



(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 I854984 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：108123006

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N15/864 (2006.01)

C12N9/64 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/06/29 美國

62/691,934

2019/06/21 美國

62/865,081

(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：撒漢克 札瑞芙 SAHENK, ZARIFE (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2016/058890A1

WO 2017/180976A1

期刊 Carinne Roudaut et al, "Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy", Circulation. 2013 Sep 3; 128(10): 1094-104.

期刊 Dan Wang et al, "The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue", Expert Opin Drug Deliv, Review, 2014 Mar;11(3): 345-364.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：10 共 73 頁

(54)名稱

用於治療肢帶型肌營養不良症 2A 之重組腺相關病毒產品與方法

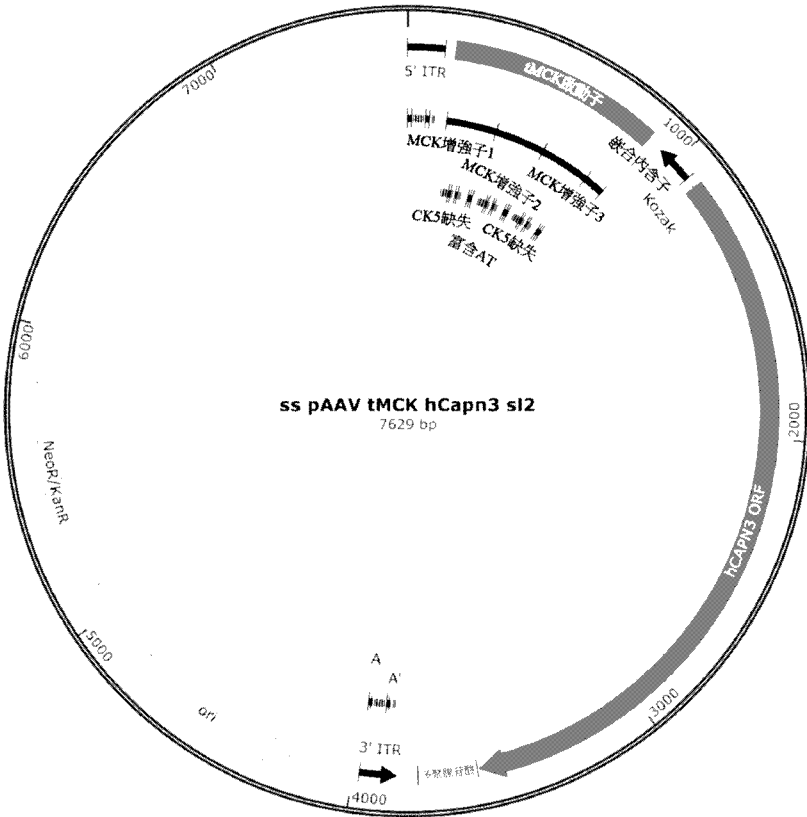
(57)摘要

提供用於治療肢帶型肌營養不良症 2A 之產品與方法。在所述方法中，重組腺相關病毒遞送編碼具有鈣蛋白酶 3 活性之蛋白質的 DNA。

Products and methods for treating limb girdle muscular dystrophy 2A are provided. In the methods, recombinant adeno-associated viruses deliver DNA encoding a protein with calpain 3 activity.

指定代表圖：

符號簡單說明：
無



【圖2】



I854984

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療肢帶型肌營養不良症2A之重組腺相關病毒產品與方法

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS PRODUCTS AND
METHODS FOR TREATING LIMB GIRDLE MUSCULAR
DYSTROPHY 2A

【中文】

提供用於治療肢帶型肌營養不良症2A之產品與方法。在所述方法中，重組腺相關病毒遞送編碼具有鈣蛋白酶3活性之蛋白質的DNA。

【英文】

Products and methods for treating limb girdle muscular dystrophy 2A are provided. In the methods, recombinant adeno-associated viruses deliver DNA encoding a protein with calpain 3 activity.

【指定代表圖】

圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療肢帶型肌營養不良症2A之重組腺相關病毒產品與方法

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS PRODUCTS AND
METHODS FOR TREATING LIMB GIRDLE MUSCULAR
DYSTROPHY 2A

【技術領域】

【0001】 本文提供用於治療肢帶型肌營養不良症2A之產品與方法。在所述方法中，重組腺相關病毒遞送編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質的DNA。

【先前技術】

【0002】 肌營養不良症(MD)為一組遺傳性疾病。所述組之特徵在於控制運動的骨骼肌肉的進行性無力與退化。一些形式之MD在嬰兒期或兒童期發展，而其他形式之MD可能直到中年或以後才出現。病症在肌肉無力之分佈及程度(一些形式之MD亦影響心肌)、發病年齡、進展速率與遺傳模式方面不同。

【0003】 一組MD為MD之肢帶組(LGMD)。LGMD為罕見的病症，並且在發病年齡；肌肉無力、心臟與呼吸受累區域；進展速率與嚴重程度方面，其在不同的人中表現不同。LGMD可以在兒童期、青春期、青年期甚至更晚期開始。兩性都受到同等影響。LGMD導致肩部與骨盆肢帶無力，上腿與手臂附近的肌肉有時亦會隨著時間的推移而減弱。腿之無力經常出現在手臂之前。面部肌肉通常不受影響。隨著病症發展，人們可能會

具有行走問題，並且可能需要長時間使用輪椅。肩部與手臂肌肉之受累可能導致難以將手臂舉過頭頂與抬起物體。在一些類型之LGMD中，可能涉及心臟與呼吸肌。

【0004】 LGMD至少有十九種形式，並且所述形式根據其相關的遺傳缺陷進行分類。

類型	遺傳模式	基因或染色體
LGMD1A	常染色體顯性	肌收縮蛋白基因
LGMD1B	常染色體顯性	核纖層蛋白A/C基因
LGMD1C	常染色體顯性	窖蛋白基因
LGMD1D	常染色體顯性	染色體7
LGMD1E	常染色體顯性	結蛋白基因
LGMD1F	常染色體顯性	染色體7
LGMD1G	常染色體顯性	染色體4
LGMD2A	常染色體隱性	鈣蛋白酶-3基因
LGMD2B	常染色體隱性	膜修復蛋白基因
LGMD2C	常染色體隱性	γ-肌聚糖基因
LGMD2D	常染色體隱性	α-肌聚糖基因
LGMD2E	常染色體隱性	β-肌聚糖基因
LGMD2F	常染色體隱性	Δ-肌聚糖基因
LGMD2G	常染色體隱性	視松蛋白基因
LGMD2H	常染色體隱性	TRIM32
LGMD2I	常染色體隱性	FKRP基因
LGMD2J	常染色體隱性	肌聯蛋白基因

LGMD2K	常染色體隱性	POMT1基因
LGMD2L	常染色體隱性	福山蛋白基因

【0005】 LGMD之專業測試現在可經由國家診斷計劃國家委員會 (NCG)獲得。

【0006】 鈣蛋白酶3(*CAPN3*)基因突變導致全球最常見的肢帶型肌營養不良症之一，LGMD2A。目前，這種遺傳性疾病尚無治療方法。以前的研究已經證明了*CAPN3*基因轉移可能會校正*CAPN3*缺陷小鼠的病理體徵。然而，藉由結蛋白啟動子驅動之*CAPN3*的表現導致心肌毒性 [Bartoli 等人，*Mol. Ther.*，13: 250-259 (2006)]。在後續研究中，研究了基因的骨骼肌肉表現 [Roudaut 等人，*Circulation*，128: 1094-1104 (2013)]。

【0007】 腺相關病毒(AAV)為複製缺陷細小病毒，其單股DNA基因組長度為約4.7 kb，包含兩種145個核苷酸反向末端重複(ITR)。存在多種 AAV之血清型。已知AAV血清型之基因組的核苷酸序列。例如，AAV-1的完整基因組在GenBank登錄號NC_002077中提供；AAV-2的完整基因組在GenBank登錄號NC_001401與Srivastava等，*J. Virol.*，45: 555-564 {1983}中提供；AAV-3的完整基因組在GenBank登錄號NC_1829中提供；AAV-4的完整基因組在GenBank登錄號NC_001829中提供；AAV-5基因組以GenBank登錄號AF085716提供；AAV-6的完整基因組在GenBank登錄號NC_001862中提供；至少部分AAV-7與AAV-8基因組分別以GenBank登錄號AX753246與AX753249提供；AAV-9基因組在Gao等人，*J. Virol.*，78: 6381-6388 (2004)中提供；AAV-10基因組在*Mol. Ther.*，13(1): 67-76 (2006)中提供；且AAV-11基因組在*Virology*，330(2): 375-

383 (2004)中提供。AAV rh.74基因組的序列參見美國專利9,434,928，其以引用之方式併入本文中。引導病毒DNA複製(rep)、衣殼化/包裝及宿主細胞染色體整合之順效應序列含於AAV ITR內。三種AAV啟動子(針對其相對圖譜位置命名為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)結合單個AAV內含子之差異性剪接(在核苷酸2107及2227處)將引起從rep基因生產四種rep蛋白質(rep 78、rep 68、rep 52及rep 40)。rep蛋白質具有多個最終負責複製病毒基因組的酶促特性。cap基因自p40啟動子表現，且其編碼三種衣殼蛋白質VP1、VP2及VP3。替代性剪接及非共同轉譯啟動對生產三種相關衣殼蛋白質負責的位點。單個共同聚腺苷酸化位點位於AAV基因組之圖譜位置95處。AAV之生命週期及遺傳在 Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992)中綜述。

【0008】 AAV具有獨特特徵，使得其例如在基因療法中作為用於遞送外來DNA至細胞的載體具有吸引力。AAV在培養物中感染細胞為非細胞病變的，且對人類及其他動物之天然感染為沉默及無症狀的。此外，AAV感染多種哺乳動物細胞允許體內靶向多種不同組織的可能性。此外，AAV緩慢轉導分裂細胞及非分裂細胞，且對於彼等細胞之生命週期可基本上保持為轉錄活性細胞核游離基因體(染色體外的元件)。AAV前病毒基因組作為質體中之純系化DNA被插入，其使得構築重組基因組變得可行。此外，由於引導AAV複製與基因組衣殼化之信號含於AAV基因組之ITR內，基因組(編碼複製及結構性衣殼蛋白質，rep-cap)之內部約4.3 kb中的一些或全部可經外來DNA置換。為產生AAV載體，rep及cap蛋白質可反式提供。AAV之另一種顯著特徵在於其為極其穩定且充滿活力的病毒。其

容易地承受用以滅活腺病毒的條件(56℃至65℃持續數小時)，使得AAV的低溫保藏不那麼重要。甚至可將AAV凍乾。最後，經AAV感染之細胞對重複感染沒有抗性。

【0009】 因此，此項技術仍然需要治療LGMD2A。

【發明內容】

【0010】 本文提供用於遞送編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質之DNA的方法與產品。此類方法與產品可用於治療各種疾病，例如LGMD2A。

【0011】 提供了編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質的重組腺相關病毒(rAAV)。重組腺相關病毒包括聚核苷酸，所述聚核苷酸包括編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列。例如，編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列與SEQ ID NO: 2至少90%一致或包括SEQ ID NO: 2的序列。

【0012】 例如，所提供之rAAV包括聚核苷酸，所述聚核苷酸包括第一AAV反向末端重複序列(ITR)、啟動子、編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質的核苷酸序列與第二AAV ITR。例如，編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列與SEQ ID NO: 2至少90%一致，或與SEQ ID NO: 2至少91%一致、與SEQ ID NO: 2至少92%一致、與SEQ ID NO: 2至少93%一致、與SEQ ID NO: 2至少94%一致、與SEQ ID NO: 2至少95%一致、與SEQ ID NO: 2至少96%一致、與SEQ ID NO: 2至少97%一致、與SEQ ID NO: 2至少98%一致，或與SEQ ID NO: 2至少99%一致。rAAV包括編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列，其包括SEQ ID NO: 2的序列。

【0013】 另外，所提供的rAAV包括編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列，其包括與SEQ ID NO:7至少90%一致、與SEQ ID NO:7至少91%一致、至少與SEQ ID NO:7至少92%一致、與SEQ ID NO:7至少93%一致、與SEQ ID NO:7至少94%一致、與SEQ ID NO:7至少95%一致、與SEQ ID NO:7至少96%一致、與SEQ ID NO:7至少97%一致、與SEQ ID NO:7至少98%一致，或與SEQ ID NO:7至少99%一致的胺基酸序列。rAAV包括編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列，其包括SEQ ID NO: 7的胺基酸序列。

【0014】 所提供的rAAV包括與SEQ ID NO: 1至少90%一致、與SEQ ID NO: 1至少91%一致、與SEQ ID NO: 1至少92%一致、與SEQ ID NO: 1至少93%一致、與SEQ ID NO: 1至少94%一致、與SEQ ID NO: 1至少95%一致、與SEQ ID NO: 1至少96%一致、與SEQ ID NO: 1至少97%一致、與SEQ ID NO: 1至少98%一致，或與SEQ ID NO: 1至少99%一致的聚核苷酸序列。rAAV包括SEQ ID NO: 1的聚核苷酸序列。

【0015】 在一個實施例中，核苷酸序列處於肌肉特異性啟動子之轉錄控制之下。例如，肌肉特異性啟動子包括以下中之一種或多種：人骨骼肌動蛋白基因元件、心肌肌動蛋白基因元件、結蛋白啟動子、骨骼 α -肌動蛋白(ASKA)啟動子、肌鈣蛋白I(TNNI2)啟動子、肌細胞特異性增強子結合因子mef結合元件、肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子、截斷的MCK(tMCK)啟動子、肌球蛋白重鏈(MHC)啟動子、雜合肌球蛋白重鏈增強子-/MCK增強子啟動子(MHCK7)啟動子、C5-12啟動子、鼠肌酸激酶增強子元件、骨骼快縮肌鈣蛋白c基因元件、慢縮心肌肌鈣蛋白c基因元件、慢縮肌鈣蛋白i基因元件、缺氧誘導核因子(HIF)-反應元件(HRE)、類固醇誘導元件與糖

皮質激素反應元件(gre)。在一個實施例中，肌肉特異性啟動子為tMCK啟動子，其包括SEQ ID NO: 3的序列。

【0016】 例如，rAAV包括聚核苷酸，其在一個實施例中包括第一AAV反向末端重複序列(ITR)、tMCK啟動子、編碼具有鈣蛋白酶3活性之蛋白質的核苷酸序列，及第二AAV反向末端重複序列(ITR)。AAV ITR(例如，第一及/或第二AAV ITR)為例如AAV2反向末端重複序列。rAAV之衣殼蛋白質包括例如AAV rh.74衣殼蛋白質或AAV9衣殼蛋白質。

【0017】 所提供之rAAV包括以下中之一種或多種：AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74與AAV rh.10衣殼蛋白質。

【0018】 在另一個實施例中，提供了包括任何所揭示之rAAV的組合物。例如，將組合物調配成用於肌肉內注射或靜脈內注射。

【0019】 還提供了在受試者中治療肢帶型肌營養不良症2A之方法，其包括向受試者投與治療有效量之任何所揭示之rAAV或包括所揭示之rAAV的任何組合物。在任何所提供之方法中，rAAV藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與。

【0020】 例如，在此等方法中，治療產生以下中之一種或多種：(a)增加肌肉纖維直徑，(b)減少小分葉狀肌肉纖維之數量，(c)減少具有內部核纖維之數量，(d)減少肌內膜結締組織含量，(e)校正肌肉萎縮與(f)增加肌肉力產生。受治療影響之肌肉纖維包括以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。

【0021】 此外，在任何所提供之方法中，治療產生以下中之一種或多種：(a)投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、

20%、25%、30%或35%或40%；(b)投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(c)投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；(d)投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(e)投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；(f)投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；(g)投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及(h)投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。

【0022】 在任何所提供之方法中，受試者之心肌顯示由任何所提供之rAAV或包括任何所提供之rAAV的組合物表現的最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。受組合物治療影響之肌肉纖維包括以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。

