202344691

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202344691 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：112122938 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 04 月 30 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/86 (2006.01)* *C07K14/65 (2006.01)*
C12N9/16 (2006.01) *C12N9/24 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/04/30 美國 62/664,741
2018/06/22 美國 62/688,640
2018/10/10 美國 62/744,068

(71)申請人：美商阿米庫斯醫療股份有限公司 (美國) AMICUS THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：杜 黃 DO, HUNG (US) ；塔斯克 史蒂芬 TUSKE, STEVEN (US) ；卡斯和 羅素 GOTSCHALL, RUSSELL (US) ；劉 冊方 LIU, CE FENG (US)

(74)代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：151 項 圖式數：36 共 189 頁

(54)名稱

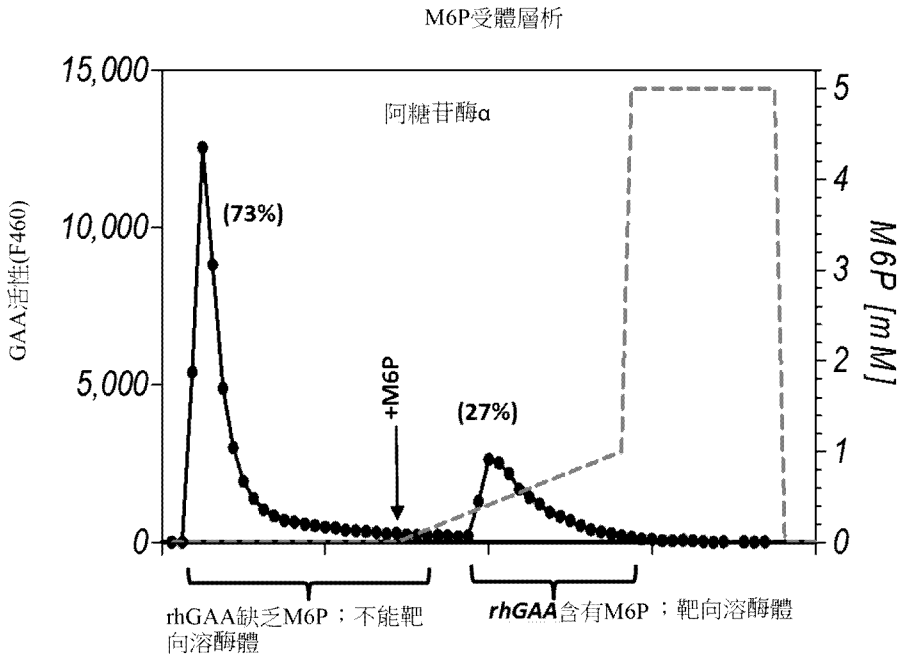
基因治療構築體及使用方法

(57)摘要

本發明提供經改良之基因治療載體及使用方法，在一些實施例中，其包含用於改良治療蛋白之表現及細胞靶向的序列。

Provided herein are improved gene therapy vectors and methods of use, in some embodiments, comprising sequences for improved expression and cellular targeting of a therapeutic protein.

指定代表圖：


M6P受體層析
阿糖苷酶α
GAA活性(F460)
M6P [mM]
15,000
10,000
5,000
0
5
4
3
2
1
0
(73%)
+M6P
(27%)
rhGAA缺乏M6P；不能靶向溶酶體
rhGAA含有M6P；靶向溶酶體

【圖1】

202344691
專利案號：112122938

【發明摘要】

【中文發明名稱】

基因治療構築體及使用方法

【英文發明名稱】

GENE THERAPY CONSTRUCTS AND METHODS OF USE

【中文】

本發明提供經改良之基因治療載體及使用方法，在一些實施例中，其包含用於改良治療蛋白之表現及細胞靶向的序列。

【英文】

Provided herein are improved gene therapy vectors and methods of use, in some embodiments, comprising sequences for improved expression and cellular targeting of a therapeutic protein.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】基因治療構築體及使用方法

【英文發明名稱】GENE THERAPY CONSTRUCTS AND METHODS OF USE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 遺傳病症係因發生於基因組之基因編碼區中之可遺傳或新生突變所產生。在一些情況下，此類遺傳病症可藉由向患有遺傳病症之個體投與由經突變基因編碼之蛋白質來治療。然而，此類治療具有挑戰性，此係因為投與該蛋白質不會一直使蛋白質到達需要其的器官、細胞或細胞器。此外，此治療亦通常需要兩週一次輸注，該等輸注不需要與基因治療一起，其中單一治療可提供持續釋放。因此，基因治療具有提供優於目前遺傳病症之可用治療的改良結果的潛能。

【發明內容】

【0002】 本文提供用於使用基因治療治療遺傳病症之組合物及方法。本文亦提供用於基因治療之基因治療載體組分及方法，該基因治療用於改良蛋白質表現及增加細胞吸收或遞送及胞內或亞細胞靶向由基因治療載體提供之治療蛋白。

【0003】 在某些態樣中，提供基因治療載體，例如包含核酸構築體之基因治療載體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：(a)轉譯起始序列，及(b)編碼治療蛋白之核酸序列。在一些實施例中，轉譯起始序列包含Kozak序列。在一些實施例中，Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含

A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含編碼信號肽之核酸序列，該信號肽能夠相較於無信號肽之治療蛋白增加治療蛋白之分泌。在一些實施例中，信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。在一些實施例中，BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與選自由SEQ ID No: 13-17組成之群之序列相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。在一些實施例中，BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與SEQ ID NO: 32之序列相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含內部核糖體進入序列(IRES)。在一些實施例中，IRES為蟋蟀麻痺病毒(CrPV) IRES。在一些實施例中，IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。在一些實施例中，IRES包含SEQ ID NO: 12。

【0004】 在額外態樣中，提供基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：(a)編碼信號肽之核酸序列，及(b)編碼治療蛋白之核酸序列，其中信號肽能夠相較於無信號肽之治療蛋白增加治療蛋白的分泌。在一些實施例中，信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。在一些實施例中，BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與選自由SEQ ID No: 13-17組成之群之序列相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。在一些實施例中，BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽包含Gaussia信號肽。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與SEQ ID NO: 32之序列相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。在一些實施例中，轉譯起始序列包含Kozak序列，該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個

核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含內部核糖體進入序列(IRES)。在一些實施例中，IRES包含選自由以下組成之群之IRES：蟋蟀麻痺病毒(cricket paralysis virus；CrPV) IRES、小核糖核酸病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、卡堡氏(Kaposi's)肉瘤相關疱疹病毒IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、瘟病毒IRES、蟋蟀麻痺病毒(Cripavirus) IRES、禾谷縊管蚜病毒IRES及梅雷克氏(Merek's)病病毒IRES。在一些實施例中，IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。在一些實施例中，IRES包含SEQ ID NO: 12。

【0005】 在其他態樣中，提供基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：(a)內部核糖體進入序列(IRES)，及(b)編碼治療蛋白之核酸序列。在一些實施例中，IRES包含選自由以下組成之群之IRES：蟋蟀麻痺病毒(cricket paralysis virus；CrPV) IRES、小核糖核酸病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、卡堡氏肉瘤相關疱疹病毒IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、瘟病毒IRES、蟋蟀麻痺病毒(Cripavirus) IRES、禾谷縊管蚜病毒IRES及梅雷克氏病病毒IRES。在一些實施例中，IRES為蟋蟀麻痺病毒(CrPV) IRES。在一些實施例中，IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。在一些實施例中，IRES包含SEQ ID NO: 12。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。在一些實施例中，轉譯起始序列包含Kozak序列，該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸

序列。在一些實施例中，Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含編碼信號肽之信號核酸序列，該信號肽能夠相較於無信號肽之治療蛋白增加治療蛋白之分泌。在一些實施例中，信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。在一些實施例中，BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含編碼以高親和力與CI-MPR結合之肽的核酸序列。在一些實施例中，以高親和力與CI-MPR結合之肽為IGF2肽。在一些實施例中，IGF2肽為包含與選自由SEQ ID NO: 1-11組成之群之胺基酸序列至少90%一致之胺基酸序列的vIGF2肽。在一些實施例中，IGF2肽為包含選自由SEQ ID NO: 1-11組成之群之胺基酸序列的vIGF2肽。在一些實施例中，vIGF2核苷酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的5'。在一些實施例中，vIGF2核苷酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的3'。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含在該vIGF2核苷酸序列與編碼治療蛋白之該核酸序列之間的編碼連接肽的連接子序列。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在

一些實施例中，連接肽包含與SEQ ID NO: 18-21或SEQ ID NO: 33至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，連接肽包含SEQ ID NO: 18-21或SEQ ID NO: 33。在一些實施例中，治療蛋白與溶酶體貯積病相關聯。在一些實施例中，治療蛋白係選自由以下組成之群：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白為α-半乳糖苷酶。在一些實施例中，酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶(PPT)，包括軟脂醯基蛋白質硫酯酶1及2 (分別地，PPT1及PPT2)。在一些實施例中，酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶1。在一些實施例中，治療蛋白與選自由以下組成之群之遺傳病症相關聯：CDKL5缺乏症、囊腫性纖維化、α-地中海型貧血及β-地中海型貧血、鐮狀細胞貧血、馬凡氏症候群(Marfan syndrome)、X脆折症候群、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、血色沉著病、先天性耳聾(非綜合型)、塔伊-薩克斯病(Tay-Sachs)、家族性高膽固醇血症、杜興氏肌肉失養症(Duchenne

muscular dystrophy)、斯特格氏病(Stargardt disease)、尤塞氏症候群(Usher syndrome)、無脈絡膜症、色盲、X性聯視網膜劈裂症、血友病、韋-奧氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)、X性聯慢性肉芽腫病、芳族L-胺基酸去羧酶缺乏症、隱性營養不良大皰性表皮鬆懈、α1抗胰蛋白酶缺乏症、哈-吉氏早老症症候群(Hutchinson-Gilford progeria syndrome；HGPS)、努南氏症候群(Noonan syndrome)、X性聯嚴重合併性免疫缺失(X-SCID)。在一些實施例中，治療蛋白係選自由以下組成之群：CDKL5、連接蛋白26、己糖苷酶A、LDL受體、肌縮蛋白、CFTR、β-球蛋白、HFE、亨廷頓氏、ABCA4、肌凝蛋白VIIA (MYO7A)、Rab護航蛋白-1 (REP1)、環狀核苷酸閘控通道β3 (CNGB3)、視網膜劈裂素1 (RS1)、血紅素次單元β (HBB)、因子IX、WAS、細胞色素B-245 β鏈、多巴去羧酶(DDC)、VII型膠原蛋白α1鏈(COL7A1)、絲胺酸蛋白酶抑因子家族A成員1 (SERPINA1)、LMNA、PTPN11、SOS1、RAF1、KRAS及IL2受體γ基因。在一些實施例中，治療蛋白能夠置換患有遺傳病症中之個體中與該遺傳病症相關之缺陷或缺乏蛋白質。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病(Fabry disease)、I型戈謝病(Gaucher disease type I)、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病(Pompe disease)、泰-薩克斯病(Tay Sachs disease)、桑多霍夫病(Sandhoff disease)、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病(Hurler disease)、亨特病(Hunter disease)、A型聖菲利波病(Sanfilippo disease type A)、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病(Morquio

disease type A)、B型莫奎病、馬羅托-拉米病(Maroteau-Lamy disease)、斯利病(Sly disease)、A型尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease type A)、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病(Schindler disease type I)及II型辛德勒病。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2型，中度形式；3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病(Danon disease)；法布立病；晚期發作II型法布立病；法伯病(Farber disease)；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(Krabbe disease) (晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；

MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡(Spielmeyer-Vogt)/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型晚幼稚型CLN5；詹斯基-比爾朔夫斯基病(Jansky-Bielschowsky disease)/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞(Santavuori-Haltia)/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病(Kanzaki disease)；薩拉病(Salla disease)；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群(Christianson syndrome)；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病(Charcot-Marie-Tooth) CMT4J；尤里斯-凡倫症候群(Yunis-Varon syndrome)；雙側顳枕多小腦回(bilateral temporooccipital polymicrogyria；BTOP)；X性聯高鈣性腎石病，登特-1；及登特病2、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，遺傳病症為龐培氏病。在一些實施例中，遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，神經元蠟樣質脂褐質沈

積症係選自由以下組成之群：幼稚型NCL (桑塔沃里-哈爾蒂亞病)、晚幼稚型NCL (詹斯基-比爾朔夫斯基病)、貝敦氏病、成人NCL (庫夫斯病(Kufs disease))、芬蘭晚幼稚型NCL、變型晚幼稚型NCL、CLN7、CLN8、土耳其晚幼稚型NCL、9型NCL及CLN10。在一些實施例中，基因治療載體為病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為腺相關病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、痘病毒載體、牛痘病毒載體、腺病毒載體或疱疹病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為AAV載體。在一些實施例中，AAV載體包含反向末端重複序列(ITR)。在一些實施例中，AAV載體係選自由以下組成之群：AAV1載體、AAV2載體、AAV3載體、AAV4載體、AAV5載體、AAV6載體、AAV7載體、AAV8載體、AAV9載體、AAVrhS載體、AAVrh10載體、AAVrh33載體、AAVrh34載體、AAVrh74載體、AAV Anc80載體、AAVPHP.B載體、AAVhu68載體及AAV-DJ載體。

【0006】 在某些態樣中，提供基因治療載體，諸如包含以下之基因治療載體：(a)編碼治療蛋白之核酸序列，及(b)編碼以高親和力與CI-MPR結合之肽的核酸序列。在一些實施例中，肽為變體IGF2 (vIGF2)肽。在一些實施例中，vIGF2肽包含與SEQ ID NO: 1至少90%一致且在選自由以下組成之群之一或多個位置處具有至少一個取代的胺基酸序列：SEQ ID NO: 1之位置6、26、27、43、48、49、50、54、55及65。在一些實施例中，該至少一個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R及K65R。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在選自由以下組成之群之兩個或更多個位置處之至少兩個取代：SEQ ID NO: 1之位置6、26、27、43、

48、49、50、54及55。在一些實施例中，該至少兩個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R及L55R。在一些實施例中，該vIGF2肽包含N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1處之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-2之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-3之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失及E6R、Y27L及K65R之取代。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失及E6R及Y27L之取代。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-5之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1-6處之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1-7處之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽相較於原生IGF2肽針對胰島素受體及IGF1R具有降低的親和力或無親和力。在一些實施例中，vIGF2肽能夠促進將治療蛋白吸收至細胞中之溶酶體中。在一些實施例中，治療蛋白能夠置換患有遺傳病症中之個體中與該遺傳病症相關之缺陷或缺乏蛋白質。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅

托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病及II型辛德勒病。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2型，中度形式；3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病；法布立病；晚發作型II型法布立病；法伯病；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML

III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型晚幼稚型CLN5；詹斯基-比爾朔夫斯基病/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病；薩拉病；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病CMT4J；尤里斯-凡倫症候群；雙側顳枕多小腦回(BTOP)；X性聯高鈣性腎石病，登特-1；及登特病2、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，遺傳病症為龐培氏病。在一些實施例中，遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，神經元蠟樣質脂褐質沈積症係選自由以下組成之群：幼稚型NCL (桑塔沃里-哈爾蒂亞病)、晚幼稚型NCL (詹斯基-比爾朔夫斯基病)、貝敦氏病、成人NCL (庫夫斯病)、芬蘭晚幼稚型NCL、變型晚幼稚型NCL、CLN7、CLN8、土耳其晚幼稚型NCL、9型NCL及CLN10。在一些實施例中，治療蛋白為可溶性溶酶體酶。在一些實施例中，治療蛋白包含選自由以下組成之群的酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A

或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，軟脂醯基蛋白質硫酯酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶1 (PPT1)或2 (PPT2)。在一些實施例中，軟脂醯基蛋白質硫酯酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶1。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。在一些實施例中，轉譯起始序列包含Kozak序列。在一些實施例中，Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，核酸構築體進一步包

含編碼信號肽之核酸序列，其中信號肽能夠相較於無信號肽之治療蛋白增加治療蛋白的分泌。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含編碼信號肽之核酸序列，其中該信號肽能夠相較於具有天然信號肽之治療蛋白增加治療蛋白之分泌。在一些實施例中，核酸構築體包含編碼非天然信號肽之核酸序列，其中該非天然信號肽能夠相較於治療蛋白之原生信號肽增加治療蛋白之分泌。在一些實施例中，信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。在一些實施例中，BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽包含Gaussia信號肽。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。在一些實施例中，vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的5'。在一些實施例中，vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的3'。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含在該vIGF2核苷酸序列與編碼治療蛋白之該核酸序列之間的編碼連接肽的連接子序列。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接肽包含SEQ ID NO: 18-21或SEQ ID NO: 33。在一些實施例中，基因治療載體為病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為腺病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體或疱疹病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為AAV載體。在一些實施例中，AAV載體包含反向末端重複序列(ITR)。在一些實施例中，AAV載體係選自由以下組成之群：AAV1載體、AAV2載

體、AAV3載體、AAV4載體、AAV5載體、AAV6載體、AAV7載體、AAV8載體、AAV9載體、AAVrhS載體、AAVrh10載體、AAVrh33載體、AAVrh34載體、AAVrh74載體、AAV Anc80載體、AAVPHP.B載體、AAVhu68載體及AAV-DJ載體。

【0007】一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體包含：(a)編碼治療蛋白之核酸序列，及(b)編碼增加治療蛋白之內吞作用之肽的核酸序列。在一些實施例中，增加該治療蛋白之內吞作用之該肽為與CI-MPR結合的肽。在一些實施例中，肽為變體IGF2 (vIGF2)肽、HIRMab或TfRMab或其他細胞靶向肽或蛋白質。在一些實施例中，肽為vIGF2。在一些實施例中，vIGF2肽包含與SEQ ID NO: 1至少90%一致且在選自由以下組成之群之一或多個位置處具有至少一個取代的胺基酸序列：SEQ ID NO: 1之位置6、26、27、43、48、49、50、54、55及65。在一些實施例中，該至少一個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R及K65R。在一些實施例中，該至少一個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R及L55R。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在選自由以下組成之群之兩個或更多個位置處之至少兩個取代：SEQ ID NO: 1之位置6、26、27、43、48、49、50、54及55。在一些實施例中，該至少兩個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R及L55R。在一些實施例中，該vIGF2肽包含N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1處之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1-6處之N端缺

失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-2之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-3之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失及E6R、Y27L及K65R之取代。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-4之N端缺失及E6R及Y27L之取代。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-5之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含SEQ ID NO: 1之位置1-6之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1-7處之N端缺失。在一些實施例中，該vIGF2肽相較於原生IGF2肽針對陽離子非依賴性M6P受體(CI-MPR)具有增加的特異性。在一些實施例中，vIGF2肽能夠促進將治療蛋白吸收至細胞中之溶酶體中。在一些實施例中，治療蛋白能夠置換患有遺傳病症中之個體中與該遺傳病症相關之缺陷或缺乏蛋白質。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病及II型辛德勒病。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2

型，中度形式；3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病；法布立病；晚發作型II型法布立病；法伯病；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型晚幼稚型CLN5；詹斯基-比

爾朔夫斯基病/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病；薩拉病；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病CMT4J；尤里斯-凡倫症候群；雙側顳枕多小腦回(BTOP)；X性聯高鈣性腎石病，登特-1；及登特病2、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，遺傳病症為龐培氏病。在一些實施例中，遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，神經元蠟樣質脂褐質沈積症係選自由以下組成之群：幼稚型NCL (桑塔沃里-哈爾蒂亞病)、晚幼稚型NCL (詹斯基-比爾朔夫斯基病)、貝敦氏病、成人NCL (庫夫斯病)、芬蘭晚幼稚型NCL、變型晚幼稚型NCL、CLN7、CLN8、土耳其晚幼稚型NCL、9型NCL及CLN10。在一些實施例中，治療蛋白為可溶性溶酶體酶。在一些實施例中，治療蛋白包含選自由以下組成之群的酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-

乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，軟脂醯基蛋白質硫酯酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶1 (PPT1)或2 (PPT2)。在一些實施例中，軟脂醯基蛋白質硫酯酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶1。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。在一些實施例中，轉譯起始序列包含Kozak序列。在一些實施例中，Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含編碼信號肽之信號核酸序列，其中信號肽能夠相較於無信號肽之治療蛋白增加治療蛋白的分泌。在一些實施例中，信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。在一些實施例中，BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸

序列。在一些實施例中，BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13-17組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽包含Gaussia信號肽。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。在一些實施例中，vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的5'。在一些實施例中，vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的3'。在一些實施例中，核酸構築體進一步包含在該vIGF2核苷酸序列與編碼治療蛋白之該核酸序列之間的編碼連接肽的連接子序列。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接肽包含SEQ ID NO: 18-21或SEQ ID NO: 33。在一些實施例中，基因治療載體為病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為腺病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體或疱疹病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為AAV載體。在一些實施例中，AAV載體包含反向末端重複序列(ITR)。在一些實施例中，AAV載體係選自由以下組成之群：AAV1載體、AAV2載體、AAV3載體、AAV4載體、AAV5載體、AAV6載體、AAV7載體、AAV8載體、AAV9載體、AAVrhS載體、AAVrh10載體、AAVrh33載體、AAVrh34載體、AAVrh74載體、AAV Anc80載體、AAVPHP.B載體、AAVhu68載體及AAV-DJ載體。

【0008】 在額外態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含(i)治療有效量之本文中之任一基因治療載體，及(ii)醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在一些實施例中，載劑或賦形劑包含非離子性低滲透化合物、緩衝劑、聚合物、鹽或其組合。

【0009】在其他態樣中，提供用於治療遺傳病症之方法，其包含向有需要之個體投與本文提供之任一基因治療載體或本文提供之任一醫藥組合物。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病及II型辛德勒病。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2型，中度形式；3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病；法布立病；晚發作型II型法布立病；法伯病；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸

酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型晚幼稚型CLN5；詹斯基-比爾朔夫斯基病/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病；薩拉病；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病CMT4J；尤里斯-凡倫症候群；雙側顳枕多小腦回(BTOP)；X性聯高鈣性腎石病、登特-1；及登特病2、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-

SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)、CDKL5缺乏症及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，遺傳病症為龐培氏病。在一些實施例中，遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，神經元蠟樣質脂褐質沈積症係選自由以下組成之群：幼稚型NCL (桑塔沃里-哈爾蒂亞病)、晚幼稚型NCL (詹斯基-比爾朔夫斯基病)、貝敦氏病、成人NCL (庫夫斯病)、芬蘭晚幼稚型NCL、變型晚幼稚型NCL、CLN7、CLN8、土耳其晚幼稚型NCL、9型NCL及CLN10。在一些實施例中，投與係以鞘內、眼內、玻璃體內、視網膜內、靜脈內、肌肉內、心室內、顱內、小腦內、腦室內、腦實質內、經眼、皮下或其組合方式進行。在一些實施例中，投與係以鞘內方式進行。在一些實施例中，投與係以眼內、玻璃體內或視網膜內方式進行。

【0010】 在額外態樣中，提供醫藥組合物，其包含本文中之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑以用於治療遺傳病症。在其他態樣中，提供醫藥組合物，其包含本文中之任一基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑以用於製備用於治療遺傳病症的藥物。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病及II型辛德勒病。在一些實施例

中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2型，中度形式；3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病；法布立病；晚發作型II型法布立病；法伯病；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質

病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型晚幼稚型CLN5；詹斯基-比爾朔夫斯基病/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病；薩拉病；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病(CMT4J；尤里斯-凡倫症候群；雙側顳枕多小腦回(BTOP)；X性聯高鈣性腎石病、登特-1；及登特病2、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)、CDKL5缺乏症及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，遺傳病症為龐培氏病。在一些實施例中，遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。在一些實施例中，神經元蠟樣質脂褐質沈積症係選自由以下組成之群：幼稚型NCL (桑塔沃里-哈爾蒂亞病)、晚幼稚型NCL (詹斯基-比爾朔夫斯基病)、貝敦氏病、成人NCL (庫夫斯病)、芬蘭晚幼稚型NCL、變型晚幼稚型NCL、CLN7、CLN8、土耳其晚幼稚型NCL、9型NCL及CLN10。在一些實施例中，組合物經調配用於鞘內、眼內、玻璃體內、視網膜內、靜脈內、肌肉內、心室內、顱內、小腦內、經眼或皮下投與。在一些實施例中，組合物經調配用於鞘內投與。在一些實施例中，組合物經調配用於鞘內投與以用於治療神經退化性病症。在一些實施例

中，組合物經調配用於經眼、玻璃體內或視網膜內投與。

【0011】在某些態樣中，提供融合蛋白，諸如包含變體IGF2肽及治療蛋白之融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白由包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)之核酸編碼。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相

關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。

【0012】 在額外態樣中，提供融合蛋白，其包含信號肽及治療蛋白，其中該信號肽在轉譯之後在自細胞分泌時移除。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，融合蛋白由包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)之核酸編碼。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂

唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。

【0013】 在其他態樣中，提供編碼融合蛋白之核酸序列，該融合蛋白包含治療蛋白，其中融合蛋白由包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)之核酸編碼。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯

基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。

【0014】 在額外態樣中，提供包含治療蛋白之融合蛋白，其中該融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-

硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，融合蛋白由包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)之核酸編碼。

【0015】 在額外態樣中，提供編碼融合蛋白之核酸，諸如編碼包含變體IGF2肽及治療蛋白之融合蛋白的核酸。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯

基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸包含於病毒載體內。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。

【0016】 在其他態樣中，提供編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含信號肽及治療蛋白。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核

酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。

【0017】 在額外態樣中，提供編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含治療蛋白，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、

GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。

【0018】 在其他態樣中，提供編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含治療蛋白，其中該核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。

在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒

或疱疹病毒。

【0019】 在額外態樣中，提供組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含變體IGF2肽及治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖

苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸包含於病毒載體內。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。

【0020】 在額外態樣中，提供組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含信號肽及治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下

組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。

【0021】 在其他態樣中，提供組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該包含治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一

些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進

一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。

【0022】 在其他態樣中，提供組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑，其中該核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯

基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。

【0023】 在額外態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含變體IGF2肽及治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含

GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質

體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，以離體方式處理來自個體之細胞，且在離體處理之後向該個體投與該等細胞。

【0024】 在額外態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含信號肽及治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID

NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡

性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，離體處理來自個體之細胞，且在離體處理之後向該個體投與該等細胞。

【0025】 在其他態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱

作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋

白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，離體處理來自個體之細胞，且在離體處理之後向該個體投與該等細胞。

【0026】 在額外態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含治療蛋白；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑，其中該核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、

乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重

合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，離體處理來自個體之細胞，且在離體處理之後向該個體投與該等細胞。

【0027】 在其他態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸之細胞，該融合蛋白包含變體IGF2肽及治療蛋白。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾

液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，細胞來源於個體。

【0028】 在額外態樣中提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸之細胞，該融合蛋白包含信號肽及治療蛋白。

在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例

中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，細胞來源於個體。

【0029】 在額外態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸之細胞，該融合蛋白包含治療蛋白，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺

基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含脂質體、奈米粒子或細胞穿透肽。在一些實施例

中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，細胞來源於個體。

【0030】 在其他態樣中，提供治療個體之遺傳病症之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸之細胞，該融合蛋白包含治療蛋白，其中該核酸進一步包含Kozak序列。在一些實施例中，核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含連接子。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)、GGGGS (SEQ ID NO: 19)、GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20)、GGGGSGGGS (SEQ ID NO: 21)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37，在

本文中亦被稱作「2GS」)或GGSGSGSTS (SEQ ID NO: 33)之胺基酸序列。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含信號肽。在一些實施例中，信號肽包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽。在一些實施例中，融合蛋白進一步包含變體IGF2肽。在一些實施例中，治療蛋白包含由以下組成之群的至少一種酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。在一些實施例中，治療蛋白包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，核酸進一步包含啟動子。在一些實施例中，核酸進一步包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體包含反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、慢病毒或疱疹病毒。在一些實施例中，適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑包含病毒外殼蛋白。在一些實施例中，病毒外殼蛋白係選自由以下組成之群：水泡性口炎病毒外殼蛋白、腺病毒外殼蛋白、腺相關病毒外殼蛋白、鼠類白血病病毒外殼蛋白、HIV外殼蛋白及流感病毒外殼蛋白。在一些實施例中，遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，

該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及慢性肉芽腫病(CGD)。在一些實施例中，細胞來源於個體。

【0031】 本文進一步提供一種融合蛋白，其包含原生信號肽、ER蛋白質裂解域、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。

【0032】 本文另外提供一種融合蛋白，其包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該融合蛋白由包含Kozak序列之核酸編碼。

【0033】 本文另外提供一種融合蛋白，其包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該融合蛋白由包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)之核酸編碼。

【0034】 本文另外提供一種編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含原生信號肽、ER蛋白質裂解域、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶。

【0035】 本文另外提供一種編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含Kozak序列。

【0036】 本文另外提供一種編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痹病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。

【0037】 本文另外提供一種組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含原生信號肽、ER蛋白質裂解域、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0038】 本文另外提供一種組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含Kozak序列；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0039】 本文另外提供一種組合物，其包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痹病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0040】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含原生信號肽、ER蛋白質裂解域、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0041】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含Kozak序列；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0042】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投

與組合物，該組合物包含：(a)編碼融合蛋白之核酸，該融合蛋白包含變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)；及(b)適合於基因治療之緩衝劑或賦形劑。

【0043】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸的細胞，該融合蛋白包含原生信號肽、ER蛋白質裂解域、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶。

【0044】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸的細胞，該融合蛋白包含結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽、變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含Kozak序列。

【0045】 本文另外提供一種治療個體之龐培氏病之方法，其包含投與表現編碼融合蛋白之核酸的細胞，該融合蛋白包含變體IGF2肽及α-葡糖苷酶，其中該核酸進一步包含蟋蟀麻痺病毒內部核糖體進入序列(CrPV IRES)。

以引用之方式併入

【0046】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案均以引用之方式併入本文中，其引用的程度如同各單獨的公開案、專利或專利申請案經特定及單獨地表明以引用之方式併入一般。

【圖式簡單說明】

【0047】 該專利申請檔案含有至少一個彩製圖。在申請且支付必要費用後，專利局將提供具有彩色圖式之本專利申請案之複本。將參考闡述利用本發明原理之說明性實施例及其附圖的以下詳細描述來獲得對本發明之特徵及優點的理解：

圖1顯示具有或不具有M6P之阿糖苷酶-α rhGAA之GAA活性。不具有M6P之rhGAA不能靶向溶酶體。然而，具有M6P之rhGAA靶向溶酶體。圖1顯示能夠與CI-MPR結合之市售ERT之比例。第一峰為缺乏任何含有M6P之聚糖且因此不能加以吸收且遞送至溶酶體的rhGAA。第二峰為含有至少一個磷酸化聚糖且具有由細胞吸收且遞送至溶酶體以進行肝醣水解潛能的部分。

圖2顯示包括IGF2之不同結合域及單磷酸化或雙磷酸化寡醣之CI-MPR的結構。

圖3顯示IGF2肽(SEQ ID NO: 1) (組A)之序列及結構。提出影響其他受體之結合的位點特異性胺基酸取代(SEQ ID NO: 2-9) (組B)。

圖4顯示野生型IGF2 (wtIGF2)肽對於CI-MPR之結合動力學，如藉由表面電漿子共振所量測。

圖5顯示與CI-MPR結合之變體IGF2 (vIGF2)肽的結合，如藉由表面電漿子共振所量測。

圖6顯示將vIGF2結合基元添加至阿糖苷酶α增加與IGF2/M6P受體結合的益處。

圖7顯示添加vIGF2/CI-MPR結合基元對於vIGF2-ERT-C融合蛋白之結合及酶活性的益處。

圖8顯示野生型IGF2與胰島素受體之結合。

圖9顯示vIGF2肽與胰島素受體之缺乏/降低的結合。

圖10顯示野生型IGF2與胰島素樣生長因子1受體之結合。

圖11顯示vIGF2肽與胰島素樣生長因子1受體之缺乏/降低的結合。

圖12顯示編碼用於基因治療之天然hGAA或vIGF2-GAA (「工程改造

hGAA」)融合蛋白之哺乳動物表現盒的兩個實例。天然hGAA具有不佳磷酸化，導致不佳CIMPR結合及細胞吸收。工程改造hGAA具有添加用於改良的CIMPR結合的元件(vIGF2)、降低vIGF2-GAA蛋白與CIMPR之空間位阻的2GS連接子及用於改良分泌的BiP。

圖13顯示來自表現PPT1及PPT1融合蛋白之細胞之PPT1的西方墨點。

圖14顯示PPT1構築體與CI-MPR之結合。

圖15顯示在表現工程改造或天然hGAA之CHO細胞之條件培養基中的GAA活性。

圖16顯示用於小鼠研究中之包括工程改造或天然hGAA的基因治療構築體。

圖17顯示在GAA基因剔除小鼠中之4週基因治療小鼠研究的研究設計。

圖18顯示如所指示未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠中之GAA血漿活性。

圖19顯示如所指示未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠中量測之GAA水準。

圖20顯示如所指示來自獲自經處理小鼠之血漿樣本之rhGAA的細胞表面受體結合。

圖21顯示如所指示未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之脛前的GAA活性及肝醣病理組織學得分。

圖22顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑

處理之GAA基因剔除小鼠之脛前的肝醣PAS。

圖23顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之脛前的hGAA免疫組織化學。

圖24顯示如所指示來自未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之大腦的GAA活性。

圖25顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之大腦的肝醣PAS。

圖26顯示如所指示來自未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之腦幹及脈絡叢的hGAA免疫組織化學。

圖27顯示如所指示來自未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之脊髓肝醣病理組織學計分。

圖28顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之脊髓的肝醣PAS。

圖29顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之脊髓的hGAA免疫組織化學。

圖30顯示如所指示來自未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之四頭肌GAA活性及肝醣病理組織學計分。

