



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I874898 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：112102851

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 19 日

(51)Int. Cl. : *C12N15/56 (2006.01)* *C12N15/86 (2006.01)*
C12N15/63 (2006.01) *C12N15/64 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P43/00 (2006.01)*

(30)優先權：2022/01/21 美國 63/267,046
2022/11/05 美國 63/382,502

(71)申請人：美商輝瑞大藥廠(美國) PFIZER INC. (US)
美國

(72)發明人：貝爾 羅伯特 D BELL, ROBERT D. (US)；鄭婷文 CHENG, TING WEN (TW)；
那魯拉 賈汀 NARULA, JATIN (IN)；潘 克拉克 坤 PAN, CLARK QUN (US)；
索瑪納桑 蘇雅納拉洋 SOMANATHAN, SURYANARAYAN (US)；蘇薩 大衛
韋恩 SOUZA, DAVID WAYNE (US)；塔貝特 里卡多斯 TABET, RICARDOS (FR)

(74)代理人：陳長文；蔣大中；朱淑尹

(56)參考文獻：

US 2021/0332385A1 WO 2021/195218A1
期刊 Miranda CJ., et al., "Liver-Directed AAV Gene Therapy for
Gaucher Disease", Blood, Vol. 134, Supplement 1, 13 November 2019,
Page 3354.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：13 共 223 頁

(54)名稱

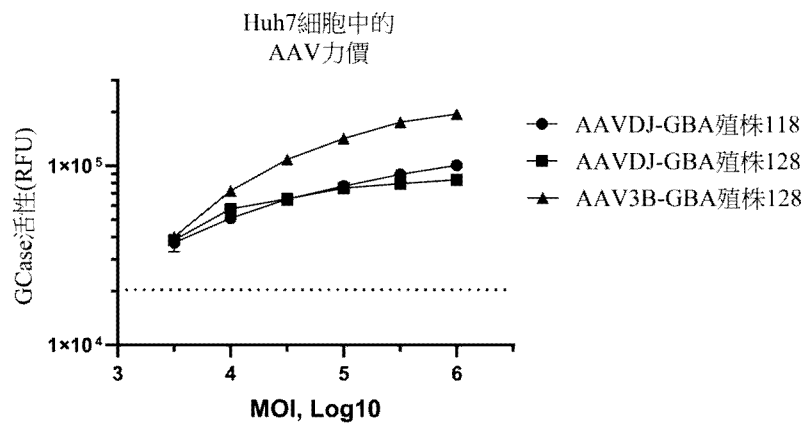
用於高歇氏(GAUCHER)病之基因療法

(57)摘要

本發明描述用於在經轉導細胞中表現 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)的經改良載體，諸如腺相關病毒(AAV)載體；及此類載體用於增加經歷 GCase 缺乏之個體(諸如患有 1 型高歇氏病之個體)中 GCase 之量的用途。

The disclosure describes improved vectors, such as adeno-associated virus (AAV) vectors, for expressing beta-glucocerebrosidase (GCase) in transduced cells, and use of such vectors to increase the amount of GCase in subjects experiencing a GCase deficiency, such as subjects with Gaucher disease Type 1.

指定代表圖：



【圖1】



I874898

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於高歇氏(GAUCHER)病之基因療法

【英文發明名稱】

GENE THERAPY FOR GAUCHER DISEASE

【中文】

本發明描述用於在經轉導細胞中表現 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)的經改良載體，諸如腺相關病毒(AAV)載體；及此類載體用於增加經歷GCase缺乏之個體(諸如患有1型高歇氏病之個體)中GCase之量的用途。

【英文】

The disclosure describes improved vectors, such as adeno-associated virus (AAV) vectors, for expressing beta-glucocerebrosidase (GCase) in transduced cells, and use of such vectors to increase the amount of GCase in subjects experiencing a GCase deficiency, such as subjects with Gaucher disease Type 1.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於高歇氏(GAUCHER)病之基因療法

【英文發明名稱】

GENE THERAPY FOR GAUCHER DISEASE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於高歇氏病之基因療法，且特定言之，使用AAV載體治療高歇氏病的基因療法。

【先前技術】

【0002】 高歇氏病(Gaucher disease，GD)為編碼β-葡萄糖腦苷脂酶之基因(GBA)經突變所導致的體染色體隱性溶酶體貯積病。溶酶體中之此酶的活性不足導致糖脂葡萄糖腦苷脂聚積在整個身體中細胞內，但尤其在骨髓、脾臟及肝臟中之細胞。雖然症狀、發病年齡及嚴重程度在個體間有極大差異，但常見症狀包括肝脾腫大、貧血、血小板減少症及骨骼異常。

【0003】 高歇氏病存在三種主要臨床亞型。最常見的1型與神經系統無關，而2型(急性神經病變)及3型(亞急性神經病變)導致葡萄糖腦苷脂在腦中聚積且因此與神經學併發症有關。亦已知該病症的兩種不常見形式，包括圍產期致死性GD及心血管GD。

【0004】 迄今已開發出治療GD的兩種方法。針對GD之酶替代療法(ERT)試圖藉由靜脈內輸注酶之重組形式來補償β-葡萄糖腦苷脂酶活性不足。已批准之針對1型GD之ERT藥物之實例包括伊米苷酶(imiglucerase)及維拉苷酶α (velaglucerase alfa)。儘管ERT有效地減少GD的至少一些症狀，但平均每兩週必須輸注一次，且治療係終身的。另外，經歷ERT的

GD患者產生針對外源供應之GCase的中和抗體並非罕見，此減少功效或可能需要中止ERT。最近開發的第二種方法，受質減少療法(SRT)，包括經口投與抑制GlcCer (GCase受質)生物合成的小分子藥物。已批准之針對1型GD之SRT藥物之實例包括艾力魯特(eliglustat)及美格魯特(miglustat)。然而，SRT僅批准用於成人，而不准用於兒科GD患者；其與多種副作用有關且亦需要終身治療以管控與GD有關的疾病過程及症狀。

【0005】考慮到與當前照護標準有關的缺點，此項技術中需要經改良之治療1型高歇氏病的方法，特定言之，需要不太頻繁投藥的療法。

【發明內容】

【0006】為了解決此項技術中的需求，本發明提供用於表現 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)蛋白質的經改良之腺相關病毒(AAV)載體、產生此類AAV載體的方法，及使用此類AAV載體預防或治療個體之以GCase蛋白之量缺乏及/或GCase蛋白之酶活性缺乏為特徵之疾病或病症(包括但不限於1型高歇氏病)的方法。

【0007】所揭示之本發明之某些枚舉非限制性實施例(E)列舉於下文。此等及相關實施例進一步詳細描述於實施方式中，包括實例及附圖。熟習此項技術者將認識到，或僅使用常規實驗便能夠確定本文所述之特定實施例的等效物。

E1. 一種重組腺相關病毒(AAV)載體基因體，其包含編碼 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)蛋白質的核苷酸序列。

E2. 如E1之AAV載體基因體，其中該GCase蛋白包含分泌信號肽序列及成熟多肽序列。

E3. 如**E1**至**E2**之AAV載體基因體，其中該GCase蛋白之成熟多肽序列來自野生型人類GCase蛋白。

E4. 如**E1**至**E3**之AAV載體基因體，其中該GCase蛋白之成熟多肽序列包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列、主要由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

E5. 如**E1**至**E4**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列來自野生型人類GCase蛋白。

E6. 如**E5**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列。

E7. 如**E1**至**E4**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列來自除GCase之外的蛋白質。

E8. 如**E7**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列來自免疫球蛋白。

E9. 如**E8**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列。

E10. 如**E1**至**E4**之AAV載體基因體，其中該GCase蛋白之胺基酸序列係由SEQ ID NO: 16之胺基酸序列提供。

E11. 如**E1**至**E10**之AAV載體基因體，其中編碼該GCase蛋白之成熟多肽序列的該核苷酸序列為野生型核苷酸序列。

E12. 如**E1**至**E10**之AAV載體基因體，其中編碼該GCase蛋白之成熟多肽序列的該核苷酸序列為經密碼子最佳化之核苷酸序列。

E13. 如**E12**之AAV載體基因體，其中相較於編碼該GCase蛋白之成熟多肽序列的野生型核苷酸序列，該經密碼子最佳化之核苷酸序列中的

CpG二核苷酸數目減少。

E14. 如**E13**之AAV載體基因體，其中編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列中的CpG二核苷酸比編碼該GCCase蛋白之成熟多肽序列的野生型核苷酸序列少1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10或1-5。

E15. 如**E13**至**E14**之AAV載體基因體，其中SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 32之核苷酸序列包含編碼該GCCase蛋白之成熟多肽序列的該野生型核苷酸序列。

E16. 如**E13**之AAV載體基因體，其中編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列不含任何CpG二核苷酸。

E17. 如**E1**至**E13**之AAV載體基因體，其中編碼該GCCase蛋白之成熟多肽序列的核苷酸序列與SEQ ID NO: 13之核苷酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致。

E18. 如**E1**至**E13**之AAV載體基因體，其中編碼該GCCase蛋白之成熟多肽序列的核苷酸序列與SEQ ID NO: 13之核苷酸序列一致。

E19. 如**E1**至**E13**之AAV載體基因體，其中編碼該GCCase蛋白之該核苷酸序列與SEQ ID NO: 41之核苷酸序列一致。

E20. 如**E1**至**E19**之AAV載體基因體，其中該基因體包含至少一個AAV反向末端重複(ITR)。

E21. 如**E20**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列為野生型。

E22. 如**E20**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列經修飾。

E23. 如**E22**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列經修飾以減少或排除該ITR經歷末端解鏈的能力。

E24. 如**E22**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列經修飾以使末端解鏈位點不活化。

E25. 如**E22**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列經修飾以減少或排除該ITR支持封裝於衣殼中的能力。

E26. 如**E22**之AAV載體基因體，其中該ITR之核苷酸序列經修飾以使D區不活化。

E27. 如**E20**至**E21**之AAV載體基因體，其中該ITR為AAV2 ITR。

E28. 如**E27**之AAV載體基因體，其中該AAV2 ITR被截斷。

E29. 如**E20**之AAV載體基因體，其中該ITR包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19之核苷酸序列，或該等序列中之每一者的互補序列或反向互補序列。

E30. 如**E20**至**E21**之AAV載體基因體，其中該ITR為除AAV2 ITR之外的ITR。

E31. 如**E1**至**E30**之AAV載體基因體，其中該載體基因體包含位於其5'端的第一AAV ITR及位於其3'端的第二AAV ITR。

E32. 如**E31**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含第三AAV ITR。

E33. 如**E32**之AAV載體基因體，其中該第三ITR經修飾以使末端解鏈位點不活化。

E34. 如**E1**至**E33**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含與編碼GCase蛋白之該核苷酸序列可操作地連接的轉錄控制區域。

E35. 如**E34**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具有組成性。

E36. 如**E34**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具誘導性。

E37. 如**E34**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具有組織特異性。

E38. 如**E37**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具有肝臟組織特異性。

E39. 如**E34**至**E38**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域包含啟動子序列。

E40. 如**E39**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域進一步包含增強子序列。

E41. 如**E40**之AAV載體基因體，其中該增強子序列定位於該啟動子之5'。

E42. 如**E40**之AAV載體基因體，其中該增強子序列定位於該啟動子之3'。

E43. 如**E39**之AAV載體基因體，其中該啟動子序列具有肝臟組織特異性。

E44. 如**E40**之AAV載體基因體，其中該增強子序列具有肝臟組織特異性。

E45. 如**E40**之AAV載體基因體，其中該啟動子序列及增強子序列中之每一者具有肝臟組織特異性。

E46. 如**E39**之AAV載體基因體，其中該啟動子序列來源於人類白蛋

白(ALB)基因。

E47. 如**E40**之AAV載體基因體，其中該增強子序列來源於人類白蛋白(ALB)基因或 α -1-微球蛋白/尿抑胰酶素前驅體(AMBIP)基因。

E48. 如**E46**之AAV載體基因體，其中該啟動子序列包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 10之核苷酸序列，或啟動子功能子序列、其修飾或變異體。

E49. 如**E47**之AAV載體基因體，其中該增強子序列分別包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或增強子功能子序列、其修飾或變異體。

E50. 如**E1**至**E49**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含轉錄終止信號序列。

E51. 如**E50**之AAV載體基因體，其中該轉錄終止信號序列為聚腺苷酸化(poly(A))信號序列。

E52. 如**E51**之AAV載體基因體，其中該轉錄終止信號序列來源於牛生長激素(bGH)基因。

E53. 如**E52**之AAV載體基因體，其中該轉錄終止信號序列包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 14之核苷酸序列，或轉錄終止信號功能子序列、其修飾或變異體。

E54. 如**E1**至**E53**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含內含子序列。

E55. 如**E54**之AAV載體基因體，其中該內含子序列定位於編碼該GCa₂蛋白之核苷酸序列內且中斷該核苷酸序列。

E56. 如**E54**之AAV載體基因體，其中該內含子序列不中斷編碼該

GCCase蛋白之核苷酸序列。

E57. 如**E56**之AAV載體基因體，其中該內含子序列定位於編碼該GCCase蛋白之核苷酸序列的5'。

E58. 如**E57**之AAV載體基因體，其中該內含子序列定位於編碼該啟動子之3'及該GCCase蛋白之核苷酸序列的5'。

E59. 如**E54**至**E58**之AAV載體基因體，其中該內含子序列來源於人類 β 血球蛋白(HBB)基因。

E60. 如**E59**之AAV載體基因體，其中該內含子序列包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

E61. 如**E1**至**E60**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含轉錄後調控元件(PRE)序列。

E62. 如**E61**之AAV載體基因體，其中該PRE序列定位於編碼該GCCase蛋白之核苷酸序列的3'及該轉錄終止信號序列之5'。

E63. 如**E61**至**E62**之AAV載體基因體，其中該PRE序列為WPRES或HPRES序列。

E64. 如**E63**之AAV載體基因體，其中該PRE序列包含SEQ ID NO: 27之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

E65. 如**E1**至**E64**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含微小RNA (miRNA)的結合位點。

E66. 如**E65**之AAV載體基因體，其中該miRNA結合位點定位於編碼該GCCase蛋白之核苷酸序列的3'及該轉錄終止信號序列之5'。

E67. 如**E1**至**E64**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含

具有足夠長度之填充或填補核苷酸序列，使得該AAV載體基因體的全長為約4.5至5.0千鹼基。

E68. 如**E1**至**E64**之AAV載體基因體，其中該載體基因體包含第一AAV ITR、與編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列可操作地連接的轉錄控制區域、轉錄終止信號序列及第二AAV ITR。

E69. 如**E68**之AAV載體基因體，其中該載體基因體依5'至3'次序包含該第一AAV ITR、與編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列可操作地連接的該轉錄控制區域、該轉錄終止信號序列，及該第二AAV ITR。

E70. 如**E69**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域包含定位於編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列之5'的啟動子及定位於該啟動子之5'的增強子。

E71. 如**E68**至**E70**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含定位於該啟動子與編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列之間的內含子。

E72. 如**E68**至**E70**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含定位於編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列內且中斷該核苷酸序列的內含子。

E73. 如**E68**至**E72**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含定位於編碼GCCase蛋白之該核苷酸序列與該poly(A)信號序列之間的PRE。

E74. 如**E68**至**E73**之AAV載體基因體，其中該第一AAV ITR定位於該載體基因體之5'端且該第二AAV ITR定位於該載體基因體之3'端。

E75. 如**E74**之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含定位於該第一與第二AAV ITR之間的第三AAV ITR。

E76. 如**E75**之AAV載體基因體，其中該第三AAV ITR之末端解鏈位點不活化。

E77. 如**E68**至**E76**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具有肝臟組織特異性。

E78. 如**E77**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域包含AMBP基因增強子序列之第一複本、AMBP基因增強子序列之第二複本、ALB基因增強子序列及ALB基因啟動子序列。

E79. 如**E78**之AAV載體基因體，其中AMBP基因增強子序列之第一及第二複本中之每一者包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成，該ALB基因增強子序列包含SEQ ID NO: 9之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成，且該ALB基因啟動子序列包含SEQ ID NO: 10之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

E80. 如**E71**至**E79**之AAV載體基因體，其中該內含子序列來源於人類 β 血球蛋白(HBB)基因。

E81. 如**E80**之AAV載體基因體，其中該內含子序列包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

E82. 如**E68**至**E81**之AAV載體基因體，其中該轉錄終止信號序列來源於牛生長激素(bGH)基因。

E83. 如**E82**之AAV載體基因體，其中該轉錄終止信號序列包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 14之核苷酸序列，或轉錄終止信號功能子序列、其修飾或變異體。

E84. 如**E68**至**E83**之AAV載體基因體，其進一步包含經修飾之TBP內含子2序列，該序列定位於該轉錄終止信號序列之3'及該第二AAV ITR之5'。

E85. 如**E1**至**E4**之AAV載體基因體，其中該載體基因體依5'至3'次序包含：

- (a) 第一AAV2 ITR，
- (b) AMBP基因增強子序列之第一複本
- (c) AMBP基因增強子序列之第二複本
- (d) ALB基因增強子序列
- (e) ALB基因啟動子序列
- (f) 人類 β 血球蛋白(HBB)基因內含子序列

(g) 編碼人類GCCase蛋白的核苷酸序列，該核苷酸序列與AMBP增強子之該第一及第二複本、該ALB增強子及該ALB啟動子可操作地連接，其中該GCCase蛋白包含分泌信號肽序列及成熟多肽序列，

- (h) 牛生長激素(bGH)基因轉錄終止信號序列
- (i) 經修飾之TBP內含子2序列；及
- (j) 第二AAV2 ITR。

E86. 如**E85**之AAV載體基因體，其中AMBP基因增強子序列之該第一及第二複本中之每一者包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；該ALB基因增強子序列包含SEQ ID NO: 9之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；該ALB基因啟動子序列包含SEQ ID NO: 10之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；人類 β 血球蛋白(HBB)基因內含

子序列包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；編碼人類GCase蛋白的核苷酸序列包含SEQ ID NO: 41之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；且該牛生長激素(bGH)基因轉錄終止信號序列包含SEQ ID NO: 14之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

E87. 如**E85**至**E86**之AAV載體基因體，其中該第一及第二AAV2 ITR中之每一者包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19之核苷酸序列，或該等序列中之每一者的互補序列或反向互補序列。

E87. 如**E85**至**E87**之AAV載體基因體，其中該載體基因體之核苷酸序列包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 17之核苷酸序列或其反向互補序列。

E88. 如**E1**至**E87**之AAV載體基因體，其中該載體基因體的長度等於或小於5千鹼基。

E89. 一種AAV載體，其包含AAV衣殼及如**E1**至**E88**之AAV載體基因體，其中該載體基因體藉由該衣殼達成衣殼化。

E90. 如**E89**之AAV載體，其中該AAV衣殼具有親肝性。

E91. 如**E89**至**E90**之AAV載體，其中該AAV衣殼係選自由以下組成之群：AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV13、AAVrh.74、AAVrh.10、AAV-DJ、AAV-LK03、AAV-KP1、AAV-hu.Lvr01、AAV-hu.Lvr02、AAV-hu.Lvr03、AAV-hu.Lvr04、AAV-hu.Lvr05、AAV-hu.Lvr06、AAV-hu.Lvr07、AAV-Anc80、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP84、AAV-hu.37、AAV-rh.8、AAV-rh.64R1、

RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4及RHM15-6、AAVHSC7、AAVHSC15及AAVHSC17。

E92. 如**E89**至**E90**之AAV載體，其中該AAV衣殼包含VP1蛋白質，該蛋白質包含以下或由以下組成：選自由SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 4組成之群的胺基酸序列。

E93. 如**E89**至**E92**之AAV載體，其中該載體基因體為單股DNA基因體。

E94. 如**E89**至**E92**之AAV載體，其中該載體基因體為自互補DNA基因體。

E95. 如**E93**至**E94**之AAV載體，其中該載體基因體呈正極性。

E96. 如**E93**至**E94**之AAV載體，其中該載體基因體呈負極性。

E97. 一種包含AAV3B衣殼及AAV載體基因體的AAV載體，其中該載體基因體之核苷酸序列包含或由以下組成：SEQ ID NO: 17之核苷酸序列或其反向互補序列，且其中該載體基因體藉由該衣殼達成衣殼化。

E98. 一種醫藥組成物，其包含**E89**至**E97**之AAV載體及醫藥學上可接受之賦形劑。

E99. 一種使經診斷存在GCase酶活性缺乏之人類個體之周邊血液單核細胞(PBMC)中之活性GCase蛋白含量增加或使該個體之血清中之葡萄糖基神經鞘胺醇含量降低的方法，該方法包含向該個體投與一量之如**E1**至**E98**之AAV載體或組成物，該量有效增加活性PBMC GCase蛋白之量或減少血清葡萄糖基神經鞘胺醇之量。

E100. 如**E99**之方法，其中該方法有效地使該個體之PBMC中之活性GCase蛋白含量增加至健康人PBMC中之活性GCase蛋白含量的至少或

約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。

E101. 如**E100**之方法，其中健康人PBMC中的活性GCCase蛋白含量在約20至130個皮克/百萬(pg/1E6)個細胞範圍內或平均值為約70 pg/1E6個細胞。

E102. 如**E99**之方法，其中相較於該個體在該AAV載體或組成物投與之前之PBMC中的活性GCCase蛋白平均量，該方法有效地使該個體之PBMC中的活性GCCase蛋白含量增加至少25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、300%、400%或500%。

E103. 如**E99**之方法，其中該方法有效地使該個體之PBMC中的活性GCCase蛋白含量增加至至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、140或150 pg/1E6個細胞。

E104. 如**E99**之方法，其中相較於該個體在該AAV載體或組成物投與之前之血清葡萄糖基神經醯胺或葡萄糖基神經鞘胺醇的平均量，該方法有效地使該個體之血清中的葡萄糖基神經醯胺或葡萄糖基神經鞘胺醇含量降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%。

E105. 如**E99**之方法，其中該方法有效地使該個體之血清中的葡萄糖基神經醯胺或葡萄糖基神經鞘胺醇含量降低不超過約200、175、150、125、100、75、50、25或10奈克/毫升血清。

E106. 如**E99**至**E105**之方法，其中該個體之PBMC中的該活性GCCase蛋白含量增加或血清中的葡萄糖基神經醯胺或葡萄糖基神經鞘胺醇含量

降低係在該AAV載體或組成物投與的10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60天內發生。

E107. 一種使人類個體之由GCase酶活性缺乏所致之至少一種症狀或徵象之嚴重程度降低的方法，其包含將有效降低此類症狀或徵象之嚴重程度之量的如**E1**至**E98**之AAV載體或組成物投與該個體。

E108. 如**E107**之方法，其中該症狀或徵象選自由以下組成之群：肝脾腫大、肝腫大、脾腫大、貧血、白血球嗜中性球減少症、全部血球減少症、血小板減少症、單株高 γ -球蛋白血症、多株高 γ -球蛋白血症、厭食症、慢性疲勞、無血管骨壞死、骨痛、骨質溶解、骨壞死及骨質減少。

E109. 如**E99**至**E108**之方法，其中該個體中之GCase酶活性缺乏係由編碼GCase蛋白之基因中的同型接合或異型接合突變引起，相對於GBA基因未突變之健康人中之GCase蛋白的平均量或活性，該突變使自該基因表現之GCase蛋白的量或酶活性減少。

E110. 如**E99**至**E109**之方法，其中該個體經診斷患有1型高歇氏病。

E111. 一種預防或治療人類個體之1型高歇氏病的方法，其包含將有效預防或治療該個體之1型高歇氏病之預防或治療有效量的如**E1**至**E98**之AAV載體或組成物投與該個體。

E112. 如**E99**至**E111**之方法，其中該AAV載體的有效量為 1×10^{10} 至 1×10^{15} 個載體基因體/公斤(vg/kg)個體體重範圍內的劑量。

E113. 如**E99**至**E112**之方法，其中該AAV載體或組成物靜脈內投與該個體。

E114. 一種如**E1**至**E97**之AAV載體用於製造供治療或預防人類個

體之1型高歇氏病用之藥劑的用途。

E115. 一種DNA質體，其包含如**E1**至**E88**之AAV載體基因體的核苷酸序列。

E116. 一種用於產生AAV載體的宿主細胞，該宿主細胞包含如**E115**之DNA質體。

E117. 如**E116**之宿主細胞，其中該宿主細胞為HEK293細胞。

E118. 如**E116**至**E117**之宿主細胞，其中該宿主細胞進一步包含編碼AAV Rep蛋白的基因，諸如DNA質體中所含的基因。

E119. 如**E116**至**E118**之宿主細胞，其中該宿主細胞進一步包含編碼AAV VP1衣殼蛋白的基因，諸如DNA質體中所含的基因。

E120. 如**E116**至**E119**之宿主細胞，其中該宿主細胞進一步包含編碼病毒輔助因子的基因，諸如DNA質體中所含的基因。

E121. 一種製備AAV載體的方法，其包含：在足以允許AAV載體產生的條件下培育如**E120**之宿主細胞，及純化由此產生的AAV載體。

E122. 一種藉由如**E121**之方法產生的AAV載體。

【圖式簡單說明】

【0008】

圖1. Huh7細胞在為了表現人類GCCase蛋白而經不同劑量之三種經AAV載體轉導後所產生的GCCase酶活性。

圖2. 投與D409V小鼠之兩種AAV GCCase載體對肝臟及脾臟的轉導，該轉導依據相對於處理小鼠及對照小鼠之組織樣品中之細胞基因體DNA之量標準化的載體基因體數目來定量。

圖3. 投與D409V小鼠之兩種AAV GCCase載體對肝臟及脾臟的轉導，

該轉導依據相對於處理小鼠及對照小鼠之組織樣品中之單倍體細胞基因體數目標準化的載體基因體數目來定量。

圖4. 投與D409V小鼠之兩種AAV GCa₂載體對肝臟及脾臟的轉導，該轉導依據相對於處理小鼠及對照小鼠之組織樣品中之細胞管家基因之表現標準化的人類GCa₂ mRNA表現量來定量。

圖5A. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之肝臟樣品中存在的人類GCa₂酶之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。

圖5B. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之脾臟樣品中存在的人類GCa₂酶之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。

圖5C. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之血清樣品中存在的人類GCa₂酶之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。

圖6. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之肝臟樣品中存在的人類GCa₂酶之量與對照小鼠的比較，如藉由免疫組織化學可視化。編號指示不同測試動物。

圖7A. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之肝臟樣品中存在的人類GCa₂酶活性之量，如利用螢光受質分析所測定。點線指示經媒劑處理之D409V小鼠中的GCa₂酶活性。

圖7B. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之脾臟樣品中存在的人類GCa₂酶活性之量，如利用螢光受質分析所測定。點線指示經媒劑處理之D409V小鼠中的GCa₂酶活性。

圖7C. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之血清樣品中存在的人類GCa₂酶活性之量，如利用螢光受質分析所測定。

圖8A. 投與兩種AAV GCa₂載體之D409V小鼠之肝臟樣品中存在的人類GCa₂酶活性之量，如利用螢光受質分析所測定。

葡糖基神經鞘胺醇之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。點線指示未處理之D409V小鼠中升高的葡糖基神經鞘胺醇含量。

圖8B. 投與兩種AAV GCaase載體之D409V小鼠之脾臟樣品中存在的葡糖基神經鞘胺醇之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。點線指示未處理之D409V小鼠中升高的葡糖基神經鞘胺醇含量。

圖8C. 投與兩種AAV GCaase載體之D409V小鼠之血清樣品中存在的葡糖基神經鞘胺醇之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。點線指示未處理之D409V小鼠中升高的葡糖基神經鞘胺醇含量。

圖9. 投與健康食蟹獼猴之兩種AAV GCaase載體對肝臟、脾臟及背根節的轉導，該轉導依據相對於處理猴及對照猴之組織樣品中之細胞基因體DNA之量標準化的載體基因體數目定量。

圖10. 投與健康食蟹獼猴之兩種AAV GCaase載體對肝臟、脾臟及背根節的轉導，該轉導依據相對於處理猴及對照猴之組織樣品中之單倍體細胞基因體數目標準化的載體基因體數目定量。

圖11. 投與健康食蟹獼猴之兩種AAV GCaase載體對肝臟、脾臟及背根節的轉導，該轉導依據相對於處理猴及對照猴之組織樣品中之細胞管家基因之表現標準化的人類GCaase mRNA表現量來定量。

圖12A. 投與四次遞增劑量之AAV GCaase載體之健康食蟹獼猴之肝臟樣品中存在的人類GCaase酶之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。點線指示10至15個健康人樣品中之GCaase蛋白含量的平均值。灰色區域表示健康人GCaase濃度的標準差。

圖12B. 投與四次遞增劑量之AAV GCaase載體之健康食蟹獼猴之脾臟樣品中存在的人類GCaase酶之量，如利用LC-MS/MS分析所測定。點線指

示10至15個健康人樣品中之GC_{ase}蛋白含量的平均值。灰色區域表示健康人GC_{ase}濃度的標準差。

圖13A. 投與兩次遞增劑量(3E12 vg/kg及1E13 vg/kg)之AAV GC_{ase}載體之健康食蟹獼猴之肝臟樣品中存在的人類GC_{ase}酶之量與對照猴的比較，如藉由免疫組織化學可視化。編號指示不同測試動物。

圖13B. 投與兩次遞增劑量(3E13 vg/kg及5E13 vg/kg)之AAV GC_{ase}載體之健康食蟹獼猴之肝臟樣品中存在的人類GC_{ase}酶之量與對照猴的比較，如藉由免疫組織化學可視化。編號指示不同測試動物。

【實施方式】

【0009】 以下論述係針對本發明之各種實施例。術語「本發明」不意指任何特定實施例或以其他方式限制本發明之範疇。儘管此等實施例中之一或多者可較佳，但所揭示之實施例不應解釋為或以其他方式用於限制本發明(包括申請專利範圍)之範疇。另外，熟習此項技術者將理解，以下描述具有廣泛應用，且任何實施例之論述僅意欲為該實施例之一實例，且不希望表示本發明(包括申請專利範圍)之範疇限於該實施例。

某些定義

【0010】 如本文所用，「腺相關病毒載體」意謂包含天然存在或非天然存在之AAV衣殼的腺相關病毒(AAV)，該AAV衣殼將載體基因體衣殼化。腺相關病毒載體可縮寫為「AAV載體」且視上下文而定，可用同義術語提及，諸如「重組AAV載體」、「rAAV載體」、「rAAV」或僅「載體」。

【0011】 如本文所用，「載體基因體」意謂一種AAV基因體，其經修飾(諸如藉由使內源AAV *rep*及/或*cap*基因不活化或缺失)以包括異源核苷酸序列及使得含有載體基因體之任何AAV載體不勝任複製。

【0012】如本文所用，「異源核苷酸序列」意謂自不同生物體(包括生物體)引入生物體(包括病毒)中的一種核苷酸序列。異源核苷酸序列的序列可與自然界中存在的序列相同，或可為其經修飾形式，或甚至部分或整個合成的。

【0013】如本文所用，「表現卡匣」意謂包含轉殖基因的核苷酸序列，該轉殖基因可操作地連接至用於控制起始及終止該轉殖基因自DNA轉錄成RNA的調控區域或元件。

【0014】如本文所用，「轉殖基因」意謂編碼至少一種多肽的核苷酸序列及/或編碼至少一種功能RNA分子的核苷酸序列。轉殖基因可用同義術語「所關注之基因」提及。

【0015】如本文所用，「宿主細胞」意謂其中產生AAV載體的細胞。生產細胞及封裝細胞為宿主細胞之實例。宿主細胞可為哺乳動物或昆蟲，或來自其他生物體，無論單細胞或多細胞生物體。

【0016】如本文所用，術語「純化(purify)」及相關術語「經純化(purified)」及「純化(purification)」當結合AAV載體或其樣品或製備使用時，表示與含有載體之起始材料相比，純度相對增加或改良；及/或旨在純化生物產物之依序純化步驟之一些方案中的事先中間純化步驟，且不需要具體的定性或定量純度，除非另外說明。

【0017】如本文所用，「轉導」意謂將AAV載體基因體引入目標細胞中。轉導有別於感染，後一術語用於指將複製勝任型腺相關病毒之基因體引入細胞中。

【0018】如本文所用，「目標細胞」意謂AAV載體被設計用來轉導或意欲轉導的細胞，或在實驗上觀測到被AAV載體轉導的細胞，不論轉導

在個體活體外或活體內進行。

【0019】如本文所用，「個體」意謂AAV載體為了預防或治療疾病、病症或病狀之目的而投與的生物體。

高歇氏病

【0020】 醣神經鞘脂(GSL)為定位於質膜之外層中以及細胞外的生物活性醣脂，其具有多種功能，包括細胞信號傳導作用。多種GSL的生物合成包括在ER及早期高基氏器(Golgi apparatus)之細胞質表面上發生神經醯胺之葡萄糖苷化、形成葡糖基神經醯胺(亦稱為葡萄糖腦苷脂；縮寫GlcCer或GL1)的步驟，隨後，高基氏腔內的糖基轉移酶附著其他糖分子，產生更複雜的聚醣結構。Aerts, JMFG 等人, *Curr Op Chem Biol*, 53:204 (2019); Schnaar, RL及Kinoshita, T, *Glycosphingolipids* (第11章), 於*Essentials of Glycobiology* [網際網路], 第3版, CSH Laboratory Press, Varki, A 等人編 (2017)。在代謝期間，GSL被胞吞且在溶酶體中降解，其在溶酶體中被糖苷酶作用，糖苷酶依序移除末端糖部分直至留下神經醯胺，神經醯胺被溶酶體酸性神經醯胺酶裂解成其成分：游離脂肪酸及神經鞘胺醇。

【0021】 負責將GSL降解成其脂質核心的溶酶體糖苷酶之一為β-葡萄糖腦苷脂酶(亦稱為葡糖基神經醯胺酶、酸性β-葡萄糖苷酶，或β-D-葡糖基-N-醯基鞘胺醇葡糖水解酶；EC 3.2.1.45；縮寫為GCase)，一種溶酶體膜相關醣蛋白，其由GBA基因編碼，催化葡萄糖腦苷脂水解成D-葡萄糖及神經醯胺。涉及GSL代謝之溶酶體糖苷酶的活性缺乏導致多種所謂的溶酶體貯積病，且β-葡萄糖腦苷脂酶的活性缺乏導致GlcCer之病理性細胞內聚積，此為高歇氏病(GD)之潛在病因。GlcCer之主要非CNS來源為衰老

血細胞之裂解及組織碎片，且未完全代謝的GlcCer受質貯積於網狀內皮系統之單核球-巨噬細胞譜系的細胞中。

【0022】 儘管GCase缺乏係GD的根本原因，但該病症的臨床表現係高度可變的，範圍為新生兒致死性至輕度症狀。白血細胞中所量測的GCase活性程度與疾病嚴重程度不具有相關性，且基因型甚至不能可靠地預測表型。其他變數(諸如與其他基因產物的相互作用、表觀遺傳機制及環境因素)決定特定個體之疾病病程的程度尚待完全瞭解。

【0023】 GD在臨床上呈現五種形式。高加索人(Caucasians)的最常見形式為1型(約90%的GD個案)(非神經病變類型)，而2型及3型呈現原發神經學併發症。兩種較罕見的形式亦已描述。

【0024】 可在任何年齡診斷出、但尤其在成年早期診斷出的1型高歇氏病(縮寫為「GD1」)與以下有關：骨骼疾病(骨質減少、局灶性溶解或硬化性病變、骨壞死(其一旦發生，即為不可逆，即使治療)及骨折)、肝腫大、脾腫大、細胞減少症(貧血、白血球減少症及/或血小板減少症)、肺病(間質性肺病、肺泡/肺葉實變及/或肺動脈高血壓)，及不存在原發中樞神經系統疾病。脾腫大極其常見(至少90%患者)，肝腫大常見(60-80%患者)，骨骼疾病亦常見(至少70%患者)，且細胞減少症幾乎普遍存在於未治療之GD中。除較常見的臨床徵象之外，1型GD可呈現凝血、免疫及代謝異常，以及某些惡性疾病(例如多發性骨髓瘤)。亦可發生疼痛性骨骼危症。

【0025】 2型及3型高歇氏病出現的年齡通常比1型年輕，且儘管與許多相同內臟症狀有關，但因包括原發CNS累及而獨特。與某些GBA突變有關之溶酶體鞘脂分解的急劇減少導致毒性副產物的聚積，該等毒性副產

物來源於膜神經節苷脂在神經元中的周轉。對於2型GD (急性神經病變形式；小於5%的GD個案)而言，疾病發作在兩歲之前發生且兩歲至四歲快速惡化而死亡。神經症狀包括延髓徵象、錐體徵象及認知障礙。不存在骨骼疾病。對於3型GD(亞急性/慢性神經病變；約5%的GD個案)而言，幼年期頻繁發病，但疾病惡化緩慢得多且患者可生存至其第三或第四個十年。神經症狀包括動眼失用症、癲癇發作及漸進肌痙攣癲癇症。

【0026】 因GCase活性完全缺乏引起皮膚障壁功能嚴重減弱所致的圍產期致死性形式(小於1%的GD個案)與鱗癬狀或火棉膠樣皮膚異常、非免疫胎兒水腫及錐體徵象有關，而心血管形式的特徵為主動脈瓣及二尖瓣鈣化、輕度脾腫大、角膜渾濁及核上眼肌麻痺。心血管GD表型係描述為與特定基因型高度相關的唯一GD表型，亦即，對於p.Asp448His變異體而言為同型接合性。

【0027】 有趣的是，在患有GD之個體及僅具異型接合性的個體中，GCase的病理性變異體與出現帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)及路易體性癡呆症(Lewy body dementia)的風險增加有關，表明異常葡萄糖基神經醯胺代謝在PD病因學中的作用。

【0028】 GD的定義特點為GlcCer聚積於巨噬細胞(通常稱為高歇氏細胞或貯積細胞)中，存在於脾臟、肝臟、骨髓、淋巴結及肺中，且咸信此等細胞造成多種GD症狀。據報導，高歇氏細胞在表型上類似於所謂的替代性活化巨噬細胞，且產生及分泌多種蛋白質及副產物，該等蛋白質及副產物可以咸信對發病機制及症狀表現有貢獻的方式調節發炎、凝血、補體活化以及全身組織及器官功能。*Boven LA 等人, Am J Clin Pathol, 122(3):359-69 (2004)。*

【0029】高歇氏細胞產生的產物之一為分泌的蛋白質，其設法進入循環中且可充當血漿生物標記物以得知此等細胞之存在且因此得知GD之存在。此等蛋白質包括酶殼三糖苷酶、趨化因子CCL18/PARC，及另一種蛋白質，稱為醣蛋白非轉移性黑色素瘤蛋白質B (gpNMB)。亦已證明，高歇氏細胞可藉由增加衍生自過量GlcCer (作為受質或輔因子)之多種產物的產生來適應GCCase缺乏，該等產物可在血漿中偵測到。此等產物包括GlcCer藉由溶酶體酸性神經醯胺酶發生去醯化變成其鞘胺醇鹼而引起的神經節苷脂GM3、糖基- β -膽固醇(GlcChol)及葡糖基神經鞘胺醇(GlcSph)之產生增加。後一種產物尤其會涉及GD發病機制且可加以監測以追蹤對ERT或SRT的反應。*Murugesan V* 等人, *Am J Hematol*, 91:1082-9 (2016)。

【0030】高歇氏病係由與編碼GCCase蛋白之人類GBA基因(亦稱為GBA1、GCB及GLUC)有關的多種突變引起。位於染色體區域1q22的GBA基因突變使得GD主要作為體染色體隱性疾病遺傳。GBA基因含有12個外顯子，其產生編碼3種蛋白質同功型的5種已知轉錄變異體。轉錄變異體1 (2291 nt長；RefSeq NM_000157.4)、變異體2 (2344 nt長；RefSeq NM_001005741.3)及變異體3 (2325 nt長；NM_001005742.3)各自編碼GCCase同功型1前驅體，536個胺基酸長的蛋白質(RefSeq NP_000148.2)，包括39個胺基酸長的信號肽序列及497個胺基酸長的成熟多肽序列，該成熟多肽序列含有5個潛在的N連接型糖基化位點。轉錄本變異體4 (RefSeq 2161 nt長；NM_001171811.2)編碼GCCase同功型2 (449個胺基酸長的蛋白質)，且變異體5 (RefSeq 2144 nt長；NM_001171812.2)編碼GCCase同功型3 (487個胺基酸長的蛋白質)。

【0031】 已鑑別至少200個與GD1有關的有害GBA基因突變，包括錯義及無義突變、剪接接合點變異體、一或多個核苷酸的缺失及插入，以及與定位於GBA下游之假基因(GBAP)重組。病原突變已與以下有關：mRNA不穩定性、蛋白質的過早轉譯終止及損失，以及影響蛋白質之酶活性的突變。

【0032】 不同群體的GD1流行率不同。舉例而言，GD1儘管在艾希肯納茲猶太人(Ashkenazi Jewish)血統的個體中較常見(約1-2:1000)，但在其他白種人群體中的頻率則低得多(約1-2:100,000)。GD1的診斷如下證實：偵測到血液白血球或單核細胞中之GCase酶活性低(正常值的0-15%)而在表型上證實，及偵測到GBA基因中之雙對偶基因病原突變而在分子遺傳學上證實，諸如對GBA進行序列分析，隨後進行靶向基因之缺失-複製分析以測試鄰近假基因的受累(若未發現病原性變異體)。儘管多種突變具有GD1病原性，但在艾希肯納茲猶太人之病原性變異體中佔約90%且在非猶太人群體中佔約50-60%的四種最常見突變為c.84dupG (亦稱為84GG)、c.115+1G>A (亦稱為IVS2+1)、p.Asn409Ser (亦稱為p.N370S或c.1226A>G)及p.Leu483Pro (亦稱為p.L444P或c.1448T>C)。

【0033】 三種重組GCase製劑作為酶替代療法已批准用於治療GD1。維拉昔酶α (商標VPRIV®)具有與成熟同功型1 GCase相同的胺基酸序列；除Arg495His取代之外，伊米昔酶(商標Cerezyme®)具有與成熟同功型1 GCase相同的胺基酸序列；且除N端的2個額外胺基酸(Glu-Phe)及C端的7個額外胺基酸(Asp-Leu-Leu-Val-Asp-Thr-Met)之外，他利昔酶α (taliglucerase alfa)(商標Elelyso®)具有與成熟同功型1 GCase相同的胺基酸序列。

腺相關病毒(AAV)

【0034】 本發明提供由重組方式修飾之腺相關病毒(AAV)建立的載體。AAV載體能夠經由轉導將可處於轉錄元件及其他調控元件控制下的基因遞送至目標細胞中。AAV載體藉由將基因之功能複本供應至其中內源形式缺失或突變的目標細胞而適用於多種疾病及病症的基因療法。

【0035】 AAV為小的、無包膜的、表觀上非病原性的細小病毒，視供應其自身複製所必需之基因產物(已知為輔助因子)的某些其他病毒而定，生物學的詭異使得AAV非常適合充當重組載體。舉例而言，在腺病毒與AAV共感染的細胞中，腺病毒(AdV)可藉由提供如下某些腺病毒因子來充當輔助病毒：諸如E1A、E1B55K、E2A及E4ORF6蛋白質，以及VA RNA。亦已鑑別出其他輔助病毒，諸如單純疱疹病毒。AAV複製依賴於其他病毒所供應的輔助因子使得AAV表徵為依賴病毒類型。AAV病毒粒子具有兩種主要結構特徵，分別稱為衣殼及基因體。衣殼為圍封且保護(衣殼化)病毒基因體的二十面體蛋白質殼體，該病毒基因體含有基因及病毒在感染細胞中複製所必需的其他序列。

【0036】 AAV基因體為含有兩種基因(稱為*rep*及*cap*)的DNA單股。在AAV2 (感染人類且在生物學上已特別充分表徵的天然存在之AAV)中，基因體長約4.7千鹼基。藉助於自兩個啟動子轉錄之轉錄本的替代性剪接，*rep*基因能夠產生四種相關的多功能蛋白質，稱為Rep (在AAV2中稱為Rep 78、Rep 68、Rep 52及Rep 40，根據其表觀分子量命名)，該等多功能蛋白質涉及病毒基因表現以及基因體的複製及封裝。自控制單一*cap*基因之單一啟動子轉錄之轉錄本的替代性剪接產生三種相關結構蛋白：VP1、VP2及VP3，總計60個，其分別以約1:1:10之比率自組裝而形成病

毒之二十面體衣殼。VP1為三種VP蛋白質中最長的且在其胺基端區域含有VP2缺乏的胺基酸，VP2又長於VP3且在其胺基端區域含有VP3缺乏的胺基酸。除含有基因體之外，衣殼蛋白亦介導與目標細胞表面上之受體的特異性結合相互作用，基於此可限制AAV感染某些動物物種及甚至同類型動物內之組織的能力，此現象稱為向性。舉例而言，與肌肉或神經元細胞相比，一種AAV類型可優先感染肝臟細胞(例如肝細胞)。

【0037】除*rep*及*cap*基因之外，完整AAV基因體亦在其5'及3'端中之每一端定位有相對較短(在AAV2中為145個核苷酸)的序列元件，稱為反向末端重複(ITR)。ITR含有巢式回文序列，其可經由沃森-克里克鹼基配對(Watson-Crick base pairing)進行自黏接以形成T形或髮夾狀二級結構。在AAV2中，已證明ITR具有病毒壽命週期所必需的重要功能，包括使單股DNA基因體轉變成基因表現所必需的雙股形式，以及藉由Rep蛋白將單股AAV基因體封裝於衣殼組裝體中。

【0038】已在不同物種中發現天然存在之許多類型的AAV。已自生物樣品中一次性分離出僅六種AAV類型的靈長類動物AAV (AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5及AAV6)，其中前五種憑結構獨特性足以基於抗體交叉反應性實驗而分類為不同血清型。後來，藉由使用靶向先前所發現之AAV之*cap*基因中之高度保守區的引子對恆河猴DNA進行PCR擴增而發現兩種新穎AAV (稱為AAV7及AAV8)。Gao, G等人, *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy, PNAS (USA) 99(18):11854-11859 (2002)*。隨後，使用類似方法自人類及非人類靈長類動物組織選殖多種新穎AAV，大大擴大已知AAV衣殼蛋白序列之範疇。Gao, G等人, *Clades of Adeno-Associated Viruses*

Are Widely Disseminated in Human Tissues, J Virol. 78(12):6381-6388 (2004)。多種AAV衣殼蛋白序列彼此高度相似或與先前鑑別的AAV高度相似，且儘管通常稱為獨特的AAV「血清型」，但並非所有的此類衣殼在根據抗體交叉反應性測試時，必然估計為在免疫學上可區分。在血清學上與所定義血清型無法區分、但含有胺基酸序列不同之衣殼蛋白的AAV或AAV衣殼更佳稱為已知血清型的變異體。由天然及非天然存在之衣殼蛋白製成的多種衣殼已用於建立AAV基因療法載體。

【0039】正如對AAV2之已確立之研究，AAV病毒顆粒在結合位於細胞表面上之其同源受體之後，經由胞吞進入細胞。在溶酶體達到低pH後，衣殼蛋白經歷構形變化，從而允許衣殼逃入細胞溶質中且接著輸送至細胞核中。一旦到達那兒，衣殼分解，釋放出基因體，該基因體被細胞DNA聚合酶作用以合成3'端以ITR開始的第二DNA股，該第二DNA股在自黏接之後充當引子。*rep*及*cap*基因接著可開始表現，隨後形成新病毒顆粒且自細胞釋出。