【0023】 提供了用於治療肢帶型肌營養不良症2A之組合物，其包括治療有效量之任何所揭示之rAAV或包括任何所揭示之rAAV的組合物。此等用於治療肢帶型肌營養不良症2A之組合物調配成用於藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與。此外，用任何所揭示之組合物治療肢帶型肌營養不良症2A產生以下中之一種或多種：(a)增加肌肉纖維直徑，(b)減少小分葉狀肌肉纖維之數量，(c)減少具有內部核纖維之數量，(d)減少肌內膜結締組織含量，(e)校正肌肉萎縮與(f)增加肌肉力產生。受組合物治療影響之肌肉纖維包括以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。

【0024】 此外，用任何所揭示之用於治療肢帶型肌營養不良症2A的

組合物的治療產生以下中之一種或多種：(a)投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%或40%；(b)投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(c)投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；(d)投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(e)投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；(f)投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；(g)投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及(h)投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。

【0025】 此外，用任何所提供之用於治療肢帶型肌營養不良症2A的組合物治療導致受試者的心肌顯示出由任何所提供之rAAV，或包括任何所提供之rAAV的組合物表現的最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。在投與rAAV後，心肌顯示沒有或幾乎沒有毒性作用，例如炎症、壞死及/或再生。

【0026】 本發明亦提供治療有效量之任何所揭示之rAAV或包括任何所揭示之rAAV的組合物在製備用於治療肢帶型肌營養不良症2A的藥物中的用途。例如，藥物調配成藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與。

【0027】 在任何用途中，用藥物治療產生以下中之一種或多種：(a)增加肌肉纖維直徑，(b)減少小分葉狀肌肉纖維之數量，(c)減少具有內部核纖維之數量，(d)減少肌內膜結締組織含量，(e)校正肌肉萎縮與(f)增加肌肉力產生。受藥物治療影響之肌肉纖維為以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。

【0028】 此外，在治療有效量之任何所揭示之rAAV或所提供之組

合物的任何用途中，用藥物治療產生以下中之一種或多種：(a)投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%或40%；(b)投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(c)投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；(d)投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(e)投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；(f)投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；(g)投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及(h)投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。

【0029】 治療有效量之任何所揭示之rAAV或所提供之組合物的任何用途，在用藥物治療後，受試者的心肌顯示由所揭示之或所揭示之組合物表現的沒有、最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。

【圖式簡單說明】

【0030】 圖1A-1F顯示基因治療恢復CAPN3-KO肌肉中的再生受損。單股AAV9.CAPN3 rAAV的示意圖顯示在圖1A中。在5'與3'單股ITR(反向末端重複序列)之間，肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子(563 bp)驅動CAPN3開放閱讀框(2466 bp)的表現。亦標記了聚腺苷酸化位點(Poly A，53 bp)。來自CAPN3-KO小鼠之脛骨前肌(TA)肌肉首先用CTX注射，且2週後用 1×10^{11} vg AAV.CAPN3注射到左TA(圖1B)或PBS到右TA(圖1C)。注射rAAV後四週，與未治療之CAPN3-KO肌肉相比，肌肉直徑增加並且分葉狀纖維不太常見。在圖1D中，具有亞肌膜細胞器模式的分葉狀纖維，線粒體分佈(箭頭)表明在更高放大倍數下未治療之CAPN3-KO肌肉中

的部分肌管融合。對於B-D，比例尺=20 μm 。在圖1E中，來自CAPN3-KO小鼠的經治療與未治療之TA肌肉的肌肉纖維尺寸分佈直方圖(平均值 $\pm$ SEM/ mm^2 面積；衍生自各組中之3隻小鼠)顯示具有治療之較大直徑纖維的變化以及未治療組中存在之小直徑亞群增加。在圖1F中，與經治療之CAPN3-KO肌肉相比，慢縮氧化(STO)纖維尺寸分佈直方圖顯示未治療之CAPN3-KO肌肉中較大數量的小纖維(例如，纖維直徑等於或小於30 μm)。

【0031】圖2顯示了本發明之rAAV的示意圖，命名為「AAVrh.74.tMCK.CAPN3」。

【0032】圖3A-3B提供了經由肌肉內注射($1\text{E}11$ vg)與全身注射($3\text{E}12$ vg與 $6\text{E}12$ vg)投與AAVrh.74.tMCK.CAPN3後的西方墨點(圖A)與RT-PCR(圖B)資料。將此資料與正常人肌肉裂解物(與小鼠裂解物相比，60%總蛋白質的凝膠負荷)及未治療之CAPN3-KO小鼠進行比較。

【0033】圖4提供了CAPN3 KO(注射與未治療之AAV.hCAPN3基因)與野生型(WT)TA肌肉的SDH染色的組織切片的代表性影像。慢縮氧化(STO，暗)、快縮氧化(FTO，中間)及快縮糖分解(FTG，淺)纖維的平均纖維尺寸似乎相對於用AAVrh.74.tMCK.CAPN3治療之小鼠的TA肌肉中的WT值標準化。表4中示出了在治療與未治療之情況下纖維類型尺寸。

【0034】圖5提供了來自低劑量組($3\text{E}12$ vg，Z18-13、Z18-15、Z18-16、Z18-17、Z18-18)的WT(Z18-14)與TA肌肉中的相對CAPN3蛋白質表現位準，並顯示了來自高劑量組($6\text{E}12$ vg，Z18-20、Z18-21、Z18-23、Z18-24、Z18-22)的腓腸肌(gastroc)、心臟、股四頭肌、脛骨前肌(TA)與肱三頭肌(UT：未治療)。

【0035】 圖6提供了在以下肌肉中的6E12載體基因組全身高劑量組中的AAVrh74.tMCK.hCAPN3載體複本/ μ g基因組DNA：股四頭肌(股四頭肌(quad))、心臟、脛骨前肌(TA)、腓腸肌(gastroc)肱三頭肌及肝臟。

【0036】 圖 7 提 供 了 在 3E12 與 6E12 vg 下 全 身 投 與 AAVrh.74.tMCK.CAPN3後來自左TA肌肉的慢縮氧化(STO，暗)、快縮氧化(FTO，中間)及快縮糖分解(FTG，淺)纖維的平均纖維尺寸。包含來自未治療之CAPN3KO與WT小鼠的資料。

【0037】 圖8提供了跑動至力竭測試之資料。圖8A提供了低劑量組，其接受3E12 vg的AAVrh.74.tMCK.CAPN3，與高劑量組，其在全身投與後4週接受6E12 vg的AAVrh.74.tMCK.CAPN3之資料。與未治療之對應物相比，經治療之CAPN3 KO小鼠在跑動至力竭測試中表現更好。圖8B 提供了高劑量組之資料，其中在全身投與 6E12 vg 的 AAVrh.74.tMCK.CAPN3(n=5)與未治療之對應物(n=16)後20-24週測試小鼠。

【0038】 圖9提供了在與未治療之對照組匹配之情況下，在3E12 vg與6E12 vg劑量下全身注射AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體後4週，來自CAPN3 KO小鼠的代表性心臟樣品的左心室的蘇木精&曙紅(H&E)染色的新鮮冷凍切片。

【0039】 圖 10 提 供 了 來 自 高 劑 量 組 (其 接 受 6E12 vg 的 AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3的心肌組織的西方墨點分析。此分析顯示在治療動物的心臟中沒有或最小可偵測到的鈣蛋白酶3蛋白質。動物識別號Z18-19與22代表來自未治療之CAPN3 KO小鼠的裂解物。

【實施方式】

【0040】 本申請案主張2018年6月29日提交之美國臨時專利申請案第 62/691,934 號與 2019 年 6 月 21 日提交之美國臨時專利申請案第 62/865,081號之優先權，其均以全文引用之方式併入本文中。

序列表以引用之方式併入

【0041】 本申請案案含有電腦可讀形式之序列表(檔案名：52684P2_SeqListing.txt；23,755位元組-ASCII正文檔案；建立於2019年6月26日)作為揭露內容之獨立部分，其以全文引用之方式併入本文中。

【0042】 本文所提供之重組AAV(rAAV)包括聚核苷酸，所述聚核苷酸包括第一AAV反向末端重複(ITR)、啟動子、編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質的核苷酸序列與第二AAV ITR。在一個實施例中，核苷酸編碼CAPN3。實施例包含但不限於rAAV，其包括編碼CAPN3或具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列，其中核苷酸序列與SEQ ID NO: 2的核苷酸序列至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%一致。另外之實施例包含但不限於包括核苷酸序列之rAAV，所述核苷酸序列與SEQ ID NO: 2中闡述的核苷酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致的，並且編碼具有CAPN3蛋白水解活性之多肽。CAPN3蛋白水解活性在此項技術中被理解為蛋白水解潛在基板諸如fodrin與HSP60的活性，及/或自溶裂解活性。因此，如本文所用，術語「具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質」係指具有CAPN3蛋白水解活性的蛋白質，其包含但不限於蛋白水解基板諸如fodrin與HSP60的活性，及/或自溶裂解活性。具有CAPN3活性之蛋白質可以具有全長鈣蛋白酶3蛋白質的全部或部分活性。在一個實施例中，具有CAPN3活性之蛋白質具有全長

CAPN3蛋白質的至少60%、70%、80%、90%、95%或99%的活性。在另一個實施例中，具有CAPN3活性之蛋白質包括與SEQ ID NO: 7至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

【0043】 在一些實施例中，編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列，其包括SEQ ID NO: 2的序列。在另一個實施例中，具有CAPN3活性之蛋白質包括與SEQ ID NO: 7至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在另一個實施例中，具有CAPN3活性之蛋白質包括SEQ ID NO: 7的胺基酸序列。在另一個實施例中，rAAV之聚核苷酸包括與SEQ ID NO: 1至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的序列。在另一個實施例中，聚核苷酸包括與SEQ ID NO: 1至少95%一致的序列。在一個實施例中，聚核苷酸包括SEQ ID NO: 1的序列。

【0044】 在另一個態樣中，本文描述了重組AAV，其包括編碼具有CAPN3活性之蛋白質的核苷酸序列及/或包括在嚴格條件下與SEQ ID NO: 2的核酸序列或其互補序列雜交的核苷酸序列。術語「嚴格」用以指此項技術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測定。雜交及洗滌之嚴格條件之實例為65-68℃下0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉，或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，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)。

【0045】 在本文所述之重組基因組中，CAPN3聚核苷酸與轉錄控制

元件(包含但不限於啟動子、增強子及/或內含子)，特別為所關注之靶細胞中起作用的轉錄控制元件可操作地連接。例如，各種實施例提供使用肌肉特異性轉錄控制元件轉導肌肉細胞之方法，其包含但不限於衍生自肌動蛋白及肌球蛋白基因家族之彼等，諸如來自myoD基因家族之彼等[參見Weintraub等人，*Science*，251: 761-766 (1991)]，肌細胞特異性增強子結合因子MEF-2 [Cserjesi 及 Olson，*Mol Cell Biol*，11: 4854-4862 (1991)]，衍生自人骨骼肌動蛋白基因之控制元件[Muscat等人，*Mol Cell Biol*，7: 4089-4099 (1987)]，肌肉肌酸激酶序列元件[參見Johnson等人，*Mol Cell Biol*，9:3393-3399 (1989)]及鼠肌酸激酶增強子(mCK)元件，衍生自骨骼快縮肌鈣蛋白C基因、慢縮心肌肌鈣蛋白C基因及慢縮肌鈣蛋白I基因之控制元件：低氧誘導之核因子(Semenza等人，*Proc Natl Acad Sci USA*，88: 5680-5684 (1991))，類固醇誘導性元件及啟動子，包含糖皮質激素反應元件(GRE)[參見Mader及White，*Proc Natl Acad Sci USA*，90: 5603-5607 (1993)]，tMCK啟動子[參見Wang等人，*Gene Therapy*，15: 1489-1499 (2008)]，CK6啟動子[參見Wang等人，*supra*]及其他控制元件。在一個實施例中，編碼具有鈣蛋白酶3(CAPN3)活性之蛋白質的核苷酸序列與肌肉特異性啟動子可操作地連接。在一個實施例中，肌肉特異性啟動子包括以下中之一種或多種：人骨骼肌動蛋白基因元件、心肌肌動蛋白基因元件、結蛋白啟動子、骨骼 α -肌動蛋白(ASKA)啟動子、肌鈣蛋白I(TNNI2)啟動子、肌細胞特異性增強子結合因子mef結合元件、肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子、截斷的MCK(tMCK)啟動子、肌球蛋白重鏈(MHC)啟動子、雜合肌球蛋白重鏈增強子-/MCK增強子啟動子(MHCK7)啟動子、C5-12啟動子、鼠肌酸激酶增強子元件、骨骼快縮肌鈣蛋白c基因元件、

慢縮心肌肌鈣蛋白c基因元件、慢縮肌鈣蛋白i基因元件、缺氧誘導核因子(HIF)-反應元件(HRE)、類固醇誘導元件與糖皮質激素反應元件(gre)。在另一個實施例中，肌肉特異性啟動子為MCK啟動子、tMCK啟動子或MHCK7啟動子。在一些實施例中，肌肉特異性啟動子為tMCK，其包括SEQ ID NO: 3之核苷酸序列。

【0046】 先前的研究表明，由結蛋白啟動子驅動之CAPN3的表現導致心肌毒性。在隨訪研究中，基因之選擇性骨骼肌表現消除了心肌缺陷。本文所揭示之AAV基因組包括肌肉特異性啟動子，tMCK以限制CAPN3向骨骼肌之表現，並且在基因注射後4週以6E12 vg(建議的初始高劑量的兩倍)全身遞送病毒後未顯示心肌毒性。

【0047】 本文描述之rAAV基因組缺乏AAV rep與cap DNA。所提供之rAAV基因組包括如上所述之CAPN3聚核苷酸與側接聚核苷酸的一個或多個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AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74及AAV rh.10。亦設想其他類型之rAAV變異體，例如具有衣殼突變之rAAV。參見例如Marsic等人，*Molecular Therapy*，22(11): 1900-1909 (2014)。如上文之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為此項技術中已知的。為促進骨骼肌肉特異性表現，可使用AAV1、AAV5、AAV6、AAV8或AAV9。

【0048】 所提供之DNA質體包括rAAV基因組。將DNA質體轉移至容許經AAV之輔助病毒(包含但不限於腺病毒、E1缺失腺病毒或疱疹病毒)

感染之細胞，用於rAAV基因組之總成進入感染性病毒顆粒。產生rAAV粒子之技術在此項技術中為標準的，其中待包裝之AAV基因組、rep及cap基因、及輔助病毒功能提供至細胞。rAAV之生產需要單個細胞(本文指示為包裝細胞)內存在以下組分：rAAV基因組、不同於rAAV基因組(亦即不在其中之)AAV rep及cap基因及輔助病毒功能。AAV ITR與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、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.10及AAV rh.74。假模式化rAAV之生產揭示於例如WO 01/83692中，其以全文引用的方式併入本文中。因此，在一個實施例中，rAAV包括以下中之一種或多種：AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74 或AAV rh.10衣殼蛋白質。在另一個實施例中，rAAV包括AAV rh.74衣殼蛋白質或AAV9衣殼蛋白質。

【0049】一種產生包裝細胞之方法為生成穩定表現AAV顆粒生產所必需之所有組分的細胞株。例如，將包括缺乏AAV rep及cap基因之rAAV基因組、不同於rAAV基因組之AAV rep及cap基因及可選標記(諸如新黴素抗性基因)之質體(或多個質體)整合於細胞基因組中。藉由諸如GC加尾[Samulski等人，*Proc. Natl. Acad. S6.USA*，79:2077-2081 (1982)]、添加含有限制性核酸內切酶裂解位點之合成連接子[Laughlin等人，*Gene*，23:65-73 (1983)]之程序或藉由直接鈍末端接合[Senapathy及Carter，*J. Biol. Chem.*，259:4661-4666 (1984)]將AAV基因組引入至細菌質體中。包裝細胞株隨後經諸如腺病毒之輔助病毒感染。此方法之優勢為可選細胞