圖31顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之四頭肌的肝醣luxol/PAS。

圖32顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之四頭肌的hGAA免疫組織化學。

圖33顯示如所指示來自未處理野生型(「正常」)小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之三頭肌GAA活性及病理組織學計分。

圖34顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之三頭肌的肝醣luxol/PAS。

圖35顯示如所指示來自未處理野生型小鼠或用基因治療載體或媒劑處理之GAA基因剔除小鼠之三頭肌的hGAA免疫組織化學。

圖36顯示配送治療蛋白之物理及生物學障壁之說明。

【實施方式】

交叉參考

【0048】 本申請案主張2018年4月30日提交之美國臨時申請案第62/664,741號、2018年6月22日提交之美國臨時申請案第62/688,640號及2018年10月10日提交之美國臨時申請案第62/744,068號之權益，該等申請案之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0049】 單一基因遺傳病症之基因治療呈現對於疾病及病症的可能單次治療，該等疾病及病症中之一些具有可能在生命早期出現且有時引起長期能力喪失的破壞性症狀。神經遺傳病症，諸如溶酶體貯積病，通常用酶置換治療治療，其向患者投與在疾病或病症狀態中缺陷或缺乏之活性蛋白質形式的治療蛋白。然而，目前療法存在難題，包括頻繁治療、發展對於治療蛋白之免疫反應及難以將治療蛋白靶向感染組織、細胞或亞細胞區室。基因治療提供包括降低治療次數及持久功效的優點。

【0050】 本文提供用於基因治療載體之組分，該等基因治療載體為基因治療提供改良，諸如在需要之地方提供更多治療蛋白，因此改良治療

功效。藉由改良治療蛋白之表現及細胞吸收或遞送及胞內或亞細胞靶向，本文解決此類難題。本文提供之特定工具或組分包括(但不限於)：用於增加分泌之信號肽(例如，結合免疫球蛋白蛋白(BiP)及Gaussia信號肽)；及增加治療蛋白之內吞作用之肽(例如，以高親和力與CI-MPR結合之肽，以增加細胞吸收及溶酶體遞送)。此類肽與由基因治療載體編碼之治療蛋白融合。在一些實施例中，肽為IGF2 (胰島素樣生長因子2)肽或其變體。在一些實施例中，預期本文提供之基因治療載體包含編碼治療蛋白之核酸，該治療蛋白與以高親和力同CI-MPR結合之肽融合以最佳化基因治療的功效。

【0051】 設計用於酶置換治療之基因治療構築體。轉譯起始序列包括(但不限於)位於構築體之5'端處之Kozak序列或IRES序列，諸如CrPV IRES；隨後編碼GAA信號肽中之一或多者之信號肽的核酸；編碼抗胰蛋白酶抑制劑的核酸；及編碼BiP序列的核酸。在此等之後為編碼細胞靶向域之核酸，該細胞靶向域可為vIGF-2、HIRMab或TfRMab或其他細胞靶向肽或蛋白質。編碼將細胞靶向域與校正性酶連接之連接子之核酸。適合的校正性酶包括(但不限於)α-葡糖苷酶(GAA)、α-半乳糖苷酶(GLA)、艾杜糖醛酸酶(IDUA)、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)、PPT1及發現在個體中缺乏之其他酶。

治療蛋白之胞內靶向

【0052】 大多數溶酶體蛋白質之N-連接碳水化合物經修飾以含有稱為甘露糖6-磷酸(M6P)之特定碳水化合物結構。M6P為使得能夠經由膜結合M6P受體將溶酶體蛋白轉運至溶酶體之生物學信號。溶酶體貯積病之酶置換治療使用M6P受體以用於將治療蛋白吸收及遞送至溶酶體。某些療法

並不使用M6P受體，包括Cerezyme®及其他重組人類GCase形式，使用能夠結合蛋白質聚糖上之末端甘露糖且遞送至溶酶體之甘露糖受體。某些酶置換治療面臨之問題為：少量的M6P存在於酶治療劑上，而其需要較高劑量來達到治療功效。此引起實質上較長的輸注時間、較高之發展對於治療劑之免疫反應的機率及較高的藥物需求，從而需要增加的蛋白質製造，導致成本增加。

【0053】 CI-MPR自循環捕獲含M6P之溶酶體酶。受體具有針對M6P及胰島素樣生長因子之不同的結合域(域1-3及7-9，參見圖2)，且因此亦稱為IGF2/甘露糖-6-磷酸受體或IGF2/CI-MPR。可使用此受體來靶向含M6P或IGF2或IGF2變體之酶置換治療。此受體針對此等配體(包括胰島素樣生長因子)之結合親和力提供於表1中。值得注意的是，IGF2肽針對CI-MPR比單磷酸化或雙磷酸化寡醣具有更高結合親和力。

表1：CI-MPR之配體

配體	**結合親和力(表觀Kd；nM)**
IGF2	0.03-0.2
[Leu27]IGF2	0.05
雙-M6P	2
β-半乳糖苷酶	20
五甘露糖-M6P	6,000
游離M6P	7,000

用於基因治療之治療性融合蛋白

【0054】 本文提供由基因治療載體產生之治療性融合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白由用編碼融合蛋白之基因治療載體轉導的細胞分泌。在一些實施例中，經轉導的細胞係在組織或器官(例如，肝)內。一旦自細胞分泌，融合蛋白經由患者之血管系統轉運且到達相關組織。在一些實施例中，治療性融合蛋白經工程改造以具有改良的分泌。在一些實施例中，融合蛋白包含用於相較於對應治療蛋白或包含治療蛋白但缺乏信號肽之融

合蛋白改良分泌水準的信號肽。舉例而言，PPT1之融合蛋白(「PPT1-2」)為PPT1與不具有信號序列(BiP)之變體IGF2的融合蛋白，且當相較於另一融合蛋白(「PPT1-30」) (一種PPT1與具有BiP信號序列之變體IGF2的融合蛋白)時，具有低許多的分泌水準。在此實例中，PPT1-2及PPT1-30為各自包含不同變體IGF2肽之融合蛋白。因此，使用本文提供之信號序列之優點在於其可補償工程改造治療蛋白或融合蛋白之減弱的分泌水準。

【0055】 如本文所用，「分泌」係指自細胞將蛋白質釋放至例如待運載至相關組織或治療蛋白作用部位之血流中。當基因治療產物分泌於器官之間隙空間中時，分泌可允許鄰近細胞之交叉校正。

【0056】 如本文所用，「遞送」意謂藥物遞送。在一些實施例中，遞送過程意謂自細胞外部(例如，血液、組織或間隙空間)將藥物物質(例如，由基因治療載體產生之治療蛋白或融合蛋白)轉運至藥物物質之治療活性的靶細胞中。

【0057】 如本文所用，「工程改造」或「蛋白質工程改造」係指藉由提供編碼蛋白質之適當核酸序列操縱蛋白質的結構以便產生所需特性或具有特定結構之蛋白質的合成。

【0058】 在一些實施例中，所提供基因治療載體經工程改造以解決伴隨基因治療關於遞送治療蛋白之問題。舉例而言，在一些情況下，藉由僅僅在患者體內產生足夠量之治療蛋白，若歸因於例如妨礙配送治療蛋白至有需要之位點之物理及/或生物學障壁，不充分量的治療蛋白遞送至需要治療蛋白的細胞中，則基因治療可能不會達成預期治療。因此，即使基因治療能夠用高濃度之治療蛋白浸沒血液或組織至飽和點，但基因治療可

能不為充分治療性的。另外，非產生性清除路徑可移除絕大部分的治療蛋白。即使在血管外將治療蛋白轉運至組織(例如，肌纖維)內之間隙空間，但不能保證充足的治療效果(參見**圖36**)。為了有效治療溶酶體貯積病，治療有效量之治療蛋白必須經歷細胞內吞作用及溶酶體遞送以產生有意義的功效。本發明藉由提供編碼融合蛋白之基因治療載體解決此等問題，該等融合蛋白包含使得能夠將治療蛋白內吞至治療靶細胞中，從而產生有效治療的肽。在一些實施例中，使得能夠進行內吞作用之肽為結合CI-MPR之肽。在一些實施例中，結合CI-MPR之肽為IGF2肽或其變體。

【0059】 本文提供編碼融合蛋白之基因治療載體，該等融合蛋白包含使得能夠將治療蛋白內吞至治療靶細胞中之肽。在一些實施例中，基因治療載體編碼包含治療蛋白及結合CI-MPR之肽之融合蛋白。此類融合蛋白當由基因治療載體表現時，將治療蛋白(諸如酶置換治療)靶向至需要其之細胞，增加至此類細胞中之遞送或由此類細胞之細胞吸收，且將治療蛋白靶向至亞細胞位置(例如，溶酶體)。在一些實施例中，肽為IGF2肽或其變體，其可將治療蛋白靶向至溶酶體。此外，在一些實施例中，本文中之融合蛋白進一步包含增加分泌之信號肽，諸如BiP信號肽或Gaussia信號肽。在一些實施例中，融合蛋白包含連接子序列。在一些實施例中，編碼本文中之融合蛋白之核酸包含內部核糖體進入序列。

【0060】 本文提供基因之治療蛋白，其包含vIGF2肽。例示性融合蛋白提供於下表2中。

表2：胺基酸序列		**SEQ ID NO**
天然hGAA	MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPV LEETHPAHQQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAP DKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLEN LSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPAN RRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTV	22

	APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLA PTPGANLYGSHPFYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSW RSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRW GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGF RDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFI TNETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDG MWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASS HQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGR YAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNT SEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKAL TLRYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLW GEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAP REPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPM ALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVN ELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTK VLDICVSLLMGEQFLVSWC	
工程改造hGAA (BiP-vIGF2-GAA)	MKLSLVAAMLLLLSAARASRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPAS RVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGGSGGGGSRPG PRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYI PAKQGLQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPT FFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPS PLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQ YITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALE DGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKS VVQQYLDVVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRA HFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRY MMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGST AFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGL TEAIASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQ LASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPF MRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAH VAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEV TGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAP LDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELF WDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKV TVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSW C	23
wt-PPT1	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLDPPAPLPLVIWHGMGDSCC NPLSMGAIKKMVEKKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVT TVCQALAKDPKLQQGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISV GGQHQGVFGLPRCPGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEY WHDPIKEDVYRNHSIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFL NDSIVDPVDSEWFGFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNA GQLVFLATEGDHLQLSEEWFYAHIIPFLG	24
PPT1-2	MASPGCLWLLAVALLPWTCASRALQHLSRTLCGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGG SGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVE KKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQ QGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQGVFGLPRC PGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNH	25

	SIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWF GFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHL QLSEEWFYAHIIPFLG	
PPT1-29 **(BiP2aa-vIGF2-PPT1)**	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLSAARAAASRTLCGGELVDTLQFVCGD RGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSEGGGG SGGGGSRPRAVPTQDPPAPLPLVIWHGMGDSCCNPLSMGAIKKMVE KKIPGIYVLSLEIGKTLMEDVENSFFLNVNSQVTTVCQALAKDPKLQ QGYNAMGFSQGGQFLRAVAQRCPSPPMINLISVGGQHQGVFGLPRC PGESSHICDFIRKTLNAGAYSKVVQERLVQAEYWHDPIKEDVYRNH SIFLADINQERGINESYKKNLMALKKFVMVKFLNDSIVDPVDSEWF GFYRSGQAKETIPLQETSLYTQDRLGLKEMDNAGQLVFLATEGDHL QLSEEWFYAHIIPFLG	26

【0061】 本文提供之融合蛋白之組分在下文進一步描述。

結合CI-MPR之肽(例如，vIGF2肽)

【0062】 本文提供結合CI-MPR之肽。包含此類肽及治療蛋白之融合蛋白當由基因治療載體表現時，將治療蛋白靶向至需要其之細胞，增加由此類細胞之細胞吸收，且將治療蛋白靶向至亞細胞位置(例如，溶酶體)。在一些實施例中，肽與治療性肽之N端融合。在一些實施例中，肽與治療蛋白之C端融合。在一些實施例中，肽為IGF2肽或其變體。本文中之IGF2肽具有**圖3**中例示之結構。一些vIGF2肽維持與CI-MPR之高親和力結合，而其針對IGF1受體、胰島素受體及IGF結合蛋白(IGFBP)之親和力降低或消除。因此，相較於wt IGF2，一些變體IGF2肽實質上更具選擇性且具有降低的安全性風險。本文中之vIGF2肽包括具有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之彼等肽。變體IGF2肽進一步包括在位置6、26、27、43、48、49、50、54、55或65處相較於wt IGF2 (SEQ ID NO: 1)具有變體胺基酸的彼等肽。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有來自由以下組成之群之一或多個取代的序列：E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R及K65R。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有E6R取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有F26S取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有Y27L取代之序列。在一些實施例中，vIGF2

肽具有帶有V43L取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有F48T取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有R49S取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有S50I取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有A54R取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有L55R取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有K65R取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有帶有E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R及L55R取代之序列。在一些實施例中，vIGF2肽具有N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有一個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有兩個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有三個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有四個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有四個胺基酸之N端缺失及E6R、Y27L與K65R取代。在一些實施例中，vIGF2肽具有四個胺基酸之N端缺失及E6R與Y27L取代。在一些實施例中，vIGF2肽具有五個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有六個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有七個胺基酸之N端缺失。在一些實施例中，vIGF2肽具有七個胺基酸之N端缺失及Y27L與K65R取代。

表3：IGF2胺基酸序列(變體殘基為加底線的)

肽	**序列**	**SEQ ID NO**
野生型	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	1
F26S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGSYFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	2
Y27L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	3
V43L	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPASRVSRRSRGILEECCFRSCDLALLETYCATPAK	4

	SE	
F48T	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCTRSCDLALLETYCATPAK SE	5
R49S	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFSSCDLALLETYCATPAK SE	6
S50I	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRICDLALLETYCATPAK SE	7
A54R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLRLLETYCATPAK SE	8
L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLARLETYCATPAK SE	9
F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGSLFSRPA SRVSRRSRGILEECCTSICDLRRLETYCATPAK SE	10
Δ1-6、Y27L、K65R	TLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRR SRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	11
Δ1-7、Y27L、K65R	LCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRS RGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	30
Δ1-4、E6R、Y27L、K65R	SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE	31
Δ1-4、E6R、Y27L	SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVS RRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAKSE	34
E6R	AYRPSRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPA SRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPAK SE	35

表4：IGF2 DNA編碼序列		
肽	**DNA序列**	**SEQ ID NO**
成熟WT IGF2	GCTTACCGCCCCAGTGAGACCCTGTGCGGC GGGGAGCTGGTGGACACCCTCCAGTTCGTC TGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGG CCCGCAAGCCGTGTGAGCCGTCGCAGCCGT GGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGC TGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGT GCTACCCCCGCCAAGTCCGAG	46
vIGF2 Δ1-4、E6R、Y27L、K65R	TCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGC GGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCCAGAG TTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGG AGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCT	36

	CCTCGAGACCTATT	
	GCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAA	

內部核糖體進入序列

【0063】 本文提供適用於治療病症之基因治療構築體，其進一步包含用於藉由繞過轉譯起始之瓶頸而增加基因表現之內部核糖體進入序列(IRES)。基因治療之用於最佳化表現之適合的內部核糖體進入序列包括(但不限於)蟋蟀麻痺病毒(cricket paralysis virus；CrPV) IRES、小核糖核酸病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、卡堡氏肉瘤相關疱疹病毒IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、瘟病毒IRES、蟋蟀麻痺病毒(Cripavirus) IRES、禾谷縊管蚜病毒IRES、梅雷克氏病病毒IRES及其他適合的IRES序列。在一些實施例中，基因治療構築體包含CrPV IRES。在一些實施例中，CrPV IRES具有AAAAATGTGATCTTGCTTGTAAATACAATTTTGAGAGGTTAATAAATTACAAGTAGTGCTATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCAGGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTGCT (SEQ ID NO: 12)之核酸序列。在一些實施例中，CrPV IRES序列與SEQ ID NO: 12至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

【0064】 蟋蟀麻痺病毒(CrPV) IRES有助於蛋白質合成。

信號肽

【0065】 在一些實施例中，本文提供之基因治療構築體進一步包含信號肽，該信號肽改良自用基因治療構築體轉導之細胞分泌治療蛋白。在一些實施例中，信號肽改良治療蛋白之蛋白質加工，且有助於初生多肽-

核糖體複合物易位至ER，且確保恰當共轉譯及轉譯後修飾。在一些實施例中，信號肽位於(i)信號轉譯起始序列之上游位置，(ii)轉譯起始序列與治療蛋白之間，或(iii)治療蛋白之下游位置。適用於基因治療構築體之信號肽包括(但不限於)來自HSP70蛋白家族(例如，HSPA5，熱休克蛋白家族A成員5)之結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽，以及其變體。此等信號肽對於信號識別粒子具有超高親和力。BiP及Gaussia胺基酸序列之實例提供於中於下表5。在一些實施例中，信號肽具有與選自由SEQ ID No: 13-17組成之群之序列至少90%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與選自由SEQ ID No: 13-17組成之群之序列相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。

表5：信號肽序列

信號肽	**胺基酸序列**	**SEQ ID NO:**
原生人類BiP	MKLSLVAAMLLLLSAARA	13
經修飾之BiP-1	MKLSLVAAMLLLLSLVAAMLLLLSAARA	14
經修飾之BiP-2	MKLSLVAAMLLLLWVALLLLSAARA	15
經修飾之BiP-3	MKLSLVAAMLLLLSLVALLLLSAARA	16
經修飾之BiP-4	MKLSLVAAMLLLLALVALLLLSAARA	17
Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA	32

【0066】 BiP信號肽-信號識別粒子(SRP)相互作用有助於易位至ER。此相互作用在**圖20**中說明。

【0067】 Gaussia信號肽來源於*Gaussia princeps*螢光素酶，且引導與此信號肽融合之治療蛋白之蛋白質合成及分泌增加。在一些實施例中，Gaussia信號肽具有與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽與SEQ ID NO: 32相差5個或更少、4個或更少、3個或更少、2個或更少或1個胺基酸。

連接子

【0068】 在一些實施例中，本文提供之基因治療構築體包含在(i)

vIGF2肽與治療蛋白之間的連接子。在一些實施例中，此類連接子維持恰當間距，且減少vIGF2肽與治療蛋白之間的空間對撞。在一些實施例中，連接子包含重複甘胺酸殘基、重複甘胺酸-絲胺酸殘基，及其組合。在一些實施例中，連接子由5-20個胺基酸、5-15個胺基酸、5-10個胺基酸、8-12個胺基酸、或約5、6、7、8、9、10、11、12或13個胺基酸組成。本文中之基因治療構築體之適合的連接子包括(但不限於)下表6中提供的彼等。

表6：連接序列	
序列	SEQ ID NO:
GGGGSGGGG	18
GGGGS	19
GGGSGGGGS	20
GGGGSGGGS	21
GGSGSGSTS	33
GGGGSGGGGS	37

轉譯起始序列

【0069】 本文提供之基因治療構築體包含具有轉譯起始序列(諸如Kozak序列，其有助於起始mRNA之轉譯)之核酸。本文中涵蓋之Kozak序列具有gccRccAUGG (SEQ ID NO: 27)之共同序列，其中小寫字母表示在該位置處之最常見鹼基且鹼基變化，大寫字母指示僅極少變化的高度保守鹼基。R指示在彼位置處始終觀測到之嘌呤((腺嘌呤或鳥嘌呤)。圓括號中之序列(gcc)具有不明意義。在一些實施例中，Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。在一些實施例中，X_1包含A。在一些實施例中，X_2包含G。在一些實施例中，Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，本文提供之Kozak序列具有

AAGATGA (SEQ ID NO: 29)之序列。在一些實施例中，Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少85%一致之核酸序列。在一些實施例中，Kozak序列與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)之序列相差一個或兩個核苷酸。在一些實施例中，Kozak序列包含GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)。

治療蛋白

【0070】 本文提供之基因治療構築體包含編碼治療蛋白之核酸，該治療蛋白係用於治療因個體中之遺傳缺陷造成不存在或缺陷蛋白質所致的遺傳病症。從基因治療構築體所表現之治療蛋白來置換不存在或缺陷蛋白質。因此，基於個體中需要治療之遺傳缺陷，選擇治療蛋白。在一些實施例中，治療蛋白為結構蛋白。在一些實施例中，治療蛋白為酶。在一些實施例中，治療蛋白為調節蛋白。在一些實施例中，治療蛋白為受體。在一些實施例中，治療蛋白為肽激素。在一些實施例中，治療蛋白為細胞介素或趨化細胞素。

【0071】 在一些實施例中，本文中之基因治療構築體可編碼酶，諸如在患有溶酶體貯積病之個體中具有遺傳缺陷之酶。在一些實施例中，基因治療構築體編碼溶酶體酶，諸如糖苷酶、蛋白酶或硫酸酯酶。在一些實施例中，由本文提供之基因治療構築體編碼之酶包括(但不限於)：α-D-甘露糖苷酶；N-天冬胺醯基-β-胺基葡糖苷酶；β-半乳糖苷酶；神經醯胺酶；岩藻糖苷酶；半乳糖腦苷脂酶；芳基硫酸酯酶A；N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶；艾杜糖醛酸硫酸酯酶；N-乙醯基胺基葡萄糖苷酶；乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷乙醯基轉移酶；N-乙醯葡萄糖胺6-硫酸酯酶；β-葡糖醛酸酶；玻尿酸酶；唾液酸酶；硫酸酯酶；神經磷脂酶；酸性β-甘露糖苷

酶；組織蛋白酶K；3-己糖苷酶A；β-己糖苷酶B；α-N-乙醯基半乳糖胺酶；sialin；己糖苷酶A；β-葡糖苷酶；α-艾杜糖醛酸酶；α-半乳糖苷酶A；β-葡糖腦苷脂酶；溶酶體酸性脂肪酶；葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶；艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶；N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶；葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶；α-葡糖苷酶；乙醯肝素硫酸醯胺酶；NADPH氧化酶之gp-91次單元；腺苷脫胺酶；細胞週期素依賴性激酶樣5；及軟脂醯基蛋白質硫酯酶1。在一些實施例中，由本文提供之基因治療構築體編碼之酶包含α-葡糖苷酶。在一些實施例中，治療蛋白與選自由以下組成之群之遺傳病症相關聯：CDKL5缺乏症、囊腫性纖維化、α-地中海型貧血及β-地中海型貧血、鐮狀細胞貧血、馬凡氏症候群、X脆折症候群、亨廷頓氏病、血色沉著病、先天性耳聾(非綜合型)、塔伊-薩克斯病、家族性高膽固醇血症、杜興氏肌肉失養症、斯特格氏病、尤塞氏症候群、無脈絡膜症、色盲、X性聯視網膜劈裂症、血友病、韋-奧氏症候群、X性聯慢性肉芽腫病、芳族L-胺基酸去羧酶缺乏症、隱性營養不良大皰性表皮鬆懈、α1抗胰蛋白酶缺乏症、哈-吉氏早老症症候群(HGPS)、努南氏症候群、X性聯嚴重合併性免疫缺失(X-SCID)。在一些實施例中，治療蛋白係選自由以下組成之群：CDKL5、連接蛋白26、己糖苷酶A、LDL受體、肌縮蛋白、CFTR、β-球蛋白、HFE、亨廷頓氏、ABCA4、肌凝蛋白VIIA (MYO7A)、Rab護航蛋白-1 (REP1)、環狀核苷酸閘控通道β3 (CNGB3)、視網膜劈裂素1 (RS1)、血紅素次單元β (HBB)、因子IX、WAS、細胞色素B-245 β鏈、多巴去羧酶(DDC)、VII型膠原蛋白α1鏈(COL7A1)、絲胺酸蛋白酶抑因子家族A成員1 (SERPINA1)、LMNA、PTPN11、SOS1、RAF1、KRAS及IL2受體γ基因。

【0072】 *基因治療載體實例*

基因治療載體及組合物

【0073】 本文提供基因治療載體，其中插入編碼治療性融合蛋白，諸如vIGF2融合體或信號肽融合體，視情況具有內部核糖體進入序列的核酸，諸如DNA。來源於反轉錄病毒(諸如慢病毒)之載體為達成長期基因轉移之適合工具，此係因為其允許長期穩定整合轉殖基因及其在子細胞中之傳播。慢病毒及腺相關病毒載體具有優於衍生於致癌反轉錄病毒之載體的額外優點，該等致癌反轉錄病毒諸如鼠類白血病病毒，其中其能夠轉導非增生細胞，諸如肝細胞及神經元。其亦具有低免疫原性之額外優點。

【0074】 本文中之例示性基因治療載體編碼治療蛋白及包含vIGF2肽之治療性融合蛋白。編碼例示性融合蛋白胺基酸序列之核酸提供於下表7中。

表7：DNA序列

構築體	**DNA序列**	**SEQ ID NO**
Kozak-hGAA (天然GAA)	GCAAGATGGGAGTGAGGCACCCGCCCTGCTCCCACCGGCTCCTG GCCGTCTGCGCCCTCGTGTCCTTGGCAACCGCTGCACTCCTGGGG CACATCCTACTCCATGATTTCCTGCTGGTTCCCCGAGAGCTGAGTG GCTCCTCCCCAGTCCTGGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCAG GGAGCCAGTAGACCAGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACACCCCGG CCGTCCCAGAGCAGTGCCCACACAGTGCGACGTCCCCCCCAACA GCCGCTTCGATTGCGCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGT GCGAGGCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTG CAGGGAGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACCCAG CTACCCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATGGG CTACACGGCCACCCTGACCCGTACCACCCCCACCTTCTTCCCCAA GGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGA ACCGCCTCCACTTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCGCTACG AGGTGCCCTTGGAGACCCCGCATGTCCACAGCCGGGCACCGTCC CCACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATC GTGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGT GGCGCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACCTC GCTGCCCTCGCAGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCTCAGTCC CCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCCTGTGGAACC GGGACCTTGCGCCCACGCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCACC CTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGTG	45

	TTCCTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCCGAGC CCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTAC ATCTTCCTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCT GGACGTTGTGGGATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGG CTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCACCCG CCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGACG TCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGGACTTC ACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATGGTGCAG GAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGATCCT GCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGCCCTACGA CGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTCATCACCAACGAGACCGGCC AGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCACTGCCTTCCCCG ACTTCACCAACCCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTG GCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGGATTGAC ATGAACGAGCCTTCCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGACGGCTGC CCCAACAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGTGCCTGGGGTGGT TGGGGGGACCCTCCAGGCGGCCACCATCTGTGCCTCCAGCCACC AGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACCTCTACGGCCTGA CCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTGAAGGCTCGGGGG ACACGCCCATTTGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGCTGGCCACGGC CGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTGGAGCTCCTGGGA GCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTAACCTGCT GGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCTTCCTGGGCA ACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAGCTGGGGGCC TTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCCTGCTCAGTCTGCCC CAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGCCATGAG GAAGGCCCTCACCCTGCGCTACGCACTCCTCCCCCACCTCTACAC ACTGTTCCACCAGGCCCACGTCGCGGGGGAGACCGTGGCCCGGC CCCTCTTCCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGG ACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCATCACCCCAGTG CTCCAGGCCGGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCCCTTGGG CACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAGGCCCTTGGCA GCCTCCCACCCCCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCAGCCATCCACA GCGAGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCCTGGACACCATC AACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCT GGCCTCACAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGCCCTGGC TGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGGGAGCTTTTCT GGGACGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGGGCCTAC ACACAGGTCATCTTCCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATGAG CTGGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGCTGCAGAA GGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCAGCAGGTCCTCT CCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACTTCACCTACAGCCCCGACACCA AGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTC TCGTCAGCTGGTGTTAG	
Kozak BiP-vIGF2-GAA (「工程改造 hGAA」)	GCAAGATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCA GCGCGGCGCGGGCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTA GACACTCTTCAGTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCT CGCCCCGCTTCCAGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAG GAGTGTTGTTTCAGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTAT TGCGCGACGCCAGCCAGGTCCGAAGGGGGCGGTGGCTCAGGTGG TGGAGGTAGCAGACCAGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACACCCCG	38

	GCCGTCCCAGAGCAGTGCCCACACAGTGCGACGTCCCCCCCAAC AGCCGCTTCGATTGCGCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACA GTGCGAGGCCCGCGGCTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGC TGCAGGGAGCCCAGATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACCC AGCTACCCCAGCTACAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATG GGCTACACGGCCACCCTGACCCGTACCACCCCCACCTTCTTCCCC AAGGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGA GAACCGCCTCCACTTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCGCTA CGAGGTGCCCTTGGAGACCCCGCATGTCCACAGCCGGGCACCGT CCCCACTCTACAGCGTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGA TCGTGCGCCGGCAGCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACG GTGGCGCCCCTGTTCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACC TCGCTGCCCTCGCAGTATATCACNGGCCTCGCCGAGCACCTCAGT CCCCTGATGCTCAGCACCAGCTGGACCAGGATCACCCTGTGGAAC CGGGACCTTGCGCCCACGCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCAC CCTTTCTACCTGGCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGT GTTCCTGCTAAACAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCCGAG CCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTA CATCTTCCTGGGCCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCT GGACGTTGTGGGATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGG CTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCACCCG CCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGACG TCCAGTGGAACGACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGGACTTC ACGTTCAACAAGGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATGGTGCAG GAGCTGCACCAGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGATCCT GCCATCAGCAGCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGCCCTACGA CGAGGGTCTGCGGAGGGGGGTTTTCATCACCAACGAGACCGGCC AGCCGCTGATTGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCACTGCCTTCCCCG ACTTCACCAACCCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTG GCTGAGTTCCATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGGATTGAC ATGAACGAGCCTTCCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGACGGCTGC CCCAACAATGAGCTGGAGAACCCACCCTACGTGCCTGGGGTGGT TGGGGGGACCCTCCAGGCGGCCACCATCTGTGCCTCCAGCCACC AGTTTCTCTCCACACACTACAACCTGCACAACCTCTACGGCCTGA CCGAAGCCATCGCCTCCCACAGGGCGCTGGTGAAGGCTCGGGGG ACACGCCCATTTGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGCTGGCCACGGC CGATACGCCGGCCACTGGACGGGGGACGTGTGGAGCTCCTGGGA GCAGCTCGCCTCCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTAACCTGCT GGGGGTGCCTCTGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCTTCCTGGGCA ACACCTCAGAGGAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAGCTGGGGGCC TTCTACCCCTTCATGCGGAACCACAACAGCCTGCTCAGTCTGCCC CAGGAGCCGTACAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGCCATGAG GAAGGCCCTCACCCTGCGCTACGCACTCCTCCCCCACCTCTACAC ACTGTTCCACCAGGCCCACGTCGCGGGGGAGACCGTGGCCCGGC CCCTCTTCCTGGAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGG ACCACCAGCTCCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCATCACCCCAGTG CTCCAGGCCGGGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCCCTTGGG CACATGGTACGACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAGGCCCTTGGCA GCCTCCCACCCCCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCAGCCATCCACA GCGAGGGGCAGTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCCTGGACACCATC AACGTCCACCTCCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCT	

	GGCCTCACAACCACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGCCCTGGC TGTGGCCCTGACCAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGGGAGCTGTTCT GGGACGATGGAGAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGGGCCTAC ACACAGGTCATCTTCCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATGAG CTGGTACGTGTGACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGCTGCAGAA GGTGACTGTCCTGGGCGTGGCCACGGCGCCCCAGCAGGTCCTCT CCAACGGTGTCCCTGTCTCCAACTTCACCTACAGCCCCGACACCA AGGTCCTGGACATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTC TCGTCAGCTGGTGTTAG	
蟋蟀麻痺病毒IRES(加底線)-BiP-vIGF2-GAA	*AAAAATGTGATCTTGCTTGTAAATACAATTTTGAGAGGTTAATAAATTAC* *AAGTAGTGCTATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAG* *GATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCAGGAAGCCCTCTCTGCGGT* *TTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTGCT***ATG**AAG CTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGCGG GCCTCTAGAACACTGTGCGGAGGGGAGCTTGTAGACACTCTTCA GTTCGTGTGTGGAGATCGCGGGTTCCTCTTCTCTCGCCCCGCTTCC AGAGTTTCACGGAGGTCTAGGGGTATAGTAGAGGAGTGTTGTTTC AGGTCCTGTGACTTGGCGCTCCTCGAGACCTATTGCGCGACGCCA GCCAGGTCCGAAGGGGGCGGTGGCTCAGGTGGTGGAGGTAGCAG ACCAGGGCCCCGGGATGCCCAGGCACACCCCGGCCGTCCCAGAG CAGTGCCCACACAGTGCGACGTCCCCCCCAACAGCCGCTTCGATT GCGCCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTGCGAGGC***CCGC*** ***GG***CTGTTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTGCAGGGAGCCCA GATGGGGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCCACCCAGCTACCCCAGCTA CAAGCTGGAGAACCTGAGCTCCTCTGAAATGGGCTACACGGCCA CCCTGACCCGTACCACCCCCACCTTCTTCCCCAAGGACATCCTGA CCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACCGCCTCCAC TTCACGATCAAAGATCCAGCTAACAGGCGCTACGAGGTGCCCTTG GAGACCCCGCATGTCCACAGCCGGGCACCGTCCCCACTCTACAGC GTGGAGTTCTCCGAGGAGCCCTTCGGGGTGATCGTGCGCCGGCA GCTGGACGGCCGCGTGCTGCTGAACACGACGGTGGCGCCCCTGT TCTTTGCGGACCAGTTCCTTCAGCTGTCCACCTCGCTGCCCTCGC AGTATATCACAGGCCTCGCCGAGCACCTCAGTCCCCTGATGCTCA GCACCAGCTGGACCAGGATCACCCTGTGGAACCGGGACCTTGCG CCCACGCCCGGTGCGAACCTCTACGGGTCTCACCCTTTCTACCTG GCGCTGGAGGACGGCGGGTCGGCACACGGGGTGTTCCTGCTAAA CAGCAATGCCATGGATGTGGTCCTGCAGCCGAGCCCTGCCCTTAG CTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGG CCCAGAGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGG GATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGGCTTCCACCTGT GCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCACCCGCCAGGTGGTGG AGAACATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGACGTCCAGTGGAAC GACCTGGACTACATGGACTCCCGGAGGGACTTCACGTTCAACAA GGATGGCTTCCGGGACTTCCCGGCCATGGTGCAGGAGCTGCACC AGGGCGGCCGGCGCTACATGATGATCGTGGATCCTGCCATCAGCA GCTCGGGCCCTGCCGGGAGCTACAGGCCCTACGACGAGGGTCTG CGGAGGGGGGTTTTCATCACCAACGAGACCGGCCAGCCGCTGAT TGGGAAGGTATGGCCCGGGTCCACTGCCTTCCCCGACTTCACCAA CCCCACAGCCCTGGCCTGGTGGGAGGACATGGTGGCTGAGTTCC ATGACCAGGTGCCCTTCGACGGCATGTGGATTGACATGAACGAGC CTTCCAACTTCATCAGGGGCTCTGAGGACGGCTGCCCCAACAATG	39

