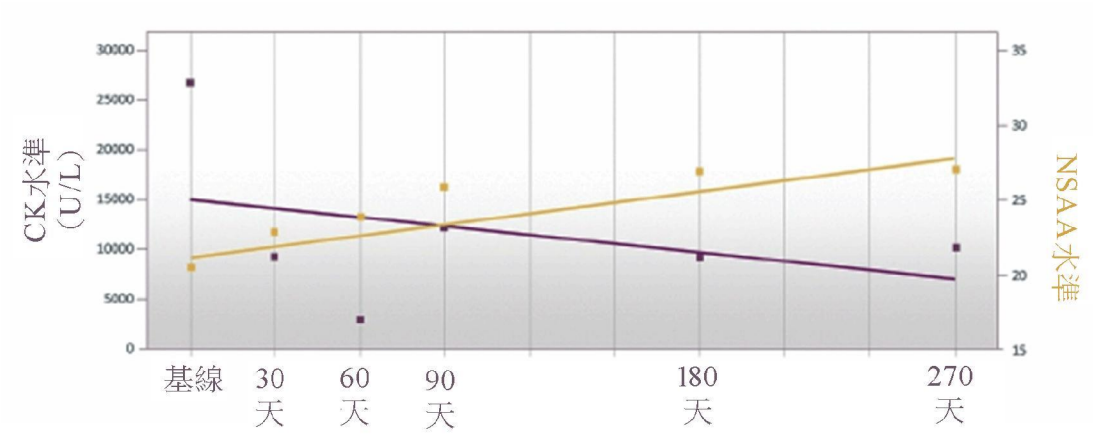

CK值(U/L)
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
治療後月份數
CK值隨時間的變化*
受試者1
受試者2
受試者3
受試者4
自第0天降低87%
(n=3)

【圖10】


平均CK水準隨時間顯著降低
CK水準
(U/L)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
基線
30
天
60
天
90
天
180
天
270
天

【圖11】

平均NSAA變化隨時間顯著增加，而CK水準隨時間顯著降低



【圖12】

SEQ ID NO: 9
rAAVrh74.MHCK7.微小肌縮蛋白

主要特徵:
ITR
MHCK7啟動子
嵌合內含子序列
人微小肌縮蛋白序列
多聚腺苷酸尾

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTT
ATCTACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggact
aaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacagaccttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacg
ggtctaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgccccccccccc
cccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggc
aggctgtaacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtcc
cccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaag
ctgcacgcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcc
cctcctggctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccacccacctccacagcacagaca
gacactcaggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC
TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG
CCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCT
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG
CCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGC
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG
TACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCC
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGA
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG
TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC
TACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA
AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC
TGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA

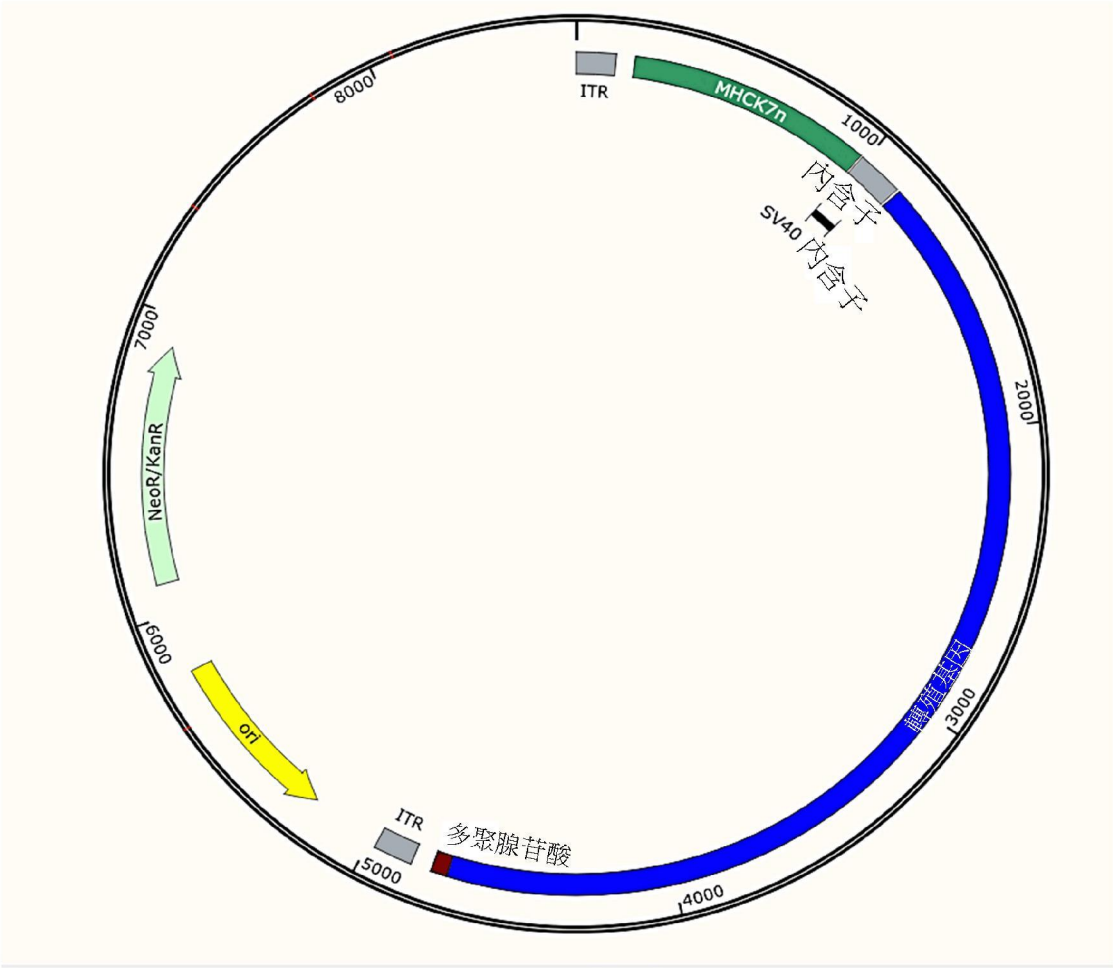
【圖13】

GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA
GAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACA
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC
AACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA
CCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAA
CGATCTGGCTAGACAGCTGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGA
GCACACTGGAGGACCTGAATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGAC
CGGGTGCGGCAGCTGCATGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTT
TCTGAGCACATCCGTGCAGGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGC
CCTACTATATTAATCACGAGACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAG
AACTGTACCAGTCCCTGGCCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCG
CTATGAAGCTGAGACGGCTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCG
CCGCCTGCGATGCCCTGGATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGAT
ATCCTGCAGATCATCAACTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCA
CAACAACCTGGTGAACGTGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAA
CGTGTATGACACTGGGCGCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGA
TTATCTCCCTGTGTAAGGCCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGG
TGGCTAGTAGCACTGGATTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATA
GTATCCAGATTCCTAGACAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCG
AACCCAGCGTGCGCAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTG
CTCTGTTCCTGGATTGGATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGC
TGCACAGAGTGGCTGCCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGC
AAGGAATGTCCCATTATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGAT
ATTTGCCAGAGCTGCTTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTAC
CCTATGGTGGAATATTGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCC
AAGGTGCTGAAGAATAAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCAT
GGGGTATCTGCCAGTGCAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAA
TGTGAGCGGCCGCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTG
TGTGtctagagtcgaccagagcatggctacgtagataagtagcatggcgg**gttaatcattaactacaAGGAACCCCTAG**

【圖13】(續)

**TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG
CGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGGCGGCCTCAGTGAGCG
AGCGAGCGCGC**

【圖13】(續)


ITR
MHCK7n
1000
內含子
SV40 內含子
2000
3000
4000
5000
ITR
多聚腺苷酸
ori
6000
NeoR/KanR
7000
8000

【圖14】

SEQ ID NO: 8

主要特徵:

ITR

MHCK7啟動子

嵌合內含子序列

人微小肌縮蛋白序列

多聚腺苷酸尾

卡那黴素抗性

GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGG
CCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTT
ATCTACGTAGCCATGCTCTAGAgtttaaacaagcttgcatgtctaagctagacccttcagattaaaaataactgaggtaa
gggcctgggtaggggaggtggtgtgagacgctcctgtctctcctctatctgcccatcggccctttggggaggaggaatgtgcccaaggact
aaaaaaaggccatggagccagaggggcgagggcaacagacctttcatgggcaaaccttggggccctgctgtctagcatgccccactacg
ggtctaggctgcccatgtaaggaggcaaggcctggggacacccgagatgcctggttataattaacccagacatgtggctgccccccccccc
cccaacacctgctgcctctaaaaataaccctgtccctggtggatcccctgcatgcgaagatcttcgaacaaggctgtgggggactgagggc
aggctgtaacaggcttgggggccagggcttatacgtgcctgggactcccaaagtattactgttccatgttcccggcgaagggccagctgtcc
cccgccagctagactcagcacttagtttaggaaccagtgagcaagtcagcccttggggcagcccatacaaggccatggggctgggcaag
ctgcacgcctgggtccggggtgggcacggtgcccgggcaacgagctgaaagctcatctgctctcaggggcccctccctggggacagcc
cctcctggctagtcacaccctgtaggctcctctatataacccaggggcacaggggctgccctcattctaccaccacctccacagcacagaca
gacactcaggagcagccagcggcgcgcccAGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCG
GATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTC
TAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC
CGCCACCATGCTGTGGTGGGAGGAGGTGGAGGATTGTTATGAAAGGGAGGACGTGC
AGAAGAAGACTTTTACCAAGTGGGTGAACGCTCAGTTCAGCAAATTTGGGAAGCAG
CACATCGAGAATCTGTTTTCCGACCTGCAGGATGGGAGACGGCTGCTGGATCTGCTG
GAAGGACTGACTGGCCAGAAGCTGCCCAAAGAGAAGGGGAGCACTAGGGTGCACG
CCCTGAACAACGTGAACAAAGCTCTGAGAGTGCTGCAGAACAACAACGTGGATCTG
GTGAATATTGGCAGTACTGATATCGTGGACGGGAACCACAAACTGACACTGGGCCT
GATCTGGAACATTATTCTGCACTGGCAGGTGAAAAATGTGATGAAGAACATCATGG
CCGGGCTGCAGCAGACCAATTCCGAGAAGATCCTGCTGTCTTGGGTGCGGCAGAGC
ACCCGCAACTATCCCCAGGTGAACGTGATTAACTTCACTACATCCTGGAGCGACGGG
CTGGCCCTGAATGCTCTGATTCACAGCCACAGGCCTGATCTGTTCGACTGGAATAGC
GTGGTGTGCCAGCAGTCTGCCACACAGCGCCTGGAACATGCCTTCAATATCGCTCGG
TACCAGCTGGGGATCGAAAAACTGCTGGACCCAGAGGATGTGGACACTACATACCC
AGATAAAAAGTCTATTCTGATGTACATTACTAGCCTGTTCCAGGTGCTGCCACAGCA
GGTGTCTATTGAAGCCATTCAGGAGGTGGAAATGCTGCCCCGCCCCCCCAAAGTGA
CTAAAGAGGAGCATTTTCAGCTGCATCATCAGATGCATTACAGCCAGCAGATTACCG