AAV載體

【0040】相對簡單的AAV結構及壽命週期以及其對人類之病原性未知的實情啟發研究人員對AAV進行工程改造且研究是否可將其自病毒轉變成用於基因療法的重組載體。簡言之，此如下進行：將包括兩個ITR之AAV2完整基因體選殖入質體中，將*rep*及*cap*基因移入各別質體中且將其用包含啟動子的異源基因表現卡匣置換，該啟動子控制編碼蛋白質之轉殖基因。因此，載體基因體中保留的唯一病毒基因體序列為ITR，原因在於該等ITR在封裝及基因表現時發揮關鍵作用，沒有此等ITR，則無法產生AAV載體，或AAV載體在轉導目標細胞之後無法發揮表現轉殖基因的作

用。最後，為了避免與輔助病毒共感染(AAV病毒粒子複製所必需的)的需要，將所謂的輔助因子(在AdV的情況下，諸如E1A、E1B55K、E2A、E4ORF6及VA RNA輔助因子)之基因選殖入第三質體中。

【0041】 當三種質體(有時稱為轉殖基因、*rep/cap*及輔助質體)一起轉染至哺乳動物宿主細胞中時，**Rep**及衣殼蛋白以及輔助病毒因子由其各別質體表現。此等基因產物接著在宿主細胞中發揮作用以質體中將載體基因體複製成其序列駐存於其上的單股DNA，組裝衣殼且將單股基因體封裝於衣殼中，從而形成載體。接著可自宿主細胞純化載體。由於*rep*及*cap*基因在不同質體上、在其側接ITR之常見環境外部以反式存在，因此其不封裝於載體內。因此，儘管以此方式產生的AAV載體能夠結合至其基因體內之表現卡匣且將該表現卡匣輸送至目標細胞中，但其不能複製產生新載體顆粒。

【0042】 若載體如所預期在轉導之後發揮作用，則表現卡匣將具有轉錄活性且在目標細胞中產生由轉殖基因編碼的基因產物。由於可以各種組態設計包含處於不同功能序列及調控元件控制下之多種轉殖基因的載體基因體且該等載體基因體與多種天然存在之衣殼及經工程改造之衣殼配對，從而具有不同向性及其他特性，因此AAV載體高度通用。因此可根據經轉導細胞類型及基因產物之產生量，以可控程度產生多種類型的基因產物。

【0043】 AAV載體包含藉由AAV衣殼達成衣殼化的載體基因體。在一些實施例中，AAV載體基因體包含至少一種AAV反向末端重複(ITR)及異源核苷酸序列，該異源核苷酸序列當存在或表現於經轉導之目標細胞中時發揮所需功能。在一些實施例中，異源核苷酸序列來源於不同類型的病

毒，或完全不同類型的生物體，諸如動物、植物、原生生物、真菌、細菌、古菌或其他類型的生物體。在一些實施例中，異源核苷酸序列置換原生AAV *rep*及/或*cap*基因中的一些或全部，使得載體不能在經轉導之目標細胞中表現功能Rep或VP蛋白質。在一些實施例中，除定位於基因體末端的AAV反向末端重複序列之外，載體基因體的完整序列係由異源核苷酸序列組成。

表現卡匣

【0044】 在一些實施例中，異源核苷酸序列包含或由以下組成：包含與啟動子及視情況存在之一或多個增強子可操作地連接之轉殖基因的表現卡匣，其用於控制轉殖基因自DNA向RNA轉錄的起始；以及轉錄終止元件，諸如聚腺苷酸化信號序列，其用於終止轉殖基因向RNA的轉錄。AAV載體可包含超過一個轉殖基因作為一個轉錄單元之一部分，或各自為其自身轉錄單元之一部分。如後續章節中所述，表現卡匣可進一步包含為了影響轉錄、轉錄本穩定性、轉譯或其他功能而設計的其他序列元件。

【0045】 通常設計AAV載體時，表現卡匣結構及整個基因體受到衣殼封裝能力的限制，以致轉殖基因當與基因體中之為載體功能所必需的所有其他元件(諸如轉錄控制元件及ITR)組合時，該轉殖基因的長度在AAV2的情況下不超過約5千鹼基，儘管其他類型的衣殼可具有更大或更小的封裝限制。然而，在尺寸限制範圍內，轉殖基因、ITR及載體發揮作用以達成其預期目的所必需之其他元件的選擇存在很大靈活性。

【0046】 出於基因療法之目的，轉殖基因可為任何基因，應瞭解其產物可預防或治療(但不一定治癒)需要預防或治療之個體的任何疾病、病症或病狀。在一些實施例中，基因療法意欲預防或治療個體之以天然存在

之基因之產物產生量異常低或甚至不存在為特徵的疾病、病症或病狀，諸如因功能損失型突變而可能發生的疾病、病症或病狀。關於此類實施例，轉殖基因可為意欲補償個體之缺陷基因的轉殖基因，其當表現時向個體之至少一些細胞提供相同或相似基因產物。非限制性實例為經設計以表現凝血因子IX之功能形式的載體，其用於B型血友病之基因療法中，B型血友病係由原生因子IX基因中的功能損失型突變引起。然而，在其他實施例中，轉殖基因可為意欲抵消目標細胞中之有害功能獲得型突變之影響的轉殖基因。在一些實施例中，轉殖基因可編碼轉錄活化因子以增強內源基因活性，產生所需基因產物，或反之，可編碼轉錄抑制因子以減少內源基因活性，產生有害的基因產物。

【0047】 在一些實施例中，轉殖基因可編碼多肽或編碼功能不同於編碼蛋白質的RNA分子，諸如非編碼的調控RNA分子(例如微RNA、小干擾RNA、piwi作用式RNA、增強子RNA、非編碼長RNA等)。轉殖基因中的蛋白質編碼序列可經密碼子最佳化，且轉譯起始位點(例如Kozak序列)可經修飾以增強或減少其起始轉譯的傾向。在一些實施例中，編碼胺基酸序列的轉殖基因可含有一或多個開放閱讀框，且/或含有一或多個剪接供體與受體位點對，以容許對不同訊息及來自此類訊息之多肽序列進行替代性剪接。編碼蛋白質之轉殖基因進一步包含一或多個終止密碼子以終止多肽鏈之轉譯。

【0048】 在一些實施例中，載體基因體可出於編輯或以其他方式修飾目標細胞之基因體的目的來設計。舉例而言，載體基因體可包括側接同源臂的表現卡匣或轉殖基因，該側接同源臂旨在促進載體基因體與目標細胞基因體之間的同源重組。在另一實例中，載體基因體可設計成藉由表現

嚮導RNA (gRNA)及/或核酸內切酶(諸如Cas9或相關核酸內切酶，諸如SaCas9)來執行CRISPR基因編輯，該核酸內切酶能夠結合gRNA且使gRNA所靶向的DNA序列裂解。

GCase 轉殖基因

【0049】 在一些實施例中，本發明之AAV載體包含載體基因體，該載體基因體包含含有GCase蛋白之編碼序列的表現卡匣。可使用所具有之酶活性能夠使糖基神經醯胺(亦稱為葡萄糖基神經醯胺、葡萄糖腦苷脂、GlcCer)裂解之任何GCase蛋白的編碼序列，包括但不限於人類溶酶體GCase蛋白同功型編號1、2及3(分別為RefSeq NP_000148.2、RefSeq NP_001165282.1及RefSeq NP_001165283.1)，以及來自非人類物種的GCase蛋白。在其他實施例中，GCase蛋白可包括人類GCase蛋白之天然存在之任何變異體，其不含有病原突變，諸如過早轉譯終止密碼子，或實質上減少GCase酶活性及/或蛋白質穩定性的胺基酸取代、插入或缺失。在又其他實施例中，GCase蛋白可包括保持GCase酶活性之人類GCase蛋白工程化變異體，諸如重組替代療法伊米苷酶及他利苷酶 α 中所用的GCase同功型1之變異體，以及其他工程化變異體，包括嵌合變異體及具有胺基酸取代、插入或缺失的變異體，該等胺基酸取代、插入或缺失係為了增強GCase特異活性、添加或移除糖基化位點或其他轉譯後修飾位點或改變GCase結構或功能之其他態樣而設計。在一些實施例中，來自相似或完全不同分泌性蛋白的分泌信號肽序列修飾或完全置換原生分泌信號肽序列。

【0050】 為了用於本發明之AAV載體中，編碼GCase蛋白的核苷酸序列可為能夠在意欲經載體轉導細胞類型中編碼所需GCase蛋白的任何核

核苷酸序列。在一些實施例中，編碼GCCase蛋白的核苷酸序列(轉殖基因)與存在於編碼GCCase (諸如人類GCCase)之天然存在之基因中的核苷酸序列相同，諸如編碼人類GCCase同功型編號1之天然存在之人類核苷酸序列中的任一者，諸如RefSeq NM_000157.4 (或核苷酸138-1748，包括端點)、RefSeq NM_001005741.3 (或核苷酸191-1801，包括端點)及RefSeq NM_001005742.3 (或核苷酸172-1782，包括端點)；或編碼人類GCCase同功型編號2之天然存在之人類核苷酸序列中的任一者，諸如RefSeq NM_001171811.2 (或核苷酸269-1618，包括端點)；或編碼人類GCCase同功型編號3之天然存在之人類核苷酸序列中的任一者，諸如RefSeq NM_001171812.2 (或核苷酸138-1601，包括端點)。

【0051】 在其他實施例中，編碼GCCase蛋白之核苷酸序列可在一或多個核苷酸位置不同於天然存在之核苷酸序列，且由於遺傳密碼的冗餘，仍編碼與天然存在之基因序列一致的GCCase蛋白。在一些實施例中，可有意地對編碼GCCase蛋白之核苷酸序列進行修飾以影響其在經轉導細胞中的功能，諸如排除能夠刺激先天性免疫反應的序列模體、排除隱性剪接接合點、排除替代起始密碼子、增強相應mRNA的穩定性及/或增加mRNA向蛋白質的轉譯速率。在其他實施例中，編碼GCCase蛋白的核苷酸序列可無內含子，可包括中斷編碼序列、但被經轉導細胞中之剪接設備移除的一或多個內含子，以便允許所需GCCase蛋白的轉譯。

【0052】 在一些實施例中，本發明之AAV載體包含編碼GCCase蛋白的轉殖基因，該GCCase蛋白包含成熟GCCase多肽，該成熟GCCase多肽的一個非限制性實例為SEQ ID NO: 40之胺基酸序列。在一些其他實施例中，本發明之AAV載體包含編碼GCCase前驅蛋白的轉殖基因，該GCCase前驅蛋

白包含或由分泌信號肽及成熟GCase多肽組成，其中分泌信號肽之非限制性實例包括SEQ ID NO: 38或SEQ ID NO: 39之胺基酸序列，且成熟GCase多肽之非限制性實例包括SEQ ID NO: 40之胺基酸序列。在一些實施例中，本發明之AAV載體包含編碼成熟GCase多肽之轉殖基因，該成熟GCase多肽之非限制性實例為SEQ ID NO: 13之核苷酸序列。在一些其他實施例中，本發明之AAV載體包含編碼GCase前驅蛋白之轉殖基因，該GCase前驅蛋白之非限制性實例包括SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37或SEQ ID NO: 41之核苷酸序列。

【0053】 在一些其他實施例中，本發明之AAV載體包含編碼成熟GCase多肽或GCase前驅蛋白之轉殖基因，其中由轉殖基因編碼的蛋白質序列與參考序列之蛋白質序列高度相似或一致，但其中轉殖基因與參考序列之核苷酸序列共有一定的一致性百分比，差異對應於密碼子內不改變相應胺基酸的位置。舉例而言，在一些實施例中，轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 28相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 28至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO:29相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 29至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、

98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 30相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 30至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 31相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 31至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 32相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 32至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 33相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 33至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 34相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 34至少50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 35相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 35至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 36相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 36至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 37相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 37至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列；或轉殖基因編碼與SEQ ID NO: 41相同的GCase蛋白且具有與SEQ ID NO: 41至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、

99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列。

【0054】 參考序列與轉殖基因之間的核苷酸序列一致性百分比可藉由此項技術中已知之任何方法測定。舉例而言，在一些實施例中，可將參考序列與轉殖基因之核苷酸序列(或由其編碼的胺基酸序列)對準且在其全長上比較且使用電腦算法計算核苷酸序列一致性百分比。用於核苷酸序列全域對準及比較的例示性算法為尼德曼-翁施算法(Needleman-Wunsch algorithm)。然而，在其他實施例中，可使用局部比對算法，諸如BLAST算法。*Needleman, SB及Wunsch, CD, J Mol Biol, 48(3):443-53 (1970); States DJ等人, Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:66-70 (1991); Pearson, WR, Curr Protoc Bioinformatics, 43:3.5.1-3.5.9 (2013)*。在一些實施例中，若參考序列及轉殖基因序列中之一者或另一者含有非編碼序列，諸如內含子或終止密碼子，則忽略非編碼序列且僅將參考序列及轉殖基因序列內的蛋白編碼序列對準且比較。參考序列與轉殖基因之間確立最佳的全域對準後，可計算所對準序列之間的一致核苷酸百分比。

【0055】 如此項技術中已知，序列比較算法可允許使用者定義取代分數及空位罰分，使用參數計算可進行之多種可能比對的比對分數。分數最高的比對接著視為最佳。取代分數包括向匹配賦予數值獎勵且向錯配賦予罰分。各別匹配及錯配分數之例示性集合包括1，-1；1，-2；1，-3；1，-4；2，-3；4，-5，但其他集合亦可。空位代價包括向空位的存在(核苷酸的插入或缺失)賦予數值罰分以及向延長空位(一旦形成)寬度賦予罰分。增加空位代價將使得比對減少所引入的空位數目。空位存在及延長之各別代價的例示性集合包括0，-4；-2，-2；-2，-4；-3，-3；-4，-2；-

4，-4；-5，-2；-6，-2，但其他集合亦可。在一些實施例中，使用預設取代分數及空位罰分及任何其他預設設置，在具備用於執行分析之電腦軟體或算法的情況下，對參考序列與轉殖基因序列執行對準及比較。

分泌信號肽序列

【0056】 根據某些實施例，本發明之AAV載體可為了轉導細胞而設計及構築，在該等細胞中，GCCase蛋白的缺乏直接導致GD1之病因學，例如單核球及巨噬細胞譜系的細胞由於不完全代謝之葡糖基神經醯胺受質聚積而形成高歇氏細胞。在此類實施例中，經載體轉導之後所產生的GCCase宜留在細胞中，其存在於細胞中可補償原生GCCase基因的功能喪失。

【0057】 然而，在其他實施例中，本發明之AAV載體可為了轉導器官中的細胞(諸如肝臟的肝細胞)而設計及構築，該等細胞在經載體轉導之後產生的GCCase分泌且移行於全身中，諸如血液中，其可被其他細胞(諸如單核球及巨噬細胞)吸收且利用。在此類實施例中，通常適用的是，將載體設計成使得GCCase蛋白包括分泌信號肽序列以確保GCCase蛋白可自經轉導細胞分泌至循環中。否則，可供單核球及巨噬細胞或其他細胞使用之GCCase的量不足以校正原生GCCase基因的功能喪失。

【0058】 此項技術中已知有效引起其中合成蛋白質之細胞分泌該蛋白質的任何分泌信號肽序列可結合本發明之AAV載體使用。細胞在分泌過程中宜將但不必定將此類信號肽自該蛋白質移除。在一些實施例中，可使用人類GCCase蛋白前驅體同功型1中之天然存在之分泌信號肽，其胺基酸序列由SEQ ID NO: 39提供。然而，在其他實施例中，原生GCCase信號肽可經來自人類或另一物種之不同分泌性蛋白的信號肽置換，例如以改良經轉導細胞中所產生之GCCase的分泌速率，或出於一些其他原因，諸如減少

免疫原性。

【0059】多種異源分泌信號肽在此項技術中已知且可用於促進經本發明之經AAV載體轉導細胞(諸如肝臟細胞)分泌GCase。在一些實施例中，信號肽序列來源於肝細胞或肝臟中之細胞所產生及分泌之多種蛋白質中的任一者。非限制性實例包括來自人類蛋白質的信號肽序列，諸如 α -1-抗胰蛋白酶、 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -1-酸性醣蛋白1、血清白蛋白、磷脂醯乙醇胺結合蛋白1、結合球蛋白、纖維蛋白溶酶原活化抑制劑1、 β -2-微球蛋白、肽基-脯胺醯基順反異構酶B、視黃醇結合蛋白4、胎球蛋白-A、補體C3、脂蛋白元A-I、內質網伴隨蛋白BiP、補體因子B、蛋白質AMBP、脂蛋白元E、凝聚素、組織蛋白酶D、血清轉鐵蛋白、 α -1-酸性醣蛋白2及補體C4-B，其他多者亦可。此等及其他分泌性蛋白質之胺基酸序列及編碼核苷酸序列可在公用序列資料庫中獲得，諸如Genbank。在其他實施例中，結合本發明之載體使用的分泌信號肽序列可利用人類或其他物種的自非肝臟細胞大量分泌之蛋白質產生，諸如人類或鼠類IgG重鏈或 κ 或 λ 輕鏈。舉例而言，在一個非限制性實施例中，可使用來自鼠類IgG重鏈的信號肽，其胺基酸序列作為SEQ ID NO: 38提供。天然存在之分泌信號肽的胺基酸序列經修飾以合乎需要地改變其功能，編碼此類野生型信號肽或經修飾之信號肽的核苷酸序列亦可經修飾以便達成所需類型的序列最佳化，諸如移除CpG模體。在又其他實施例中，可使用完全合成的分泌信號肽序列。

轉錄控制區域

【0060】意欲在經轉導細胞中及/或自經轉導細胞表現GCase蛋白的本發明AAV載體可進一步包含與編碼GCase多肽序列之轉殖基因可操作地

連接的一或多個轉錄控制區域作為載體基因體之一部分。如下文進一步論述，此項技術中已知不同類型之轉錄控制區域，其可用於控制轉殖基因向RNA轉錄的起始。如本文所用，術語「可操作地連接(operable linkage)」及變化形式，諸如「可操作地連接(operative linkage)」、「可操作地連接(operably linked)」及「可操作地連接(operatively linked)」係指轉錄控制區域與轉殖基因之間的功能關係，使得控制區域可影響轉殖基因的轉錄(不論正面或負面)，而其間未指明任何特定的空間或結構關係。因此，舉例而言，轉錄控制區域儘管定位於轉殖基因的5'或3'及/或緊鄰或遠離轉殖基因定位，但可與轉殖基因可操作地連接。轉錄控制區域可具有組成活性，在特定細胞或組織中具有活性，回應於一些環境刺激物的誘導活性，來源於天然存在之基因(任何適合的物種)，且可經修飾以改良或改變其功能，或甚至為完全合成的。

【0061】 在一些實施例中，轉錄控制區域包含啟動子區域，該啟動子區域通常包含經轉導細胞中之轉錄設備起始轉錄所必需的最小DNA序列(例如TATA盒或起始序列)，以及單一地或協作地發揮作用以增加自基本啟動子轉錄之速率的一或多個其他近端元件。視其序列而定，啟動子可起始RNA聚合酶I、II或III的轉錄，但意欲在經轉導細胞中表現多肽(諸如GCase)的AAV載體中通常使用來自蛋白質編碼基因的啟動子，其通常由RNA pol II轉錄。

【0062】 在其他實施例中，轉錄控制區域包含或進一步包含至少一個增強子區域，該增強子區域的作用係進一步增加基因轉錄速率超過單獨基本啟動子可維持的速率。增強子在其天然環境中通常遠離其作用之基因之啟動子定位，有時位於上游(亦即，5')數十至數百或數千個鹼基對，但

增強子亦可存在於別處，諸如存在於內含子中或其作用之基因的下游(亦即，3')。儘管啟動子區域可含有近端增強子元件(其子序列若移除，則會減少始於基本啟動子的轉錄)，但增強子通常不含有可充當基本啟動子的序列。儘管在自然界中，增強子區域通常定位於其作用之基因之啟動子的遠端，但增強子區域或較大增強子區域內的增強子元件(此類元件通常對應於轉錄因子的DNA結合位點)當其天然環境中移除且很大程度上更接近啟動子(不論來自相同或甚至不同基因)再定位時，有時可保持其至少一些轉錄增強功能。

【0063】 科學文獻中所述之基因的增強子及啟動子區域當與轉殖基因及為載體功能所需之其他基因體元件組合時，可能因太大而無法被AAV衣殼的封裝容量所容納。相應地，在一些實施例中，可使用一般技術者熟悉的方法鑑別較長增強子或啟動子區域內的功能子序列，且將較短功能子序列併入本發明載體所用之轉錄控制區域中。以此方式可減小轉錄控制區域的尺寸，同時維持其所需功能。利用此方法可將來自天然存在之增強子或啟動子的功能元件以新穎方式組合，諸如藉由修改其數目、間距及/或佈置來產生具有經改良之特性的雜合體或合成增強子及/或啟動子。在一些實施例中，增強子及啟動子各自可來源於相同的天然存在之基因，而在其他實施例中，增強子及啟動子可來源於完全不同的基因，包括不同物種的基因。

【0064】 在一些實施例中，從編碼股(亦即，正股)單股DNA AAV載體基因體之視角看，啟動子序列定位於待轉錄成RNA之下游序列(諸如編碼蛋白質(諸如GCase)的轉殖基因)的5'。在一些實施例中，增強子元件或區域若存在，則可定位於啟動子序列的5'，或改為定位於基因體中的別

處，諸如與轉殖基因相鄰的5'或3'非轉譯區(UTR)、內含子、轉錄終止信號序列的3'，或別處。在一些實施例中，載體基因體可包含超過一個增強子區域(相同或不同類型)，其可彼此相鄰定位，或間隔開來，且/或藉由基因體內的其他功能元件隔開。在一些實施例中，相同增強子元件或區域係以重複單元(諸如2、3、4或更多個)的串聯佈置陣列提供。

【0065】 在一些實施例中，用於本發明之AAV載體中的轉錄控制區域無組織特異性，此意謂其在多種不同細胞類型(但不一定是所有)中具有組成型活性。根據一些實施例，無組織特異性的轉錄控制區域包括來源於某些病毒的啟動子(可包括鄰近於基本啟動子的增強子元件)，諸如人類細胞巨大病毒主要即刻早期基因(CMV-IE)(*Boshart, M* 等人, *Cell*, 41:521-30 (1985); *Yew, NL* 等人, *Hum Gene Ther*, 8:575-84 (1997))；猿猴病毒40(SV40)；以及來自勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)及莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney murine leukemia virus, MoMLV)的逆轉錄病毒長末端重複序列(LTR)啟動子。在其他實施例中，無組織特異性的轉錄控制區域包括可來源於在多種不同細胞類型(包括來自不同類型的動物)中具有活性之基因的啟動子(其可包括近端增強子元件)，諸如人類多肽鏈延伸因子(EF1 α)基因；磷酸甘油酯激酶(PGK)基因；泛素C (UbiC)基因；雞 β -肌動蛋白(CBA)基因；U1a1或U1b2小核RNA啟動子(*Bartlett, JS* 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8852-7 (1996); *Wu, Z* 等人, *Mol Ther*, 16(2):280-9 (2008))；組蛋白H2或組蛋白H3啟動子(*Hurt, MM* 等人, *Mol Cell Biol* 11:2929-36 (1991); *Wu, Z* 等人, *Mol Ther*, 16(2):280-9 (2008))。

【0066】 同樣，增強子區域可來源於在來自不同類型動物的不同細

胞類型中具有活性的病毒及基因。正如所提及，在一些實施例中，不僅可將來源於相同基因的啟動子與增強子組合以建立用於本發明之載體中的轉錄控制區域，而且可將來自不同基因的增強子與啟動子組合以建立雜合體轉錄控制區域。常用實例為 1.6 kb 雜合體 enh/pro 區域，稱為 CAG (或 CAGGS)，包含 CMV 即刻早期增強子、雞 β 肌動蛋白 (CBA) 基因啟動子及 CBA 內含子/外顯子 1 (Niwa, H 等人, *Gene*, 108:193-9 (1991); Ikawa, M 等人, *Dev Growth Differ*, 37:455-9 (1995))，及減小其尺寸の後續修飾，包括其中 CBA 內含子被較小猿猴病毒 40 (SV40) 內含子置換的修飾 (Wang, Z 等人, *Gene Ther*, 10:2105-11 (2003))，及另一種稱為 CBA 的雜合體內含子 (CBh)，其中 SV40 內含子被由來自 CBA 5' UTR 的 5' 供體剪接位點及來自 MVM 內含子的 3' 受體剪接位點構成的雜合體內含子置換 (Gray, SJ 等人, *Hum Gene Ther*, 22:1143-53 (2011))。

【0067】 在一些實施例中，用於本發明之 AAV 載體中的轉錄控制區域可具有肝臟組織特異性，此意謂其在引導轉殖基因在肝臟細胞 (諸如肝細胞) 中表現方面比其他組織或器官的細胞具有更大或最大活性。不希望受理論所束縛，肝臟組織特異性可藉以發生的一種機制係增強子及/或啟動子中存在 DNA 結合轉錄活化蛋白質的一或多個特異性結合位點，該等轉錄活化蛋白質優先在肝臟細胞中表現。在一些實施例中，使用肝臟組織特異性轉錄控制區域可為有利的，有利之處在於減少或甚至防止轉殖基因在可經載體轉導之非肝臟細胞中的表現，從而可降低脫靶效應的風險。

【0068】 肝特異性轉錄控制區域可來源於天然高量表現於肝臟中的基因，其實例包括白蛋白、轉甲狀腺素蛋白 (前白蛋白)、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、凝血酶原及多種其他蛋白質之基因。高量表現的某些肝特異性基因具

有增強子與啟動子，兩者均可包括於轉錄控制區域中。在一些實施例中，來源於相同基因的增強子與啟動子可在肝特異性轉錄控制區域中組合，而在其他實施例中，可將來自一種基因的增強子與來自不同基因的啟動子在雜合體肝特異性轉錄控制區域中組合。當來自相同基因時，包含一或多個增強子及啟動子的轉錄控制區域序列因存在於衍生其的原生基因中而可複製，或經工程改造以縮減其長度，諸如藉由使分隔一或多個增強子與啟動子的無轉錄活性序列缺失。在一些實施例中，用於肝特異性轉錄控制區域中的增強子及啟動子可來源於不同物種的基因。在又其他實施例中，相對於原始序列，可藉由改變、添加或移除核苷酸以改良其功能(諸如增加轉錄活化因子結合、減少轉錄抑制子結合或減小轉錄控制區域的尺寸)來修飾轉錄控制區域中的增強子及/或啟動子序列。在一些實施例中，是增強子達成肝特異性表現且啟動子本身不具有肝特異性，而在其他實施例中，是啟動子達成肝特異性表現且增強子(若存在)本身不具有肝特異性，但能夠增加自肝特異性啟動子轉錄的速率。舉例而言，強病毒增強子(諸如人類CMV主要即刻早期基因增強子)可與肝特異性啟動子配對，或強肝特異性增強子(諸如來自白蛋白基因)可與強病毒啟動子(諸如SV40早期啟動子)配對。在其他實施例中，增強子與啟動子各自均具有肝特異性。在一些實施例中，不同增強子區域可組合而形成嵌合增強子區域，該等嵌合增強子區域用於本發明之AAV載體的轉錄控制區域中。

【0069】 本發明之AAV載體之肝特異性轉錄控制區域中可使用且可包含的增強子及啟動子之非限制性實例包括來自白蛋白基因的增強子(其中至少三者已表徵)及啟動子(*Minghetti, PP 等人, J Biol Chem, 261(15):6747-57 (1986); Frain, M 等人, Mol Cell Biol, 10(3):991-9*

(1990); Hayashi, Y 等人, *J Biol Chem*, 267(21):14580-5 (1992)) ; 來自小鼠或人類 α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)基因的增強子及啟動子(Costa, RH 等人, *Mol Cell Biol*, 9(4):1415-25 (1989); De Simone, V 等人, *EMBO J*, 6(9):2759-66 (1987); Monaci, P 等人, *EMBO J*, 7(7):2075-87 (1988); Hafenrichter, DG 等人, *Blood*, 84:3394-3404 (1994); Le, M 等人, *Blood*, 89:1254-59 (1997)) ; 來自轉甲狀腺素蛋白(TTR)基因的增強子及啟動子(Tsuszuki, T 等人, *J Biol Chem*, 260(22):12224-7 (1985); Costa, RH 等人, *Mol Cell Biol*, 6(12):4697-708 (1986)) ; 來自 α 胎蛋白(AFP)基因的增強子及啟動子 ; 來自凝血酶原基因的增強子及啟動子(Bancroft, JD 等人, *Biochem*, 31:12469-76 (1992)) ; 以及來自人類脂蛋白元E/C-I基因簇HCR1及HCR2增強子區域(Allan, CM 等人, *J Biol Chem*, 272(46):29113-9 (1997); Dang, Q 等人, *J Biol Chem*, 270(38):22577-85 (1995); Simone, WS 等人, *J Biol Chem*, 268(11):8221-9 (1993)) 。任一種前述增強子可與來自相同或不同基因之任一種前述啟動子組合以構築用於本發明之AAV載體中的肝特異性轉錄控制區域。

【0070】 已描述代表來自不同基因(及來自相同或不同物種，諸如小鼠、大鼠或人類)之增強子與啟動子之雜合體組合的多種肝臟組織特異性轉錄控制區域，或來自肝特異性基因的轉錄控制區域，該等肝特異性基因經工程改造以減小其尺寸或改良其效能，其中的任一種轉錄控制區域可用於本發明之AAV載體中以及在經轉導之肝臟細胞中表現GCase蛋白。非限制性實例包括來自人類ApoE基因之HCR1增強子區域與來自人類 α 1-抗胰蛋白酶(hAAT)基因的組合，其中已建立多種形式，試圖減小組合元件的尺寸(Miao, CH 等人, *Mol Ther*, 1:522-532 (2000); Dang Q 等人, *J Biol*

Chem 270:22577-22585 (1995); Davidoff AM 等人, *Mol Ther* 11:875-888 (2005); Hafenrichter DG 等人, *Blood* 84:3394-3404 (1994); McIntosh J 等人, *Blood* 121:3335-3344 (2013); Nathwani AC 等人, *Blood* 107:2653-2661 (2006)) ; TTR 基因最小增強子及啟動子(Yan, C 等人, *EMBO J*, 9:869-78 (1990); Samadani, U and Costa, RH, *Mol Cell Biol*, 16:6273-84 (1996)) ; 人類因子IX基因啟動子與多聚化肝臟轉錄因子結合位點(5號位點的元件)(GTV)的組合(Hoag, H 等人, *Gene Ther*, 6:1584-89 (1999)) ; 人類因子VIII基因啟動子與來自相同基因之多聚化HNF-1結合位點的組合(PF8+5HNF-1)(Notley, C 等人, *Hum Gene Ther*, 13:1583-93 (2002)) ; 小鼠白蛋白基本啟動子與來源於SV40內含子之短內含子的組合(Sarkar, R 等人, *J Thromb Haemost*, 1: 220-6 (2003)) ; α 1-微球蛋白/尿抑胰酶素增強子之兩個複本與甲狀腺素激素結合之球蛋白基因啟動子的組合(Rouet P 等人, *J Biol Chem* 267:20765-20773 (1992); Hayashi Y 等人, *Mol Endocrinol* 7:1049-1060 (1993); Ill, CR 等人, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 8(Suppl 2):S23-S30 (1997); Wang, L 等人, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:3906-10 (1999)); Wang L 等人, *Blood* 105:3079-3086 (2005)) ; 白蛋白啟動子與 α -胎蛋白MERII增強子的組合(Wooddell, CI 等人, *J Gene Med*, 10:551-63 (2008)) ; 以及連接至鼠類轉甲狀腺素蛋白啟動子之隨機組裝的肝細胞特異性轉錄因子結合位點(Vigna E 等人, *Mol Ther* 11:763-775 (2005)) 。

【0071】 關於肝臟組織特異性轉錄控制區域的其他參考文獻包括 Schiedner G 等人, *Nat Genet* 18:180-183 (1998); Xiao, W 等人, *J Virol* 72:10222-10226 (1998); Kuriyama S 等人, *Cell Struct Funct* 16:503-510

(1991); Chuah, MK 等人, *Mol. Ther.*, 22:1605-1613 (2014); 及 Nair, N. 等人, *Blood*, 123:3195-3199 (2014)。

【0072】 在一些實施例中，HCR增強子序列可包含或由GenBank U32510.1的鹼基對134至442組成，且hAAT啟動子可包含或由GenBank K02212.1的鹼基對1747至2001組成。

【0073】 在一些實施例中，本發明之AAV載體中的轉錄控制區域可包含或由人類白蛋白(hALB)基因啟動子組成，在一些實施例中，包含或由SEQ ID NO: 10之核苷酸序列組成。在一些實施例中，轉錄控制區域可包含或由人類白蛋白基因近端增強子組成或進一步包含人類白蛋白基因近端增強子，在一些實施例中，包含或由SEQ ID NO: 9之核苷酸序列組成。在一些實施例中，轉錄控制區域可包含或由 α -1-微球蛋白/尿抑胰酶素前驅體(AMBP)增強子組成，或進一步包含該增強子，在一些實施例中，包含或由SEQ ID NO: 8之核苷酸序列組成。在一些實施例中，轉錄控制區域可進一步包含該AMBP增強子序列之超過一個複本，諸如2、3、4個或更多個此類序列，該等序列可串聯佈置。在一些實施例中，轉錄控制區域可以5'至3'次序包含或由AMBP增強子序列之兩個重複序列、hALB近端增強子序列及hALB啟動子序列組成。在一些實施例中，此類元件佈置可包含或由SEQ ID NO: 42之核苷酸序列組成。

轉錄終止信號序列

【0074】 在一些實施例中，本發明之AAV載體包含含有轉錄終止子序列的載體基因體，從編碼股(正股)單股DNA載體基因體之視角看，該轉錄終止子序列定位於轉殖基因的3'。在一些實施例中，另一種序列，諸如3'非轉譯區(UTR)序列，可定位於轉殖基因序列與轉錄終止子序列之間。

關於轉錄終止的一般資訊可見於例如 *Proudfoot, NJ, Genes Devel, 25:1770-82 (2011)*; *Kuehner, JN* 等人, *Nat Rev Mol Cell Biol, 12:283-94 (2011)*; *Porrua, O and Libri, D, Nat Rev Mol Cell Biol, 16:190-202 (2015)*。

【0075】 在一些實施例中，特別是當轉殖基因含有蛋白質編碼序列(相較於具有除編碼蛋白質之外之一些功能的RNA序列)時，轉錄終止子序列可為聚腺苷酸化信號序列(以多種形式縮寫為「polyA」、「pA」、「poly(A)」或「p(A)」)。在一些實施例中，pA信號序列可來源於天然存在之基因且用於載體中，而在其他實施例中，pA信號可如下經修飾，諸如縮短其(相較於其天然對應物)，或改變其序列以使得其更高效地達成轉錄終止。在其他實施例中，pA信號可為來自不同基因之pA序列組合的雜合體序列，或可為合成的。

【0076】 可用於本發明載體中之pA信號之非限制性實例包括來自牛生長激素基因(bGH pA)；人類、小鼠或兔 β -血球蛋白基因；SV40晚期基因；sNRP1；spA；單純疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV TK)；或5型腺病毒L3聚腺苷酸化位點的pA信號，其他pA信號亦可。在其他實施例中，用於本發明之載體中的轉錄終止子包括終止RNA轉錄本而不引導聚腺苷酸化的轉錄終止子，諸如組蛋白H4基因mRNA 3'端處理信號(*Whitelaw, E* 等人, *Nucleic Acids Res, 14:7059-70 (1986)*)。

【0077】 在一些實施例中，本發明之AAV載體包含含有轉殖基因的載體基因體，其轉錄係藉由包括以下來終止：來源於牛生長激素基因(bGH)的poly(A)，在一些實施例中，該poly(A)位點包含或由SEQ ID NO: 14之核苷酸序列組成；來自SV40病毒的poly(A)位點，在一些實施例中，

該poly(A)位點包含或由SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 25之核苷酸序列組成；或來自兔 β -血球蛋白基因的poly(A)位點，在一些實施例中，該poly(A)位點包含或由SEQ ID NO: 26之核苷酸序列組成。

其他載體基因體元件

【0078】 除轉錄控制區域及轉錄終止信號之外，本發明之AAV載體的基因體中亦可包括其他序列，包括順式調控元件，以改良、控制或調節轉殖基因在經轉導細胞中的表現及/或轉譯，或將其他功能賦予載體。此類元件包括但不限於基因5'及/或3'端的非轉譯區、非編碼外顯子、內含子、剪接供體及受體位點、lox位點、內部核糖體進入位點(IRES)、編碼2A肽的序列、使RNA轉錄本穩定的元件、調控性miRNA的結合位點、微RNA (miRNA)序列、增強mRNA之核輸出的元件，包括病毒轉錄後調控元件，諸如土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元件(WPRE)，以及憑經驗證明可改良轉殖基因表現的任何其他元件，即使機制可能不明確。在其他實施例中，載體基因體可包括所謂的填充或填補序列，其僅旨在將載體基因體的總長增加至所需尺寸，例如達成接近特定衣殼之長度、但仍低於特定衣殼之封裝容量，且從而降低將截斷之載體基因體或非載體DNA意外封裝於衣殼中的可能性。

【0079】 在一些實施例中，載體基因體中可包括內含子以增強轉殖基因表現及/或轉錄本穩定性。在一些實施例中，提供編碼蛋白質的轉殖基因，其中外顯子及內含子之序列與天然存在之基因相同。然而，在具有多個外顯子及內含子的基因中，可移除一或多個內含子，以便最小化總長，從而促進其他元件的納入，同時不超過衣殼封裝容量。然而，在其他實施例中，由與提供載體轉殖基因之編碼序列的基因完全不同的基因提供

內含子。不論內含子來自與轉殖基因相同或不同的基因，內含子均可自其原始序列加以修飾，例如藉由改變某些核苷酸，或移除內部序列以減少其總長，同時維持發生高效剪接所必需的剪接供體及受體序列模體，或維持具有重要功能的其他內含子順式元件(例如可駐留於未修飾之原始內含子序列中的增強子)。內含子亦可為雜合的，其中來自一種基因之內含子的剪接供體部分與來自不同基因之內含子的剪接受體部分配對，或可為合成的，其序列不對應於已知的任一種基因內含子。在一些實施例中，內含子可安置於轉殖基因之編碼序列內且因此中斷轉殖基因之編碼序列(且具備發生高效剪接所必需的供體及受體位點)，而在其他實施例中，內含子存在，但不中斷蛋白質編碼序列，且改為定位於編碼序列的5'或3'。在內含子不中斷編碼序列的情況下，其可具備自其原始遺傳環境帶來的一些外顯子序列，只要該外顯子序列不含有隱性轉譯起始信號。在一些實施例中，內含子可定位於啟動子的3' (從正股ssDNA載體基因體的視角看)及編碼序列的5'。在其他實施例中，內含子可定位於載體基因體中之編碼序列上游或下游的遠端。

【0080】 可用於本發明AAV載體中之內含子之非限制性實例包括來自小鼠細小病毒(MVM)的小內含子(*Haut, DD 及 Pintel, DJ, J Virol, 72(3):1834-43 (1998); Haut, DD 及 Pintel, DJ, Virology, 258:84-94 (1999)*)；來自人類凝血因子IX (FIXm1及FIXm2)的內部缺失內含子1(*Kurachi, S 等人, J Biol Chem, 270(10):5276-81 (1995)*)；嵌合的β血球蛋白剪接供體與免疫球蛋白重鏈剪接受體內含子(GenBank U47120.2核苷酸890-1022)；來自小鼠α血球蛋白基因的內含子1；以及SV40小t抗原內含子，其可包含或由GenBank錄入號J02400.1之鹼基對4644至4552組成且

可在位置4582 (g至c)、4580 (g至c)、4578 (a至c)及4561 (a至t)經修飾，正如Nathwani, AC等人, *Blood*, 107(7):2653-61 (2006)所報導。

【0081】 在一些實施例中，載體基因體中可包括轉錄後調控元件(PRE)以增強轉殖基因表現。PRE之實例包括土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元件(WPRE)、B型肝炎病毒轉錄後調控元件(HPRE)及其修飾。Donello, JE等人, *J Virol*, 72(6):5085-92 (1998); Loeb, JE等人, *Hum Gene Ther*, 10:2295-2305 (1999); Zanta-Boussif, MA等人, *Gene Ther*, 16:605-19 (2009); Patricio, MI等人, *Mol Ther Nucleic Acids*, 6:198-208 (2017); 美國公開專利申請案2018-0353620 A1。在一些實施例中，從編碼股(正股)單股DNA載體基因體的視角看，至少一個WPRE序列可定位於轉殖基因的下流(從而定位於編碼多肽之轉殖基因之終止密碼子的3')及poly(A)信號序列的上游。在一些實施例中，可包括複數個PRE，諸如相同或不同類型的2、3或更多個PRE，該等PRE可串聯佈置。

【0082】 在一些實施例中，本發明之AAV載體包含含有WPRE元件的載體基因體，在一些實施例中，該WPRE元件包含或由SEQ ID NO: 27之核苷酸序列組成。

AAV反向末端重複序列(ITR)

【0083】 稱為反向末端重複序列(縮寫為「ITR」)的獨特核苷酸序列定位於腺相關病毒基因體的末端，該等核苷酸序列充當病毒DNA複製起點且充當支持單股(ssDNA)基因體在被感染細胞中轉變成雙股形式(dsDNA)的引發位點，該雙股形式有能力支持亦包含於病毒基因體中的*rep*及*cap*蛋白編碼基因轉錄。ITR亦發揮著將所複製之ssDNA基因體封裝於AAV衣殼中的作用。AAV ITR含有多回文序列，該等多回文序列可經

由股內互補鹼基配對折回自身，以形成dsDNA T形髮夾二級結構。

【0084】 正如下文進一步解釋，本發明之AAV載體中的載體基因體可包括一或多個AAV ITR，其作用類似於其在未修飾之病毒中的作用。除非另有說明，否則本文中使用的術語「反向末端重複」或「ITR」包括完整的全長ITR，以及具有經修飾之序列(諸如一或多個核苷酸之截斷、內部缺失(諸如trs或D序列)、添加及取代)、保持可歸因於ITR之一或多種功能(即使效率低於同類型的完整ITR)(包括但不限於自重組DNA (諸如質體)拯救載體基因體、載體基因體複製及/或將載體基因體封裝於組裝的衣殼中)的ITR。

【0085】 當其存在於封裝的病毒及載體基因體中時，定位於ssDNA基因體之3'端的ITR將具有自由3'羟基，而定位於ssDNA基因體之反向5'端的ITR將具有自由5'端。5' ITR亦可稱為「左」ITR，且3' ITR亦可稱為「右」ITR。然而，在質體(諸如可能用於產生載體的質體)之上下文中，載體基因體序列將以雙股形式存在，因此5' ITR及3' ITR各自將存在兩個集合。因此，為了避免模糊，應說明ITR置於哪個股上，從而將其區分。在缺乏此類說明的情況下，根據正股或有義股(亦即，其上的轉殖基因序列與轉殖基因或功能RNA之多肽產物之編碼序列相同的DNA股，其中轉殖基因不編碼蛋白質)來提及呈雙股形式之載體基因體中的ITR，諸如在質體中。

【0086】 在野生型AAV2中，ITR具有145個鹼基長度，其中末端125個鹼基包含回文子序列。當黏接時，AAV2 ITR含有兩個形成髮夾臂的雙股回文結構：B-B'及C-C'，該兩個回文序列接合成更大的雙股回文結構，形成髮夾莖。ITR進一步含有接近ITR之非末端端部的D序列，其在

ITR內不具有互補序列且因此保持單股狀態，但在位於基因體之相對端之ITR的D區(從而，D及D')中具有互補序列。A-A'莖結構包括供大AAV Rep蛋白結合的含有四核苷酸重複模體之Rep結合元件(RBE)，其目的係在ITR序列中之末端解鏈位點(trs)(AAV2 ITR中之核苷酸124與125之間，自3'端計數)引入序列特異性及股特異性切口，此為病毒基因體發生DNA複製所必需的步驟。

【0087】 當其複性時，ITR可摺疊成兩種組態，稱為翻轉及反轉，其中相對於其他組態，A與A'反向重複序列之間的序列係作為反向互補序列存在。就5' ITR (左ITR)而言，翻轉組態之末端回文序列之次序為5'-ABB'CC'A'D-3'，且反轉組態之次序為5'-ACC'BB'A'D-3'。就3' ITR (右ITR)而言，翻轉組態之末端回文序列之次序為3'-A'B'BC'CAD'-5'，且反轉組態之次序為3'-A'C'CB'BAD'-5'。因此，翻轉組態的B'B回文結構最接近自由3'端，而反轉組態的C'C回文結構最接近自由3'端(Lusby, E等人, *J Virol*, 34:402-9 (1980); Srivastava, A等人, *J Virol*, 45(2):555-64 (1983); Samulski, RJ等人, *Cell*, 33:135-143 (1983))。

【0088】 假設ITR二級結構藉由內源細胞DNA聚合酶在具有自由3'羟基之ITR處起始之自引發單股置換延長機制來支持病毒DNA複製。股延長引起單體dsDNA基因體複製型中間物形成，該中間物的一個末端共價閉合。開放端的雙螺旋ITR再摺疊(異構化)成雙髮夾結構，形成經延長、同時互補股被置換的新3' ITR。大AAV Rep蛋白在封閉端(下游)結合至ITR且在其末端解鏈位點切割DNA，在起始於開放端的DNA複製複合物到達下游ITR之前，起始第二DNA複製複合物複製下游ITR。原始複製複合物置換對置股(其ITR新近剛剛合成)，且完成複製直至曾經的基因體封

閉端現向雙螺旋ITR開放，以供該等雙螺旋ITR異構化成雙髮夾。因此，為了再次起始複製週期，重新建立單體dsDNA基因體複製型中間物，同時可將被置換的ssDNA基因體(其3' ITR新近建立)封裝於病毒顆粒中。

【0089】複製的ssDNA基因體將包括正性股(正股或有義股)與負性股(負股或反義股)極性，且證據表明其以同等效率個別地封裝於衣殼中。因此，在一些實施例中，AAV載體顆粒製劑，如被調適成其的病毒，可含有約等比例的有義或反義ssDNA基因體。然而，亦可藉由自用於產生AAV載體之兩個ITR中之一者選擇性移除D序列來修飾ITR，該D序列將封裝侷限於載體基因體之負性股或正性股(Wang, X-S 等人, *J Virol*, 70(3):1668-77 (1996))。因此，在一些其他實施例中，AAV載體製劑可含有其中大部分或基本上所有載體基因體為正股或負股的載體顆粒。

【0090】感染之後，AAV病毒粒子被輸送至細胞核，在細胞核中，ssDNA基因體自衣殼釋出。在可表現病毒*rep*及*cap*基因之前，假設ssDNA基因體必須首先藉由細胞DNA聚合酶在3' ITR起始股延長、經由互補股合成來轉變成dsDNA，咸信此過程緩慢且效率低下。亦假設可存在更快的機制來形成細胞內dsDNA基因體，其中來源於感染同一細胞之不同病毒粒子的正與負互補ssDNA基因體在細胞核中彼此相遇且經由分子間鹼基配對而雜交。此類雙螺旋基因體接著可支持轉錄，而無需首先藉由細胞DNA聚合酶來延長。

【0091】設計AAV載體時，載體基因體中保留的唯一AAV病毒DNA序列為ITR，原因為該等ITR在生產期間的DNA複製及封裝方面以及在轉導之後ssDNA基因體轉變成dsDNA方面發揮關鍵作用。編碼Rep及Cap蛋白質的序列以及產生載體亦需要的病毒輔助功能可以此項技術中已