	AGCTGGAGAACCCACCCTACGTGCCTGGGGTGGTTGGGGGGACC CTCCAGGCGGCCACCATCTGTGCCTCCAGCCACCAGTTTCTCTCC ACACACTACAACCTGCACAACCTCTACGGCCTGACCGAAGCCATC GCCTCCCACAGGGCGCTGGTGAAGGCTCGGGGGACACGCCCATT TGTGATCTCCCGCTCGACCTTTGCTGGCCACGGCCGATACGCCGG CCACTGGACGGGGGACGTGTGGAGCTCCTGGGAGCAGCTCGCCT CCTCCGTGCCAGAAATCCTGCAGTTTAACCTGCTGGGGGTGCCTC TGGTCGGGGCCGACGTCTGCGGCTTCCTGGGCAACACCTCAGAG GAGCTGTGTGTGCGCTGGACCCAGCTGGGGGCCTTCTACCCCTTC ATGCGGAACCACAACAGCCTGCTCAGTCTGCCCCAGGAGCCGTA CAGCTTCAGCGAGCCGGCCCAGCAGGCCATGAGGAAGGCCCTCA CCCTGCGCTACGCACTCCTCCCCCACCTCTACACACTGTTCCACC AGGCCCACGTCGCGGGGGAGACCGTGGCCCGGCCCCTCTTCCTG GAGTTCCCCAAGGACTCTAGCACCTGGACTGTGGACCACCAGCT CCTGTGGGGGGAGGCCCTGCTCATCACCCCAGTGCTCCAGGCCG GGAAGGCCGAAGTGACTGGCTACTTCCCCTTGGGCACATGGTACG ACCTGCAGACGGTGCCAGTAGAGGCCCTTGGCAGCCTCCCACCC CCACCTGCAGCTCCCCGTGAGCCAGCCATCCACAGCGAGGGGCA GTGGGTGACGCTGCCGGCCCCCCTGGACACCATCAACGTCCACCT CCGGGCTGGGTACATCATCCCCCTGCAGGGCCCTGGCCTCACAAC CACAGAGTCCCGCCAGCAGCCCATGGCCCTGGCTGTGGCCCTGA CCAAGGGTGGGGAGGCCCGAGGGGAGCTGTTCTGGGACGATGGA GAGAGCCTGGAAGTGCTGGAGCGAGGGGCCTACACACAGGTCAT CTTCCTGGCCAGGAATAACACGATCGTGAATGAGCTGGTACGTGT GACCAGTGAGGGAGCTGGCCTGCAGCTGCAGAAGGTGACTGTCC TGGGCGTGGCCACGGCGCCCCAGCAGGTCCTCTCCAACGGTGTC CCTGTCTCCAACTTCACCTACAGCCCCGACACCAAGGTCCTGGAC ATCTGTGTCTCGCTGTTGATGGGAGAGCAGTTTCTCGTCAGCTGG TGT**TAG**	
最佳化之 wt-PPT1 IDT密碼子	ATGGCATCACCGGGTTGCCTCTGGTTGTTGGCCGTTGCGTTGCTTC CGTGGACATGTGCATCAAGAGCTCTTCAACATCTGGATCCCCCAG CTCCCCTGCCGCTCGTAATCTGGCACGGGATGGGGGATTCATGTT GTAACCCGTTGTCAATGGGCGCGATAAAAAAGATGGTTGAAAAG AAGATTCCAGGCATCTACGTTCTGTCCCTGGAAATCGGTAAGACA CTGATGGAAGACGTGGAGAACTCCTTCTTTCTCAACGTCAATAGT CAGGTCACTACCGTCTGTCAAGCATTGGCAAAGGACCCTAAACTT CAGCAGGGGTACAATGCGATGGGGTTTAGCCAGGGCGGACAGTT TCTTAGAGCCGTCGCACAGCGCTGTCCATCTCCCCCGATGATTAAC CTTATATCTGTCGGGGGACAACACCAGGGTGTTTTTGGTCTTCCTC GCTGTCCTGGTGAAAGCTCCCACATCTGTGATTTCATACGCAAAA CGTTGAACGCAGGAGCTTATAGTAAAGTCGTCCAAGAACGGCTTG TTCAAGCGGAGTATTGGCATGACCCAATAAAAGAAGACGTTTATA GGAATCACTCTATCTTCTTGGCCGATATCAACCAAGAACGCGGAA TCAACGAAAGCTACAAAAAGAATCTTATGGCTCTCAAGAAATTTG TTATGGTGAAATTCCTTAATGACTCTATAGTAGATCCTGTCGATTCA GAATGGTTCGGGTTCTACAGGTCTGGCCAGGCGAAGGAGACTATT CCCCTCCAAGAAACGTCTCTCTATACACAAGACAGACTCGGACTG AAAGAGATGGATAATGCGGGCCAGTTGGTCTTCTTGGCTACGGAA GGCGATCATCTCCAACTCTCCGAAGAGTGGTTCTATGCCCATATAA TCCCGTTCCTGGGCTAA	40

PPT1-2 (wt-vIGF2-PPT1；由IDT密碼子最佳化工具最佳化之密碼子)	ATGGCATCCCCCGGATGTTTGTGGCTGCTGGCGGTTGCGCTTCTG CCATGGACGTGCGCCTCCCGAGCCCTCCAACACCTGTCCAGGAC ACTTTGCGGCGGAGAGTTGGTCGATACGCTTCAATTCGTGTGTGG GGATAGAGGCTTCCTTTTTTCTCGGCCCGCTAGCCGCGTGTCCCG AAGGTCCCGGGGTATCGTTGAGGAATGCTGTTTCCGGTCCTGCGA TCTTGCACTGTTGGAGACATACTGTGCTACGCCTGCGAGAAGCGA GGGTGGAGGGGGTTCTGGAGGTGGAGGGAGCCGGCCTCGGGCG GTTCCCACCCAGGATCCTCCAGCTCCTCTGCCTCTGGTCATCTGGC ATGGGATGGGGGACTCATGTTGTAACCCGCTGAGTATGGGGGCAA TTAAAAAAATGGTTGAAAAGAAAATTCCAGGTATTTATGTCCTCTC TCTTGAAATCGGTAAGACACTTATGGAGGATGTGGAAAACTCCTT TTTCCTTAATGTCAATTCTCAGGTCACAACAGTTTGTCAGGCTCTG GCGAAGGATCCTAAGCTGCAGCAAGGCTACAACGCCATGGGTTTT TCCCAGGGAGGCCAATTTCTCAGAGCGGTAGCTCAGCGATGTCCA TCACCACCGATGATAAATCTGATCAGTGTCGGCGGACAACACCAG GGAGTTTTCGGGCTGCCCAGGTGTCCGGGGGAATCTAGTCACATA TGTGACTTCATTCGCAAGACCCTTAACGCCGGCGCTTACTCAAAG GTGGTTCAAGAACGGCTTGTGCAGGCTGAATACTGGCACGATCCC ATCAAGGAAGATGTATATAGGAACCACAGTATCTTTCTGGCAGACA TAAATCAGGAAAGGGGTATTAACGAAAGCTACAAGAAAAATCTCA TGGCCCTGAAGAAATTTGTAATGGTTAAGTTTTTGAACGATTCTAT AGTAGATCCTGTTGACTCCGAGTGGTTCGGGTTCTATCGATCTGGT CAAGCCAAGGAGACGATTCCGCTTCAGGAAACTTCACTGTACAC ACAGGATCGGCTGGGACTCAAGGAGATGGACAATGCGGGCCAGT TGGTGTTTCTGGCTACAGAGGGAGACCATCTCCAGTTGAGTGAAG AATGGTTCTATGCACATATTATCCCATTCCTCGGCTAA	41
PPT1-29 (BiP2aa-vIGF2-PPT1；原生人類序列)	ATGAAGCTCTCCCTGGTGGCCGCGATGCTGCTGCTGCTCTGGGTG GCACTGCTGCTGCTCAGCGCGGCGAGGGCCGCCGCGAGTCGCAC GTTGTGTGGAGGTGAACTCGTCGACACCCTTCAGTTCGTATGTGG AGATCGCGGTTTCCTCTTCTCACGCCCAGCTTCCAGAGTTTCCCG AAGATCACGAGGAATAGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGGTCTTGTGA TCTGGCTCTCCTCGAGACTTATTGTGCTACGCCGGCCCGCTCTGA AGGAGGTGGTGGCAGTGGAGGAGGAGGGAGTCGGCCTAGGGCA GTCCCAACCCAGGACCCGCCGGCGCCGCTGCCGTTGGTGATCTG GCATGGGATGGGAGACAGCTGTTGCAATCCCTTAAGCATGGGTGC TATTAAAAAAATGGTGGAGAAGAAAATACCTGGAATTTACGTCTTA TCTTTAGAGATTGGGAAGACCCTGATGGAGGACGTGGAGAACAG CTTCTTCTTGAATGTCAATTCCCAAGTAACAACAGTGTGTCAGGC ACTTGCTAAGGATCCTAAATTGCAGCAAGGCTACAATGCTATGGG ATTCTCCCAGGGAGGCCAATTTCTGAGGGCAGTGGCTCAGAGATG CCCTTCACCTCCCATGATCAATCTGATCTCGGTTGGGGGACAACAT CAAGGTGTTTTTGGACTCCCTCGATGCCCAGGAGAGAGCTCTCAC ATCTGTGACTTCATCCGAAAAACACTGAATGCTGGGGCGTACTCC AAAGTTGTTCAGGAACGCCTCGTGCAAGCCGAATACTGGCATGAC CCCATAAAGGAGGATGTGTATCGCAACCACAGCATCTTCTTGGCA GATATAAATCAGGAGCGGGGTATCAATGAGTCCTACAAGAAAAAC CTGATGGCCCTGAAGAAGTTTGTGATGGTGAAATTCCTCAATGAT TCCATTGTGGACCCTGTAGATTCGGAGTGGTTTGGATTTTACAGAA GTGGCCAAGCCAAGGAAACCATTCCCTTACAGGAGACCTCCCTGT ACACACAGGACCGCCTGGGGCTAAAGGAAATGGACAATGCAGGA	42

	CAGCTAGTGTTTCTGGCTACAGAAGGGGACCATCTTCAGTTGTCT GAAGAATGGTTTTATGCCCACATCATACCATTCCTTGGATGA	

【0075】 在一些實施例中，本文提供之包含編碼所需治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列之核酸的載體，為腺相關病毒載體(A5/35)。在一些實施例中，使用轉座子，諸如睡美人(sleeping beauty)、crisper、CAS9及鋅指核酸酶，來實現編碼vIGF2-治療性融合蛋白之核酸之表現(參見June等人2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716，以引用之方式併入本文中)。

【0076】 在一些實施例中，將編碼治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列之核酸，選殖至多種類型之載體中。舉例而言，在一些實施例中，將核酸選殖至載體中，該載體包括(但不限於)質體、噬菌質體、噬菌體衍生物、動物病毒及黏質體。尤其受關注之載體包括表現載體、複製載體、探針產生載體及定序載體。

【0077】 此外，在一些實施例中，將編碼所需治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列之核酸，以病毒載體形式提供至細胞。病毒載體技術描述於例如Sambrook等人, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)及其他病毒學與分子生物學手冊中。適用作載體之病毒包括(但不限於)反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒。一般而言，適合載體含有在至少一種生物體中起作用的複製起點、啟動子序列、適宜的限制性核酸內切酶位點，及一或多種可選標記物(例如WO 01/96584；WO 01/29058；及美國專利第6,326,193號)。

【0078】 本文亦提供用於基因轉移之組合物及系統。已針對基因轉

移至哺乳動物細胞中開發出多個基於病毒之系統。舉例而言，反轉錄病毒提供基因傳遞系統之適宜平台。在一些實施例中，使用適合技術，將所選擇基因插入至載體中且封裝在反轉錄病毒顆粒中。隨後，分離重組病毒且活體內或離體遞送至個體之細胞中。多種反轉錄病毒系統適合於基因治療。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體適合於基因治療。在一些實施例中，使用腺相關病毒載體。多種腺相關病毒適合於基因治療。在一個實施例中，使用慢病毒載體。

【0079】 本文提供之基因治療構築體包含載體(或基因治療表現載體)，其中將所關注之基因選殖至該載體中，或者該載體以使得載體之核苷酸序列允許表現(組成性表現或者以某種方式調節)所關注之基因的方式包括所關注之基因。本文提供之載體構築體包括能夠遞送至相關組織且將在所選擇相關組織中提供表現所關注之基因之任何適合的基因表現載體。

【0080】 在一些實施例中，載體為腺相關病毒(AAV)載體，此係因為AAV載體跨越血腦障壁及轉導神經元組織之能力。在本文提供之方法中，考慮使用任何血清型之AAV。在某些實施例中，所使用之血清型之病毒載體係選自由以下組成之群：AAV1載體、AAV2載體、AAV3載體、AAV4載體、AAV5載體、AAV6載體、AAV7載體、AAV8載體、AAV9載體、AAVrhS載體、AAVrh10載體、AAVrh33載體、AAVrh34載體、AAVrh74載體、AAV Anc80載體、AAVPHP.B載體、AAVhu68載體、AAV-DJ載體及適合於基因治療之其他載體。

【0081】 AAV載體係衍生自對於哺乳動物為非病原性的單股DNA細小病毒。簡言之，基於AAV之載體具有rep及cap病毒基因，考慮移除病毒基因組之96%，留下用於起始病毒DNA複製、封裝及整合之兩個側接145

鹼基對反向末端重複序列(ITR)。在不存在輔助病毒下，野生型AAV以較佳位點特異性在染色體19q 13.3處整合至人類宿主細胞基因組中，或其可保持游離地表現。單一AAV顆粒能夠容納至多5 kb ssDNA。

【0082】 在一說明性實施例中，使用血清型2衣殼，將包含在兩個AAV ITR之間的序列的AAV主鏈假型化，產生AAV2載體。在其他實施例中，使用血清型9衣殼，將包含在兩個AAV ITR之間的序列的AAV主鏈假型化，產生AAV9載體。其他實施例包括使用其他血清型衣殼以產生：AAV1載體、AAV2載體、AAV3載體、AAV4載體、AAV5載體、AAV6載體、AAV7載體、AAV8載體、AAV9載體、AAVrhS載體、AAVrh10載體、AAVrh33載體、AAVrh34載體、AAVrh74載體、AAV Anc80載體、AAVPHP.B載體、AAV-DJ載體及適合於基因治療之其他載體。視情況，AAV病毒衣殼為AAV2/9、AAV9、AAVrhS、AAVrh10、AAVAnc80或AAV PHP.B。

【0083】 額外啟動子元件(例如，強化子)調節轉錄起始頻率。通常，此等位於起始位點上游30-110 bp區中，儘管已顯示許多啟動子亦在起始位點下游含有功能元件。啟動子元件之間的間距通常為可撓性的，使得當元件倒置或相對於彼此移動時保留啟動子功能。在胸苷激酶(tk)啟動子中，啟動子元件之間的間距在活性開始下降之前通常增加至相隔50 bp。視啟動子而定，個別元件看起來合作地或獨立地起活化轉錄功能。

【0084】 能夠表現治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列、哺乳動物T細胞中之轉殖基因之啟動子的實例為EF1a啟動子。原生EF1a啟動子驅動延長因子-1複合物之α次單元的表現，該複合物負責將胺基醯基tRNA酶促傳遞至核糖體。EF1a啟

動子已在哺乳動物表現中廣泛使用，且已顯示在驅動自選殖至慢病毒載體中之轉基因表現中有效(參見例如Milone等人, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009))。啟動子之另一實例為即刻早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列為強組成型啟動子序列，其能夠驅動與其可操作地連接之任何聚核苷酸序列之高水準表現。然而，有時亦可使用其他組成型啟動子序列，包括(但不限於)雞β肌動蛋白啟動子、P546啟動子、猴病毒40(SV40)早期啟動子、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)長末端重複(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病病毒啟動子、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒啟動子(Rous sarcoma virus promoter)，以及人類基因啟動子，諸如(但不限於)肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白啟動子、延長因子-1a啟動子、血紅素啟動子及肌酸激酶啟動子。此外，預期基因治療載體不限於使用組成型啟動子。此處亦涵蓋誘導性啟動子。誘導性啟動子之使用提供分子開關，該分子開關能夠在需要此類表現時打開其可操作地連接之聚核苷酸序列之表現或在不需要表現時關閉表現。誘導性啟動子之實例包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、糖皮質激素啟動子、孕酮啟動子及四環素調節啟動子。

【0085】 為了評定視情況具有內部核糖體進入序列或其部分之治療性融合蛋白(諸如vIGF融合體或信號肽融合體)之表現，待引入至細胞中之表現載體通常含有可選標記基因或報導基因或兩者，以便於自設法經由病毒載體轉染或感染之細胞群體鑑別及選擇表現細胞。在其他態樣中，可選標記物通常攜載於獨立DNA段上且用於共轉染程序。可選標記物與報導基因有時側接適當的調節序列以實現在宿主細胞中的表現。適用可選標記物包括例如耐抗生素基因，諸如neo及其類似物。

【0086】 用於引入至細胞中及表現基因之方法及組合物適合於本文中之方法。在表現載體之情形下，載體藉由此項技術中之任何方法容易地引入至宿主細胞(例如哺乳動物、細菌、酵母菌或昆蟲細胞)中。舉例而言，藉由物理、化學或生物方式，將表現載體轉移至宿主細胞中。

【0087】 用於將聚核苷酸引入宿主細胞中之物理方法及組合物包括磷酸鈣沈澱、脂質體轉染、粒子轟擊、顯微注射、基因槍、電穿孔及類似方法。用於製造包含載體及/或外源性核酸之細胞之方法適合於本文中之方法(參見例如Sambrook等人, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)。將聚核苷酸引入宿主細胞中之一種方法為磷酸鈣轉染。

【0088】 用於將相關聚核苷酸引入宿主細胞中之生物學方法及組合物包括使用DNA及RNA載體。病毒載體及尤其反轉錄病毒載體已成為最廣泛用於將基因插入至哺乳動物(例如人類)細胞中之方法。在一些實施例中，其他病毒載體來源於慢病毒、痘病毒、I型單純疱疹病毒、腺病毒及腺相關聯病毒及其類似病毒。

【0089】 將聚核苷酸引入宿主細胞中之化學方式及組合物包括膠態分散系統，諸如大分子複合物、奈米膠囊、微球、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞及脂質體。用作活體外及活體內遞送媒劑之例示性膠態系統為脂質體(例如人工膜泡)。可獲得目前先進技術中靶向遞送核酸之其他方法，諸如用靶向奈米粒子或其他適合之亞微米大小的遞送系統遞送聚核苷酸。

【0090】 在利用非病毒遞送系統之情況下，例示性遞送媒劑為脂質體。涵蓋脂質調配物之使用，以用於將核酸引入至宿主細胞(活體外、離

體或活體內)中。在另一態樣中，核酸與脂質締合。在一些實施例中，與脂質締合之核酸囊封於脂質體之水性內部中，穿插於脂質體之脂質雙層內，經由與脂質體及寡核苷酸締合之連接分子與脂質體連接、包覆於脂質體中，與脂質體複合，分散於含有脂質之溶液中，與脂質混合，與脂質合併，以懸浮液形式含於脂質中，含有微胞或與微胞複合，或以其他方式與脂質締合。與脂質、脂質/DNA或脂質/表現載體締合的組合物不限於溶液中之任何特定結構。舉例而言，在一些實施例中，其存在於雙層結構中，以微胞形式存在或具有「塌陷」結構。替代地，其可簡單地穿插於溶液中，可能形成大小或形狀上不均勻的聚集物。脂質為脂肪物質，其在一些實施例中為天然存在或合成脂質。舉例而言，脂質包括細胞質中天然存在之脂肪滴以及含有長鏈脂族烴及其衍生物之化合物類別(諸如脂肪酸、醇、胺、胺基醇及醛)。

【0091】 適用之脂質係獲自商業來源。舉例而言，在一些實施例中，二肉豆蔻基磷脂醯膽鹼(「DMPC」)係獲自Sigma, St. Louis, Mo.；在一些實施例中，磷酸三十二烷基酯(「DCP」)係獲自K & K Laboratories (Plainview, N.Y.)；在一些實施例中，膽固醇(「Choi」)係獲自Calbiochem-Behring；二肉豆蔻基磷脂醯甘油(「DMPG」)及其他脂質通常係獲自Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.)。脂質於氯仿或氯仿/甲醇中之儲備溶液通常儲存在約-20℃下。氯仿用作唯一溶劑，因為其比甲醇更容易蒸發。「脂質體」為通用術語，其涵蓋藉由產生經圍封之脂質雙層或聚集物而形成的多種單層及多層脂質媒劑。脂質體之特徵通常為具有囊泡結構，其具有磷脂雙層膜及內部水性介質。多層脂質體具有藉由水性介質分隔開之多個脂質層。其在磷脂懸浮於過量水溶液中時自發

地形成。脂質組分在形成封閉結構之前進行自身重排，且在脂質雙層之間捕獲水及溶解之溶解物(Ghosh等人, 1991 Glycobiology 5: 505-10)。然而，亦涵蓋在溶液中具有與正常囊泡結構不同之結構的組合物。舉例而言，在一些實施例中，脂質呈現微胞結構或僅以脂質分子之非均勻聚集物形式存在。亦涵蓋脂染胺-核酸複合物。

【0092】 不管用於將外源性核酸引入宿主細胞中或者將細胞暴露於本文提供之視情況具有內部核糖體進入序列之治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)的方法如何，為了確認宿主細胞中重組DNA序列的存在，考慮進行各種分析。此類分析包括例如適合於本文中之方法之「分子生物學」分析，諸如南方及北方墨點法、RT-PCR及PCR；「生物化學」分析，諸如偵測特定肽之存在或不存在，例如藉由免疫學方式(ELISA及西方墨點法)或藉由本文所描述之分析來鑑別在本文之範疇內的試劑。

【0093】 本發明進一步提供一種載體，其包含治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列、編碼核酸分子。在一個態樣中，治療性融合蛋白載體能夠直接轉導至細胞中。在一個態樣中，載體為選殖或表現載體，例如包括(但不限於)以下之載體：一或多種質體(例如，表現質體、選殖載體、微環、微載體、雙微染色體)、反轉錄病毒及慢病毒載體構築體。在一個態樣中，載體能夠在哺乳動物細胞中表現vIGF2-治療性融合蛋白構築體。在一個態樣中，哺乳動物細胞為人類細胞。

用途及治療方法

【0094】 本文亦提供使用基因治療來治療遺傳病症之方法，其包含

向個體投與本文所揭示之編碼治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體或信號肽-vIGF2融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列的核酸。適合於使用本文方法進行治療之遺傳病症包含個體中由基因組中之一或多個突變引起的病症，該一或多個突變引起缺乏表現蛋白質或由突變型基因表現功能異常蛋白質。

【0095】 本文進一步提供醫藥組合物，其包含基因治療載體，諸如基因治療載體，該基因治療載體包含本文所揭示之編碼治療性融合蛋白(諸如vIGF2融合體或信號肽融合體或信號肽-vIGF2融合體)，視情況具有內部核糖體進入序列之核酸，及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，以用於製備用於治療遺傳病症的藥物。

【0096】 適合於藉由本文中之方法治療之遺傳病症包括(但不限於)：軟骨發育不全、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、抗磷脂症候群、常染色體顯性多囊性腎病、恰克-馬利-杜斯病(Charcot-Marie-Tooth)、結腸癌、貓叫症候群(Cri du chat)、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、囊腫性纖維化、德爾肯病(Dercum Disease)、杜恩氏症候群(Duane Syndrome)、杜興氏肌肉失養症、因子V萊頓易栓病(Factor V Leiden Thrombophilia)、家族性高膽固醇血症、家族性地中海熱、X脆折症候群、戈謝病、血色沉著病、血友病、前腦無裂畸形、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、克氏症候群(Klinefelter syndrome)、馬凡氏症候群、肌緊張性營養障礙、神經纖維瘤、努南症候群、成骨不全、帕金森氏病(Parkinson's disease)、苯酮尿症、波蘭異常、卟啉症、早老症、色素性視網膜炎、嚴重合併性免疫缺失(SCID)、鐮狀細胞疾病、脊髓性肌萎縮、泰-薩克斯病、地中海貧血、三甲基胺尿症、特納症候群(Turner Syndrome)、顎心臉症候群、WAGR症

候群或威爾遜病(Wilson Disease)。在一些實施例中，遺傳病症係選自由以下組成之群：CDKL5缺乏症、囊腫性纖維化、α-地中海型貧血及β-地中海型貧血、鐮狀細胞貧血、馬凡氏症候群、X脆折症候群、亨廷頓氏病、血色沉著病、先天性耳聾(非綜合型)、塔伊-薩克斯病、家族性高膽固醇血症、杜興氏肌肉失養症、斯特格氏病、尤塞氏症候群、無脈絡膜症、色盲、X性聯視網膜劈裂症、血友病、韋-奧氏症候群、X性聯慢性肉芽腫病、芳族L-胺基酸去羧酶缺乏症、隱性營養不良大皰性表皮鬆懈、α1抗胰蛋白酶缺乏症、哈-吉氏早老症症候群(HGPS)、努南氏症候群、X性聯嚴重合併性免疫缺失(X-SCID)。

【0097】 在一些實施例中，適合於使用本文提供之方法治療之遺傳病症為溶酶體貯積病。在一些實施例中，本文中溶酶體貯積病使用基因治療遞送缺失或缺陷酶至患者來治療。在一些實施例中，本文中之方法將與vIGF2融合或與信號肽融合之酶遞送至患者，以便將酶遞送至需要其之細胞中。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病及II型辛德勒病。在一些實施例中，溶酶體貯積病係選自由以下組成之群：活化因子缺乏症、GM2-神經節苷脂貯積病；GM2-神經節苷脂貯積病、AB變型；α-甘露糖苷貯積病(2型，中度形式；

3型，新生兒，重度)；β-甘露糖苷貯積病；天冬胺醯葡萄糖胺尿症；溶酶體酸性脂肪酶缺乏症；胱胺酸症(晚發作幼年型或青年腎病類型；幼稚型腎病)；錢林-朵爾夫曼症候群；伴隨肌病之中性脂貯積病；NLSDM；達農病(Danon disease)；法布立病；晚期發作II型法布立病；法伯病；法伯脂肪肉芽腫病；岩藻糖苷貯積症；半乳糖唾液酸貯積症(合併神經胺糖酸苷酶及β-半乳糖苷酶缺乏症)；戈謝病；II型戈謝病；III型戈謝病；IIIC型戈謝病；因鞘脂激活蛋白C缺乏所致之非典型戈謝病；GM1-神經節苷脂貯積病(晚幼稚型/幼年型GM1-神經節苷脂貯積病；成人/慢性GM1-神經節苷脂貯積病)；球狀細胞腦白質營養不良、克拉培病(晚幼稚型發作；幼年型發作；成年發作型)；因鞘脂激活蛋白A缺乏所致之非典型克拉培病；異染性腦白質營養不良(幼年型；成人)；部分硫酸腦甘脂缺乏症；假芳基硫酸酯酶A缺乏症；因鞘脂激活蛋白B缺乏所致之異染性腦白質營養不良；黏多醣貯積症：MPS I、賀勒侯症群；MPS I、賀勒-沙伊侯症群；MPS I、沙伊侯症群；MPS II、亨特症候群；MPS II、亨特症候群；A型聖菲利波症候群/MPS IIIA；B型聖菲利波症候群/MPS IIIB；C型聖菲利波症候群/MPS IIIC；D型聖菲利波症候群/MPS IIID；莫奎症候群、A型/MPS IVA；莫奎症候群、B型/MPS IVB；MPS IX玻尿酸酶缺乏症；MPS VI馬洛特-拉米症候群；MPS VII斯利症候群；黏脂貯積症I、II型唾液腺病；I-細胞病、勒羅伊病、黏脂貯積症II；假賀勒多營養不良/III型黏脂貯積症；黏脂貯積症IIIC/ML III GAMMA；IV型黏脂貯積症；多硫酸酯酶缺乏症；尼曼-匹克病(B型；C1型/慢性神經疾病形式；C2型；D型/諾瓦司考田)；神經元蠟樣質褐質病：CLN6病，非典型晚期幼稚型、晚發作變型、早幼年型；貝敦氏-家族黑蒙性白癡/幼年型NCL/CLN3病；芬蘭變型

晚幼稚型CLN5；詹斯基-比爾朔夫斯基病/晚幼稚型CLN2/TPP1病；Kufs/成年發作型NCL/CLN4病(B型)；北方癲癇症/變型晚幼稚型CLN8；桑塔沃里-哈爾蒂亞/幼稚型CLN1/PPT病；龐培氏病(II型肝糖貯積病)；晚發作型龐培氏病；密骨發育障礙；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；桑多霍夫病/GM2神經節苷脂貯積病；辛德勒病(III型/中度，可變)；神琦病；薩拉病；幼稚型無唾液酸貯積病(ISSD)；伴隨進展性肌痙攣癲癇症之脊髓性肌萎縮(SMAPME)；泰-薩克斯病/GM2神經節苷脂貯積病；幼發型泰-薩克斯病；晚發作型泰-薩克斯病；克里斯蒂安症候群；洛氏眼-腦-腎症候群；4J型恰克-馬利-杜斯病CMT4J；尤里斯-凡倫症候群；雙側顳枕多小腦回(BTOP)；X性聯高鈣性腎石病、登特-1；及登特病2。在一些實施例中，治療蛋白與溶酶體貯積病相關聯，且治療蛋白係選自由以下組成之群：GM2-活化因子蛋白質；α-甘露糖苷酶；MAN2B1；溶酶體ß-甘露糖苷酶；糖基天冬醯胺酶；溶酶體酸性脂肪酶；cystinosin；CTNS；PNPLA2；溶酶體相關膜蛋白-2；α-半乳糖苷酶A；GLA；酸性神經醯胺酶；α-L-岩藻糖苷酶；保護性蛋白質/組織蛋白酶A；酸性ß-葡糖苷酶；GBA；PSAP；ß-半乳糖苷酶-1；GLB1；半乳糖苷基神經醯胺ß-半乳糖苷酶；GALC；PSAP；芳基硫酸酯酶A；ARSA；α-L-艾杜糖醛酸酶；艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶；乙醯肝素N-硫酸酯酶；N-α-乙醯基胺基葡萄糖苷酶；乙醯肝素乙醯CoA:α-胺基葡糖苷乙醯基轉移酶；N-乙醯葡萄糖胺6-硫酸酯酶；半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶；ß-半乳糖苷酶；玻尿酸酶；芳基硫酸酯酶B；ß-葡糖醛酸酶；神經胺糖酸苷酶；NEU1；N-乙醯葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶之γ次單元；mucolipin-1；硫酸酯酶修飾因子-1；酸性神經磷脂酶；SMPD1；NPC1；

及NPC2。

【0098】 在一些實施例中，經由本文中之方法之治療將編碼治療蛋白之基因遞送至需要治療蛋白的細胞中。在一些實施例中，治療將基因遞送至個體中之所有體細胞中。在一些實施例中，治療置換靶向細胞中之缺陷基因。在一些實施例中，將離體治療以表現治療蛋白之細胞遞送至個體。

【0099】 用於本文所揭示之病症之基因治療提供優於習知治療，包括酶置換治療之治療結果，此係因為其不需要長期輸注治療。此外，其具有個體發展對於治療蛋白之免疫反應之降低的風險，該免疫反應通常在接受酶置換治療之個體中經歷。

定義

【0100】 如本文所用，「離體基因治療」係指其中患者細胞在個體外部經基因修飾以例如表現治療性基因的方法。隨後，具有新遺傳資訊之細胞返回至其來源的個體。

【0101】 如本文所用，「活體內基因治療」係指其中直接向個體投與攜帶治療性基因之載體的方法。

【0102】 如本文所用，「融合蛋白」及「治療性融合蛋白」在本文中可互換使用，且係指具有與其連接之至少一個額外蛋白質、肽或多肽的治療蛋白。在一些情況下，融合蛋白為含有兩個或更多個蛋白質或其片段之單一蛋白質分子，該兩個或更多個蛋白質或其片段經由其各別肽鏈內之肽鍵而無化學連接子共價連接。在一些實施例中，融合蛋白包含治療蛋白及信號肽(一種增加融合蛋白之內吞作用之肽)或兩者。在一些實施例中，增加內吞作用之肽為結合CI-MPR之肽。