【圖15】

TGAGCCTGGCTCAGGGATATGAGCGCACCAGTAGTCCAAAACCACGGTTCAAGTCC
TACGCTTATACCCAGGCTGCCTACGTGACAACTAGCGACCCTACTAGATCCCCCTTT
CCATCCCAGCACCTGGAGGCCCCAGAGGACAAGAGCTTTGGGTCCAGCCTGATGGA
AAGCGAGGTGAATCTGGATCGGTACCAGACAGCCCTGGAGGAGGTGCTGAGCTGGC
TGCTGAGTGCTGAAGACACACTGCAGGCCCAGGGCGAAATTTCCAATGACGTGGAA
GTGGTGAAGGATCAGTTCCACACACACGAGGGCTATATGATGGACCTGACAGCTCA
CCAGGGGCGCGTGGGCAATATCCTGCAGCTGGGCTCTAAACTGATCGGCACCGGGA
AACTGAGTGAGGACGAGGAAACAGAAGTGCAGGAGCAGATGAACCTGCTGAACAG
CCGCTGGGAGTGTCTGAGAGTGGCTAGTATGGAGAAGCAGTCCAACCTGCACCGGG
TGCTGATGGACCTGCAGAACCAGAAACTGAAAGAGCTGAACGACTGGCTGACAAAG
ACTGAGGAACGCACAAGGAAGATGGAGGAGGAGCCACTGGGACCCGACCTGGAGG
ATCTGAAGAGACAGGTGCAGCAGCATAAGGTGCTGCAGGAGGATCTGGAACAGGA
GCAGGTGCGGGTGAACTCCCTGACACATATGGTGGTGGTGGTGGACGAATCTAGTG
GAGATCACGCCACCGCCGCCCTGGAGGAACAGCTGAAGGTGCTGGGGGACCGGTGG
GCCAACATTTGCCGGTGGACCGAGGACAGGTGGGTGCTGCTGCAGGACATCCTGCT
GAAATGGCAGAGGCTGACCGAGGAGCAGTGTCTGTTTAGTGCTTGGCTGAGCGAGA
AAGAGGACGCCGTGAACAAGATCCACACAACCGGCTTTAAGGATCAGAACGAAATG
CTGTCTAGCCTGCAGAAACTGGCTGTGCTGAAGGCCGATCTGGAGAAAAAGAAGCA
GAGCATGGGCAAACTGTATAGCCTGAAACAGGACCTGCTGAGCACCCTGAAGAACA
AGAGCGTGACCCAGAAGACAGAAGCCTGGCTGGATAACTTTGCCCGCTGCTGGGAC
AACCTGGTGCAGAAACTGGAGAAAAGTACAGCTCAGATCTCTCAGGCTGTGACCAC
AACCCAGCCTAGCCTGACCCAGACAACCGTGATGGAAACCGTGACCACCGTGACAA
CCCGCGAACAGATCCTGGTGAAACATGCCCAGGAAGAGCTGCCACCTCCACCTCCC
CAGAAGAAGAGAACCCTGGAGCGGCTGCAGGAGCTGCAGGAAGCCACTGACGAAC
TGGACCTGAAGCTGAGGCAGGCCGAAGTGATTAAGGGGTCTTGGCAGCCTGTGGGC
GATCTGCTGATTGATTCCCTGCAGGACCACCTGGAAAAGGTGAAGGCTCTGAGAGG
CGAAATTGCTCCACTGAAGGAGAACGTGAGTCATGTGAACGATCTGGCTAGACAGC
TGACAACACTGGGCATCCAGCTGAGCCCATACAATCTGAGCACACTGGAGGACCTG
AATACCAGGTGGAAGCTGCTGCAGGTGGCTGTGGAAGACCGGGTGCGGCAGCTGCA
TGAGGCCCATCGCGACTTCGGACCAGCCAGCCAGCACTTTCTGAGCACATCCGTGCA
GGGGCCCTGGGAGAGGGCCATTTCTCCCAACAAGGTGCCCTACTATATTAATCACGA
GACCCAGACCACTTGTTGGGACCATCCCAAGATGACAGAACTGTACCAGTCCCTGG
CCGATCTGAACAACGTGAGGTTTAGCGCTTACAGAACCGCTATGAAGCTGAGACGG
CTGCAGAAGGCCCTGTGCCTGGATCTGCTGTCCCTGTCCGCCGCCTGCGATGCCCTG
GATCAGCATAATCTGAAGCAGAACGATCAGCCAATGGATATCCTGCAGATCATCAA
CTGCCTGACCACTATCTACGACAGGCTGGAGCAGGAGCACAACAACCTGGTGAACG
TGCCTCTGTGCGTGGATATGTGCCTGAACTGGCTGCTGAACGTGTATGACACTGGGC
GCACCGGCCGGATCAGAGTGCTGAGTTTTAAAACTGGGATTATCTCCCTGTGTAAGG
CCCACCTGGAGGACAAGTACAGGTACCTGTTCAAGCAGGTGGCTAGTAGCACTGGA
TTTTGTGACCAGCGCCGCCTGGGACTGCTGCTGCATGATAGTATCCAGATTCCTAGA