且適用於大規模生產rAAV。適合之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。

【0050】 rAAV生產之一般原理在例如Carter, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-1539 (1992) ; 及 Muzyczka, *Curr.Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129 (1992)中綜述。 各種方法描述於以下：Ratschin等人, *Mol. Cell.Biol.*, 4:2072 (1984)；Hermonat等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984)；Tratschin 等人, *Mol.Cell.Biol.*, 5:3251 (1985)；McLaughlin等人, *J. Virol.*, 62:1963 (1988)；Lebkowski等人, *Mol. Cell.Biol.*, 7:349 (1988)；Samulski等人, *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989)；美國專利第5,173,414號；WO 95/13365 及相應的美國專利第5,658,776號；WO 95/13392；WO 96/17947；PCT/US98/18600；WO 97/09441 (PCT/US96/14423)；WO 97/08298 (PCT/US96/13872)；WO 97/21825 (PCT/US96/20777)；WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)；WO 99/11764；Perrin等人, *Vaccine*, 13:1244-1250 (1995)；Paul等人, *Human Gene Therapy*, 4:609-615 (1993)；Clark等人, *Gene Therapy* 3:1124-1132 (1996)；美國專利第5,786,211號；美國專利第5,871,982號；美國專利第6,258,595號；以及 McCarty, *Mol. Ther.*, 16(10): 1648-1656 (2008)。前述文獻在此以其全文引用之方式併入本文中，其中特定強調文獻中與rAAV生產相關之彼等部分。

【0051】 因此提供了產生感染性rAAV的包裝細胞。在一個實施例中包裝細胞可為穩定轉型癌細胞，諸如HeLa細胞及PerC.6細胞(同源293株)。在另一實施例中，包裝細胞系不為經轉型癌細胞的細胞，諸如低傳

代293細胞(經腺病毒之E1轉型之人類胚胎腎細胞)、MRC-5細胞(人類胚胎纖維母細胞)、WI-38細胞(人類胚胎纖維母細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚胎肺細胞)。

【0052】 因此，本文提供之重組AAV為包括重組基因組之複製缺陷型、感染性衣殼化病毒顆粒。實例包含但不限於包含包括編碼CAPN3的SEQ ID NO: 1中闡述序列的基因組的rAAV，包含基本上由編碼CAPN3之SEQ ID NO: 1中闡述序列組成的基因組的rAAV，及包含由編碼CAPN3之SEQ ID NO: 1中闡述序列組成的基因組的rAAV(命名為「AAVrh.74.tMCK.CAPN3」)。rAAV之基因組均缺乏AAV rep及cap DNA，亦即在rAAV基因組之ITR之間不存在AAV rep或cap DNA。

【0053】 AAVrh.74.tMCK.CAPN3序列之序列在SEQ ID NO: 1中闡述，其中AAV2 ITR跨越核苷酸1-128，tMCK啟動子跨越核苷酸165-884，嵌合內含子跨越核苷酸937-1069，Kozak序列跨越核苷酸1101-1106，CAPN3聚核苷酸跨越核苷酸1107-3572，poly A信號跨越核苷酸3581-3780，且第二AAV2 ITR跨越核苷酸3850-3977。

【0054】 rAAV可藉由此項技術中已知之方法(諸如藉由管柱層析法或氯化銫梯度)純化。用於自輔助病毒純化rAAV載體之方法在此項技術中已知，且包含例如Clark等人，*Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999)；Schenpp及Clark, *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。

【0055】 在另一實施例中，提供了包括本文所述之rAAV的組合物。所提供之組合物包括在醫藥學上可接受之載劑中的rAAV。組合物亦可包括其他成分，諸如稀釋劑及佐劑。可接受載劑、稀釋劑及佐劑對接受

者無毒，且較佳在所採用之劑量及濃度下為惰性，且包含緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽或其他有機酸；抗氧化劑，諸如抗壞血酸；低分子量多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子表面活性劑，諸如吐溫(Tween)、普朗尼克(pluronic)或聚乙二醇(PEG)。

【0056】本發明之方法中待投與之rAAV之效價將視例如特定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之效價可在約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 至約 1×10^{14} 範圍內，或每ml更多耐脫氧核糖核酸酶粒子(DRP)。劑量亦可以病毒基因組之單位表現(vg)。例示性所揭示之劑量包含1E11 vg、3E12 vg及6E12 vg。

【0057】本文涵蓋用rAAV體內或體外轉導靶細胞之方法。體內方法包括將包括本文所提供之rAAV的組合物的有效劑量或有效多劑量投與對其有需要之受試者(例如，包含但不限於人類患者的動物)的步驟。若劑量在罹患病症/疾病之前投與，則投與為預防性的。若劑量在罹患病症/疾病之後投與，則投與為治療性的。有效劑量為緩解(消除或減少)至少一種與所治療病症/疾病病況相關之症狀的劑量、減緩或預防病症/疾病病況進展的劑量、減緩或預防病症/疾病病況進展的劑量、減輕疾病程度的劑量、引起疾病緩解(局部或總體)的劑量及/或延長存活期的劑量。與治療前之受試者相比，本文之方法產生以下中之一種或多種：增加肌肉纖維直

徑，減少小分葉狀肌肉纖維之數量，減少具有內部核纖維之數量，減少肌肉內膜結締組織含量，校正肌肉萎縮與增加肌肉力產生。在一個實施例中，肌肉纖維包括以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。在一個實施例中，治療產生以下中之一種或多種：(a)投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%或40%；(b)投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(c)投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；(d)投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；(e)投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；(f)投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；(g)投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及(h)投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。在一個實施例中，本發明之方法導致在投與rAAV的受試者的心肌中由rAAV表現的沒有、最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。

【0058】 檢查此等結果之測定在此項技術中被理解及/或在本文的實例中描述。設想使用本文所述之方法來預防或治療由CAPN3活性缺陷或CAPN3表現缺陷引起的病症/疾病(例如，肌營養不良症)。LGMD2A為根據方法設想用於預防或治療之疾病的實例。

【0059】 亦設想組合治療。如本文所用之組合包含同步治療或依序治療兩者。特定涵蓋本文所述之方法與標準醫藥治療(例如皮質類固醇)之組合作為與新穎治療的組合。

【0060】有效劑量之組合物之投與可藉由此項技術中之標準途徑進行，所述標準途徑包含但不限於肌肉內、非經腸、靜脈內、鞘內、經口、頰內、經鼻、經肺、顱內、骨內、眼內、經直腸或經陰道。考慮到所治療之感染及/或疾病病況以及表現CAPN3之靶細胞/組織，本領域中熟習此項技術者可以選擇及/或匹配rAAV(具體來說，AAV ITR與衣殼蛋白質)的AAV組分的投與途徑與血清型。在一個實施例中，rAAV藉由肌肉內注射、靜脈內注射、腹膜內注射、皮下注射、上表皮投與、陰道內注射、皮內投與或經鼻投與來投與。在另一個實施例中，藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與rAAV。

【0061】特定言之，實際投與本文所述之rAAV可藉由使用任何將使rAAV重組載體轉移至動物的靶向組織中的物理方法實現。投與包含但不限於注射至肌肉中，注射至血流中及/或直接注射至肝臟中。已證明簡單地將rAAV再懸浮於磷酸鹽緩衝鹽水中足以提供適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不存在已知限制。rAAV之衣殼蛋白質可經修飾，使得rAAV靶向所關注之特定靶向組織，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待藉由經皮輸送遞送至肌肉中的局部調配物。先前已研發大量用於肌肉內注射及經皮輸送兩者之調配物，且可用於實踐本方法。出於投與及處置簡易性，rAAV可與任何醫藥學上可接受之載劑一起使用。

【0062】出於肌肉內注射之目的，可採用在諸如芝麻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，且首先用生理鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑等張。可在水中適合地

與諸如羥基丙基纖維素之界面活性劑混合製備作為游離酸(DNA含有酸性磷酸根基)或藥理學上可接受之鹽的rAAV的溶液。亦可在甘油、液態聚乙二醇及其於油中之混合物中製備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以防止微生物生長。與此相關，所採用無菌水性介質所有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。

【0063】 適用於全身(例如靜脈內)可注射使用之醫藥形式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，形式必須為無菌的且必須為流體，達到存在可容易注射性之程度。其在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。載劑可為含有例如水、乙醇、聚醇(例如甘油、丙二醇、液態聚乙二醇及其類似物)、其適合的混合物及植物油之溶劑或分散介質。恰當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、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，其將較佳包含等張劑(例如糖或氯化鈉)。可注射組合物之延長吸收可藉由使用延緩吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現。

【0064】 無菌可注射溶液藉由以下製備：將所需量之rAAV視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌。一般而言，藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在無菌粉末用於製備無菌可注射溶液之情況下，在一些實施例中，製備方法包括真空乾燥及/

或冷凍乾燥技術，其各者自其預先無菌過濾溶液產生活性成分加任何另外所需成分之粉末。

【0065】 用rAAV轉導亦可在體外進行。在一個實施例中，所需靶向肌肉細胞自個體移出，經rAAV轉導且再引入至個體中。替代地，可使用同基因型或異種肌肉細胞，其中彼等細胞在個體中將不會產生不當的免疫反應。

【0066】 用於轉導及將經轉導細胞再引入至個體中之適合之方法為此項技術中已知的。在一個實施例中，可在體外，例如在適當媒劑中藉由組合rAAV與肌肉細胞來轉導細胞，且使用習知技術，諸如南方墨點及/或PCR，或藉由使用可選標記篩檢含有所關注的DNA的彼等細胞。然後可將轉導之細胞調配成醫藥組合物，並藉由各種技術將組合物引入受試者，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到平滑肌與心肌中。

【0067】 藉由本文所述之方法用rAAV轉導細胞產生CAPN3或具有CAPN3活性的蛋白質的持續表現。因此提供了用於向受試者，較佳人投與表現CAPN3或具有CAPN3活性的蛋白質的rAAV的方法。本發明之主題包含但不限於人、狗、貓、馬、牛、豬、羊、山羊、雞、嚙齒動物(例如，大鼠與小鼠)及靈長類動物。此等方法包含用本文所述之一或多種rAAV轉導組織(包含但不限於組織，諸如肌肉；器官，諸如肝臟及腦；及腺體，諸如唾液腺)。

【0068】 肌肉組織為體內DNA遞送之誘人標靶，因為其不為生命器官且容易獲取。本文之方法提供了來自轉導的肌細胞的CAPN3的持續表現。

【0069】 「肌肉細胞」、「肌肉纖維」或「肌肉組織」意謂衍生自任何種類之肌肉[(例如骨骼肌肉及平滑肌，例如來自消化道、膀胱、血管或心肌組織)]之細胞或細胞群。此類肌肉細胞可為分化或未分化的，諸如成肌細胞、肌細胞、肌管、心肌細胞及成心肌細胞(cardiomyoblast)。

【0070】 術語「轉導」用以指代經由描述之rAAV將CAPN3投與/遞送至體內或體外之受體細胞，引起由受體細胞表現之CAPN3。

【0071】 因此，本方法提供向有需要之受試者投與有效劑量(或基本上同時投與之劑量，或在一定間隔下提供之劑量)之編碼CAPN3的rAAV的方法。

【0072】 如上所指出，與治療前之受試者相比，本文所述之方法使受試者產生以下中之一種或多種：增加肌肉纖維直徑，減少小分葉狀慢縮氧化(STO)肌肉纖維之數量，減少具有內部核纖維之數量，減少肌內膜結締組織含量，校正肌肉萎縮與增加肌肉力產生。

實例

【0073】 藉由以下實例說明態樣與實施例。實例1描述了AAV9.MCK.CAPN3之生產。實例2描述了AAV9.MCK.CAPN3之肌肉內投與。實例3描述了AAVrh.74.tMCK.CAPN3之生產。實例4描述了AAVrh.74.tMCK.CAPN3之肌肉內投與。實施例5描述了AAVrh.74.tMCK.CAPN3之靜脈內投與。實例6描述了終點研究。實例7描述了毒理學與生物分佈研究。實例8描述了肌肉內注射後之體內生物效力測試。實例9描述了全身注射後之體內生物效力測試。實例10描述了全身AAVrh.74.tMCK.CAPN3基因遞送之評估。實例11描述了全身注射AAVrh.74.tMCK.CAPN3載體後心肌毒性之評估。實例12描述了體內生理

分析。

實例1

AAV9.MCK.CAPN3之生產

【0074】產生在肌肉特異性MCK啟動子下攜帶CAPN3基因之AAV載體(命名為AAV.CAPN3)(圖1A)。藉由Eurofin Genomics, USA合成包含兩個NotI限制位點之間的小鼠CAPN3(NM_007601.3)的開放閱讀框的DNA, 並將其亞克隆到先前Rodino-Klapac等人, *Journal of Translational Medicine*, 5:45-55 (2007)]中描述的單股AAV.MCK(肌肉肌酸激酶)載體中。藉由改質交叉包裝方法產生rAAV載體, 其中AAV2型載體基因組可包裝成多個AAV衣殼血清型。[Rabinowitz等人, *J Virol.* 76 (2):791-801 (2002)]。使用HEK293細胞之標準三質體DNA/CaPO₄沈澱方法完成生產。將293細胞維持在補充有10%胎牛血清(FBS)與青黴素及鏈黴素的DMEM中。生產質體為: (i)pAAV.MCK.microdys, (ii)rep2-capX改質之AAV輔助質體, 其編碼cap血清型1、6或8狀分離物, 與(iii)腺病毒5型輔助質體(pAdhelper)表現腺病毒E2A、E4 ORF6及VA I/II RNA基因。為了允許血清型之間的比較, 使用定量的基於PCR的滴定方法來利用Prism 7500 Taqman偵測器系統(PE Applied Biosystems)測定衣殼化載體基因組(vg)效價。[Clark *et al.*, *Hum Gene Ther.* 10 (6): 1031-1039 (1999)]引子與螢光探針靶向MCK啟動子, 且為如下: MCK正向引子、5-CCCGAGATGCCTGGTTATAATT-3 (SEQ ID NO: 4); MCK反向引子、5-GCTCAGGCAGCAGGTGTTG-3 (SEQ ID NO: 5); 與MCK探針、5-FAM-CCAGACATGTGGCTGCTCCCCC-TAMRA-3 (SEQ ID NO: 6)。最終效價(vg ml⁻¹)藉由使用用於MCK啟動子利用Prism 7500即時偵測器系

統(PE Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA)中之特異性引子與探針定量反轉錄酶PCR來測定。將等分病毒保持在-80℃ 直至使用。

實例2

AAV9.MCK.CAPN3之肌肉內投與

【0075】 為了證明WT CAPN3能否恢復CAPN3敲除(CAPN3-KO)小鼠之受損再生過程，麻醉下CAPN3-KO小鼠(n=4)[Kramerova *et al.*, *Hum Mol Genet* 13(13):1373-1388 (2004)]的TA肌肉首先注射30 μ l CTX，且2週後使用AAV9.MCK.CAPN3在 1×10^{11} vg下在20 μ l體積中經由肌肉內注射轉導表現野生型CAPN3。來自另一組CAPN3-KO(n =4)之TA肌肉作為對照，在CTX注射後2週得到相同體積的PBS。

【0076】 在CTX注射後6週殺死小鼠，並移除出TA肌肉並進行低溫恆溫切片處理。首先用H&E染色12 μ m厚的橫截面用於常規組織病理學評估；從各組3隻小鼠的TA的SDH染色橫截面獲得肌肉纖維類型比直徑量測值。在X20放大率下拍攝TA的三個隨機影像(每動物的每切片)，並生成纖維直徑量測值與纖維類型特異性直方圖。

【0077】 琥珀酸脫氫酶(SDH)酶組織化學用於評估代謝纖維類型分化[慢縮氧化(STO)、快縮氧化(FTO)與快縮糖分解(FTG)]。在最後的心臟毒素注射後4週與12週，使用12 μ m厚的SDH染色的橫截面獲得肌肉纖維類型比直徑量測值。使用奧林巴斯(Olympus)BX41顯微鏡及SPOT照相機(奧林巴斯BX61，日本(Japan))在X20放大率下沿中軸線(每動物的每切片)拍攝三個影像，各影像代表腓腸肌之三個不同區域(主要由STO構成之深區域、顯示STO及FTO或FTG之棋盤形外觀之中間區域及主要由FTG纖維構成之表面區域)。選擇此方法以捕獲回應於再生期間之代謝變化的各區