【0103】 如本文所用，在本文中可互換使用之「載體」或「基因治療載體」，係指將治療性基因遞送至細胞之基因治療遞送媒劑或載劑。基因治療載體為適用於基因治療之任何載體，例如適合於將核酸聚合物(編碼多肽或其變體)治療性遞送至患者之靶細胞(例如，感覺神經元)中之任何載體。在一些實施例中，基因治療載體將編碼治療蛋白或治療性融合蛋白之核酸遞送至表現治療蛋白或融合體且自細胞分泌之細胞。載體可具有任何類型，例如其可為質體載體或小環DNA。通常，載體為病毒載體。此等包括基因失能病毒(諸如腺病毒)載體及非病毒載體(諸如脂質體)兩者。病毒載體可例如衍生自腺相關病毒(AAV)、反轉錄病毒、慢病毒、單純疱疹病毒或腺病毒。AAV源性載體。載體可包含AAV基因組或其衍生物。

【0104】 如本文所用，「構築體」係指編碼治療蛋白或融合蛋白且視情況包含額外序列(諸如轉譯起始序列或IRES序列)之核酸分子或序列。

【0105】 如本文所用，「AAV」係指野生型AAV病毒或病毒顆粒。AAV (細小病毒家族成員)為小的非包膜二十面體病毒，其具有4.7千鹼基(kb)至6 kb之單股線性DNA基因組。AAV歸為依賴病毒屬，因為該病毒發現為經純化腺病毒儲備液中之雜質。AAV之生命週期包括：潛伏期，此時AAV基因組在感染之後整合於宿主基因組中；及感染期，其中在腺病毒或單純疱疹病毒感染後，整合的AAV基因組隨後修復、複製及封裝成感染性病毒。非病原性、寬廣的感染宿主範圍(包括非分裂細胞)及整合之特性使得AAV為誘人的遞送媒劑。術語「AAV」、「AAV病毒」及「AAV病毒顆粒」在本文中可互換使用。術語「rAAV」係指重組AAV病毒或重組感染性囊封病毒顆粒。已描述用於自組織分離其之各種不同AAV序列及方法。

在其他AAV序列之中，已描述自猴或人類組織來源獲得之AAV1-6、AAV7、AAV9及AAV9。參見例如國際專利公開案第WO 02/33269號、第WO 02/386122 (AAV8)號及國際專利公開案第WO 2005/033321號。藉由此，不再嚴格藉由血清交叉反應(血清型)來定義AAV。近期文獻定義此等AAV之間關於相關性的關係，將多組稱為「分枝系」。參見例如Gao等人, J Virol, 78(12):6381-6388 (2004年6月)；國際專利公開案第WO 2005/033321號。

【0106】 術語「rAAV基因組」係指衍生自原生AAV基因組，已經修飾的聚核苷酸序列。在一些實施例中，rAAV基因組已經修飾以移除原生cap及rep基因。在一些實施例中，rAAV基因組包含內源性5'及3'反向末端重複序列(ITR)。在一些實施例中，rAAV基因組包含來自AAV血清型(不同於AAV基因組所來源之AAV血清型)之ITR。在一些實施例中，rAAV基因組包含編碼治療蛋白之核酸，其在5'及3'端上側接反向末端重複(ITR)。rAAV基因組可為自身互補(sc)基因組，其在本文中稱為「scAAV基因組」。或者，rAAV基因組可為單股(ss)基因組，其在本文中稱為「ssAAV基因組」。

【0107】 術語「scAAV」係指包含自身互補基因組之rAAV病毒或rAAV病毒顆粒。術語「ssAAV」係指包含單股基因組之rAAV病毒或rAAV病毒顆粒。

【0108】 「封裝」係指引起AAV顆粒之組裝及衣殼化之一系列胞內事件。術語「製造」係指藉由封裝細胞製造rAAV (感染性囊封rAAV顆粒)之過程。

【0109】 AAV「rep」及「cap」基因係指分別編碼腺相關病毒之複

製及衣殼化蛋白質的聚核苷酸序列。AAV rep及cap在本文中被稱作AAV「封裝基因」。

【0110】 AAV之「輔助病毒」係指允許AAV (例如，野生型AAV)複製且藉由哺乳動物細胞封裝之病毒。AAV之各種此類輔助為此項技術中已知的，包括腺病毒、疱疹病毒及痘病毒(諸如牛痘)。腺病毒可涵蓋多個不同子組，但子組C之5型腺病毒最常用。已知人類、非人類哺乳動物及禽類來源之多種腺病毒且獲自貯藏所(諸如ATCC)。疱疹家族之病毒包括例如單純疱疹病毒(HSV)及埃-巴二氏病毒(EBV)以及巨細胞病毒(CMV)及假性狂犬病病毒(PRV)；其亦獲自諸如ATCC之貯藏所。

【0111】 「輔助病毒功能」係指編碼在允許AAV複製及封裝(結合本文所描述之複製及封裝之其他需求)之輔助病毒基因組中的功能。如本文所描述，「輔助病毒功能」可以多種方式提供，包括藉由以反式向生產細胞提供輔助病毒或提供例如編碼必需功能之聚核苷酸序列。

【0112】 如本文所用，「質體」係指在細胞內獨立於染色體DNA進行複製之環狀雙股DNA單元。

【0113】 如本文所用，「啟動子」係指DNA上與酶RNA聚合酶結合且起始DNA轉錄為RNA之位點。

【0114】 如本文所用，「體細胞療法」係指其中操縱將對於患者為校正性而非遺傳至下一代之細胞中之基因表現的方法。體細胞包括人體中之所有非生殖細胞。

【0115】 如本文所用，「體細胞」係指除生殖細胞外之所有身體細胞。

【0116】 如本文所用，「趨向性」係指載體(諸如病毒)對於某一細胞

或組織類型之偏好。各種因素決定載體感染特定細胞之能力。病毒例如必須與特定細胞表面受體結合以進入細胞。若細胞不表現必需受體，則病毒通常不能感染細胞。

【0117】術語「轉導」用於指，經由本發明之複製缺陷型rAAV，向靶細胞活體內或活體外投與/遞送編碼治療蛋白之核酸，引起接受者細胞表現功能性多肽。用本發明之基因治療載體(諸如rAAV)轉導細胞，引起持久表現由rAAV編碼之多肽或RNA。因此，本發明提供藉由鞘內、視網膜內、眼內、玻璃體內、腦室內、腦實質內或靜脈內途徑或其任何組合，向個體投與/遞送編碼治療蛋白之基因治療載體(諸如rAAV)的方法。「鞘內」遞送係指遞送至大腦或脊髓之蜘蛛膜下之空間中。在一些實施例中，鞘內投與係經由腦池內投與。

【0118】術語「接受者」、「個體(individual/subject)」、「宿主」及「患者」在本文中可互換使用，且在一些情況下，係指需要診斷、治療或療法之任何哺乳動物個體，特定言之人類。出於治療之目的之「哺乳動物」係指歸類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家養動物及農畜、及實驗室、動物園、體育或寵物動物，諸如狗、馬、貓、牛、綿羊、山羊、豬、小鼠、大鼠、兔、天竺鼠、猴等。在一些實施例中，哺乳動物為人類。

【0119】如本文所用，在一些情況下，術語「治療(treatment/treating)」、「改善症狀」及其類似者，係指出於以統計學上顯著方式或以臨床上顯著方式獲得治療效果(包括抑制、緩解、降低、預防或改變病症之至少一個態樣或標記)之目的，投與藥劑或進行程序。術語「改善」或「治療」不表明或暗示治癒潛在病狀。如本文所用，「治療」

或「改善」(及類似者)可包括治療哺乳動物，特定言之人類，且包括：(a)預防病症或病症之症狀在可能易患該病症但尚未診斷患病(例如，包括可能與原發性病症相關聯或由其引起之病症)之個體中發生；(b)抑制病症，亦即遏制其發展；(c)減輕病症，亦即引起病症消退；及(d)改良病症之至少一個症狀。治療可指代在治療或改善或預防病症中之任何成功標誌，包括任何客觀或主觀參數，諸如消除；緩解；減弱症狀或使病症病狀對於患者為更可容忍的；減緩變性或衰退之速率；或使變性之最終點較低衰弱。治療或改善症狀係基於一或多個客觀或主觀參數；包括藉由醫師檢查之結果。因此，術語「治療」包括投與本發明之化合物或藥劑以預防與病症相關之症狀或病狀，或延遲、減輕或遏制或抑制與病症相關之症狀或病狀之發展。術語「治療效果」係指減少、消除或預防個體之病症、病症之症狀或病症之副作用。

【0120】 術語「親和力」係指分子與其結合搭配物或受體之間的結合強度。舉例而言，親和力係指肽(或含有此種肽之治療性融合體)與CI-MPR結合以便使肽及CI-MPR之平衡朝向藉由其結合形成之複合物之存在偏移的程度。

【0121】 如本文所用，片語「高親和力」係指例如含有結合CI-MPR之此種肽之治療性融合體，該治療性融合體與CI-MPR具有高於無該肽之治療蛋白約100至1,000倍或500至1,000倍的親和力。在一些實施例中，親和力高於無該肽之至少100、至少500或至少1000倍。舉例而言，當將治療蛋白及CI-MPR以相對相等濃度併入時，具有高親和力之肽將與可獲得的CI-MPR結合以便使平衡朝向高濃度之所得複合物偏移。

【0122】 在一些情況下，「治療有效量」意謂當向個體投與以用於

治療病症時，足以實現對彼病症之治療的量。

【0123】 如本文所用，術語「約」某數目係指跨越小於該數目之10%至大於該數目之10%，且包括範圍內之值(諸如數目本身)的範圍。

【0124】 如本文所用，術語「包含」技術方案之一或多個要素係指彼等要素但不排除包括額外一或多個要素。

實例

【0125】 以下實例出於說明本發明之各種實施例之目的給出且不意欲以任何方式限制本發明。該等實例連同本文中所描述之方法當前為較佳實施例之代表，為例示性的且不意欲作為對本發明範疇之限制。熟習此項技術者將想到涵蓋在本發明之精神範圍內、如由申請專利範圍之範疇所限定的其中之變化及其他用途。

實例1：變體IGF2肽與CI-MPR受體之結合

【0126】 使用Biacore進行表面電漿子共振(SPR)實驗以量測野生型及變體IGF2 (vIGF2)與CI-MPR受體之結合。野生型人類成熟IGF2肽(wt IGF2)具有SEQ ID NO: 1中闡述之序列。vIGF2序列與wt IGF2之不同之處在於其缺乏殘基1-4且含有以下突變：E6R、Y27L及K65R。其具有胺基序列SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE (SEQ ID NO: 31)。vIGF2亦具有N端連接子，該N端連接子具有序列GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)。組合序列為GGGGSGGGGSRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCDLALLETYCATPARSE (SEQ ID NO: 43)。**圖4**顯示，如所預期，野生型IGF2肽以高親和力(0.2 nM)與CI-MPR受體結合。**圖5**顯

示，變體IGF2肽(vIGF2)亦以高親和力(0.5 nM)與CI-MPR受體結合。此等資料指示，vIGF2肽針對預期CI-MPR受體具有高親和力以用於將療法靶向溶酶體。

【0127】 使用SPR以量測與胰島素受體結合之肽，以評定潛在副作用。胰島素以高親和力(~8 nM；資料未顯示)結合胰島素受體。測試野生型IGF2及vIGF2， 其 中vIGF2具 有 帶 有N端 連 接 子 之 序 列 SRTLCGGELVDTLQFVCGDRGFLFSRPASRVSRRSRGIVEECCFRSCD LALLETYCATPARSE (SEQ ID NO: 31)， 該N端 連 接 子 具 有 序 列 GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 18)。**圖8**顯示，野生型IGF2亦以相對較高親和力(~100 nM)結合胰島素受體。來自Biomarin/Zystor IGF2-GAA融合蛋白(BMN-701)之IGF2肽亦以高親和力結合胰島素受體，且顯示在臨床試驗中引起低血糖症。**圖9**顯示vIGF2肽與胰島素受體之可量測結合。此等資料表明，vIGF2肽相較於wt IGF2肽融合體賦予優良安全概況。

【0128】 使用相同SPR結合分析以表徵vIGF2肽與IGF1受體之相互作用。**圖10**顯示，野生型IGF2以相對較高親和力(~100 nM)結合IGF1受體。**圖11**顯示vIGF2肽與IGF1受體無可量測結合，表明相較於wt IGF2之經改良的安全概況。

表8：SPR親和力結果		
受體	**wt IGF2 Kd (nM)**	**vIGF2 Kd (nM)**
CI-MPR	0.2	0.5
胰島素受體	100	未偵測到結合
IGF1受體	100	未偵測到結合

實例2：vIGF2將CI-MPR之低親和力配體轉化為高親和力ERT

【0129】 將具有N端連接子(SEQ ID NO: 18)之vIGF2肽(SEQ ID NO: 31)與阿糖苷酶-α化學偶合，在本文中成為vIGF2-阿糖苷酶-α，以測

定vIGF2肽是否可改良針對CI-MPR之親和力。如**圖6**中所示，在塗覆有CI-MPR之96孔ELISA盤中使用CI-MPR盤結合分析，直接比較阿糖苷酶-α及vIGF2-阿糖苷酶-α之結合親和力。在量測結合酶活性之前，洗滌掉未結合酶。將變化濃度之兩種酶製劑與或不與游離WT IGF2肽一起使用。vIGF2實質上改良針對CI-MPR之親和力。此外，vIGF2-阿糖苷酶-α之結合由游離WT IGF2阻斷，指示結合為IGF2依賴性的。(資料未顯示。) vIGF2肽之偶合不損害GAA酶活性。

【0130】將vIGF2與重組人類N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶(rhNAGLU)偶合。測定肽是否可將非配體轉化為CI-MPR之高親和力配體的RrhNAGLU (缺乏M6P之溶酶體酶)。在此實驗中，使用CI-MPR盤結合分析，使用塗覆CI-MPR之培養盤，直接比較rhNAGLU及vIGF2-rhNAGLU。在量測結合酶活性之前，洗滌掉未結合酶。將變化濃度之兩種酶製劑與或不與游離vIGF2肽一起使用。如**圖7**中所示，vIGF2-rhNAGLU比缺乏vIGF2之rhNAGLU針對CI-MPR具有顯著較高的親和力。此外，vIGF2-rhNAGLU結合由游離vIGF2肽阻斷，指示受體結合對IGF2肽具有特異性。此等結果表明，可使用vIGF2肽來改良至溶酶體之藥物靶向。

實例3：vIGF2-GAA融合蛋白之肌母細胞吸收

【0131】投與vIGF2-GAA融合蛋白(與實例1-2中相同之順序)，且量測酶之L6肌母細胞吸收。**圖6**顯示相較於rhGAA及M6P-GAA，vIGF2-rhGAA之優良吸收。因此，vIGF2在將GAA靶向細胞上有效。

實例4：藉由基因治療遞送之ERT之構築體

【0132】在**圖12**中說明兩種不同構築體。上圖為編碼「天然

hGAA」(SEQ ID NO: 45)之構築體，該構築體含有Kozak序列及編碼帶有原生信號肽之重組人類GAA之核酸(SEQ ID NO: 45)。中間圖為編碼「工程改造hGAA」(SEQ ID NO: 23)之構築體Kozak-BiP-vIGF2-2GS-GAA。此構築體之特徵在於Kozak序列、編碼BiP信號肽之核酸、編碼vIGF2肽(其具有SEQ ID NO: 31中闡述之序列)之核酸及編碼2GS連接子(SEQ ID NO: 18)之核酸，隨後編碼重組人類GAA (其中移除N端60個胺基酸以預防過早加工及移除vIGF2)之核酸。

實例5：基因治療構築體之增強分泌

【0133】 *工程改造hGAA具有較高分泌，且能夠與適合於細胞吸收及溶酶體靶向之細胞表面受體相互作用*

培養表現工程改造hGAA(下文更詳細地描述)或天然hGAA之CHO，且收集條件培養基以用於量測GAA活性。圖15顯示工程改造及天然hGAA之相對活性，顯示工程改造hGAA相較於天然hGAA具有增加的活性。

實例6：條件培養基中之PPT1之分析

【0134】 *PPT1構築體之選殖*

將所有PPT1構築體選殖至含有CMV啟動子之pcDNA3.1表現載體(ThermoFisher，目錄號V79020)中。所測試構築體包括PPT1-1 (WT-PPT1) (SEQ ID NO: 24)、PPT1-2 (WT-vIGF2-PPT1) (SEQ ID NO: 25)、PPT1-29 (BiP2aa-vIGF2-PPT1) (SEQ ID NO: 26)。

PPT1分泌及結合

【0135】 在HEK293T細胞中暫時表現PPT1構築體3天，且PPT1分泌於培養基中。藉由西方墨點法量化所分泌之PPT1，且使用所建立方法分析CI-MPR結合。

【0136】 所分泌之PPT1顯示於圖13中。CI-MPR結合顯示於圖14中。

【0137】 **實例7：動物研究方案**

GAA活性

【0138】 將血漿與5.6 mM 4-MU-α-葡萄哌喃糖苷pH 4.0混合，且在37℃下培育三小時。用0.4 M碳酸鈉pH 11.5終止反應。使用Victor3螢光計，ex 355 nm及在460 nm下發射來量測相對螢光單位RFU。藉由內插法根據4-MU之標準曲線，計算以nmol/mL/hr為單位之活性。基於勻漿中之總蛋白含量，進一步標準化個體組織樣本中之活性。

藉由LC/MS之GAA標誌肽

【0139】 在100%甲醇中沈澱血漿，且離心。丟棄上清液。對集結粒(pellet)外加對於hGAA獨特之穩定同位素標記之肽作為內標，且將其與胰蛋白酶一起再懸浮，且在37℃下培育一小時。用10%甲酸終止消化。藉由C-18逆相層析分離胰蛋白酶肽，且藉由ESI-質譜分析鑑別及量化。根據標誌肽濃度計算血漿中之總GAA濃度。

細胞表面受體結合分析

【0140】 用受體塗覆96孔培養盤，洗滌且用BSA阻斷。將來自AAV處理小鼠之28天血漿連續稀釋，得到一系列降低濃度，且與偶合受體一起培育。在培育之後，洗滌培養盤，以移除任何未結合hGAA，且在37℃下添加4-MU-α-葡萄哌喃糖苷持續一小時。用1.0 M甘胺酸pH 10.5終止反應，且藉由Spectramax螢光計；ex 370、發射460讀取RFU。藉由內插法，根據4-MU之標準曲線，將每一樣本之RFU'轉化為活性(nmol/mL/hr)。使用GraphPad Prism進行非線性回歸。

組織學

【0141】對組織進行福馬林固定且石蠟包埋。肌肉切片用PAS染色；CNS切片用luxol快藍/過碘酸-Schiff (PAS)染色。經委員會認證之獸醫學病理學家(JH)盲目地審查組織學切片。在掃描切片上進行具有肝醣儲存及細胞質空泡化之細胞之總百分比的半定量評估。產生0至4之得分，如下表中所描述。

表9：組織學計分	
	儲存/空泡化
0	0
1	1至9%
2	10至49%
3	50至74%
4	75至100%

免疫-組織化學(IHC)

吾人根據使用抗-人類GAA抗體(Sigma HPA029126)免疫染色之切片研究轉殖基因表現及細胞定位。

【0142】實例7.1：組織學-組織加工方案及龐培氏病動物模型中之結果

【0143】如上文實例4所描述，製備用於人類重組GAA之轉殖基因表現之構築體。根據研究方案，將所有組織固定於10% NBF (中性緩衝之福馬林)中。常規地使用本領域中之分析(PAS及IHC)。

【0144】四頭肌及三頭肌之PAS染色(圖31及圖34)，將組織固定於10% NBF中，且包埋於石蠟中。將切片後固定於1%過碘酸中，且用Schiff試劑染色。隨後，切片用蘇木精複染。肝醣呈現為洋紅色聚集物(結合溶酶體)或擴散性粉紅色(胞質)；核為藍色。基於影像且假設各自表示一組，關於肝醣清除之排名順序為：工程改造hGAA>天然hGAA。在整個

圖像中，工程改造hGAA構築體相較於其餘的產生更多染色，表明經由vIGF2與CI-MPR之結合所介導之GAA蛋白質的內吞作用改良。

【0145】 **脊髓(圖28)之PAS染色**，將組織固定於10% NBF中。1%過碘酸中之後固定可在石蠟包埋之前或之後進行。切片用Schiff試劑染色，且可能用亞甲基藍複染。肝醣呈現為洋紅色聚集物(結合溶酶體)；神經纖維呈現藍色。影像聚焦於脊髓之下角及運動神經元中之肝醣積聚。在構築體中，工程改造hGAA在肝醣降低中看起來最有效。

【0146】 **GAA IHC (圖23、圖26、圖29、圖32及圖35)**，將組織固定於10% NBF中且包埋於石蠟中。將切片與抗GAA一級抗體一起培育，隨後與識別一級抗體且攜帶酶標記HRP之二級抗體一起培育。隨後，進行酶反應，且形成棕色沈澱產物。隨後，切片用蘇木精複染。構築體顯示GAA吸收至肌纖維中(圖33)。工程改造hGAA>天然hGAA。在整個圖像中，BiP-vIGF2構築體相較於其餘的具有更多的擴散染色。

【0147】 相較於其他載體，工程改造hGAA產生更多GAA IHC信號，在肌纖維內部具有斑點樣外觀，表明多許多的有效溶酶體靶向(圖23)。

【0148】 總之，在構築體中，工程改造hGAA始終表明在各種組織中之組織吸收、溶酶體靶向及肝醣降低中的優越性。

【0149】 **實例8：在龐培氏病動物模型中測試基因治療載體**

【0150】 人類GAA轉殖基因經工程改造以用更高效序列置換原生信號序列，以實現較高蛋白質表現及hGAA之分泌(高於原生信號序列5至10倍)。此外，工程改造轉殖基因經設計以產生含有使得能夠與細胞表面受體高親和力結合以用於有效吸收及遞送至溶酶體之靶向基元的hGAA。一

旦在細胞中，藉由西方墨點法，hGAA產物不可與野生型GAA區分，指示恰當地移除靶向基元且酶在溶酶體中正常處理。(資料未顯示。) 此等資料指示，hGAA之較高表現及分泌與有效肌肉靶向之組合可最終轉變為對於龐培氏病之更有效基因治療。

【0151】 *龐培氏基因治療：臨床前概念驗證研究設計*

【0152】 在GAA基因剔除(GAA KO)小鼠中，使用高劑量，進行臨床前研究，以用於構築體之初始比較。構築體顯示於圖16中。小鼠用媒劑或兩個構築體(天然hGAA或工程改造hGAA)中之一者處理。向小鼠投與5e11 gc/小鼠(大致2.5e13 gc/kg)。使用2月齡之GAA基因剔除小鼠。正常(野生型)小鼠用作對照。研究設計概述於圖17中。

【0153】 *龐培氏基因治療：血漿*

【0154】 如所指示自野生型(正常)小鼠或用媒劑或基因治療載體處理之GAA KO小鼠收集血漿，且量測GAA活性及細胞表面結合。資料概述於圖18、圖29及圖20中。在用基因治療載體處理之小鼠看見類似高GAA水準(圖18、圖19)。然而，工程改造構築體觀測到較高細胞靶向受體結合(圖20)。

【0155】 *龐培氏基因治療：四頭肌*

【0156】 在正常(野生型)小鼠及經處理GAA KO小鼠中評定GAA活性及肝醣儲存/細胞質空泡化(圖30)。四頭肌中之GAA活性約高於野生型的20倍。亦評定肝醣PAS (圖31)及免疫組織化學(圖32)。免疫組織化學顯示相較於野生型，工程改造hGAA具有更高溶酶體靶向。藉由PAS染色，工程改造hGAA之肝醣降低更恆定。

【0157】 *龐培氏基因治療：三頭肌*

【0158】 在正常(野生型)小鼠及經處理GAA KO小鼠中評定GAA活性及肝醣儲存/細胞質空泡化(圖33)。GAA活性約高於野生型的10-15倍。亦評定免疫組織化學及肝醣PAS(圖34及圖35)。免疫組織化學說明相較於野生型GAA，工程改造hGAA具有更高溶酶體靶向。如藉由PAS染色所量測，工程改造hGAA之肝醣降低更恆定。

【0159】 *龐培氏基因治療：脛前(TA)*

【0160】 在正常(野生型)小鼠及經處理GAA KO小鼠中評定GAA活性及肝醣儲存/細胞質空泡化(圖21)。TA中之GAA活性約高於野生型的15-20倍。亦評定免疫組織化學及肝醣PAS(圖22及圖23)。免疫組織化學說明相較於野生型GAA，工程改造hGAA具有更高溶酶體靶向。肝醣水準接近於野生型水準。藉由PAS染色，工程改造hGAA之肝醣降低更恆定。

【0161】 *龐培氏基因治療：大腦及脊髓*

【0162】 在正常(野生型)小鼠及經處理GAA KO小鼠中評定GAA活性、肝醣含量及肝醣儲存/細胞質空泡化(圖24及圖27)。大腦中之GAA活性約低於野生型的5倍。亦評定免疫組織化學及肝醣PAS(圖25、圖26、圖28、圖29)。免疫組織化學指示，可存在直接轉導一些細胞。然而，天然構築體獲得極少至無肝醣清除。工程改造構築體之肝醣水準接近於野生型水準，即使活性僅為野生型之20%。脊髓中之PAS染色顯示天然構築體極少至無肝醣清除。在包括運動神經元之下角中，觀測到工程改造構築體接近於野生型之肝醣水準。免疫組織化學表明脊髓神經元中之直接轉導。由脈絡叢及神經元細胞產生之工程改造hGAA能夠藉由脊髓中之交叉校正而降低肝醣，而對於天然hGAA觀測到極少肝醣降低。

【0163】 *結論*

【0164】 總而言之，此實例中中之資料表明，工程改造基因治療構築體比習知治療中使用之野生型GAA具有大大更佳的吸收至組織中的吸收及肝醣降低，包括大腦及脊髓中之效果。

【0165】 雖然本文已顯示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將明白，此等實施例僅藉助於實例提供。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將想到諸多變化、變更及取代。應理解，可採用本文所描述之實施例的各種替代方案。預期以下申請專利範圍界定本發明之範疇，且由此覆蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內之方法及結構。

【符號說明】

【0166】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【補充序列表】

<110> 美商阿米庫斯醫療股份有限公司(Amicus Therapeutics, Inc.)

<120> 基因治療構築體及使用方法

<130> 36003-701

<140> 108115137
<141> 2019-04-30

<150> US 62/744,068
<151> 2018-10-10

<150> US 62/688,640
<151> 2018-06-22

<150> US 62/664,741
<151> 2018-04-30

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 67
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 2
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 2
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Ser Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 3
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 3
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 4
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 4
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Leu Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 5
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 5
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Thr
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 6
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 6
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Ser Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 7

<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 7
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ile Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 8
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 8
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 9
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 9
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 10
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 10
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Ser Leu Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Leu Glu Glu Cys Cys Thr
35 40 45

Ser Ile Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 11
<211> 61
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 11
Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg

20 25 30

Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala
35 40 45

Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu
50 55 60

<210> 12
<211> 190
<212> DNA
<213> 麻痺病毒屬(Cripavirus sp.)

<400> 12
aaaaatgtga tcttgcttgt aaatacaatt ttgagaggtt aataaattac aagtagtgct 60

atttttgtat ttaggttagc tatttagctt tacgttccag gatgcctagt ggcagcccca 120

caatatccag gaagccctct ctgcggtttt tcagattagg tagtcgaaaa acctaagaaa 180

tttacctgct 190

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
1 5 10 15

Arg Ala

<210> 14
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 14
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val
1 5 10 15

Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala
20 25

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 15
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala
20 25

<210> 16
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 16
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala
20 25

<210> 17
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 17
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Arg Ala
20 25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 18
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 19
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 20
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 22
<211> 952
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22
Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu

645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 23
<211> 982
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 23
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
1 5 10 15

Arg Ala Ser Arg Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln
20 25 30

Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg
35 40 45

Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser
50 55 60

Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser
65 70 75 80

Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Pro Gly Pro Arg
85 90 95

Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys
100 105 110

Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile
115 120 125

Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys
130 135 140

Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro
145 150 155 160

Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met
165 170 175

Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys

180 185 190

Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg
195 200 205

Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro
210 215 220

Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser
225 230 235 240

Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu
245 250 255

Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala
260 265 270

Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr
275 280 285

Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr
290 295 300

Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn
305 310 315 320

Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser
325 330 335

Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu
340 345 350

Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp
355 360 365

Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr
370 375 380

Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly
385 390 395 400

Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln
405 410 415

Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp
420 425 430

Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys
435 440 445

```
Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly
    450                 455                 460

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

Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val
                485                 490                 495

Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro
            500                 505                 510

Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp
        515                 520                 525

Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly
    530                 535                 540

Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu
545                 550                 555                 560

Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly
                565                 570                 575

Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His
            580                 585                 590

Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr
        595                 600                 605

Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg
    610                 615                 620

Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala
625                 630                 635                 640

Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser
                645                 650                 655

Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val
            660                 665                 670

Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys
        675                 680                 685

Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His
    690                 695                 700

Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro
705                 710                 715                 720
```

Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu
725 730 735

Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr
740 745 750

Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp
755 760 765

Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro
770 775 780

Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly
785 790 795 800

Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu
805 810 815

Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly
820 825 830

Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu
835 840 845

Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr
850 855 860

Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly
865 870 875 880

Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu
885 890 895

Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn
900 905 910

Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly
915 920 925

Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln
930 935 940

Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro
945 950 955 960

Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln
965 970 975

Phe Leu Val Ser Trp Cys
980

<210> 24
<211> 306
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

```
Met Ala Ser Pro Gly Cys Leu Trp Leu Leu Ala Val Ala Leu Leu Pro
1               5                  10                  15

Trp Thr Cys Ala Ser Arg Ala Leu Gln His Leu Asp Pro Pro Ala Pro
            20                  25                  30

Leu Pro Leu Val Ile Trp His Gly Met Gly Asp Ser Cys Cys Asn Pro
        35                  40                  45

Leu Ser Met Gly Ala Ile Lys Lys Met Val Glu Lys Lys Ile Pro Gly
    50                  55                  60

Ile Tyr Val Leu Ser Leu Glu Ile Gly Lys Thr Leu Met Glu Asp Val
65                  70                  75                  80

Glu Asn Ser Phe Phe Leu Asn Val Asn Ser Gln Val Thr Thr Val Cys
                85                  90                  95

Gln Ala Leu Ala Lys Asp Pro Lys Leu Gln Gln Gly Tyr Asn Ala Met
            100                 105                 110

Gly Phe Ser Gln Gly Gly Gln Phe Leu Arg Ala Val Ala Gln Arg Cys
        115                 120                 125

Pro Ser Pro Pro Met Ile Asn Leu Ile Ser Val Gly Gly Gln His Gln
    130                 135                 140

Gly Val Phe Gly Leu Pro Arg Cys Pro Gly Glu Ser Ser His Ile Cys
145                 150                 155                 160

Asp Phe Ile Arg Lys Thr Leu Asn Ala Gly Ala Tyr Ser Lys Val Val
                165                 170                 175

Gln Glu Arg Leu Val Gln Ala Glu Tyr Trp His Asp Pro Ile Lys Glu
            180                 185                 190

Asp Val Tyr Arg Asn His Ser Ile Phe Leu Ala Asp Ile Asn Gln Glu
        195                 200                 205

Arg Gly Ile Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Asn Leu Met Ala Leu Lys Lys
    210                 215                 220

Phe Val Met Val Lys Phe Leu Asn Asp Ser Ile Val Asp Pro Val Asp
225                 230                 235                 240
```

Ser Glu Trp Phe Gly Phe Tyr Arg Ser Gly Gln Ala Lys Glu Thr Ile
245 250 255

Pro Leu Gln Glu Thr Ser Leu Tyr Thr Gln Asp Arg Leu Gly Leu Lys
260 265 270

Glu Met Asp Asn Ala Gly Gln Leu Val Phe Leu Ala Thr Glu Gly Asp
275 280 285

His Leu Gln Leu Ser Glu Glu Trp Phe Tyr Ala His Ile Ile Pro Phe
290 295 300

Leu Gly
305

<210> 25
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 25
Met Ala Ser Pro Gly Cys Leu Trp Leu Leu Ala Val Ala Leu Leu Pro
1 5 10 15

Trp Thr Cys Ala Ser Arg Ala Leu Gln His Leu Ser Arg Thr Leu Cys
20 25 30

Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly
35 40 45

Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly
50 55 60

Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu
65 70 75 80

Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Asp Pro Pro Ala
100 105 110

Pro Leu Pro Leu Val Ile Trp His Gly Met Gly Asp Ser Cys Cys Asn
115 120 125

Pro Leu Ser Met Gly Ala Ile Lys Lys Met Val Glu Lys Lys Ile Pro
130 135 140

Gly Ile Tyr Val Leu Ser Leu Glu Ile Gly Lys Thr Leu Met Glu Asp
145 150 155 160

Val Glu Asn Ser Phe Phe Leu Asn Val Asn Ser Gln Val Thr Thr Val
165 170 175

Cys Gln Ala Leu Ala Lys Asp Pro Lys Leu Gln Gln Gly Tyr Asn Ala
180 185 190

Met Gly Phe Ser Gln Gly Gly Gln Phe Leu Arg Ala Val Ala Gln Arg
195 200 205

Cys Pro Ser Pro Pro Met Ile Asn Leu Ile Ser Val Gly Gly Gln His
210 215 220

Gln Gly Val Phe Gly Leu Pro Arg Cys Pro Gly Glu Ser Ser His Ile
225 230 235 240

Cys Asp Phe Ile Arg Lys Thr Leu Asn Ala Gly Ala Tyr Ser Lys Val
245 250 255

Val Gln Glu Arg Leu Val Gln Ala Glu Tyr Trp His Asp Pro Ile Lys
260 265 270

Glu Asp Val Tyr Arg Asn His Ser Ile Phe Leu Ala Asp Ile Asn Gln
275 280 285

Glu Arg Gly Ile Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Asn Leu Met Ala Leu Lys
290 295 300