【圖15】(續)

CAGCTGGGAGAGGTGGCTAGTTTCGGAGGATCTAACATCGAACCCAGCGTGCGCAG
CTGTTTCCAGTTTGCCAATAACAAACCTGAAATCGAGGCTGCTCTGTTCCTGGATTG
GATGCGCCTGGAACCACAGAGCATGGTGTGGCTGCCTGTGCTGCACAGAGTGGCTG
CCGCCGAAACTGCCAAGCACCAGGCTAAATGCAACATCTGCAAGGAATGTCCCATT
ATCGGCTTTCGCTACAGGAGTCTGAAACATTTTAACTACGATATTTGCCAGAGCTGC
TTCTTTTCCGGAAGAGTGGCCAAAGGACACAAGATGCACTACCCTATGGTGGAATAT
TGCACCCCAACTACATCTGGCGAAGATGTGCGCGATTTTGCCAAGGTGCTGAAGAAT
AAGTTTCGGACTAAGAGGTACTTCGCCAAGCACCCCCGCATGGGGTATCTGCCAGTG
CAGACAGTGCTGGAAGGAGACAATATGGAGACCGATACAATGTGAGCGGCCGCAAT
AAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGtctagagtcgaccagagcat
ggctacgtagataagtagcatggcgg**gttaatcattaactacaAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA**
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC
CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCagctgcat
taatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcg
gctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaaCATGTGA
GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT
CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAC
TGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATC
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC
AGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG
TGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAAAATATTCCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTG
CAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAA
GATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTG
CACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAA
CAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCG
GTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCA
GCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTT
GTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCT
CCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCG
GCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCG
CATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG

【圖15】(續)

ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGC
ATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC
ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGC
GAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGC
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAACCGGTAATATTATTGAAGCAT
TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTctaagaaaccattat
tatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgaggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcag
ctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtc
ggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaa
aataccgcatcaggCGAttccaacatccaataaatcatacaggcaaggcaaagaattagcaaaattaagcaataaagcctcagagcataa
agctaaatcggttgtaccaaaaacattatgaccctgtaatacttttgcgggagaagcctttatttcaacgcaaggataaaaatttttagaaccctc
atatattttaaatgcaatgcctgagtaatgtgtaggtaaagattcaaacgggtgagaaaggccggagacagtcaaatcaccatcaatatgatat
tcaaccgttctagctgataaattcatgccggagagggtagctatttttgagaggtctctacaaaggctatcaggtcattgcctgagagtctgga
gcaaacaagagaatcgatgaacggtaatcgtaaaactagcatgtcaatcatatgtaccccggttgataatcagaaaagccccaaaaacagg
aagattgtataagcaaatatttaaattgtaaGcgttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccg
aaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacg
tggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagtttttttggggtcgag
gtgccgtaaaGcactaaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggga
agggaagaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaa
tgcgccgctacagggcgcgtactatggttgctttgacgagcacgtataacgtgctttcctcgttagaatcagagcgggagctaaacaggagg
ccgattaaagggattttagacaggaacggtacgccagaatcctgagaagtgtttttataatcagtgaggccaccgagtaaaagagtctgtcca
tcacgcaaattaaccgttgtcgcaatacttctttgattagtaataacatcacttgcctgagtagaagaactcaaactatcggccttgctggtaatat
ccagaacaatattaccgccagccattgcaacggaatcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcc
tcttcgctattacgccagct

【圖15】(續)