域中纖維之氧化狀態的改變。藉由使用蔡司(Zeiss)Axiovision LE4軟體(v.4.8)量測穿過肌肉纖維之最短距離來測定暗(STO)、中間(FTO)及淺(FTG)纖維之直徑。對STO分別生成纖維直徑直方圖；將FTG與FTO組合以代表衍生自3隻動物的總快縮纖維群體(FTG/O)，並表現為每mm²肌內膜面積的數量(平均值±SEM)。平均纖維直徑衍生自將所有3種纖維類型組合。每組量測平均900-1700根纖維。TA肌肉用於評估纖維化(見下文)

【0078】 AAV9.MCK.CAPN3注射後四週，觀察到肌肉直徑顯著增加，內核明顯減少，並且具有分葉狀模式的小纖維數量少得多(圖1B)。未治療之CAPN3-KO肌肉每mm²面積增加了31.6%的纖維，主要由小的與分葉狀的STO纖維構成，表明治療改善了肌管融合，藉此減少了單位面積的單個小纖維數量(圖1、C與D；表1)。

表1-脛骨前肌纖維尺寸

	每mm ² 未治療數	未治療直徑	每mm ² AAV.CAPN3-治療數	AAV.CAPN3-治療直徑
STO	355	32.72 ± 0.4	233	39.81 ± 0.6*
FTG/O	116	44.26 ± 0.9	99	50.40 ± 1.2*
全纖維	471	35.55 ± 0.4	322	43.08 ± 0.6*

與相同之野生型參數相比，*p < 0.0001

【0079】 經治療之TA肌肉的纖維尺寸分佈直方圖顯示經由治療轉變為較大直徑的纖維，並且未治療之CAPN3-KO對照肌肉中過量之小纖維為STO組織化學纖維類型(圖1E與1F)。總體而言，此等研究結果表明CAPN3-KO肌肉經由基因治療替代CAPN3挽救了有缺陷的再生，這可以藉由纖維尺寸的標準化與STO纖維種群體數量的減少來證明。

實例3

AAVrh.74.tMCK.CAPN3之生產

【0080】 產生在截斷的肌肉特異性MCK啟動子(tMCK啟動子)下攜帶CAPN3基因之AAV載體(命名為AAVrh74.tMCK.CAPN3)。藉由Eurofin Genomics，USA合成包含兩個Not1限制位點之間的小鼠CAPN3(NM_007601.3)的開放閱讀框的DNA，並且然後插入AAV生產質體中。質體圖如圖2所示。

【0081】 然後藉由實例1中描述之方法產生rAAV載體。

實例4

AAVrh.74.tMCK.CAPN3之靜脈內投與

【0082】 CAPN3-KO小鼠，6個月大，在低(3×10^{12} vg)與高劑量(6×10^{12} vg)下經由注射到尾靜脈來得到AAVrh.74.tMCK.CAPN3。在基因注射後20週殺死小鼠用於終點研究。年齡匹配之載體治療的CAPN3-KO小鼠作為對照。

表2-治療組

組	治療	小鼠總數#	治療開始下之年齡	治療劑量 (AAVrh.74.tMCK.CAPN3)	治療持續時間	終點下之年齡
CAPN3-KO		40				
低劑量	AAV.CAPN3	8	24週	3×10^{12} vg在300 μ l鹽水中， i.v.	20週	44週
	鹽水治療	8	24週		20週	44週
高劑量	AAV.CAPN3	8	24週	6×10^{12} vg在300 μ l鹽水中， i.v.	20週	44週
	鹽水治療	8	24週		20週	44週
野生型對照	鹽水治療	8	24週		20週	44週

【0083】 如下文實例7中所述進行的終點研究，其包含肌肉生理學(TA力產生或體內肌肉收縮性測定，以及防止偏心收縮)、肌肉病理組織

學、使用qPCR之hCAPN3偵測與西方墨點分析。

實例5

AAVrh.74.tMCK.CAPN3之肌肉內投與

【0084】 在經由rAAV治療將CAPN3引入再生肌肉後，在老年與年輕CAPN3-KO肌肉中量測再生反應以誘導心臟毒素(CTX)同步壞死。

【0085】 在年輕(2個月大)與老年小鼠(6個月大)之組中，在向左側TA肌肉注射rAAV前2週，將CTX注射到兩個TA肌肉中以誘導同步壞死。經由肌肉內注射將AAVrh.74.tMCK.CAPN3在20 μl體積中在1×10¹¹ vg下投與。在基因轉移後8週(在1×10¹¹ vg劑量下，在我們之前的研究中確定功效)進行終點研究，以藉由比較來自左TA與未治療右TA的定量組織學與生理學結果來評估再生缺陷的校正。

表3-治療組

組	治療	小鼠總數#	CTX注射-雙側TA肌肉；年齡/遞送途徑/劑量	基因治療開始下之年齡	治療劑量(AAVrh.74.tMCK.CAPN3)左TA	治療持續時間	終點下之年齡
CAPN3-KO	CTX+AAV.CAPN3	16					
年輕		8	6週/i.m./30 μl	8週	1e11 vg在30 μl PBS中，i.m.	8週	16週
老年		8	22週/i.m./30 μl	24週	1e11 vg在30 μl PBS中，i.m.	8週	32週
野生型	僅CTX	18					
年輕		8	6週/i.m./30 μl	8週	30 μl PBS	8週	16週
老年		8	22週/i.m./30 μl	24週	30 μl PBS	8週	32週

【0086】 rAAV注射後八週，如下文實例6中所述進行的終點研究，其包含肌肉生理學(TA力產生以及防止偏心收縮)、定量肌肉病理組織學、使用qPCR之hCAPN3偵測與西方墨點分析。

實例6

終點研究

TA力產生與防止偏心收縮

【0087】 分析從小鼠中萃取肌肉進行TA肌肉之功能結果的方案 [Wein 等人, *Nature Medicine*, 20(9):992-1000 (2014)]。使用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物麻醉小鼠。使用解剖鏡，移除後肢皮膚以曝露TA肌肉及膝蓋骨。解剖出遠端TA肌腱，並且一個雙方結打結在肌腱周圍，其中4-0縫合儘可能靠近肌肉，並且切斷肌腱。曝露之肌肉不斷用鹽水沾濕。然後將小鼠轉移到熱控平台並保持在37度下。將膝蓋經由膝蓋骨肌腱固定到具有針狀物的平台上，遠端TA肌腱縫合到力轉導子(Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada)的水平臂上，並且用帶固定足部。經由雙極鉑電極藉由刺激坐骨神經而引發TA肌肉收縮。一旦肌肉穩定，藉由逐漸拉伸肌肉直到達到最大收縮力來測定最佳長度。在休息3分鐘後，TA在50、100、150與200 Hz下受刺激，在各刺激之間允許1分鐘的休息時間以測定最大的強直力。量測肌肉長度。休息5分鐘後，評估TA肌肉對收縮誘導損傷的易感性。刺激500 ms後，肌肉延長了最佳長度的10%。此包含以150 Hz刺激肌肉700 ms。刺激後，肌肉恢復到最佳長度。每分鐘重複循環，總共10個循環。藉由將最大強直力除以TA肌肉橫截面積來計算比力。在離心收縮後，然後使小鼠安樂死，並解剖出TA肌肉，稱重並冷凍用於分析。資料分析盲目但非隨機進行。

體內肌肉收縮性測定

【0088】 此測定量測由下肢的足底或背屈肌產生之總扭矩，並且使用肌肉生理學設備(Aurora Scientific, ON, Canada)進行。用異氟烷麻醉動物。一旦動物被麻醉，將使用剪刀根據需要移除背部與後肢的毛髮。若

用剪刀移除毛髮不足，則施加一層薄薄的脫毛膏(Nair)，並用溫水徹底清潔部位以防止不適。待量測之後肢用黏合帶附接到腳板上。肢體在鈍鉗中保持剛性。用經由皮膚皮下插入神經附近的兩個無菌的一次性28規格單極電極刺激坐骨神經的脛骨或腓骨組件。藉由導電溫控加熱墊(設定在37℃)或輻射熱源維持小鼠溫度，並藉由溫度探針監測。

病理組織學

【0089】 對於組織學分析，將所有肌肉與器官包埋在7%的黃蓍膠中，並在液氮冷卻的異戊烷中快速冷凍。冷凍切片(12 μm)被收集用於免疫組織化學與西方墨點分析。

用於偵測人CAPN3之西方墨點分析

【0090】 使用西方墨點法評估小鼠肌肉組織中之CAPN3蛋白質定量。CAPN3酶藉由十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)解析，並使用識別N-端NCL-CALP-12A2的Novocastra臨床級抗體以約60 kDa的自溶產物遷移為94 kDa條帶。此外，NCL-CALP-2C4抗體識別相同的CAPN3分子量(94 kD)，以及骨骼肌中之另外片段(30 kD)；兩種抗體都適用於蛋白質偵測。在遞送治療rAAV載體後，進行鈣蛋白酶敲除小鼠樣品內CAPN3蛋白質表現位準的半定量量測，並與未治療之對照進行比較。

定量肌肉組織學

【0091】 用AAVrh.74.tMCK.CAPN3治療之TA與股四頭肌的橫截面與未注射的對照相比，用蘇木精與曙紅染色，並使用蔡司Axiovision L4軟體(每動物的每切片4隨機20×影像)拍照。在治療與對照之間比較纖維尺寸直徑。

統計分析

【0092】 在適用的情況下，進行學生t測試或單向ANOVA多重比較測試。

實例7

毒理學/生物分佈研究

【0093】 使用建立的有效劑量與一個對數更高的劑量進行毒理學/生物分佈研究。藉由將rAAV全身(尾靜脈)遞送至6-8週齡CAPN3-KO小鼠來進行毒理學研究，包含與正常C57Bl6正常小鼠的比較。包含6-10隻小鼠之組，並使用GLP類方法進行完整的屍體剖檢。

【0094】 從血液樣品中收集的血清用於臨床化學：丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶、天冬胺酸轉胺酶、膽紅素(總數與直接)、血尿素氮、肌酸酐、肌酸激酶、葡萄糖與總蛋白質。

【0095】 經由對動物內臟與胴體的徹底及系統的檢查與解剖進行完整的屍檢。收集的組織/器官包含性腺、腦、脾、腎、空腸、結腸、胰腺、心臟、肺、胃、肝臟、腹股溝淋巴結、脊髓腓腸肌與股四頭肌。收集用於病理組織學研究的組織/器官並用10%中性緩衝福爾馬林(10% NBF)固定，所有骨骼肌肉標本除外，所述骨骼肌肉標本用OCT安裝在嵌段上，並在液氮冷卻的甲基丁烷中快速冷凍用於冷凍切片。

實例8

肌肉內注射後之體內生物效能測試

【0096】 如上文實例5中所述，在將AAVrh.74.tMCK.CAPN3(1E11 vg)肌內(IM)注射到CAPN3 KO小鼠(n=3)的脛骨前肌(TA)肌肉中後進行體內生物效能測試。

【0097】 在投與後4週下，藉由反轉錄定量PCR(RT-qPCR)與西方墨點分析來分析基因遞送。對於西方墨點分析，在3-8%丙烯醯胺、三-乙酸鹽SDS凝膠上分離對應於50 μg全肌蛋白質萃取物的樣品，並轉移至PVDF膜。用針對含有人鈣蛋白酶3序列(Leica)的AAs 1-19的合成肽產生的單株抗體與作為上樣對照的肌肉特異性肌動蛋白抗體(Leica)進行免疫偵測。圖3A表明在細胞內注射後TA肌肉中存在94 kD鈣蛋白酶3蛋白質。RT-qPCR分析證明與WT小鼠相比，基因轉移後4週的人鈣蛋白酶3基因的相對表現位準恢復至標準化位準(參見圖3B)。小鼠GAPDH用作參考基因，且WT C57BL/6用於校準RT-qPCR資料。

【0098】 此外，在肌肉內投與後進行定量組織病理學分析。如圖所示，將經治療之CAPN3 KO小鼠的TA肌肉纖維的直徑與未治療之對照(林格氏乳酸鹽注射的TA)肌肉的直徑進行比較。慢縮氧化(STO，暗)、快縮氧化(FTO，中間)與快縮糖分解(FTG，淺)纖維的平均纖維尺寸在AAV.hCAPN3注射TA肌肉中朝向WT值標準化。表4中提供了纖維類型尺寸的定量，並說明了隨治療之增加。

表4

	WT(z18-14)		經治療(z18-11)		未治療(z18-22 L)	
	數量	直徑(μm)	數量	直徑(μm)	數量	直徑(μm)
STO	246	28.06±0.27	142	28.89±0.32	240	25.57±0.27
FTO	63	36.65±0.53	86	36.71±0.58	110	32.19±0.48
FTG	82	42.55±0.53	86	43.68±0.66	128	35.49±0.50
全纖維	391	32.45±0.38	314	35.08±0.45	478	29.75±0.30

【0099】 總之，IM注射載體(1E11 vg)到CAPN3 KO小鼠(n = 2)的脛骨前肌(TA)肌肉後的體內生物效能測試表明基因遞送後4週1)RT-qPCR與西方墨點分析顯示CAPN3轉錄物與94 kDa全長鈣蛋白酶3蛋白質

之表現及2)組織學分析顯示TA的肌肉纖維直徑與對照(林格氏乳酸鹽注射TA)肌肉相比增加。

實例9

全身注射後體內生物效能測試

【0100】在經由CAPN3-KO小鼠的尾靜脈全身注射AAVrh.74.tMCK.CAPN3(3E12 vg或6E12 vg)後進行體內生物效能測試。低劑量CAPN3KO組(n=5；小鼠表示為Z18-13、Z18-15、Z18-16、Z18-17、Z18-18)在300 µl林格氏乳酸鹽中獲得3E12 vg。在基因注射後4週，藉由跑動至力竭的跑步機測試評估小鼠的跑步疲勞，並且然後使其安樂死以進行組織收集。移除上肢與下肢(TA，腓腸肌(GAS)、股四頭肌、肱三頭肌)、心臟、肝臟脾臟、肺、卵巢與睪丸的肌肉，並將組織樣品在異戊烷中冷凍，並在液氮中冷卻。

【0101】在TA肌肉中評估RT-qPCR CAPN3表現。對於3E12 vg低劑量，CAPN3 mRNA表現位準低，如藉由高CT值> 27所觀察到。西方墨點分析顯示不可偵測的相應蛋白質條帶。儘管在此組織中觀察到低劑量的低表現資料，但經由全身投與3E12 vg證明了功能與組織學益處。

【0102】隨後，全身投與更高劑量(6E12 vg)以研究可否在更高劑量的載體遞送下偵測蛋白質表現。高劑量組(表示為Z18-20、Z18-21、Z18-23 與 Z18- 24 之小鼠)CAPN3-KO小鼠接受6E12 vg AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體(經由全身注射到尾靜脈的低劑量組中使用的劑量的兩倍)，並在注射後4週使其安樂死。RT-qPCR在股四頭肌、肱三頭肌、GAS、TA與心肌中顯示出不同位準之CAPN3表現。

【0103】為測定CAPN3 mRNA之相對表現，在3E12 vg(低劑量組

1)與6E12 vg(高劑量組2)之劑量下從用tMCK.hCAPN3載體治療之CAPN3 KO小鼠收集肌肉組織樣品。從兩個組中分離總RNA，並測定CAPN3對小鼠GAPDH的qPCR以及來自經由IM注射得到載體的組的先前樣品(1E11 vg；參見上文實例8)。

【0104】 CAPN3之相對表現藉由以下方法測定：

$$CT = CT_{CAPN3} - CT_{mGAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT_{校正器*}$$

$$CAPN3 = 2^{-\Delta\Delta CT} \text{之相對表現}$$

各組織中CAPN3的相對表現與原始CT值顯示在下表5與圖5中。表5提供了用於IM遞送(小鼠編號Z18-11與Z18-12)以及全身遞送之資料

表5：CAPN3 RT-PCR:

小鼠號	組織	基因型	治療之劑量 (每隻小鼠的 DRAP)	CT值				ΔCT	ΔΔCT	2 ^(-ΔΔCT)
				CAPN3		mGAPDH				
Z18-14*	TA	WT	0	22.437	22.456	15.234	15.274	7.193	0.000	1.0003
Z18-19	TA	CAPN3 KO	0	35.259	32.705	15.159	15.176	18.814	11.621	0.0003
Z18-11	TA		1E11	24.338	24.217	15.800	15.835	8.460	1.267	0.4155
Z18-12	TA			21.030	21.104	14.906	15.058	6.085	-1.108	2.1548
Z18-13	TA		3E12	32.376	32.430	15.236	15.203	17.183	9.990	0.0010
Z18-15	TA			27.407	27.443	14.510	14.520	12.910	5.717	0.0190
Z18-16	TA			28.609	28.333	15.229	15.259	13.227	6.034	0.0153
Z18-17	TA			28.675	28.670	14.997	15.005	13.671	6.478	0.0112
Z18-18	TA			27.869	28.128	14.522	14.544	13.466	6.273	0.0129
Z18-20	腓腸肌		6E12	22.271	22.439	15.939	15.974	6.398	-0.795	1.7347
	心臟			21.996	22.051	15.267	15.315	6.732	-0.461	1.3762
	股四頭肌			21.008	21.202	15.203	15.407	5.800	-1.393	2.6262
	TA			23.806	24.173	16.169	16.385	7.713	0.520	0.6975
	肱三頭肌			24.083	24.361	15.978	16.097	8.185	0.992	0.5027
Z18-21	腓腸肌			25.330	25.221	15.461	15.462	9.814	2.621	0.1625
	心臟			25.024	24.819	15.032	15.097	9.857	2.664	0.1577
	股四頭肌			26.278	26.108	15.285	15.370	10.866	3.673	0.0784
	TA			26.649	26.697	15.017	15.010	11.659	4.466	0.0452
	肱三頭肌			27.040	27.134	15.321	15.343	11.755	4.562	0.0423

Z18-23	腓腸肌			24.150	24.144	16.225	16.117	7.976	0.783	0.5812
	心臟			22.799	22.495	14.593	14.502	8.099	0.906	0.5335
	股四頭肌			24.248	24.076	16.511	16.504	7.655	0.462	0.7262
	TA			25.554	25.338	16.124	16.054	9.357	2.164	0.2231
	肱三頭肌			24.396	24.383	15.363	15.277	9.070	1.877	0.2723
Z18-24	腓腸肌			24.444	24.165	18.083	18.036	6.245	-0.948	1.9297
	心臟			22.769	22.425	15.100	15.077	7.508	0.315	0.8037
	股四頭肌			22.754	22.521	15.637	15.672	6.983	-0.210	1.1568
	TA			23.491	23.555	15.979	15.974	7.547	0.354	0.7826
	肱三頭肌			24.554	24.403	16.370	16.329	8.128	0.935	0.5229
Z18-22	腓腸肌		0	31.878	31.962	15.433	15.527	16.440	9.247	0.0016
	心臟			31.407	32.964	16.006	15.972	16.197	9.004	0.0019
	股四頭肌			32.332	33.464	16.528	16.468	16.400	9.207	0.0017
	TA			35.584	33.917	16.451	16.372	18.339	11.146	0.0004
	肱三頭肌			33.615	32.786	15.742	15.628	17.516	10.323	0.0008
人體組織	肌肉			23.547	23.539	37.743	38.262			
pAAV.tMCK. hCAPN3	1pg/uL			16.328	16.413	UD	38.302			

*校正器

【0105】 總體而言，與1E11 vg下之IM遞送(IM遞送<1%)相比，全身遞送後CAPN3 KO肌肉中的CAPN3 mRNA表現具有動物與組織特異性變化與較低的相對表現；這對於3E12低劑量組尤為真實。因此，全長94 kDa蛋白質低於藉由西方墨點之偵測極限。然而，在高劑量組中全身注射6E12 vg全身劑量後，表現出穩固的基因表現與顯著量的全長鈣蛋白酶3蛋白質。

實例10

全身AAVrh74.tMCK.hCAPN3基因遞送之評估

【0106】 藉由qPCR評估基因轉移效率，計算在6E12 vg下全身遞送AAVrh74.tMCK.hCAPN3後CAPN3 KO小鼠組織樣品內的載體基因組複本。測定了下肢與上肢骨骼肌肉(股四頭肌、TA、腓腸肌、肱三頭肌)、心臟及肝臟的載體基因組負荷。從冷凍組織樣品中分離基因組DNA。使用

以下引子組在ABI 7500(Applied Biosystems)上進行qPCR測定："5'-CGGAGAGCAACTGCATAAG-3'(正向；SEQ ID NO: 8)；"5'-GGCTGATGATGGCTGAATAG-3'(反向；SEQ ID NO: 9)。引子對專門擴增來自hCAPN3 ORF的5'區域，以及表現載體(包含內含子元件的部分)特有的下游區域的產物。最終結果報告為每微克基因組DNA的AAVrh74載體的平均複本數。

【0107】如圖6所示，在全身載體遞送後，肝臟中存在最高的載體基因組複本數。載體基因組分佈在肌肉群之間為可變的。總體而言，與其他肌肉相比，股四頭肌與心臟組織的值更高。亦注意到實驗變化；與小鼠Z18-21號的情況一樣，與其他3隻小鼠相比，Z18-21在所有肌肉組中顯示相對較低的複本數。

【0108】在3E12 vg全身治療之CAPN3 KO小鼠中觀察到功能與組織學特徵的改善，然而，藉由RT-qPCR僅在總RNA分離物中偵測到低位準的鈣蛋白酶3表現，並且藉由西方墨點不可偵測全長94 kDa蛋白質用於具體肌肉組織(參見圖3A)。然而，在6E12 vg全身劑量後，表現出穩固的基因表現與顯著量的鈣蛋白酶3蛋白質(參見圖3B)。資料表明，在基因轉移AAVrh74.tMCK.hCAPN3顆粒後4週後，與WT小鼠相比，鈣蛋白酶3基因表現恢復到標準化位準。小鼠GAPDH用作參考基因，並且WT C57BL/6用於校正RT-qPCR資料。

病理組織學

【0109】如上所述，觀察到注射後4週之功效趨勢。在兩組(3E12與6E12)注射後4週，在全身遞送AAVrh.74.tMCK.hCAPN3後，在CAPN3 KO小鼠的TA肌肉中觀察到纖維尺寸的顯著增加。如圖7所示，與未治療

之KO對應物相比，兩個治療組中的總纖維直徑顯著增加($p < 0.00001$)。治療導致纖維尺寸標準化，並且治療組之間沒有劑量相關差異($p = 0.78058$)。表6提供了在3E12與6E12 vg下全身AAV.hCAPN3基因治療後野生型與CAPN3 KO小鼠的肌肉纖維尺寸。

表6

	WT (n=3)		6E12 CAPN3 (n=3)		3E12 CAPN3 (n=4)		KO (n=4)	
	數量	直徑(μm)	數量	直徑(μm)	數量	直徑(μm)	數量	直徑(μm)
STO	532	30.0±0.6	441	31.7±0.8	464	30.7±1.2	858	27.7±0.8
FTO	278	40.7±1.1	345	38.8±1.1	447	40.8±1.4	364	35.4±1.1
FTG	275	46.1±1.3	226	45.8±1.4	4.3	44.1±1.6	455	39.7±1.2
全纖維	1085	38.9±1.8	1012	38.8±2.0	1314	38.5±2.4	1677	34.1±1.8

【0110】 在任一組中，在4週時全身注射AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體後沒有心肌毒性的組織病理學證據。在心臟組織中發現可變量的病毒，但在任一組中藉由西方墨點在心臟組織中未偵測到蛋白質條帶。

功能研究：跑動至力竭測試

【0111】 小鼠習慣於跑步機(Columbus儀器)，在10 m/min下每天跑動15分鐘，持續3天，然後進行跑動至力竭測試的資料採集。所使用之方案要求小鼠在15度傾斜的跑步機上。跑步機以1m/min之速度打開，並且速度每分鐘增加1 m，直到小鼠筋疲力盡。當小鼠坐在休息墊上至少15秒時測定力竭。記錄至力竭之時間、速度與距離。

【0112】 圖8A提供了低劑量組的跑動至力竭測試的資料，其得到AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3之3E12 vg，以及高劑量組2，其得到AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3之6E12 vg，如在全身投與後4週評估。與未治療之對應物相比，兩組中經治療之CAPN3 KO小鼠在跑動至力竭測試中表

現更好。在低劑量與高劑量組之間，跑動至力竭測試效能或肌肉纖維直徑的統計差異沒有明顯的劑量相關差異。

【0113】 在投與6E12 vg的AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3後20-24週，進一步分析來自高劑量組2(n=16)的小鼠。如圖8B所示，與未治療之對應物相比，經治療之CAPN3 KO小鼠在跑動至力竭測試中繼續表現更好(p<0.00001)。

實例11

全身注射

AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體後之心肌毒性的評估

【0114】 在注射後4週對組之使小鼠安樂死後，收集血清與器官樣品。低劑量組1 CAPN3KO組(n=5)經由尾靜脈注射在300 µl林格氏乳酸鹽AAVrh.74.tMCK.hCAPN3載體中得到3E12 vg。高劑量組2CAPN3-KO小鼠經由尾靜脈得到6E12 vg AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體，並在注射後4週對兩組進行安樂死。經由心臟的頂點，心室的淺表及深部區域檢查兩個切片。在組織切片中未發現炎症、壞死或再生，表明在注射後4週以兩種不同劑量全身遞送AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體對心肌沒有觀察到毒性效應。小鼠編號Z18-19與Z18-22(林格氏乳酸鹽注射/未治療)用作對照KO動物。圖9提供了來自心臟的H&E染色的新鮮冷凍切片。未見肌肉纖維壞死、再生或炎症。即使心臟組織中存在可變量的病毒，在任一組中都沒有藉由西方墨點偵測到蛋白質條帶。圖10提供了西方墨點分析，其顯示全長鈣蛋白酶3蛋白質低於轉導後心臟組織中的偵測極限。

實例12

體內生理分析

【0115】 在IM或全身投與AAVrh7.4.tMCK.hCAPN3載體後進行生理學評估。在體內生理評估期間，用吸入的異氟烷麻醉小鼠。一旦動物被麻醉，用剪刀根據需要移除背部與後肢的毛髮。如果用剪刀移除毛髮不足，則塗上一層薄薄的脫毛膏。在體內生理力量測期間，在坐骨神經的超大刺激後，用連接到力偵測馬達(Aurora Scientific, Canada)的非侵入性力足板量測來自後肢的扭矩。待量測之後肢用黏合帶附接到腳板上。肢體在鈍鉗中保持剛性。用皮下插入神經附近的兩個無菌的一次性28規格單極電極刺激坐骨神經的脛骨或腓骨組件。藉由導電溫控加熱墊(設定在37°C)或輻射熱源維持小鼠溫度，並藉由紅外溫度探針監測。

【0116】 儘管本發明已提供具體實施例，但應理解本領域中熟習此項技術者將進行變化及修改。因此，本發明應僅受如申請專利範圍中所呈現之此類限制的限定。

【0117】 本申請案中提及之所有文獻均以全文引用之方式併入本文中。

【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> 用於治療肢帶型肌營養不良症2A之重組腺相關病毒產品與方法

<130> 28335/52684

<140> TW 108123006

<141> 2019-06-29

<150> US 62/691,934

<151> 2018-06-29

<150> US 62/865,081

<151> 2019-06-21

<160> 9

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 7629

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> AAVrh.74.tMCK.CAPN3重組基因組

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(128)

<223> AAV2 ITR

<220>

<221> misc_feature

<222> (165)..(884)

<223> tMCK啟動子

<220>

<221> misc_feature

<222> (937)..(1069)

<223> 嵌合內含子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1101)..(1106)
<223> Kozak序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1107)..(3572)
<223> CAPN3聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (3581)..(3780)
<223> 多聚腺苷酸信號

<220>
<221> misc_feature
<222> (3850)..(3977)
<223> 第二AAV2 ITR

<400> 1	
gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc ggcaaagccc gggcgctcggg cgacctttgg	60
tcgccccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag	120
gggttcctta atacgactca ctatagggcc gcaccggtaa gcttcacta cgggtctagg	180
ctgcccattgt aaggaggcaa ggcctgggga cacccgagat gcctggttat aattaacccc	240
aacacctgct gcccccccc ccccaacacc tgctgcctga gcctgagcgg ttaccccacc	300
ccggtgcctg ggtcttaggc tctgtacacc atggaggaga agctcgctct aaaaataacc	360
ctgtccctgg tggatccact acgggtctag gctgcccatt taaggaggca aggcctgggg	420
acacccgaga tgccctggta taattaaccc caacacctgc tgccccccc cccccaacac	480
ctgtgcctg agcctgagcg gttacccac cccggtgcct gggctcttagg ctctgtacac	540
catggaggag aagctcgctc taaaaataac cctgtccctg gtggatccac tacgggtcta	600
ggctgcccatt gtaaggaggc aaggcctggg gacacccgag atgcctgggt ataattaacc	660
ccaacacctg ctgccccccc cccccaaca cctgtgcct gagcctgagc ggttacccca	720
ccccggtgcc tgggtcttag gctctgtaca ccatggagga gaagctcgct ctaaaaataa	780
ccctgtccct ggtggatcct ccttggggac agccccctct ggctagtcac accctgtagg	840
ctcctctata taaccaggga gcacaggggc tgccccggg tcacggtgga taccctgca	900

ggtaaccacgc gctgtaattg aactgggagt ggacacctgt ggagagaaaag gcaaagtgga	960
tgtcagtaag accaataggt gcctatcaga aacgcaagag tcttctctgt ctcgacaagc	1020
ccagtttcta ttggctcct taaacctgtc ttgtaacctt gatacttacg gagagcaact	1080
gcataagggc tagcctcgag gccacatgc cgacctcat tagcgcatct gtggctccaa	1140
ggacagcggc tgagccccgg tccccagggc cagtccctca cccggcccag agcaaggcca	1200
ctgaggctgg ggggtgaaac ccaagtggca tctattcagc catcatcagc cgcaattttc	1260
ctattatcgg agtgaaagag aagacattcg agcaacttca caagaaatgt ctagaaaaga	1320
aagttcttta tgtggacct gagttccac cggatgagac ctctctcttt tatagccaga	1380
agttcccat ccagttcgtc tggaagagac ctccgaaat ttgcgagaat ccccgattta	1440
tcattgatgg agccaacaga actgacatct gtcaaggaga gctaggggac tgctggtttc	1500
tcgcagccat tgccctgctg accctgaacc agcaccttct ttccgagtc ataccccatg	1560
atcaaagttt catcgaaaac tacgcaggga tcttccactt ccagttctgg cgctatggag	1620
agtgggtgga cgtggttata gatgactgcc tgccaacgta caacaatcaa ctggttttca	1680
ccaagtcaa ccaccgcaat gagttctgga gtgctctgct ggagaaggct tatgctaagc	1740
tccatggttc ctacgaagct ctgaaagggt ggaacaccac agaggccatg gaggacttca	1800
caggaggggt ggcagagttt tttagatca gggatgctcc tagtgacatg tacaagatca	1860
tgaagaaagc catcgagaga ggctccctca tgggctgctc cattgatgat ggcacgaaca	1920
tgacctatgg aacctctcct tctggctga acatggggga gttgattgca cggatggtaa	1980
ggaatatgga taactcactg ctccaggact cagacctga cccagaggc tcagatgaaa	2040
gaccgaccg gacaatcatt ccggttcagt atgagacaag aatggcctgc gggctggtca	2100
gaggtcacgc ctactctgtc acggggctgg atgagggtccc gticaaaggt gagaaagtga	2160
agctgggtcg gctgcggaat ccgtggggcc aggtggagtg gaacggttct tggagtgata	2220
gatggaagga ctggagcttt gtggacaaag atgagaaggc ccgtctgcag caccaggtea	2280
ctgaggatgg agagtcttgg atgtcctatg aggatttcat ctaccatttc acaaagtgg	2340
agatctgcaa cctcacggcc gatgctctgc agtctgacaa gcttcagacc tggacagtgt	2400