Lys Phe Val Met Val Lys Phe Leu Asn Asp Ser Ile Val Asp Pro Val
305 310 315 320

Asp Ser Glu Trp Phe Gly Phe Tyr Arg Ser Gly Gln Ala Lys Glu Thr
325 330 335

Ile Pro Leu Gln Glu Thr Ser Leu Tyr Thr Gln Asp Arg Leu Gly Leu
340 345 350

Lys Glu Met Asp Asn Ala Gly Gln Leu Val Phe Leu Ala Thr Glu Gly
355 360 365

Asp His Leu Gln Leu Ser Glu Glu Trp Phe Tyr Ala His Ile Ile Pro
370 375 380

Phe Leu Gly
385

<210> 26
<211> 387
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 26

```
Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ala
1               5                  10                  15

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

Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly
        35                  40                  45

Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly
    50                  55                  60

Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                85                  90                  95

Gly Gly Gly Ser Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Asp Pro Pro Ala
            100                 105                 110

Pro Leu Pro Leu Val Ile Trp His Gly Met Gly Asp Ser Cys Cys Asn
        115                 120                 125

Pro Leu Ser Met Gly Ala Ile Lys Lys Met Val Glu Lys Lys Ile Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Tyr Val Leu Ser Leu Glu Ile Gly Lys Thr Leu Met Glu Asp
145                 150                 155                 160

Val Glu Asn Ser Phe Phe Leu Asn Val Asn Ser Gln Val Thr Thr Val
                165                 170                 175

Cys Gln Ala Leu Ala Lys Asp Pro Lys Leu Gln Gln Gly Tyr Asn Ala
            180                 185                 190

Met Gly Phe Ser Gln Gly Gly Gln Phe Leu Arg Ala Val Ala Gln Arg
        195                 200                 205

Cys Pro Ser Pro Pro Met Ile Asn Leu Ile Ser Val Gly Gly Gln His
    210                 215                 220

Gln Gly Val Phe Gly Leu Pro Arg Cys Pro Gly Glu Ser Ser His Ile
225                 230                 235                 240
```

Cys Asp Phe Ile Arg Lys Thr Leu Asn Ala Gly Ala Tyr Ser Lys Val
245 250 255

Val Gln Glu Arg Leu Val Gln Ala Glu Tyr Trp His Asp Pro Ile Lys
260 265 270

Glu Asp Val Tyr Arg Asn His Ser Ile Phe Leu Ala Asp Ile Asn Gln
275 280 285

Glu Arg Gly Ile Asn Glu Ser Tyr Lys Lys Asn Leu Met Ala Leu Lys
290 295 300

Lys Phe Val Met Val Lys Phe Leu Asn Asp Ser Ile Val Asp Pro Val
305 310 315 320

Asp Ser Glu Trp Phe Gly Phe Tyr Arg Ser Gly Gln Ala Lys Glu Thr
325 330 335

Ile Pro Leu Gln Glu Thr Ser Leu Tyr Thr Gln Asp Arg Leu Gly Leu
340 345 350

Lys Glu Met Asp Asn Ala Gly Gln Leu Val Phe Leu Ala Thr Glu Gly
355 360 365

Asp His Leu Gln Leu Ser Glu Glu Trp Phe Tyr Ala His Ile Ile Pro
370 375 380

Phe Leu Gly
385

<210> 27
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成寡核苷酸之描述

<400> 27
gccrccatgg 10

<210> 28
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成寡核苷酸之描述

<220>
<221> modified_base
<222> (2)..(3)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 28
annatga 7

<210> 29
<211> 7
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成寡核苷酸之描述

<400> 29
aagatga 7

<210> 30
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 30
Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp
1 5 10 15

Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser
20 25 30

Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu
35 40 45

Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu
50 55 60

<210> 31
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 31
Ser Arg Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val
1 5 10 15

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser
20 25 30

Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
35 40 45

Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu

50 55 60

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Gaussia princeps

<400> 32
Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 33
Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser
1 5

<210> 34
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 34
Ser Arg Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val
1 5 10 15

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Leu Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser
20 25 30

Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp
35 40 45

Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu
50 55 60

<210> 35
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 35

Ala Tyr Arg Pro Ser Arg Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 36
<211> 189
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 36
tctagaacac tgtgcggagg ggagcttgta gacactcttc agttcgtgtg tggagatcgc 60

gggttcctct tctctcgccc cgcttccaga gtttcacgga ggtctagggg tatagtagag 120

gagtgttgtt tcaggtcctg tgacttggcg ctcctcgaga cctattgcgc gacgccagcc 180

aggtccgaa 189

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成肽之描述

<400> 37
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 38
<211> 2954
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<220>
<221> modified_base
<222> (869)..(869)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 38

gcaagatgaa gctctccctg gtggccgcga tgctgctgct gctcagcgcg gcgcgggcct 60

ctagaacact gtgcggaggg gagcttgtag acactcttca gttcgtgtgt ggagatcgcg 120

ggttcctctt ctctcgcccc gcttccagag tttcacggag gtctaggggt atagtagagg 180

agtgttgttt caggtcctgt gacttggcgc tcctcgagac ctattgcgcg acgccagcca 240

ggtccgaagg gggcggtggc tcaggtggtg gaggtagcag accagggccc cgggatgccc 300

aggcacaccc cggccgtccc agagcagtgc ccacacagtg cgacgtcccc cccaacagcc 360

gcttcgattg cgcccctgac aaggccatca cccaggaaca gtgcgaggcc cgcggctgtt 420

gctacatccc tgcaaagcag gggctgcagg gagcccagat ggggcagccc tggtgcttct 480

tcccacccag ctaccccagc tacaagctgg agaacctgag ctcctctgaa atgggctaca 540

cggccaccct gacccgtacc acccccacct tcttccccaa ggacatcctg accctgcggc 600

tggacgtgat gatggagact gagaaccgcc tccacttcac gatcaaagat ccagctaaca 660

ggcgctacga ggtgcccttg gagaccccgc atgtccacag ccgggcaccg tccccactct 720

acagcgtgga gttctccgag gagcccttcg gggtgatcgt gcgccggcag ctggacggcc 780

gcgtgctgct gaacacgacg gtggcgcccc tgttctttgc ggaccagttc cttcagctgt 840

ccacctcgct gccctcgcag tatatcacng gcctcgccga gcacctcagt cccctgatgc 900

tcagcaccag ctggaccagg atcaccctgt ggaaccggga ccttgcgccc acgcccggtg 960

cgaacctcta cgggtctcac cctttctacc tggcgctgga ggacggcggg tcggcacacg 1020

gggtgttcct gctaaacagc aatgccatgg atgtggtcct gcagccgagc cctgccctta 1080

gctggaggtc gacaggtggg atcctggatg tctacatctt cctgggccca gagcccaaga 1140

gcgtggtgca gcagtacctg gacgttgtgg gatacccgtt catgccgcca tactggggcc 1200

tgggcttcca cctgtgccgc tggggctact cctccaccgc tatcacccgc caggtggtgg 1260

agaacatgac cagggcccac ttccccctgg acgtccagtg gaacgacctg gactacatgg 1320

actcccggag ggacttcacg ttcaacaagg atggcttccg ggacttcccg gccatggtgc 1380

aggagctgca ccagggcggc cggcgctaca tgatgatcgt ggatcctgcc atcagcagct 1440

cgggccctgc cgggagctac aggccctacg acgagggtct gcggaggggg gttttcatca 1500

ccaacgagac cggccagccg ctgattggga aggtatggcc cgggtccact gccttccccg 1560

acttcaccaa ccccacagcc ctggcctggt gggaggacat ggtggctgag ttccatgacc 1620

aggtgccctt cgacggcatg tggattgaca tgaacgagcc ttccaacttc atcaggggct 1680

ctgaggacgg ctgccccaac aatgagctgg agaacccacc ctacgtgcct ggggtggttg 1740

gggggaccct ccaggcggcc accatctgtg cctccagcca ccagtttctc tccacacact 1800

acaacctgca caacctctac ggcctgaccg aagccatcgc ctcccacagg gcgctggtga 1860

aggctcgggg gacacgccca tttgtgatct cccgctcgac ctttgctggc cacggccgat 1920

acgccggcca ctggacgggg gacgtgtgga gctcctggga gcagctcgcc tcctccgtgc 1980

cagaaatcct gcagtttaac ctgctggggg tgcctctggt cggggccgac gtctgcggct 2040

tcctgggcaa cacctcagag gagctgtgtg tgcgctggac ccagctgggg gccttctacc 2100

ccttcatgcg gaaccacaac agcctgctca gtctgcccca ggagccgtac agcttcagcg 2160

agccggccca gcaggccatg aggaaggccc tcaccctgcg ctacgcactc ctcccccacc 2220

tctacacact gttccaccag gcccacgtcg cgggggagac cgtggcccgg ccctcttcc 2280

tggagttccc caaggactct agcacctgga ctgtggacca ccagctcctg tgggggggagg 2340

ccctgctcat caccccagtg ctccaggccg ggaaggccga agtgactggc tacttccct 2400

tgggcacatg gtacgacctg cagacggtgc cagtagaggc ccttggcagc ctcccacccc 2460

cacctgcagc tccccgtgag ccagccatcc acagcgaggg gcagtgggtg acgctgccgg 2520

ccccctgga caccatcaac gtccacctcc gggctgggta catcatcccc ctgcagggcc 2580

ctggcctcac aaccacagag tcccgccagc agcccatggc cctggctgtg gccctgacca 2640

agggtgggga ggcccgaggg gagctgttct gggacgatgg agagagcctg gaagtgctgg 2700

agcgaggggc ctacacacag gtcatcttcc tggccaggaa taacacgatc gtgaatgagc 2760

tggtacgtgt gaccagtgag ggagctggcc tgcagctgca gaaggtgact gtcctgggcg 2820

tggccacggc gccccagcag gtcctctcca acggtgtccc tgtctccaac ttcacctaca 2880

gccccgacac caaggtcctg gacatctgtg tctcgctgtt gatgggagag cagtttctcg 2940

tcagctggtg ttag 2954

<210> 39
<211> 3139
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 39
aaaaatgtga tcttgcttgt aaatacaatt ttgagaggtt aataaattac aagtagtgct 60

atttttgtat ttaggttagc tatttagctt tacgttccag gatgcctagt ggcagcccca 120

caatatccag gaagccctct ctgcggtttt tcagattagg tagtcgaaaa acctaagaaa 180

tttacctgct atgaagctct ccctggtggc cgcgatgctg ctgctgctca gcgcggcgcg 240

ggcctctaga acactgtgcg gaggggagct tgtagacact cttcagttcg tgtgtggaga 300

tcgcgggttc ctcttctctc gccccgcttc cagagtttca cggaggtcta ggggtatagt 360

agaggagtgt tgtttcaggt cctgtgactt ggcgctcctc gagacctatt gcgcgacgcc 420

agccaggtcc gaaggggggcg gtggctcagg tggtggaggt agcagaccag ggccccgggga 480

tgcccaggca cacccggcc gtcccagagc agtgcccaca cagtgcgacg tccccccaa 540

cagccgcttc gattgcgccc ctgacaaggc catcacccag gaacagtgcg aggcccgcgg 600

ctgttgctac atccctgcaa agcaggggct gcagggagcc cagatggggc agccctggtg 660

cttcttccca cccagctacc ccagctacaa gctggagaac ctgagctcct ctgaaatggg 720

ctacacggcc accctgaccc gtaccacccc caccttcttc cccaaggaca tcctgaccct 780

gcggctggac gtgatgatgg agactgagaa ccgcctccac ttcacgatca aagatccagc 840

taacaggcgc tacgaggtgc ccttggagac cccgcatgtc cacagccggg caccgtcccc 900

actctacagc gtggagttct ccgaggagcc cttcggggtg atcgtgcgcc ggcagctgga 960

cggccgcgtg ctgctgaaca cgacggtggc gcccctgttc tttgcggacc agttccttca 1020

gctgtccacc tcgctgccct cgcagtatat cacaggcctc gccgagcacc tcagtcccct 1080

gatgctcagc accagctgga ccaggatcac cctgtggaac cgggaccttg cgcccacgcc 1140

cggtgcgaac ctctacgggt ctcacccttt ctacctggcg ctggaggacg gcgggtcggc 1200

acacggggtg ttcctgctaa acagcaatgc catggatgtg gtcctgcagc cgagccctgc 1260

ccttagctgg aggtcgacag gtgggatcct ggatgtctac atcttcctgg gcccagagcc 1320

caagagcgtg gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac ccgttcatgc cgccatactg 1380

gggcctgggc ttccacctgt gccgctgggg ctactcctcc accgctatca cccgccaggt 1440

ggtggagaac atgaccaggg cccacttccc cctggacgtc cagtggaacg acctggacta 1500

catggactcc cggagggact tcacgttcaa caaggatggc ttccgggact tcccggccat 1560

ggtgcaggag ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg atcgtggatc ctgccatcag 1620

cagctcgggc cctgccggga gctacaggcc ctacgacgag ggtctgcgga gggggtttt 1680

catcaccaac gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta tggcccgggt ccactgcctt 1740

ccccgacttc accaacccca cagccctggc ctggtgggag gacatggtgg ctgagttcca 1800

tgaccaggtg cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac gagccttcca acttcatcag 1860

gggctctgag gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac ccaccctacg tgcctggggt 1920

ggttgggggg accctccagg cggccaccat ctgtgcctcc agccaccagt ttctctccac 1980

acactacaac ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc atcgcctccc acagggcgct 2040

ggtgaaggct cgggggacac gcccatttgt gatctcccgc tcgacctttg ctggccacgg 2100

ccgatacgcc ggccactgga cgggggacgt gtggagctcc tgggagcagc tcgcctcctc 2160

cgtgccagaa atcctgcagt ttaacctgct gggggtgcct ctggtcgggg ccgacgtctg 2220

cggcttcctg ggcaacacct cagaggagct gtgtgtgcgc tggacccagc tgggggcctt 2280

ctacccctte atgcggaacc acaacagcct gctcagtctg ccccaggagc cgtacagctt 2340

cagcgagccg gcccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc ctgcgctacg cactcctccc 2400

ccacctctac acactgttcc accaggccca cgtcgcgggg gagaccgtgg cccggcccct 2460

cttcctggag ttccccaagg actctagcac ctggactgtg gaccaccagc tcctgtgggg 2520

ggaggccctg ctcatcaccc cagtgctcca ggccgggaag gccgaagtga ctggctactt 2580

cccccttgggc acatggtacg acctgcagac ggtgccagta gaggcccttg gcagcctccc 2640

acccccacct gcagctcccc gtgagccagc catccacagc gaggggcagt gggtgacgct 2700

gccggccccc ctggacacca tcaacgtcca cctccgggct gggtacatca tccccctgca 2760

gggccctggc ctcacaacca cagagtcccg ccagcagccc atggccctgg ctgtggccct 2820

gaccaagggt ggggaggccc gaggggagct gttctgggac gatggagaga gcctggaagt 2880

gctggagcga ggggcctaca cacaggtcat cttcctggcc aggaataaca cgatcgtgaa 2940

tgagctggta cgtgtgacca gtgagggagc tggcctgcag ctgcagaagg tgactgtcct 3000

gggcgtggcc acggcgcccc agcaggtcct ctccaacggt gtccctgtct ccaacttcac 3060

ctacagcccc gacaccaagg tcctggacat ctgtgtctcg ctgttgatgg gagagcagtt 3120

tctcgtcagc tggtgttag 3139

<210> 40
<211> 921
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 40
atggcatcac cgggttgcct ctggttgttg gccgttgcgt tgcttccgtg gacatgtgca 60

tcaagagctc ttcaacatct ggatccccca gctcccctgc cgctcgtaat ctggcacggg 120

atgggggatt catgttgtaa cccgttgtca atgggcgcga taaaaaagat ggttgaaaag 180

aagattccag gcatctacgt tctgtccctg gaaatcggta agacactgat ggaagacgtg 240

gagaactcct tctttctcaa cgtcaatagt caggtcacta ccgtctgtca agcattggca 300

aaggacccta aacttcagca ggggtacaat gcgatggggt ttagccaggg cggacagttt 360

cttagagccg tcgcacagcg ctgtccatct cccccgatga ttaaccttat atctgtcggg 420

ggacaacacc agggtgtttt tggtcttcct cgctgtcctg gtgaaagctc ccacatctgt 480

gatttcatac gcaaaacgtt gaacgcagga gcttatagta aagtcgtcca agaacggctt 540

gttcaagcgg agtattggca tgacccaata aaagaagacg tttataggaa tcactctatc 600

ttcttggccg atatcaacca agaacgcgga atcaacgaaa gctacaaaaa gaatcttatg 660

gctctcaaga aatttgttat ggtgaaattc cttaatgact ctatagtaga tcctgtcgat 720

tcagaatggt tcgggttcta caggtctggc caggcgaagg agactattcc cctccaagaa 780

acgtctctct atacacaaga cagactcgga ctgaaagaga tggataatgc gggccagttg 840

gtcttcttgg ctacggaagg cgatcatctc caactctccg aagagtggtt ctatgcccat 900

ataatcccgt tcctgggcta a 921

<210> 41
<211> 1164
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 41
atggcatccc ccggatgttt gtggctgctg gcggttgcgc ttctgccatg gacgtgcgcc 60

tcccgagccc tccaacacct gtccaggaca ctttgcggcg gagagttggt cgatacgctt 120

caattcgtgt gtggggatag aggcttcctt ttttctcggc ccgctagccg cgtgtcccga 180

aggtcccggg gtatcgttga ggaatgctgt ttccggtcct gcgatcttgc actgttggag 240

acatactgtg ctacgcctgc gagaagcgag ggtggagggg gttctggagg tggagggagc 300

cggcctcggg cggttcccac ccaggatcct ccagctcctc tgcctctggt catctggcat 360

gggatggggg actcatgttg taacccgctg agtatggggg caattaaaaa aatggttgaa 420

aagaaaattc caggtattta tgtcctctct cttgaaatcg gtaagacact tatggaggat 480

gtggaaaact ccttttttcct taatgtcaat tctcaggtca caacagtttg tcaggctctg 540

gcgaaggatc ctaagctgca gcaaggctac aacgccatgg gtttttccca gggaggccaa 600

tttctcagag cggtagctca gcgatgtcca tcaccaccga tgataaatct gatcagtgtc 660

ggcggacaac accagggagt tttcgggctg cccaggtgtc cgggggaatc tagtcacata 720

tgtgacttca ttcgcaagac ccttaacgcc ggcgcttact caaaggtggt tcaagaacgg 780

cttgtgcagg ctgaatactg gcacgatccc atcaaggaag atgtatatag gaaccacagt 840

atctttctgg cagacataaa tcaggaaagg ggtattaacg aaagctacaa gaaaaatctc 900

atggccctga agaaatttgt aatggttaag tttttgaacg attctatagt agatcctgtt 960

gactccgagt ggttcgggtt ctatcgatct ggtcaagcca aggagacgat tccgcttcag 1020

gaaacttcac tgtacacaca ggatcggctg ggactcaagg agatggacaa tgcgggccag 1080

ttggtgtttc tggctacaga gggagaccat ctccagttga gtgaagaatg gttctatgca 1140

catattatcc cattcctcgg ctaa 1164

<210> 42
<211> 1164
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 42
atgaagctct ccctggtggc cgcgatgctg ctgctgctct gggtggcact gctgctgctc 60

agcgcggcga gggccgccgc gagtcgcacg ttgtgtggag gtgaactcgt cgacaccctt 120

cagttcgtat gtggagatcg cggtttcctc ttctcacgcc cagcttccag agtttcccga 180

agatcacgag gaatagttga ggagtgctgt tttcggtctt gtgatctggc tctcctcgag 240

acttattgtg ctacgccggc ccgctctgaa ggaggtggtg gcagtggagg aggagggagt 300

cggcctaggg cagtcccaac ccaggacccg ccggcgccgc tgccgttggt gatctggcat 360

gggatgggag acagctgttg caatccctta agcatgggtg ctattaaaaa aatggtggag 420

aagaaaatac ctggaattta cgtcttatct ttagagattg ggaagaccct gatggaggac 480

gtggagaaca gcttcttctt gaatgtcaat tcccaagtaa caacagtgtg tcaggcactt 540

gctaaggatc ctaaattgca gcaaggctac aatgctatgg gattctccca gggaggccaa 600

tttctgaggg cagtggctca gagatgccct tcacctccca tgatcaatct gatctcggtt 660

gggggacaac atcaaggtgt ttttggactc cctcgatgcc caggagagag ctctcacatc 720

tgtgacttca tccgaaaaac actgaatgct ggggcgtact ccaaagttgt tcaggaacgc 780

ctcgtgcaag ccgaatactg gcatgacccc ataaaggagg atgtgtatcg caaccacagc 840

atcttcttgg cagatataaa tcaggagcgg ggtatcaatg agtcctacaa gaaaaacctg 900

atggccctga agaagtttgt gatggtgaaa ttcctcaatg attccattgt ggaccctgta 960

gattcggagt ggtttggatt ttacagaagt ggccaagcca aggaaaccat tcccttacag 1020

gagacctccc tgtacacaca ggaccgcctg gggctaaagg aaatggacaa tgcaggacag 1080

ctagtgtttc tggctacaga aggggaccat cttcagttgt ctgaagaatg gttttatgcc 1140

cacatcatac cattccttgg atga 1164

<210> 43
<211> 72
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成多肽之描述

<400> 43

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Leu Cys Gly Gly
1 5 10 15

Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Leu
20 25 30

Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val
35 40 45

Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr
50 55 60

Cys Ala Thr Pro Ala Arg Ser Glu
65 70

<210> 44
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成寡核苷酸之描述

<400> 44
gcaagatg 8

<210> 45
<211> 2864
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列：合成聚核苷酸之描述

<400> 45
gcaagatggg agtgaggcac ccgccctgct cccaccggct cctggccgtc tgcgccctcg 60
tgtccttggc aaccgctgca ctcctggggc acatcctact ccatgatttc ctgctggttc 120
cccgagagct gagtggctcc tccccagtcc tggaggagac tcacccagct caccagcagg 180
gagccagtag accagggccc cgggatgccc aggcacaccc cggccgtccc agagcagtgc 240
ccacacagtg cgacgtcccc cccaacagcc gcttcgattg cgcccctgac aaggccatca 300
cccaggaaca gtgcgaggcc cgcggctgtt gctacatccc tgcaaagcag gggctgcagg 360
gagcccagat ggggcagccc tggtgcttct tcccacccag ctaccccagc tacaagctgg 420
agaacctgag ctcctctgaa atgggctaca cggccaccct gacccgtacc acccccacct 480
tcttccccaa ggacatcctg accctgcggc tggacgtgat gatggagact gagaaccgcc 540
tccacttcac gatcaaagat ccagctaaca ggcgctacga ggtgcccttg gagaccccgc 600
atgtccacag ccgggcaccg tccccactct acagcgtgga gttctccgag gagccccttcg 660
gggtgatcgt gcgccggcag ctggacggcc gcgtgctgct gaacacgacg gtggcgcccc 720
tgttctttgc ggaccagttc cttcagctgt ccacctcgct gccctcgcag tatatcacag 780
gcctcgccga gcacctcagt ccctgatgc tcagcaccag ctggaccagg atcaccctgt 840
ggaaccggga ccttgcgccc acgcccggtg cgaacctcta cgggtctcac cctttctacc 900
tggcgctgga ggacggcggg tcggcacacg gggtgttcct gctaaacagc aatgccatgg 960
atgtggtcct gcagccgagc cctgccctta gctggaggtc gacaggtggg atcctggatg 1020
tctacatctt cctgggccca gagcccaaga gcgtggtgca gcagtacctg gacgttgtgg 1080
gataccgtt catgccgcca tactggggcc tgggcttcca cctgtgccgc tggggctact 1140
cctccaccgc tatcacccgc caggtggtgg agaacatgac cagggcccac ttccccctgg 1200
acgtccagtg gaacgacctg gactacatgg actcccggag ggacttcacg ttcaacaagg 1260
atggcttccg ggacttcccg gccatggtgc aggagctgca ccagggcggc cggcgctaca 1320
tgatgatcgt ggatcctgcc atcagcagct cgggccctgc cgggagctac aggccctacg 1380
acgagggtct gcggaggggg gttttcatca ccaacgagac cggccagccg ctgattggga 1440
aggtatggcc cgggtccact gccttccccg acttcaccaa ccccacagcc ctggcctggt 1500
gggaggacat ggtggctgag ttccatgacc aggtgccctt cgacggcatg tggattgaca 1560

tgaacgagcc ttccaacttc atcaggggct ctgaggacgg ctgccccaac aatgagctgg 1620

agaacccacc ctacgtgcct ggggtggttg gggggaccct ccaggcggcc accatctgtg 1680

cctccagcca ccagtttctc tccacacact acaacctgca caacctctac ggcctgaccg 1740

aagccatcgc ctcccacagg gcgctggtga aggctcgggg gacacgccca tttgtgatct 1800

cccgctcgac ctttgctggc cacggccgat acgccggcca ctggacgggg gacgtgtgga 1860

gctcctggga gcagctcgcc tcctccgtgc cagaaatcct gcagtttaac ctgctggggg 1920

tgcctctggt cggggccgac gtctgcggct tcctgggcaa cacctcagag gagctgtgtg 1980

tgcgctggac ccagctgggg gccttctacc ccttcatgcg gaaccacaac agcctgctca 2040

gtctgcccca ggagccgtac agcttcagcg agccggccca gcaggccatg aggaaggccc 2100

tcaccctgcg ctacgcactc ctccccccacc tctacacact gttccaccag gcccacgtcg 2160

cgggggagac cgtggcccgg cccctcttcc tggagttccc caaggactct agcacctgga 2220

ctgtggacca ccagctcctg tgggggggagg ccctgctcat caccccagtg ctccaggccg 2280

ggaaggccga agtgactggc tacttccccct tgggcacatg gtacgacctg cagacggtgc 2340

cagtagaggc ccttggcagc ctcccacccc cacctgcagc tccccgtgag ccagccatcc 2400

acagcgaggg gcagtgggtg acgctgccgg ccccccctgga caccatcaac gtccacctcc 2460

gggctgggta catcatcccc ctgcagggcc ctggcctcac aaccacagag tcccgccagc 2520

agcccatggc cctggctgtg gccctgacca agggtgggga ggcccgaggg gagcttttct 2580

gggacgatgg agagagcctg gaagtgctgg agcgaggggc ctacacacag gtcatcttcc 2640

tggccaggaa taacacgatc gtgaatgagc tggtacgtgt gaccagtgag ggagctggcc 2700

tgcagctgca gaaggtgact gtcctgggcg tggccacggc gccccagcag gtcctctcca 2760

acggtgtccc tgtctccaac ttcacctaca gccccgacac caaggtcctg gacatctgtg 2820

tctcgctgtt gatgggagag cagtttctcg tcagctggtg ttag 2864

<210> 46
<211> 201
<212> DNA
<213> 智人

<400> 46
gcttaccgcc ccagtgagac cctgtgcggc ggggagctgg tggacaccct ccagttcgtc 60

tgtggggacc gcggcttcta cttcagcagg cccgcaagcc gtgtgagccg tcgcagccgt 120

ggcatcgttg aggagtgctg tttccgcagc tgtgacctgg ccctcctgga gacgtactgt 180

gctacccccg ccaagtccga g 201

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體包含：

(a)編碼治療蛋白之核酸序列，及

(b)編碼以高親和力與陽離子非依賴性甘露糖6-磷酸(M6P)受體(CI-MPR)結合之肽的核酸序列。

【請求項2】

如請求項1之基因治療載體，其中該肽為變體IGF2 (vIGF2)肽。

【請求項3】

如請求項2之基因治療載體，其中該vIGF2肽包含與SEQ ID NO: 1至少90%一致且在選自由以下組成之群之一或多個位置處具有至少一個取代的胺基酸序列：SEQ ID NO: 1之位置6、26、27、43、48、49、50、54、55及65。

【請求項4】

如請求項3之基因治療載體，其中該至少一個取代係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R及K65R。

【請求項5】

如請求項3至4之基因治療載體，其中該vIGF2肽包含在選自由以下組成之群之兩個或更多個位置處之至少兩個取代：SEQ ID NO: 1之位置26、27、43、48、49、50、54及55。

【請求項6】

如請求項5之基因治療載體，其中該至少兩個取代係選自由以下組成

之群：SEQ ID NO: 1之E6R、F26S、Y27L、V43L、F48T、R49S、S50I、A54R、L55R及K65R。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之基因治療載體，其中該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1處之N端缺失。

【請求項8】

如請求項7之基因治療載體，其中該vIGF2肽包含在SEQ ID NO: 1之位置1至4處之N端缺失。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之基因治療載體，其中相較於原生IGF2肽，該vIGF2肽針對胰島素受體及IGFR1具有降低的親和力或無親和力。

【請求項10】

如請求項9之基因治療載體，其中該vIGF2肽能夠促進將該治療蛋白吸收至細胞中之溶酶體中。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之基因治療載體，其中該治療蛋白能夠置換患有遺傳病症個體中與該遺傳病症相關之缺陷或缺乏蛋白質。

【請求項12】

如請求項11之基因治療載體，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項13】

如請求項11或請求項12之基因治療載體，其中該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病(Batten disease)、胱胺酸症、法布立病(Fabry disease)、I型戈謝病(Gaucher disease type I)、II

型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病(Pompe disease)、泰-薩克斯病(Tay Sachs disease)、桑多霍夫病(Sandhoff disease)、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病(Hurler disease)、亨特病(Hunter disease)、A型聖菲利波病(Sanfilippo disease type A)、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病(Morquio disease type A)、B型莫奎病、馬羅托-拉米病(Maroteau-Lamy disease)、斯利病(Sly disease)、A型尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease type A)、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病(Schindler disease type I)、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)、CDKL5缺陷病及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項14】

如請求項11或請求項12之基因治療載體，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項15】

如請求項11或請求項12之基因治療載體，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之基因治療載體，其中該治療蛋白包含選自由以下組成之群之酶：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙

醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。

【請求項17】

如請求項16之基因治療載體，其中該治療蛋白為α-葡糖苷酶。

【請求項18】

如請求項16之基因治療載體，其中該治療蛋白為軟脂醯基蛋白質硫酯酶。

【請求項19】

如請求項1之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。

【請求項20】

如請求項19之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含Kozak序列。

【請求項21】

如請求項20之基因治療載體，其中該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。

【請求項22】

如請求項21之基因治療載體，其中X_1包含A。

【請求項23】

如請求項21或請求項22之基因治療載體，其中X_2包含G。

【請求項24】

如請求項21或請求項22之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。

【請求項25】

如請求項20至24中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。

【請求項26】

如請求項20之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項27】

如請求項20或請求項26之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項28】

如請求項1之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含編碼信號肽之信號核酸序列，其中該信號肽能夠相較於無該信號肽之該治療蛋白會增加該治療蛋白之分泌。

【請求項29】

如請求項28之基因治療載體，其中該信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。

【請求項30】

如請求項29之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含與選自由SEQ

ID NO: 13至17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項31】

如請求項29之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群的胺基酸序列。

【請求項32】

如請求項28之基因治療載體，其中該信號肽包含Gaussia信號肽。

【請求項33】

如請求項32之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項34】

如請求項32之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。

【請求項35】

如請求項1至34中任一項之基因治療載體，其中該vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之該核酸序列的5'。

【請求項36】

如請求項1至34中任一項之基因治療載體，其中該vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之該核酸序列的3'。

【請求項37】

如請求項1至36中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含在該vIGF2核苷酸序列與編碼治療蛋白之該核酸序列之間的編碼連接肽的連接子序列。

【請求項38】

如請求項37之基因治療載體，其中該連接肽包含SEQ ID NO: 18至21、SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37。

【請求項39】

如請求項1至38中任一項之基因治療載體，其中該基因治療載體為病毒載體。

【請求項40】

如請求項39之基因治療載體，其中該病毒載體為腺病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、痘病毒載體、牛痘病毒載體或疱疹病毒載體。

【請求項41】

一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至40中任一項之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項42】

如請求項41之醫藥組合物，其中該賦形劑包含非離子性低滲透化合物、緩衝劑、聚合物、鹽或其組合。

【請求項43】

一種用於治療遺傳病症之方法，其包含向有需要之個體投與如請求項1至40中任一項之基因治療載體或如請求項41或請求項42之醫藥組合物。

【請求項44】

如請求項43之方法，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項45】

如請求項43或請求項44之方法，其中該遺傳病症係選自由以下組成

之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)、CDKL5缺陷病及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項46】

如請求項43或請求項44之方法，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項47】

如請求項43或請求項44之方法，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項48】

如請求項43至47中任一項之方法，其中該投與係以鞘內、眼內、玻璃體內、視網膜內、靜脈內、肌肉內、小腦內、顱內、腦實質內(intraperenchymally)、皮下或其組合方式進行。

【請求項49】

如請求項43至47中任一項之方法，其中該投與係以鞘內方式進行。

【請求項50】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至40中任一項之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，以用於治療遺傳病症。

【請求項51】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至40中任一項之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，以用於製備用於治療遺傳病症之藥物。

【請求項52】

如請求項50或請求項51之醫藥組合物，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項53】

如請求項50至52中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)、慢性肉芽腫病(CGD)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項54】

如請求項50至53中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項55】

如請求項50至53中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項56】

如請求項50至55中任一項之醫藥組合物，其中該組合物經調配用於鞘內、眼內、玻璃體內、視網膜內、靜脈內、肌肉內、心室內、顱內、小腦內或皮下投與。

【請求項57】

如請求項50至56中任一項之醫藥組合物，其中該組合物經調配用於鞘內投與。

【請求項58】

一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：

(a)轉譯起始序列，及

(b)編碼治療蛋白之核酸序列。

【請求項59】

如請求項58之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含Kozak序列。

【請求項60】

如請求項59之基因治療載體，其中該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。

【請求項61】

如請求項60之基因治療載體，其中X_1包含A。

【請求項62】

如請求項60或請求項61之基因治療載體，其中X_2包含G。

【請求項63】

如請求項59至62中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含

與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。

【請求項64】

如請求項59至63中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。

【請求項65】

如請求項59之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項66】

如請求項59或請求項65之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項67】

如請求項58至66中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含編碼信號肽之核酸序列，該信號肽能夠相較於無該信號肽之該治療蛋白會增加該治療蛋白的分泌。