知的多種方法、以反式提供。當載體基因體序列(諸如可包括於用於產生 AAV 載體之質體中的載體基因體序列)包括兩個完整 ITR 且長度不超過約 5 kb 之 AAV 衣殼封裝容量時，可如上文所提及封裝 ssDNA 基因體，但由於基因表現之前，該步驟可能低效發生，因此關於轉變成 dsDNA 的需要可導致轉導效率低於所需轉導效率。一種克服需要藉由內源細胞 DNA 聚合酶實現 dsDNA 轉變且潛在地改良異源序列(諸如治療轉殖基因)轉導效率及表現的策略依賴於複製及封裝「自互補」AAV 載體基因體(scAAV)，該等 AAV 載體基因體由於在相同 DNA 分子中含有正股及負股序列，因此可快速複性，以便在衣殼於目標細胞核中脫殼之後經由分子內鹼基配對(亦即，分子內雜交)形成 dsDNA 轉錄模板。

【0092】 可用至少兩種方式促進自互補基因體的產生，此兩種方式均依賴於在 DNA 分子複製而變成基因體期間，Rep 在末端解鏈位點無法切割 ITR。在 AAV 的天然複製週期中，當 Rep 在末端解鏈位點無法切割單體基因體複製型中間物之下游 ITR 時，可存在二聚體 dsDNA 基因體複製型中間物分子，該等單體基因體複製型中間物在開放端具有雙髮夾且在封閉端具有單個下游 ITR。當此發生時，初始 DNA 複製複合物的複製(始於開放端的 3' ITR)經由下游(封閉端) ITR 以及被置換的股繼續進行，以形成二聚體 dsDNA 基因體。此分子類似於上述單體 dsDNA 基因體複製型中間物，但含有兩個基因體。由於其開放端具有雙螺旋 ITR，因此其可異構化以起始 DNA 複製週期，如同單體形式。或者，封閉端髮夾可經歷末端解鏈，形成雙螺旋 ITR，該等雙螺旋 ITR 可異構化，使得 DNA 合成始於解鏈端。在任一情況下，二聚體模板複製而產生新的二聚體 dsDNA 基因體複製型中間物，並且置換 ssDNA 二聚體反向重複基因體，該 ssDNA 二聚體反向

重複基因體含有5' ITR、一種極性的病毒基因體序列、中心ITR、相反極性的病毒基因體序列，及3' ITR。

【0093】 通常，ssDNA二聚體反向重複病毒基因體由於超過正常的衣殼封裝容量而未被封裝。然而，藉由設計長度縮減的載體基因體以使得ssDNA二聚體反向重複基因體當形成時不會超過AAV封裝容量，可產生含有自互補基因體的載體顆粒。在實踐中，以此方式產生的載體製劑可含有其中封裝一種scDNA基因體或一或兩種單體ssDNA基因體之顆粒之混合物，所有該等基因體的比例可因製劑而異。

【0094】 封裝之後，scDNA基因體可能以單股形式(類似於ssDNA非自互補基因體)駐存於衣殼內，但接著在衣殼脫殼之後快速黏接以形成在一端具有共價封閉之ITR且在另一端具有兩個開放ITR的dsDNA分子，類似於經由自引發轉變成dsDNA之後的習知病毒基因體結構。因此，儘管不希望受理論束縛，但所謂的ssDNA與scDNA基因體之間的主要差異並非衣殼化時的拓樸結構，而是在衣殼脫殼且基因體在經轉導細胞內釋放之後可能獲得的各類型基因體之拓樸結構。

【0095】 然而，進一步的修飾可以使對於含有scDNA基因體之載體顆粒的產生達到更大的控制。具體而言，藉由使一個ITR之末端解鏈位點(諸如在含有用於產生載體之載體基因體序列的質體中)造成突變或缺失，即可能在載體基因體複製週期期間抑制或排除在該ITR中產生單股切口。因此，在未突變ITR處啟動的複製複合物會經由經突變的髮夾前進並且回到起始端，導致產生二聚體dsDNA基因體複製型中間物，就如同野生型ITR末端解鏈不是偶然發生的情況一樣。然而，此中間物在一端含有封閉的野生型ITR，在分子中段處含有突變的雙螺旋ITR，且在相對端含有能

夠異構化的雙螺旋開放ITR。此分子接著就可以在每一端進行正常循環的複製並與野生型ITR進行股置換，以產生經置換的子代基因體複本，此子代基因體副本含有5'野生型ITR、一種極性的載體基因體序列、中段處經突變ITR、相反極性的載體基因體序列，及位於3'端的野生型ITR。若異源序列含有編碼蛋白質的轉殖基因，則scDNA基因體會在相同DNA分子中含有編碼序列與其互補序列。儘管咸信此類基因體係以單股形式封裝於衣殼內部，但由於ITR外部存在大量的自互補序列，因此亦咸信其能夠在經轉導細胞之核內部快速自黏接成雙股形式，此形式可以支持異源序列的轉錄作用。利用含有經突變ITR之構築體產生scAAV可產生超過90%的scDNA基因體。

【0096】 在具有約4.7 kb之封裝容量的AAV2衣殼中，接著藉由排除ITR序列，ssDNA基因體可容納約4.4 kb的異源序列，而scDNA載體基因體可容納約2.2 kb。根據特定的非限制性實施例，用於產生scAAV載體的基因體構築體尺寸(諸如用於產生AAV載體之質體內可能容納的尺寸)為約2,500個核苷酸長，包含約2,200個核苷酸長的異源序列加上兩個ITR (一個為野生型且一個已突變)。此會產生約4,700個核苷酸長的scAAV基因體，低於典型的AAV衣殼封裝容量。

【0097】 可以各種方式破壞ITR末端解鏈位點來促進scAAV載體的產生。舉例而言，可將外源序列插入末端解鏈位點(trs)序列本身中，或插入ITR的相鄰序列中，諸如Rep結合元件與trs之間。或者，trs序列可部分或全部缺失。在其他實施例中，相鄰D區可部分或全部缺失。在另一其他實施例中，trs內的核苷酸可經不同核苷酸取代，從而降低trs被Rep切割的頻率。使ITR不可解鏈的其他方式屬於此項技術中之一般技能範圍內。

【0098】 關於AAV病毒及載體基因體複製以及scAAV設計的其他資訊可見於McCarty, DM等人, *Gene Therapy*, 10:2112-18 (2003); McCarty, DM等人, *Gene Therapy*, 8:1248-54 (2001); McCarty, DM, *Molecular Therapy*, 16(10):1648-56 (2008) ; 美國專利第7,790,154號。

【0099】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的AAV載體基因體可含有一或多個來源於不同AAV血清型及變異體的AAV ITR，其具有不同序列及長度且定位於基因體內的不同位置。用於本發明載體中的AAV ITR序列可為野生型或經修飾。在其他實施例中，AAV ITR序列亦可作為載體基因體序列的一部分包括於質體及其他類型的載體中，諸如桿狀病毒，該等質體及載體用於將載體基因體序列引入宿主細胞中用於產生載體的目的。

【0100】 來自AAV2的ITR頻繁地用於產生AAV載體，但替代實施例可包括使用來自任何AAV血清型或變異體的ITR，包括例如來自AAV1、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8或AAV9的ITR，或來自已知或尚待發現之任何其他AAV血清型或變異體的ITR，只要此類ITR在載體基因體複製及封裝以及轉殖基因表現方面發揮作用即可。ITR亦可包括對野生型ITR序列的序列修飾或為全合成的。經修飾的ITR可與野生型ITR序列(諸如AAV2之ITR序列)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在一些實施例中，藉由添加、缺失及/或改變核苷酸以破壞末端解鏈位點(trs)及/或ITR之D序列或改變具有ITR之一些其他子序列來修飾ITR。在一些實施例中，載體基因體可包含來自不同AAV血清型或變異體之ITR。

【0101】 在一些實施例中，選用於產生載體的ITR將來自與衣殼相

同的血清型或變異體。舉例而言，AAV2 ITR可結合AAV2衣殼使用。然而，在其他實施例中，載體可假型化或為雜合體，此意謂具有來自一種血清型或變異體之ITR的載體基因體可封裝於來自不同血清型或變異體的衣殼中。舉例而言，具有來自AAV2之ITR的載體基因體可封裝於來自AAV8的衣殼(或任何其他血清型或變異體衣殼)中。此假型通常縮寫為AAV2/8，其中斜線之前的數字表示ITR來源，且斜線之後的數字表示衣殼來源。

【0102】 根據一些實施例，本發明之AAV載體可含有具有不同數目個ITR的載體基因體。舉例而言，完整AAV病毒基因體通常具有兩個ITR：各分別定位於5'及3'端，且使用完整ITR產生且封裝有ssDNA基因體的AAV載體亦可具有類似地定位的兩個ITR。然而，正如上文所論述，載體可設計成使得其基因體包括三個ITR：兩個位於基因體的末端，如同病毒或習知載體，但另一個位於中段或中段附近(完整或突變)，如同自互補載體。然而，亦已觀測到，對於一些載體而言，尤其是基因體長度超過衣殼的平均封裝容量時，由於假設過早或可變的封裝終止，因此5' ITR可截斷或完全缺失。儘管可能產生缺陷性干擾顆粒，但亦假設此類顆粒由於原本不完全基因體的互補而仍然支持轉殖基因表現(Kapranov, P等人, *Hum Gene Ther*, 23:46-55 (2012))。相應地，在一些實施例中，本發明之AAV載體顆粒可含有包含單個功能ITR (諸如位於3'端或5'端)的基因體，且其中在相對端存在非功能性截斷的ITR或無ITR序列。因此，在本發明AAV載體之AAV載體基因體的一些實施例中，AAV ITR可定位於基因體之5'端，或基因體之3'端，或基因體之5'端與3'端，以及其他位置。

【0103】 可存在於AAV載體中之異源性的另一種來源可起因於任何

特定基因體中之翻轉與反轉ITR組態的差異性存在。因此，舉例而言，在一些實施例中，樣品中的任何特定載體顆粒可能含有在基因體之兩端均具有呈翻轉組態之ITR的基因體，或在基因體之兩端均具有呈反轉組態之ITR的基因體，或在5'端具有翻轉ITR且在3'端具有反轉ITR的基因體，或在5'端具有反轉ITR且在3'端具有翻轉ITR的基因體。當與如下觀測結果組合時：單股DNA基因體可作為正股或負股存在，AAV載體樣品可包含比例相似或潛在不同的八種可能組態。除非另外說明，否則本發明之AAV載體基因體不限於此等組態中之任一者；任何或所有基因體均可被此類載體封裝。

【0104】 在一些實施例中，AAV載體基因體在其5'及3'端中之每一端包括完整的全長ITR。因此，舉例而言，若兩個ITR均來自AAV2，則此類全長ITR具有145個核苷酸的長度。然而，在其他實施例中，一或多個ITR可截斷，相對於該類型之ITR的典型全長序列，缺失一或多個末端核苷酸。因此，舉例而言，相對於該類型之ITR的典型全長序列，ITR的末端可缺乏至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或更多個核苷酸。此類截斷的ITR不僅可存在於本發明之AAV載體所封裝的基因體內，而且可存在於用於產生AAV載體的載體基因體序列中，諸如質體中。舉例而言，已觀測到，若一個ITR缺失的序列保留於另一個ITR中，則截斷的ITR由於具有自修復的能力而仍可發揮產生AAV的作用(Wang, X-S 等人, *J Mol Biol*, 250:573-80 (1995); Samulski, RJ 等人, *Cell*, 33:135-43 (1983))。

【0105】 在一些實施例中，本發明AAV載體之AAV載體基因體可含有一或多個AAV ITR，該等AAV ITR包含、基本上由以下組成或由以下

組成：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19中之任一或多者的核苷酸序列，或此類序列中之任一者的互補序列或反向互補序列。

序列最佳化

【0106】 在一些實施例中，可最佳化AAV載體基因體內的一或多個序列，以相對於初始參考序列來改良其功能特徵。舉例而言且不受限制，可基於遺傳密碼的簡併以及已知存在於不同物種之間及高量或低量表現於相同物種中之蛋白質之間的密碼子使用偏好，相對於野生型序列，對載體基因體中的任何蛋白質編碼序列進行密碼子最佳化。此類密碼子偏好可例如使用特定物種的密碼子適應指數加以鑑別。密碼子適應指數(CAI)更詳細地解釋於Sharp, PM及Li, WH, *Nucleic Acids Res*, 15:1281-95 (1987)。在一些實施例中，對編碼序列進行人類密碼子最佳化，此意謂基於人類密碼子偏好最佳化編碼序列。可使用此項技術中已知的多種算法來促進密碼子最佳化。如此項技術中所知，可基於所分析的高度表現基因(諸如人類基因)來構築不同CAI。例示性人類CAI報導於Haas, J等人, *Current Biology*, 6(3):315-24 (1996)中。必要時，亦可根據除人類之外的物種對蛋白質編碼序列進行密碼子最佳化。

【0107】 以增加蛋白質表現量為目標，已提出且實施不同密碼子最佳化策略。舉例而言，可將最頻繁使用的同義密碼子(亦即，編碼相同胺基酸的密碼子)代入其不存在的位置。或者，可調整整個編碼序列上的密碼子使用，使得其與宿主生物體中的天然密碼子偏好分佈成比例。在一些實施例中，密碼子置換侷限於相對很少出現於物種之高度表現蛋白質中的密碼子，例如頻率為10%以下，如CAI所反映。

【0108】 在一些實施例中，藉由用較常見的同義密碼子取代至少一個稀有密碼子而對藉由本發明之AAV載體表現的蛋白編碼序列進行密碼子最佳化。在一些實施例中，蛋白編碼序列中至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或95%及在一些實施例中100%的稀有密碼子經較頻繁使用的同義密碼子置換，如CAI (諸如人類CAI)所反映。在一些實施例中，稀有密碼子為出現頻率小於或等於10%、9%、8%、7%、6%或5%的密碼子，如CAI (諸如人類CAI)所反映。

【0109】 在一些實施例中，藉由用較頻繁使用的同義密碼子(如CAI (諸如人類CAI)所反映)置換一或多個密碼子而對藉由本發明之AAV載體表現的蛋白編碼序列進行密碼子最佳化，使得針對整個編碼序列計算的CAI值相對於初始非密碼子最佳化序列增加，該初始非密碼子最佳化序列在一些實施例中為野生型蛋白質編碼序列。因此，在一些實施例中，參照特定CAI參考表計算初始參考序列的CAI值且用較頻繁的同義密碼子置換一或多個密碼子，使得現經密碼子最佳化之編碼序列的總體CAI值增加至少或約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35、0.36、0.37、0.38、0.39、0.40、0.41、0.42、0.43、0.44、0.45、0.46、0.47、0.48、0.49、0.50、0.55、0.60或0.70。

【0110】 如此項技術中已知，核酸中存在低甲基化CpG二核苷酸可刺激免疫反應來排除經轉導的細胞。使載體基因體中的CpG二核苷酸耗竭因此可增強載體轉導引起長期基因表現的可能性。*Wright, JF, Mol Ther, 28(3):701-3 (2020)*。考慮到CpG二核苷酸的潛在有害影響，因此在一些

實施例中，可對基因體內的任何序列(包括例如增強子、啟動子、內含子、編碼蛋白質或功能RNA的開放閱讀框、轉錄終止子、5'及/或3'非轉譯區(UTR)序列、ITR或任何其他序列)進行修飾以移除一或多個CpG二核苷酸，只要此舉對經修飾之元件的一些所需功能不會造成不可接受的干擾或破壞。由於載體基因體內之某些元件(諸如ITR、啟動子及增強子)的功能可能高度依賴於某些位置之特定核苷酸的一致性，因此使此類元件中之CpG二核苷酸顯著耗竭的機會可能更有限。由於兩種極性(就基因體內之轉殖基因的編碼序列而言，例如有義及反義)之AAV載體基因體以約等比例封裝於衣殼中，因此在一些實施例中，CpG耗竭策略可定向減少或排除兩種極性之載體基因體之核苷酸序列中的CpG模體，而不僅僅是含有有義取向之蛋白編碼序列之載體基因體中的CpG模體。

【0111】 在一些實施例中，相對於初始參考序列，編碼序列或整個載體基因體序列(就有義及/或反義股而言)中至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的CpG二核苷酸缺失或被置換。在其他實施例中，相對於初始參考序列，至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個CpG二核苷酸或任一前述值之間範圍內的CpG二核苷酸缺失或被置換。在其他實施例中，相對於初始參考序列，1至5、5至10、10至15、15至20、20至25、25至30、30至35、35至40、40至45、45至50、50至55、55至60、60至65、65至70、70至75、75至80、80至85、85至90、90至95或95至100個CpG二核苷酸缺失或被置換。

【0112】 在其他實施例中，相對於初始參考序列，序列最佳化可增

加或降低總體GC含量。因此，在一些實施例中，相對於初始參考序列，諸如野生型蛋白質編碼序列，可使轉殖基因或整個基因體中之G或C核苷酸的總百分比增加至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40%或更多。在一些實施例中，相對於初始參考序列，諸如野生型蛋白質編碼序列，可使轉殖基因或整個基因體中之G或C核苷酸的總百分比降低至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40%或更多。

【0113】 如一般技術者將瞭解，當最佳化編碼序列時，用較盛行密碼子取代物種(諸如人類)中之任何特定胺基酸的目的可能與其他最佳化策略不相容，原因在於引入較頻繁使用的密碼子可引入CpG模體，或CpG的排除可能需要使用稀有密碼子，或密碼子最佳化可能以非所需方式增加或減少GC含量。在此等情形中，可能需要設計及測試經最佳化的不同編碼序列(編碼相同多肽)來鑑別對不同最佳化策略之間可接受的平衡造成衝擊的形式，以達成經改良之蛋白質表現。

【0114】 可藉由改變除密碼子偏好及CpG含量之外的特徵來最佳化轉殖基因及載體基因體序列。舉例而言，可鑑別(在概念上，諸如使用算法，或憑經驗)且改變或排除有時存在於序列中且對轉殖基因表現造成負面影響的任一種以下特徵以便減少其影響：隱性剪接位點；過早轉錄終止信號序列(例如polyA序列)；除預期起始子甲硫胺酸之外的轉譯起始位點(例如IRES)；GC含量高的序列區域；可形成髮夾的mRNA 5'端序列；及mRNA 3'非轉譯區中可被去穩定化RNA結合蛋白所結合的富AU元件

(ARE)。一般熟習此項技術者將熟悉可出現於轉殖基因及載體基因體中、當改變時可增強轉殖基因表現的其他序列特徵。

【0115】 在其他實施例中，轉殖基因或載體序列可經修飾以增強功能。舉例而言，蛋白質編碼序列中之第一預定起始密碼子僅可微弱地支持自該位點起始的轉譯，在此情況下，可改變周圍序列以便與所謂的Kozak共有序列匹配以在真核生物中達成轉譯起始。*Kozak, M., Gene, 234(2):187-208 (1999)*。

【0116】 在一些實施例中，相較於包括未最佳化之初始參考序列(諸如衍生最佳化序列的野生型編碼序列)的相同載體，轉殖基因編碼序列中的CpG耗竭(部分或完全耗竭)或其他類型的序列最佳化(諸如密碼子最佳化)可改良轉殖基因之蛋白質表現。因此，舉例而言，相較於未最佳化的初始參考序列，諸如編碼序列的野生型形式，轉殖基因的最佳化編碼序列可有效地表現至少25%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或更多。

AAV衣殼

【0117】 本發明之AAV載體可使用由任何AAV衣殼蛋白製成的衣殼，不論天然存在或經修飾，包括當前已知或尚待發現或開發的衣殼，其適於轉導個體中之細胞以自載體轉殖基因表現GCase蛋白。

【0118】 可根據多種考量及因素來指導待用於建立AAV載體(及用於產生其的相應*cap*基因序列)之衣殼蛋白的選擇。如上文所提及，不同AAV衣殼藉由與某些細胞表面受體發生特異性相互作用而可具有不同細胞或組織向性，當相對於其他組織而需要優先轉導某些組織時，此可為優點。舉例而言，為了優先在肌肉中表現轉殖基因產物，可使用對肌肉之向

性大於肝臟的衣殼產生載體。反之，為了在肝臟中表現轉殖基因產物，可使用對肝臟之向性大於肌肉或其他組織的衣殼產生載體。

【0119】 其他因素亦可能重要。舉例而言，研究已明確，一些人由於暴露於天然存在之AAV而對某些衣殼具有高中和抗體效價，此會干擾具有相同或相似衣殼之AAV載體轉導目標細胞的能力。因此，在設計用於基因療法之載體時，有時可根據衣殼之免疫原性及/或待治療之患者的血清流行率來引導衣殼的選擇。可影響衣殼選擇的其他考量包括可製造性及儲存期間的穩定性，以及此項技術中已知的其他考量。

【0120】 本發明之AAV載體可使用由來自天然存在之AAV的衣殼蛋白製成的衣殼，以及經修飾或經工程改造之衣殼蛋白。舉例而言，可藉由在VP1、VP2及/或VP3蛋白質序列中插入或缺失胺基酸或肽或引入胺基酸取代來修飾天然存在之衣殼蛋白，此旨在以一些方式來改良衣殼功能，諸如組織向性、免疫原性、穩定性或可製造性。其他實例包括藉由將來自一種已知衣殼之胺基酸或結構域與另一者交換(鑲嵌或嵌合衣殼)或使用DNA改組及定向演化方法建立經改良之特性的新穎衣殼。

【0121】 在一些實施例中，本發明之AAV載體可包含來自己知AAV血清型及變異體之衣殼以及非天然存在之衣殼，包括但不限於AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh74、AAV-DJ、AAV-PHP.B、Anc80、AAV2.5及AAV2i8，多種其他衣殼亦可。在一些實施例中，本發明之AAV載體的衣殼包括作為已知VP1、VP2或VP3 AAV衣殼蛋白變異體或衍生物的VP1、VP2及/或VP3 AAV衣殼蛋白。在一些實施例中，AAV衣殼蛋白之此類變異體或衍生物的胺基酸序列可與任何已知AAV衣殼VP1、VP2或

VP3 蛋白質序列(包括但不限於 AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh74、AAV-DJ、AAV-PHP.B、Anc80、AAV2.5及AAV2i8或任何其他適合 AAV 衣殼(包括例如下文論述的親肝性衣殼)的 AAV 衣殼 VP1、VP2 或 VP3 蛋白質)之胺基酸序列至少或約 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9% 一致。在一些其他實施例中，AAV 衣殼蛋白之此類變異體或衍生物的胺基酸序列與已知 AAV 衣殼 VP1、VP2 或 VP3 蛋白質胺基酸序列(包括但不限於 AAV1、AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh74、AAV-DJ、AAV-PHP.B、Anc80、AAV2.5 及 AAV2i8，或任何其他適合 AAV 衣殼(包括例如下文論述的親肝性衣殼)的 AAV 衣殼 VP1、VP2 或 VP3 蛋白質)存在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 個或更多個胺基酸的差異(不論由於胺基酸的缺失、插入或取代)。

親肝性 AAV 衣殼

【0122】 在一些實施例中，本發明之 AAV 載體包含親肝性衣殼。親肝性衣殼為對肝臟細胞(諸如肝細胞)具有向性之 AAV 衣殼。根據一些實施例，用於本發明之 AAV 載體中的衣殼對人類肝臟細胞(諸如人類肝細胞)具

有親肝性。如一般技術者將瞭解，親肝性不意謂衣殼僅能夠轉導肝臟細胞。相反，親肝性衣殼展現轉導肝臟細胞之傾向度有些大於其他類型的細胞或組織，即使該傾向並非絕對，且即使親肝性衣殼展現轉導一些其他類型之細胞或組織的傾向甚至大於肝臟細胞。在一些非限制性實施例中，親肝性AAV衣殼為結合至硫酸乙醯肝素蛋白聚醣(HSPG)的親肝性AAV衣殼，硫酸乙醯肝素蛋白聚醣已表明為介導AAV感染人類肝細胞的細胞受體。

【0123】 親肝性衣殼之實例包括但不限於：AAV2；AAV3B；AAV5；AAV6；AAV7；AAV8；AAV9；AAV13；AAV-DJ (*Grimm, D* 等人, *J Virol*, 82:5887-5911 (2008))；AAV-LK03 (*Lisowski, L* 等人, *Nature* 506:382-6 (2014))；AAV-KP1；AAV-hu.Lvr01 (Genbank 登錄號 QPP19816)；AAV-hu.Lvr02 (Genbank 登錄號 QPP19818)；AAV-hu.Lvr03 (Genbank 登錄號 QPP19819)；AAV-hu.Lvr04 (Genbank 登錄號 QPP19821)；AAV-hu.Lvr05 (Genbank 登錄號 QPP19824)；AAV-hu.Lvr06 (Genbank 登錄號 QPP19825)；AAV-hu.Lvr07 (Genbank 登錄號 QPP19828)；AAV-rh.10；AAV-rh.74；AAV-Anc80 (*Zinn, E* 等人, *Cell Rep*, 12:1056-68 (2015))；AAV-NP40、AAV-NP59及AAV-NP84 (*Paulk, NK* 等人, *Molecular Therapy*, 26(1):289-303 (2018))；AAV-hu.37；AAV-rh.8；AAV-rh.64R1；來自WO 2015/013313之包含VP1蛋白質的衣殼，該蛋白質包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9及SEQ ID NO: 10 (分別稱為 RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4及 RHM15-6)；AAVHSC7、AAVHSC15及AAVHSC17 (*Smith, LJ* 等人, *Mol*

Ther, 22(9):1625-34 (2014); Ellsworth, JL 等人, *PLOS One*, 14(11): e0225582 (2019))。

用於表現GCCase蛋白的AAV載體

【0124】 根據某些實施例，本發明之AAV載體包含AAV載體基因體，該AAV載體基因體包含編碼 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)蛋白質(諸如人類GCCase蛋白同功型1)的轉殖基因。在一些實施例中，轉殖基因包含分泌信號肽序列之編碼序列以及GCCase蛋白成熟形式之編碼序列。在一些實施例中，分泌信號肽序列與天然存在之GCCase蛋白中存在的分泌信號肽序列相同，但亦可使用來自異源蛋白質之信號肽，諸如來自IgG重鏈多肽之信號肽，諸如鼠類IgG重鏈多肽。在一些實施例中，人類GCCase成熟多肽包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列，野生型人類GCCase分泌信號肽之胺基酸序列包含SEQ ID NO: 39，且來自鼠類IgG重鏈多肽之分泌信號肽的胺基酸序列包含SEQ ID NO: 38。在一些實施例中，包括鼠類IgG重鏈多肽及人類GCCase成熟多肽之嵌合GCCase前驅蛋白的胺基酸序列包含SEQ ID NO: 16。

【0125】 在一些實施例中，編碼GCCase蛋白之轉殖基因核苷酸序列為與野生型人類GCCase編碼序列相同的核苷酸序列，其非限制性實例包括SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 32。然而，在其他實施例中，可最佳化編碼序列，諸如藉由使一些或所有CpG二核苷酸缺失、同時仍編碼相同GCCase蛋白來最佳化編碼序列，其非限制性實例包括編碼成熟多肽的SEQ ID NO: 13，或編碼嵌合GCCase蛋白的SEQ ID NO: 41，該GCCase蛋白包含鼠類IgG H鏈分泌信號肽序列及人類成熟多肽。在一些實施例中，自GCCase蛋白轉殖基因編碼

序列中移除至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110個或更多個CpG二核苷酸，或上文具體枚舉之任一值之間之任何範圍內(包括該值)的CpG二核苷酸。在一些實施例中，編碼GCase蛋白之核苷酸序列不含CpG二核苷酸。在一些實施例中，編碼GCase蛋白的核苷酸序列包含50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0個CpG二核苷酸或上文具體枚舉之任一值之間之任何範圍內(包括該值)的CpG二核苷酸，其中相對於參考序列(諸如野生型序列)已將其中CpG二核苷酸移除的核苷酸序列為含有編碼序列的有義股，或反義股，亦即，該有義股之反向互補序列。

【0126】 在一些實施例中，編碼人類GCase成熟多肽之轉殖基因之核苷酸序列與SEQ NO: 13所提供的核苷酸序列相同，而在相關實施例中，轉殖基因可與SEQ ID NO: 13之核苷酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致，同時編碼與SEQ ID NO: 13所編碼之胺基酸序列一致的胺基酸序列。在其他實施例中，編碼嵌合GCase前驅蛋白之轉殖基因之核苷酸序列與SEQ NO: 41所提供的核苷酸序列相同，而在相關實施例中，轉殖基因可與SEQ ID NO: 41之核苷酸序列至少

50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致，同時編碼與SEQ ID NO: 41所編碼之胺基酸序列一致的胺基酸序列。在其他實施例中，編碼人類GCase成熟多肽之轉殖基因之核苷酸序列與SEQ NO: 28、SEQ NO: 29或SEQ NO: 30所提供之核苷酸序列相同，而在相關實施例中，轉殖基因可分別與SEQ NO: 28、SEQ NO: 29或SEQ NO: 30之核苷酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致，同時編碼與SEQ NO: 28、SEQ NO: 29或SEQ NO: 30分別所編碼之胺基酸序列一致的胺基酸序列。

【0127】 在一些實施例中，本發明之AAV載體之載體基因體進一步包含定位於基因體之5'及/或3'端的至少一個AAV反向末端重複(ITR)。在一些實施例中，載體基因體可進一步包含定位於來自第一AAV ITR之基因體之相對端的至少第二AAV ITR。在一些實施例中，載體基因體包含定位於其5'端的AAV ITR。在一些實施例中，載體基因體包含定位於其3'端的AAV ITR。在一些實施例中，載體基因體包含定位於其5'端的第一AAV ITR及定位於其3'端的第二AAV ITR。在一些實施例中，載體基因體包含定位於其5'端的第一AAV ITR及定位於其3'端的第二AAV ITR及定位於該第一與第二AAV ITR之間的第三AAV ITR。

【0128】 用於本發明之載體中的AAV ITR可係任何類型，諸如AAV2 ITR或非AAV2 ITR，且可為全長的或截斷的，且可具有與存在於

自然界中(野生型序列)或可經修飾之任何已知AAV病毒ITR相同的序列。例示性非限制性修飾類型包括減少存在於ITR序列中的CpG二核苷酸數目、減少或排除ITR序列在AAV Rep蛋白作用下經歷末端解鏈的能力，諸如藉由使末端解鏈位點(trs)突變、缺失或以其他方式不活化，以及減少或排除ITR支持封裝於衣殼中的能力，諸如藉由使ITR序列之D序列突變、缺失或以其他方式不活化。在一些實施例中，載體基因體可進一步包含至少第三AAV ITR，諸如定位於基因體之末端之間的AAV ITR，諸如靠近或位於載體基因體序列之中心的AAV ITR。在一些此等實施例中，第三ITR可經修飾，諸如藉由使其末端解鏈位點不活化，以使得包括轉殖基因的載體基因體為自互補的。在一些實施例中，載體基因體包含AAV ITR，該AAV ITR包含、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19之核苷酸序列，或此類序列中之每一者的互補序列或反向互補序列。

【0129】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體進一步包含與編碼GCase蛋白之轉殖基因可操作地連接的轉錄控制區域。在一些實施例中，轉錄控制區域可具誘導性、組成活性或細胞類型或組織類型特異性，諸如大部分或僅在肝細胞或肝臟中具有活性(從而具有肝細胞特異性或肝臟組織特異性)。在一些實施例中，轉錄控制區域包含或由啟動子組成，且可進一步包含至少一個增強子區域或元件。轉錄控制區域中的任何區域或元件可來源於人類基因，或非人類基因，諸如大鼠、小鼠、牛、非人類靈長類動物、雞或病毒基因，或其他物種或類型的生物體。轉錄控制區域中的各區域或元件可彼此間鄰接，或被載體基因體的其他功能性序列分隔。因此，舉例而言，啟動子區域可位於轉殖基因的近端及5' (上

游)，而增強子區域或元件可位於載體基因體中的任何其他位置，諸如上游遠端，或別處，諸如轉殖基因的遠端3'（下游）。轉錄控制區域中的任何區域或元件可具有細胞類型或組織特異性，諸如肝臟組織特異性。因此，啟動子可具有肝臟細胞或組織特異性，增強子區域或元件可具有肝臟細胞或組織特異性，或單獨作用或協同作用的啟動子與增強子均可具有肝臟細胞或組織特異性。

【0130】 在一些實施例中，用於本發明之載體中的轉錄控制區域可含有來源於人類白蛋白(ALB)基因的啟動子序列，其中此類啟動子為完整的人類ALB基因啟動子，或此類人類ALB基因啟動子的啟動子功能子序列。因此，舉例而言，啟動子可以包含、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 10之核苷酸序列或其啟動子功能子序列、修飾或變異體。

【0131】 在一些實施例中，用於本發明之載體中的轉錄控制區域可含有來源於人類白蛋白(ALB)基因的增強子序列，其中此類增強子序列為完整的人類ALB基因增強子區域，或此類人類ALB基因增強子區域之增強子功能子序列。因此，舉例而言，增強子序列可包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 9之核苷酸序列或其增強子功能子序列、修飾或變異體。在一些實施例中，用於本發明之載體中的轉錄控制區域可含有來源於 α -1-微球蛋白/尿抑胰酶素前驅體(AMBP)基因的增強子序列，其中此類增強子序列為完整的AMBP基因增強子區域，或此類AMBP基因增強子區域之增強子功能子序列。因此，舉例而言，增強子序列可包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 8之核苷酸序列或其增強子功能子序列、修飾或變異體。

【0132】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體進一步包含轉錄終止信號序列，諸如聚腺苷酸化(poly(A))信號序列，諸如來源於牛生長激素(bGH)基因的pA信號序列，或此類bGH基因pA信號序列之轉錄終止功能子序列。因此，舉例而言，轉錄終止信號序列可包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 14之核苷酸序列或其轉錄終止功能子序列、修飾或變異體。

【0133】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體進一步包含內含子序列，該內含子序列可定位於編碼GCaase蛋白之轉殖基因內且中斷該轉殖基因，或可定位於載體基因體中之別處且不中斷編碼序列，諸如定位於轉殖基因之5'，或定位於轉殖基因之3'，或定位於別處，諸如定位於啟動子之3'及轉殖基因之5'。在一些實施例中，內含子序列可來源於人類β血球蛋白(HBB)基因，在一些實施例中，其可包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。

【0134】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體進一步包含其他功能性序列，諸如病毒轉錄後調控元件(PRE)序列，諸如土撥鼠肝炎病毒轉錄後調控元件(WPRE)或B型肝炎病毒轉錄後調控元件(HPRE)，其中任一者可定位於轉殖基因之3'及轉錄終止信號序列之5'，或基因體中之別處。在一些實施例中，PRE可為WPRE，其包含、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 27之核苷酸序列或其功能子序列、修飾或變異體。可用於本發明之載體基因體中的其他序列包括但不限於微小RNA (miRNA)的結合位點，其可定位於轉殖基因之3'及轉錄終止信號序列之5'，或定位於基因體中之別處；及填充或填補核苷酸序列，包括該等填充或填補核苷酸序列的目的不一定是直接影響轉殖基因的表現(儘管

此類特性可存在)，而是使得載體基因體的總長具有特定尺寸，例如足夠長以便接近於特定AAV衣殼的封裝容量，以便減少封裝於衣殼中之污染性非全長載體基因體DNA的量。

【0135】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體包含第一AAV ITR、與編碼GCase蛋白之轉殖基因可操作地連接的轉錄控制區域、轉錄終止信號序列及第二AAV ITR。在相關實施例中，此等元件可以5'至3'次序依序佈置於與呈有義取向之單股載體基因體對應的核酸分子中，或佈置於包含基因體序列之雙股DNA分子的有義股中，諸如可存在於用於在宿主細胞中產生載體之質體中。反之，此等元件可以3'至5'次序依序佈置於與呈反義取向之單股載體基因體對應的互補核酸分子中，或佈置於包含基因體序列之雙股DNA分子的反義股中。因此，舉例而言(而非為了限制)，若呈有義取向的載體基因體以5'至3'次序包含增強子、啟動子、編碼蛋白質之轉殖基因及poly(A)信號序列，則互補的反義載體基因體序列將自其5'端開始、以poly(A)、轉殖基因、啟動子、增強子之次序包含彼等相同元件，但其中沿著5'至3'方向之各元件(及其間之任何連接序列)的核苷酸序列為有義股載體基因體序列中之相同元件的反向互補序列。在自互補載體基因體(scAAV)的情況下，元件佈置將以5'至3'次序存在於其序列的約一半中且接著以3'至5'次序存在於互補的一半中。

【0136】 在一些實施例中，本發明之AAV載體中的載體基因體以5'至3'次序包含：位於基因體之5'端的來自AAV2之第一AAV ITR、轉錄控制區域、內含子、與轉錄控制區域可操作地連接的編碼GCase蛋白之轉殖基因、轉錄終止信號序列，及位於基因體之3'端的來自AAV2之第二AAV ITR。在一些實施例中，轉錄控制區域包含增強子區域及啟動子，其中的

任一者或兩者可具有肝臟組織特異性，諸如(5'至3'次序)包含AMBP基因增強子序列之兩個串聯複本的增強子區域，該兩個複本各自包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列、基本上由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成；包含SEQ ID NO: 9之核苷酸序列、基本上由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成的ALB基因增強子序列；以及包含SEQ ID NO: 10之核苷酸序列、基本上由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成的ALB基因啟動子序列。在一些實施例中，內含子來源於人類 β 血球蛋白(HBB)基因且包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。在一些實施例中，轉錄終止信號序列來源於牛生長激素(bGH)基因且包含SEQ ID NO: 14之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成。在一些實施例中，AAV載體基因體進一步包含經修飾之TBP內含子2序列，其定位於轉錄終止信號序列之3'及該第二AAV2 ITR之5'。在任一前述實施例中，編碼人類GCCase蛋白的轉殖基因可包含SEQ ID NO: 41之核苷酸序列、主要由該核苷酸序列組成或由該核苷酸序列組成，或編碼包含與SEQ ID NO: 16之胺基酸20-516之序列一致之成熟多肽的GCCase蛋白且包含與SEQ ID NO: 13之核苷酸序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%一致的核苷酸序列。在任一前述實施例中，第一及第二AAV2 ITR中的任一者或兩者可為全長的或截斷的，且可成翻轉或反轉組態。在任一前述實施例中，第一及第二AAV2 ITR中的任一者或兩者可包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18或SEQ ID NO: 19之核

核苷酸序列，或此類序列中之每一者的反向互補序列。在任一前述實施例中，載體基因體可包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 17之核苷酸序列或其反向互補序列。在任一前述實施例中，載體基因體可為單股，此意謂其不為自互補的(ITR外部)且可具有約4000至5000核苷酸範圍內的長度。在任一前述實施例中，載體基因體可呈有義取向或反義取向。在任一前述實施例中，載體基因體可藉由AAV衣殼(諸如親肝性AAV衣殼)達成衣殼化，其非限制性實例包括來自以下之衣殼：AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV13、AAVrh.74、AAVrh.10、AAV-DJ、AAV-LK03、AAV-KP1、AAV-hu.Lvr01、AAV-hu.Lvr02、AAV-hu.Lvr03、AAV-hu.Lvr04、AAV-hu.Lvr05、AAV-hu.Lvr06、AAV-hu.Lvr07、AAV-Anc80、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP84、AAV-hu.37、AAV-rh.8、AAV-rh.64R1、RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4及RHM15-6、AAVHSC7、AAVHSC15及AAVHSC17，或包含VP1蛋白質的AAV衣殼，該蛋白質包含以下或由以下組成：選自由SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 4組成之群的胺基酸序列。在任一前述實施例中，AAV載體可包含在來自AAV3B之衣殼中達成衣殼化的AAV載體基因體，其中該基因體之核苷酸序列包含、主要由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 17之核苷酸序列或其反向互補序列。

【0137】 在一些實施例中，本發明之AAV載體的載體基因體進一步包含定位於第一與第二AAV ITR之間的第三AAV ITR，諸如定位於載體基因體之中段(即使不恰好位於中段)，在一些實施例中，其可具有不經歷末端解鏈的突變或改變之末端解鏈位點。在此等實施例中，載體基因體可

為自互補的，且當封裝於衣殼中時可具有約4000至5000個核苷酸範圍內的長度，或當其序列包含於適用於在宿主細胞中產生scAAV載體之質體中時可具有約2000至2500個核苷酸的長度。

AAV載體產生

【0138】 如此項技術中已知，AAV載體可以多種方式產生，包括大規模產生。舉例而言，可在哺乳動物或昆蟲細胞中產生AAV載體且接著純化。不依賴於與輔助病毒共感染的傳統方法包括使用如上文所論述的三種質體。一種質體含有輔助病毒因子之基因，第二種質體含有呈雙股形式之AAV基因體序列，且第三種質體含有AAV *rep*及*cap*基因。*rep/cap*質體通常含有來自AAV2的*rep*基因，但此並非必需的，且*cap*基因序列係基於構成衣殼所需的AAV衣殼蛋白來選擇。在實踐中，三種質體通常在細菌中分別複製，純化，在溶液中依預定比例混合在一起且接著與轉染劑混合。接著使用轉染混合物轉染適合的哺乳動物宿主細胞(貼附或懸浮細胞培養時)，在足以供宿主細胞表現輔助因子以及*rep*及*cap*基因以及供AAV載體基因體自其質體模板複製且封裝於衣殼中的條件下培育足夠的時間(例如48至72小時等)。在一些實施例中，宿主細胞為HEK293細胞，其組成性表現AdV輔助因子E1A及E1B，使得輔助質體僅需含有AdV E2A、E4ORF6及VA RNA基因。使用自身不產生AdV或其他病毒輔助因子的其他哺乳動物宿主細胞則必須使用含有缺失之輔助因子或原本必需之輔助因子(不論哪種)的輔助質體。儘管通常使用上述所謂的三重轉染方法，但不要求輔助因子之基因以及*rep*及*cap*基因以各別質體提供。原則上，所有此等基因可容納於例如一種質體中，在此情況下，可利用兩種質體進行轉染。

【0139】 藉由尋求更高效方法來大規模產生AAV載體，已建立含有一些但非所有組分的穩定細胞株，該等組分原本為藉由短暫轉染引入細胞中所必需的。封裝細胞株含有穩定整合的AAV *rep*及*cap*基因。在封裝細胞中產生AAV需要將該等細胞用含有AAV載體基因體的質體短暫轉染且用輔助病毒感染。亦可在無需轉染的情況下如下在封裝細胞中產生AAV載體：首先用供應AdV E1基因產物以誘導*rep*及*cap*在細胞中表現的AdV (野生型或其中E2b基因已缺失)以及為AAV複製所必需的輔助因子感染該等細胞，隨後用複製缺乏性雜合體AdV感染，在該雜合體AdV中，AAV載體基因體置換雜合體病毒基因體中的E1基因。

【0140】 在另一選項中，生產細胞株含有穩定整合的AAV *rep*及*cap*基因，以及AAV載體基因體。在生產細胞中產生AAV需要將該等細胞用輔助病毒感染。封裝細胞及生產細胞進一步描述於例如 *Martin, J* 等人, *Generation and characterization of adeno-associated virus producer cell lines for research and preclinical vector production, Hum. Gene Methods*, 24:253-269 (2013); *Gao, GP* 等人, *High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus, Hum. Gene Ther.*, 9:2353-62 (1998); *Martin, J* 等人, *Generation and Characterization of Adeno-Associated Virus Producer Cell Lines for Research and Preclinical Vector Production, Hum. Gene Ther. Meth.*, 24:253-69 (2013); *Clement, N* 及 *JC Grieger, Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials, Mol. Ther. Meth. & Clin. Dev.* (2016) 3, 16002 (doi:10.1038/mtm.2016.2)。用於在哺乳動物細胞中產生AAV載體(包括商業規模)的其他細胞系統亦可。

【0141】 桿狀病毒系統亦已用於產生AAV載體，其中Sf9昆蟲細胞用差異性地含有AAV *rep*及*cap*基因及AAV基因體的重組桿狀病毒載體感染。表現外源基因，隨後基因體封裝於細胞內的載體顆粒中。在該系統的早期形式中，各組分*rep*、*cap*及基因體由三種各別的桿狀病毒攜載。隨後進行修飾，諸如將*rep*與*cap*組合於單一桿狀病毒中，使得僅需兩種類型之桿狀病毒，以及產生含有穩定整合之AAV *rep*及*cap*基因的Sf9細胞株，該細胞株僅需用單一類型的含有AAV載體基因體之重組桿狀病毒感染。使用桿狀病毒系統產生AAV載體進一步描述於例如Urabe, M等人, *Insect Cells as a Factory to Produce Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors*, *Hum. Gene Ther.*, 13:1935-43 (2002); Virag, T等人, *Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: Overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy*, *Hum. Gene Ther.*, 20:807-17 (2009); Smith, RH等人, *A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells*, *Mol. Ther.*, 17:1888-96 (2009); Mietzsch, M等人, *OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy*, *Hum. Gene Ther.* 25(3):212-22 (2014)。用於在昆蟲細胞中產生AAV載體(包括商業規模)的其他細胞系統亦可。

宿主細胞

【0142】 如本文所用，「宿主細胞」意謂適於或經調適可活體外產生AAV載體的細胞。宿主細胞通常為能夠在衰老停止生長之前分裂成多代的單株細胞株，或甚至可為永生的。為了產生載體，可經由引入外源遺傳

資訊來短暫或非短暫地修飾宿主細胞，該外源遺傳資訊設計成引導宿主細胞中生物合成為AAV載體組裝所必需的多種組分，尤其是AAV衣殼蛋白、Rep蛋白、輔助病毒因子及載體基因體。舉例而言，宿主細胞可用外源供應的核酸轉染，諸如呈一或多種DNA質體形式的核酸，其含有編碼所需載體組分的核苷酸序列。

【0143】 此項技術中已知以核酸轉染宿主細胞的多種方法。此等方法包括但不限於將核酸與可與核酸複合且接著吸收於細胞中的某些化合物混合，該等化合物包括磷酸鈣或陽離子有機化合物，諸如DEAE-聚葡萄糖、聚乙烯亞胺(PEI)、聚離胺酸、聚鳥胺酸、凝聚胺、環糊精、陽離子型脂質及此項技術中已知的其他化合物。亦可經由電穿孔及更多外來技術(諸如生物彈道顆粒遞送)，以非化學方式執行轉染。如此項技術中已知，轉染可為短暫或穩定的。就短暫轉染而言，轉染的核酸在細胞中存在的時段有限且在DNA的情況下，轉染的核酸不整合於基因體中。就穩定轉染而言，引入細胞中的DNA可作為游離型質體長時段持久存在，或整合於染色體中。通常，為了產生經穩定轉染的細胞，將含有選擇標記物基因以及編碼一或多種所需載體組分之核苷酸序列的質體轉染至細胞中，接著在選擇性壓力下培養且維持，亦即，在殺滅未轉染之細胞或其中外源DNA(包括其選擇標記物)因一些原因而消失之經轉染之細胞的條件下培養且維持。舉例而言，質體可含有抗生素抗性基因且可藉由將抗生素添加至培養細胞的培養基中來選擇經轉染的細胞。在一些實施例中，除非當培養細胞時引入誘導啟動子的環境因素，諸如藥物、金屬離子，或提高溫度，否則編碼引入經穩定轉染之宿主細胞中之一或多種所需載體組分的核苷酸序列處於誘導型啟動子的控制下且不表現，或僅低量表現。

【0144】 在其他實施例中，可使用遺傳工程方法，諸如嵌入(knock-in)，或基因編輯方法，以非短暫的靶向方式修飾宿主細胞基因體，以引導宿主細胞產生一或多種所需載體組分。在其他實施例中，出於引導AAV載體產生的目的，可將編碼一或多種所需載體組分的核苷酸序列經由轉導引入宿主細胞中，其中用含有此類核苷酸序列之經修飾病毒感染宿主細胞。適用於此類目的之病毒載體之實例包括腺病毒、逆轉錄病毒(包括慢病毒)、桿狀病毒、痘瘡病毒及單純疱疹病毒，其他病毒載體亦可。