ctgtgaacga gggccgctgg gtacggggtt gctctgccgg aggctgccgc aacttcccag	2460
atactttctg gaccaaccct cagtaccgtc tgaagctcct ggaggaggac gatgaccctg	2520
atgactcggg ggtgatttgc agcttcctgg tggccctgat gcagaagaac cggcgggaagg	2580
accggaagct aggggccagt ctcttcacca ttggcttcgc catctacgag gttcccaaag	2640
agatgcacgg gaacaagcag cacctgcaga aggacttctt cctgtacaac gcctccaagg	2700
ccaggagcaa aacctacatc aacatgcggg aggtgtccca gcgcttcgc ctgcctccca	2760
gcgagtacgt catcgtgccc tccacctacg agccccacca ggagggggaa ttcattcctcc	2820
gggtcttctc tgaaaagagg aacctctctg aggaagtiga aaataccatc tccgtggatc	2880
ggccagtga aagaaaaaa accaagccca tcattttcgt ttcggacaga gcaaacagca	2940
acaaggagct ggggtgtggac caggagtcag aggagggcaa aggcaaaaca agccctgata	3000
agcaaaagca gtccccacag ccacagcctg gcagctctga tcaggaaagt gaggaacagc	3060
aacaattccg gaacattttc aagcagatag caggagatga catggagatc tgtgcagatg	3120
agctcaagaa ggtccttaac acagtctga acaaacaaa ggacctgaag acacacgggt	3180
tcacactgga gtccctgccgt agcatgattg cgtctatgga tacagatggc tctggaaagc	3240
tcaacctgca ggagttccac cacctctgga acaagattaa ggcttggcag aaaattttca	3300
aacactatga cacagaccag tccggcacca tcaacagcta cgagatgcga aatgcagtca	3360
acgacgcagg attccacctc aacaaccagc tctatgacat cattaccatg cggtagcgag	3420
acaaacacat gaacatcgac tttagacagt tcatctgtct cttcgttagg ctggagggca	3480
tgttcagagc ttttcatgca tttagacaagg atggagatgg tatcatcaag ctcaacgttc	3540
tggagtggct gcagctcacc atgtatgcct gagcggccgc ggggatccag acatgataag	3600
atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg	3660
taaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa	3720
caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca gggtcagggg gaggtgtggg aggttttttc	3780
ggatcctcta gagtcgacca gagcatggct acgtagataa gtagcatggc ggggttaatca	3840
ttaactacaa ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgcctgc	3900

tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg ctttggccgg gcggcctcag	3960
tgagcgagcg agcgcgagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt	4020
gcglattggg cgctcttccg ctctctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct	4080
gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggaatacgg ttatccacag aatcagggga	4140
taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	4200
cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	4260
ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg	4320
aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt	4380
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggatc tcagttcgg	4440
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg	4500
cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	4560
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg ctacagagtt	4620
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct	4680
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac	4740
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc	4800
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg	4860
ttaagggatt ttggcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta	4920
aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa aaatattccg gaattgccag	4980
ctggggcgcc ctctggtgtaag gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc	5040
cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt	5100
ttcgcgatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc	5160
tattcggtgta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcgggc	5220
tgtcagcgca ggggcgcccc gtcttttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg	5280
aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag	5340
ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg	5400

ggcaggatct cctgicaccc caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg	5460
caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac	5520
atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggict tgtcgatcag gatgatctgg	5580
acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc	5640
ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg	5700
aaaatggccg cttttctgga ttcacgcact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc	5760
aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc	5820
gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc	5880
ttcttgacga gttcttctga accggaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct	5940
catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac	6000
atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta	6060
taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgctt ttcggtgatg acggtgaaaa	6120
cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag	6180
cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta	6240
tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cggtgtgaaa taccgcacag	6300
atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggaa ctccaacat ccaataaatc atacaggcaa	6360
ggcaaagaat tagcaaaatt aagcaataaa gcctcagagc ataaagctaa atcggttgta	6420
ccaaaaacat tatgacctg taatactttt gcgggagaag cctttatttc aacgcaagga	6480
taaaaatfff tagaacctc atatatfita aatgcaatgc ctgagtaatg tgtaggtaaa	6540
gattcaaacg ggtgagaaaag gccggagaca gtcaaatcac catcaatatg atattcaacc	6600
gttctagctg ataaattcat gccggagagg gtagctatft ttgagaggtc tctacaaagg	6660
ctatcaggtc attgcctgag agtctggagc aaacaagaga atcgatgaac ggtaatcgta	6720
aaactagcat gtcaatcata tgtaccccggt ttgataatca gaaaagcccc aaaaacagga	6780
agattgtata agcaaatatt taaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa	6840
atftttgtta aatcagctca tttttfaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata	6900

aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttggtcc agtttggaac aagagtcac	6960
tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc	7020
cactacgtga accatcaccc taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaatcactaa	7080
atcggaaacc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg	7140
cgagaaagga agggaaagaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg	7200
tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgccg cgtttaatgc gccgtacag ggcgctact	7260
atggttgctt tgacgagcac gtataacgtg ctttcctcgt tagaatcaga gcgggagcta	7320
aacaggaggc cgattaaagg gattttagac aggaacggta cgcagaatc ctgagaagtg	7380
ttttataat cagtgaggcc accgagtaaa agagtctgtc catcacgcaa attaaccgtt	7440
gtcgaatac ttctttgatt agtaataaca tcacttgcct gagtagaaga actcaaacta	7500
tcggccttgc tggtaatatc cagaacaata ttaccgccag ccattgcaac ggaatcgcca	7560
ttcgccattc aggcctgcga actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgtatt	7620
acgccagct	7629

<210> 2
<211> 2466
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> CAPN3聚核苷酸

<400> 2 atgccgaccg tcattagcgc atctgtggct ccaaggacag cggtgagcc ccggtcccca	60
gggccagttc ctcaccggc ccagagcaag gccactgagg ctgggggtgg aaaccaagt	120
ggcatctatt cagccatcat cagccgcaat tttcctatta tcggagtgaag agagaagaca	180
ttcgagcaac ttcacaagaa atgtctagaa aagaaagttc tttatgtgga ccctgagttc	240

ccaccgcatg agacctctct cttttatagc cagaagttcc ccatccagtt cgtctggaag	300
agacctccgg aaatttgcga gaatccccga tttatcattg atggagccaa cagaactgac	360
atctgtcaag gagagctagg ggactgctgg ttctctgcag ccattgcctg cctgaccctg	420
aaccagcacc ttcttttccg agtcataccc catgatcaaa gtttcatcga aaactacgca	480
gggatcttcc acttccagtt ctggcgtat ggagagtggg tggacgtggt tatagatgac	540
tgcctgccaa cgtacaacaa tcaactgggt ttcaccaagt ccaaccaccg caatgagttc	600
tggagtgtc tgctggagaa ggcttatgtc aagctccatg gttcctacga agctctgaaa	660
ggtgggaaca ccacagaggc catggaggac ttcacaggag gggtaggcaga gttttttgag	720
atcagggatg ctccatagta catgtacaag atcatgaaga aagccatcga gagaggtcc	780
ctcatgggct gctccattga tgatggcacg aacatgacct atggaacctc tccttctggt	840
ctgaacatgg gggagttgat tgcacggatg gtaaggaata tggataactc actgtccag	900
gactcagacc tcgaccccag aggtcagat gaaagaccga cccggacaat cattccggtt	960
cagtatgaga caagaatggc ctgcgggctg gtcagaggtc acgcctactc tgtcacgggg	1020
ctggatgagg tcccgttcaa aggtgagaaa gtgaagctgg tgcggctgcg gaatccgtgg	1080
ggccaggtgg agtggaacgg ttcttggagt gatagatgga aggactggag ctttgtggac	1140
aaagatgaga aggccctct gcagcaccag gtcactgagg atggagagtt ctggatgtcc	1200
tatgaggatt tcattacca tttcacaaag ttggagatct gcaacctcac ggccgatgct	1260
ctgcagtctg acaagcttca gacctggaca gtgtctgtga acgagggccg ctgggtacgg	1320
ggttgctctg ccggaggctg ccgcaacttc ccagatactt tctggaccaa ccctcagtac	1380
cgtctgaagc tcctggagga ggacgatgac cctgatgact cggaggtgat ttgcagcttc	1440
ctggtggccc tgatgcagaa gaaccggcgg aaggaccgga agctaggggc cagtctcttc	1500
accattggct tcgccatcta cgaggttccc aaagagatgc acgggaacaa gcagcacctg	1560
cagaaggact tcttctgta caacgcctcc aaggccagga gcaaaacctc catcaacatg	1620
cgggaggtgt ccagcgtt ccgcctgcct ccagcagat acgtcatcgt gccctccacc	1680
tacgagcccc accaggaggg ggaattcatc ctccgggtct tctctgaaaa gaggaacctc	1740

tctgaggaag ttgaaaatac catctccgtg gatcggccag tgaaaaagaa aaaaaccaag	1800
cccatcatct tcgtttcgga cagagcaaac agcaacaagg agctgggtgt ggaccaggag	1860
tcagaggagg gcaaaggcaa aacaagccct gataagcaaa agcagtcccc acagccacag	1920
cctggcagct ctgatcagga aagtgaggaa cagcaacaat tccggaacat tttcaagcag	1980
atagcaggag atgacatgga gatctgtgca gatgagctca agaaggtcct taacacagtc	2040
gtgaacaaac acaaggacct gaagacacac gggttcacac tggagtcctg ccgtagcatg	2100
attgcgctca tggatacaga tggctctgga aagctcaacc tgcaggagt tccaccacctc	2160
tggacaaga ttaaggcctg gcagaaaatt ttcaaact atgacacaga ccagtccggc	2220
accatcaaca gctacgagat gcgaaatgca gtcaacgacg caggattcca cctcaacaac	2280
cagctctatg acatcattac catgcggtac gcagacaaac acatgaacat cgactttgac	2340
agtttcatct gctgcttcgt taggctggag ggcatgttca gagcttttca tgcatttgac	2400
aaggatggag atggtatcat caagctcaac gtctctggagt ggctgcagct caccatgtat	2460
gcctga	2466

<210> 3
<211> 720
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> tMCK啟動子

<400> 3	
ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct	60
ggttataatt aacccaaca cctgctgccc ccccccccc aacacctgct gcctgagcct	120
gagcggttac cccaccccg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct	180
cgctctaaaa ataacctgt ccttggtgga tccactacgg gtctaggctg cccatgtaag	240
gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc	300

ccccccccc caacacctgc tgcctgagcc tgagcggta cccaccccg gtgcctgggt	360
cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataaccctg tccctggtgg	420
atccactacg ggtctaggct gcccatgtaa ggaggcaagg cctggggaca cccgagatgc	480
ctggttataa ttaaccccaa cacctgctgc ccccccccc ccaacacctg ctgcctgagc	540
ctgagcgggt accccacccc ggtgcctggg tcttaggctc tgtacaccat ggaggagaag	600
ctcgtcttaa aaataaccct gtccctgggt gatcctccct ggggacagcc cctcctggct	660
agtcacaccc tgtaggctcc tctatataac ccaggggcac aggggctgcc cccgggtcac	720

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> MCK正向引子

<400> 4	
cccgagatgc ctggttataa tt	22

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> MCK反向引子

<400> 5	
gctcaggcag caggtgttg	19

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> MCK探針

<400> 6
ccagacatgt ggctgctccc cc22

<210> 7
<211> 821
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

Met Pro Thr Val Ile Ser Ala Ser Val Ala Pro Arg Thr Ala Ala Glu
151015

Pro Arg Ser Pro Gly Pro Val Pro His Pro Ala Gln Ser Lys Ala Thr
202530

Glu Ala Gly Gly Gly Asn Pro Ser Gly Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Ser
354045

Arg Asn Phe Pro Ile Ile Gly Val Lys Glu Lys Thr Phe Glu Gln Leu
505560

His Lys Lys Cys Leu Glu Lys Lys Val Leu Tyr Val Asp Pro Glu Phe
65707580

Pro Pro Asp Glu Thr Ser Leu Phe Tyr Ser Gln Lys Phe Pro Ile Gln
859095

Phe Val Trp Lys Arg Pro Pro Glu Ile Cys Glu Asn Pro Arg Phe Ile
100105110

Ile Asp Gly Ala Asn Arg Thr Asp Ile Cys Gln Gly Glu Leu Gly Asp
115 120 125

Cys Trp Phe Leu Ala Ala Ile Ala Cys Leu Thr Leu Asn Gln His Leu
130 135 140

Leu Phe Arg Val Ile Pro His Asp Gln Ser Phe Ile Glu Asn Tyr Ala
145 150 155 160

Gly Ile Phe His Phe Gln Phe Trp Arg Tyr Gly Glu Trp Val Asp Val
165 170 175

Val Ile Asp Asp Cys Leu Pro Thr Tyr Asn Asn Gln Leu Val Phe Thr
180 185 190

Lys Ser Asn His Arg Asn Glu Phe Trp Ser Ala Leu Leu Glu Lys Ala
195 200 205

Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr Glu Ala Leu Lys Gly Gly Asn Thr
210 215 220

Thr Glu Ala Met Glu Asp Phe Thr Gly Gly Val Ala Glu Phe Phe Glu
225 230 235 240

Ile Arg Asp Ala Pro Ser Asp Met Tyr Lys Ile Met Lys Lys Ala Ile
245 250 255

Glu Arg Gly Ser Leu Met Gly Cys Ser Ile Asp Asp Gly Thr Asn Met
260 265 270

Thr Tyr Gly Thr Ser Pro Ser Gly Leu Asn Met Gly Glu Leu Ile Ala
275 280 285

Arg Met Val Arg Asn Met Asp Asn Ser Leu Leu Gln Asp Ser Asp Leu
290 295 300

Asp	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	Glu	Arg	Pro	Thr	Arg	Thr	Ile	Ile	Pro	Val	
305					310					315					320	
Gln	Tyr	Glu	Thr	Arg	Met	Ala	Cys	Gly	Leu	Val	Arg	Gly	His	Ala	Tyr	
				325					330					335		
Ser	Val	Thr	Gly	Leu	Asp	Glu	Val	Pro	Phe	Lys	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	
			340					345					350			
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Val	Glu	Trp	Asn	Gly	Ser	
		355					360					365				
Trp	Ser	Asp	Arg	Trp	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Val	Asp	Lys	Asp	Glu	Lys	
370						375					380					
Ala	Arg	Leu	Gln	His	Gln	Val	Thr	Glu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Met	Ser	
385					390					395					400	
Tyr	Glu	Asp	Phe	Ile	Tyr	His	Phe	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Cys	Asn	Leu	
				405						410				415		
Thr	Ala	Asp	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Lys	Leu	Gln	Thr	Trp	Thr	Val	Ser	
			420						425				430			
Val	Asn	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Arg	Gly	Cys	Ser	Ala	Gly	Gly	Cys	Arg	
		435						440				445				
Asn	Phe	Pro	Asp	Thr	Phe	Trp	Thr	Asn	Pro	Gln	Tyr	Arg	Leu	Lys	Leu	
450						455					460					
Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Pro	Asp	Asp	Ser	Glu	Val	Ile	Cys	Ser	Phe	
465					470					475					480	
Leu	Val	Ala	Leu	Met	Gln	Lys	Asn	Arg	Arg	Lys	Asp	Arg	Lys	Leu	Gly	
				485					490					495		
Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Tyr	Glu	Val	Pro	Lys	Glu	
				500					505					510		