【請求項68】

如請求項67之基因治療載體，其中該信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。

【請求項69】

如請求項68之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項70】

如請求項68之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群的胺基酸序列。

【請求項71】

如請求項68之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項72】

如請求項68之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列。

【請求項73】

如請求項58至72中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含內部核糖體進入序列(IRES)。

【請求項74】

如請求項73之基因治療載體，其中該IRES為蟋蟀麻痺病毒(CrPV) IRES。

【請求項75】

如請求項73或請求項74之基因治療載體，其中該IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。

【請求項76】

如請求項73或請求項74之基因治療載體，其中該IRES包含SEQ ID NO: 12。

【請求項77】

一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：

(a)編碼信號肽之核酸序列，及

(b)編碼治療蛋白之核酸序列，其中該信號肽能夠相較於無該信號肽

之該治療蛋白會增加該治療蛋白的分泌。

【請求項78】

如請求項77之基因治療載體，其中該信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。

【請求項79】

如請求項78之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項80】

如請求項78之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群的胺基酸序列。

【請求項81】

如請求項77至80中任一項之基因治療載體，其中該信號肽包含Gaussia信號肽。

【請求項82】

如請求項81之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項83】

如請求項81之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。

【請求項84】

如請求項77至83中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。

【請求項85】

如請求項84之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含Kozak序列，該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。

【請求項86】

如請求項85之基因治療載體，其中X_1包含A。

【請求項87】

如請求項85或請求項86之基因治療載體，其中X_2包含G。

【請求項88】

如請求項85至87中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。

【請求項89】

如請求項85至88中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。

【請求項90】

如請求項84之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項91】

如請求項84或請求項90之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項92】

如請求項77至91中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含內部核糖體進入序列(IRES)。

【請求項93】

如請求項92之基因治療載體，其中該IRES包含選自由以下組成之群之IRES：蟋蟀麻痹病毒(cricket paralysis virus；CrPV) IRES、小核糖核酸病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、卡堡氏(Kaposi's)肉瘤相關疱疹病毒IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、瘟病毒IRES、蟋蟀麻痹病毒(Cripavirus) IRES、禾谷縊管蚜病毒IRES及梅雷克氏(Merek's)病病毒IRES。

【請求項94】

如請求項92或請求項93之基因治療載體，其中該IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。

【請求項95】

如請求項92至94中任一項之基因治療載體，其中該IRES包含SEQ ID NO: 12。

【請求項96】

一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體以5'至3'順序包含：

(a)內部核糖體進入序列(IRES)，及

(b)編碼治療蛋白之核酸序列。

【請求項97】

如請求項96之基因治療載體，其中該IRES包含選自由以下組成之群之IRES：蟋蟀麻痹病毒(cricket paralysis virus；CrPV) IRES、小核糖核酸病毒IRES、口蹄疫病毒IRES、卡堡氏肉瘤相關疱疹病毒IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、瘟病毒IRES、蟋蟀麻痹病毒(Cripavirus) IRES、禾谷縊管蚜病毒IRES及梅雷克氏病病毒IRES。

【請求項98】

如請求項97之基因治療載體，其中該IRES為蟋蟀麻痹病毒(CrPV) IRES。

【請求項99】

如請求項97或請求項98之基因治療載體，其中該IRES包含與SEQ ID NO: 12至少90%一致之核酸序列。

【請求項100】

如請求項97至99中任一項之基因治療載體，其中該IRES包含SEQ ID NO: 12。

【請求項101】

如請求項96至100中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含轉譯起始序列。

【請求項102】

如請求項101之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含Kozak序列，該Kozak序列包含序列AX_1X_2ATGA (SEQ ID NO: 28)，其中X_1及X_2中之每一者為任何核苷酸。

【請求項103】

如請求項102之基因治療載體，其中X_1包含A。

【請求項104】

如請求項102或請求項103之基因治療載體，其中X_2包含G。

【請求項105】

如請求項102至104中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含與AAGATGA (SEQ ID NO: 29)至少90%一致之核酸序列。

【請求項106】

如請求項102至105中任一項之基因治療載體，其中該Kozak序列包含AAGATGA (SEQ ID NO: 29)。

【請求項107】

如請求項101之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項108】

如請求項101或請求項107之基因治療載體，其中該轉譯起始序列包含與GCAAGATG (SEQ ID NO: 44)至少90%一致之核酸序列。

【請求項109】

如請求項96至108中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含編碼信號肽之核酸序列，該信號肽能夠相較於無該信號肽之該治療蛋白會增加該治療蛋白的分泌。

【請求項110】

如請求項107之基因治療載體，其中該信號肽係選自結合免疫球蛋白蛋白(BiP)信號肽及Gaussia信號肽。

【請求項111】

如請求項110之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含與選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

【請求項112】

如請求項110之基因治療載體，其中該BiP信號肽包含選自由SEQ ID NO: 13至17組成之群的胺基酸序列。

【請求項113】

如請求項110之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含與SEQ ID NO: 32至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項114】

如請求項110之基因治療載體，其中該Gaussia信號肽包含SEQ ID NO: 32。

【請求項115】

如請求項58至114中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含編碼IGF2肽之核酸序列。

【請求項116】

如請求項115之基因治療載體，其中該IGF2肽為包含與選自由以下組成之群之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列的vIGF2肽：SEQ ID NO: 1至11、SEQ ID NO: 30至31、SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 35。

【請求項117】

如請求項115之基因治療載體，其中該IGF2肽為包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的vIGF2肽：SEQ ID NO: 1至11、SEQ ID NO: 30至31、SEQ ID NO: 34及SEQ ID NO: 35。

【請求項118】

如請求項115至117中任一項之基因治療載體，其中該vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的5'。

【請求項119】

如請求項115至117中任一項之基因治療載體，其中該vIGF2核酸序列在編碼治療蛋白之核酸序列的3'。

【請求項120】

如請求項115至119中任一項之基因治療載體，其中該核酸構築體進一步包含在該vIGF2核苷酸序列與編碼治療蛋白之該核酸序列之間的編碼連接肽的連接子序列。

【請求項121】

如請求項120之基因治療載體，其中該連接肽包含與SEQ ID NO: 18至21、SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37至少90%一致之胺基酸序列。

【請求項122】

如請求項120之基因治療載體，其中該連接肽包含SEQ ID NO: 18至21、SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 37。

【請求項123】

如請求項58至122中任一項之基因治療載體，其中該治療蛋白係選自由以下組成之群：α-半乳糖苷酶(A或B)、β-半乳糖苷酶、β-己糖苷酶(A或B)、半乳糖神經醯胺酶、芳基硫酸酯酶(A或B)、β-葡糖腦苷脂酶、葡糖腦苷脂酶、溶酶體酸性脂肪酶、溶酶體酶酸性神經磷脂酶、甲醯基甘胺酸生成酶、艾杜糖醛酸酶(例如，α-L)、乙醯基-CoA:α-胺基葡糖苷N-乙醯基轉移酶、葡糖胺聚糖α-L-艾杜糖醛水解酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、N-乙醯基-α-D-胺基葡糖苷酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、半乳胺糖-6-硫酸硫酸酯酶、N-乙醯基半乳胺糖-6-硫酸酯酶、葡糖胺聚糖N-乙醯基半乳胺糖4-硫酸酯酶、β-葡糖醛酸酶、玻尿酸酶、α-N-乙醯基神經胺糖酸苷酶(唾液酸酶)、神經節苷脂唾液酸酶、磷酸轉移酶、α-葡糖苷酶、α-D-甘露糖苷酶、β-D-甘露糖苷酶、天冬胺醯胺基葡萄糖苷酶、α-L-海藻糖苷酶、battenin、軟脂醯基蛋白質硫酯酶及其他貝敦氏相關蛋白(例如，蠟樣質-脂褐質沈積症神經元蛋白6)。

【請求項124】

如請求項123之基因治療載體，其中該治療蛋白為α-半乳糖苷酶。

【請求項125】

如請求項123之基因治療載體，其中該酶為軟脂醯基蛋白質硫酯酶。

【請求項126】

如請求項123之基因治療載體，其中該治療蛋白能夠置換患有遺傳病症中之個體中與該遺傳病症相關之缺陷或缺乏蛋白質。

【請求項127】

如請求項126之基因治療載體，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項128】

如請求項126之基因治療載體，其中該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項129】

如請求項126之基因治療載體，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項130】

如請求項126之基因治療載體，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐

質沈積症。

【請求項131】

如請求項58至130中任一項之基因治療載體，其中該基因治療載體為病毒載體。

【請求項132】

如請求項131之基因治療載體，其中該病毒載體為腺相關病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、痘病毒載體、牛痘病毒載體、腺病毒載體或疱疹病毒載體。

【請求項133】

一種醫藥組合物，其包含(i)治療有效量之如請求項58至132中任一項之基因治療載體及(ii)醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項134】

如請求項133之醫藥組合物，其中該載劑或賦形劑包含非離子性低滲透化合物、緩衝劑、聚合物、鹽或其組合。

【請求項135】

一種用於治療遺傳病症之方法，其包含向有需要之個體投與如請求項58至132中任一項之基因治療載體或如請求項133或請求項134之醫藥組合物。

【請求項136】

如請求項135之方法，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項137】

如請求項135或請求項136之方法，其中該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型

戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項138】

如請求項135或請求項136之方法，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項139】

如請求項135或請求項136之方法，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項140】

如請求項135至139中任一項之方法，其中該投與係以鞘內、靜脈內、肌肉內、心室內、顱內、小腦內、腦室內、腦實質內、經眼、皮下或其組合方式進行。

【請求項141】

如請求項135至140中任一項之方法，其中該投與係以鞘內方式進行。

【請求項142】

一種醫藥組合物，其包含如請求項58至132中任一項之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，以用於治療遺傳病症。

【請求項143】

一種醫藥組合物，其包含如請求項58至132中任一項之基因治療載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑，以用於製備用於治療遺傳病症之藥物。

【請求項144】

如請求項142或請求項143之醫藥組合物，其中該遺傳病症為溶酶體貯積病。

【請求項145】

如請求項142至144中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症係選自由以下組成之群：天冬胺醯葡萄糖胺尿症、貝敦氏病、胱胺酸症、法布立病、I型戈謝病、II型戈謝病、III型戈謝病、龐培氏病、泰-薩克斯病、桑多霍夫病、異染性腦白質營養不良、I型黏脂貯積症、II型黏脂貯積症、III型黏脂貯積症、IV型黏脂貯積症、賀勒病、亨特病、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、A型莫奎病、B型莫奎病、馬羅托-拉米病、斯利病、A型尼曼-匹克病、B型尼曼-匹克病、C1型尼曼-匹克病、C2型尼曼-匹克病、I型辛德勒病、II型辛德勒病、腺苷脫胺酶嚴重合併性免疫缺失(ADA-SCID)及神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項146】

如請求項142至145中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症為龐培氏病。

【請求項147】

如請求項142至145中任一項之醫藥組合物，其中該遺傳病症為神經元蠟樣質脂褐質沈積症。

【請求項148】

如請求項142至147中任一項之醫藥組合物，其中該組合物經調配用於鞘內、靜脈內、肌肉內、心室內、顱內、小腦內、經眼或皮下投與。

【請求項149】

如請求項142至148中任一項之醫藥組合物，其中該組合物經調配用於鞘內投與。

【請求項150】

一種基因治療載體，其包含核酸構築體，該核酸構築體包含：

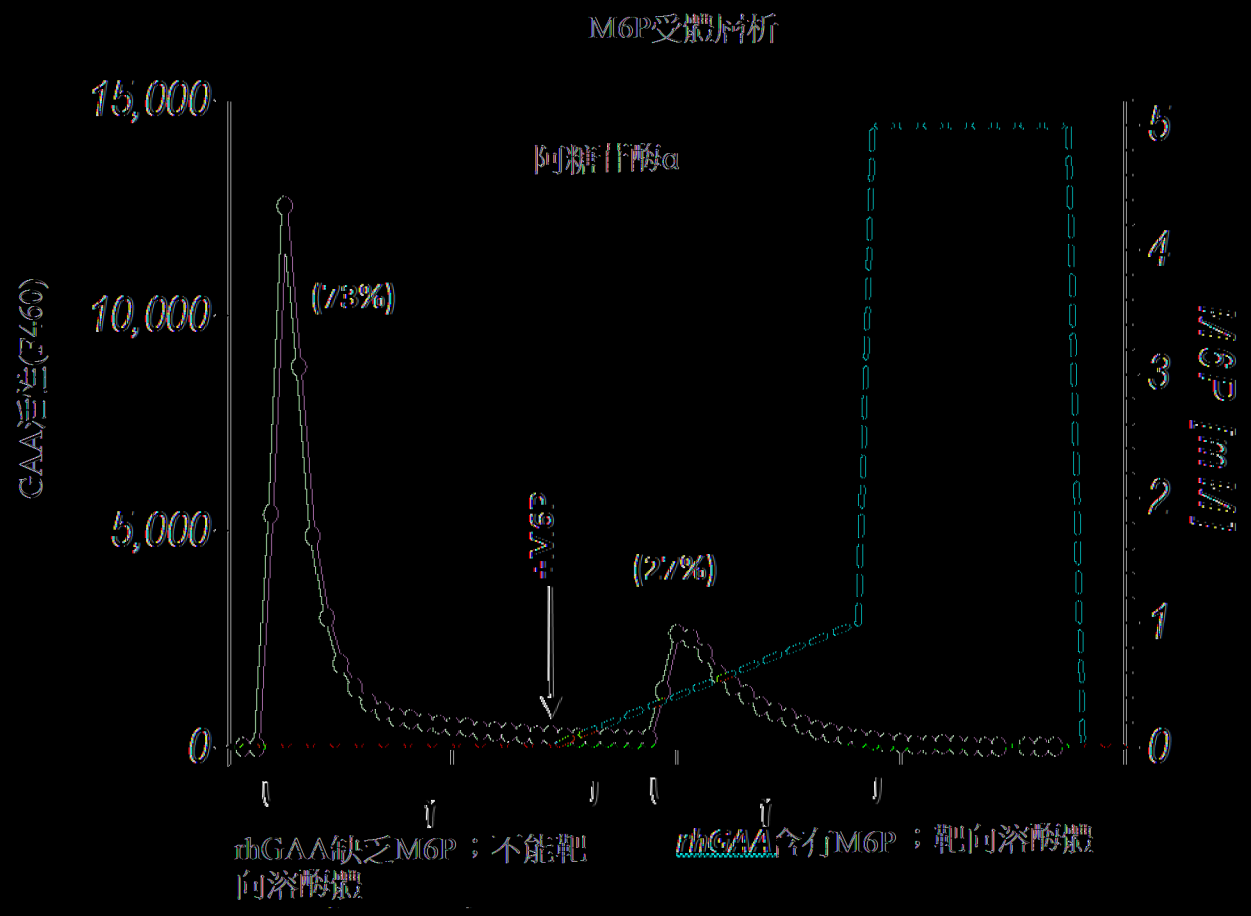
(a)編碼治療蛋白之核酸序列，及

(b)編碼增加該治療蛋白之內吞作用之肽的核酸序列。

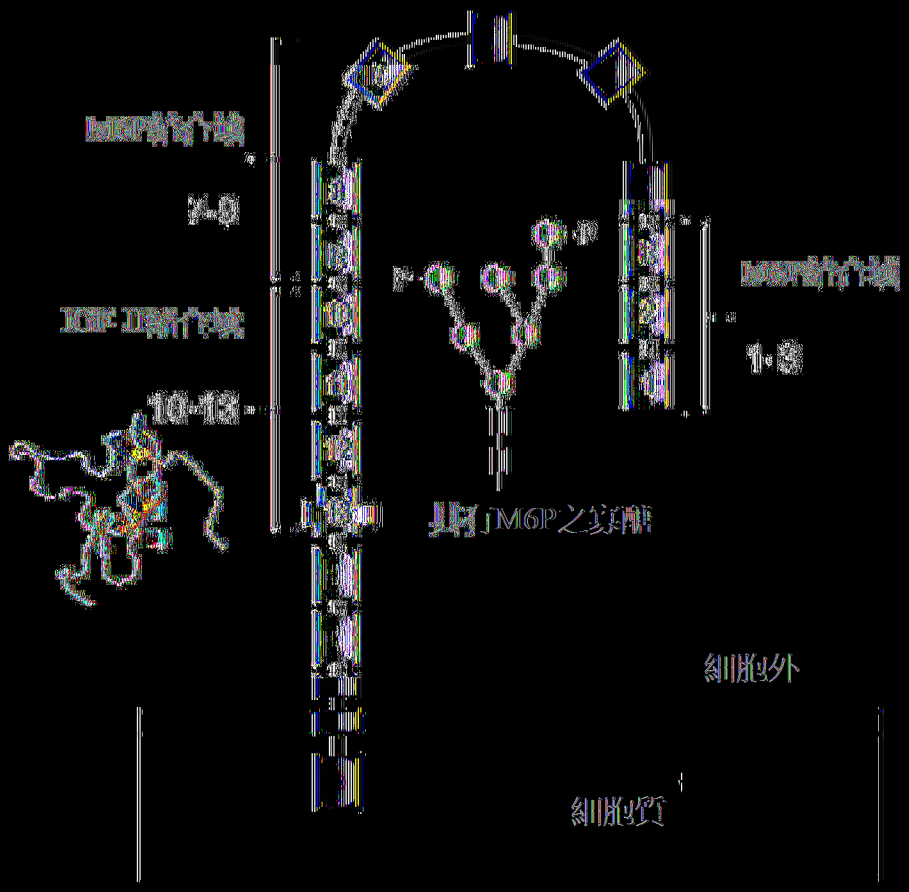
【請求項151】

如請求項150之基因治療載體，其中增加該治療蛋白之內吞作用之該肽為與CI-MPR結合的肽。

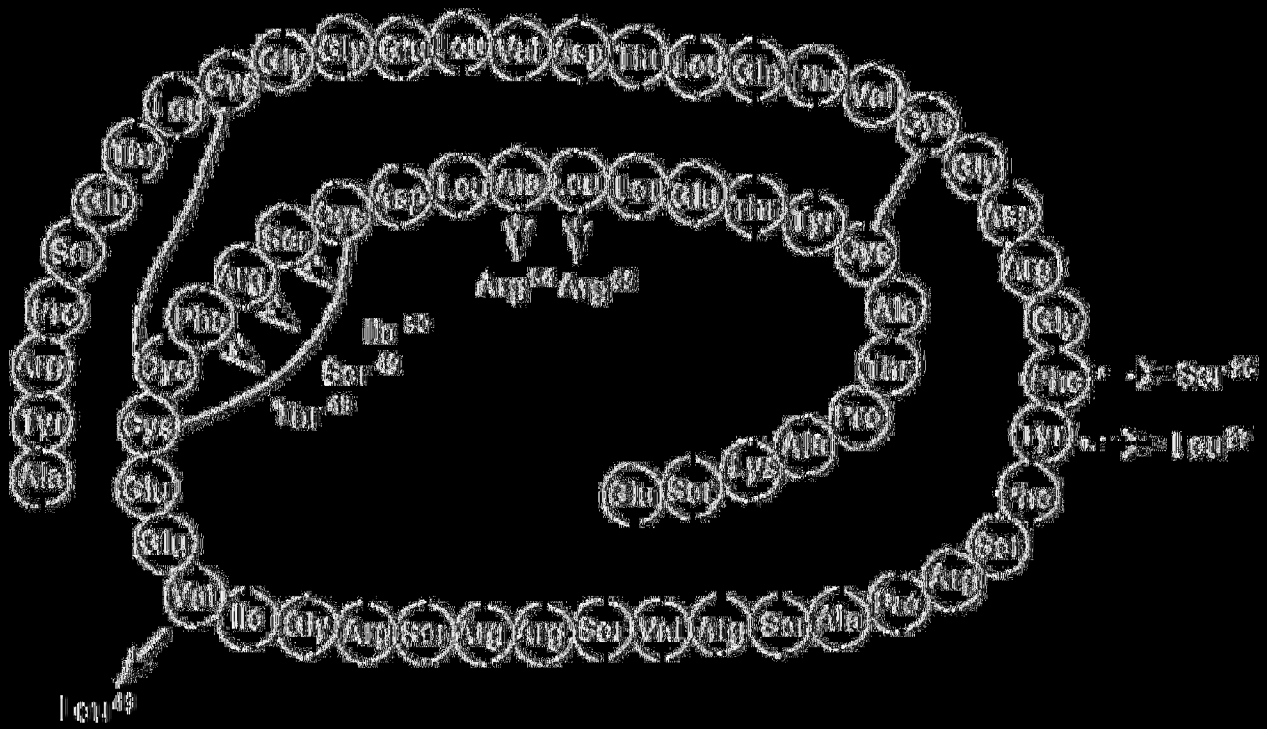
【發明圖式】


M6P受體分析
阿葡糖苷酶α
15,000
10,000
5,000
0
GAA活性(F460)
(73%)
(27%)
5
4
3
2
1
0
mV
rhGAA缺乏M6P；不能靶向溶酶體
rhGAA含有M6P；靶向溶酶體

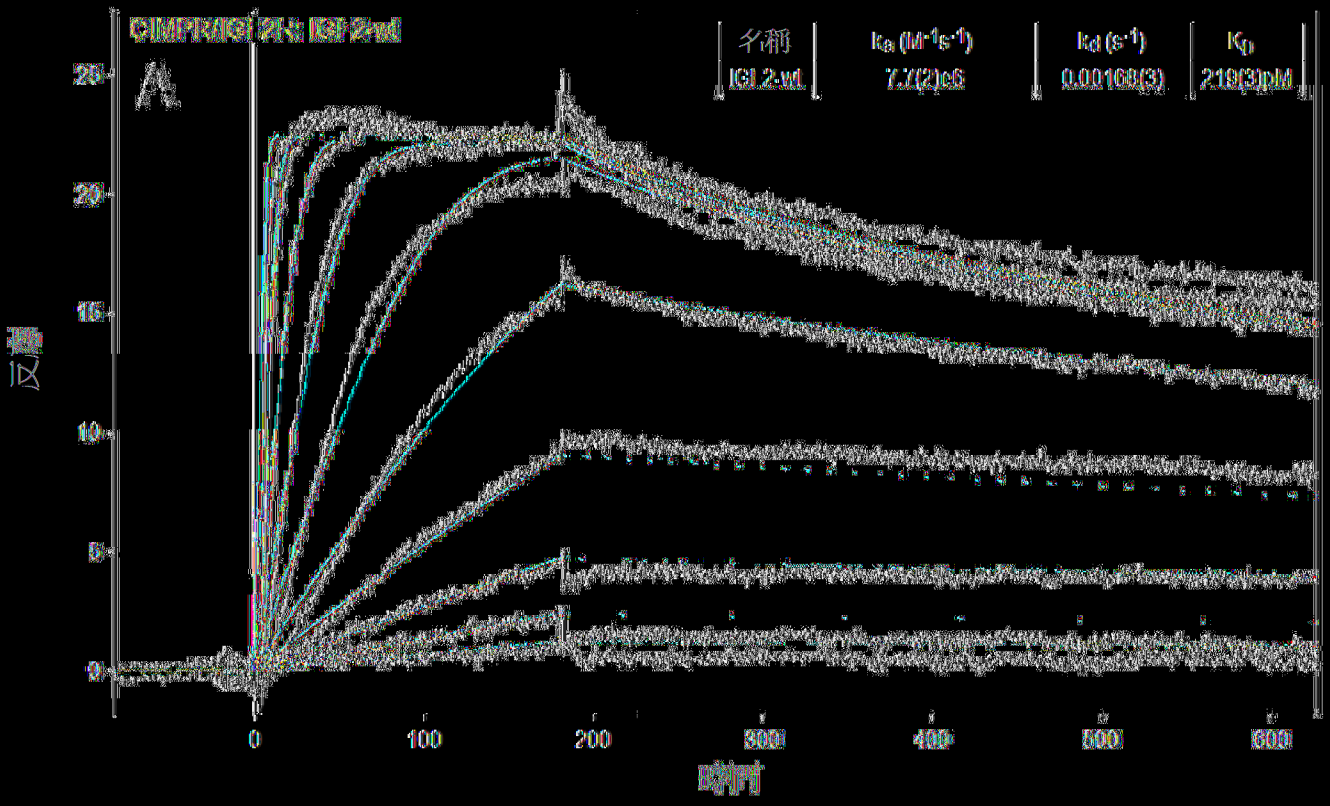
【圖1】



[圖2]



|(圖3)|


CIMP2G1 2Rs IGF2-vd
A
名稱
IGF2-vd
ka (M-1s-1)
7.7(2)e6
kd (s-1)
0.00168(3)
KD
219(3)pM
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
時間

|(圖4)|

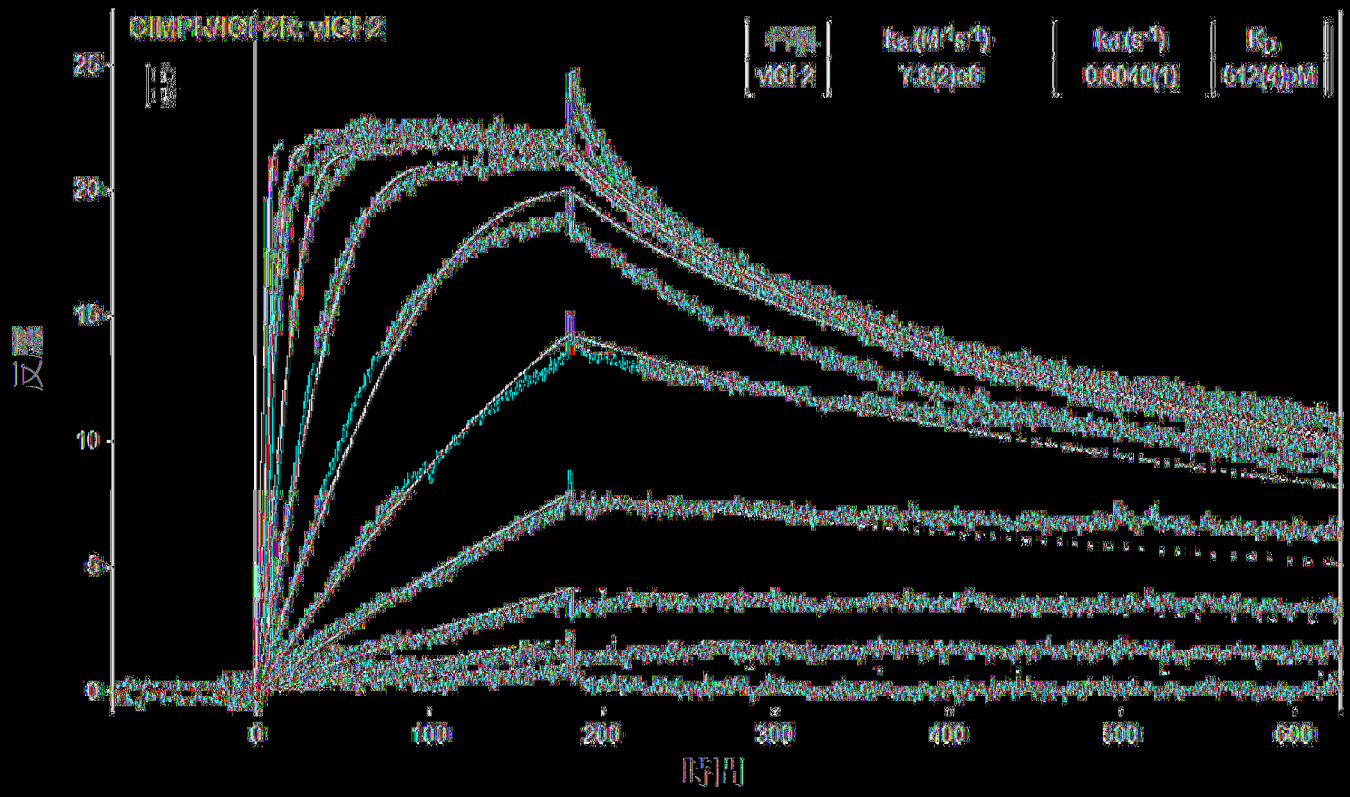

CIMP1/VEGF-2R: vEGF-2
反應
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
時間
ka(M-1s-1)
7.8(2)e6
kd(s-1)
0.0040(1)
KD
512(4)pM

圖5

IGF2/CI-MPR受體結合

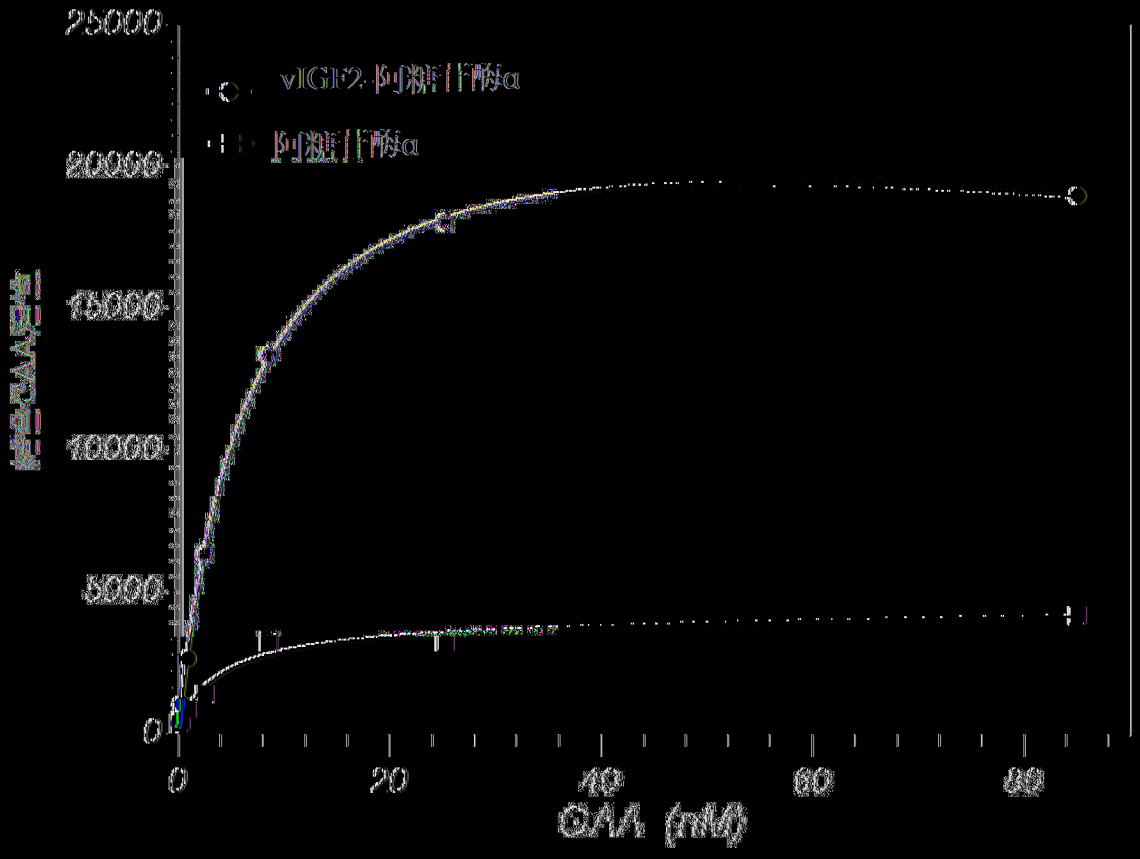
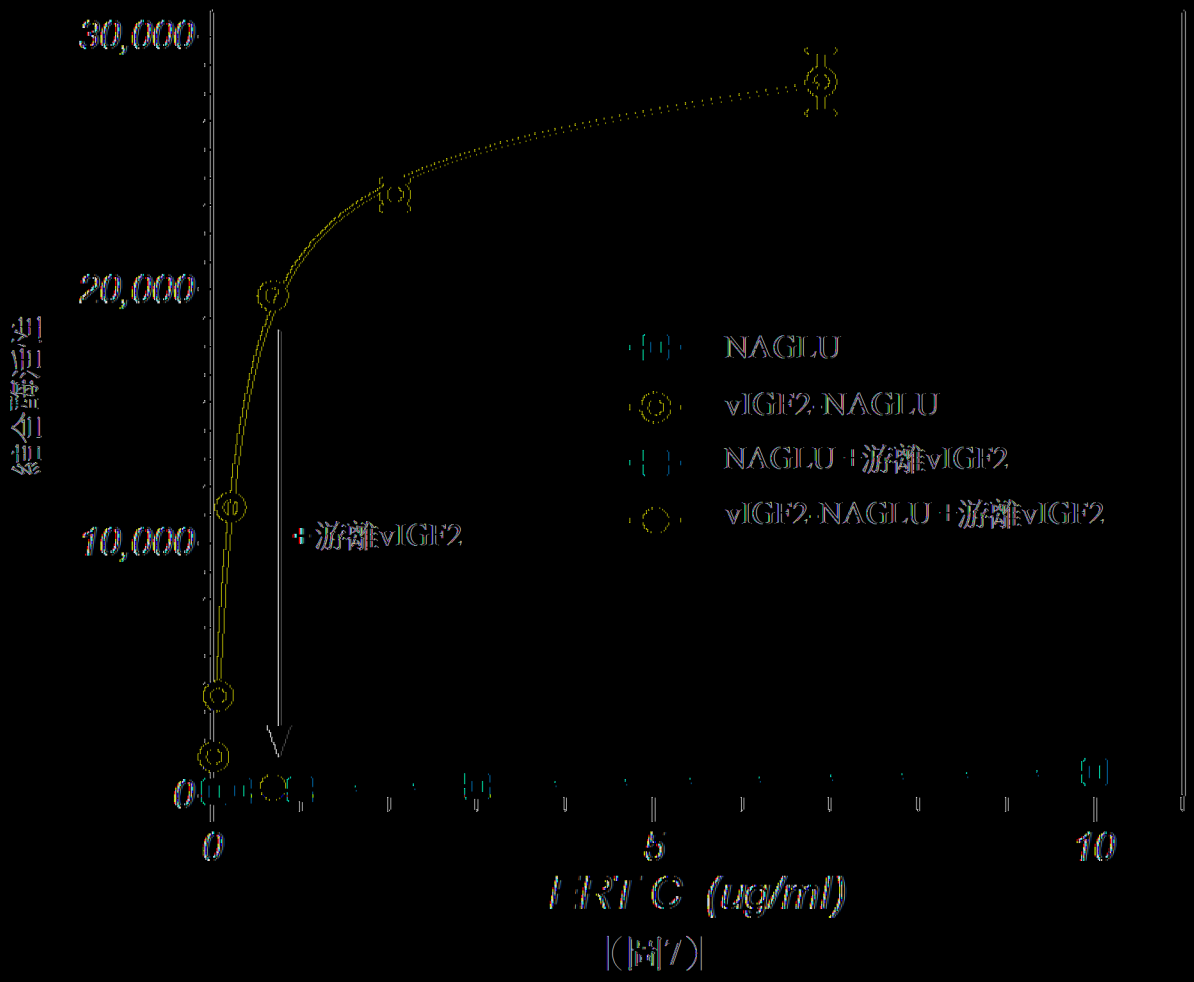
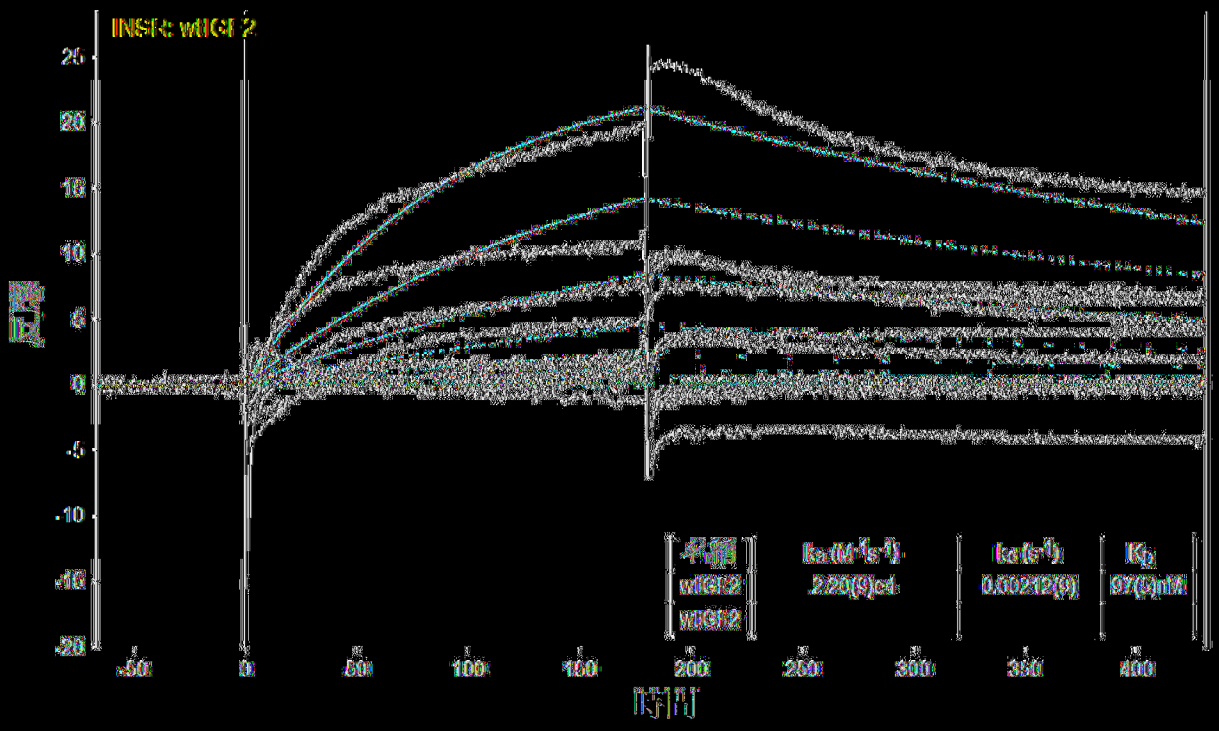