【0145】 宿主細胞可為此項技術中已知適用於產生AAV載體之目的之任何類型的細胞。宿主細胞通常為動物細胞，不同類型或物種亦可，諸如昆蟲細胞或哺乳動物細胞，包括大鼠、小鼠或人類細胞，其他宿主細胞亦可。在一些實施例中，適用於產生本發明之AAV載體的宿主細胞為哺乳動物宿主細胞，其實例包括HeLa細胞、Cos細胞、HEK293細胞(及HEK293細胞變異體，諸如HEK293E、HEK293F、HEK293H、HEK293T或HEK293FT細胞)、A549細胞、BHK細胞、Vero細胞、NIH 3T3細胞、HT-1080細胞、Sp2/0細胞、NS0細胞、C127細胞、AGE1.HN細胞、CAP細胞、HKB-11細胞、WI-38細胞、MRC-5細胞或PER.C6細胞，其他多種宿主細胞亦可。在一些實施例中，適用於產生本發明之AAV載體的宿主細胞為昆蟲宿主細胞，其實例包括Sf9細胞、ExpiSf9、Sf21細胞、S2細胞、D.Mel2細胞、Tn-368細胞或BTI-Tn-5B1-4細胞，其他多種昆蟲宿主細胞亦可。在一些實施例中，包括(但不限於)HEK293細胞及其變異體的宿主細胞可經調適以在懸浮培養物中生長。

【0146】 出於產生AAV載體的目的，宿主細胞通常在有助於其生長及載體生物合成的可控條件下、在培養物中培養或維持。舉例而言，可在

化學組成限定的液體培養基中培養宿主細胞，該液體培養基提供細胞生長及生物合成所必需的所有營養。例示性培養基包括 DMEM、DMEM/F12、MEM、RPMI 1640 (用於哺乳動物宿主細胞)及Express Five SFM、Sf-900 II SFM、Sf-900 III或ExpiSf CD (用於某些昆蟲細胞)。此類培養基在使用時可補充有已知可刺激特定類型之細胞生長的抗生素、生長因子或細胞介素(重組產生或存在於動物血清中，諸如FBS)，以及可為AAV載體之最佳生物合成所必需、但原本限制供應的其他成分。例示性補充劑包括必需胺基酸、麩醯胺酸、維生素K、胰島素、BSA或運鐵蛋白。除生長培養基之外，亦可控制其他培養條件以最佳化細胞的生長及/或生產力，諸如pH、溫度及CO₂及氧濃度。

【0147】 培養中之宿主細胞可在此項技術中已知的多種容器中培養或維持，諸如攪拌罐生物反應器、波浪式反應袋、旋轉燒瓶、中空纖維生物反應器或滾瓶，其中一些可根據一次性使用或多次使用來設計及組態。視所討論之宿主細胞的特徵而定，可以貼附細胞培養方式培養宿主細胞，其中細胞貼附於物理受質且與物理受質接觸時生長；或以懸浮細胞培養方式培養宿主細胞，其中單一細胞自由漂浮於支撐其的培養基中，或貼附於懸浮於培養基中的珠粒微載體上。如此項技術中已知，已開發出各種技術且可用於使宿主細胞生長至高細胞密度，諸如灌注培養，此可增加每次生產運作所產生的AAV載體之總量。

【0148】 如此項技術中已知，宿主細胞之樣品通常在冷凍細胞庫(諸如主細胞庫及工作細胞庫)中維持，此有助於隨時間以多個批次生產生物學產物，同時確保宿主細胞的效能不變。在產生AAV載體的操作之前，典型地將來自細胞庫之宿主細胞的冷凍樣品解凍，接種於小體積培養物中且

在體積增加的培養物中培養至不斷更高的密度或數目。當宿主細胞已達到所需細胞密度及/或培養體積時，可引入外源遺傳物質，諸如藉由用質體DNA轉染或用病毒載體感染或轉導，以促使宿主細胞開始產生AAV載體。或者，若使用非短暫修飾之宿主細胞，其中編碼一或多種所需載體組分的核苷酸序列處於誘導性控制下，則可引入為了誘導表現而必需的環境因素。宿主細胞接著可在培養物中、在足以供其產生AAV載體的條件下培養或維持足夠的時間。

AAV載體純化

【0149】 在宿主細胞中生物合成之後，可以此項技術中已知之多種方式純化AAV載體。舉例而言，在一些實施例中，宿主細胞可以機械方式或化學方式溶解，諸如使用清潔劑溶解，隨後移除宿主細胞DNA及其他組分，隨後執行諸如密度梯度離心之步驟，或使用一或多種層析分離方法獲得高度純化的AAV載體製劑以用於研究或治療方法中。

【0150】 適用於純化AAV載體的層析方法包括但不限於尺寸排阻層析(SEC)；使用任何親和配位體的親和層析，該親和配位體附著至能夠特異性結合至衣殼的層析樹脂或基質，諸如抗體、凝集素或聚醣；固著式金屬螯合劑層析(IMAC)；親疏吸附層析；疏水性相互作用層析(HIC)；多峰層析(MMC)；偽親和層析；及離子交換層析(IEX或IEC)，諸如陰離子交換層析(AEX)或陽離子交換層析(CEX)。

【0151】 在一些實施例中，AAV載體可使用基於抗體的親和層析加以純化，其中抗體或其抗體片段附著至負載於層析管柱中的固定相(基質或樹脂)，宿主細胞溶胞物經由層析管柱被抽吸，隨後洗滌且溶離已結合至抗體的載體。結合至固相的抗體可為IgG或其片段，或單鏈駱駝抗體(諸

如重鏈可變區駱駝抗體)，其他類型的抗體亦可。配位體親和樹脂之非限制性實例包括Sepharose AVB、POROS CaptureSelect AAVX、POROS CaptureSelect AAV8及POROS CaptureSelect AAV9。參見例如Terova, O 等人, *Affinity Chromatography Accelerates Viral Vector Purification for Gene Therapies*, *BioPharm Intl. 電子書*第27-35頁(2017); Mietzsch, M 等人, *Characterization of AAV-Specific Affinity Ligands: Consequences for Vector Purification and Development Strategies*, *Mol. Ther. Meth. & Clin. Dev.*, 19:362-73 (2020); Rieser, R 等人, *Comparison of Different Liquid Chromatography-Based Purification Strategies for Adeno-Associated Virus Vectors*, *Pharmaceutics* 13, 748 (2021) (doi.org/10.3390/pharmaceutics13050748)。

【0152】 在其他實施例中，AAV載體可使用配位體層析加以純化，其中固定相已附著有與其同類型且已知某些AAV當結合至細胞時使用的配位體，諸如聚醣、唾液酸(例如O連接或N連接的唾液酸)、半乳糖、肝素、硫酸乙醯肝素或蛋白聚醣，諸如硫酸乙醯肝素或肝素蛋白聚醣(HSPG)。舉例而言，含有唾液酸殘基的親和基質可用於純化衣殼特異性結合至唾液酸的AAV載體(例如AAV1、AAV4、AAV5或AAV6)；含有半乳糖的親和基質可用於純化衣殼特異性結合至半乳糖的AAV載體(例如AAV9)；且含有肝素、乙醯肝素或HSPG的親和基質可用於純化衣殼特異性結合至HSPG的AAV載體(例如AAV2、AAV3A、AAV3B、AAV6或AAV13)。

【0153】 視載體的物理化學特徵而定，諸如衣殼上的電荷，可藉由執行陰離子交換、陽離子交換或疏水性相互作用層析來進一步純化AAV載

體。適用於純化AAV載體的其他下游製程步驟亦可使用，諸如但不限於去鹽及緩衝交換、超濾、奈米過濾、透濾及切向流過濾(TFF)。可使用超過一個下游處理步驟，且可根據一般熟習此項技術者的知識、以任何次序執行複數個下游處理步驟。

治療方法

【0154】 在其他實施例中，本發明提供藉由將治療有效量之本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA殖株128的載體)或含有此類AAV載體之醫藥組成物投與需要治療高歇氏病(或GCase缺乏)之個體(諸如人類個體)來治療高歇氏病(包括1型高歇氏病(GD1)或其他類型的GCase缺乏)的方法。亦提供本發明之AAV載體用於製造供本文揭示之治療方法中所用之藥劑的用途。另外，提供本發明之AAV載體或含有此類AAV載體之醫藥組成物，其用於本文揭示之治療方法中。

【0155】 治療患有高歇氏病之個體不一定產生被視為有效的治癒，其中「治癒」定義為疾病停止惡化，或個體之健康部分地或完全地恢復為其在症狀發作或惡化之前，或相對於無GD1之健康人而言。相反，本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA殖株128的載體)或含有此類AAV載體之醫藥組成物的治療有效量可為用於達成以下的治療有效量：至少部分地逆轉、減輕或緩解個體之與高歇氏病或GCase缺乏有關之至少一種症狀或徵象的程度或嚴重程度；或至少部分地逆轉、減輕或緩解由高歇氏病或GCase缺乏引起之個體身體、器官、組織或細胞之至少一種病症或功能障礙的程度或嚴重程度；或減緩個體之高歇氏病的惡化或GCase缺乏之其他有害影響；或改良患有高歇氏病或經歷GCase缺乏之有害影響之個體的生活品質。與高歇氏病或GCase缺乏有關之症狀、徵象、

病症或功能障礙的實例包括但不限於肝脾腫大、肝腫大、脾腫大、貧血、白血球嗜中性球減少症、白血球減少症、全部血球減少症、血小板減少症、單株高 γ -球蛋白血症、多株高 γ -球蛋白血症、厭食症、慢性疲勞、骨危象、無血管骨壞死、骨痛、骨質溶解、骨壞死、骨質減少、生活品質(QoL)降低，以及此項技術中已知與高歇氏病或GCase缺乏有關的其他症狀、徵象、病症或功能障礙。

【0156】 在一些實施例中，本文所揭示之用於治療GD1或其他類型之GCase缺乏的方法可用於治療GBA基因中存在任何類型之同型接合或異型接合有害突變或具有影響GBA基因之任何類型之同型接合或異型接合有害突變之人類個體的GD1或GCase缺乏。有害突變之非限制性實例包括GBA基因中之任一個或兩個對偶基因的缺失、插入、重組、剪接位點變異體、錯義或無義突變；影響GBA基因之任一個或兩個對偶基因之轉錄控制區域(例如增強子或啟動子)的突變；及/或減少由GBA基因之任一個或兩個對偶基因表現之mRNA之穩定性或自此類mRNA轉錄本轉譯之蛋白質之量的突變；只要突變導致GCase蛋白之產生量減少或GCase蛋白損失，及/或產生之GCase蛋白之酶活性之量減少或酶活性損失。舉例而言且不受限制，人類GBA基因中與GB1有關的一些較常見有害突變包括c.1226A>G (N370S)、c.1448T>C (L444P)、c.84dup、c.115+1G>A (IVS2+1G>A)，以及GBA與GBAP假基因之間重組而產生的RecNciI突變，以及此項技術中已知的多種其他突變。GBA基因之任一個或兩個對偶基因具有有害突變之個體的基因分型方法，諸如RFLP分析或基因或基因體定序，已為一般技術者所熟悉，用於偵測及定量個體樣品中存在之GCase蛋白及/或GCase酶活性之量的方法亦為一般技術者所熟悉。

【0157】 在一些實施例中，個體為經診斷患有GD1、此前未曾用針對GD1之酶替代療法(ERT)或受質減少療法(SRT)治療(亦即，未接受照護標準療法)的人類個體，而在其他實施例中，個體為經診斷患有GD1、在用本發明方法治療前已經歷ERT或SRT的人類個體。在一些實施例中，就正接受照護標準療法(亦即，並非未經治療)之患有GD1的個體而言，治療有效量之本發明的AAV載體或含有此類AAV載體的醫藥組成物允許此類個體中斷ERT或SRT或降低此類ERT或SRT的劑量及/或頻率，且至少在一段時間內不經歷以高歇氏病(或GCase缺乏)為特徵之症狀、徵象、病症或功能障礙的惡化(亦即，治療作用不一定是終身的)。

【0158】 可評估本文所揭示之治療方法對患有GD1或其他類型之GCase缺乏之個別個體的治療功效，其藉由在治療之前(基線)與治療之後觀測或量測且比較以GD1 (或GCase缺乏)為特徵之任何症狀、徵象、病症、功能障礙或實驗值的嚴重程度或量級。此類比較可在治療之後的一或多個時間(諸如在治療之後的0、1、2、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45或48個月或一些其他時間)執行。來自個別個體之用於比較的資料可單一資料點，或為複數個資料點(若可獲得)之平均值。

【0159】 在一些其他實施例中，可對充當其自身對照的患有GD1或其他類型之GCase缺乏之個體群體(亦即，兩個或更多個)評估治療功效，其藉由在治療之前(基線)與治療之後觀測或量測該群體內之個體之以GD1 (或GCase缺乏)為特徵之任何症狀、徵象、病症、功能障礙或實驗值的嚴重程度或量級且對治療前平均值資料與治療後平均值資料進行比較。此類比較可在治療之後的一或多個時間(諸如在治療之後的0、1、2、3、6、

9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45或48個月或一些其他時間)執行。研究群體可在用本發明之AAV載體治療之前接受針對GD1的照護標準ERT或SRT療法，且典型地在載體治療之後，至少在持續監測治療作用期間，中斷ERT或SRT療法(視具體情況而定)。在其他實施例中，研究群體在用本發明之AAV載體治療之前未曾接受照護標準療法。在一些實施例中，旨在建立及定量治療功效的研究可設計成對經本發明之AAV載體治療之個體群體(治療組)的治療作用與接受安慰劑之個體群體(對照組)的治療作用進行比較。典型地，儘管未必，研究中之治療組與對照組內的個體就相關個體特徵而言為匹配的，諸如在干預時的年齡、性別、疾病嚴重程度，以及個體是否一直接受或正接受照護標準ERT或SRT療法，或相反，未曾治療。在其他實施例中，對照群體不用安慰劑治療，但改為自天然病史研究中抽取，其中觀測GD1患者以描述且定量相關疾病參數在基因療法不存在下的進展。

【0160】 在一些實施例中，本文所揭示之用於治療GD1或其他類型之GCase缺乏的方法有效地治療任何年齡之患有GD1或GCase缺乏之個體，包括但不限於小於1歲的個體，諸如約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11月齡的個體，或至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70歲或更大的個體，或包括上文具體枚舉之任一年齡以及該任一年齡之間的年齡。

【0161】 在一些實施例中，本文所揭示之用於治療GD1或其他類型之GCase缺乏的方法有效地治療在本發明之AAV載體首次投與時患有任何嚴重等級或程度之GD1的個體，諸如輕度、中度或重度GD1，或利用適合

嚴重度評分指數之個體嚴重度評分所反映的GD1嚴重程度，諸如下文進一步描述的GD1-DS3或GauSSI-I。舉例而言且不受限制，在首次用本發明之AAV載體治療時，一或多名個體根據GD1-DS3嚴重度評分指數可具有嚴重度評分19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1，或根據GauSSI-I可具有嚴重度評分42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1。在一些實施例中，在首次用本發明之AAV載體治療時，個體尚未展現GD1的任何明顯徵象或症狀，但基於基因測試已診斷出可能會出現此類徵象或症狀，該基因測試證明個體GBA基因之任一個或兩個對偶基因中存在至少一個有害突變。

【0162】 在一些實施例中，在載體投與之後的一段時間內，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA殖株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地治療GD1或任何其他形式的GCase缺乏，在此期間，患者可放棄1型高歇氏病的照護標準療法，例如ERT或SRT療法，而不會經歷高歇氏病的任何症狀或徵象，或不會經歷在基因療法時可能已存在之高歇氏病之症狀或徵象的任何惡化，或至多經歷在基因療法時可能已存在之高歇氏病之症狀或徵象的最小惡化，使得患者的總體健康、機能、生活品質及/或壽命不受到實質或顯著影響。在一些實施例中，此時段(在本文中稱為治療耐久期)可為任何適合的或所需的時段，包括例如且不限於至少或約3、6、9、12、15、18、21、24個或更多個月，或至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15年或更多年，或至少或約1、2、3、4、5、6、7個或更多

個十年，或具體枚舉之任一值之間的任何時間跨度，或甚至在一些實施例中，在接受如本文所述之基因療法之後的患者餘生。

血液學臨床表現

【0163】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低疾病過程之血液學臨床表現(尤其包括貧血、血小板減少症及過度出血)的發生率、頻率或嚴重度。在一些實施例中，治療使GD1患者在本發明之AAV載體投與後之時段內之疾病過程之血液學臨床表現頻率或程度降低，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間以及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

貧血

【0164】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低貧血(紅血細胞數低於正常數目，其通常藉由量測血液中之血紅蛋白含量或由紅血細胞構成之血容量百分比(血容比)來定量)的發生率、頻率或嚴重度，及相關風險，包括疲乏、無力、呼吸短促、眩暈及其他。在一些實施例中，用於治療GD1之本發明方法可減少GD1患者原本所需之輸血次數，以預防貧血症狀，諸如疲乏，或其他症狀。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效

地降低GD1患者之貧血頻率或程度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間且涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0165】 在一些實施例中，用於治療GD1 (或其他GCase缺乏)之本發明方法有效地增加已治療之個別GD1患者之血液中的血紅蛋白(Hb)含量，或經治療之GD1患者群之平均血紅蛋白含量，例如自小於8公克/分升(g/dL)增加至更大數值，諸如8.0至9.9 g/dL，或10至12 g/dL，或成年男性之血液中的血紅蛋白濃度大於12 g/dL，或成年女性大於11.5 g/dL。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0166】 在一些實施例中，治療方法有效地增加已治療之個別GD1患者之血液中的Hb濃度，或經治療之GD1患者群體之平均Hb濃度，增加至健康人血液中之平均Hb濃度的至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或110%。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，視所用參考範圍而定，健康人血液中之Hb濃度的範圍就成年男性而言為約13.2至16.6公克/分升(g/dL)、或13.8至17.2 g/dL、或14.0至17.5 g/dL、或14至18 g/dL，就成

年女性而言為約11.6至15.0 g/dL、或12.1至15.1 g/dL、或12.3至15.3 dL、或12至16 g/dL，就1至6歲的兒童而言為9.5至14.0 g/dL且就6至18歲的兒童及青少年而言為10.0至15.5 g/dL。在一些實施例中，正常參考值為另一值，諸如對於男性為約13、14、15、16、17或18 g/dL，且對於女性為11、12、13、14、15或16 g/dL，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。

【0167】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者之血液中的Hb濃度(已治療之個別GD1患者之血液中的Hb濃度，或經治療之GD1患者群體的平均Hb濃度)，比基因療法之前的基線Hb濃度或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血液中之平均Hb濃度高至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或正接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者之血液中的基線Hb濃度不超過或小於或為約每dL血液170、160、150、140、130、120、110、110、90、80、70、60或50 g或更小，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0168】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者之血液中的Hb濃度(已治療之個別GD1患者之血液中的Hb濃度或經治療之GD1患者群體之平均Hb濃度)，比基因療法之前的基線Hb濃度或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血液中的平均Hb濃度高至少或約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0 g/dL或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或正接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者之血液中的基線Hb濃度不超過或小於或為約每dL血液170、160、150、140、130、120、110、110、90、80、70、60或50 g或更小，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述的基因療法之前接受照護標準ERT或SRT療法，且此類治療方法有效地使照護標準療法所引起的血液Hb濃度維持在一定容限內。在一些實施例中，容限小於或約30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%。

【0169】 在一些實施例中，治療方法有效地增加血容比，血容比為GD1患者之血液中的紅血細胞體積百分比(已治療之個別GD1患者之血液

中的紅血細胞體積百分比，或經治療之GD1患者群體之紅血細胞體積百分比平均值)，增加至健康人之平均血容比的至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，視所用參考範圍而定，健康人血容比的範圍就成年男性而言為約40%至54%或41%至50%，且就成年女性而言為約36%至44%或36%至48%。在一些實施例中，正常參考值為整數值，諸如35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%或55%。

【0170】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者之血容比(已治療之個別GD1患者之血容比，或經治療之GD1患者群體之血容比平均值)，比基因療法之前的基線Hb濃度或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均血容比高至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

血栓細胞減少症

【0171】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA殖株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低血小板減少症(血小板數低於正常數目，通常定義為每微升(μL)血液少於150,000個血小板)的發生率、頻率或嚴重度，及相關風險，包括淤血、長於正常凝血時間及過度出血。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地降低GD1患者之血小板減少症的頻率或程度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間或涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0172】 在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法可增加已治療之個別GD1患者之血小板計數或經治療之GD1患者群體之血小板計數平均值，例如自每微升血液小於60,000 (通常定義為中度至重度血小板減少症)增加至更大數目，諸如60,000/ μL 至100,000/ μL 、或60,000/ μL 至120,000/ μL 、或100,000/ μL 至150,000/ μL 、或120,000/ μL 至150,000/ μL ，或每微升血液大於150,000之血小板計數。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法可減少GD1患者為了預防過度出血(諸如在牙科程序或手術之前，或創傷之後)而原本必需之血小

板輸注數目。

【0173】 在一些實施例中，治療方法有效地增加已治療之個別GD1患者的血小板計數或經治療之GD1患者群體的平均血小板計數，增加至健康人平均血小板計數的至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多，在一些實施例中，健康人平均血小板計數可在每微升血液150,000至450,000範圍內。在一些實施例中，正常參考值為另一值，諸如每微升血液約150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000或450,000，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0174】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者的每微升血液血小板計數(已治療之個別GD1患者的每微升血液血小板計數，或經治療之GD1患者群體的每微升血液血小板計數平均值)，比基因療法之前的基線血小板計數或患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均血小板計數高至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者

或正接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者的基線血小板計數不超過或小於或為每微升血液約350,000、300,000、250,000、200,000、150,000、100,000、90,000、80,000、70,000、60,000、50,000、40,000或30,000，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0175】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者的血小板計數(已治療之個別GD1患者的血小板計數，或經治療之GD1患者群體的平均血小板計數)，比基因療法之前的基線血小板計數或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均血小板計數高至少或約5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、15,000、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、100,000、105,000、110,000、115,000、120,000、125,000、130,000、135,000、140,000、145,000、150,000、160,000、170,000、180,000、190,000、200,000、250,000、300,000個或更多血小板/微升血液，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或正接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者的基線血小板計數不超過或小於或為每微升血液約350,000、300,000、250,000、200,000、150,000、100,000、90,000、80,000、70,000、60,000、50,000、40,000

或30,000，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0176】 血小板計數減少的一種結果為血液凝結之前的出血時間延長，導致患有GD1或其他形式之GCase缺乏的患者出現過度出血，諸如黏膜皮膚出血，例如流鼻血、齒齦出血或月經過多，或手術後出血，分娩期間的出血及自發血腫。相應地，在一些實施例中，用於治療GD1或其他形式之GCase缺乏的本發明方法有效地縮短出血時間。可使用此項技術中已知之任何方法量測出血時間，諸如所謂的Ivy方法，其中正常出血時間小於8分鐘；或Duke方法，其中正常出血時間小於3分鐘。因此，在一些實施例中，治療方法有效地使出血時間自大於8分鐘縮減至小於8分鐘的時間，如使用Ivy方法所測定，或有效地使出血時間自大於3分鐘縮減至小於3分鐘的時間，如使用Duke方法所測定。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

白血球減少症

【0177】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低白血球減少症(白血細胞數低於正常數目，通常定義為每微升(μL)血液少於4,000個白血細胞)的發生率、頻率或嚴重度，及相關風險，包括更容易感染。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地降低GD1患者之白血球減少症的頻率或程

度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的範圍時間及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0178】 在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法增加已治療之個別GD1患者的白血細胞計數或經治療之GD1患者群體的平均白血細胞計數，例如自每微升血液小於1,900增加至更大數目，諸如1,900/ μ L至2,500/ μ L、或2,500/ μ L至4,000/ μ L，或每微升血液白血細胞計數大於4,000。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0179】 在一些實施例中，治療方法有效地增加已治療之個別GD1患者的每微升血液白血細胞計數或經治療之GD1患者群體之每微升血液白血細胞計數平均值，增加至健康人平均白血細胞計數的至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多；在一些實施例中，健康人平均白血細胞計數的範圍為4,000/ μ L至11,000/ μ L血液。在一些實施例中，正常參考值為另一值，諸如約4,000/ μ L、4,500/ μ L、5,000/ μ L、5,500/ μ L、6,000/ μ L、6,500/ μ L、7,000/ μ L、7,500/ μ L、8,000/ μ L、8,500/ μ L、9,000/ μ L、9,500/ μ L、10,000/ μ L、10,500/ μ L或11,000/ μ L血液，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。

在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0180】 在一些實施例中，治療方法有效地增加GD1患者的每微升血液白血細胞計數(已治療之個別GD1患者的每微升血液白血細胞計數，或經治療之GD1患者群體的每微升血液白血細胞計數平均值)，比基因療法之前的基線白血細胞計數或患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均白血細胞計數高至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

細胞GCase含量

【0181】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地增加患有GD1或其他形式之GCase缺乏之患者之周邊血液單核細胞(PBMC)、單核球、總白血球、培養之纖維母細胞或其他類型細胞中的GCase蛋白及/或酶活性之量。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地增加患有GD1或其他形式之

GCase缺乏之患者之周邊血液單核細胞(PBMC)、總白血球、培養之纖維母細胞或其他類型細胞中的GCase蛋白及/或酶活性之量，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。用於在治療之前或之後定量個體或充當對照之健康人之PBMC中之GCase蛋白或酶活性之量的方法在此項技術中已知。參見例如Ysselstein, D等人, Movement Disorders 36(12):2719-2730 (2021) (DOI:10.1002/mds.28815)。舉例而言，可使用螢光受質偵測及定量GCase活性，如例如DOE: 10.1021/ja5106738及DOI: 10.1021/ja5106738中進一步所述。

【0182】 在一些實施例中，治療方法有效地增加獲自GD1患者之PMBC、單核球或白血球中之GCase蛋白或酶活性的量(已治療之個別GD1患者的GCase蛋白或酶活性之量，或經治療之GD1患者群體之平均值)，增加至獲自健康人之PMBC、單核球或白血球中之GCase平均量的至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%或更多。在一些實施例中，健康人PMBC、單核球或白血球中之GCase平均量在約20至130皮克/百萬(pg/1E6)個PBMC範圍內，或平均值為約70 pg/1E6個細胞，或為另一值，諸如約30、40、50、60、80、90、100、110或120 pg/1E6個細胞，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。參見例如Berger, J等人, Intra-monocyte Pharmacokinetics of

Imiglucerase Supports a Possible Personalized Management of Gaucher Disease Type 1, Clin Pharmacokinet 58:469-482 (2019) (doi.org/10.1007/s40262-018-0708-8)。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0183】 在一些實施例中，治療方法有效地增加獲自GD1患者之PBMC、單核球或白血球中之GCase蛋白或酶活性之量(已治療之個別GD1患者的GCase蛋白或酶活性之量，或經治療之GD1患者群體的GCase蛋白或酶活性之量平均值)，比基因療法之前獲自此一或多個患者之PBMC、單核球或白血球中之基線GCase量或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之PBMC、單核球或白血球中之GCase平均量高至少或約25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、225%、250%、300%、400%、500%、700%、800%、900%、1000%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0184】 在一些實施例中，該等方法有效地增加獲自GD1患者之PBMC、單核球或白血球中之GCase蛋白之量(已治療之個別GD1患者的GCase蛋白之量，或經治療之GD1患者群體的GCase蛋白之量平均值)，比獲自基因療法之前之此一或多個患者之PBMC、單核球或白血球中之GCase的基線量或比患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之PBMC中之GCase的平均量高至少或約10、15、

20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、140、150 pg/1E6或更多，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

肝脾腫大

【0185】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低器官尺寸或體積增加、尤其是肝臟及脾臟之尺寸或體積增加的發生率、頻率或嚴重度。可使用諸如磁共振成像(MRI)、x射線電腦斷層攝影術(CT)或超音波之成像技術定量肝臟或脾臟體積。在一些實施例中，正常肝臟尺寸可定義為總身體質量的2.5%，且肝腫大可定義為肝臟體積或質量(由體積推測)大於1.25倍正常值(N)的任何增加。在一些實施例中，正常脾臟尺寸可定義為總身體質量的0.2%，且脾腫大可定義為脾臟體積或質量(由體積推測)大於1倍正常值(N)的任何增加。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地降低GD1患者肝臟或脾臟之腫大頻率或程度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間

的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0186】 在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法可減小已治療之個別GD1患者的肝臟體積或經治療之GD1患者群體的肝臟體積平均值，例如，自大於2.5倍(或多倍)正常值(>2.5 MN)的體積減小至1.25 MN至2.5 MN之間的體積，或減小至小於1.25 MN的體積(視為非肝腫大)。在一些實施例中，治療方法有效地減小已治療之個別GD1患者的肝臟體積或經治療之GD1患者群體的平均肝臟體積，減小至不超過、小於或約4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7 MN或更小體積之值，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0187】 在一些實施例中，相較於基因療法之前的肝臟體積，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均肝臟體積，治療方法有效地使GD1患者的肝臟體積(已治療之個別GD1患者的肝臟體積，或經治療之GD1患者群體的平均肝臟體積)減小至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、50%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療

法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者的肝臟尺寸在約0.8至6 MN、或1至5 MN、或1.5至5 MN範圍內，或為另一值，諸如1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0 MN，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在其他實施例中，用於治療GD1的本發明方法可減小肝臟病變(包括肝纖維化或門靜脈高血壓)之頻率或程度。

【0188】 在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法可減小已治療之個別GD1患者的脾臟體積或經治療之GD1患者群體的脾臟體積平均值，例如，自大於15倍(或多倍)正常值(>15 MN)的體積減小至10 MN至15 MN之間、或5 MN至9 MN之間的體積，或減小至小於5 MN的體積。在一些實施例中，治療方法有效地將已治療之個別GD1患者的脾臟體積或經治療之GD1患者群體的平均脾臟體積減小至不超過、小於或約50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18.5、18.0、17.5、17.0、16.5、16.0、15.5、15.0、14.5、14.0、13.5、13.0、12.5、12.0、11.5、11.0、10.5、10.0、9.5、9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、4.0、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1、3.0、2.9、2.8、2.7、2.6、2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7 MN或更小體積之值，或涵蓋上文具體枚舉之任一值

的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0189】 在一些實施例中，相較於基因療法之前的脾臟體積，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者的平均脾臟體積，治療方法有效地使GD1患者的脾臟體積(已治療之個別GD1患者的脾臟體積，或經治療之GD1患者群體的平均脾臟體積)減小至少或約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更多。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些非限制性實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或正接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者的脾臟尺寸在約0.8至60 MN、或1至50 MN、或5至50 MN範圍內，或為另一值，諸如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45或50 MN，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。在其他實施例中，相較於未接受治療的GD1患者，用於治療GD1的本發明方法可減小脾臟病變(脾臟病變可使用諸如MRI或超音波之成像術偵測)的頻率或程度，或減小經治療之GD1患者群體的脾切除術頻率。

骨骼臨床表現

【0190】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地降低疾病過程之骨骼臨床表現(包括骨骼危象、骨痛、高歇氏細胞浸潤骨髓、骨礦物質密度減小，以及發生溶解性病變、骨折及缺血性壞死)的發生率、頻率或嚴重度。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地減小GD1患者之疾病過程之骨骼臨床表現的頻率或程度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0191】 GD1的骨骼危象通常呈現為劇痛的突然發生，該劇痛與腫脹及紅斑、發熱及白血球增多有關，隨後，骨骼通常受到嚴重損傷，以致可能發生骨折，隨後變成繼發變性骨關節炎。在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法減小已治療之個別GD1患者在12個月時段內的骨骼危象頻率或經治療之GD1患者群體在12個月時段內的平均骨骼危象頻率，例如自2次或更多次骨骼危象事件減小至1或0次事件。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0192】 即使在骨骼危象不存在下，GD1患者通常經歷可為輕度至極度不同程度的骨痛。在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法減小

已治療之個別GD1患者在30天時段內經歷的最大疼痛程度或經治療之GD1患者之平均疼痛程度：自極度至重度、中度、輕度、極輕度或無疼痛，或自重度至中度、輕度、極輕度或無疼痛，或自中度至輕度、極輕度或無疼痛，或自輕度至極輕度或無疼痛，或自極輕度至無疼痛。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。可利用標準疼痛量表評估GD1患者在30天時段內所經歷的最大疼痛。

【0193】 高歇氏細胞浸潤的一種組織間隙為骨髓，其負荷可使用本技術領域標準方法(諸如磁共振成像或閃爍圖術)定量。在一些實施例中，用於治療GD1的本發明方法減小高歇氏細胞浸潤骨髓的頻率或程度，如使用一或多種標準評分系統在已治療之個別GD1患者中或在經治療之GD1患者群體中作為平均值所測定。因此，舉例而言，在一些實施例中，根據羅森塔爾量表(Rosenthal scale)，使用本發明之AAV載體治療GD1患者可使骨髓浸潤自超過7之評分(諸如8至11)減小至較低值，諸如4至7，或1至3，或0之值。在其他實施例中，根據杜塞爾多夫量表(Dusseldorf scale)，治療使骨髓浸潤自超過6之評分(諸如7或8)減小至較低值，諸如4至6，或1至3，或0之值。在其他實施例中，根據特爾科量表(Terk scale)，治療使骨髓浸潤自超過2a/b之評分(諸如3a/b)減小至較低值，諸如2a/b，或1a/b，或0之值。在其他實施例中，根據椎盤比率(vertebral disk ratio, VDR)量表，治療使骨髓浸潤自小於1.0之評分增加至較高值，諸如1.0至1.5，或1.5至2.0，或大於2.0之值。在其他實施例中，根據骨髓負荷(BMB)，治療使骨髓浸潤自超過12之評分(諸如13至16)減小至較低值，諸如8至12，或3至7，或0至2。在其他實施例中，根據定量化學位移指數(QCSI)脂肪

分率量表，治療使骨髓浸潤自小於0.20之評分增加至較高值，諸如0.20至0.25，或0.25至0.30，或大於0.30之值。在其他實施例中，根據西班牙MRI量表，治療使骨髓浸潤自超過17之評分(諸如18至24)減小至較低值，諸如11至17、或5至10、或0至4。在其他實施例中，根據^{99m}Tc-司他比鐸(sestamibi)量表，治療使骨髓浸潤自超過6之評分(諸如7至8)減小至較低值，諸如5至6、或3至4、或0至2。在其他實施例中，根據^{99m}Tc-放射性膠質量表，與標準閃爍照相圖案相比，治療使骨髓浸潤自重度減至中度、輕度或正常值，或自中度減至輕度或正常值，或自輕度減至正常值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。關於骨髓浸潤評分量表的更多資訊可見於例如Rosenthal DI等人, J Bone Joint Surg Am 68:802-8 (1986); Poll LW等人, Skeletal Radiol 9:496-503 (2001); Terk MR等人, Skeletal Radiol 29:563-71 (2000); Vlieger EJ等人, J Comput Assist Tomogr 26:843-8 (2002); Maas M等人, Radiology 229:554-61 (2003); Poll LW等人, Blood Cells Mol Dis 28:209-20 (2002)。

【0194】 減小的骨礦物質密度(BMD)為高歇氏病的另一種骨骼臨床表現，其可至少部分地藉由用本發明之AAV載體治療來逆轉，如使用諸如雙重能量X射線吸光測定法(DEXA)之技術所定量且用T或Z評分表示(反映BMD分別與年輕成人平均值或年齡及性別匹配對照者相比之標準差)。因此，舉例而言，在一些實施例中，治療GD1之本發明方法可使已治療之個別GD1患者的Z評分或經治療之GD1患者群體之平均Z評分自小於-1.5之值增加至大於-1.5之值，諸如-1.5至-1.0，或-1.0至0.0，或0.0至+1.0。或

者，在一些其他實施例中，治療GD1之本發明方法可使已治療之個別GD1患者的T評分或經治療之GD1患者群體之平均T評分自小於-2.5之值增加至大於-2.5之值，諸如-2.5至-1.0、或-1.0至0.0、或增加至大於0.0之值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0195】 在其他實施例中，本發明之AAV載體治療GD1患者有效地減小已治療之個別GD1患者之疾病過程之其他骨骼臨床表現的頻率或程度或經治療之GD1患者群體之疾病過程之其他骨骼臨床表現的平均頻率或程度，包括骨壞死、骨質溶解、缺血性壞死、髓質梗塞、因椎骨粉碎性骨折所致的永久變形、繼發性關節病、出現錐形瓶式變形、類鴉片及非類鴉片鎮痛劑的消費減少、需要關節置換及兒童生長遲緩(例如生長保持低於第5百分位數的時段)。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

組織及血漿生物標記物

【0196】 由高歇氏病或GCase缺乏引起的代謝紊亂可更廣泛地導致細胞及組織或血流中的某些蛋白質及醣脂顯著升高。此等產物中的一些被高歇氏細胞過度表現，且一些為GlcCer在溶酶體中由於缺乏GCase活性而不完全降解的副產物。在使用照護標準基因療法治療GD1患者之後，可觀測到此等產物及副產物的含量下降，且此可充當指示治療功效的生物標記物。相應地，在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA 殖株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病

(GD1))的方法有效地減小在患有GD1或GCase缺乏之個體中更廣泛升高的生物標記物含量。在一些實施例中，定量用本發明之AAV載體治療之後之個體中之生物標記物含量的變化指示治療功效程度。

代謝副產物，包括葡糖基神經鞘胺醇

【0197】 作為GCase缺乏之結果，如在GD1中，細胞GlcCer含量增加且可用作其他酶之受質，產生毒性副產物，其含量可在根據本文所揭示之方法治療後降低。舉例而言，糖基轉移酶對GlcCer的合成代謝增加可產生包括GM3的複合物神經節苷脂，其可在GD1患者之血漿及脾臟中偵測到。參見例如DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.001。酶 β -葡糖苷酶(GBA2)亦可作用於GlcCer以增加Cer (促細胞凋亡分子)的含量，以及葡萄糖自GlcCer向膽固醇的轉移，產生葡糖基- β -膽固醇(GlcChol)。參見例如DOI: 10.1194/jlr.M064923; DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006。另外，聚積於溶酶體中的GlcCer藉由溶酶體酸性神經醯胺酶轉化成其鞘胺醇鹼：葡糖基神經鞘胺醇(GlcSph；亦稱為lyso-GL1、lyso-GB1、葡糖神經鞘胺醇、鞘胺醯基 β -葡糖苷、葡糖神經鞘胺醇半乳糖苷)，據報導，此可導致未治療之症狀性GD1患者之血漿副產物含量平均增加200倍。參見例如DOI: 10.1002/1873-3468.12104; DOI: 10.1182/blood-2011-05-352971。用於定量個體在治療之前或之後之血漿、血清或組織樣品或定量充當對照之健康人之血漿、血清或組織樣品中之GM3、Cer、GlcChol及GlcSph含量的方法在此項技術中已知。用於偵測及定量GlcSph的方法(例如使用LC/MS-MS分析)描述於Rolf, A等人，PLOS One 8(11):e79732 (2013); Murugesan, V等人，Am. J. Hematol. 91:1082-1089 (2016) (DOI:10.1002/ajh.24491); Beasley, J等人，Clinica Chimica Acta

511:132-137 (2020) (doi.org/10.1016/j.cca.2020.10.007); Stiles, AR 等人, Mol Genetics Metabol Rep 27:100729 (2021) (doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100729)。在一些實施例中，葡糖基神經鞘胺醇濃度可用每毫升血漿、血清或均質化組織樣品中的奈克數單位 (ng/mL) 表示。

【0198】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括GD1)的方法有效地減少獲自患有GD1或其他形式之GCase缺乏之患者之血清、血漿或均質化組織樣品中之由GlcCer產生之副產物(包括GM3、Cer、GlcChol或葡糖基神經鞘胺醇)的含量。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地減少獲自經治療之患者之血清、血漿或均質化組織樣品中之GM3、Cer、GlcChol或葡糖基神經鞘胺醇的含量，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0199】 在一些實施例中，治療方法有效地減少獲自GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中之GM3、Cer或GlcChol含量(已治療之個別GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的GM3、Cer或GlcChol含量，或經治療之GD1患者群體的GM3、Cer或GlcChol平均含量)，相較於獲自此一或多個患者在基因療法之前之血清、血漿或均質化組織樣品中的

GM3、Cer或GlcChol平均含量，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的GM3、Cer或GlcChol平均含量，減少至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0200】 在一些實施例中，治療方法有效地減少獲自GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇含量(已治療之個別GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇量，或經治療之GD1患者群體的葡糖基神經鞘胺醇平均含量)，相較於此一或多個患者在基因療法之前獲得之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇平均含量，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇平均含量，減少至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中存在的葡糖基神經鞘胺醇含量在約3 ng/mL至1000 ng/mL、4 ng/mL至600 ng/mL、10 ng/mL至500

ng/mL、20 ng/mL至400 ng/mL、50 ng/mL至300 ng/mL、100 ng/mL至300 ng/mL、或140 ng/mL至220 ng/mL範圍內，或平均值為約180 ng/mL，或為另一值，諸如約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、320、325、340、350、360、375、380、400、425、440、450、460、475、480、500、525、540、550、560、575、580、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,500或2,000 ng/mL，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0201】 在一些實施例中，治療方法有效地減少獲自GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇含量(已治療之個別GD1患者之血清、血漿或均質化組織樣品中的葡糖基神經鞘胺醇含量，或經治療之GD1患者群體的葡糖基神經鞘胺醇平均含量)，每毫升血清、血漿或均質化組織樣品減少至不超過、至小於或至約1,500、1,000、900、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、240、230、225、220、215、210、205、200、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1.5或1 ng，或涵蓋前述具體舉例之任一值的範圍，或前述具體舉例之任一值之間的整數值。在一些

此等實施例中，GD1患者在以如本文所述之基因療法前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法前正接受照護標準ERT或SRT療法。

殼三糖苷酶

【0202】 GD1中，因高歇氏細胞過度表現且分泌於血液循環中的蛋白質之一係酵素殼三糖苷酶，其含量會升高，可作為高歇氏病的生物標記物。據報導，在未治療之症狀性GD1患者的血漿中，殼三糖苷酶活性平均升高1000倍。用於定量個體在治療前或後之血漿、血清或組織樣品或充當對照之健康人之血漿、血清或組織樣品中之殼三糖苷酶活性度的方法是此項技術中已知的，諸如量測藉由特定人工螢光受質(諸如4-甲基傘形酮基-殼三糖苷、4'-去氧-殼二糖-4-甲基傘形酮、4-甲基傘形酮基- β -D-三乙醯基殼三糖苷酶或此項技術中已知的其他受質)之酶裂解而產生的螢光量。關於此生物標記物的其他資訊，參見例如DOI: 10.1172/JCI117084; DOI: 10.1016/S0074-7696(06)52001-7; DOI: 10.1074/jbc.M301804200; DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006; DOI: 10.1007/s10545-014-9711-x。在一些實施例中，殼三糖苷酶活性可以每小時裂解的螢光受質的質量/體積表示，或用奈莫耳/毫升/小時(nmol/mL/小時)之單位表示。

【0203】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地減少獲自患有GD1或其他形式之GCase缺乏之患者之血清或血漿中殼三糖苷酶蛋白質和/或酶活性的量。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地減少獲自經治療之患者之血清或血漿中殼三糖苷酶蛋白質及/或酶活性的量，該時段為至多或至

少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0204】 在一些實施例中，用於治療GD1之本發明方法可減少已治療之個別GD1患者之血清或血漿中之殼三糖苷酶活性的量或經治療之GD1患者群體之平均量，例如自超過15,000 nmol/mL/hr減少至較低數目，諸如4,000至15,000 nmol/mL/hr，或600至4,000 nmol/mL/hr，或減少至小於600 nmol/mL/hr之值。在一些此等實施例中，GD1患者在以如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0205】 在一些實施例中，治療方法有效地減少獲自GD1患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之量(已治療之個別GD1患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之量，或經治療之GD1患者群體的殼三糖苷酶活性之平均量)，相較於此一或多個患者在基因療法之前獲得之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之平均量，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之平均量，減少至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或接受照護標準ERT或SRT療法

之GD1患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之量在約200至100,000 nmol /mL/hr、400至80,000 nmol /mL/hr、1,000至50,000 nmol /mL/hr、2,000至40,000 nmol /mL/hr、4,000至20,000 nmol /mL/hr或5,000至15,000 nmol /mL/hr範圍內，或為另一值，諸如約300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000或80,000 nmol/mL/hr，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0206】 在一些實施例中，治療方法有效地使獲自GD1患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之量(已治療之個別GD1患者之血清或血漿中的殼三糖苷酶活性之量，或經治療之GD1患者群體之平均量)減少至不超過、小於或約25,000、20,000、19,000、18,000、17,000、16,000、15,000、14,000、13,000、12,000、11,000、10,000、9,000、8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000、1,000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 nmol/mL/hr或更小，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

CCL18-PARC

【0207】 高歇氏細胞產生且分泌的另一種生物標記物蛋白質為趨化因子CCL18/PARC (趨化因子(C-C模體)配位體18；肺部活化調控的趨化因子)，其在未治療之症狀性GD1患者之血漿中可升高20倍至50倍。用於定量治療之前或之後之個體或充當對照之健康人之血漿、血清或組織樣品中之CCL18/PARC含量的方法在此項技術中已知，諸如藉由使用針對該蛋白質之特異性抗體進行ELISA。關於此生物標記物的其他資訊，參見例如DOI: 10.1016/j.bbailip.2013.11.004；DOI: 10.1182/blood-2003-05-1612。

【0208】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GCase缺乏(包括1型高歇氏病(GD1))的方法有效地減少獲自患有GD1或其他形式之GCase缺乏之患者之血清或血漿中之CCL18的量。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地減少獲自經治療之患者之血清或血漿中的CCL18之量，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0209】 在一些實施例中，用於治療GD1之本發明方法可減少已治療之個別GD1患者之血清或血漿中之CCL18的量或經治療之GD1患者群體之平均量，例如自超過1,000 ng/mL減少至較低數目，諸如237至1,000 ng/mL，或72至237 ng/mL，或減少至小於每毫升血清或血漿72 ng之值。

在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0210】 在一些實施例中，治療方法有效地減少獲自GD1患者之血清或血漿中之CCL18的量(已治療之個別GD1患者之血清或血漿中之CCL18的量，或經治療之GD1患者群體的平均量)，相較於獲自基因療法之前之此一或多個患者之血清或血漿中之CCL18的平均量，或相較於患有GD1或其他形式之GCase缺乏之類似(例如年齡及性別匹配)對照患者之血清或血漿中的CCL18之平均量，減少至少或約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些實施例中，後述的對照組未接受照護標準療法或正接受照護標準ERT或SRT療法。在一些實施例中，未接受照護標準療法之GD1患者或接受照護標準ERT或SRT療法之GD1患者之血清或血漿中的CCL18之量在約40至1,500 ng/mL、100至1,200 ng/mL、200至1,000 ng/mL、或400至800 ng/mL範圍內，或為另一值，諸如約40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、320、325、340、350、360、375、380、400、425、440、450、460、475、480、500、525、540、550、560、575、580、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400或1,500 ng/mL，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之

基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

【0211】 在一些實施例中，治療方法有效地使獲自GD1患者之血清或血漿中的CCL18之量(已治療之個別GD1患者之血清或血漿中的CCL18之量，或經治療之GD1患者群體之平均量)減少至不超過、小於或至每毫升血清或血漿約1,500、1,400、1,300、1,200、1,100、1,000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、325、300、275、250、240、230、225、220、215、210、205、200、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5 ng或更小，或涵蓋上文具體枚舉之任一值的範圍，或上文具體枚舉之任一值之間的整數值。在一些此等實施例中，GD1患者在如本文所述之基因療法之前未接受照護標準療法，而在其他實施例中，GD1患者在基因療法之前正接受照護標準ERT或SRT療法。