Met His Gly Asn Lys Gln His Leu Gln Lys Asp Phe Phe Leu Tyr Asn
515 520 525

Ala Ser Lys Ala Arg Ser Lys Thr Tyr Ile Asn Met Arg Glu Val Ser
530 535 540

Gln Arg Phe Arg Leu Pro Pro Ser Glu Tyr Val Ile Val Pro Ser Thr
545 550 555 560

Tyr Glu Pro His Gln Glu Gly Glu Phe Ile Leu Arg Val Phe Ser Glu
565 570 575

Lys Arg Asn Leu Ser Glu Glu Val Glu Asn Thr Ile Ser Val Asp Arg
580 585 590

Pro Val Lys Lys Lys Lys Thr Lys Pro Ile Ile Phe Val Ser Asp Arg
595 600 605

Ala Asn Ser Asn Lys Glu Leu Gly Val Asp Gln Glu Ser Glu Glu Gly
610 615 620

Lys Gly Lys Thr Ser Pro Asp Lys Gln Lys Gln Ser Pro Gln Pro Gln
625 630 635 640

Pro Gly Ser Ser Asp Gln Glu Ser Glu Glu Gln Gln Gln Phe Arg Asn
645 650 655

Ile Phe Lys Gln Ile Ala Gly Asp Asp Met Glu Ile Cys Ala Asp Glu
660 665 670

Leu Lys Lys Val Leu Asn Thr Val Val Asn Lys His Lys Asp Leu Lys
675 680 685

Thr His Gly Phe Thr Leu Glu Ser Cys Arg Ser Met Ile Ala Leu Met
690 695 700

Asp Thr Asp Gly Ser Gly Lys Leu Asn Leu Gln Glu Phe His His Leu
705 710 715 720

Trp Asn Lys Ile Lys Ala Trp Gln Lys Ile Phe Lys His Tyr Asp Thr
725 730 735

Asp Gln Ser Gly Thr Ile Asn Ser Tyr Glu Met Arg Asn Ala Val Asn
740 745 750

Asp Ala Gly Phe His Leu Asn Asn Gln Leu Tyr Asp Ile Ile Thr Met
755 760 765

Arg Tyr Ala Asp Lys His Met Asn Ile Asp Phe Asp Ser Phe Ile Cys
770 775 780

Cys Phe Val Arg Leu Glu Gly Met Phe Arg Ala Phe His Ala Phe Asp
785 790 795 800

Lys Asp Gly Asp Gly Ile Ile Lys Leu Asn Val Leu Glu Trp Leu Gln
805 810 815

Leu Thr Met Tyr Ala
820

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引子

<400> 8
cggagagcaa ctgcataag 19

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引子

<400> 9

ggctgatgat ggctgaatag

20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包括SEQ ID NO: 1之聚核苷酸的核苷酸1至3977。

【請求項2】

如請求項1之rAAV，其中該rAAV包括一或多個AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.74、AAV rh.10衣殼蛋白或其變異體。

【請求項3】

如請求項1或2之rAAV，其中該rAAV包括rh.74衣殼蛋白或AAV-9衣殼蛋白。

【請求項4】

一種組合物，其包括如請求項1至3中任一項之rAAV。

【請求項5】

一種用於治療肢帶型肌營養不良症2A之組合物，其包括治療有效量之如請求項1至3中任一項之rAAV或如請求項4之組合物。

【請求項6】

如請求項5之組合物，其中用所述組合物進行治療產生以下中之一種或多種：

- (a)增加之肌肉纖維直徑，
- (b)減少之小分葉狀肌肉纖維數量，
- (c)減少之具有內核之纖維數量，

(d)減少之肌內膜結締組織含量，

(e)校正肌肉萎縮，及

(f)增加之肌肉力產生。

【請求項7】

如請求項6之組合物，其中所述肌肉纖維包括以下中之一種或多種：
慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖維。

【請求項8】

如請求項4至7中任一項之組合物，其中用所述組合物進行治療產生以下中之一種或多種：

(a)投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%或40%；

(b)投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；

(c)投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；

(d)投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；

(e)投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；

(f)投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；

(g)投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及

(h)投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。

【請求項9】

如請求項4至7中任一項之組合物，其中所述組合物調配成藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與。

【請求項10】

如請求項4至7中任一項之組合物，其中在用所述組合物治療後，受試者之心肌顯示rAAVrh.74所表現最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。

【請求項11】

一種如請求項1至3中任一項之rAAV或如請求項4之組合物的用途，其用於製備供治療肢帶型肌營養不良症2A的藥劑。

【請求項12】

如請求項11之用途，其中用所述藥劑進行治療產生以下中之一種或多種：

- (a)增加之肌肉纖維直徑，
- (b)減少之小分葉狀肌肉纖維數量，
- (c)減少之具有內核之纖維數量，
- (d)減少之肌內膜結締組織含量，
- (e)校正肌肉萎縮，及
- (f)增加之肌肉力產生。

【請求項13】

如請求項12之用途，其中所述肌肉纖維包括以下中之一種或多種：慢縮氧化(STO)肌肉纖維、快縮氧化(FTO)肌肉纖維與快縮糖分解(FTG)纖

維。

【請求項14】

如請求項11至13中任一項之用途，其中用所述藥劑進行治療產生以下中之一種或多種：

- (a) 投與後4週，每 mm^2 總肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%或40%；
- (b) 投與後4週，肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；
- (c) 投與後4週，每 mm^2 STO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或42%；
- (d) 投與後4週，STO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%；
- (e) 投與後4週，每 mm^2 FTO肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%或20%；
- (f) 投與後4週，FTO肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%或20%；
- (g) 投與後4週，每 mm^2 FTG肌肉纖維數減少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%；及
- (h) 投與後4週，FTG肌肉纖維直徑增加至少5%、10%、15%、20%或25%。