圖5

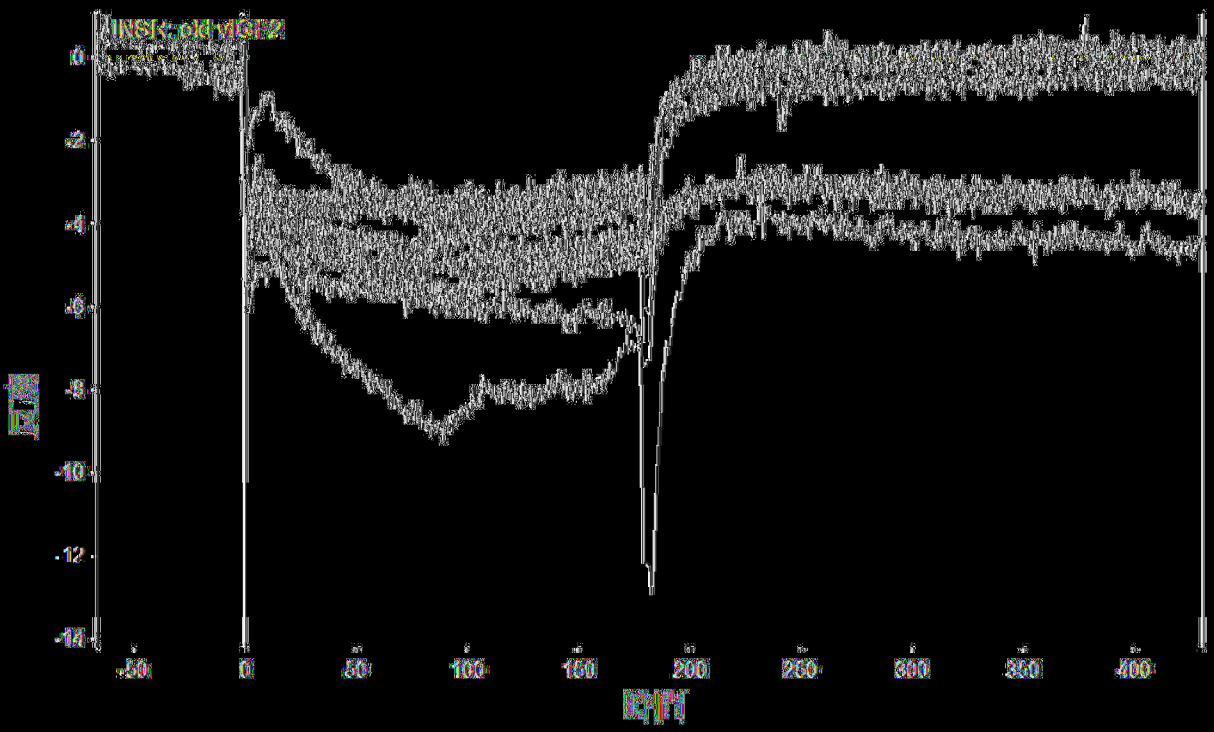
IGF2/CI-MPR受體結合



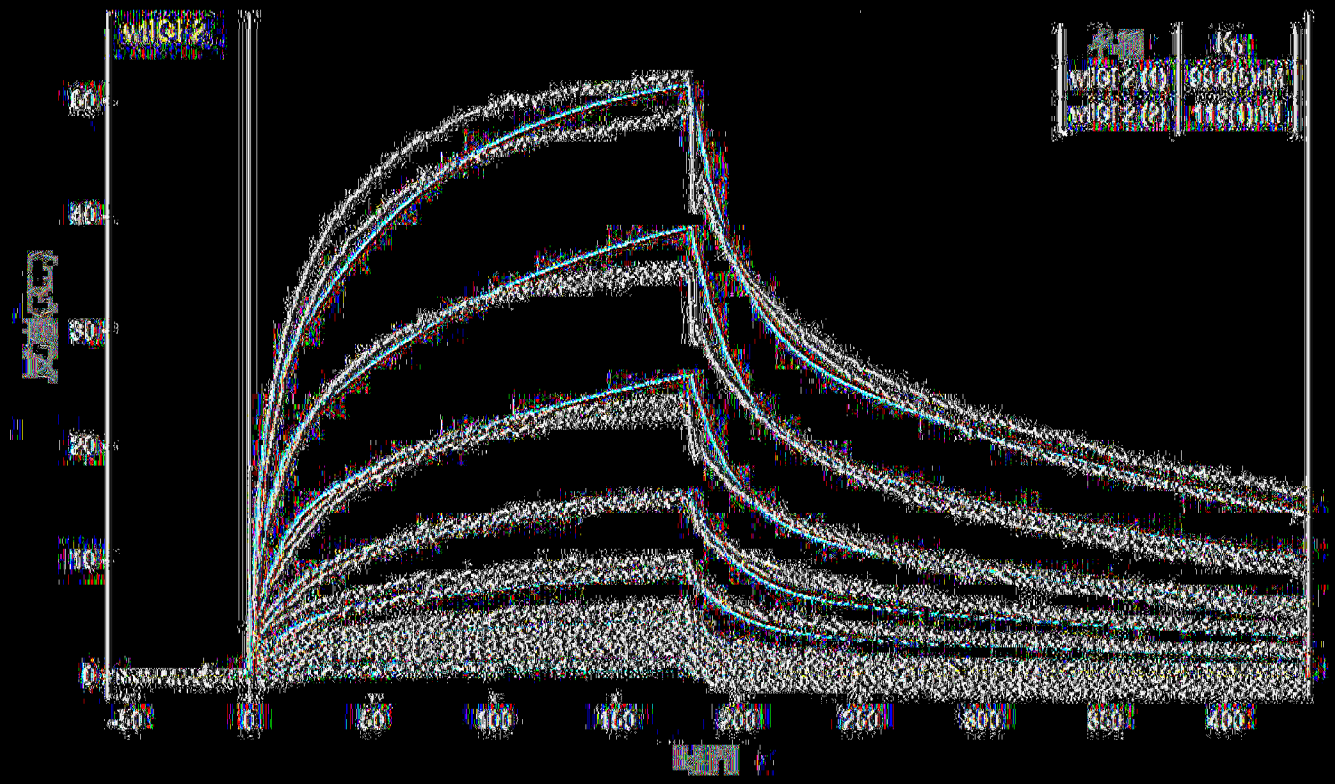
[圖7]


INSR: wtIGF 2
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
時間
平衡
wtIGF2
wtIGF2
ka(M-1s-1)
2.20(9)e4
kd(s-1)
0.00212(9)
K2
97(0)nM

[圖8]


INSR: old wtIGF2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
時間

[圖9]



|(圖10)|

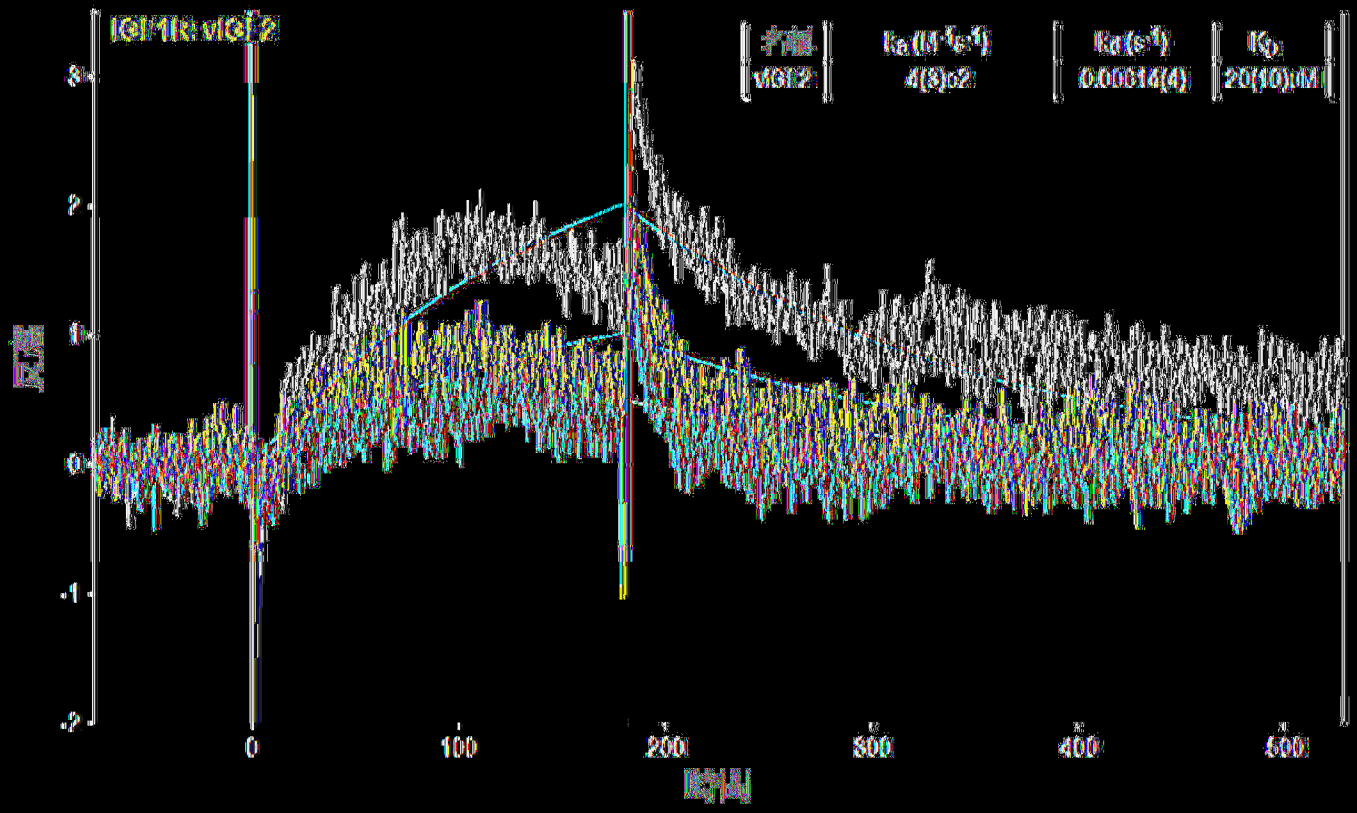

IGF1R:vIGF2
分析物
vIGF2
ka(1/Ms)
4(3)e2
kd(s-1)
0.00014(4)
KD
20(10)nM
8
2
1
0.4
-1
-2
0
100
200
300
400
500
時間

圖11

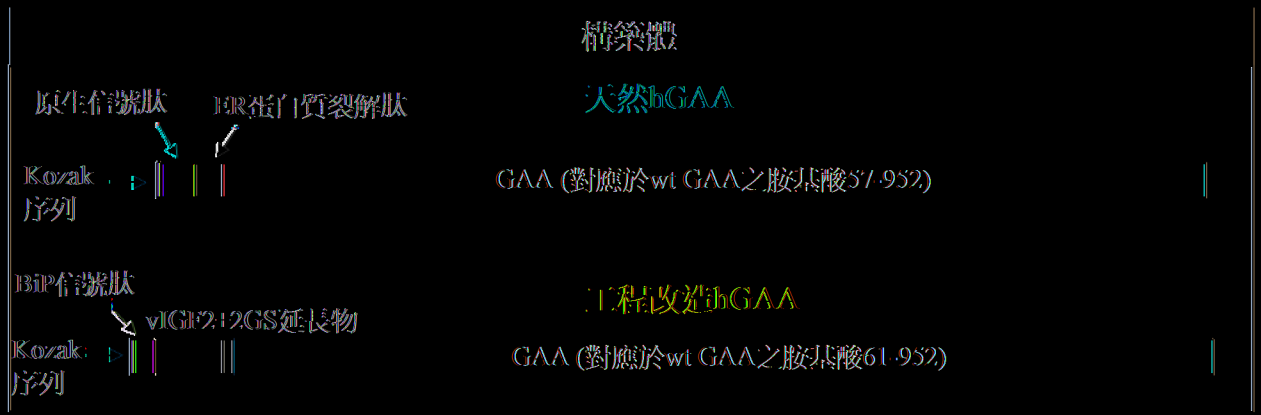
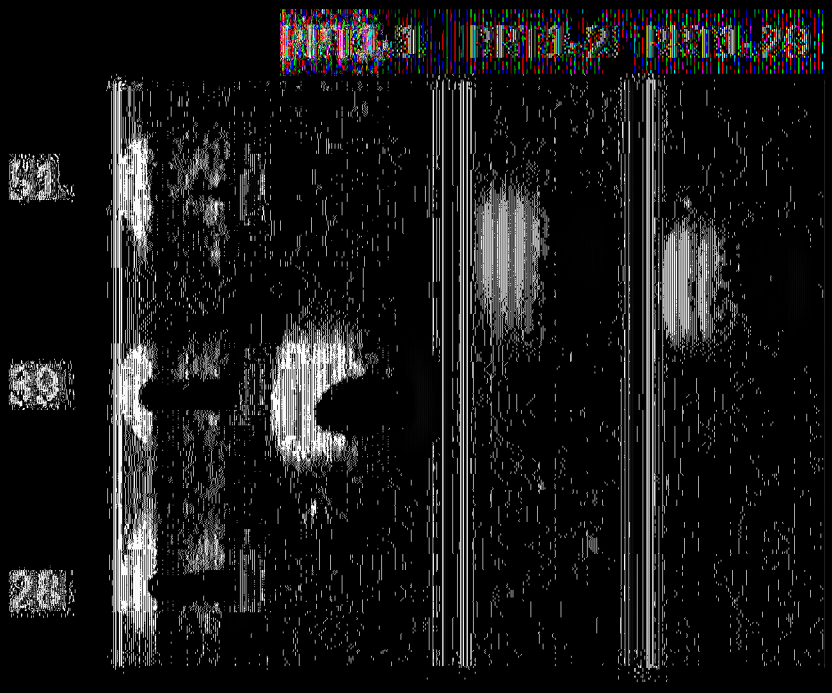
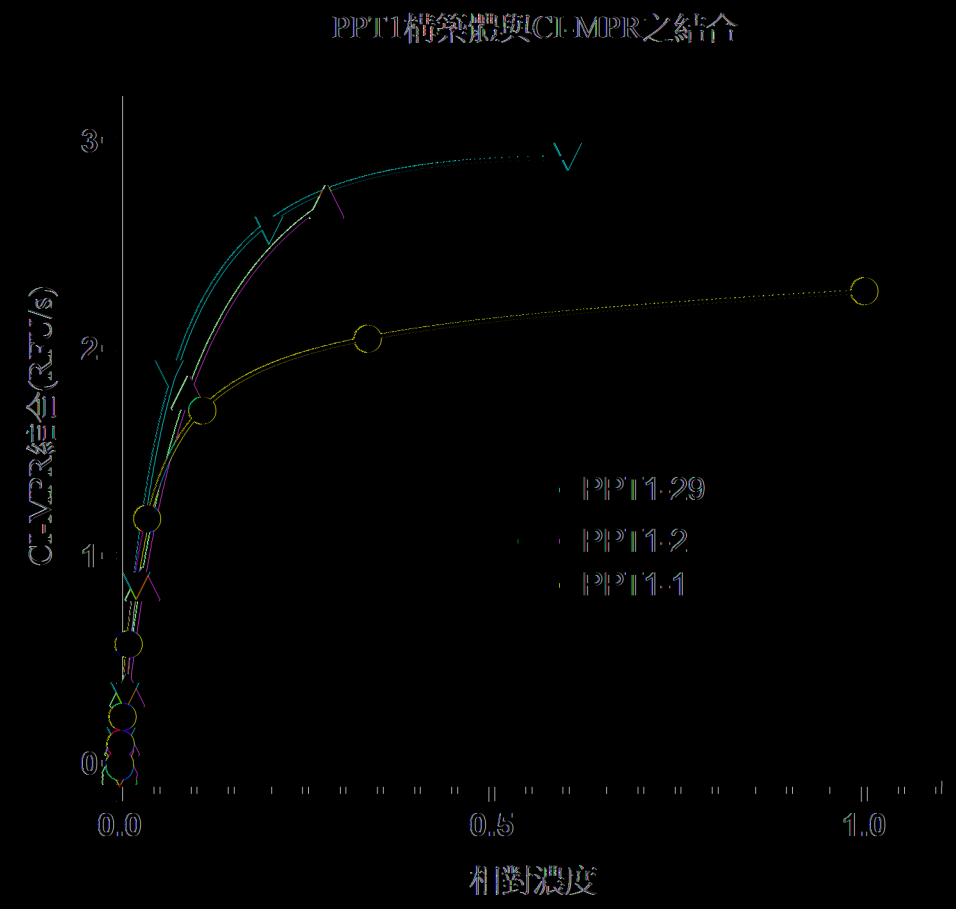

精氨酸
原生信號肽
ER蛋白質裂解肽
天然hGAA
Kozak
序列
GAA (對應於wt GAA之胺基酸57-952)
BiP信號肽
vIGF2-2GS延長物
工程改造hGAA
Kozak
序列
GAA (對應於wt GAA之胺基酸61-952)

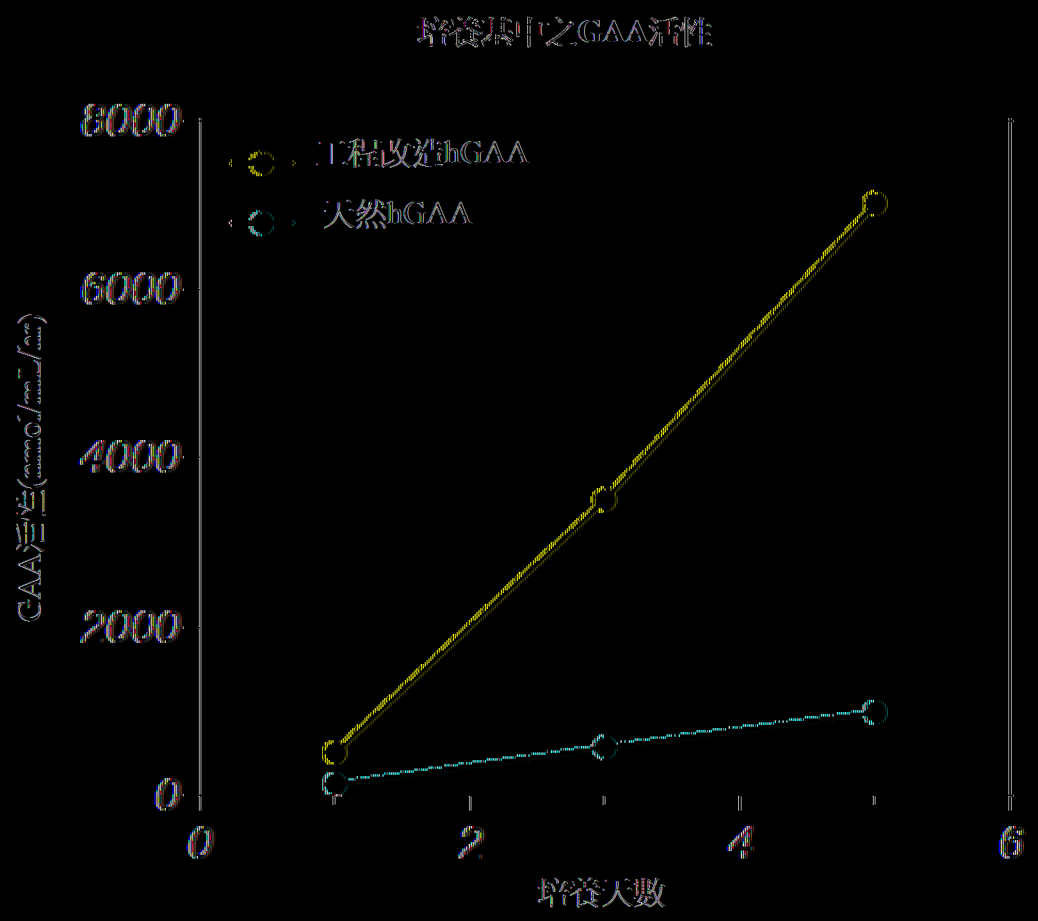
圖12



圖(13)


PPT1精製標準CI-MPR之結合
3
2
1
0
CI-MPR結合(RFU)
PPT1-29
PPT1-2
PPT1-1
0.0
0.5
1.0
相對濃度

[圖14]


培養基中之GAA活性
8000
6000
4000
2000
0
GAA活性(nmol/mL/hr)
工程改造hGAA
天然hGAA
0
2
4
6
培養天數

|(圖15)|

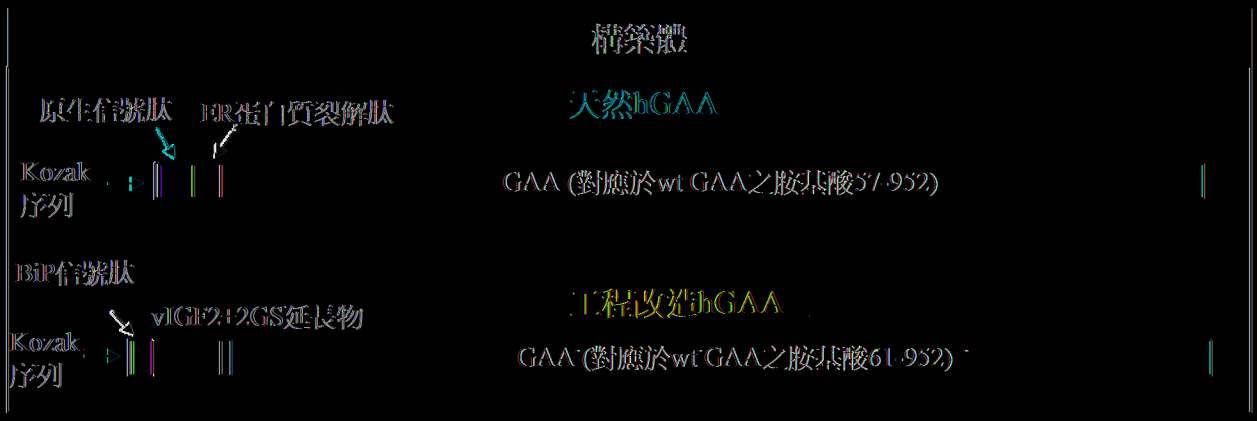

構築體
原生信號肽
ER蛋白質裂解肽
天然hGAA
Kozak
序列
GAA (對應於wt GAA之胺基酸57-952)
BiP信號肽
v1GF2-2GS延長物
工程改造hGAA
Kozak
序列
GAA (對應於wt GAA之胺基酸61-952)

圖16

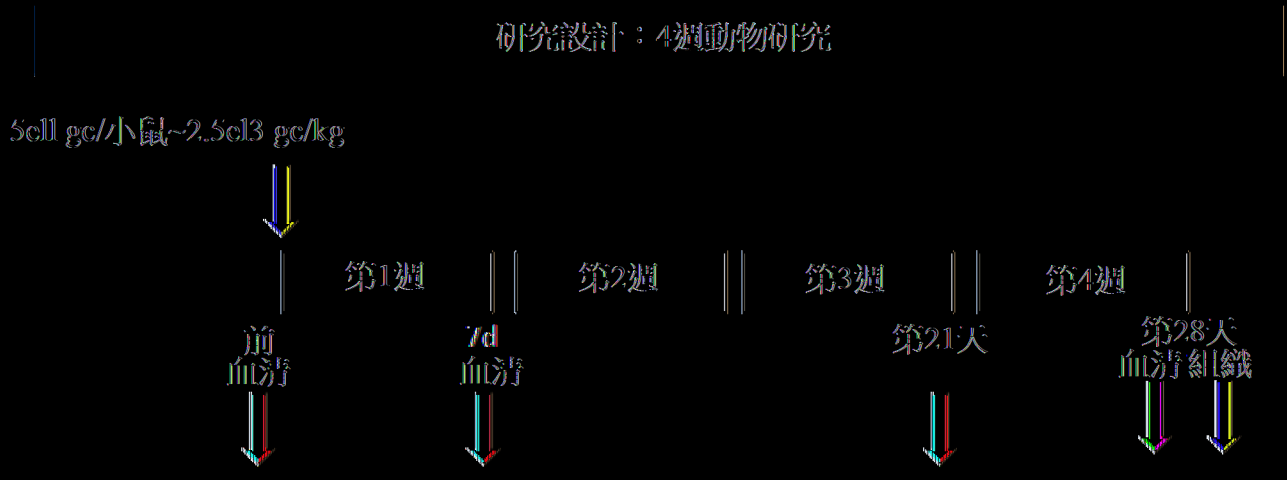

研究設計：4週動物研究
5e11 gc/小鼠~2.5e13 gc/kg
第1週
第2週
第3週
第4週
前
血清
7d
血清
第21天
第28天
血清 組織

圖17

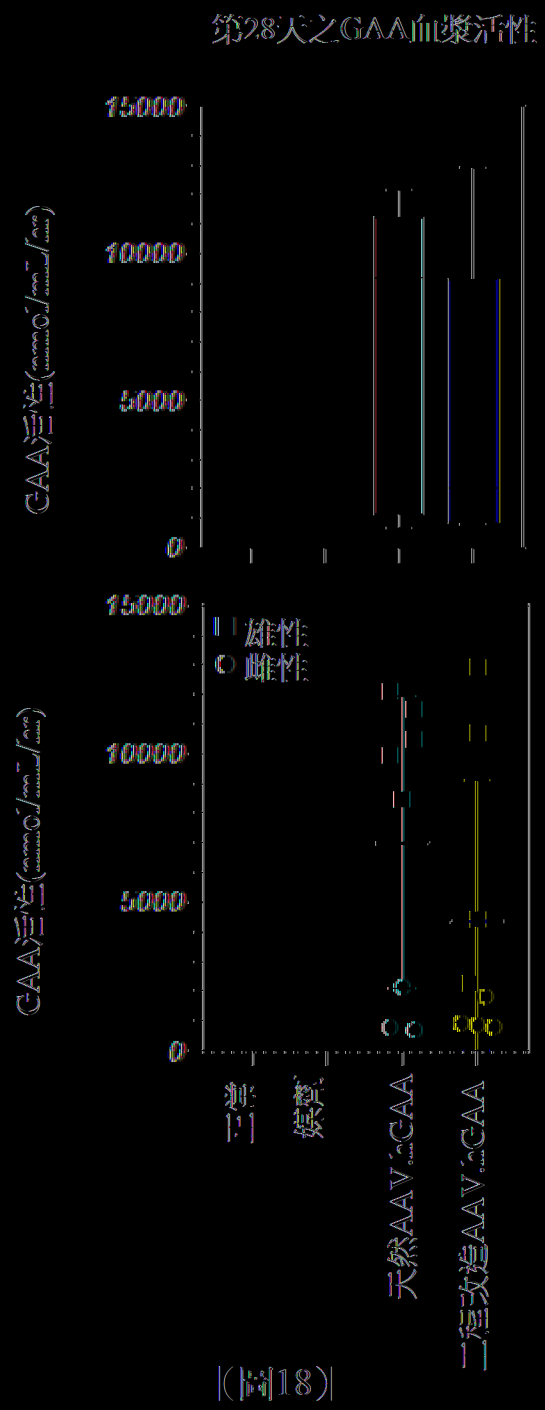

第28天之GAA血漿活性
15000
10000
5000
0
GAA活性(nmol/mL/hr)
雄性
雌性
對照組
載體
天然AAV2.GAA
二倍改造AAV2.GAA