高歇氏病嚴重度評分

【0212】 在一些實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療1型高歇氏病(GD1)的方法有效地減小已治療之個別GD1患者的高歇氏病嚴重度或經治療之GD1患者群體的高歇氏病平均嚴重度，如使用高歇氏病嚴重度評分指數所量測，其中若干者在此項技術中已知。舉例而言，在一些實施例中，本文所揭示之治療高歇氏病的方法有效地減小高歇氏病嚴重度，如利用Zimran嚴重度評分指數(SSI)所測定(如DOI: 10.1016/s0140-6736(89)90536-9及Zimran A

等人，Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine* 71:337-353 (1992)中所述)；如利用Di Rocco等人之針對I型患者之高歇氏病嚴重度評分指數(GauSS-I)所測定(如 DOI: 10.3324/haematol.12379中所述)；或如利用Weinreb等人之I型高歇氏病嚴重度評分系統(GD-DS3)(如 Weinreb, NJ 等人，*Genetics Med* 12(1):44-51 (2010)中所述)，可使用其他嚴重度評分指數。在一些實施例中，在本發明之AAV載體投與之後的時段內，治療有效地減小GD1患者之高歇氏病嚴重度，該時段為至多或至少或約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170或180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18個月，或1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5或6.0年，或前述舉例之任一時段之間的時間範圍，及涵蓋前述舉例之任一時段的時間範圍。

【0213】 在一些實施例中，本文所揭示之治療高歇氏病的方法有效地使高歇氏病嚴重度自重度減至中度或輕度或自中度減至輕度，如利用Zimran評分指數或利用相同指數所測定，將嚴重度評分自26至51分範圍內之整數值減至較低值，諸如25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0，或自11至25分範圍內的整數值減至較低值，諸如10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0分。在一些實施例中，本文所揭示之治療高歇氏病的方法有效地減小高歇氏病嚴重度，如利用Di Rocco GauSS-I評分指數所測定，自1至42分範圍內之整數值減至較低值，諸如41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、

19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0分。在一些實施例中，本文所揭示之治療高歇氏病的方法有效地使高歇氏病嚴重度自重度減至顯著、中度、輕度或邊緣，或自顯著減至中度、輕度或邊緣，或自中度減至輕度或邊緣，或自輕度減至邊緣，如利用 Weinreb GD-DS3 評分指數或利用相同指數所測定，將嚴重度評分自10至19分範圍內的整數值減至較低值，諸如9、8、7、6、5、4、3、2、1或0，或自6至9分範圍內的整數值減至較低值，諸如8、7、6、5、4、3、2、1或0，或自3至6分範圍內的整數值減至較低值，諸如5、4、3、2、1或0，或自3分之值減至2、1或0，或自2分之值減至1或0，或自1分之值減至0。

其他有益治療作用

【0214】 在其他實施例中，以本發明之AAV載體(包括不限於本文中描述為AAV3B-GBA植株128的載體)治療GD1患者有效地減小已治療之個別GD1患者之高歇氏病病程之其他臨床表現(包括內分泌及代謝障礙、神經症狀及其他症狀)的頻率或程度或經治療之GD1患者群體的平均頻率或程度。因此，在一些實施例中，本文所揭示之GD1治療方法有效地減少以下的發生率：低食慾、體重不足、基礎肝葡萄糖升高、2型糖尿病、高密度脂蛋白膽固醇含量低、周邊神經病變、出現帕金森氏病的風險升高、多發性骨髓瘤及非骨髓瘤的風險升高、高歇氏細胞對肺的浸潤及相關肺纖維化、脊椎變形繼發性限制性肺病、肺動脈高血壓、呼吸衰竭、高歇氏細胞對腎臟腎小球的浸潤及相關蛋白尿症及血尿、皮膚受累所致的黃棕色色素過多、眼臨床表現，及心肌或心臟瓣膜受累。

預防方法

【0215】 在其他實施例中，本發明提供藉由將預防有效量之本發明 AAV 載體(包括不限於本文中描述為 AAV3B-GBA 殖株 128 的載體)或含有此類 AAV 載體之醫藥組成物投與需要預防高歇氏病(或 GCase 缺乏)之個體(諸如人類個體)來治療高歇氏病(包括 1 型高歇氏病(GD1)或其他類型的 GCase 缺乏)的方法。亦提供本發明之 AAV 載體用於製造供本文所揭示之預防方法使用之藥劑的用途。另外，提供本發明之 AAV 載體或含有此類 AAV 載體之醫藥組成物，其用於本文所揭示之預防方法中。

【0216】 在一些實施例中，將預防有效量的本發明 AAV 載體(包括不限於本文中描述為 AAV3B-GBA 殖株 128 的載體)或含有此類 AAV 載體的醫藥組成物投與個體有效地預防高歇氏病在個體中起始或發作；有效地預防 GCase 缺乏之任何有害作用在個體中起始或發作；有效地預防 GCase 活性量之減少在個體中起始或發作；有效地預防與高歇氏病或 GCase 缺乏相關之至少一種症狀或徵象在個體中起始或發作；有效地預防由高歇氏病或 GCase 缺乏引起之身體、器官、組織或細胞之至少一種病症或功能障礙在個體中起始或發作；有效地預防由高歇氏病或 GCase 缺乏引起之生活品質之任何降低在個體中起始或發作，各種情況在缺乏預防時原本會發生。

【0217】 在本文所述之預防方法的一些實施例中，個體為 GBA 基因中存在同型接合或異型接合有害突變的人類個體，該有害突變的存在係在高歇氏病之任何可偵測症狀或徵象或與 GCase 缺乏相關之其他症狀或徵象發作之前藉由基因分型測定。基因分型方法(諸如 RFLP 分析或基因或基因體定序)已為一般熟習此項技術者所熟悉。

AAV 載體組成物、調配物、投與方法、劑量

【0218】 除 AAV 載體之外，本發明提供包含此類載體及至少一種醫

藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑的組成物。此類載體尤其可用於本文中亦描述之預防及治療GD1之方法中。

【0219】 包含本發明之AAV載體的組成物可以水溶液或懸浮液、乳液形式提供且以其他形式(諸如凍乾餅)提供。載體組成物可使用可為達成所需特性(諸如pH、離子強度、張力、穩定性、儲存期限、對凍融循環的抗性、及冷凍乾燥能力)所必需之任何適合稀釋劑及賦形劑且考慮投藥模式來調配。例示性稀釋劑及載劑包括但不限於無菌注射用水、乙醇及甘油。例示性賦形劑包括但不限於鹽、緩衝劑、酸、鹼、界面活性劑、醣、糖醇及此項技術中已知的多種其他賦形劑。用於預防或治療個體之疾病或病症(諸如GD1)的包含本發明AAV載體之組成物可以任何適合形式封裝，諸如小瓶或預填充注射器。在一些實施例中，套組具備複數個小瓶，基於相關變數，諸如此類個體之疾病嚴重度、體重、性別或其他，該等小瓶含有達成所需總劑量的足夠總量之載體。

【0220】 包含本發明之AAV載體的組成物可藉由任何適合投與途徑投與，其非限制性實例包括全身投與、直接投與組織或器官、靜脈內投與、動脈內投與、淋巴內投與、腹膜內投與、肌肉內投與、腦實質內投與、鞘內投與、腦室內投與或枕大池內投與，其他投與途徑亦可。在一些實施例中，例如在需要AAV載體優先靶向肝臟的情況下，包含此類載體的組成物可投與門靜脈內。

【0221】 包含本發明之AAV載體的組成物可單獨投與而不使用任何其他類別的療法，或可與照護標準療法或一些其他藥劑、化合物、藥物、療法或治療方案同時、同期投與，或在任何適合的給藥時間間隔投與。在一些實施例中，可在用免疫抑制劑(諸如類固醇或他克莫司(tacrolimus)或

其他免疫抑制藥物)預防之後，投與包含本發明之AAV載體的組成物，或免疫抑制藥物可在其後投與以控制針對基因療法的任何體液及/或細胞免疫反應。

【0222】 載體組成物可含有任何適合量的AAV載體，該量經計算可將預防或治療有效量的此類載體以容易處置或投與個體且/或預期不會引起個體產生任何不適或不良副作用的體積遞送至個體。

【0223】 結合本發明所提供之預防及治療方法，AAV載體及包含此類載體之組成物可以經預測或測定可有效達成所需預防或治療程度的任何適合劑量投與。在一些實施例中，用於預防或治療1型高歇氏病之本發明AAV載體的劑量可用每公斤個體體重之載體基因體(vg)(縮寫「vg/kg」)定量且表示。在一些實施例中，本發明之AAV載體(包括例如包含AAV3B衣殼及基因體的AAV載體，該基因體包含SEQ ID NO: 17之核苷酸序列)的例示性有效劑量包括而不限於至少或約 1×10^9 vg/kg、 1×10^{10} vg/kg、 1×10^{11} vg/kg、 1×10^{12} vg/kg、 1×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg 或 1×10^{15} vg/kg，或上文具體枚舉之任一劑量之間的劑量範圍，且包括上文具體枚舉之任一劑量的劑量範圍，其他劑量亦可。

* * *

【0224】 本發明之其他目標、特點及優點自以下詳細說明將變得顯而易見。然而，應瞭解，詳細說明及隨後的特定實例儘管說明本發明之特定實施例，但僅為了說明而提供，因為一般熟習此項技術者自詳細說明及實例將顯而易知本發明精神及範疇內的多種變化、潤飾及等效物，且該等變化、潤飾及等效物落入隨附申請專利範圍的範疇內。

【0225】 除非另外指明，否則提及一組實施例之一或多個成員時使

用術語「或」相當於意謂「及/或」且不要求其彼此相互排斥。除非另外指明，否則複數個明確敘述的數值範圍亦描述一種範圍，其下限來源於明確敘述範圍中之任一者的下限或上限且其上限來源於明確敘述範圍中之任何其他者的下限或上限。因此，舉例而言，一系列明確敘述的範圍「10-20、20-30、30-40、40-50、100-150、200-250、275-300」尤其亦描述範圍10-50、50-100、100-200及150-250。除非另外指明，否則在一系列數值或範圍之前使用術語「約」不僅希望修飾緊隨其後的該值或範圍，而且希望修飾該系列中後續出現的每一個值或範圍。因此，舉例而言，片語「約1、2或3」等效於「約1、約2或約3」。

【0226】 本文中列舉的所有出版物及參考文獻，包括但不限於論文、文摘、專利、專利申請案(不論公開或未公開)及生物學序列(包括但不限於藉由特定資料庫參考編號標識的生物學序列)，以全文引用之方式併入本文中用於所有目的，其引用的程度如同各個別出版物或參考文獻經具體地且個別地指示以引用的方式併入一般。本申請案直接地或間接地主張優先權的任何專利申請案亦以全文引用的方式併入本文中。

【0227】 除非另外指明，否則下文實例描述實驗，該等實驗使用一般熟習此項技術者熟知且常規使用的標準技術執行。實例具有說明性，而非限制本發明。

* * *

實例

【0228】 以下實例以及圖式係為了展現本發明之較佳實施例而納入。熟習此項技術者應瞭解，實例或圖式中所揭示之技術代表本發明人所發現之在本發明實施中起良好作用之技術，且因此可視為構成其較佳實施

方式。然而，熟習此項技術者根據本發明應瞭解，在不背離本發明之精神及範疇的情況下可對所揭示之特定實施例作出許多變更且仍獲得相同或類似結果。

實例1

設計及產生表現GCase的AAV載體

【0229】 利用標準技術設計且產生包含轉殖基因之AAV載體以用於表現人類β-葡萄糖腦苷脂酶(GCase)。由載體表現之蛋白質為全長野生型人類GCase，但其中原生分泌信號肽序列經免疫球蛋白分泌信號肽序列置換。一種載體基因體(殖株118)包括編碼hGCase蛋白質的原生人類核苷酸序列(除信號肽之外)，而另一種載體基因體(殖株128)中的轉殖基因編碼相同蛋白質，但經修飾以減少CpG模體數目(殖株128中之66個CpG模體相較於殖株118中之96個CpG模體)。兩種基因體以5'至3'次序均包含來自AAV2的5' ITR、來自α1-微球蛋白/尿抑胰酶素前驅體之增強子區域的兩個複本(A1MB enh)、來自人類白蛋白(hALB)基因之近端增強子區域的一個複本、來自hALB基因之核心啟動子區域的一個複本(hALB pro)、人類β血球蛋白基因內含子的一個複本(其不中斷編碼序列)、與GCase酶之編碼序列同框的IgVH信號肽編碼序列(IgVH信號肽置換原生信號肽)、終止密碼子、牛生長激素(bGH)基因聚腺苷酸化(polyA)信號序列(亦即，終止子)、經修飾之TBP內含子2序列，及來自AAV2的3' ITR。

【0230】 就殖株128之載體基因體(以SEQ ID NO: 17報告的完整序列(包括兩個ITR))而言，各基因體組件的正常起始及終止核苷酸數目闡述於下表1中。

表1

基因體組件	SEQ ID NO: 17中的 初始核苷酸	SEQ ID NO: 17中的 終止核苷酸
5' ITR	1	145
A1MB增強子	320	464
hALB近端增強子	479	792
hALB核心啟動子	793	1,002
hβ血球蛋白內含子	1,010	1,859
IgVH信號肽	1,896	1,952
hGCase編碼序列	1,953	3,446
bGH polyA	3,454	3,681
3' ITR	4,057	4,202

【0231】 與本文所述之載體有關的其他多肽及核苷酸序列闡述於下文**序列表**中。

【0232】 為了產生載體顆粒，利用經典的三重轉染方法轉染懸浮培養的HEK 293細胞。在250 L規模下，以搖瓶開始，經由波浪式反應袋至一次性生物反應器(SUB)，自工作細胞庫等分試樣擴增HEK 293細胞多代。藉由添加轉染混合物來轉染細胞，該轉染混合物含有PEI及三種不同質體：用於表現AdV輔助因子的pHelper；用於表現AAV3B衣殼蛋白及AAV3B Rep蛋白的pRepCap；以及轉殖基因質體。轉染3小時之後，藉由添加CDM4培養基來淬滅轉染，隨後為72小時培育期以允許細胞產生AAV載體。如下收集載體：用Triton X-100溶解細胞，添加溴化度米芬(domiphen bromide)以使宿主細胞DNA絮凝，過濾上清液且接著利用三個階段純化載體，包括親和層析、陰離子交換層析及切向流過濾。收集及純化之後，藉由定量式PCR滴定載體，且接著活體外及活體內測試載體的效力及毒性。

實例2

AAV GCaase載體的活體外測試

【0233】 在使用螢光受質的分析中，藉由轉導Huh7細胞(人類肝腫瘤細胞株)及量測GCaase酶活性來活體外測試含有殖株128基因體之兩種載體的效力，一種載體使用AAV3B衣殼(AAV3B-GBA殖株128)且另一種載體使用AAVDJ衣殼(AAVDJ-GBA殖株128)。測試使用AAVDJ衣殼的載體，原因在於已知AAV3B衣殼轉導小鼠肝臟組織的效率低，潛在地混淆下述活體內實驗的結果。在Huh7細胞中，兩種載體均顯示Huh7細胞中的GCaase酶活性出現劑量依賴性增加(圖1)。

實例3

在小鼠1型高歇氏病模型中測試AAV GCaase載體

【0234】 在D409V轉殖基因小鼠動物1型高歇氏病模型中測試藉由AAV3B與AAVDJ衣殼遞送之殖株128載體基因體的功效。D409V嵌入型小鼠表現與人類GCaase中所發現之D409V突變對應的突變型小鼠GBA基因。類似於1型GD患者中發現的殘餘GCaase含量，D409V小鼠中的GCaase活性為野生型(WT)動物的約10%。可在血清及多種器官(包括肝臟及脾臟)中偵測到鞘脂聚積。D409V小鼠模型進一步描述於例如Xu, Y-H等人, Viable Mouse Models of Acid β -Glucosidase Deficiency, Am J Pathol. 2003年11月; 163(5): 2093-2101 (DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63566-3); Sun, Y等人, Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid beta-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants, J Lipid Res. 2005年10月;46(10):2102-13 (DOI: 10.1194/jlr.M500202-JLR200)。

【0235】 其中AAV3B及AAVDJ衣殼對殖株128載體基因體達成衣殼化的載體在本文中可分別稱為「AAV3B-GBA」及「AAVDJ-GBA」。可替代性地使用指數記法或E記法表示載體劑量。因此，舉例而言，「 3×10^{12} vg/kg」的劑量與「 $3E12$ vg/kg」具有相同的含義。

材料及方法

載體投與及樣品收集

【0236】 藉由靜脈內注射、經由眶後途徑將AAV3B-GBA殖株128載體($1E13$ vg/kg)及AAVDJ-GBA殖株128 ($1E12$ vg/kg及 $1E13$ vg/kg)以單次劑量投與5月齡雄性D409V同型接合嵌入型轉殖基因小鼠(Jackson Lab #019106)。將生理鹽水投與相同類型的4隻測試動物作為陰性對照。各種載體劑量使用五個測試動物。二十八天後，將測試動物安樂死且收集且分析血清及組織樣品。將組織樣品速凍且在 -80°C 下儲存直至使用。對於IHC而言，使組織在10%中性緩衝福馬林中固定且加工成石蠟切片。

DNA分離

【0237】 使用冷凍的組織樣品，利用苯酚/氯仿DNA提取方法進行DNA分離。使用Covaris CP02 Cyroprep磨粉機，根據製造商說明書，將冷凍的組織樣品粉碎成冷凍的乾燥粉末。將約30 mg各冷凍組織粉末轉移至新管中且再懸浮於292.5 mL含有1% SDS的TENS溶解緩衝液中。接著，將7.5 mL蛋白酶K添加至各管中且在以1000 rpm搖動的熱混合器中、在 56°C 下培育3小時，且每30分鐘渦旋15秒。接著將樣品冷卻至室溫且用核糖核酸酶A處理5分鐘。各樣品用300 mL苯酚:氯仿:異戊醇(25:24:1)處理且渦旋20秒。收集上層相的液體以便藉由添加約0.5倍上層相體積的7.5 M NH_4OAc 及添加3倍總體積的純乙醇來進行DNA沈澱。在 -20°C 下冷卻

樣品至少2小時，隨後在4℃下以16,000 g離心30分鐘。DNA集結粒用冰冷的70%乙醇洗滌且再懸浮於不含核酸酶的水中。使用Nanodrop分光光度計量測DNA濃度。

RNA分離

【0238】如上述章節中所述製備冷凍的組織粉末。使用頻率設定為25 1/s的Tissuelyzer II，使用約30 mg組織樣品，在5 mm不鏽鋼珠存在下，在1 mL Trizol中均質化5分鐘。將溶胞物轉移至相分離管(phasemaker tube)中且添加200 mL氯仿。將樣品渦旋15秒，在室溫下培育5分鐘且在4℃下以14,000 g離心5分鐘。將透明上清液轉移至新管中且使用Purelink RNA小型套組、根據製造商說明書加以處理。在管柱上執行去氧核糖核酸酶處理20分鐘，隨後用不含核酸酶的水溶離。使用Nanodrop分光光度計來量測RNA濃度。

載體基因體複本數

【0239】藉由使用以下引子及探針序列擴增所有樣品中的GBA轉殖基因，使用ddPCR執行VGC定量。在ddPCR分析中，黏接溫度為60℃，探針引子序列為TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC (SEQ ID NO:43)，正向引子序列為AATGCGATGCAATTCCTCATT (SEQ ID NO: 44)，反向引子序列為TGCCAGCCATCTGTTGTT (SEQ ID NO:45)，探針螢光團為FAM，且淬滅體為NFQ。將DNA稀釋至10 ng/mL。在用DNAZap清潔的Airclean 600 PCR工作站中製備20 µl含有ddPCR超混合液、分離gDNA、GBA引子及FAM探針(參見上文)、管家基因(ms)Tfrnc引子及VIC探針的PCR反應混合物且添加至ddPCR 96孔盤中。使用QX200液滴產生器產生液滴。培養盤用PX1 PCR培養盤封口機密封。完成PCR程式：95

℃維持10分鐘→ [94℃維持30秒→ 60℃維持1分鐘] (x40個循環) → 98℃維持10分鐘→ 4℃維持。藉由QX200讀取器獲取微滴計數及振幅且使用QuantaSoft軟體分析以計算DNA複本數目。將獲自FAM通道的VGC相對於gDNA輸入的μg標準化或以VGC/單倍體基因體報告，VGC/單倍體基因體係藉由計算FAM對VIC通道的比率而獲得。

GBA轉殖基因表現

【0240】 使用iScript cDNA合成套組(Bio-Rad，目錄號1708891)，根據製造商方案，對經分離的RNA樣品進行逆轉錄以產生cDNA文庫。20 μL反應使用500 ng總RNA。在37℃下執行逆轉錄60分鐘，隨後在95℃下執行逆轉錄5分鐘。在-20℃下儲存cDNA樣品直至RT-PCR分析。使用與上文所述相同的GBA引子及探針以及管家基因MmHprt引子探針，使用ddPCR測定GBA轉殖基因之RNA表現定量。在用DNAZap清潔的Airclean 600 PCR工作站中製備含有ddPCR超混合液(無dUTP)及上述引子探針的PCR反應混合物且添加至ddPCR 96孔盤中。如上文所述執行微滴產生、PCR程式及資料擷取。將VGC相對於gDNA的μg或MmHprt計數標準化。

藉由LC-MS/MS測定的GCase蛋白表現

【0241】 利用特異性結合GCase的抗體自血清、PBMC以及肝臟及脾臟組織溶解物之樣品中富集經載體治療之測試動物所產生的人類重組GCase蛋白，且接著藉由液相層析串聯質譜分析(LC-MS/MS)加以定量。如下製備脾臟及肝臟切片：添加一定體積之M-PER + 蛋白酶抑制劑來製備100 mg組織/mL緩衝液，使用Next Advance bullet blender處理樣品7分鐘。分析不同體積的樣品：20 μL血清及200 μL組織溶解物，相對於含有1% BSA、外加有他利昔酶蛋白質之PBS的標準曲線替代基質。組織樣品

的分析線性範圍為0.25至1,000 ng/mL且血清樣品的分析線性範圍為0.5至1,000 ng/mL。使用2 µg抗GCase抗體 + 生物素及鏈黴抗生物素蛋白磁性珠粒執行雙重IP。在Thermo KingFisher Flex上處理樣品且用30 mM HCl + 5% MeCl₂溶離。使用1 M Tris-HCl將樣品調節至pH 8.3，還原，烷基化且使用Promega LysC-胰蛋白酶消化隔夜。使用OptiFlow系統，使用捕集及溶離奈米流LC條件，在Thermo Altis MS或Sciex 6500E上注射85 µL體積的樣品。使用Sciex 6500 (SciexE)，使用具有HotFix 1擷取軟體的Analyst 1.7.1或使用Xcalibur 4.2.47擷取軟體的Thermo Altis (Altis2)，擷取LC-MS/MS分析資料。具體而言，在Sciex 6500E上操作血清樣品，使用Sciex MultiQuant 3.0.3軟體完成資料處理。在Altis2上操作組織樣品，使用Skyline v.21.1.0.146完成樣品資料處理。由分析物肽相對於SIL肽的峰面積比產生校準曲線且利用兩種套裝軟體、根據標準曲線反推計算峰面積比來測定研究樣品的濃度。組織溶解物的LC-MS/MS資料相對於總蛋白質重量標準化。

藉由ICH測定的GCase蛋白表現

【0242】 使用全自動化染色機(Leica Biosystems Bond Rx)，用抗GCase抗體將石蠟切片染色。簡言之，將載片脫蠟且用過氧化物處理10分鐘。接著，載片用去離子水沖洗且用0.3% Triton溶液滲透1小時，隨後與一級抗GCase抗體(Sigma-Aldrich)一起培育1小時。一級抗體在Bond一級抗體稀釋劑中以1:250稀釋度稀釋。接著，沖洗載片且在二級抗體(Leica #DS9800)中培育8分鐘。藉由與DAB (Leica #DS9800)一起培育10分鐘來使抗體的存在可視化。最後，用水沖洗載片且在梯度乙醇至二甲苯中脫水，隨後封片且在載片掃描儀(Axio Scan Z1, Zeiss)上成像。使用ZEN

Blue軟體呈現影像。

***GCase* 活性分析**

【0243】 如上文所述製備冷凍的組織粉末。使用頻率設定為25 1/s的Tissuelyzer II，使用約20 mg組織樣品，在不鏽鋼珠存在下，在溶解緩衝液(含有0.25% (w/w)牛膽酸鈉、0.25% Triton X-100及蛋白酶抑制劑的檸檬酸鹽磷酸鹽緩衝液pH5.4)中產生溶解物歷時約8分鐘。藉由BCA蛋白質分析套組量測組織溶解物中的蛋白質濃度。在96孔黑色非結合盤中，在37℃下將25 µg組織溶解物、10 µL血清或他利昔酶標準物與3 mM合成GCase受質(4-甲基傘形酮基β-D-葡萄糖哌喃糖苷)在0.2 M乙酸鈉溶液(pH 4)中混合30分鐘。藉由添加0.7倍體積的1 M甘胺酸pH10來減弱反應。使用Envision讀盤器獲取螢光信號(激發/發射波長：355/450 nm)。藉由減除背景信號且接著與他利昔酶標準曲線擬合來計算數值。

***GluSph* 分析**

【0244】 藉由LC-MS/MS分析測試動物之血清及組織樣品中的D-葡萄糖基-β1-1'-D-赤-神經鞘胺醇(GluSph)濃度。使用97.5份移動相A (100:0.5 乙腈:甲酸)、2.5份移動相B (50 mM甲酸銨/60:40:0.5 甲醇:去離子水:甲酸)(MPAB)之混合物使樣品中的蛋白質沈澱，提取GluSph，乾燥且復原。選擇MPAB作為標準的替代基質。替代基質與實際基質(血清、肝臟及脾臟勻漿)均運作品質對照。為了組織均質化，將組織稱重，以4:1 µL/mg比率添加均質化緩衝液(MPAB)，均質化，將上清液轉移至新管中，且依標準曲線運作(0.005 ng/mL-81.92 ng/mL)。為了製備樣品，將20 µL標準品等分試樣、品質對照物、空白基質及樣品分配至96孔圓底培養盤中，添加20 µL基質或替代基質，添加120 µL存在MPAB中的工作內標(ISTD)溶

液，隨後進行渦旋、離心，且將樣品混合物轉移至新盤的孔中。藉由在45°C下培育蒸發來移除液體，用100 µL MPAB將殘餘物復原，隨後渦旋且噴射至具有Turbo離子噴霧介面的MDS-SCIEX/Applied Biosystems 5500 QTrap。以0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56、5.12、10.24、20.48、40.96及81.92 ng/mL濃度，使用MPAB製備替代標準品，重複三次。以0.5、1.25、5及25 ng/mL濃度，使用MPAB製備替代基質品質對照物，重複三次。接著將替代基質及小鼠組織基質外加至所製備的品質對照物中。使用MPAB作為替代的基質品質對照物，同時使用血清及均質化組織作為基質品質對照物。品質對照物符合±20%的接受準則且重複實驗在標稱濃度的±20%內合格。為了確保各分析的穩定性，在分析之前，在品質對照物之後及在分析結束時再次運作標準曲線。藉由使用Sciex OS軟體曲線擬合、以 $1/x^2$ 權重設置二次式來執行校準曲線回歸。GluSph-d5用作內標。

結果

載體基因體複本數

【0245】 用AAVDJ-GBA載體轉導肝臟及脾臟，如藉由定量獲自測試動物之組織樣品中的載體基因體複本數所測定，其中肝臟出現劑量反應傾向(圖2)。AAV3B-GBA載體亦轉導肝臟，但效率低於AAVDJ-GBA (圖2)。將載體基因體複本數相對於小鼠管家基因Tfrc之複本數標準化表明，AAVDJ-GBA轉導肝臟的效率為AAV3B衣殼所遞送之相同劑量($1E13$ vg/kg)之轉殖基因的27倍，證實AAVDJ衣殼轉導小鼠肝臟的效率大於AAV3B (圖3)。當將載體基因體複本數相對於輸入gDNA之量標準化時，兩種載體對脾臟的轉導均顯而易見，但將載體基因體複本數相對於管家基

因(充當宿主細胞單倍體基因體之代表)之複本數標準化時，轉導顯而易見是最小的(圖3)。個別測試動物的轉導資料提供於下文表2中。

GBA 轉殖基因表現

【0246】 相對於宿主細胞管家基因Hprt之表現標準化的GBA轉殖基因mRNA表現符合載體轉導模式。AAVDJ-GBA載體所投與之測試動物之肝臟中的轉殖基因表現實質上大於由相同劑量之AAV3B-GBA載體產生的轉殖基因表現(圖4)。任一載體均未偵測到脾臟中的轉殖基因表現(圖4)。個別測試動物之GBA轉殖基因mRNA表現量展示於下文表2中。

表2

動物 ID	組織	測試物	劑量 (vg/kg)	VG/ μ g gDNA	VG/小鼠基因體 (hGBA/mTFRC)	hGBA RNA (hGBA/mHPRT)
26	肝臟	媒劑	0	0	0.000	0.001
27	肝臟	媒劑	0	200	0.002	0.000
28	肝臟	媒劑	0	N/A	N/A	0.001
11	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	3420	0.047	0.651
12	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	260	0.565	1.422
13	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	8060	0.065	0.761
6	肝臟	AAVDJ-GBA	1E13	480400	6.063	38.871
7	肝臟	AAVDJ-GBA	1E13	290000	3.539	27.325
8	肝臟	AAVDJ-GBA	1E13	507800	8.849	37.834
21	肝臟	AAVDJ-GBA	1E12	85600	N/A	N/A
22	肝臟	AAVDJ-GBA	1E12	80800	N/A	N/A
23	肝臟	AAVDJ-GBA	1E12	44200	N/A	N/A
26	脾臟	媒劑	0	132	N/A	0.000
27	脾臟	媒劑	0	0	N/A	0.001
11	脾臟	AAV3B-GBA	1E13	3460	0.009	0.000
12	脾臟	AAV3B-GBA	1E13	184000	0.552	0.004
13	脾臟	AAV3B-GBA	1E13	2380	0.007	0.000
6	脾臟	AAVDJ-GBA	1E13	49200	0.099	0.001
7	脾臟	AAVDJ-GBA	1E13	35580	0.076	0.003
8	脾臟	AAVDJ-GBA	1E13	38400	0.074	0.002

藉由LC-MS/MS測定的GCase 蛋白表現

【0247】 利用免疫親和LC-MS/MS分析對GBA載體所投與之測試動物之樣品中的人類GCase蛋白進行定量。AAVDJ-GBA載體治療引起肝臟GCase蛋白含量出現劑量反應性且與轉殖基因mRNA表現一致，在肝臟中產生的GCase含量高於相同劑量的AAV3B-GBA載體(圖5A)。在測試動物之血清樣品中量測的GCase蛋白含量亦反映此模式(圖5C)，表明AAV介導的GBA表現卡匣遞送可使肝臟產生GCase，接著釋放至血流中。儘管不存在GBA mRNA表現，但在經兩種載體治療之測試動物的脾臟樣品中可偵測到GCase蛋白(圖5B)，表明來自來源於肝臟中之血流中之蛋白質的GCase被脾臟所吸收。如同肝臟，AAVDJ-GBA載體在脾臟樣品中所產生之GCase的量具有劑量依賴性。個別測試動物之血清及組織樣品中的GCase蛋白濃度提供於下表3中。

藉由ICH測定的GCase蛋白表現

【0248】 亦藉由免疫組織化學研究經兩種GBA載體治療之測試動物中的人類GCase蛋白。偵測到肝細胞中之陽性染色強度低，而在沿著竇狀隙定位的庫弗細胞(Kupffer cells)中偵測高強度染色(圖6)。藉由ICH針對AAVDJ-GBA載體所測的GCase蛋白染色強度大於相同劑量的AAV3B-GBA載體，此與LC-MS/MS所測定的肝臟GCase蛋白濃度一致。

血清及組織中的GCase活性

【0249】 如利用螢光受質分析所量測，在用AAVDJ-GBA及AAV3B-GBA載體治療之後，相對於媒劑對照，來自測試動物之血清及組織樣品中的GCase活性增加(圖7A、圖7B、圖7C)。在肝臟中，兩種載體產生的GCase活性高於僅接受媒劑之測試動物(圖7A)，但唯AAVDJ-GBA載體在脾臟(圖7B)及血清(圖7C)中產生的GCase活性程度超過陰性對照，

包括在測試劑量較低的情況下(1E12 vg/kg)。在血清、肝臟及脾臟中，AAVDJ-GBA載體所產生的GCCase活性具有劑量反應性。總體而言，此等結果證明載體在肝臟中產生的人類GCCase酶具有功能。

血清及組織中的GluSph含量

【0250】 葡糖基神經鞘胺醇(GluSph)為高歇氏病的生物標記物。病症中的GCCase缺乏引起溶酶體內的葡糖神經醯胺聚積，接著藉由酸性神經醯胺酶去醯化，形成葡糖基神經鞘胺醇。恢復GCCase活性(諸如藉由因子置換或基因療法)預期可降低GluSph含量。

【0251】 藉由LC-MS/MS測定經載體及媒劑治療之測試動物之血清及組織樣品中的GluSph濃度。D409V轉殖基因小鼠缺乏GCCase活性且因此在肝臟、脾臟及血清中的GluSph含量升高。當用AAVDJ-GBA或AAV3B-GBA載體治療時，相較於經媒劑治療之測試動物中盛行的含量，相同組織及血清中的GluSph含量實質上降低(圖8A、圖8B、圖8C)。與其他結果一致，用AAVDJ-GBA治療引起GluSph含量的下降大於相同劑量的AAV3B-GBA載體。回應於AAVDJ-GBA載體的GluSph含量降低具有劑量反應性，且在1E12 vg/kg之劑量下，肝臟及脾臟GluSph含量實現大於84%的降幅。值得注意的是，儘管經1E13 vg/kg AAV3B-GBA載體治療之測試動物之肝臟中所偵測的GCCase蛋白之量僅為經相同劑量之AAVDJ-GBA治療之動物的6%，但肝臟GluSph含量下降超過70% (圖8A)。脾臟(圖8B)及血清(圖8C)中出現類似的GluSph濃度下降。此等結果證明，用設計成轉導肝臟且產生酶活性hGCCase蛋白質(該蛋白質分泌於血液循環中)之載體治療動物疾病模型可減少1型高歇氏病的最顯著標記物之一，肝及脾臟中的鞘脂聚積。

表3

			hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/g組織	hGCase 濃度 ng/g組織	hGCase 活性 µg/mL	hGCase活 性 µg/mg蛋 白質	hGCase 活性 µg/mg蛋 白質	GluSph 濃度 µg/mL	GluSph 濃度 ng/g組織	GluSph 濃度 ng/g組織
測試動 物編號	測試物	劑量 (vg/kg)	血清 第14天	血清 第28天	脾臟	肝臟	血清	脾臟	肝臟	血清	脾臟	肝臟
26	媒劑	NA	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	0.51	0.28	0.28	13.50	80.90	18.80
27	媒劑	NA	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	0.59	0.37	0.33	13.50	139.00	21.20
28	媒劑	NA	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	0.60	0.35	0.31	14.10	114.00	23.50
29	媒劑	NA	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	0.59	N/A	0.33	14.70	96.40	23.40
21	AAVDJ-GBA	1E12	543	724	141	2030	2.48	1.00	2.68	5.58	5.00	3.52
22	AAVDJ-GBA	1E12	250	396	118	1380	0.77	0.64	2.14	5.24	11.30	5.15
23	AAVDJ-GBA	1E12	677	729	221	1860	2.49	1.09	2.64	4.89	5.11	3.11
24	AAVDJ-GBA	1E12	407	621	164	1280	0.82	N/A	2.30	5.62	5.67	3.08
25	AAVDJ-GBA	1E12	630	639	244	1530	1.34	N/A	3.02	4.68	4.76	2.51
6	AAVDJ-GBA	1E13	5230	6780	1550	14100	13.18	2.83	7.27	2.62	2.10	1.86
7	AAVDJ-GBA	1E13	5440	5920	1300	10200	19.11	2.96	6.76	2.64	1.85	1.88
8	AAVDJ-GBA	1E13	7770	9770	2000	10700	21.09	3.58	8.73	2.01	1.23	1.21
9	AAVDJ-GBA	1E13	4110	4750	927	7370	11.09	N/A	6.02	3.22	2.12	2.16
10	AAVDJ-GBA	1E13	223	8930	1750	10300	22.54	N/A	6.25	2.00	1.39	1.25
11	AAV3B-GBA	1E13	49.8	44.4	BLOQ	334	0.76	0.44	1.32	9.94	32.10	6.83
12	AAV3B-GBA	1E13	154	118	297	561	0.83	0.43	1.41	7.27	16.40	4.92
13	AAV3B-GBA	1E13	53.2	57.0	1190	424	0.83	0.43	1.21	9.06	32.20	7.50
14	AAV3B-GBA	1E13	169	162	1760	1030	0.89	N/A	1.65	7.11	16.10	5.76
15	AAV3B-GBA	1E13	174	179	581	939	0.92	N/A	1.85	6.70	14.30	4.44

BLOQ = 低於定量極限

實例4

在健康非人類靈長類動物中測試AAV GCase載體

【0252】 為了擴展小鼠研究，藉由靜脈內注射將AAV3B-GBA殖株128載體及AAVDJ-GBA殖株128載體(在此實例及相關圖式中分別稱為AAV3B-GBA及AAVDJ-GBA)投與健康食蟹獼猴且在屍體解剖之後取樣，以分析經轉導細胞中的載體基因體複本數以及由載體轉導引起的RNA及蛋白質表現。

材料及方法

載體投與及樣品收集

【0253】 藉由靜脈內注射將AAV3B-GBA殖株128載體以四種遞增劑量投與食蟹獼猴。兩隻雄猴及一隻雌猴接受每公斤體重 $3E12$ 個載體基因體的劑量(vg/kg)；一隻雄猴及兩隻雌猴接受 $1E13$ vg/kg的劑量；一隻雄猴及一隻雌猴接受 $3E13$ vg/kg的劑量；並且一隻雄猴及一隻雌猴分別接受 $5.3E13$ vg/kg及 $5.2E13$ vg/kg的劑量。AAVDJ-GBA殖株128載體以 $3E13$ vg/kg之劑量靜脈內投與一隻雄猴及一隻雌猴。總共四隻動物(兩隻雄猴及兩隻雌猴)接受媒劑作為陰性對照。在整個研究期間，動物以甲基普賴蘇禮(methylprednisolone)維持，以抑制可能的免疫反應。在給藥後的約30天進行屍體解剖。收集血清樣品且自肝臟、脾臟及背根節收集100-200 mg組織樣品且在 -80°C 下儲存直至使用。對於免疫組織化學(IHC)而言，將組織在10%中性緩衝福馬林中固定，處理成石蠟塊及切片。

DNA分離

【0254】 使用冷凍的組織樣品，利用苯酚/氯仿DNA提取方法進行DNA分離。使用Covaris CP02 Cyroprep磨粉機，根據製造商說明書，將

冷凍的組織樣品粉碎成冷凍的乾燥粉末。將約30 mg各冷凍組織粉末轉移至新管中且再懸浮於292.5 mL含有1% SDS的TENS溶解緩衝液中。接著，將7.5 mL蛋白酶K添加至各管中且在以1000 rpm搖動的熱混合器中、在56°C下培育3小時，且每30分鐘渦旋15秒。接著將樣品冷卻至室溫且用核糖核酸酶A處理5分鐘。各樣品用300 mL苯酚:氯仿:異戊醇(25:24:1)處理且渦旋20秒。收集上層相的液體以便藉由添加約0.5倍上層相體積的7.5 M NH₄OAc及添加3倍總體積的純乙醇來進行DNA沈澱。在-20°C下冷卻樣品至少2小時，隨後在4°C下以16,000 g離心30分鐘。DNA集結粒用冰冷的70%乙醇洗滌且再懸浮於不含核酸酶的水中。使用Nanodrop分光光度計量測DNA濃度。

RNA分離

【0255】 如上述章節中所述製備冷凍的組織粉末。使用頻率設定為25 1/s的Tissuelyzer II，使用約30 mg組織樣品，在5 mm不鏽鋼珠存在下，在1 mL Trizol中均質化5分鐘。將溶胞物轉移至相分離管(phasemaker tubes)中且添加200 mL氯仿。將樣品渦旋15秒，在室溫下培育5分鐘且在4°C下以14,000 g離心5分鐘。將透明上清液轉移至新管中且使用Purelink RNA小型套組、根據製造商說明書加以處理。在用不含核酸酶的水溶離之前，在管柱上執行去氧核糖核酸酶處理20分鐘。使用Nanodrop分光光度計來量測RNA濃度。

載體基因體複本數

【0256】 自肝臟、脾臟及DRG提取基因體DNA (gDNA)，且藉由對GBA轉殖基因執行ddPCR以定量載體轉導來測定載體基因體複本數(VGC)。將VGC相對於gDNA輸入或相對於管家基因Tfrc之表現標準化。

在 ddPCR 分析中，黏接溫度為 60 °C，探針引子序列為 TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC (SEQ ID NO:43)，正向引子序列為 AATGCGATGCAATTTCTCATT (SEQ ID NO: 44)，反向引子序列為 TGCCAGCCATCTGTTGTT (SEQ ID NO:45)，探針螢光團為 FAM，且淬滅體為 NFQ。將 DNA 稀釋至 10 ng/mL。在用 DNAZap 清潔的 Airclean 600 PCR 工作站中製備二十微升含有 ddPCR 超混合液、分離 gDNA、GBA 引子及 FAM 探針(參見上文)、管家基因(ms)Tfric 引子及 VIC 探針的 PCR 反應混合物且添加至 ddPCR 96 孔盤中。使用 QX200 液滴產生器產生液滴。培養盤用 PX1 PCR 培養盤封口機密封。完成 PCR 程式：95°C 維持 10 分鐘 → [94°C 維持 30 秒 → 60°C 維持 1 分鐘] (x40 個循環) → 98°C 維持 10 分鐘 → 4°C 維持。藉由 QX200 讀取器獲取微滴計數及振幅且使用 QuantaSoft 軟體分析以計算 DNA 複本數目。將獲自 FAM 通道的 VGC 相對於 gDNA 輸入的 µg 標準化或以 VGC/單倍體基因體報告，VGC/單倍體基因體係藉由計算 FAM 對 VIC 通道的比率而獲得。

GBA 轉殖基因表現

【0257】 藉由對來自肝臟、脾臟及 DRG 之 RNA 樣品進行逆轉錄及 ddPCR 來定量經轉導之轉殖基因的 GBA mRNA 表現。將轉殖基因 mRNA 含量相對於管家基因 Hprt 的表現標準化。使用 iScript cDNA 合成套組 (Bio-Rad，目錄號 1708891)，根據製造商方案，對經分離的 RNA 樣品進行逆轉錄以產生 cDNA 文庫。20 µL 反應使用 500 ng 總 RNA。在 37°C 下執行逆轉錄 60 分鐘，隨後在 95°C 下執行逆轉錄 5 分鐘。在 -20°C 下儲存 cDNA 樣品直至 RT-PCR 分析。使用與上文所述相同的 GBA 引子及探針以及管家基因 mfHprt 的引子探針，使用 ddPCR 測定 GBA 轉殖基因之 RNA 表現定

量。在用DNAZap清潔的Airclean 600 PCR工作站中製備含有ddPCR超混合液(無dUTP)及上述引子探針的PCR反應混合物且添加至ddPCR 96孔盤中。如上文所述執行微滴產生、PCR程式及資料擷取。將VGC相對於gDNA的 μg 或mfHPRT的計數標準化。

藉由LC-MS/MS測定的GCase蛋白表現

【0258】 利用特異性結合GCase的抗體自血清、PBMC以及肝臟及脾臟組織溶解物之樣品中富集經載體治療之測試動物所產生的人類重組GCase蛋白，且接著藉由液相層析串聯質譜分析(LC-MS/MS)加以定量。將PBMC集結粒與M-PER緩衝液 + 蛋白酶抑制劑合併於小瓶中且在Bullet Blender STORM 5中藉由珠粒研磨溶解6分鐘。藉由添加一定體積的M-PER + 蛋白酶抑制劑以製備50 mg組織/mL緩衝液來製備脾臟及肝臟切片，使用Omni Bead Ruptor Elite處理樣品1.5分鐘。分析不同體積的樣品：50 μL 血清、200 μL 組織溶解物及200-800 μL PBMC溶解物，相對於含有1% BSA、外加有他利昔酶蛋白質之PBS的標準曲線替代基質。分析線性範圍為0.25至1,000 ng/mL。使用2 μg 抗GCase抗體 + 生物素及鏈黴抗生物素蛋白磁性珠粒執行雙重IP。在Thermo KingFisher Flex上處理樣品且用30 mM HCl + 5% ACN溶離。使用1 M Tris-HCl將樣品調節至pH 8.3，還原，烷基化且使用Promega LysC-胰蛋白酶消化隔夜。使用捕集及溶離奈米流LC條件，以85 μL 的體積將樣品注射至Thermo Altis MS系統上。在Thermo Altis上，藉由Xcalibur v.4.1獲取LC-MS/MS分析用的所有資料。使用Skyline v.21.2.0.369進行資料處理且輸出至Excel中。由分析物肽相對於SIL肽的峰面積比產生校準曲線且根據標準曲線反推計算峰面積比來測定研究樣品的濃度。將PBMC及組織溶解物的LC-MS/MS資料相

對於組織的總蛋白質重量及自PBMC集結粒收集的百萬個細胞總數標準化。

藉由ICH測定的GCase蛋白表現

【0259】 使用全自動化染色機(Leica Biosystems Bond Rx)，用抗GCase抗體將肝臟、脾臟及DRG之石蠟切片染色。簡言之，將載片脫蠟且用過氧化物處理10分鐘。接著，載片用去離子水沖洗且用0.3% Triton溶液滲透1小時，隨後與一級抗GCase抗體(Sigma-Aldrich)一起培育1小時。一級抗體在Bond一級抗體稀釋劑中以1:250稀釋度稀釋。接著，沖洗載片且在二級抗體(Leica #DS9800)中培育8分鐘。藉由與DAB (Leica #DS9800)一起培育10分鐘來使抗體的存在可視化。最後，用水沖洗載片且在梯度乙醇至二甲苯中脫水，隨後封片且在載片掃描儀(Axio Scan Z1, Zeiss)上成像。使用ZEN Blue軟體呈現影像。

衣殼中和抗體效價

【0260】 為了控制載體衣殼之中和抗體之存在可影響轉導效率的可能性，載體投與當天測定nAb在測試動物中針對AAV3B的效價。執行基於細胞的轉導抑制分析以評估NAb效價。簡言之，將HEK293T細胞以60K個細胞/100 μ L/孔接種於聚D-離胺酸96孔盤中且在37°C、5% CO₂下培育隔夜。次日，以MOI 100將10 μ L WT腺病毒添加至細胞培養盤中且培育盤2小時。製備血清樣品及熱滅活血清(用作對照)的連續稀釋液且與AAV載體(MOI 10000)混合，在37°C、5% CO₂下培育盤1小時以允許載體-血清複合物形成。接著將載體血清複合物轉移(120 μ L)至細胞中且在37°C、5% CO₂下培育盤18-24小時。接著根據使用者手冊將100 μ L Bight Glo試劑添加至培養盤中。在Envision上讀盤。使用熱滅活血清截止值計算NAb