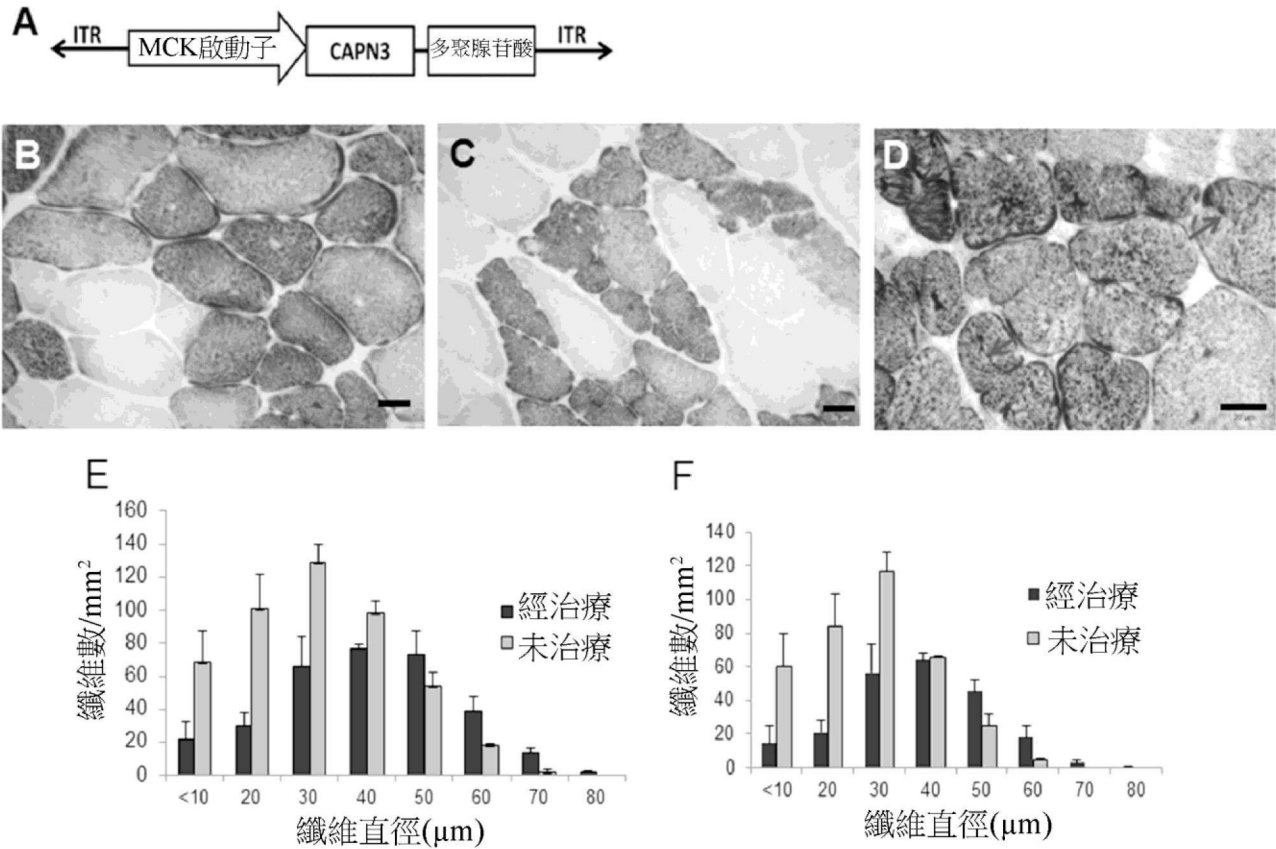
【請求項15】

如請求項11至13中任一項之用途，其中所述藥劑經調配以藉由肌肉內注射或靜脈內注射投與。

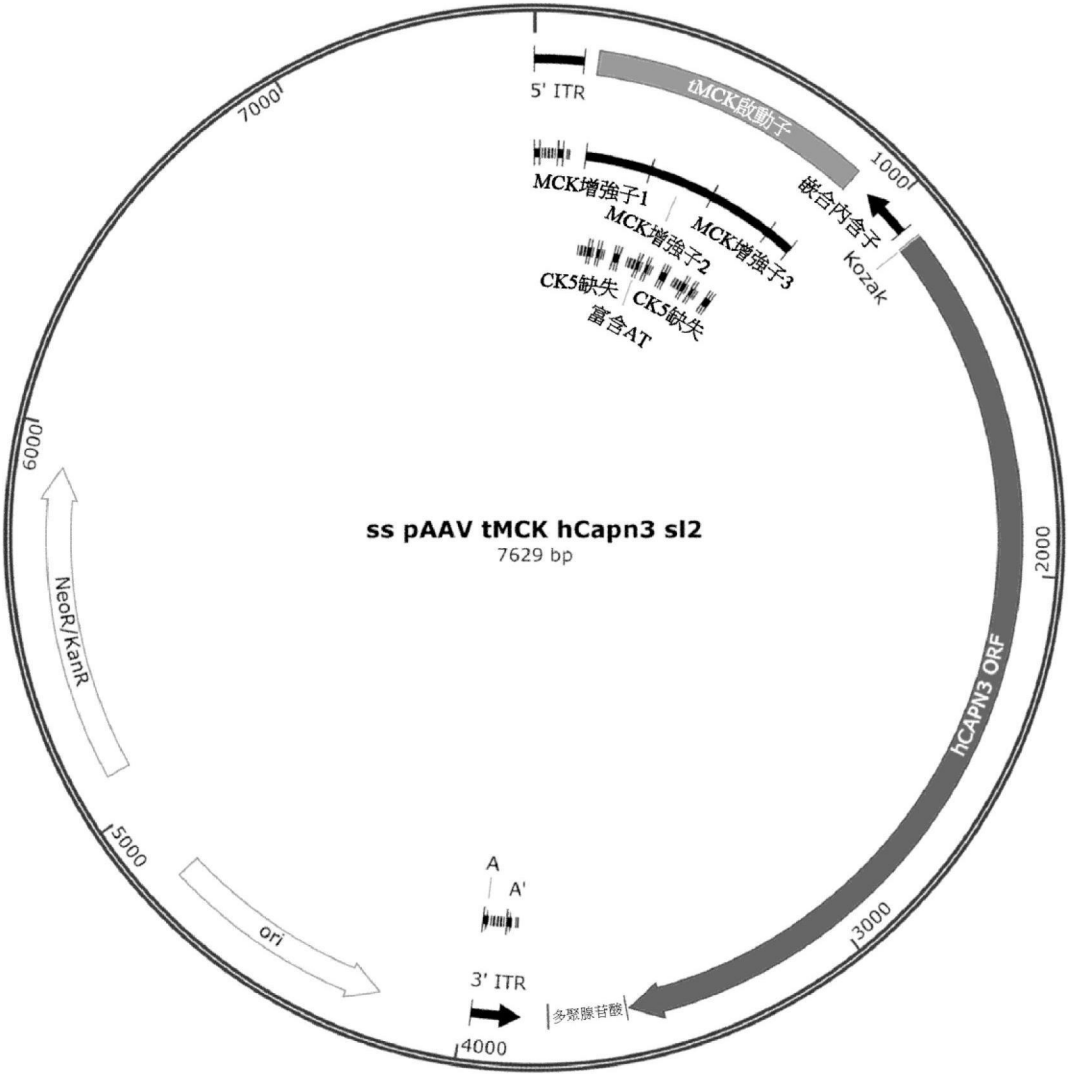
【請求項16】

如請求項11至13中任一項之用途，其中在用所述藥劑治療後，受試者之心肌顯示如請求項1至3中任一項之rAAV或如請求項4之組合物表現最小或低鈣蛋白酶3蛋白質。

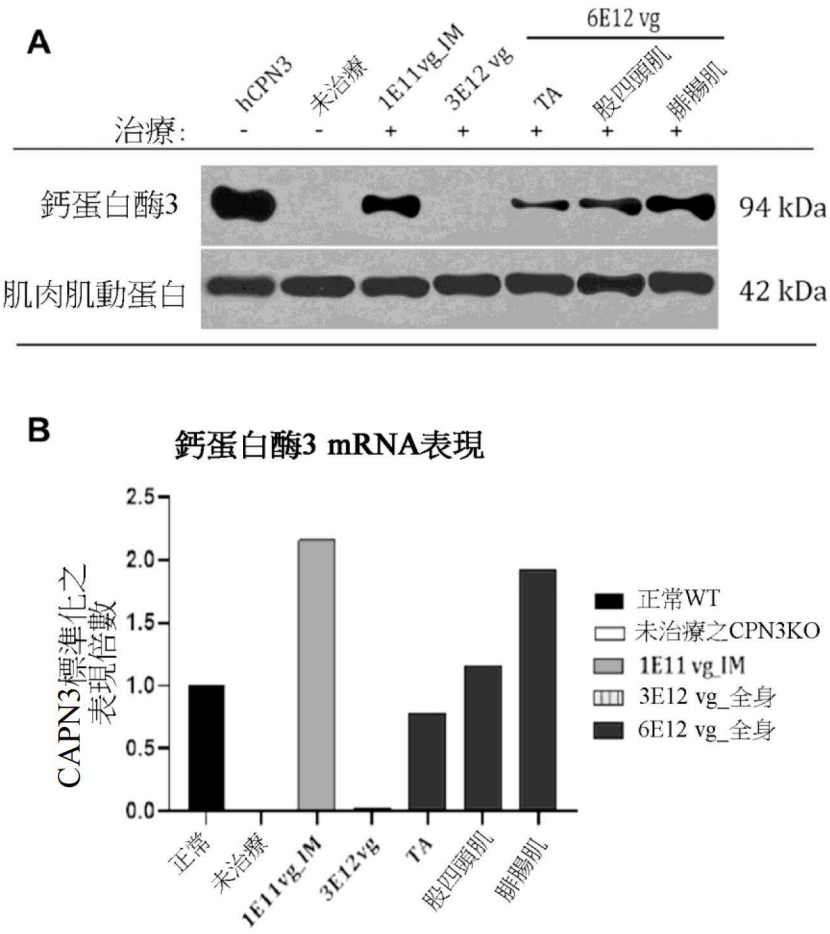
【發明圖式】



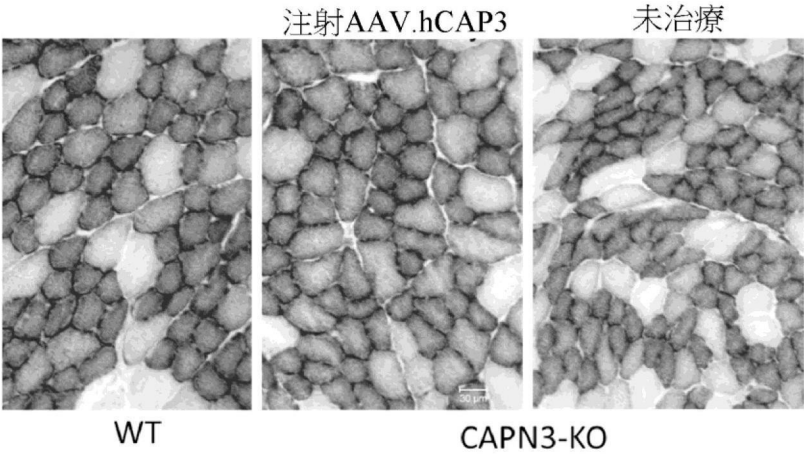
【圖1】



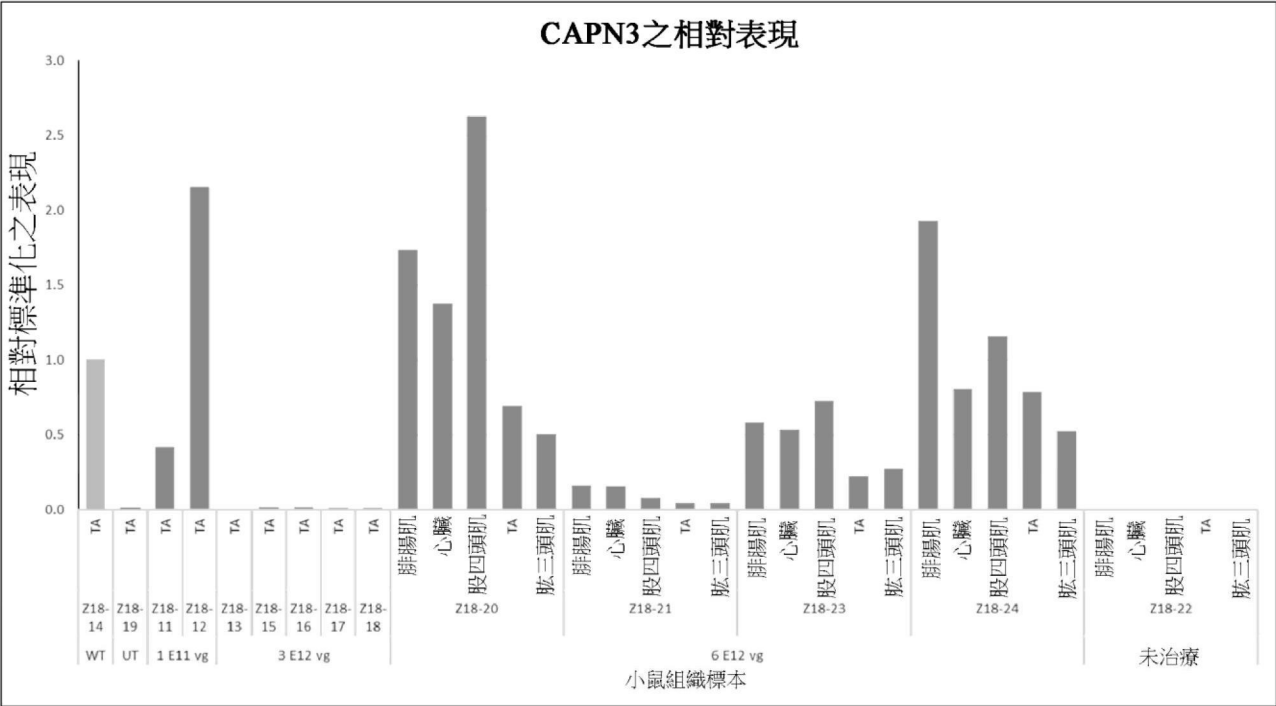
【圖2】



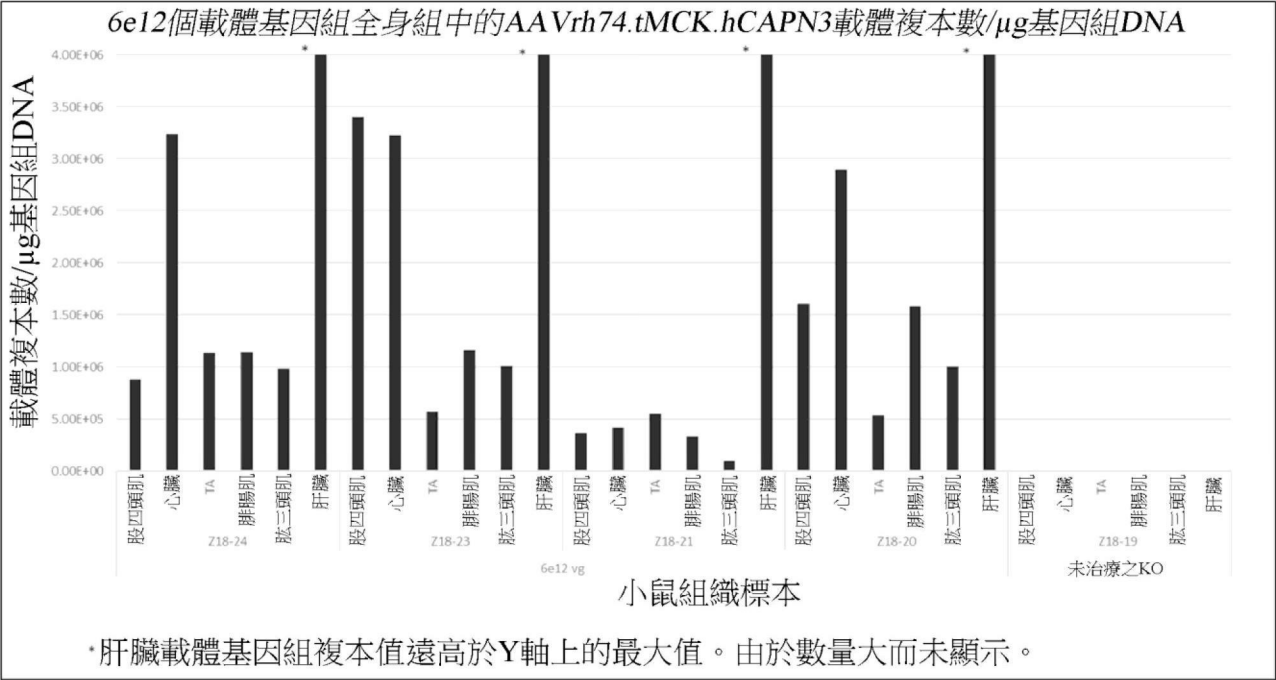
【圖3】



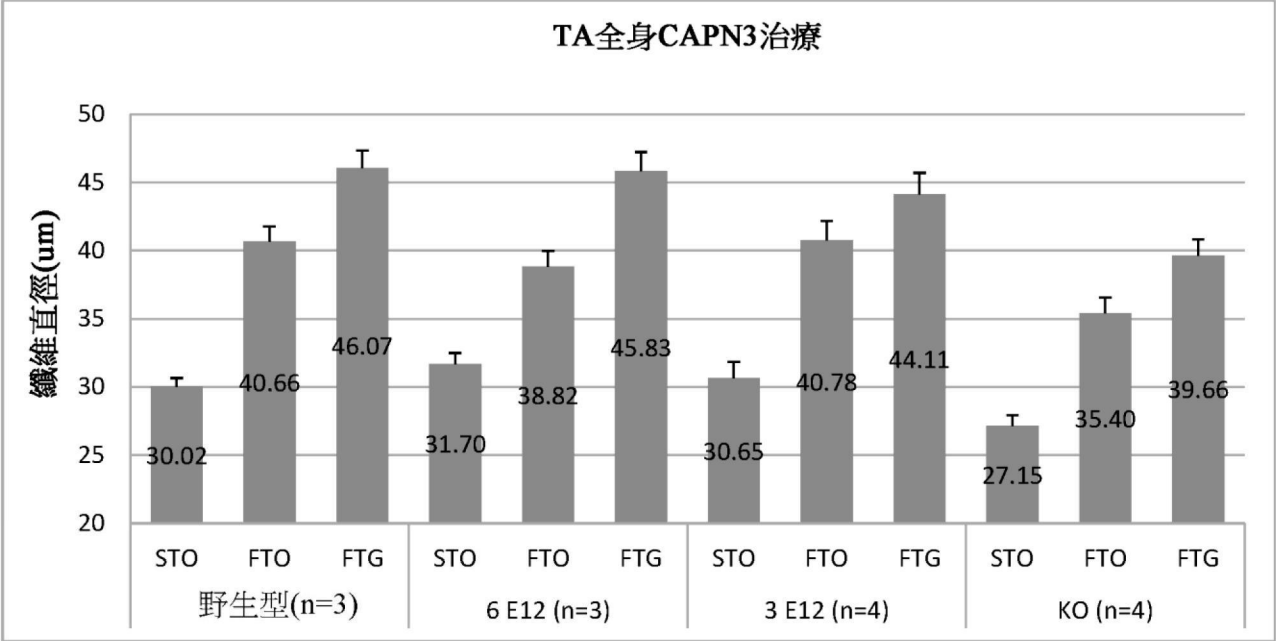
【圖4】



【圖5】

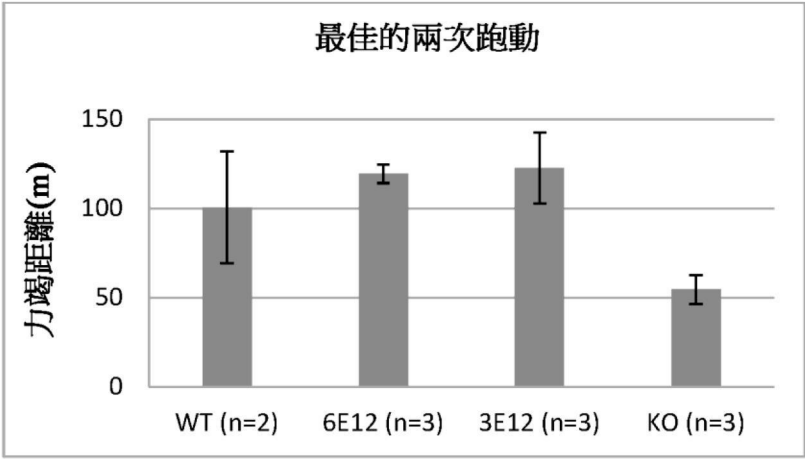


【圖6】

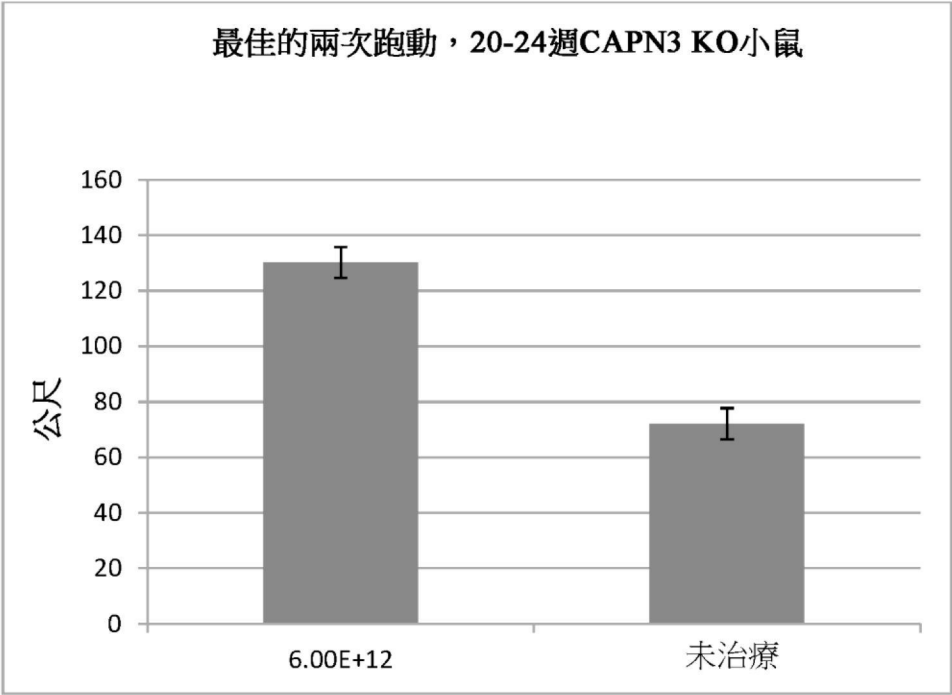


【圖7】

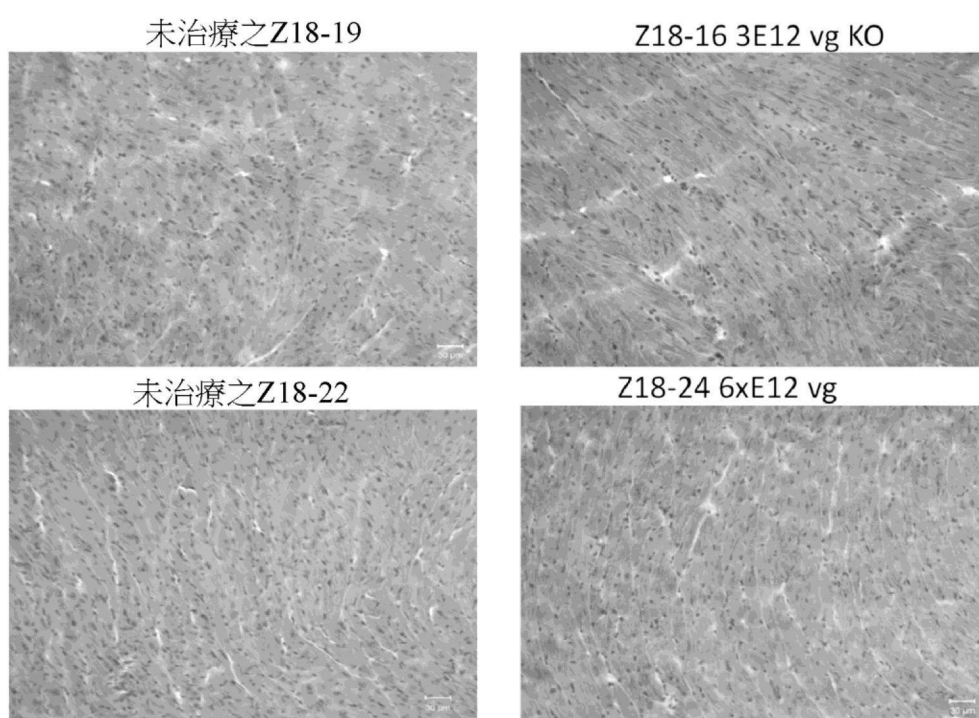
A



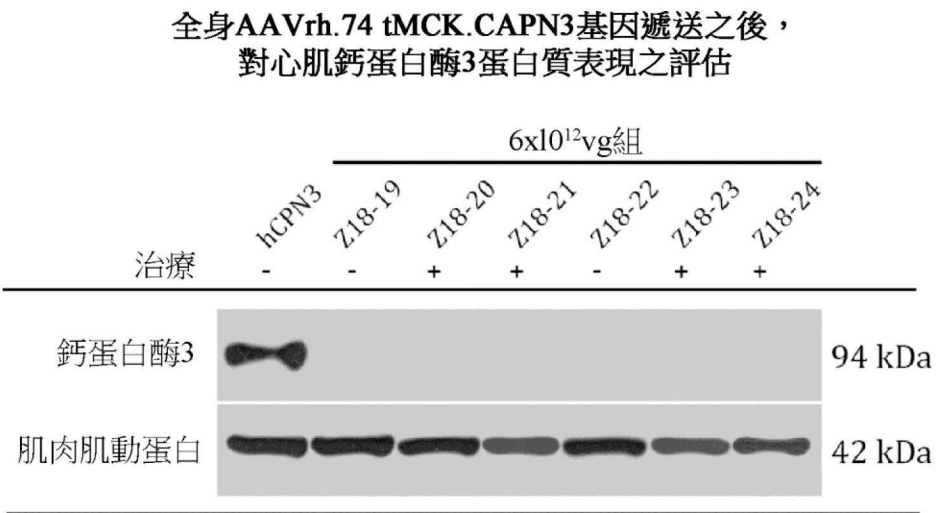
B



【圖8】



【圖9】



全長鈣蛋白酶3蛋白質低於偵測極限。
6×10¹² vg AAVrh74.tMCK.CAPN3全身給予之CPN3KO小鼠在心肌中未顯示可偵測到之鈣蛋白酶3蛋白質表現。
陽性對照物(hCPN3)人類股四頭肌肌肉裂解物。

【圖10】