圖18

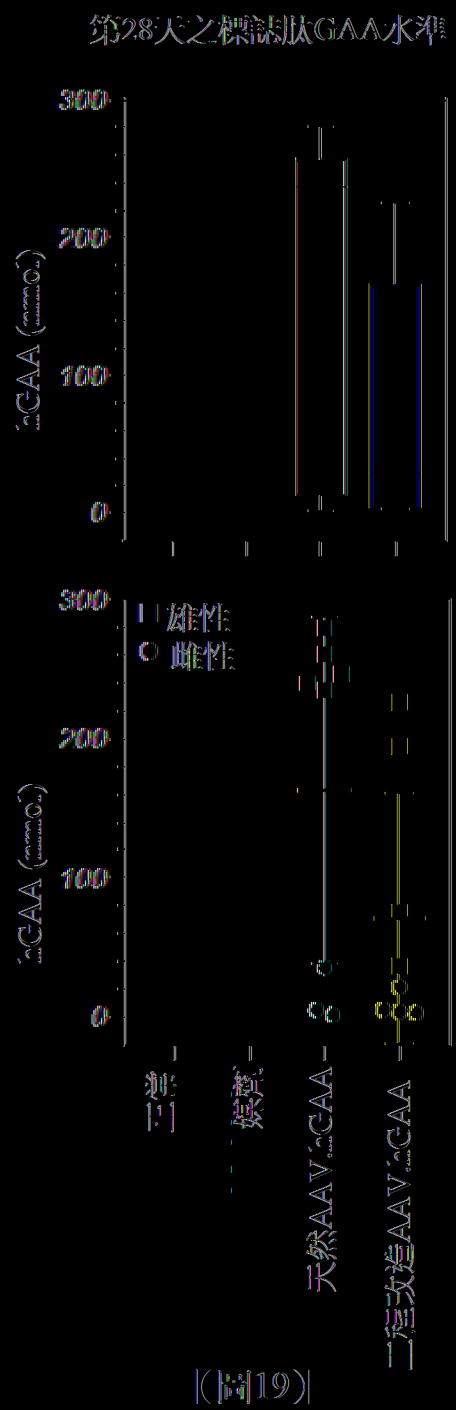
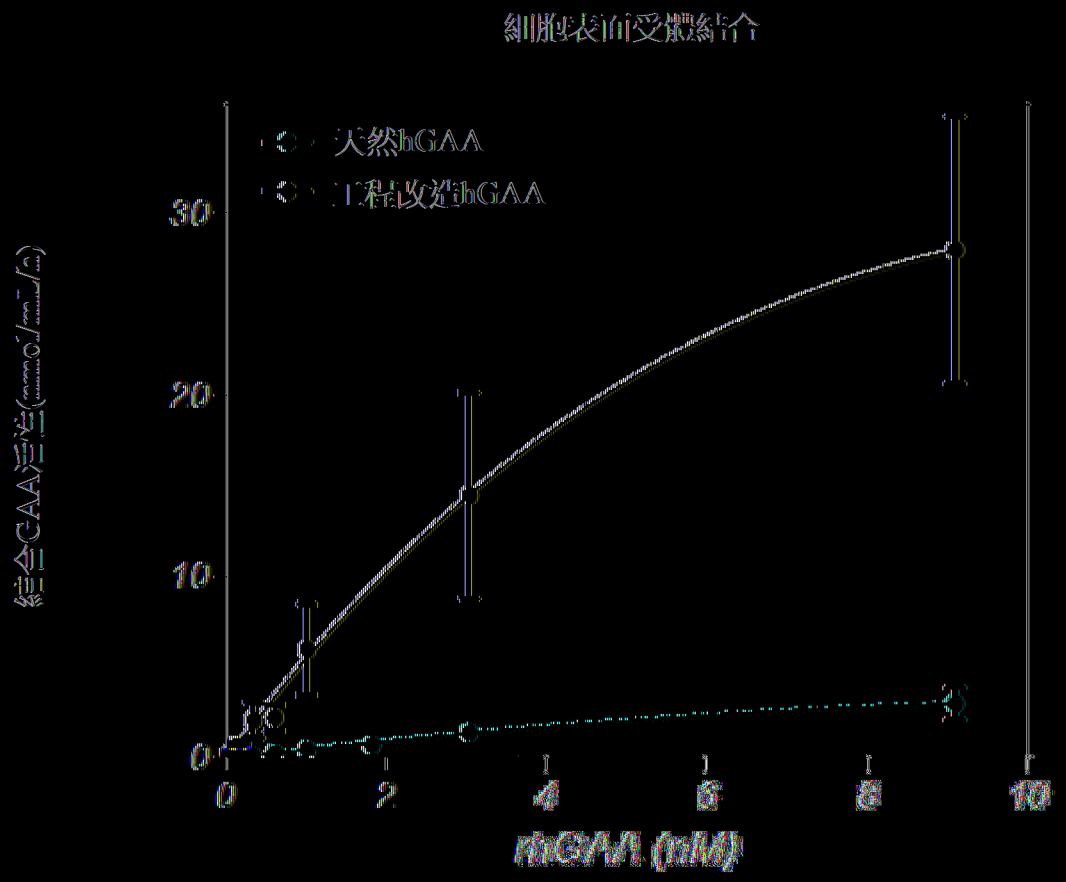
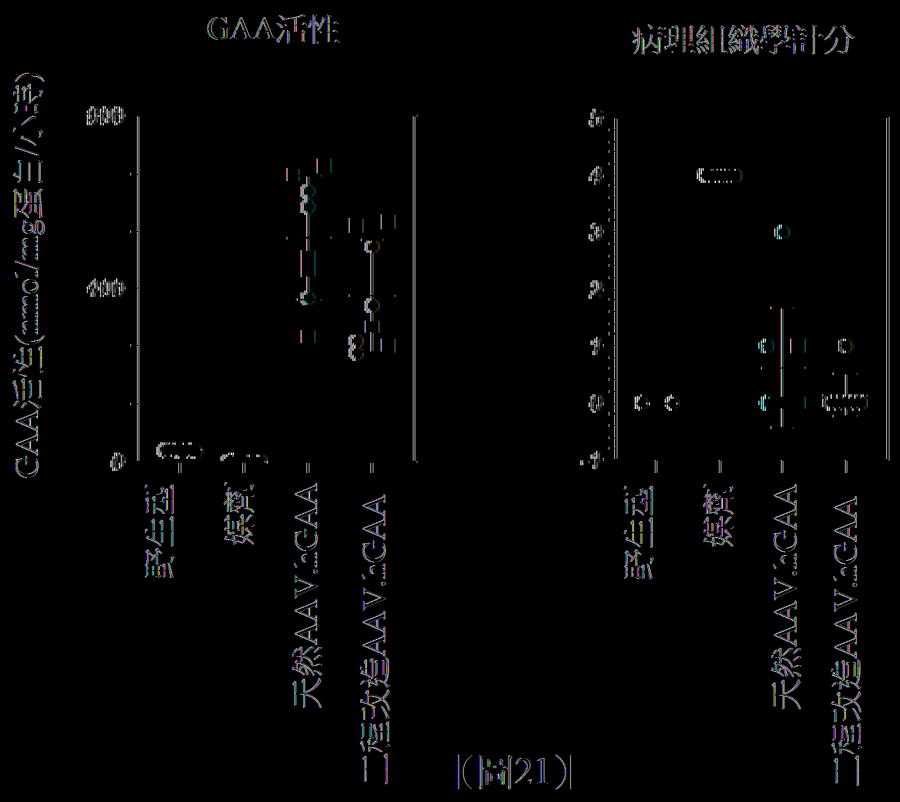

第28天之標記肽GAA水準
300
200
100
0
GAA (nmol/L)
雄性
雌性
對照組
經鼠
天然AAV-GAA
一次改造AAV-GAA

圖19

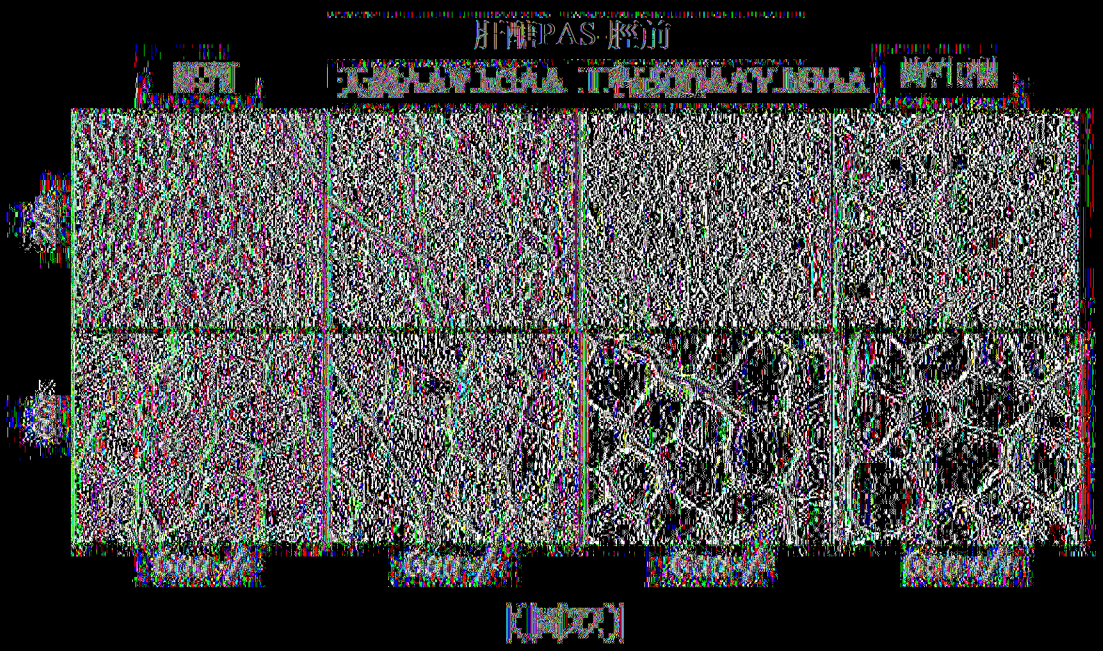


用於評價細胞受體相互作用之血漿樣本

|(圖20)|


GAA活性
病理組織學評分
GAA活性(nmol/mg/hr)
800
400
0
6
4
3
2
1
0
-1
無治療
載體
天然AAV2.GAA
優化過AAV2.GAA
無治療
載體
天然AAV2.GAA
優化過AAV2.GAA

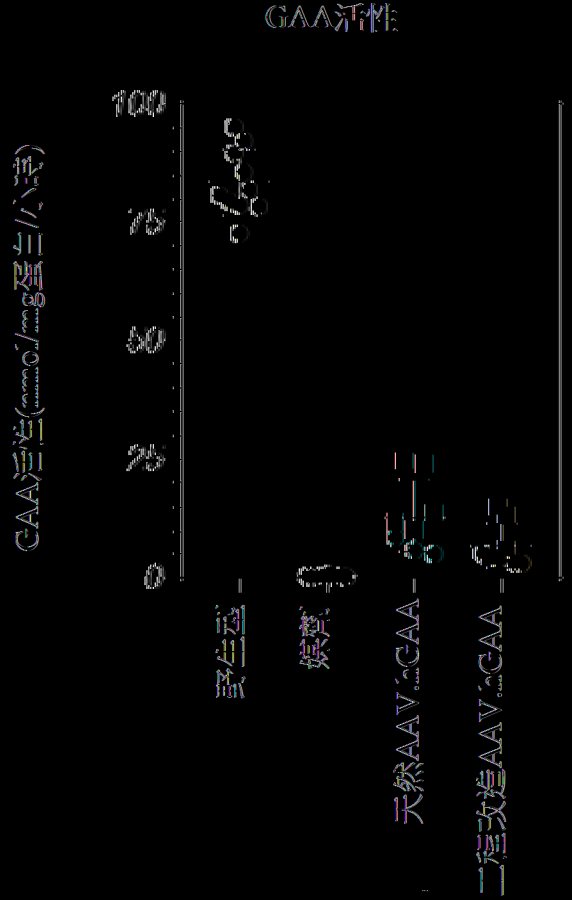
[圖21]


肝臟PAS 染色

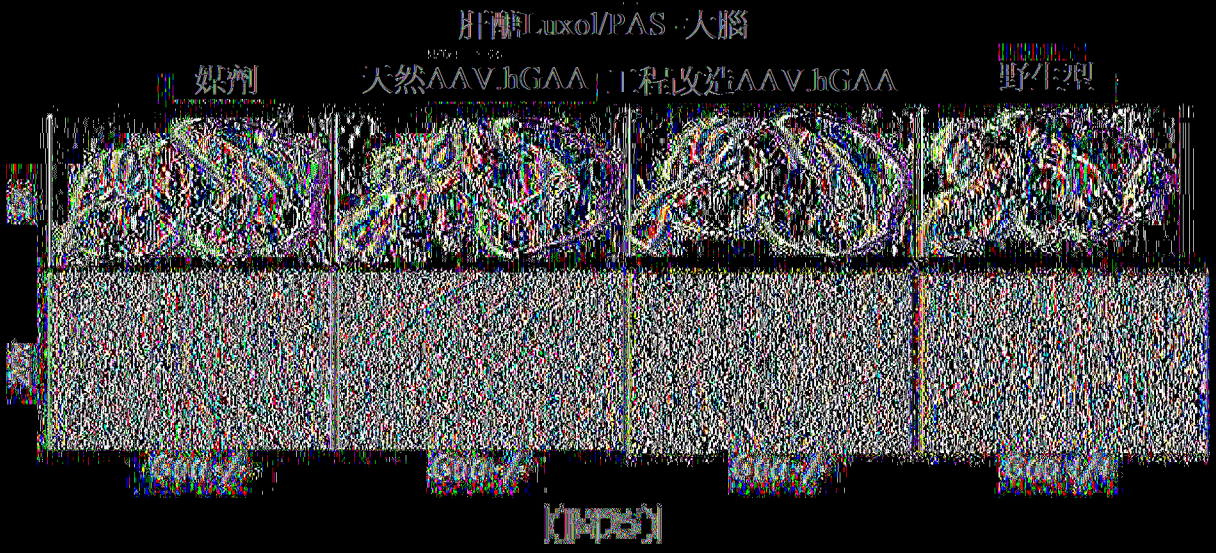
[圖22]



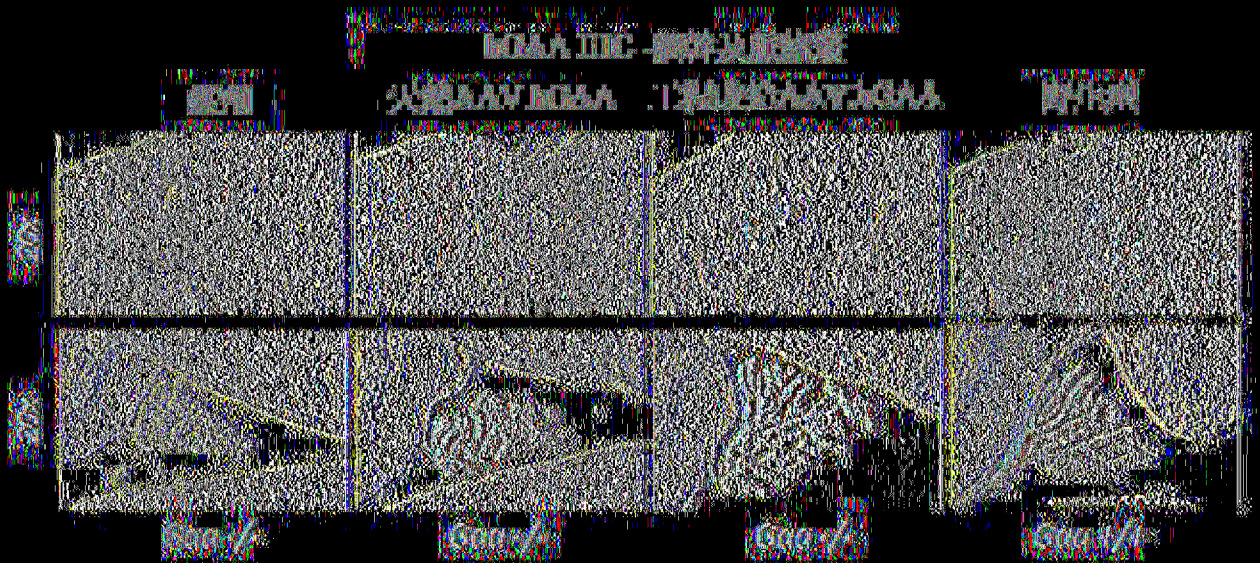
[圖23]


GAA活性
100
75
50
25
0
GAA活性(nmol/mg蛋白/小時)
無細胞
載體
天然AAV2.5GAA
二胺改造AAV2.5GAA

[圖24]


肝臟Luxol/PAS－大腦
媒劑
天然AAV.hGAA
工程改造AAV.hGAA
野生型

[圖4C]


肝臟 IHC－腦幹溶酶體蓄積
媒劑
天然AAV.hGAA
工程改造AAV.hGAA
野生型

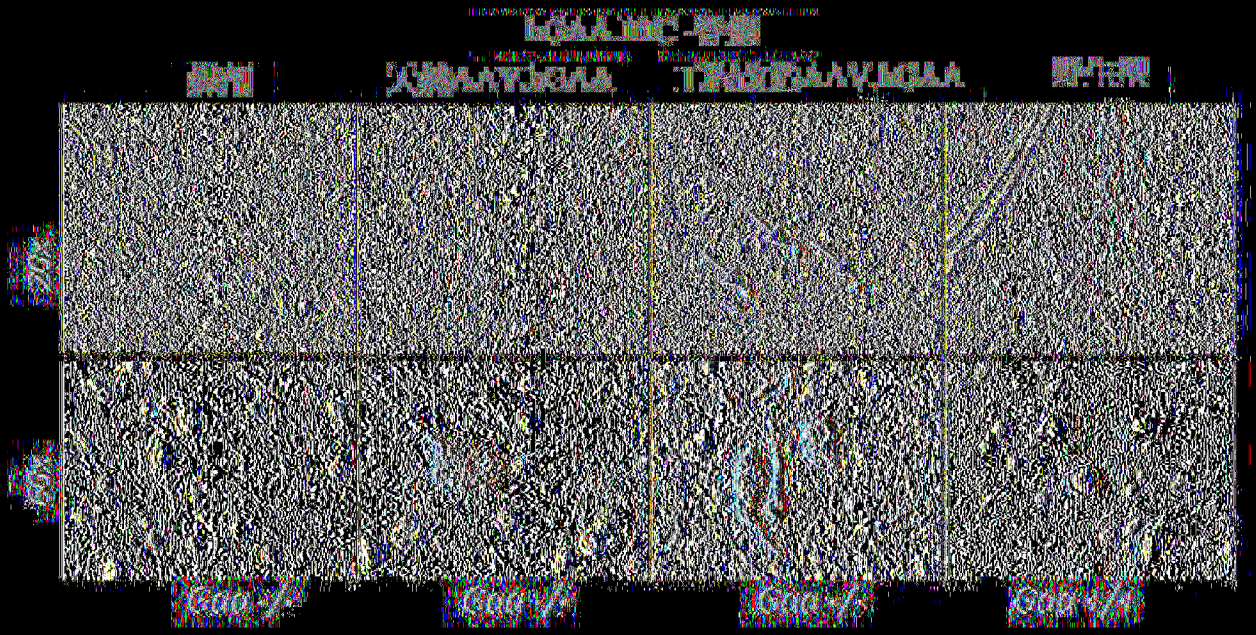
[圖4D]

病理組織學評分
6
4
2
0
-2
假手術
模型
天然AAV1.sCAA
工程改造AAV1.sCAA

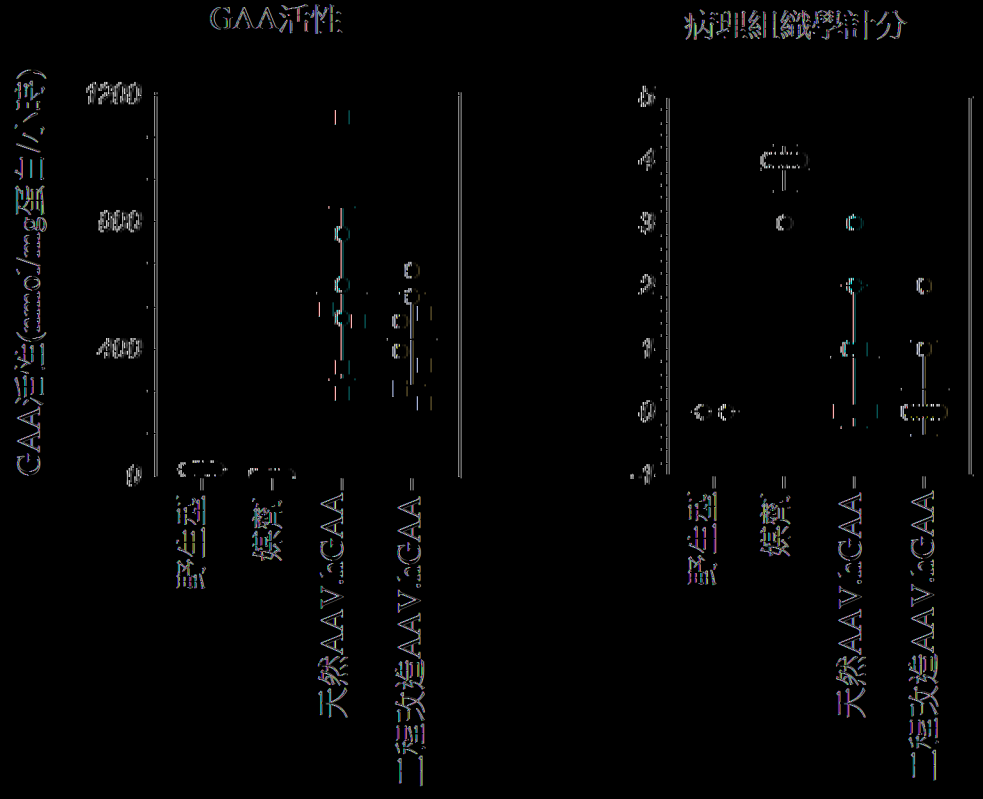
圖27

肝酶Luxol/PAS 脊髓
假手術
天然AAV1.sCAA
工程改造AAV1.sCAA
野生型
6.0×10^13
6.0×10^13
6.0×10^13
6.0×10^13

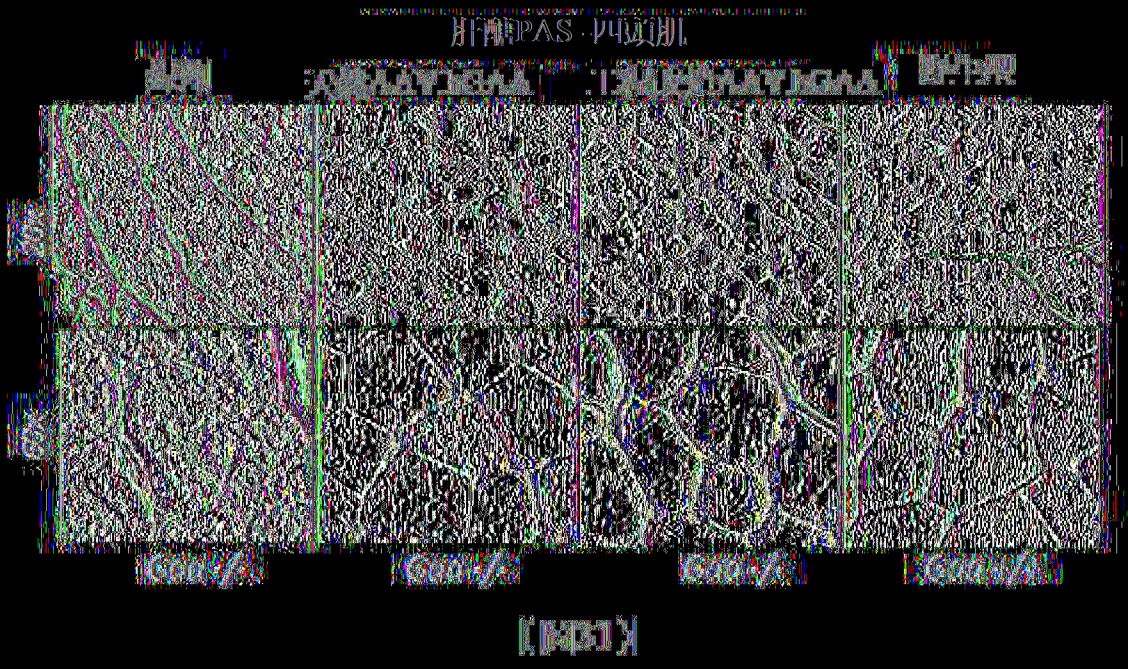
圖28



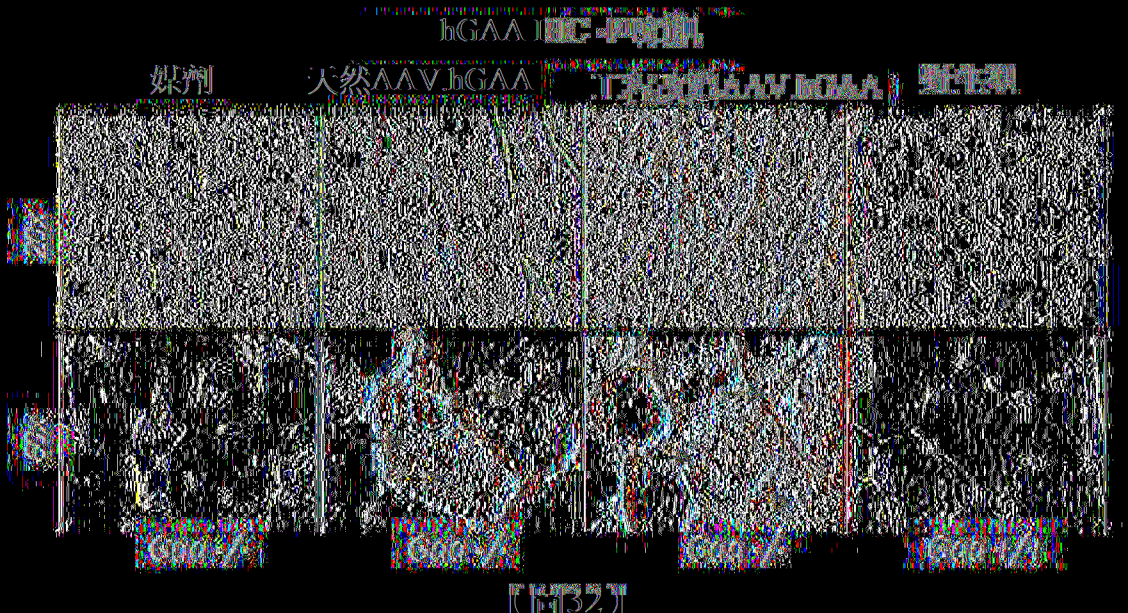
|(圖29)|


GAA活性
病理組織學評分
GAA活性(nmol/mg蛋白/小時)
1200
800
400
0
6
4
3
2
1
0
-1
假白質
模擬
天然AAV2.2GAA
二胺改造AAV2.2GAA

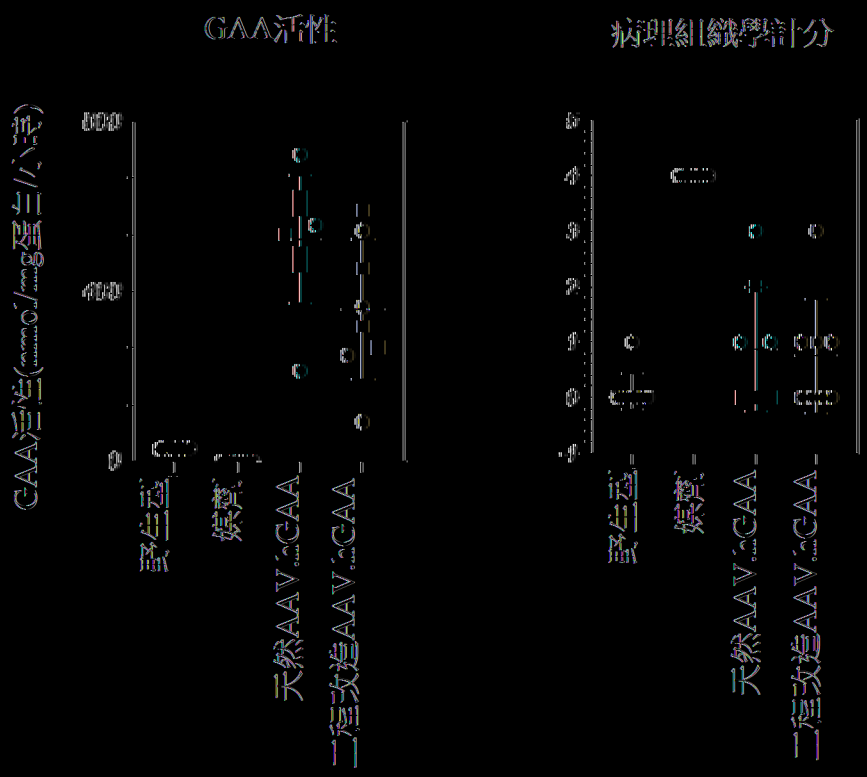
|(圖30)|


肝臟PAS-四頭肌
媒劑
大於AAV hGAA
小於AAV hGAA
生理鹽水
hGAA
hGAA
hGAA
hGAA

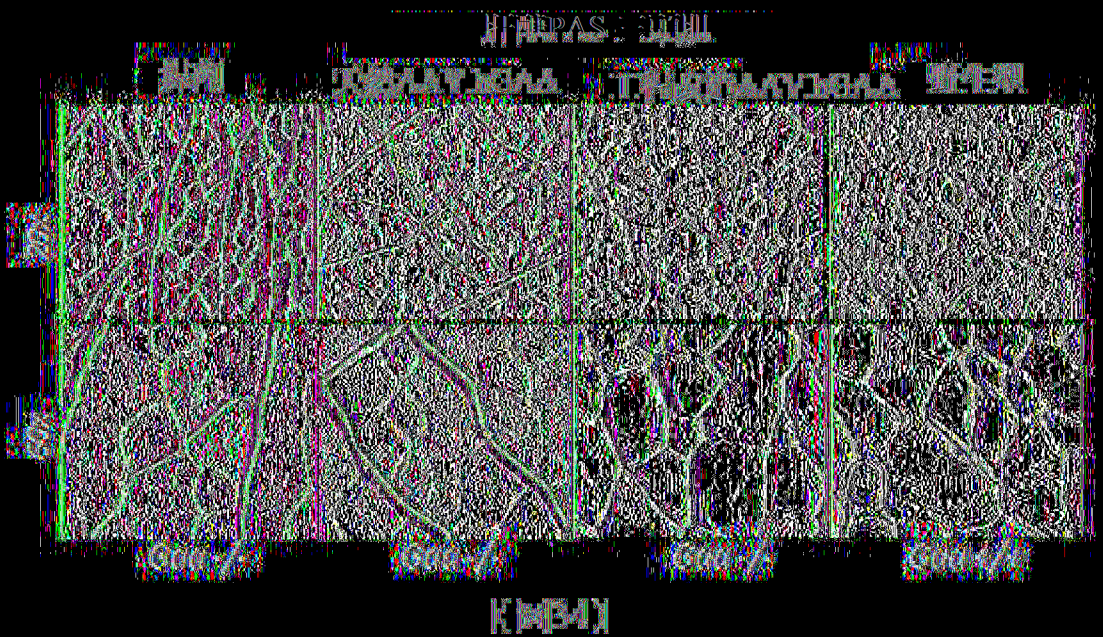
[圖31]


hGAA
媒劑
大於AAV hGAA
小於AAV hGAA
生理鹽水
hGAA
hGAA
hGAA
hGAA

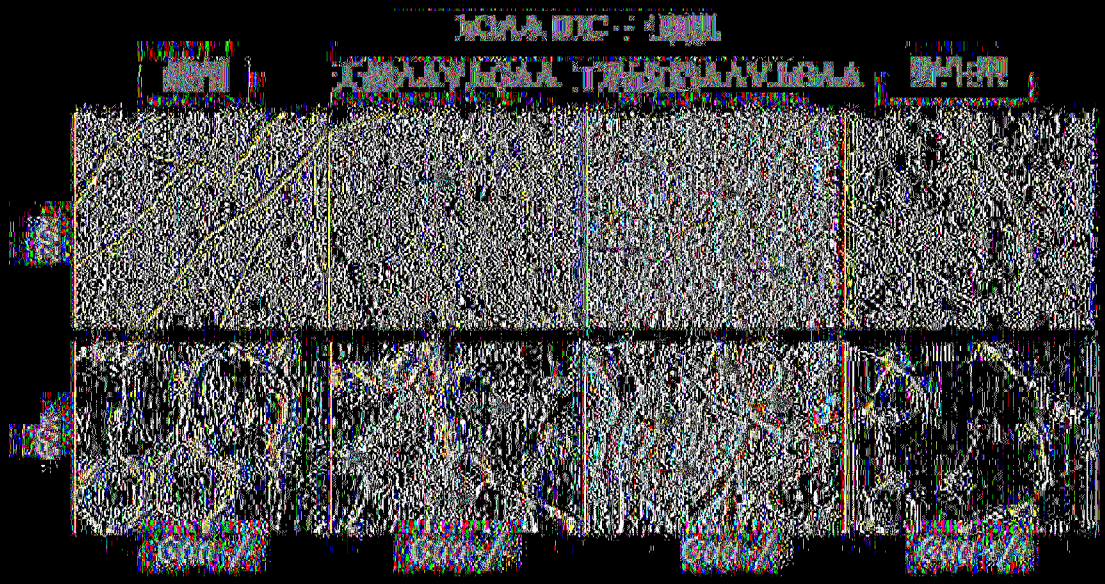
[圖32]


GAA活性
病理組織學評分
GAA活性(nmol/mg蛋白/小時)
400
0
5
4
3
2
1
0
-1
對照組
模型組
天然AAV9.GAA
一種改造AAV9.GAA
對照組
模型組
天然AAV9.GAA
一種改造AAV9.GAA

[(圖33)]

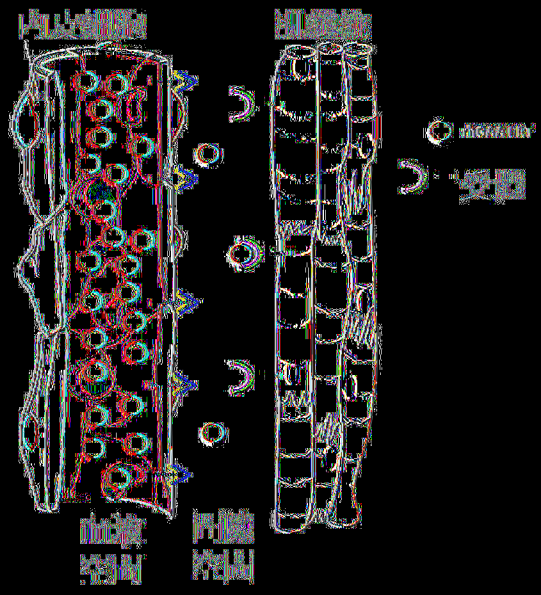

肝細胞

[圖34]



【圖35】

物理及/或生物學阻礙妨礙配送治療蛋白



血液中之ERT濃度：

- 給藥後血液中之高濃度ERT
- 非產生性清除路徑移除絕大部分的ERT
  - 肝臟
  - 脾
  - 胃腸道
  - 淋巴
- 在血管外將ERT轉運至間隙空間
  - 轉運機制不好定義，如轉內吞作用
  - 轉內吞作用為一種低效過程

間隙空間中之ERT濃度：

- ERT水準低於血液中的50-100X
- 有效的細胞吸收及遞送ERT至溶酶體需要受體介導之內吞作用

【圖36】