效價。效價用引起 $\geq 50\%$ 轉導抑制之血清稀釋度最低倒數(5、10、20、40直至5120)報告。

結果

載體基因體複本數

【0261】 用AAV3B-GBA載體轉導肝臟及脾臟，如藉由定量獲自測試動物之組織樣品中的載體基因體複本數所測定，出現劑量反應傾向(圖9)。亦用AAVDJ-GBA載體轉導肝臟，但在相同劑量($3E13$ vg/kg)下，效率比AAV3B-GBA載體低約29倍，證實AAV3B衣殼轉導NHP肝臟的效率大於AAVDJ。在背根節(DRG)中偵測到的載體基因體複本數為背景水平，說明該組織未被任一載體轉導(圖9)。將載體基因體複本數相對於食蟹獼猴管家基因Tfrc標準化時，觀測到類似的結果。當增加AAV3B-GBA載體的劑量時，以管家基因(充當宿主細胞單倍體基因體的代表)之複本數計的載體基因體相對數亦增加，自 $3E12$ vg/kg之最低劑量下的7倍增加至 $5E13$ vg/kg之最高劑量下的117倍(圖10)。基於相對於管家基因標準化的資料，AAV3B載體轉導脾臟，但僅在兩種最高測試劑量下轉導脾臟，且因此效率低於肝臟(圖10)。標準化資料證實DRG未被轉導。個別測試動物的轉導資料提供於下文表4中。

GBA轉殖基因表現

【0262】 儘管在經AAV3B-GBA載體轉導之後，在肝臟與脾臟中均可偵測到載體基因體(圖9及圖10)，但僅在肝臟中而非在脾臟中偵測到由載體產生的hGCase mRNA (圖11)，表明表現卡匣中所用的肝臟特異性增強子及啟動子有效地限制GBA轉殖基因在經轉導之肝臟細胞中的表現。與藉由偵測載體基因體DNA所測定的轉導效率一致，極低表現量起因於

AAVDJ-GBA載體對肝臟的轉導，且脾臟或DRG中未見任一載體引起的RNA表現。藉由AAV3B載體遞送之GBA轉殖基因在肝臟中的表現亦具有劑量反應性。當相對於宿主細胞管家基因Hprt的mRNA含量標準化時，GBA mRNA含量在3E12 vg/kg之劑量下增加1倍，在1E13 vg/kg之劑量下增加7倍，在3E13 vg/kg之劑量下增加17倍且在5E13 vg/kg之劑量下增加125倍。個別測試動物的GBA轉殖基因mRNA表現資料提供於下表4中。

表4

動物ID	組織	測試物	劑量(vg/kg)	VG/ μ gDNA	VG/猴基因體(hGBA/cynoTFRC)	hGBA RNA(hGBA/cynoHPRT)
1A	肝臟	媒劑	0	2340	0.025	0.007
6A	肝臟	媒劑	0	1720	0.013	0.000
2A	肝臟	AAV3B-GBA	3E13	6974000	84.404	125.262
7A	肝臟	AAV3B-GBA	3E13	3714000	32.333	17.578
3A	肝臟	AAV3B-GBA	5E13	10076000	106.604	64.914
8A	肝臟	AAV3B-GBA	5E13	15200000	116.741	125.659
4A	肝臟	AAVDJ-GBA	3E13	676000	8.063	3.131
9A	肝臟	AAVDJ-GBA	3E13	3880	0.032	0.000
1A	肝臟	媒劑	0	2060	0.007	0.001
6A	肝臟	媒劑	0	2840	0.007	0.001
2A	肝臟	AAV3B-GBA	3E13	1342000	4.056	0.032
7A	肝臟	AAV3B-GBA	3E13	197000	0.786	0.004
3A	肝臟	AAV3B-GBA	5E13	13800000	45.590	0.052
8A	肝臟	AAV3B-GBA	5E13	4386000	14.860	0.029
1A	DRG	媒劑	0	6160	0.034	0.046
6A	DRG	媒劑	0	7000	0.055	0.000
2A	DRG	AAV3B-GBA	3E13	9400	0.065	0.016
7A	DRG	AAV3B-GBA	3E13	2800	0.031	0.000
3A	DRG	AAV3B-GBA	5E13	8200	0.058	0.000
8A	DRG	AAV3B-GBA	5E13	7600	0.063	0.002
4A	DRG	AAVDJ-GBA	3E13	7200	0.050	0.001
9A	DRG	AAVDJ-GBA	3E13	6600	0.053	0.000
1B	肝臟	媒劑	0	100	0.001	0.000
5B	肝臟	媒劑	0	680	0.006	0.000
2B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	1766000	10.600	1.770

3B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	1330000	6.604	1.160
6B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	3714000	21.419	3.550
4B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	3660000	17.395	4.420
7B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	5518000	29.667	6.560
8B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	1190000	7.881	1.020
1B	肝臟	媒劑	0	122	0.000	0.000
5B	肝臟	媒劑	0	720	0.002	0.000
2B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	41760	0.059	0.010
3B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	59380	0.143	0.000
6B	肝臟	AAV3B-GBA	3E12	486000	1.559	0.000
4B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	70000	0.227	0.000
7B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	90800	0.245	0.000
8B	肝臟	AAV3B-GBA	1E13	232400	0.521	0.000
1B	DRG	媒劑	0	198	0.002	0.000
5B	DRG	媒劑	0	360	0.004	0.000
4B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	1140	0.008	0.000
7B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	3960	0.022	0.000
8B	DRG	AAV3B-GBA	1E13	6520	0.038	0.000

藉由LC-MS/MS測定的GCase蛋白表現

【0263】 利用免疫親和LC-MS/MS分析對GBA載體所投與之測試動物之樣品中的人類GCase蛋白進行定量。AAV3B-GBA載體在肝臟中產生的GCase蛋白含量平均而言高於脾臟，且與兩種組織中的載體劑量相關(圖12A及圖12B)。由於在經載體治療之測試動物的肝臟中而非脾臟中偵測到GBA mRNA，因此脾臟中存在GCase蛋白可能歸因於分泌於血液中的其循環蛋白質被經轉導之肝細胞吸收。在所有測試劑量下，在經AAV3B-GBA治療之測試動物之肝臟中所觀測的hGCase蛋白質含量超過健康人之肝臟樣品的平均含量(圖12A)，而經兩種最高劑量之載體治療之測試動物之脾臟中的蛋白質含量與健康人之脾臟中的GCase含量一致(圖12B)。亦在載體投與之後的多個時間點收集血液樣品且對自血液製備之血清及周邊血液單核細胞(PBMC)中的hGCase蛋白質之量進行定量。結果

係可變的，但證明由兩種經GBA載體轉導之肝臟細胞所產生的hGCase (包括在測試劑量最低的情況下)在血清中可偵測到且可被血液中的PBMC吸收。個別測試動物之血清及組織樣品中的GCase蛋白含量提供於表5及表6中。

表5

				hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL	hGCase 濃度 ng/mL
測試動物編號	測試物	劑量 (vg/kg)	性別	血清 第3天	血清 第8天	血清 第15天	血清 第22天	血清 第29天	血清 第30天	血清 第37天	血清 第50天	血清 第58天
1A	媒劑	NA	M	13	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-	-	-
6A	媒劑	NA	F	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	-	-	-
1B	媒劑	NA	M	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
5B	媒劑	NA	F	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
2B	AAV3B-GBA	3.0E12	M	129	236	200	176	-	119	127	87	93
3B	AAV3B-GBA	3.0E12	M	117	264	141	142	-	76	95	72	45
6B	AAV3B-GBA	3.0E12	F	80	324	259	217	-	242	176	114	99
4B	AAV3B-GBA	1.0E13	M	94	300	344	380	-	267	237	182	193
7B	AAV3B-GBA	1.0E13	F	136	364	282	371	-	330	300	188	144
8B	AAV3B-GBA	1.0E13	F	100	220	79	86	-	63	59	44	35
2A	AAV3B-GBA	3.0E13	M	200	623	6067	8240	8226	-	-	-	-
7A	AAV3B-GBA	3.0E13	F	140	187	228	231	161	-	-	-	-
3A	AAV3B-GBA	5.3E13	M	278	496	904	2871	3930	-	-	-	-
8A	AAV3B-GBA	5.2E13	F	373	736	2581	3550	7366	-	-	-	-
4A	AAVDJ-GBA	3.0E13	M	23	86	99	51	40	-	-	-	-
9A	AAVDJ-GBA	3.0E13	F	0.4	0.9	2.7	BLOQ	0.5	-	-	-	-

BLOQ = 低於定量極限

表6

				hGCase 濃度 pg/1E6 細胞	hGCase 濃度 pg/1E6 細胞	hGCase 濃度 pg/1E6 細胞	hGCase 濃度 pg/1E6 細胞	hGCase 濃度 pg/1E6細胞	hGCase 濃度 ng/g組織	hGCase 濃度 ng/g組織	hGCase 濃度 ng/g組織	hGCase 濃度 ng/g組織
測試動物 編號	測試物	劑量 (vg/kg)	性別	PBMC 第15天	PBMC 第29天	PBMC 第30天	PBMC 第50天	PBMC 第58天	脾臟 第29天	脾臟 第58天	肝臟 第29天	肝臟 第58天
1A	媒劑	NA	M	BLOQ	BLOQ	-	-	-	BLOQ	-	BLOQ	-
6A	媒劑	NA	F	BLOQ	BLOQ	-	-	-	BLOQ	-	BLOQ	-
1B	媒劑	NA	M	BLOQ	-	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	BLOQ	-	BLOQ
5B	媒劑	NA	F	BLOQ	-	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	BLOQ	-	BLOQ
2B	AAV3B-GBA	3.0E12	M	BLOQ	-	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	19	-	276
3B	AAV3B-GBA	3.0E12	M	5	-	4	BLOQ	BLOQ	-	9	-	156
6B	AAV3B-GBA	3.0E12	F	BLOQ	-	9	BLOQ	BLOQ	-	39	-	377
4B	AAV3B-GBA	1.0E13	M	BLOQ	-	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	15	-	430
7B	AAV3B-GBA	1.0E13	F	4	-	25	3	BLOQ	-	14	-	608
8B	AAV3B-GBA	1.0E13	F	BLOQ	-	BLOQ	BLOQ	BLOQ	-	6	-	187
2A	AAV3B-GBA	3.0E13	M	52	63	-	-	-	403	-	31123	-
7A	AAV3B-GBA	3.0E13	F	249	12	-	-	-	8	-	837	-
3A	AAV3B-GBA	5.3E13	M	9	40	-	-	-	163	-	16275	-
8A	AAV3B-GBA	5.2E13	F	457	315	-	-	-	668	-	33891	-
4A	AAVDJ-GBA	3.0E13	M	BLOQ	BLOQ	-	-	-	7	-	354	-
9A	AAVDJ-GBA	3.0E13	F	BLOQ	BLOQ	-	-	-	BLOQ	-	BLOQ	-

BLOQ = 低於定量極限

藉由ICH測定的GCase蛋白表現

【0264】亦藉由免疫組織化學研究經AAV3B-GBA載體治療之測試動物中的人類GCase蛋白。在所有載體劑量治療之動物之肝臟樣品之包圍肝細胞的周門靜脈中觀測到陽性染色高於背景，但在兩種最高測試劑量下的陽性細胞數目(圖13B)比兩種較低劑量(圖13A)大得多。另外，在兩種最高劑量下，個別測試動物在GCase染色呈陽性之肝臟細胞的數目與肝臟樣品中可偵測之GBA mRNA的量之間存在一致性。在經載體治療之測試動物的脾臟及DRG樣品中，hGCase染色處於背景水平(資料未展示)。

衣殼中和抗體效價

【0265】在AAV3B-GBA載體投與之前所收集及之後第22天所收集的測試動物血清中量測中和抗體對AAV3B衣殼的效價。治療前，nAb效價為陰性或較低(在分析中，20-40倍稀釋度達成 $\geq 50\%$ 轉導抑制)，表明高nAb效價並非一些測試動物中所觀測到之低轉導效率的主要原因。在兩種最高載體劑量下，測試動物在治療之後的第22天出現高AAV3B衣殼nAb效價(高達5120倍稀釋度)。相比之下，接受較低載體劑量之測試動物中的nAb效價仍然較低，表明動物的血清轉化需要至少 3×10^{13} vg/kg載體。個別測試動物中之抗衣殼中和抗體效價提供於表7中。

表7

抗AAV3B nAb效價				
動物編號	性別	劑量(vg/kg)	第1天的Nab效價	第22天的Nab效價
1B	M	0	<5	<5
5B	F	0	<5	<5
2B	M	3E+12	<5	>40
3B	M	3E+12	<5	>40
6B	F	3E+12	<5	>40
4B	M	1E+13	<5	>40
7B	F	1E+13	<5	>40
8B	F	1E+13	<5	>40
1A	M	0	80	40
6A	F	0	40	10
2A	M	3E+13	40	2560
7A	F	3E+13	20	5120
3A	M	5E+13	20	2560
8A	F	5E+13	20	2560

其他觀測結果

【0266】 在實驗過程中，在多個時間點評估測試動物的健康及與載體之免疫反應性相關的標記物。未觀測到體重或攝食量發生與測試物相關的一或多種臨床變化。在AAV3B-GBA載體≥3E13 vg/kg投與而非以更低劑量的動物中觀測到細胞介素IL-10 (峰值變化至基線的3.83倍)及IP-10 (峰值增加至基線的3.99倍)出現與測試物相關的增加。在任何測試動物中均未觀測到IFNα-2a、MCP-1、IL-6、IFN-γ、TNF-α或補體活化產物C3a及C5b-9增加。在四種動物中觀測到肝酶丙胺酸轉胺酶(ALT)而非天冬胺酸轉胺酶(AST)的血清含量增加(範圍為載體投與之前所觀測之含量的2.1至11.5倍)，此被視為與測試物相關，但與相應測試動物中之AAV3B nAb效價或肝臟轉導或GBA表現程度不相關。在兩隻測試動物中均觀測到C反應蛋白(CRPHS)出現與測試物相關的短暫增加。在某些天，在某些測試動

物中，亦觀測到網狀紅血球、白血細胞、嗜中性球、淋巴球或單核球的數目或血清三酸甘油酯含量增加。

序列表

SEQ ID NO.	描述	序列
1	AAV3B VP1衣殼蛋白胺基酸序列	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY LKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTDGSE SVPDPQPLGEPAPAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN HYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG CLPPFPADVFMVFPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQG TTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMQLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGN LIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFH PSPLMGGFGLKHPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGV YSEPRPIGTRYLTRNL
2	AAV3B VP2衣殼蛋白胺基酸序列	MAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTDGESVDPDPQLGEPAPAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGN WHCDSQWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFN IQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVFPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSMQLQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNN NSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSS NTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTG QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
3	AAV3B VP3衣殼蛋白胺基酸序列	MASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVFPQYGYLTLNN GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLFSQAGPQSM LQARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNLIFGKEGTTASNAELDNVMITD EEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPQIMIKN TPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
4	AAV-DJ VP1衣殼蛋白胺基酸序列	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWVKLKPGLPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPY LKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGAD SVPDPQPIGEPAPAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSWTMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSN DNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAH QGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRT QTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSG VLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTSVDFAVNTEG VYSEPRPIGTRYLTRNL
5	AAV-DJ VP2衣殼蛋白胺基酸序列	MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPDPQPIGEPAPAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGN WHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKL FNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT GNNFQFTYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADN NNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQR GNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYST GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

6	AAV-DJ VP3衣殼蛋白胺基酸序列	MAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLSFKLFENIQVKEVTQNEGKTKIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPFPFADVFMI PQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQLMRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNP LIDQYLYLSRTQT TGGTTNTQT LGSFQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVP GPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPFVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLP GMVWQDRDVYLQGPIWAKI PHTDGHFHP SPLMGGFGLKHFP PQI L I KNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
7	5'反向末端重複(5'-ITR)核苷酸序列(反轉組態)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTT CCT
8	AMBP增強子核苷酸序列	GTTAATTTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCT
9	hALB近端增強子核苷酸序列	GCATGCGTGAGTACTTGTGTGTAAATTTTTT CATTATCTATAGGTAAAAGCACACTTGGAATTAGCAATAGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGTATGTCTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGGTTAGTAATTACTAAACACTGAGAACTAAATTGCAAACACCAAGAACTAAATGTTC AAGTGGGAAATTACAGTTAAATACCATGGTAATGAATAAAAGGTACAAATCGTTTAAACTCTTATGTAAAATTTGATAAGATGTTTTACACAACTTTAATACATTGACAAGGCTTGTGGAGAAAAC
10	hALB核心啟動子核苷酸序列	AGTTCAGATGGTAAATATACACAAGGGATTTAGTCAAACAATTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTTTGTAATCGGTTGGCAGCCAATGAAATACAAAGATGAGTCTAGTTAATAATCTACAATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCCACACGCCCTTTGGCAC
11	hβ血球蛋白內含子核苷酸序列	GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTTCTATGGTTAAGTTCATGT CATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATACAATTGTTTCTTTTGTTTAAATCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAACTAACTTAAAAAAAACCTTACACAGCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTGTCATATT CATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTAAATATGTGTACACATATTGACC AAATCAGGGTAATTTTGCAATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTT CAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCATAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAC TGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAG
12	編碼IgVH蛋白分泌信號肽的核苷酸序列	ATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTGCCAACAGCTACAGGTGTGCACTCC
13	pAAV-GBA殖株128載體基因體中之編碼人類GCase蛋白成熟多肽的核苷酸序列	GCCAGACCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTATAGTTCTGTGGTTTGTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCATTTGACCCTCCTACATTTCTGCACTGGGCACTTT CAGCAGGTATGAGTCTACCAGATCTGGCAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCTATCCAGGCTAACCACACCGGCACAGGGCTGCTGCTGACTCTGCAGCCCGAACAGAAATCCAGAAGGTTAAGGGTTTGGAGGAGCCATGACAGATGCAGCAGCCCTGAACATTTTGCTCTCAGCCCTCCAGCTCAGAACCTGCTCCTTAAATCATACTTCAGTGAAGAAGGAATTGGCTACAACATCATAAGAGTACCCATGGCCAGCTGTGATTTTCCATTAGAACCTACACTTATGCTGATACTCCTGATGATTTT CAGCTGCACAACTTTCCCTCCCTGAAGAGGACACAAAGCTCAAGATTCCCCTCATTCACAGAGCCCTGCAACTGGCCCAGAGGCCTGTGTCCCTGCTGGCCAGCCCCTGGACA TCTCCAACATGGCTGAAAACCAATGGAGCAGTAAATGGCAAAGGTTCCCTTAAGGGCCAGCCAGGAGACATCTACCACCAAACCTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTCCCTGGATGCCTATGCAGAGCATAAGCTGCAGTTTGGGCAGTGACTGCTGAAAATGAACCTCTGCTGGACTGCTCTCAGGGTATCCCTTCCAGTGCCTGGGATTTACTCCTGAGCACCAAGAGAGATTTCA TTGCCAGAGACCTGGGGCCACCCCTTGCCAACAGCACACACCACAATGTTAGACTGCTGATGCTGGATGACCAGAGGCTGCTCCTTCCCCACTGGGC AAAAGTGGTGCTGACTGACCCAGAGGCCGCCAAGTATGTCCATGGCATCGCCGTTCA TTGGTACCTGGACTTCCCTGGCCCCTGCCAAGGCCACCTTGGGGGAGACACATAGGCTCTTCCCCAACACCATGCTGTTTGCCCTCAGAAGCCTGTGTGGGTTC AAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGCTCCTGGGACAGGGGC

		ATGCAGTACAGCCATTCCATCATCACCAATCTGCTGTACCATGTGGTAGGCTGGACCGACTGGAATCTTGCCCTCAACCCAGAAGGTGGC CCCAACTGGGTGAGAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGATATTACCAAAGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTTTATCACCTG GGCCACTTCTCCAAGTTCATCCCTGAGGGAAGCCAGAGAGTGGGATTGGTTGCCTCCCAGAAGAATGATCTCGATGCTGTGGCCCTCATG CAGCCAGATGGCAGCGCAGTGGTAGTAGTACTGAACAGGTCACTAAGGATCTGCCTCTCACTATTAAAGATCCTGCAGTGGGCTTCTTG GAGACCATCAGCCCCGGATACAGCATCCACACCTACCTGTGGAGGAGACAGTGA
14	bGH polyA核苷酸序列	CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTT CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
15	3'反向末端重複(3'-ITR)核 苷酸序列(反轉組態)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCCTCCG GCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
16	由pAAV-GBA 殖株128載體 基因體中之GCase轉殖基因 編碼的人類GCase蛋白前驅 體胺基酸序列(IgVH分泌信 號肽序列)	MGWSCIILFLVATATGVHSARPCIPKSFYSSVVCVNATYCDSDPPTFPALGTFSTRYESTRSGRMELSMGP IQANHTGTGLLLTLQP EQKFQKVKGFGGAMTDAAALNIALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLI HRLQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGF TPEHQRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEA CVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGS QRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSAVVVVLNRSSKDVPLTIKDFAVGFLETISPGYSIHTYLRWRRQ
17	pAAV-GBA 殖株128載體基 因體核苷酸序列(5'-ITR 至 3'-ITR)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTACGTACCTAGGCTCAGAAATTCGTTAATTTTTAA AAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTGTGTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGA GGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCCTGGATCCGTTAATTTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTG GCAGCATTTACTCTCTCTGTGTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACT TATCCTCTGGGCCTCAGATCTGTTAACAGCATGCGTGAGTACTTGTGTGTAATTTTTTCATTATCTATAGGTAAAAGCACACTTGGAATT AGCAATAGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGTATGTCTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGGTTAGTAATTACTAAACACTGA GAACTAAATTGCAAAACACCAAGAACTAAAATGTTCAAGTGGGAAATTACAGTTAAATACCATGGTAATGAATAAAAGGTACAAATCGTTT AAACTCTTATGTAAAATTTGATAAGATGTTTACACAACTTTAAATACATTGACAAGGTCTTGTGGAGAAAACAGTTCAGATGGTAAATA TACACAAGGGATTTAGTCAAACAATTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTTTGTAATCGGTTGGCAGCCAATGAAATACAAAGATGAGTCT AGTTAATAATCTACAATTATTTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGCTCCTAGCTTTTCTCTTCTGTCAACCCACA CGCCTTTGGCACTAGTCAGGTGAGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTTCATGTCATAGGAAGGG GAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTT GCTGTTCATAACAATTGTTTTCTTTGTTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAA CATTGTGTATACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAAGTAACTTAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTG GAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTAT GGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAATCAGGGTAATTTTGCAATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTCTTCTT TTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGATCAATGCTCTCTT GCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAC TGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTC TGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCTCCACAGGTGTCGTTCTAGCACTATCAAGCTTCCCTGG CCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTGGCAACAGCTACAGGTGTGCACTCCGCCAGACCTGCAATCCCTAAGAGCTTTG GCTATAGTTCTGTGGTTTGTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCATTTGACCCTCCTACATTTCTGCACTGGGCACTTTCAGCAGGT ATGAGTCTACCAGATCTGGCAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCTATCCAGGCTAACCACACCGGCACAGGGCTGCTGCTGACTCTGC AGCCCGAACAGAAATCCAGAAGGTTAAGGGTTTGGAGGAGCCATGACAGATGCAGCAGCCCTGAACATTTTGGCTCTCAGCCCTCAG CTCAGAACCTGCTCCTTAAATCATACTTCAGTGAAGAAGGAATTGGCTACAACATCATAAGAGTACCCATGGCCAGCTGTGATTTTTCCA TTAGAACCTACACTTATGCTGATACTCCTGATGATTTTCAGCTGCACAACTTTCCCTCCCTGAAGAGGACACAAAGCTCAAGATTC

		TCATTACAGAGCCCTGCAACTGGCCAGAGGCCTGTGTCCCTGCTGGCCAGCCCCCTGGACATCTCCAACATGGCTGAAAACCAATGGAG CAGTAAATGGCAAAGGTTCCCTTAAGGGCCAGCCAGGAGACATCTACCACCAAACCTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCT ATGCAGAGCATAAGCTGCAGTTTGGGCAGTGACTGCTGAAAATGAACCCTCTGCTGGACTGCTCTCAGGGTATCCCTTCCAGTGCCTGG GATTTACTCCTGAGCACAGAGAGATTTCAATTGCCAGAGACCTGGGGCCCAACCCTTGCCAACAGCACACACCAACAATGTTAGACTGCTGA TGCTGGATGACCAGAGGCTGCTCCTTCCCCACTGGGCAAAAGTGGTGCTGACTGACCCAGAGGCCGCCAAGTATGTCCATGGCATCGCCG TTCATTGGTACCTGGACTTCCTGGCCCCCTGCCAAGGCCACCTTGGGGGAGACACATAGGCTCTTCCCCAACACCATGCTGTTTGCCTCAG AAGCCTGTGTGGGTTCCAAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGCTCCTGGGACAGGGGCATGCAGTACAGCCATTCCATCATCACCA ATCTGCTGTACCATGTGGTAGGCTGGACCGACTGGAATCTTGCCCTCAACCAGAAGGTGGCCCCAAGTGGGTGAGAACTTCGTGGACA GCCCCATCATCGTGGATATTACCAAAGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCCAAGTTCATCCCTGAGG GAAGCCAGAGAGTGGGATTGGTTGCCTCCCAGAAGAATGATCTCGATGCTGTGGCCCTCATGCACCCAGATGGCAGCGCAGTGGTAGTAG TACTGAACAGGTCATCTAAGGATGTGCCTCTCACTATTAAAGATCTCCGAGGTTTGGCTTCTTGAGAGACCATCAGCCCCGGATACAGCATCC ACACCTACCTGTGGAGGAGACAGTGACATATGGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCTGCCTTCCT TGACCTTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTAGCGTAC GCTTGTGGCAAACCTTCGTCACTTATTTTAAGAAATTGCCACAGCTACCACCTGATCAGTCAGCAGCCAACAACAACGAGGGCAAGATC CTCTGTGACAAAAAGATTTTGATTTGCTGCAGGCTCACAAAGATTGTTAGCAATTTTAGCAATAAAGCAATTTTAAATTAAGTTATATAC AAATTATTAGACAAATTGCTATTGCACACTTAATAGACTTTAGTGCTAACAAAACTTTTGTAGGCACTGGGAAACCAAAAAATTGTTGCC GCTTGCTTTTATTGAGTTGGTCTGGAACCTAACCTGTAGTATCTCCGAGGTTTGGCTGTATCTTAAATTGTAATTTGTCCTTACAGCTAG CAGTACTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGA CGCCCGGGCTTTGCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
18	AAV2 ITR (130 bp)	aggaaccctagtgtgatggagtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagggccggcgaccaaaggcgccccgagccccgg gctttgccccgggcgggcctcagtgagcgagcgagcgcgcgag
19	AAV2 ITR (130 bp)	ctgcgcgctcgctcgctcactgagggcgccccgggcaagcccgggcgctcgggcgacctttggcgccccggcctcagtgagcgagcgagcg cgagagagggagtggccaaactccatcactaggggttcct
20	CMV增強子及雞β肌動蛋白 啟動子	gacattgattattgactagttattaatagtaatacaattacggggtcatttagttcatagcccatatatggagttccgcggttacataactta cggtaaatggcccgccctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggga ctttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgccctggcattatgccagtagcatgaccttatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat tagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctcccccccccaattttgtat ttatttattttttaattattttggcgagcgatggggcgggggggggggggcgcgcgccagggcgggggcgggggcgggggcgggggcg cgggcgagggcgagaggtgcggcgggcagccaatcagagcgggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgagggcgggcgggcgggcg ctataaaaagcgaagcgcgcgggcgggcg
21	CMV增強子	gacattgattattgactagttattaatagtaatacaattacggggtcatttagttcatagcccatatatggagttccgcggttacataactta cggtaaatggcccgccctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggga ctttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccta ttgacgtcaatgacggtaaatggcccgccctggcattatgccagtagcatgaccttatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat tagtcatcgctattaccatg
22	雞β肌動蛋白啟動子	tcgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctcccccccccaattttgtatttatttattttttaattat gtgcagcgatggggcgggggggggggggggsgcgcgccggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg cgcgggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgagggcgggcgggcgggcgggcgccataaaaaagcgaagcg ggcgggcg
23	SV40啟動子	gcattctcaattagtcagcaaccatagtcccgccccctaactccgcccatactccgcccactccgcccagttccgcccattctccgcccc tggtgactaattttttttatttatgagagggcgagggcgccctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttgagg cctaggcttttgcaaa

24	SV40 poly(A)信號	taagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttat ttgtaaccattataagctgcaataaacaagtt
25	SV40 poly(A)信號	aacttgtttatttgcagcttataatggttacaaataagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttctactgcattctagt tgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatc
26	兔β-血球蛋白poly(A)信號	aataaaggaaattttatttttcattgcaatagtgtgttggaatttttttgtgtctctca
27	WPRE	aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgcttta atgcctttgtatcatgctatttgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaaatcctggttgctgtctctttatgaggagttg tgcccgttgtcaggaacgtggcggtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctc ctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttggccgctgctggacaggggctcggtg ttgggcactgacaattccgtggtgttgcgggaaatcatcgctcttcccttggtgctcgctgtgttgccacctggattctcgcgggg acgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctgctgcgggctctgcggcctcttcgcgctctt cgcttcgcccctcagacgagtcggatctccctttggggcgccctccccgc
28	智人葡糖基神經醯胺酶β (GBA)，轉錄本變異體1； NCBI 參 考 序 列： NM_000157.4	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTA CTTCAGGCAGTGTCTGTTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACA TACTGTGACTCCTTTGACCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTG AGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCCTGCTACTGACCCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCAGAAAGTGAAGGGATTT GGAGGGCCATGACAGATGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCAACCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAA GAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCAACGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCC GTTTCACTCCTTGCCAGCCCCCTGGACATCACCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCC GGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATAACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCC CGTGACCTAGGTCTACCCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGTGCTGCCCCACTGG GCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTCTGGCTCCAGCCAAA GCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCCTGGGAGCAGAGT GTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCAGAACCTCCTGTACCATGTGGTGGGCTGGACCGACTGG AACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGACAGTCCCATCATTGTAGACATACCAAGGACACGTTT TACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGCCACTTCAGCAAGTTCATTCTGAGGGCTCCAGAGAGTGGGCTGGTTGCCAGTCAAGAG AACGACCTGGACGCGAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTTCGTGCTAAACCGCTCCTTAAGGATGTGCCTCTTACC ATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTTGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA
29	智人葡糖基神經醯胺酶β (GBA)，轉錄本變異體2； NCBI 參 考 序 列： NM_001005741.3	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTA CTTCAGGCAGTGTCTGTTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACA TACTGTGACTCCTTTGACCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTG AGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCCTGCTACTGACCCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCAGAAAGTGAAGGGATTT GGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCAACCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAA GAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTCAACGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCC GTTTCACTCCTTGCCAGCCCCCTGGACATCACCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCC GGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATAACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCC CGTGACCTAGGTCTACCCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGTGCTGCCCACTGG GCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTCTGGCTCCAGCCAAA GCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCCTGGGAGCAGAGT

		GTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGACTGG AACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGCGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAAGGACACGTTT TACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGCCACTTCAGCAAGTTCATTCCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAG AACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACC ATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA
30	智人葡萄糖基神經醯胺酶β (GBA)，轉錄本變異體3； NCBI 參考序列： NM_001005742.3	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTA CTTCAGGCAGTGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACA TACTGTGACTCCTTTGACCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTG AGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCAGAAAGTGAAGGGATTT GGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCACCCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTACTTCTCTGAA GAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGAT TTCCAGTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATAACCCCTGATTACCCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCC GTTTCACTCCTTGCCAGCCCCGGACATCACCCATCTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGCACAGCCC GGAGACATCTACCACAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGGGCAGTGACA GCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATAACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTCAACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCC CGTGACCTAGGTCTTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGG GCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAA GCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCCTGGGAGCAGAGT GTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGACTGG AACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGGCTAAGACCAATCGAGCGCTCCAATCATTGTAGACATCATTCAAGGCACAGCTT TACAAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGCCACTTCAGCAAGTTCATTCCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAG AACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACC ATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA
31	智人葡萄糖基神經醯胺酶β (GBA)，轉錄本變異體4； NCBI 參考序列： NM_001171811.2	ATGGAGCTGAGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGCCTGCTACTGACCCTGCAGCCAGAACAGAAGTTCAGAAAGTG AAGGGATTTGGAGGGGCCATGACAGATGCTGCTGCTCTCAACATCCTTGCCCTGTCACCCCCTGCCAAAATTTGCTACTTAAATCGTAC TTCTCTGAAGAAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATCCGCACCTACACCTATGCAGACACC CCTGATGATTTCCAGTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTGATTACCCGAGCCCTGCAGTTGGCC CAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCGGTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAG GGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAGTTACAGTTCTGG GCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATAACCCCTCCAGTGCCTGGGCTTCACCCCTGAACATCAGCGAGAC TTCATTGCCCGTGACCTAGGTCTTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGCCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTG CCCCACTGGGCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGGCT CCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCCTGG GAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAACCTCCTGTACCATGTGGTCGGCTGG ACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGCGACAGTCCCATCATTGTAGACATCACCAAG GACACGTTTTACAAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGCCACTTCAGCAAGTTCATTCCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCC AGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTG CCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCGTCGCCAGTGA
32	智人葡萄糖基神經醯胺酶β (GBA)，轉錄本變異體5； NCBI 參考序列： NM_001171812.2	ATGGAGTTTTCAAGTCCTTCCAGAGAGGAATGTCCAAGCCTTTGAGTAGGGTAAGCATCATGGCTGGCAGCCTCACAGGATTGCTTCTA CTTCAGGCAGTGTGTCGTGGGCATCAGGTGCCCGCCCCTGCATCCCTAAAAGCTTCGGCTACAGCTCGGTGGTGTGTGTCTGCAATGCCACA TACTGTGACTCCTTTGACCCCCGACCTTTCCTGCCCTTGGTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTACACGCAGTGGGCGACGGATGGAGCTG AGTATGGGGCCCATCCAGGCTAATCACACGGGCACAGGAATCGGATATAACATCATCCGGGTACCCATGGCCAGCTGTGACTTCTCCATC CGCACCTACACCTATGCAGACACCCCTGATGATTTCCAGTTGCACAACTTCAGCCTCCCAGAGGAAGATACCAAGCTCAAGATACCCCTG ATTACCGAGCCCTGCAGTTGGCCCAGCGTCCCGTTTCACTCCTTGCCAGCCCTGGACATCACCCACTTGGCTCAAGACCAATGGAGCG

		GTGAATGGGAAGGGGTCACTCAAGGGACAGCCCGGAGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTTGTGAAGTTCCTGGATGCCTATGCTGAGCACAAAGTTACAGTTCCTGGGCAGTGACAGCTGAAAATGAGCCTTCTGCTGGGCTGTTGAGTGGATACCCCTTCCAGTGCCTGGGCTTACCCCTGAACATCAGCGAGACTTCATTGCCCGTGACCTAGGTCCTACCCTCGCCAACAGTACTCACCACAATGTCCGGCTACTCATGCTGGATGACCAACGCTTGCTGCTGCCCCACTGGGCCAAAGGTGGTACTGACAGACCCAGAAGCAGCTAAATATGTTTCATGGCATTGCTGTACATTGGTACCTGGACTTTCTGGCTCCAGCCAAAGCCACCCTAGGGGAGACACACCGCCTGTTCCCCAACACCATGCTCTTTGCTCAGAGGCCTGTGTGGGCTCCAAGTTCCTGGGAGCAGAGTGTGCGGCTAGGCTCCTGGGATCGAGGGATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACGAACCTCTGTACCATGTGGTCGGCTGGACCGACTGGAACCTTGCCCTGAACCCCGAAGGAGGACCAATTGGGTGCGTAACTTTGTGCACAGTCCCATCATTTGTAGACATCACC AAGGACACGTTTACAAACAGCCCATGTTCTACCACCTTGGCCACTTCAGCAAGTTCATTTCCTGAGGGCTCCCAGAGAGTGGGGCTGGTTGCCAGTCAGAAGAACGACCTGGACGCAGTGGCACTGATGCATCCCGATGGCTCTGCTGTTGTGGTCGTGCTAAACCGCTCCTCTAAGGATGTGCCTCTTACCATCAAGGATCCTGCTGTGGGCTTCTGGAGACAATCTCACCTGGCTACTCCATTACACCTACCTGTGGCTCGCCAGTGA
33	WO2019070894_15	ATGGAATT CAGCAGCCCCAGCAGAGAGGAATGCCCAAGCCTCTGAGCCGGGTGTCAATCATGGCCGGATCTCTGACAGGACTGCTGCTGCTTCAGGCCGTGTCTTGGGCTTGGCGCTAGACCTTGTCATCCCCAAGAGCTTCGGCTACAGCAGCGTCGTGTGCGTGTGCAATGCCACCTACTGCGACAGCTTCGACCCCTCTACCTTTCTGCTCTGGGCACCTTCAGCAGATACGAGAGCACCAGATCCGGCAGACGGATGGAAGTGAAGCATGGGACCCATCCAGGCCAATCACACAGGCACTGGCCTGCTGCTGACACTGCAGCCTGAGCAGAAATTCAGAAAGTGAAAGGCTTCGGCGGAGCCATGACAGATGCCGCCGCTCTGAATATCCTGGCTCTGTCTCCACCAGCTCAGAACCTGCTGCTCAAGAGCTACTTCAGCGAGGAAGGCATCGGCTACAACATCATCAGAGTGCCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGGACCTACACCTACGCCGACACACCCGACGATTTCCAGCTGCACAACCTTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACCAAGCTGAAGATCCCTCTGATCCACAGAGCCCTGCAGCTGGCACAAAGACCCGTGTCACTGCTGGCCTCTCCATGGACATCTCCACCTGGCTGAAAACAAATGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCAGCCTGAAAGGCCAACCTGGCGACATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTCGTGAAGTTCCTGGACGCCATGCGCAGCACAAGCTGTTTGGGCCGTGACAGCCGAGAAACGAACTTCTGCTGGACTGCTGAGCGGCTACCCCTTTCAGTGCCCTGGGCTTTACACCCGAGCACCAGCGGGACTTTATCGCCCGTGATCTGGGACCCACACTGGCCAATAGCACCCACCATAATGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGACCAGAGACTGCTTCTGCCCCACTGGCTAAAGTGGTGCTGACAGATCCTGAGGCCGCCAAATACGTGCACGGAATCGCCGTGCACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCTGCCAAGGCCACACTGGGAGAGACACACAGACTGTTCCCCAACACCATGCTGTTCCGCCAGCGAAGCCTGTGTGGGCAGCAAGTTTGGGAACAGAGCGTGCGGGCTCGGCAGCTGGGATAGAGGCATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACC AACCTGCTGTACCACGTCGTCGGCTGGACCGACTGGAATCTGGCCCTGAATCCTGAAGGCGGCCCTAACTGGGTCCGAAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGACATCACCAAGGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGACACTTCAGCAAGTTCATCCCGAGGGCTCTCAGCGCGTTGGACTGGTGGCTTCCCAGAAGAACGATCTGGACGCCGTGGCTCTGATGCACCCCTGATGGATCTGCTGTGGTGGTGGTCTCTGAACCGCAGCAGCAAGATGTGCCCCTGACCATCAAGGATCCCGCCGTGGGATTCTCTGGAACAATCAGCCCTGGCTACTCCATCCACACCTACCTGTGGCGTAGACAG
34	WO2020012164_13	ATGGAGTTCAGCTCCCCCTTCTAGGGAGGAGTGCCCTAAGCCACTGTCTCGCGTGAGCATCATGGCAGGAAGCCTGACCGGACTGCTGCTGCTGTCAGGCCGTGTCTTGGGCATCTGGAGCAAGGCCCTGCATCCCTAAGTCTTTCGGCTACTCTAGCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCCACCTATTGTGACTCCTTCGATCCCCCTACCTTTCCCGCCCTGGGCACATTTTCTCGGTACGAGAGCACAAGATCCGGCCGGAGAATGGAGCTGTCTATGGGCCCCATCCAGGCCAATCACACCGGAACAGGACTGCTGCTGACCCTGCAGCCTGAGCAGAAGTTCAGAAAGTGAAAGGGCTTTGGAGGAGCAATGACAGACGCAGCCGCCCTGAACATCCTGGCCCTGAGCCCCACCGCCAGAAATCTGCTGCTGAAGTCTTACTTCAGCGAGGAGGGCATCGGCTATAACATCATCCGGGTGCCAATGGCCTCCTGTGACTTTTCTATCAGAACCTACACATATGCCGATACCCCCGACGATTTCCAGCTGCACAATTTTCCCTGCCTGAGGAGGATACAAAGCTGAAGATCCCACTGATCCACAGGGGCCCTGCAGCTGGCACAGAGGCCTGTGAGCCTGCTGGCATCCCCATGGACCTCTCCACATGGCTGAAGACCAACGGCGCCGTGAATGGCAAGGGAAGCCTGAAGGCAGGCCAGCCAGCGACATCTACCACCAGACATGGGCCCGGTATTTCTGTGAAGTTTCTGGATGCCTACGCCGAGCACAAGCTGCAGTTCCTGGCGAGTGACCGCAGAGAACGAGCCATCTGCCGGACTGCTGAGCGGATATCCATTCCAGTGCCTGGGCTTTACACCCGAGCACCAGAGGGACTTTATCGCAAGGGATCTGGGACCTACCCTGGCCAATCCACACACCACAATGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGATCAGAGACTGCTGCTGCCCCACTGGGCCAAGGTGGTGCTGACCGACCTGAGGCCGCCAAGTACGTGCACGGCATCGCCGTGCACTGGTATCTGGATTTCTTGGCACCAGCAAGGCCACCCCTGGGAGAGACACACAGGCTGTTCCCCAACACCATGCTGTTTGCCAGCGAGGCCCTGCGTGGGCTCCAAGTTTGGGAGCAGTCCGTGCGGCTGGGATCTTGGGACAGAGGCATGCAGTACAGCCACTCCATCATCACCAATCTGCTGTATCACGTGGTGGGCTGGACAGACTGGAACCTGGCCCTGAATCCTGAGGGCGGCCAAACTGGGTGAGAAATTTCTGGATAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGATACATTCTACAAGCAGCCTATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCTAAGTTTATCCCAGAGGGAAGCCAGAGGGTGGGACTGGTGGCAAGCCAGAAG

		AACGACCTGGATGCCGTGGCCCTGATGCACCCAGATGGCTCCGCCGTGGTGGTGGTGCTGAATCGCTCCTCTAAGGACGTGCCCCTGACC ATCAAGGATCCTGCCGTGGGCTTTCTGGAGACCATCAGCCCCGGCTACTCCATCCACACATATCTGTGGAGGGCCAGTGA
35	WO2020012164_14	ATGGAGTTCTCTTCTCCATCTCGCGAGGAGTGCCCTAAGCCACTGAGTCGAGTGTCTATCATGGCCGGCAGTCTGACAGGACTCCTCCTC CTACAAGCTGTGTCTTGGGCCAGTGGCGCCCGGCCATGCATCCCAAAGTCTTTCGGGTACTCTAGCGTGGTGTGCGTGTGCAACGCTACA TACTGCGACTCTTTCGACCCACCTACATTCCCCGCCCTGGGAACCTTCAGCCGATACGAGTCTACACGGTCCGGGCGGCGCATGGAGCTG TCAATGGGGCCAATTCAGGCTAACCACACCGGAACAGGACTCCTGTGACATTACAACCCGAGCAGAAGTTCAGAAGGTGAAGGGGTTT GGCGGAGCTATGACCGACGCTGCCGCTCTGAACATTCTGGCCCTGTCCCCACCCGCTCAGAACCTGCTCCTCAAGTCTTACTTCAGCGAG GAGGGAATCGGGTACAACATTATTAGAGTGCCTATGGCTTCTTGCGACTTCAGCATCCGCACATACACATACGCCGACACCCCTGACGAC TTCCAGCTGCACAACCTTCAGCCTCCCAGAGGAGGACACAAAGCTCAAGATCCCACTGATTCACCGCGCTTTACAGCTCGCTCAGAGGCCA GTGTCTCTGCTCGCTTCCCCTTGGACATCTCCAACATGGTTAAAAACAAACGGCGCCGTGAACGGAAGGGGTCCCTGAAGGGGCAGCCC GGAGACATTTACCACCAGACATGGGCCAGGTACTTCGTGAAGTTCCTCGACGCTTACGCTGAGCACAAGCTCCAGTTCTGGGCCGTGACC GCCGAGAACGAGCCTAGCGCCGGCCTGCTGTCCGGATACCCCTTCCAGTGCCTCGGATTACACCCAGAGCACCAGCGGGACTTCATTGCT AGAGACCTCGGGCCAACACTCGCTAACTCTACCCACCACAACGTGAGACTGCTGATGCTCGACGACAGCGCCTCCTGTGCCCTCACTGG GCTAAGGTGGTGCTCACAGACCCGAGGGCCGCAAGTACGTGCACGGAATTGCCGTGCACTGGTATCTCGACTTCTCGCCCTCAGCTAAG GCTACACTCGGCAGACCCACAGGCTGTTCCCTAACACAATGCTGTTGCCAGCGAGGCTTGCGTGGAAGCAAGTCTGGGAGCAGTCC GTGAGACTCGGATCTTGGGACCGCGGAATGCAGTACTCTCACTCTATCATTACAAACCTCCTGTACCACGTGGTGGGATGGACCGACTGG AACCTGGCTCTCAACCCCGAGGGCGGGCCAAACTGGGTGAGAACTTCGTGGACAGCCCTATTATTGTGGACATTACAAAGGACACCTTC TACAAGCAGCCTATGTTCTACCACCTCGGGCACTTCAGCAAGTTCATCCCCGAGGGATCTCAGAGAGTGGGACTGGTGGCCTCTCAGAAG AACGACCTCGACGCTGTGGCTCTGATGCACCTGACGGGTGGCCGTGGTGGTGGTGCTCAACCGATCTAGCAAGGACGTGCCACTGACA ATTAAGGACCCCGCCGTGGGGTTCCTGGAGACAATTAGCCCCGGATACTCCATTACACATACCTGTGGCGCAGGCAGTGA
36	WO2020012164_15	ATGGAGTTTAGCAGCCCTAGCAGAGAAGAGTGCCCTAAGCCTCTGTCTCGTGTGAGCATCATGGCCGGCTCCTTAACCGGATTATTACTG CTGCAAGCTGTGTCTTGGGCTTCCGGCGTAGGCCCTTGATTTCCCAAGTCTTTCGGCTACTCCTCCGTGGTGTGCGTCTGTAATGCCACC TACTGTGACAGCTTCGATCCCCCACATTCCCGCTCTGGGCACATTTTCTGTTACGAAAGCACTCGTAGCGGAAGGAGATGGAGCTG AGCATGGGCCCTATTCAAGCTAACCACACCGGCACCGGTTTATTACTGACTTTACAACCCGAGCAGAAGTTCAGAAGGTGAAGGGCTTT GGAGGGCGCCATGACAGACGCCGCCGCTTTAAATATTCTGGCTTTAAGCCCTCCCGCCAAAATCTGCTGCTGAAGTCTTACTTCTCCGAG GAAGGCATCGGCTACAACATCATTAGGGTCCCTATGGCCTCTGTGACTTCAGCATTAGGACCTACACCTACGCCGACACCCCCGACGAC TTCCAGCTGCACAACCTTCTCTTACCCGAGGAGGATACAAAGCTGAAGATCCCTTTAATCCATCGTGCCCTCCAGCTGGCTCAGAGGCC GTTAGCTTATTAGCCTCCCCTTGGACATCCCCTACTTGGCTGAAAACCAACGGCGCTGTCAACGGAAGGGCTCTTTAAAGGGACAGCCC GGCGACATTTACCACCAGACATGGGCTAGGTACTTCGTGAAGTTTTTAGACGCTTATGCCGAACACAAGCTGCAGTTCTGGGCCGTGACC GCTGAGAACGAGCCTTCCGCCGGTTTACTGTCCGGATACCCCTTCCAATGTCTGGGATTACCCCCGAACACCAGAGGGACTTCATCGCC AGAGATCTGGGCCCCACACTGGCCAATTCCACACACCACAACGTGAGACTGCTCATGCTGGACGACCAGAGGTTATTACTCCCTCACTGG GCCAAAGTGGTGCTGACCGACCCCGAAGCTGCCAAGTATGTGCATGGAATCGCCGTGCACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCCCGCCAAG GCTACACTGGGCGAGACCCACAGACTGTTCCCTAACACCATGCTCTTCGCCAGCGAAGCTTGCCTGGGAAGCAAGTCTGGGAGCAATCC GTGAGGCTGGGCAGCTGGGATCGTGGCATGCAGTACTCCCACTCCATTATCACAAATCTGCTCTACCACGTCGTGGGATGGACCGATTGG AATTTAGCTCTGAACCCCGAGGGAGGCCCCAATTGGGTGAGGAACTTCGTGGATTCCCCCATCATCGTCGATATACCAAGGACACATTC TACAAGCAGCCCATGTTCTACCATTTAGGCCACTTTAGCAAGTTCATCCCCGAGGGAAGCCAGAGAGTGGTTAGTGGCCTCCCAGAAG AACGATCTGGACGCCGTCCGCCCTCATGCATCCGAGCTGGCAGCGCTGTGGTCTGCTGCTGAATAGAAGCTCCAAGGACTCCCTTTAACC ATCAAGGACCCCGCCGTGGGCTTTCTGGAACCATCTCCCCGGTTATAGCATCCACACCTATTTATGGAGAAGACAGTAA
37	WO2020012164_16	ATGGAATTTTCTAGCCCCTCCAGAGAGGAATGCCCCAAGCCTCTGAGCCGGGTGTCAATCATGGCCGGATCTCTGACAGGACTGCTGCTG CTTCAGGCCGTGTCTTGGGCTTCTGGCGCTAGACCTTGATCCCCAAGAGCTTCGGCTACAGCAGCGTCGTGTGCGTGTGCAATGCCACC TACTGCGACAGCTTCGACCCCTCTACCTTTCTGCTCTGGGCACCTTCAGCAGATACGAGAGCACCAGATCCGGCAGACGGATGGAAGT AGCATGGGACCCATCCAGGCCAATCACACAGGCACTGGCCTGCTGCTGACACTGCAGCCCAGCAGAAATTCAGAAAGTGAAGGGCTTC GGCGGAGCCATGACAGATGCCGCCGCTCTGAATATCCTGGCTCTGTCTCCACCAGCTCAGAACCTGCTGCTCAAGAGCTACTTCAGCGAG GAAGGCATCGGCTACAACATCATCAGAGTGGCCATGGCCAGCTGCGACTTCAGCATCAGGACCTACACCTACGCCGACACACCCGACGAT

		TTCCAGCTGCACAACTTCAGCCTGCCTGAAGAGGACACCAAGCTGAAGATCCCTCTGATCCACAGAGCCCTGCAGCTGGCACAAAGACCC GTTTCTCTGCTGGCTAGCCCCCTGGACATCTCCACCTGGCTGAAAACAAATGGCGCCGTGAATGGCAAGGGCAGCCTGAAAGGCCAACCT GGCGATATCTACCACCAGACCTGGGCCAGATACTTCGTGAAGTTCCTGGACGCCTATGCCGAGCACAAAGCTGCAGTTTGGGCCGTGACA GCCGAGAACGAACCTTCTGCTGGACTGCTGAGCGGCTACCCCTTTCAGTGCCCTGGGCTTTACACCCGAGCACAGCGGGACTTTATCGCC AGAGATCTGGGACCCACACTGGCCAATAGCACCCACCATAATGTGCGGCTGCTGATGCTGGACGACCAGAGACTGCTTCTGCCCCACTGG GCTAAAGTGGTGCTGACAGATCCTGAGGCCGCCAAATACGTGCACGGAATCGCCGTGCACTGGTATCTGGACTTTCTGGCCCCCTGCCAAG GCCACACTGGGAGAGACACACAGACTGTTCCCCAACACCATGCTGTTCCGCAGCGAAGCCTGTGTGGGCAGCAAGTTTGGGAACAGAGC GTGCGGCTCGGCAGCTGGGATAGAGGCATGCAGTACAGCCACAGCATCATCACCACCTGCTGTACCACGTCGTCGGCTGGACCGACTGG AATCTGGCCCTGAATCCTGAAGGCGGCCCTAACTGGGTCCGAAACTTCGTGGACAGCCCCATCATCGTGGACATCACCAAGGACACCTTC TACAAGCAGCCCATGTTCTACCACCTGGGACACTTCAGCAAGTTCATCCCCGAGGGCTCTCAGCGCGTTGGACTGGTGGCCAGCCAGAAG AATGATCTGGACGCCGTGGCTCTGATGCACCTGATGGATCTGCTGTGGTGGTCTCCTGAACCGGTCCAGCAAAGATGTGCCCTGACC ATCAAGGATCCCGCCGTGGGATTCTTGAAACAATCAGCCCTGGCTACTCCATCCACACCTACCTGTGGCGGAGACAGTAG
38	由SEQ ID NO: 12 編碼的 IgG重鏈分泌信號肽胺基酸 序列	MGWSCIILFLVATATGVHS
39	人類GCase蛋白同功型1分 泌信號肽胺基酸序列(由 NCBI 參 考 序 列： NM_000157.4編碼)	MEFSSPSREECPKPLSRVSIMAGSLTGLLLLQAVSWASG
40	人類GCase蛋白同功型1成 熟多肽胺基酸序列(由NCBI 參考序列：NM_000157.4 編碼)	ARPCIPKSFYSSVVCVNATYCDSFDPPTFPALGTFSTRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQVKVGFGGAMTDAAA LNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRVPSLLASPWD SPTWLKTNGAVNGKGLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGTFPEHQRFDIARDLGPTLAN STHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSDWRG MQYSHSIIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALM HPDGSAVVVVNLNRSSKDVPLTIKDPAVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ
41	編碼人類GCase蛋白前驅體 (SEQ ID NO: 16)的核苷酸 序列；與SEQ ID NO: 12及 SEQ ID NO: 13同框組合	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTGGCAACAGCTACAGGTGTGCACTCCGCCAGACCCTGCATCCCTAAGAGCTTTGGCTAT AGTTCTGTGGTTTGTGTGTGCAATGCCACATACTGTGACTCATTTGACCCTCCTACATTTCTGCACTGGGCACTTTTCAGCAGGTATGAG TCTACCAGATCTGGCAGGAGGATGGAGCTGAGCATGGGGCCTATCCAGGCTAACCACACCGGCACAGGGCTGCTGCTGACTCTGCAGCCC GAACAGAAATTCAGAAGGTTAAGGGTTTTGGAGGAGCCATGACAGATGCAGCAGCCCTGAACATTTTGGCTCTCAGCCCTCCAGCTCAG AACCTGCTCCTTAAATCATACTTCAGTGAAGAAGGAATTGGCTACAACATCATAAGAGTACCCATGGCCAGCTGTGATTTTCCATTAGA ACCTACACTTATGCTGATACTCCTGATGATTTTTCAGCTGCACAACTTTTCCCTCCCTGAAGAGGACACAAAGCTCAAGATTCCCCTCATT CACAGAGCCCTGCAACTGGCCAGAGGCCTGTGTCCTGCTGGCCAGCCCTGGACATCTCCAACATGGCTGAAAACCAATGGAGCAGTA AATGGCAAAGGTTCCCTTAAGGGCCAGCCAGGAGACATCTACCACCAAACCTGGGCCAGGTATTTTGTGAAGTTTCTGGATGCCTATGCA GAGCATAAGCTGCAGTTTGGGCAGTGACTGCTGAAAATGAACCTCTGCTGGACTGCTCTCAGGGTATCCCTTCCAGTGCCTGGGATTT ACTCCTGAGCACCAGAGAGATTTTCATTGCCAGAGACCTGGGGCCACCCTTGCCAACAGCACACACCACAATGTTAGACTGCTGATGCTG GATGACCAGAGGCTGCTCCTTCCCCACTGGGCAAAAGTGGTGCTGACTGACCAGAGGGCCGCAAGTATGTCCATGGCATCGCCGTTTCAT TGGTACCTGGACTTCCTGGCCCCCTGCCAAGGCCACCTTGGGGGAGACACATAGGCTCTTCCCCAACACCATGCTGTTTGCCTCAGAAGCC TGTGTGGGTTCCAAATTTTGGGAGCAGTCTGTTAGGCTGGGCTCCTGGGACAGGGGCATGCAGTACAGCCATTCCATCATACCAATCTG CTGTACCATGTGGTAGGCTGGACCGACTGGAATCTTGCCCTCAACCCAGAAGGTGGCCCCAACTGGGTGAGAACTTCGTGGACAGCCCC ATCATCGTGGATATTACCAAAGACACCTTCTACAAGCAGCCCATGTTTTATCACCTGGGCCACTTCTCCAAGTTCATCCCTGAGGGAAGC CAGAGAGTGGGATTGGTTGCCTCCCAGAAGAATGATCTCGATGCTGTGGCCCTCATGCACCCAGATGGCAGCGCAGTGGTAGTAGTACTG AACAGGTCATCTAAGGATGTCCTCTCACTATTAAAGATCCTGCAGTGGGCTTCTTGGAGACCATCAGCCCCGGATACAGCATCCACACC TACCTGTGGAGGAGACAGTGA

42	包 含 兩 個 AMBP ehnl、 hALB prox ehnl及hALB pro 的轉錄控制區域	GTAAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAA AACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCAACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTGGATCCGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCC AAGTGGCCCTTGGCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACATTCCTGGAGGCAGGAGAAGAAATCA ACATCCTGGACTTATCCTCTGGGCCTCAGATCTGTTAACAGCATGCGTGAGTACTTGTGTGTAAATTTTTCATTATCTATAGGTAAAAGC ACACTTGGAATTAGCAATAGATGCAATTTGGGACTTAACTCTTTCAGTATGTCTTATTTCTAAGCAAAGTATTTAGTTTGGTAGTAATT ACTAAACACTGAGAACTAAATTGCAAACACCAAGAACTAAAATGTTCAAGTGGGAAATTACAGTTAAATACCATGGTAATGAATAAAAGG TACAAATCGTTTAACTCTTATGTAAAATTTGATAAGATGTTTTACACAACCTTAATACATTGACAAGGTCTGTGGAGAAAACAGTTCC AGATGGTAAATATACACAAGGGATTTAGTCAAACAATTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTTGTAAATCGGTTGGCAGCCAATGAAATAC AAAGATGAGTCTAGTTAATAATCTACAATTATTGGTTAAAGAAGTATATTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCTAGCTTTCTCTTCT GTCAACCCACACGCCTTTGGCAC
43	GBA探針引子	TTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGGC
44	GBA正向引子	AATGCGATGCAATTTCTCATT
45	GBA反向引子	TGCCAGCCATCTGTTGTT

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="C253565SEQBX20240902C.xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-09-02">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112102851</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-01-19</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>PC072728A</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/267,046</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-01-21</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商輝瑞大藥廠</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Pfizer Inc.</ApplicantNameLatin>
  <InventorName languageCode="zh">羅伯特 D 貝爾</InventorName>
  <InventorNameLatin>BELL, ROBERT D.</InventorNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">用於高歇氏(GAUCHER)病之基因療法</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>45</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>736</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..736</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
<INSDQualifier id="q2">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAADGYLPDWLEDNLSEGI REWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGLDKG
EPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGK
KRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPPAAP TSLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVG
NSSGNWHCDSQWLGRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
NWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNN
GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLI
FSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNI
FGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTRTVNDQ GALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKI
PHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT
SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>599</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..599</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPTSLG
SNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLMNPLID
QYLYLNRQTGTTSGTTNQSRLIFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLNVN
PGPAMASHKDDEEKFFPMHGNIIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEIRTTPVATEQYGTVANLQSSNTAPTTRTVNDQ
GALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGFGFLKHPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQV
SVEIEWELQKENSQRWNPEIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>534</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..534</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS
GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTTVQVFT
DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHSSY
AHQSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRQTGTTSGTTNQSRLIFSQAGPQMSLQARNWLPGPCYRQRLSKTANDNNNSNFPWT
AASKYHLNGRDSLNVNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGNIIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEIRTTPVATEQYGTVANL
```

```
QSSNTAPTTRTVNDQGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAK IPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSP
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>737</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..737</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MAADGYLPDWLEDTLSEGI RQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG
EPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGK
KRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQP IGEPPAAPSGVGSLTMAAGGGAPMADNNEGADGVG
NSSGNWHCDSTWMGDRVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLI
NNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTL
NNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTTGGTTNTQTL
GFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVL
IFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAK
IPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSF ITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQY
TSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>600</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..600</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPIGEPPAAPSGVG
    SLTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYST
    PWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
    HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPL
    IDQYLYYLSRTQTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
    NPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEERTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNT
    QGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQ
    VSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>535</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..535</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="ql2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNST
SGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQV
FTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHS
SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTGGTTNTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSW
TGATKYHLNGRDSLVPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTN
LQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFN
QSKLSNFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<INSDQualifier id="ql4">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Adeno-associated dependoparvovirus
A</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>腺相關依賴性細小病毒
A</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcg
tcgggcgaccttttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggccaactccatcactaggggtt
cct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gttaatttttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactctctctgtt
tgctctggttaataatctcaggagcacaaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatacctctggg
cct</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>314</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..314</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="ql8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gcatgcgtgagtacttgtgtgttaaatttttcattatctataggtaaaagcacacttggatt
agcaatagatgcaatttgggacttaactctttcagtatgtcttatttctaagcaaagtatttagtttggttagtaattac
taaacactgagaactaaattgcaaacaccaagaactaaaatgttcaagtgggaaattacagttaaataccatggtaatga
ataaaaggtacaaatcgtttaactcttatgtaaaatttgataagatgttttacacaactttaatacattgacaaggtct
tgtggagaaaac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>210</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
<INSDFeature_location>1..210</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q20">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agttccagatggttaaatacacaaagggatttagtcaaacaatttttggcaagaatattat
gaattttgtaatcggttggcagccaatgaaatacaaagatgagtcctagttaataatctacaattattggttaaagaagta
tattagtgctaatttcctccgtttgtcctagcttttcttctgtcaacccacacgcctttggcac</INSDSeq_se
quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>850</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..850</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q22">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gtgagtctatgggacccttgatgttttctttcccttcttttctatggttaagttcattgtca
taggaaggggagaagtaacagggtacagtttagaatgggaaacagacgaatgattgcatcagtggtgaagtcacaggatc
gttttagtttcttttatttgctgttcataacaattgttttcttttgtttaattcttgctttcttttttttcttctccgc
aatttttactattatacttaatgccttaacattgtgtataacaaaaggaaatatctctgagatacattaagtaacttaa
aaaaaactttacacagtccttagtacattactatttggaaatatgtgtgcttatttgcatattcataatctccctac
tttttttcttttatttttaattgatacataatcattatacatatttatgggttaaagtgtaatgttttaatatgtgtac
acatattgaccaaatacagggtaatgttcattgttaattttaaaaaatgctttcttcttttaatacttttttggttat
cttatttctaatactttccctaatactcttttctttcaggggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattcta
aagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatcttgcatataaataattcttgcatataaattgtaact
gatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggct
ggattattctgagtcgaagctaggcccttttgctaatacatgttcataacctttatcttctctccacag</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>57</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..57</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</INSDSeq_feature-table>

```

```
<INSDSeq_sequence>atgggatggagctgtatcatcctcttcttgggtggcaacagctacaggtgtgcactcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1494</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1494</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unidentified</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>未鑑別</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>gccagaccctgcatccctaagagctttggctatagttctgtggtttgtgtgtgcaatgccac
  atactgtgactcatttgaccctcctacatttccctgcactgggcactttcagcaggtatgagtctaccagatctggcagga
  ggatggagctgagcatggggcctatccaggctaaccacaccggcacagggtgctgctgactctgcagcccgaacagaaa
  ttccagaaggttaagggttttggaggagccatgacagatgcagcagccctgaacattttggctctcagccctccagctca
  gaacctgctccttaaatcatacttcagtgaagaaggaattggctacaacatcataagagtacccatggccagctgtgatt
  tttccattagaacctacattatgctgatactcctgatgattttcagctgcacaacttttccctccctgaagaggacaca
  aagctcaagattcccctcattcacagagccctgcaactggcccagaggcctgtgtccctgctggccagcccctggacatc
  tccaacatggctgaaaaccaatggagcagtaaatggcaaaggttcccttaagggccagccaggagacatctaccacaaa
  cctgggccaggtattttgtgaagttcctggatgcctatgcagagcataagctgcagttttgggcagtgactgctgaaaat
  gaacctctgctggactgctctcagggtatcccttccagtgcctgggatttactcctgagcaccagagagatttcattgc
  cagagacctggggcccacccttgccaacagcacacaccacaatgttagactgctgatgctggatgaccagaggctgctcc
  tccccactgggcaaaagtgggtgctgactgacctcagaggccgccaagtatgtccatggcatcgccgttcatttggtacctg
  gacttcttgggccctgccaaggccaccttgggggagacacataggctcttccccaacaccatgctgtttgcctcagaagc
  ctgtgtgggttccaaattttgggagcagctctgttaggctgggctcctgggacaggggcatgcagtacagccattccatca
```

```

tcaccaatctgctgtaccatgtggtaggctggaccgactggaatcttgcctcaaccagaaggtggccccaactgggtg
agaaacttcgtggacagcccatcatcgtggatattaccaaagacaccttctacaagcagcccatgttttatcacctggg
ccacttctccaagttcatccctgaggggaagccagagagtgggattggttgcctcccagaagaatgatctcgatgctgtgg
ccctcatgcaccagatggcagcgagtggttagtagtactgaacaggtcatctaaggatgtgcctctcactattaaagat
cctgcagtgggcttcttggagaccatcagccccggatacagcatccacacctacctgtggaggagacagtga</INSDSeq
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>228</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..228</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q28">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Bos taurus</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>溫帶牛</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgacc
ctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtgtctgagtaggtgtcattctat
tctggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggct
ctatgg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Adeno-associated dependoparvovirus
A</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>腺相關依賴性細小病毒
A</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggaacccttagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
ggcgaccaaaggtcgcccgacggcggtttggcgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggc
caa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>516</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..516</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q32">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGWSCIIILFLVATATGVHSARPCIPKSFSGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYEST
RSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYPSEEGIGYNIIRVPM
ASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS�KGQPGD
IYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLMLDD
QRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAPHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQY
SHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFİPEGSQRVGLVASQKND
LDAVALMHPDGSASVVVVLNRSSKDVPŁTIKDPAVGLETİSPGYSİHTYLWRRQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>4202</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..4202</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q34">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcg
tcgggcgaccttttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgcgagagaggagtgggcaactccatcactaggggtt
ccttacgtacctaggtcgagaattcgtaatttttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactc
tctctgtttgctctggttaataatctcaggagcacaaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttat
cctctgggcctggatccgttaatttttaaaaagcagtcaaaagtccaagtggcccttggcagcatttactctctctgttt
gctctggttaataatctcaggagcacaaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatcctctgggc
ctcagatctgttaacagcatgctgtgagtacttgtgtgttaaatttttcattatctataggtaaaagcacacttggattag
caatagatgcaatttgggacttaactctttcagtatgtcttattttctaagcaaagtatttagtttggttagtaattacta
aacactgagaactaaattgcaaacaccaagaactaaaatgttcaagtgggaaattacagttaaataccatggtaatgaat
aaaaggtacaaatcgtttaactcttatgtaaaaatttgataagatgttttacacaactttaatacattgacaaggctcttg
tgagaaaaacagttccagatggtaatatatacacaagggttttagtcaaacaatttttggcaagaatattatgaattttg
taatcggttggcagccaatgaaatacaaagatgagtcctagttaataatctacaattatttggttaaagaagtatattagt
ctaatttccctccgtttgtcctagcttttctcttctgtcaacccacacgcctttggcactagtcagggtgagtcctatggg
acccttgatgttttctttcccttcttttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacagttt
agaatgggaaacagacgaatgattgcatcagtggtgaagtcctcaggatcgtttttagtttcttttatttgcgttcataac
aattgttttcttttggttaattcttgctttcttttttcttctccgcaatttttactattatacttaatgccttaaca
ttgtgtataacaaaaggaaatatctctgagatacattaagtaacttaaaaaaaaaactttacacagtcctgcctagtacatt
actatttggaatatatgtgtgcttatttgcatactcataatctccctactttattttcttttatttttaattgatacata
atcattatacatatttatgggttaaagtgtaatgttttaatatgtgtacacatataggacaaatcagggttaattttgcat
ttgtaattttaaaaaatgctttcttcttttaataatacttttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctcttc
tttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaagg
caatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaatgttaactgatgtaagaggtttcatttgctaatagcag
ctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctttt
gctaatacatgttcataacctcttatcttctccacagggtgtcgttctagcactatcaagcttccctggccaccatgggat
ggagctgtatcatcctcttcttgggtggcaacagctacagggtgtgcactccgccagaccctgcatccctaagagctttggc
tatagttctgtggtttgtgtgtgcaatgccacatactgtgactcatttgaccctctacatttctgactgggcacttt
cagcaggtatgagtcctaccagatctggcaggaggatggagctgagcatggggcctatccaggctaaccacaccggcacag
ggctgctgctgactctgcagcccgaacagaaattccagaagggttaagggttttggaggagccatgacagatgcagcagcc
ctgaacattttggctctcagccctccagctcagaacctgctccttaaatcatacttcagtgaagaaggaattggctacaa
catcataagagtacctatggccagctgtgattttccattagaacctacacttatgtgtatactcctgatgattttcagc
tgcacaacttttccctccctgaagaggacacaaagctcaagattccctcattcacagagccctgcaactggcccagagg
cctgtgtccctgctggccagcccctggacatctccaacatggctgaaaaccaatggagcagtaaatggcaaaggttccct
taagggccagccaggagacatctaccacaaacctgggccaggtattttgtgaagttcctggatgcctatgcagagcata
agctgcagttttgggcagtgactgctgaaaatgaacctctgctggactgctctcagggtatcccttccagtgcctggga
tttactcctgagcaccagagagatttcatatggcagagacctggggcccacccttgccaacagcacacaccacaatgttag
actgctgatgctggatgaccagaggctgctccttccccactgggcaaaagtgggtgctgactgaccagaggccgccaagt
atgtccatggcatcgccgttcattgggtacctggacttccctggcccttgccaaggccaccttgggggagacacataggctc
ttccccaacaccatgctgtttgcctcagaagcctgtgtgggttccaaattttgggagcagtcctgttaggctgggctcctg
ggacaggggcatgcagtacagccattccatcatcaccaatctgctgtaccatgttggttaggctggaccgactggaatcttg

```
ccctcaaccagaaggtggccccaactgggtgagaaacttcgtggacagccccatcatcgtggatattaccaagacacc
ttctacaagcagcccatgttttatcacctgggccacttctccaagttcatccctgaggggaagccagagagtgggattggt
tgcctcccagaagaatgatctcgatgctgtggccctcatgcaccagatggcagcgcagtggttagtagtactgaacaggt
catctaaggatgtgcctctcactattaaagatcctgcagtgggcttcttggagaccatcagccccggatacagcatccac
acctacctgtggaggagacagtgacatatggcgactgtgccttcttagttgccagccatctgtttgtttgccccctccccgt
gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttttctaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagta
ggtgtcattctattctggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatgcggtgggctctatggctagcgtacgcttgtggcaaacttcgtcagtccttattttaagaaattgccacagctaccac
cctgatcagtcagcagccaacaacaacgaggcaagatcctctgtcagcaaaaagattttgatttgctgcaggctcacaag
attgttagcaatttttagcaataaagcaattttaaattaagtatatatacaaattattagacaaattgctattgcacactta
atagacttttagtgctaacaaaactttttaggcactgggaaacaaaaaattgttgccgcttgctttattgagttggtct
ggaacctaacctgtagtatctccgaggtttgcctgtatctttaattgtaatttgccttcacagctagcagtactaggaa
cccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgcctcactgaggccgggcgaccaaaggctgccccgacg
cccggtctttgcccggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Adeno-associated dependoparvovirus
A</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>腺相關依賴性細小病毒
A</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggcc
ggcgaccaaaggtcgcccgacggcggtttggcgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagcag</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Adeno-associated dependoparvovirus
A</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>腺相關依賴性細小病毒
A</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttgg
tcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtggccaaactccatcactaggggttcct</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>658</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..658</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacattgattattgactagttattaatagtaataattacggggtcattagttcatagccca
tatatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggcccgcttgctgaccgccaacgacccccgccattgacgtc
aataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaactg
cccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtacccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgctgg
cattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtatttagtcacgtattaccatggg
tcgaggtgagccccacgttctgtcttactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattttattttt
taattattttgtgcagcgtatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcgggggcgaggggcggggcg
gggcgaggcgagaggtgcggcgccagccaatcagagcggcgcgcctccgaaagtttcttttatggcgaggcggcggcgg
cggcgccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>380</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..380</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q42">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagccca
tatatggagttccgcgttacataacttacggtaaattggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtc
aataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggactatttacggtaaactg
cccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgctgg
cattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatttagtcacgcgtattaccatg</
INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>278</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..278</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccaccccccaatt
ttgtattttattttattttttaattattttgtgcagcgatgggggcggggggggggggggggsgcgcgccggggggggggggg
ggggggggggggggggggggsggggsgrggcgagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttcctt
ttatggcgaggcggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcgggcgggcg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>196</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..196</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q46">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gcattctcaattagtcagcaaccatagtcgccgccctaactccgcccattccgcccctaactc
cgcccagttccgcccattctccgcccattggctgactaattttttttttttatgcagaggccgaggccgcctcggcctct
gagctattccagaagtagtgaggaggcttttttgaggccctaggcttttgcaaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>taagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatt
tgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagtt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q50">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aacttgttttattgcagcttataatggtttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaa
taaagcatttttttctactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtcttgatc</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>56</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..56</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>aataaaggaaattttattttcattgcaatagtggttgaatTTTTGTGTCTCTCA</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>589</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..589</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q54">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctcc
ttttacgctatgtggatacgtgcttttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcatTTTTCTCCTCCT
tgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgttt
gctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctat
tgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtgg
tgttgctcggggaaatcatcgctcctttccttggtgctgcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgc
tacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcg
ccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
```

```
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q56">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagttttcaagtccttccagagaggaatgtcccaagcctttgagtagggtaagcatcat
ggctggcagcctcacaggattgcttctacttcaggcagtgctgtgggcatcaggtgcccgccctgcacccctaaaagct
tcggctacagctcgggtggtgtgtgtctgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccgaccttctctgcccttgg
accttcagccgctatgagagtacacgcagtgggcgacggatggagctgagtatggggcccatccaggctaatacacacggg
cacaggcctgctactgacctgcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggatttgaggggcccatgacagatgctg
ctgctctcaacatccttgccctgtcacccccctgccccaaatttgctacttaaatacgtacttctctgaagaaggaatcgga
tataacatcatccgggtacccatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacacccctgatgattt
ccagttgcacaacttcagcctcccagaggaagataccaagctcaagataccccctgattcaccgagccctgcagttggccc
agcgtcccgtttcactccttgccagccccctggacatcacccacttggtcgaagaccaatggagcgggtgaatgggaagggg
tcactcaagggacagccccggagacatctaccaccagacctgggcccagatactttgtgaagttcctggatgcctatgctga
gcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaaaatgagccttctgctgggctgttgagtggataccccctccagtgcc
tgggcttcacccctgaacatcagcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacagtactcaccacaat
gtccgcctactcatgctggatgaccaacgcttgctgtctgccccactgggcaaaggtggtactgacagaccagaagcagc
taaataatgttcatggcattgctgtacattggtacctggacttcttggtccagccaaagccaccctaggggagacacacc
gcctgttccccaacaccatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagtgctgcggctaggg
tcctgggatcgagggatgcagtacagccacagcatcatcacgaacctcctgtaccatgttggtcggttgaccgactggaa
ccttgccctgaaccccgaaggaggaccaattgggtgcgtaactttgtcgacagtcccatcattgtagacatcaccaagg
acacgttttacaaacagcccattgttctaccaccttgccacttcagcaagttcattcctgagggctcccagagagtgggg
ctggttgccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactgatgcacccgatggctctgctgtttgtggtcgtgctaaa
ccgctcctctaaggatgtgcctcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcctggagacaatctcacctggctactcca
ttcacacctacctgtggcgctcgccagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagttttcaagtccttcagagaggaatgtcccaagcctttgagtagggtaagcatcat
ggctggcagcctcacaggattgcttctacttcaggcagtgctgtgggcatcaggtgcccgccctgcacccctaaaagct
tcggctacagctcgggtggtgtgtgtctgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccgaccttctctgcccttgg
accttcagccgctatgagagtacacgcagtgggcgacggatggagctgagtatggggcccatccaggctaatacacaggg
cacaggcctgctactgacctgcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggaatttgaggggccatgacagatgctg
ctgctctcaacatccttgccctgtcacccccgtgccccaaatttgctacttaaactcgtacttctctgaagaaggaatcgga
tataacatcatccgggtacctatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacaccttgatgattt
ccagttgcacaacttcagcctcccagaggaagataccaagctcaagataccccctgattcaccgagccctgcagttggccc
agcgtcccgtttcactccttgccagccccctggacatcacccacttggtcgaagaccaatggagcgggtgaatgggaagggg
tcactcaagggacagccccggagacatctaccaccagacctgggcccagatactttgtgaagttcctggatgcctatgctga
gcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaaaatgagccttctgctgggctgttgagtggataccccctccagtgcc
tgggcttcacctgaacatcagcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacagtactcaccacaat
gtccgcctactcatgctggatgaccaacgcttgctgctgccccactgggcaaaggtggtactgacagaccagaagcagc
taaatatgttcatggcattgctgtacattggtacctggacttcttggtccagccaaagccacctaggggagacacacc
gcctgttccccaacaccatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagtgctgggctaggg
tcctgggatcgagggatgcagtacagccacagcatcatcacgaacctcctgtaccatgtggctcggttgaccgactggaa
ccttgccctgaaccccggaaggaggaccaattgggtgcgtaactttgtcgacagtcccatcattgtagacatcaccaagg
acacgttttacaaacagcccattgttctaccaccttgccacttcagcaagttcattcctgagggtccagagagtgggg
ctggttgccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactgatgcacccgatggctctgctgttgtgtgctgctaaa
ccgctcctctaaggatgtgcctcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcctggagacaatctcacctggctactcca
ttcacacctacctgtggcgctcgccagtga</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>atggagttttcaagtccttcagagaggaatgtcccaagcctttgagtagggtaagcatcat
ggctggcagcctcacaggattgcttctacttcaggcagtgctgtgggcatcaggtgccccgccctgcacccctaaaagct
tcggctacagctcgggtggtgtgtgtctgcaatgccacatactgtgactcctttgacccccgaccttctctgcccttggt
accttcagccgctatgagagtacacgcagtgggcgacggatggagctgagtatggggcccatccaggctaatacacaggg
cacaggcctgctactgacctgcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggatttgaggggccatgacagatgctg
ctgctctcaacatccttgccctgtcacccccctgccccaaatttgctacttaaatacgtacttctctgaagaaggaatcgga
tataacatcatccgggtacctatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacaccttgatgattt
ccagttgcacaacttcagcctcccagaggaagataccaagctcaagataccccctgattcaccgagccctgcagttggccc
agcgtcccgtttcactccttgccagccccctggacatcacccacttggtcgaagaccaatggagcggatgaatgggaagggg
tcactcaagggacagccccggagacatctaccaccagacctgggcccagatactttgtgaagttccttggaatgcctatgctga
gcacaagttacagttctgggcagtgacagctgaaaatgagccttctgctgggctgttgagtggatacccccttcagtgcc
tgggcttcaccttgaaacatcagcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacagtactcaccacaat
gtccgcctactcatgctggatgaccaacgcttgctgctgccccactgggcaaaggtggtactgacagaccagaagcagc
taaataatgttcatggcattgctgtacattgggtacctggacttcttggtccagccaaagccaccctaggggagacacacc
gcctgttccccaacaccatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagtgtgcggctaggc
tcctgggatcgagggatgcagtacagccacagcatcatcacgaacctcctgtacctatgttggtcggttggaaccgactggaa
```

```
ccttgccctgaaccccgaaggaggacccaattgggtgcgtaactttgtcgacagtcccatcattgtagacatcaccaagg
acacgttttacaaacagcccatgttctaccaccttggccacttcagcaagttcattcctgagggctcccagagagtgggg
ctggttgccagtcagaagaacgacctggacgcagtggcactgatgcatcccgatggctctgctgtttgtggtcgtgctaaa
ccgctcctctaaggatgtgcctcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcctggagacaatctcacctggctactcca
ttcacacctacctgtggcgctgccagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1350</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1350</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q62">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>atggagctgagtatggggcccatccaggctaatacacacgggcacaggcctgctactgacct
gcagccagaacagaagttccagaaagtgaagggaatttgagggggccatgacagatgctgctgctctcaacatccttggcc
tgtcacccctgccccaaaatttgctacttaaatcgctacttctctgaagaaggaatcggatataacatcatccgggtaccc
atggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagacacccctgatgatttccagttgcacaacttcagcct
cccagaggaagataccaagctcaagatacccctgattcaccgagccctgcagttggcccagcgtcccgtttcactccttg
ccagcccctggacatcacccacttggctcaagaccaatggagcggatgaatgggaaggggtcactcaagggaacagcccga
gacatctaccaccagacctggggccagatactttgtgaagttcctggatgcctatgctgagcacaagttacagttctgggc
agtgcagctgaaaatgagccttctgctgggctgttgagtggataccccttccagtgctgggcttcacccctgaacatc
agcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacagtactcaccacaatgtccgcctactcatgctggat
gaccaacgcttgctgctgccccactgggcaaaggtgggtactgacagaccagaagcagctaaatatgttcatggcattgc
tgtacattggtacctggactttctggctccagccaaagccaccctaggggagacacaccgcctgttccccaacaccatgc
```

```
tctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagttctgggagcagagtgtgcggctaggctcctgggatcgagggatgcag
tacagccacagcatcatcacgaacctcctgtaccatgttggtcggctggaccgacttgaaccttgccctgaacccgaagg
aggaccaattgggtgcgtaactttgtcgacagtcccatcattgtagacatcaccaaggacacgttttacaaacagccca
tgttctaccaccttggccacttcagcaagttcatttcctgagggctcccagagagtggggctggttgccagtcagaagaac
gacctggacgcagtggcactgatgcatcccgatggctctgctgtttgttggtcgtgctaaaccgctcctctaaggatgtgcc
tcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcctggagacaatctcacctggctactccattcacacctacctgtggcgctc
gccagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1464</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1464</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q64">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>智人</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagttttcaagtccttccagagaggaatgtcccaagcctttgagttagggtaagcatcat
ggctggcagcctcacaggattgcttctacttcaggcagtgtcgtgggcatcaggtgcccgcacctgcacccataaaagct
tcggctacagctcgggtggtgtgtgtctgcaatgccacatactgtgactcctttgaccccccgaccttctcctgcccttgg
accttcagccgctatgagagtacacgcagtgggcgacggatggagctgagtatggggcccatccaggctaatacacggg
cacaggaatcggatataacatcatccgggtacctatggccagctgtgacttctccatccgcacctacacctatgcagaca
cccctgatgatttccagttgcacaacttcagcctcccagaggaagataccaagctcaagatacccctgattcaccgagcc
ctgcagttggcccagcgtcccgcttctactccttgccagccccctggacatcacccacttggctcaagaccaatggagcggt
gaatgggaaggggtcactcaagggacagccccggagacatctaccaccagacctggggccagatactttgtgaagttcctgg
atgcctatgctgagcacaagttacagttctgggcagtgcagctgaaaatgagccttctgctgggctgtttgagtggatac
```

```
cccttcagtgccctgggcttcacccctgaacatcagcgagacttcattgcccgtgacctaggtcctaccctcgccaacag
tactcaccacaatgtccgcctactcatgtctggatgaccaacgcttgctgctgccccactgggcaaaggtggtactgacag
accagaagcagctaaatatgttcattggcattgctgtacattggtacctggactttctggctccagccaaagccacccta
ggggagacacaccgcctgttccccaacacatgctctttgcctcagaggcctgtgtgggctccaagtctctgggagcagag
tgtgcggctaggctcctgggatcgagggatgcagtacagccacagcatcatcacgaacctcctgtaccatgtggtcggct
ggaccgactggaaccttgccctgaaccccgaaggaggacccaattgggtgcgtaactttgtcgacagtccecatcattgta
gacatcaccaaggacacgttttacaaacagcccatgttctaccaccttggccacttcagcaagttcattcctgagggtc
ccagagagtggggctggttgccagtcagaagaacgacctggacgcagtgccactgatgcatcccgatggctctgctgttg
tggtcgtgctaaaccgctcctctaaggatgtgcctcttaccatcaaggatcctgctgtgggcttcttgagacaatctca
cctggctactccattcacacctacctgtggcgctgccagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1608</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1608</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q66">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaattcagcagccccagcagagaggaatgccccaaagcctctgagccgggtgtcaatcat
ggccggatctctgacaggactgctgctgcttcaggccgtgtcttgggcttctggcgctagaccttgcatccccaagagct
tcggctacagcagcgtcgtgtgcgtgtgcaatgccacctactgcgacagcttcgacctcctacctttcctgctctgggc
accttcagcagatacagagaccagatccggcgagacggatggaactgagcatgggacctatccaggccaatcacacagg
cactggcctgctgctgacactgcagcctgagcagaaattccagaaagtgaaggcttcggcgaggccatgacagatgccg
ccgctctgaatatcctggctctgtctccaccagctcagaacctgctgctcaagagctacttcagcgaggaaggcatcggc
```

```
tacaacatcatcagagtgcccatggccagctgcgacttcagcatcaggacctacacctacgccgacacacccgacgattt
ccagctgcacaacttcagcctgcctgaagaggacaccaagctgaagatccctctgatccacagagccctgcagctggcac
aaagacccgtgtcactgctggcctctccatggacatctcccacctggctgaaaacaaatggcgccgtgaatggcaagggc
agcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggccagatacttcgtgaagtctctggacgcctatgccga
gcacaagctgcagttttgggccgtgacagccgagaacgaaccttctgctggactgctgagcggctacccctttcagtgcc
tgggctttacacccgagcaccagcgggactttatcgcccgtgatctgggacccacactggccaatagcaccaccataat
gtgcggtgctgatgctggacgaccagagactgcttctgccccactgggctaaagtgggtgctgacagatcctgaggccgc
caaatacgtgcacggaatcgccgtgactgggtatctggactttctggccccctgccaaggccacactgggagagacacaca
gactgttccccaacacccatgctgttcgccagcgaagcctgtgtgggcagcaagttttgggaacagagcgtgcggctcggc
agctgggtagagggcatgcagtacagccacagcatcatccaacctgctgtaccacgtcgtcggtggaccgactggaa
tctggccctgaatcctgaaggcggccctaactgggtccgaaacttcgtggacagccccatcatcgtggacatccaagg
acaccttctacaagcagcccatgttctaccacctgggacacttcagcaagttcatccccgagggctctcagcgcgttggga
ctggtggcttcccagaagaacgatctggacgccgtggctctgatgcacctgatggatctgctgtggtggtggtcctgaa
ccgcagcagcaaagatgtgccctgacctcaaggatccccgccgtgggattccttggaacaatcagccctggctactcca
tccacacctacctgtggcgtagacag</INSDSeg_sequence>
</INSDSeg>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeg>
    <INSDSeg_length>1611</INSDSeg_length>
    <INSDSeg_moltype>DNA</INSDSeg_moltype>
    <INSDSeg_division>PAT</INSDSeg_division>
    <INSDSeg_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q68">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeg_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>atggagttcagctcccccttctagggaggagtgccctaagccactgtctcgcgtgagcatcat
ggcaggaagcctgaccggactgctgctgctgcaggccgtgtcctgggcattctggagcaaggccctgcattccctaagtcct
tcggctactctagcgtggtgtgcgtgtgcaacgccacctattgtgactccttcgatccccctacctttcccgccctgggc
acattttctcggtagagagcacaagatccggccggagaatggagctgtctatgggccccatccaggccaatcacaccgg
aacaggactgctgctgaccctgcagcctgagcagaagttccagaaggtgaagggctttggaggagcaatgacagacgcag
ccgccctgaacatcctggccctgagccccaccgcccagaatctgctgctgaagtcttacttcagcgaggagggcatcggc
tataacatcatccgggtgccaatggcctcctgtgacttttctatcagaacctacacatatgccgatacccccgacgattt
ccagctgcacaatttttccctgcctgaggaggatacaaagctgaagatcccaactgatccacagggccctgcagctggcac
agaggcctgtgagcctgctggcatccccatggacctctcccacatggctgaagaccaacggcgccgtgaatggcaaggga
agcctgaagggacagccaggcgacatctaccaccagacatgggccccgtatttctgtgaagtttctggatgcctacgccga
gcacaagctgcagttctgggcagtaccgcagagaacgagccatctgccggactgctgagcggatatccattccagtgcc
tgggctttacaccgagcaccagagggactttatcgcaagggatctgggacctaccctggccaactccacacaccacaat
gtgcggtgctgatgctggacgatcagagactgctgctgccccactgggccaaggtggtgctgaccgacctgaggccgc
caagtacgtgcacggcatcgccgtgactggtatctggatttcttggcaccagcaaaggccaccctgggagagacacaca
ggctgttccccaacaccatgctgtttgccagcgaggcctgcgtgggctccaagttttgggagcagtcctgtcggctggga
tcttgggacagaggcatgcagtacagccactccatcatcaccaatctgctgtatcacgtggtgggctggacagactggaa
cctggccctgaatcctgaggggcgcccaaactgggtgagaaatttctgtgatagccccatcatcgtggacatcaccaagg
atacattctacaagcagcctatgttttatcactgggccacttctctaaagtttatcccagagggaagccagagggtggga
ctggtggcaagccagaagaacgacctggatgccgtggccctgatgcaccagatggctccgccgtggtggtggtgctgaa
tcgctcctctaaggacgtgcccctgacctcaaggatcctgccgtgggctttctggagaccatcagccccggctactcca
tccacacatatctgtggaggcgccagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q70">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagtctctcttctccatctcgcgaggagtgccctaagccactgagtcgagtgtctatcat
ggccggcagtcctgacaggactcctcctcctacaagctgtgtcttgggccagtggcgcccgccatgcatcccaaagtctt
tcgggtactctagcgtggtgtgcgtgtgcaacgtacatactgcgactctttcgaccacctacattccccgccctggga
accttcagccgatacagagtctacacggtccgggcggcgcgatggagctgtcaatggggccaattcaggctaaccacaccgg
aacaggactcctgctgacattacaacccgagcagaagttccagaaggtgaaggggttcggcgaggactatgaccgacgctg
ccgctctgaacattctggccctgtccccaccgcctcagaacctgtctctcaagtcttacttcagcgaggagggaatcggg
tacaacattattagagtgcctatggcttcttgcgacttcagcatccgcacatacacatacgcgcacacccctgacgactt
ccagctgcacaacttcagcctcccagaggaggacacaaagctcaagatcccaactgattcacgcgcctttacagctcgtc
agaggccagtgtctctgctcgttcccccttgacatctccaacatggttaaaaacaaacggcgccgtgaacggaaagggg
tcctgaaggggcagcccgagacatttaccaccagacatgggccaggtacttcgtgaagttcctcgacgcttacgctga
gcacaagctccagttctgggccgtgaccgccgagaacgagcctagcgccggcctgctgtccggataccctttccagtgcc
tcggattcacaccagagcaccagcgggacttcattgctagagacctcgggccaaacactcgctaactctaccaccacaac
gtgagactgctgatgctcgacgaccagcgccctctgctgcctcactgggctaaggtggtgctcacagaccccgaggccgc
caagtacgtgcacggaattgccgtgactgggtatctcgacttctcgccccagctaaggctacactcggcgagaccaca
ggctgttccctaacacaatgctgttcgccagcgaggcttgctgggaagcaagttctgggagcagtcctgtgagactcgga
tcttgggaccgcggaatgcagtactctcactctatcattacaaacctctgtaccacgtggtgggatggaccgactggaa
cctggctctcaaccccgaggcgcccaactgggtgagaaacttcgtggacagccctattattgtggacattacaaagg
acacctctacaagcagcctatgttctaccacctcgggcacttcagcaagttcatccccgagggatctcagagagtggga
ctggtggcctctcagaagaacgacctcgacgctgtggctctgatgcacctgacgggtcgcccggtggtggtggtgctcaa
ccgatctagcaaggacgtgccactgacaattaaggacccccgccgtgggggttcttgagacaattagccccggatactcca
ttcacacatacctgtggcgcaggcagtgatga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q72">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagtttagcagccctagcagagaagagtgccctaagcctctgtctcgtgtgagcatcat
ggccggctccttaaccggattattactgctgcaagctgtgtcttgggcttccggcgctaggccttgtattcccaagtcct
tcggctactcctccgtggtgtgcgtctgtaatgccacctactgtgacagcttcgatccccccacattccccgctctgggc
acattttctcgttacgaaagcactcgtagcggaaggaggatggagctgagcatggggccctattcaagctaaccacaccgg
caccggtttattactgactttacaacccgagcagaagttccagaaggtgaagggttttgaggcgccatgacagacgccg
ccgctttaaatattctggttttaagccctccccgccccaaaatctgctgctgaagtcctacttctccgaggaaggcatcggc
tacaacatcattagggtccctatggcctcttgtgacttcagcattaggacctacacctacgccgacacccccgacgactt
ccagctgcacaacttctctttacccgaggaggatacaaagctgaagatccctttaatccatcggtgccctccagctggctc
agaggcccgttagcttattagcctcccccttgacatccccctacttggctgaaaaccaacggcgctgtcaacggaaagggc
tctttaagggacagccccggcgacatttaccaccagacatgggctaggtacttctgtgaagtttttagacgcttatgccga
acacaagctgcagttctgggcccgtgaccgctgagaacgagccttccgccggtttactgtccggatacccccttccaatgtc
tgggattcacccccgaacaccagagggaacttcacgccagagatctgggccccacactggccaattccacacaccacaac
gtgagactgctcatgctggacgaccagaggttattactccctcactgggcccagggtgctgaccgacccccgaagctgc
caagtatgtgcatggaatcgccgtgactggtatctggactttctggccccgcccaaggctacactgggcgagaccaca
gactgttccctaacaccatgctcttcgccagcgaagcttgctgggaagcaagttctgggagcaatccgtgaggctgggc
agctgggatcgtggcatgcagtactcccactccattatcacaatctgctctaccacgtcgtgggatggaccgattggaa
tttagctctgaaccccgagggaggcccccaattgggtgaggaacttctgtgattcccccatcatcgctcgatatcaccaagg
acacattctacaagcagcccatgttctaccatttaggccactttagcaagttcatccccgagggaagccagagagtgggt
ttagtggcctcccagaagaacgatctggacgccgtgcctcatgcatcccgatggcagcgctgtggtcgtcgtgctgaa
tagaagctccaaagacgtccctttaaccatcaaggacccccgccgtgggctttctggaaaccatctcccccggttatagca
tccacacctatttatggagaagacagtaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1611</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_mol type>DNA</INSDSeq_mol type>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1611</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q74">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggaat t t t t c t a g c c c c t c c a g a g a g g a a t g c c c c a a g c c t c t g a g c c g g t g t c a a t c a t
g g c c g g a t c t c t g a c a g g a c t g c t g c t g c t t c a g g c c g t g t c t t g g g c t t c t g g c g c t a g a c c t t g c a t c c c c a a g a g c t
t c g g c t a c a g c a g c g t c g t g t g c g t g t g c a a t g c c a c c t a c t g c g a c a g c t t c g a c c c t c c t a c c t t t c c t g c t c t g g g c
a c c t t c a g c a g a t a c g a g a g c a c c a g a t c c g g c a g a c g g a t g g a a c t g a g c a t g g g a c c c a t c c a g g c c a a t c a c a c a g g
c a c t g g c c t g c t g t g a c a c t g c a g c c c g a g c a g a a t t c c a g a a a g t g a a a g g c t t c g g c g g a g c c a t g a c a g a t g c c g
c c g c t c t g a a t a t c c t g g c t c t g t c t c c a c c a g c t c a g a a c c t g c t g c t c a a g a g c t a c t t c a g c g a g g a a g g c a t c g g c
t a c a a c a t c a t c a g a g t g c c c a t g g c c a g c t g c g a c t t c a g c a t c a g g a c c t a c a c c t a c g c c g a c a c a c c c g a c g a t t t
c c a g c t g c a c a a c t t c a g c c t g c c t g a a g a g g a c a c c a a g c t g a a g a t c c c t c t g a t c c a c a g a g c c c t g c a g c t g g c a c
a a a g a c c c g t t t t c t g t g g c t a g c c c c t g g a c a t c t c c c a c c t g g c t g a a a c a a a t g g c g c c g t g a a t g g c a a g g g c
a g c c t g a a a g g c c a a c c t g g c g a t a t c t a c c a c c a g a c c t g g g c c a g a t a c t t c g t g a a g t t c c t g g a c g c c t a t g c c g a
g c a c a a g c t g c a g t t t t g g g c c g t g a c a g c c g a g a a c g a a c c t t c t g c t g g a c t g c t g a g c g g c t a c c c c t t t c a g t g c c
t g g g c t t t a c a c c c g a g c a c c a g c g g g a c t t t a t c g c c a g a g a t c t g g g a c c c a c a c t g g c c a a t a g c a c c c a c c a t a a t
g t g c g g c t g c t g a t g c t g g a c g a c c a g a g a c t g c t t c t g c c c c a c t g g g c t a a a g t g g t g c t g a c a g a t c c t g a g g c c g c
c a a a t a c g t g c a c g g a a t c g c c g t g c a c t g g t a t c t g g a c t t t c t g g c c c c t g c c a a g g c c a c a c t g g g a g a g a c a c a c a
g a c t g t t c c c c a a c a c c a t g c t g t t c g c c a g c g a a g c c t g t g t g g g c a g c a a g t t t t g g g a a c a g a g c g t g c g g c t c g g c
a g c t g g g a t a g a g g c a t g c a g t a c a g c c a c a g c a t c a t c a c c a a c c t g c t g t a c c a c g t c g t c g g c t g g a c c g a c t g g a a
t c t g g c c c t g a a t c c t g a a g g c g g c c c t a a c t g g g t c c g a a a c t t c g t g g a c a g c c c c a t c a t c g t g g a c a t c a c c a a g g
a c a c c t t c t a c a a g c a g c c c a t g t t c t a c c a c c t g g g a c a c t t c a g c a a g t t c a t c c c c g a g g g c t c t c a g c g c g t t g g a
c t g g t g g c c a g c c a g a a g a a t g a t c t g g a c g c c g t g g c t c t g a t g c a c c c t g a t g g a t c t g c t g t g g t g g t g g t c c t g a a
c c g g t c c a g c a a a g a t g t g c c c c t g a c c a t c a a g g a t c c c g c c g t g g g a t t c c t g g a a a c a a t c a g c c c t g g c t a c t c c a
t c c a c a c c t a c c t g t g g c g g a g a c a g t a g </INSDSeq_sequence>
```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 38">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q76">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MGWSCIIILFLVATATGVHS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 39">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>39</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..39</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q78">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MEFSSPSREECPKPLSRVSIAGSLTGLLLLQAVSWASG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>497</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..497</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q80">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ARPCIPKSGFYSSVVCVCNATYCDSPPTFPALGTFSTRSGRRMELSMGPIQANHTG
    TGLLLTLQPEQKFQKVGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDF
    QLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPSLLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS�KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAE
    HKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQRFIARDLGPTLANSTHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAA
    KYVHGI AVHWYLDFLAPAKATLGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWN
```

```
LALNPEGGPNWVRNFVDSPI IVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKF IPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSASVVVLN
RSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1551</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1551</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q82">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atgggatggagctgtatcatcctcttcttgggtggcaacagctacaggtgtgcactccgccag
accctgcatccctaagagctttggctatagtctgtgtggtttgtgtgtgcaatgccacatactgtgactcatttgaccctc
ctacatttcctgcactgggcactttcagcaggtatgagctctaccagatctggcaggaggatggagctgagcatggggcct
atccaggctaaccacaccggcacagggtgtgtgtgactctgcagcccgaacagaaattccagaaggttaagggttttgg
aggagccatgacagatgcagcagccctgaacattttggctctcagccctccagctcagaacctgctccttaaatacact
tcagtgaagaaggaattggctacaacatcataagagtacccatggccagctgtgattttccattagaacctacacttat
gctgatactcctgatgattttcagctgcacaacttttccctccctgaagaggacacaaagctcaagattcccctcattca
cagagccctgcaactggcccagaggcctgtgtccctgtctggccagccccctggacatctccaacatggctgaaaaccaatg
gagcagtaaatggcaaaggttcccttaagggccagccaggagacatctaccaccaaacctgggccaggtattttgtgaag
ttcctggatgcctatgcagagcataagctgcagttttgggcagtgactgctgaaaatgaacctctgctggactgctctc
agggtatcccttccagtgcctgggatttactcctgagcaccagagagatttcattgccagagacctggggcccacccttg
ccaacagcacacaccacaatgttagactgctgatgctggatgaccagaggctgctccttccccactgggcaaaaagtgggtg
ctgactgaccagaggccgccaagtatgtccatggcatcgccgttcatttggtacctggacttcttgccccctgccaaggc
caccttggggggagacacataggctcttccccaacaccatgctgtttgcctcagaagcctgtgtgggttccaaattttggg
```

```
agcagtctgttaggctgggctcctgggacaggggcatgcagtacagccattccatcatcaccaatctgctgtaccatgtg
gtaggctggaccgactggaatcttgcctcaacccagaaggtggccccaactgggtgagaaacttcgtggacagcccat
catcgtggatattaccaaagacaccttctacaagcagcccatgttttatcacctgggccacttctccaagttcatccctg
agggaagccagagagtgggattggttgccctcccagaagaatgatctcgatgctgtggccctcatgcaccagatggcagc
gcagtggtagtagtactgaacaggtcatctaaggatgtgcctctcactattaaagatcctgcagtgggcttcttggagac
catcagccccggatacagcatccacacctacctgtggaggagacagtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 42" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>834</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..834</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q84">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gttaatTTTTTAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTtactctctctgtt
tgctctggttaataatctcaggagcacaaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatectctggg
cctggatccgttaatTTTTTAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGCAGCATTtactctctctgtttgctctggt
taataatctcaggagcacaaacattcctggaggcaggagaagaaatcaacatcctggacttatectctgggcctcagatc
tgtaacagcatgcgtgagtacttgtgtgttaaTTTTTcattatctataggtAAAAGCACacttggaaattagcaatagat
gcaatttgggacttaactctttcagtatgtcttatttctaagcaaagtatttagtttggttagtaattactaaacactga
gaactaaattgcaaacaccaagaactaaaatgttcaagtgggaaattacagttaaataccatggtaatgaataaaaggta
caaatcgTTTTAAactcttatgtAAAATTTgataagatgttttacacaactTTAatacattgacaaggctcttgtggagaaa
acagttccagatggtaaatatacacaagggatttagtcaaacaatTTTTTggcaagaatattatgaattttgtaatcggt
tggcagccaatgaaatacaaagatgagtcctagttaataatctacaattatttggttaaagaagtattatagtgtctaatttc
```

```

cctccgtttgtcctagcttttctcttctgtcaacccacacgcctttggcac</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 43">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q86">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttaggaaaggacagtgggagtggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 44">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>

```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q88">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aatgcgatgcaatttcctcatt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q90">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tgccagccatctgttggt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺相關病毒(AAV)載體基因體，該基因體包含編碼 β -葡萄糖腦苷脂酶(GCase)蛋白質的核苷酸序列，該蛋白質包含分泌信號肽序列及成熟多肽序列，其中該分泌信號肽序列來自野生型人類GCase蛋白或GCase以外的蛋白質，且其中編碼該GCase蛋白質之該核苷酸序列包含SEQ ID NO: 13之核苷酸序列。

【請求項2】

如**請求項1**之AAV載體基因體，其中該成熟GCase多肽序列與該野生型人類GCase蛋白之成熟多肽序列一致。

【請求項3】

如**請求項2**之AAV載體基因體，其中該分泌信號肽序列來自免疫球蛋白。

【請求項4】

如**請求項1**之AAV載體基因體，其中該成熟GCase多肽序列包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列，且該分泌信號肽序列包含SEQ ID NO: 38或SEQ ID NO: 39之胺基酸序列。

【請求項5】

如**請求項1**之AAV載體基因體，其中該GCase蛋白之胺基酸序列係由SEQ ID NO: 16之胺基酸序列提供。

【請求項6】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中編碼GCase蛋白的該核苷酸序列為野生型或經密碼子最佳化。

【請求項7】

如**請求項6**之AAV載體基因體，其中該密碼子最佳化核苷酸序列相較於野生型核苷酸序列具有經減少CpG二核苷酸數目。

【請求項8】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該基因體包含至少一個AAV反向末端重複(ITR)。

【請求項9】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含轉錄控制區域，該轉錄控制區域與編碼GCaase蛋白之該核苷酸序列可操作地連接。

【請求項10】

如**請求項9**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域具有肝臟組織特异性。

【請求項11】

如**請求項10**之AAV載體基因體，其中該轉錄控制區域包含來源於人類白蛋白(ALB)基因的啟動子及來源於人類白蛋白(ALB)基因或 α -1-微球蛋白/尿抑胰酶素前驅體(AMB)基因的增強子。

【請求項12】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含轉錄終止信號序列。

【請求項13】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該載體基因體進一步包含內含子或轉錄後調控元件(PRE)。

【請求項14】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該載體基因體以5'至3'次序包含：

- (a) 第一AAV2 ITR，
- (b) AMBP基因增強子序列之第一複本
- (c) AMBP基因增強子序列之第二複本
- (d) ALB基因增強子序列
- (e) ALB基因啟動子序列
- (f) 人類 β 血球蛋白(HBB)基因內含子序列

(g) 編碼人類GCase蛋白的核苷酸序列，該核苷酸序列與AMBP增強子之該第一及第二複本、該ALB增強子及該ALB啟動子可操作地連接，其中該GCase蛋白包含分泌信號肽序列及成熟多肽序列，

- (h) 牛生長激素(bGH)基因轉錄終止信號序列
- (i) 經修飾之TBP內含子2序列；及
- (j) 第二AAV2 ITR。

【請求項15】

如**請求項14**之AAV載體基因體，其中AMBP基因增強子序列之該第一及第二複本中的每一者包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列；或該ALB基因增強子序列包含SEQ ID NO: 9之核苷酸序列；或該ALB基因啟動子序列包含SEQ ID NO: 10之核苷酸序列；或該人類 β 血球蛋白(HBB)基因內含子序列包含SEQ ID NO: 11之核苷酸序列；或編碼人類GCase蛋白的該核苷酸序列包含SEQ ID NO: 41之核苷酸序列；或該bGH基因轉錄終止信號序列包含SEQ ID NO: 14之核苷酸序列。

【請求項16】

如**請求項1至5**中任一項之AAV載體基因體，其中該載體基因體之核苷酸序列包含SEQ ID NO: 17之核苷酸序列，或其反向互補序列。

【請求項17】

一種AAV載體，其包含如**請求項1至16**中任一項之AAV載體基因體及AAV衣殼。

【請求項18】

如**請求項17**之AAV載體，其中該AAV衣殼具有親肝性。

【請求項19】

如**請求項17**或**請求項18**之AAV載體，其中該AAV衣殼係選自由以下組成之群：AAV2、AAV3B、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV13、AAVrh.74、AAVrh.10、AAV-DJ、AAV-LK03、AAV-KP1、AAV-hu.Lvr01、AAV-hu.Lvr02、AAV-hu.Lvr03、AAV-hu.Lvr04、AAV-hu.Lvr05、AAV-hu.Lvr06、AAV-hu.Lvr07、AAV-Anc80、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP84、AAV-hu.37、AAV-rh.8、AAV-rh.64R1、RHM4-1、RHM15-1、RHM15-2、RHM15-3/RHM15-5、RHM15-4及RHM15-6、AAVHSC7、AAVHSC15及AAVHSC17；或其中該AAV衣殼包含含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的VP1蛋白。

【請求項20】

一種如**請求項17至19**中任一項之AAV載體之用途，其係用於製備治療需要治療1型高歇氏病之人類個體的藥劑。

【請求項21】

如**請求項20**之方法，其中該AAV載體係以每公斤個體體重 1×10^{10} 至

1×10^{15} 個載體基因體(vg/kg)範圍內的劑量投與，且其中該AAV載體與醫學上可接受之賦形劑係呈組成物以靜脈內途徑投與該個體。

【請求項22】

如**請求項21**之方法，其中該藥劑有效地使該個體之周邊血液單核細胞(PBMC)中的活性GCaase蛋白之量增加至至少20 pg/1E6個細胞。

【請求項23】

如**請求項21**之方法，其中該藥劑有效地降低選自由以下組成之群之1型高歇氏病之症狀或徵象的嚴重度：肝脾腫大、肝腫大、脾腫大、貧血、白血球嗜中性球減少症、全部血球減少症、血小板減少症、單株高 γ -球蛋白血症、多株高 γ -球蛋白血症、厭食症、慢性疲勞、無血管骨壞死、骨痛、骨質溶解、骨壞死及骨質缺少。

【請求項24】

一種DNA質體，其包含如**請求項1至16**中任一項之AAV載體基因體的核苷酸序列。

【請求項25】

一種用於產生AAV載體的宿主細胞，該宿主細胞包含如**請求項24**之DNA質體。

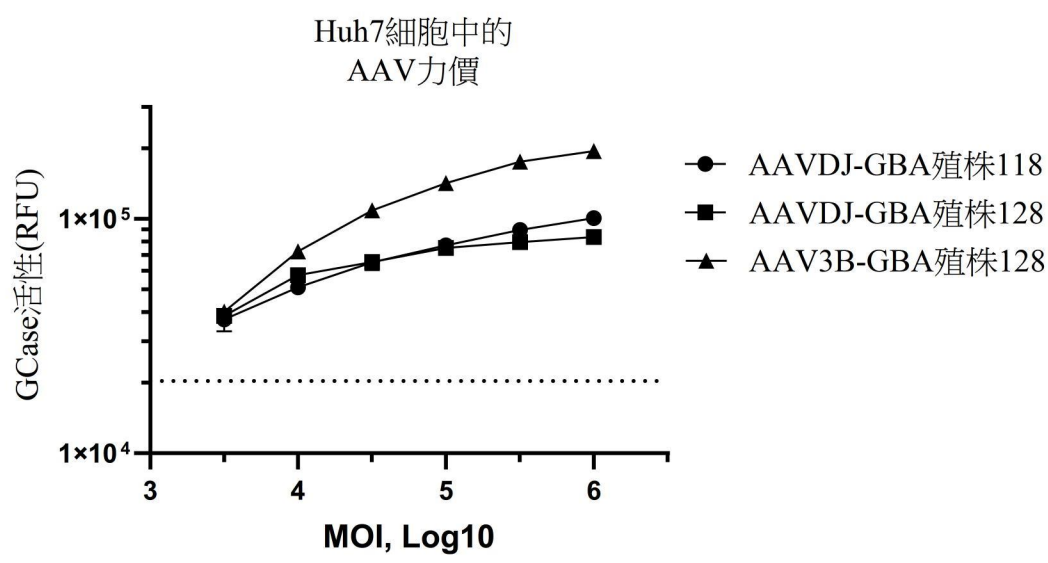
【請求項26】

一種製備AAV載體的方法，該方法包含在足以產生AAV載體的條件下培育如**請求項25**之宿主細胞及純化由此所產生的該等AAV載體。

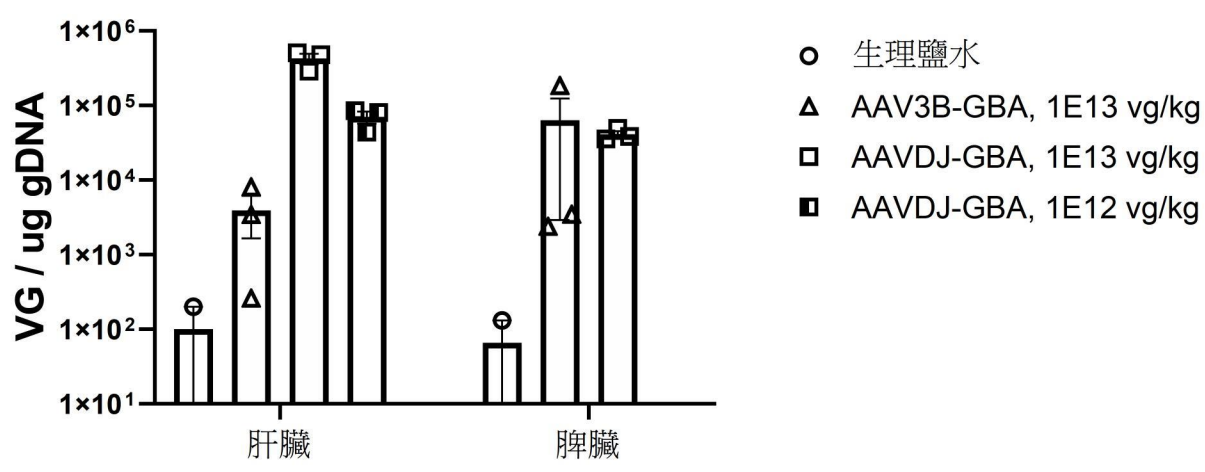
【請求項27】

一種AAV載體，其藉由如**請求項26**之方法產生。

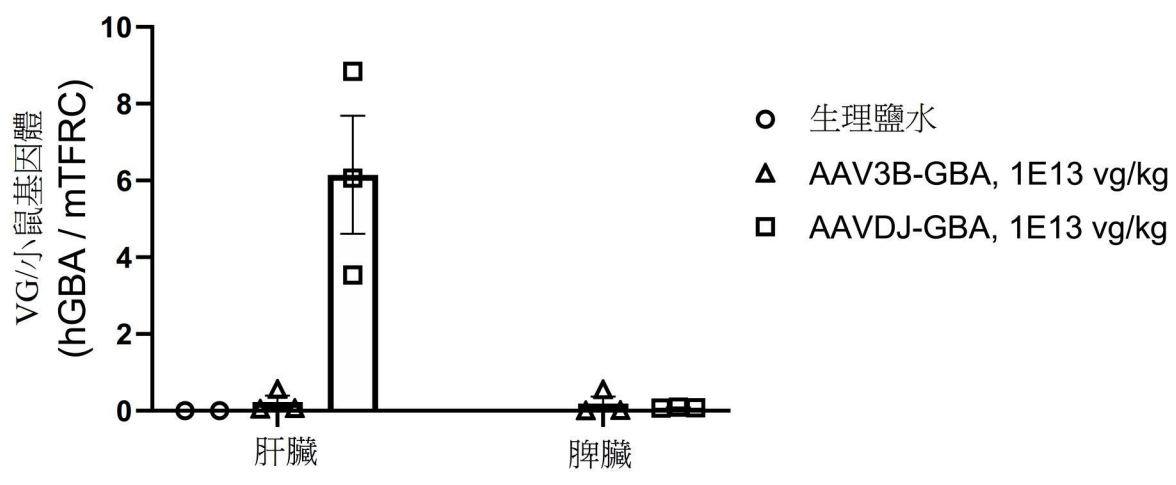
【發明圖式】



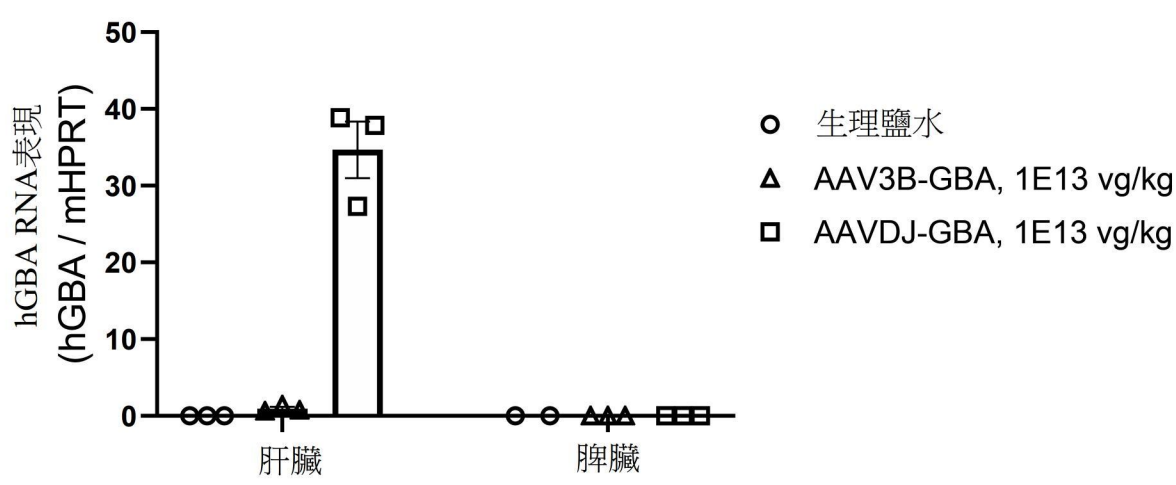
【圖1】



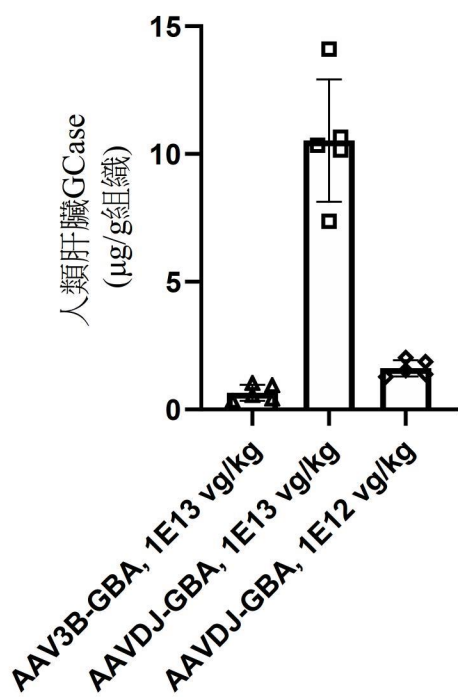
【圖2】



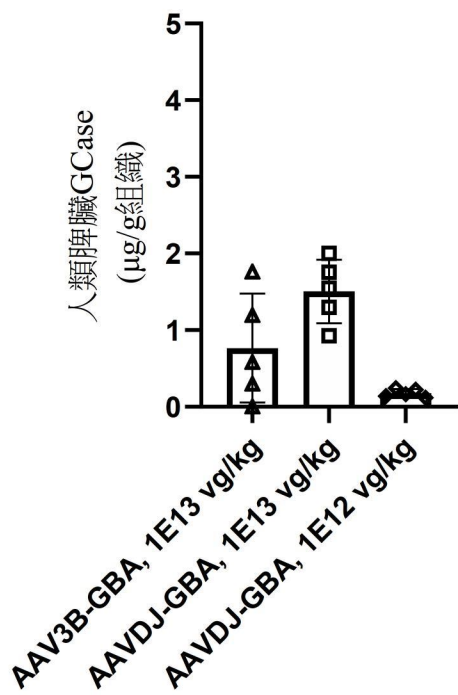
【圖3】



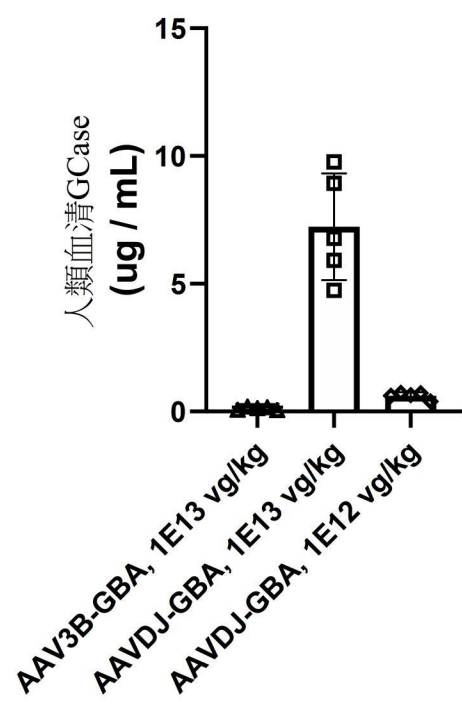
【圖4】



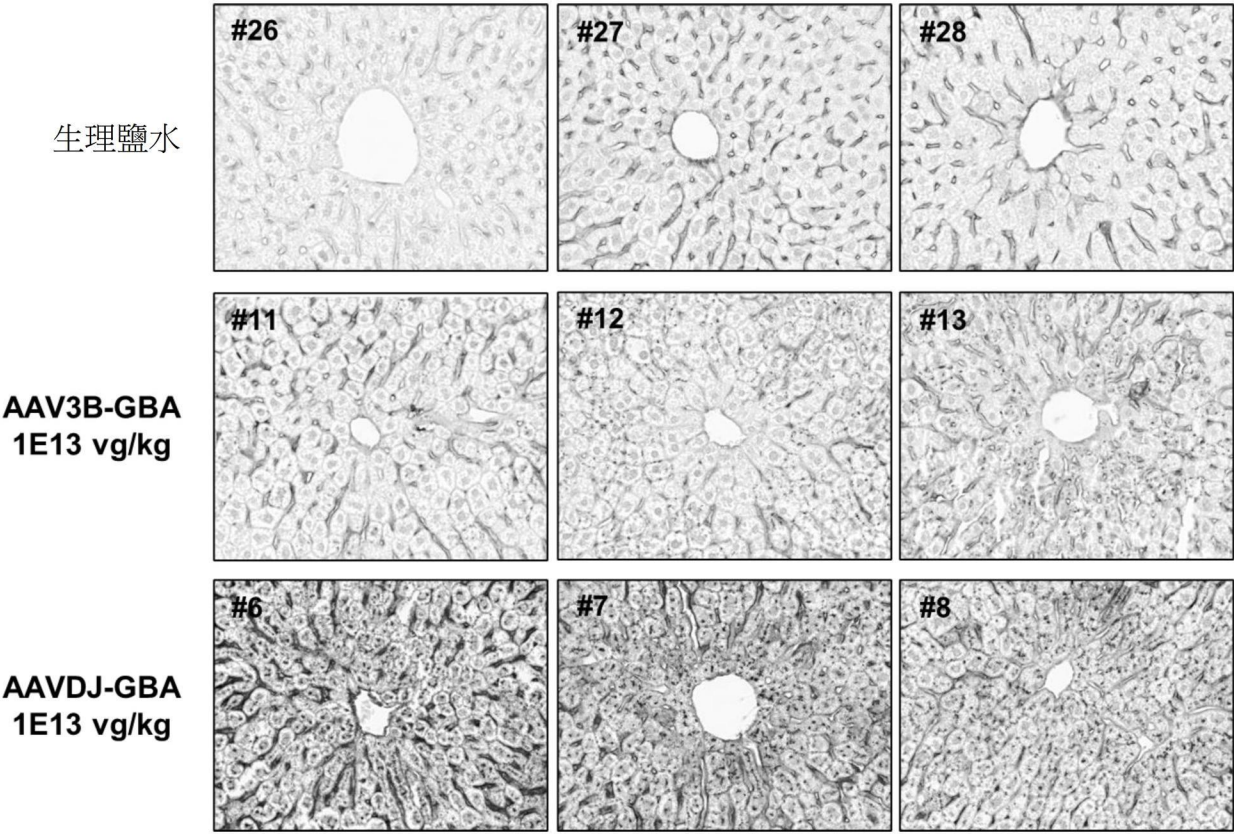
【圖5A】



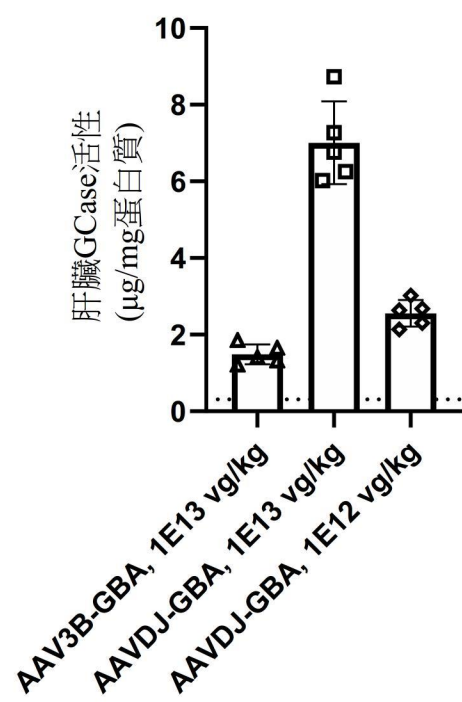
【圖5B】



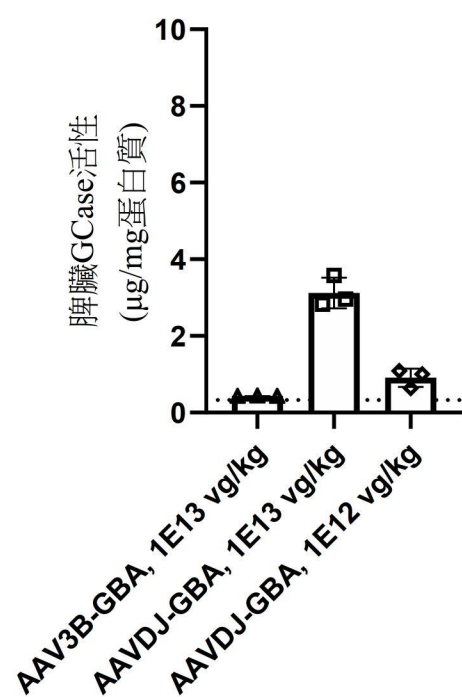
【圖5C】



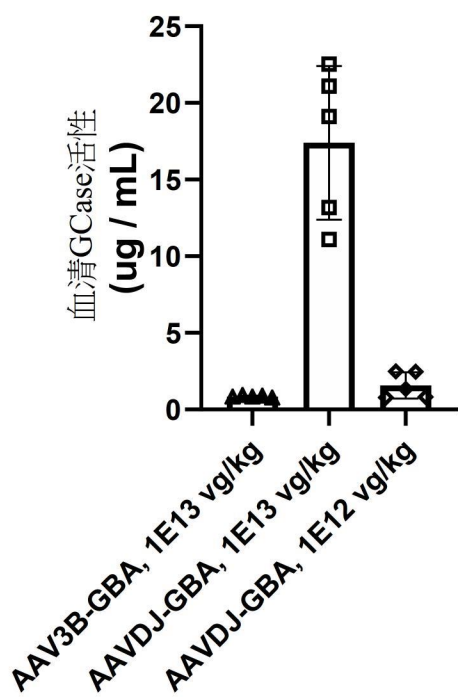
【圖6】



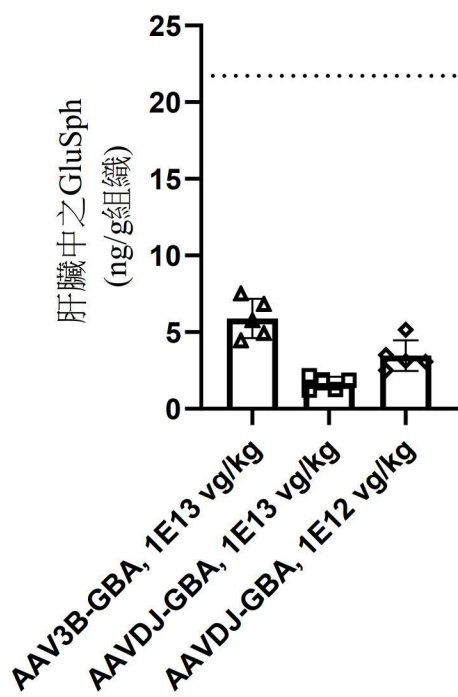
【圖7A】



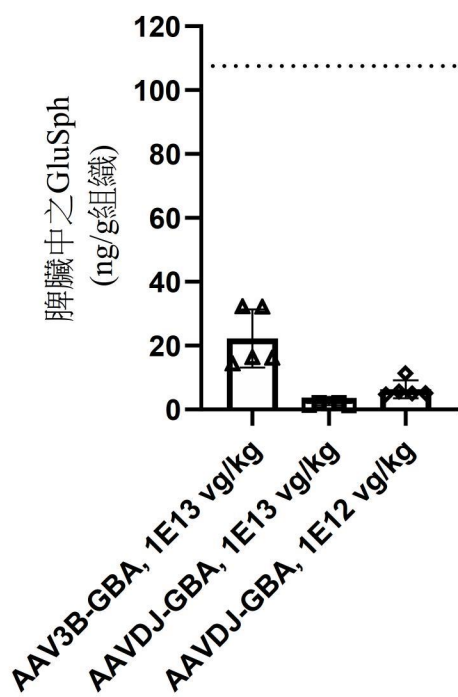
【圖7B】



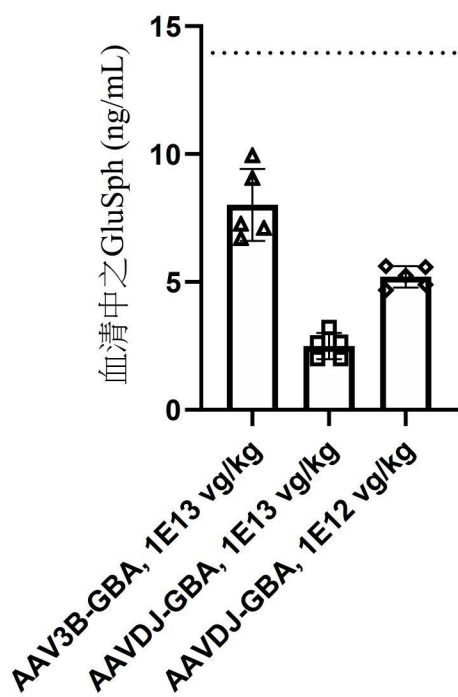
【圖7C】



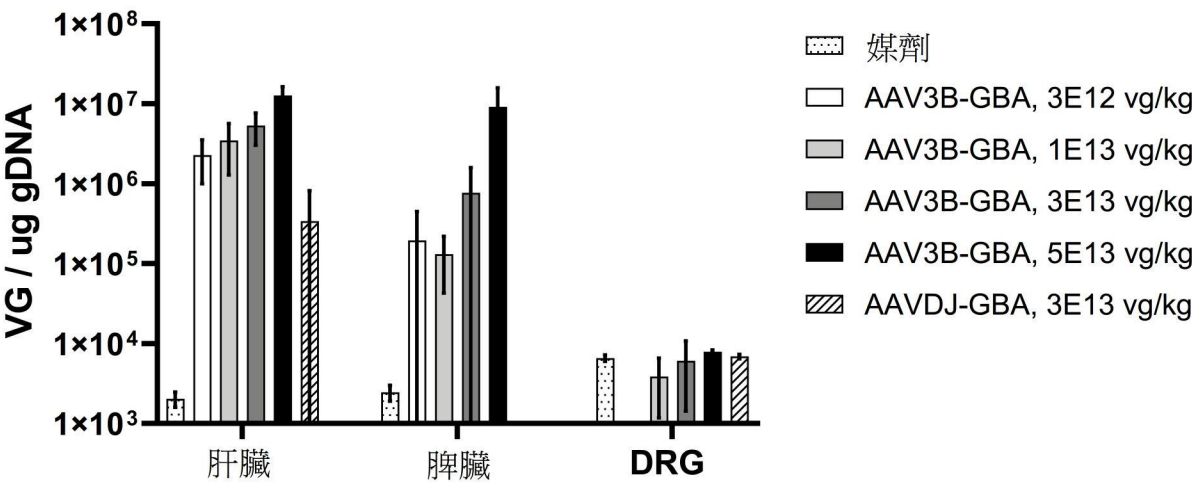
【圖8A】



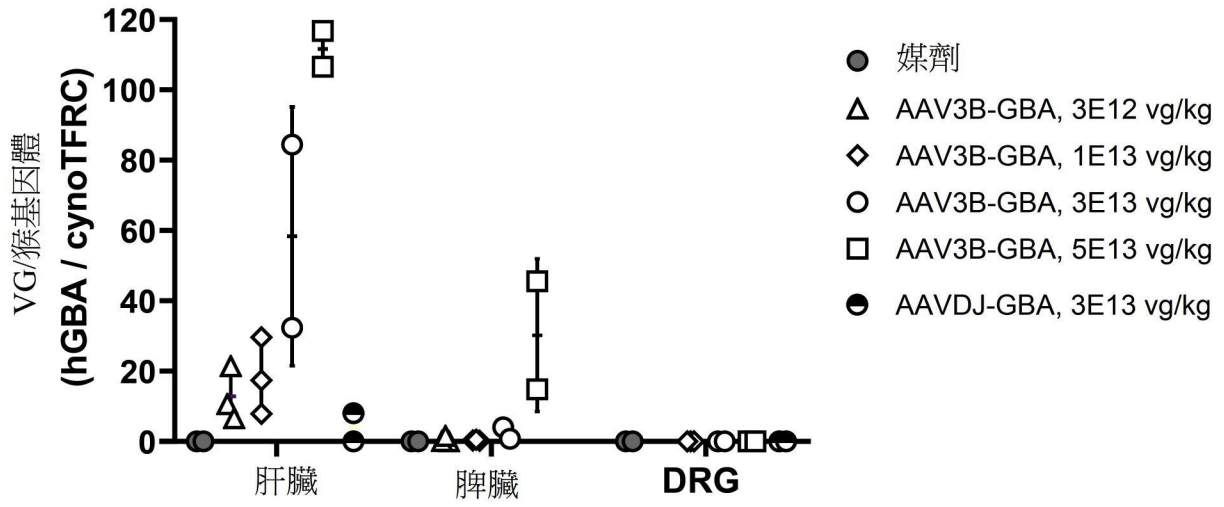
【圖8B】



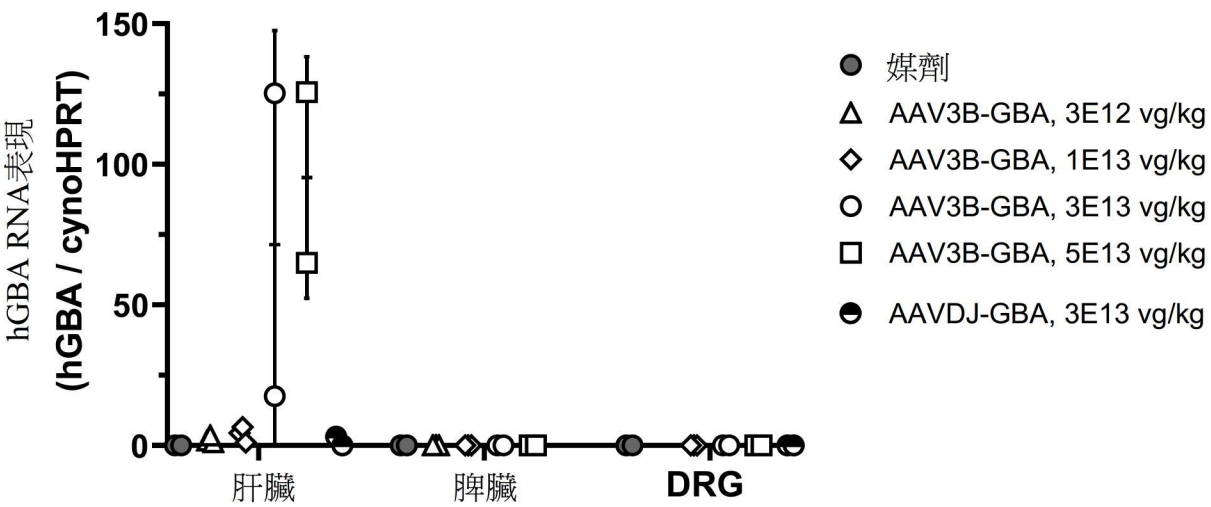
【圖8C】



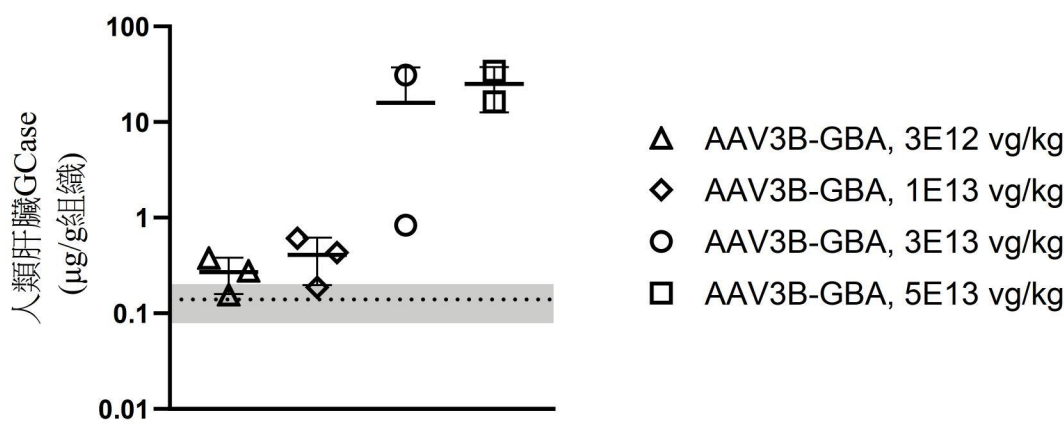
【圖9】



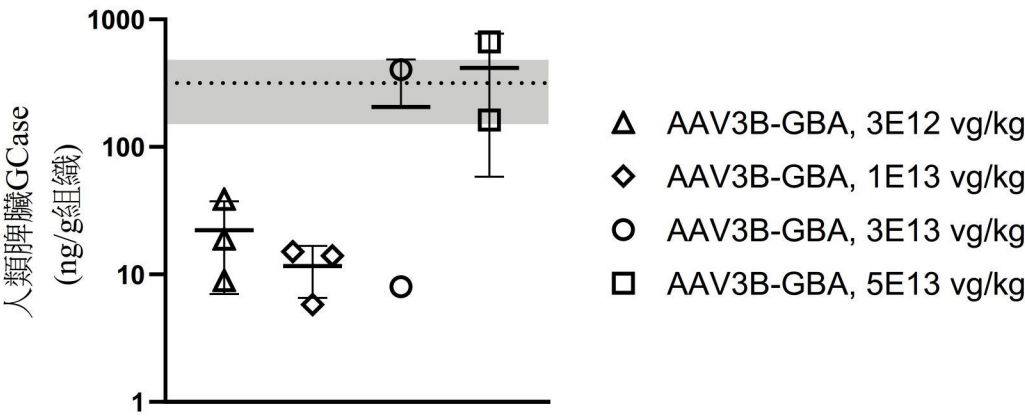
【圖10】



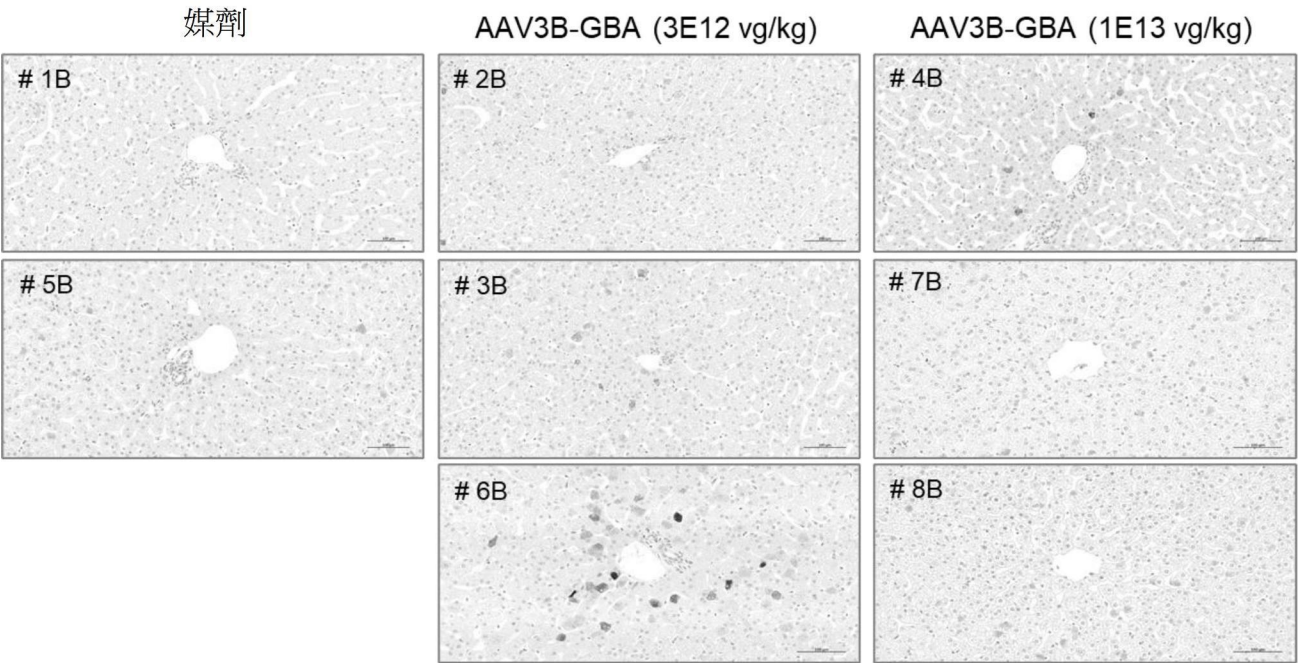
【圖11】



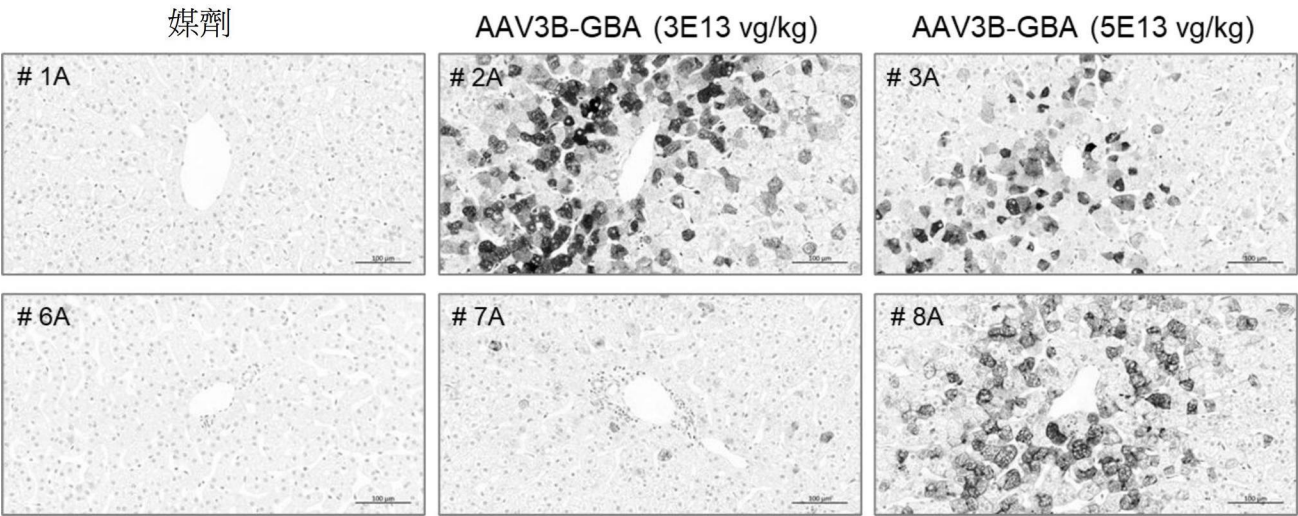
【圖12A】



【圖12B】



【圖13A】



【圖13B】