



(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 I873172 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：109128653

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 21 日

(51)Int. Cl. : C07K14/47 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/08/21 美國

62/889,749

2020/04/24 美國

63/014,934

2020/05/11 美國

63/022,843

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

美國

(72)發明人：羅帝諾 克拉帕克 路易斯 RODINO-KLAPAC, LOUISE (US)；葛莉芬 丹尼艾爾 GRIFFIN, DANIELLE (US)；麥德爾 傑瑞 R MENDELL, JERRY R. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2013/078316A1

期刊 Mendell et al. Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular

Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion HUMAN GENE THERAPY 30

(7) 2019 794-801

審查人員：周浩宇

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：10 共 111 頁

(54)名稱

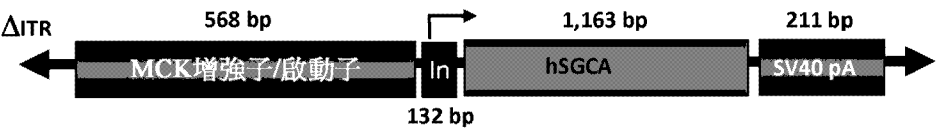
 α 肌聚糖之腺相關病毒載體遞送及肌肉萎縮症之治療

(57)摘要

本文描述治療個體之肌肉萎縮症的方法，其包括使用全身投與途徑且以約 1.0×10^{12} vg/kg 至約 5.0×10^{15} vg/kg 之劑量投與重組 AAV 載體 AAVrh74.tMCK.hSCGA。進一步揭示表現細胞中或有需要之個體中之 α 肌聚糖基因、減少血清 CK 含量及增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的方法。

Described herein are methods of treating muscular dystrophy in a subject, comprising administration of a recombinant AAV vector AAVrh74.tMCK.hSCGA using a systemic route of administration and at a dose of about 1.0×10^{12} vg/kg to about 5.0×10^{15} vg/kg. Further disclosed are methods of expressing alpha-sarcoglycan gene in a cell or in a subject in need thereof, decreasing a serum CK level, and increasing alpha-sarcoglycan positive fibers in muscle tissue of a subject.

指定代表圖：



【圖1】



I873172

【發明摘要】

【中文發明名稱】

α 肌聚糖之腺相關病毒載體遞送及肌肉萎縮症之治療

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF ALPHA-SARCOGLYCAN AND THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

【中文】

本文描述治療個體之肌肉萎縮症的方法，其包括使用全身投與途徑且以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量投與重組AAV載體AAVrh74.tMCK.hSCGA。進一步揭示表現細胞中或有需要之個體中之 α 肌聚糖基因、減少血清CK含量及增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的方法。

【英文】

Described herein are methods of treating muscular dystrophy in a subject, comprising administration of a recombinant AAV vector AAVrh74.tMCK.hSCGA using a systemic route of administration and at a dose of about 1.0×10^{12} vg/kg to about 5.0×10^{15} vg/kg. Further disclosed are methods of expressing alpha-sarcoglycan gene in a cell or in a subject in need thereof, decreasing a serum CK level, and increasing alpha-sarcoglycan positive fibers in muscle tissue of a subject.

【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】

α 肌聚糖之腺相關病毒載體遞送及肌肉萎縮症之治療

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF ALPHA-SARCOGLYCAN AND THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

【技術領域】

相關應用

【0001】 本申請案主張2019年8月21日申請之美國臨時申請案第62/889,749號、2020年4月24日申請之美國臨時申請案第63/014,934號及2020年5月11日申請之美國臨時申請案第63/022,843號之優先權，該等申請案所有者以全文引用之方式併入本文中。

【0002】 本文描述表現 α 肌聚糖之治療載體，諸如AAV載體，及使用此等載體治療諸如LGMD2D之肢帶型肌肉萎縮症的方法。

序列表以引用之方式併入

【0003】 作為揭示內容的單獨部分，本申請案含有電腦可讀形式之序列表（文件名：54652_SeqListing.txt；18,768位元組-ASCII文本文件；於2020年8月17日創建），其以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

【0004】 肌肉萎縮症（MD）為一組遺傳病。該組之特徵在於控制運動之骨骼肌的進行性無力及退化。一些形式之MD在嬰兒期或兒童期發展，而其他形式可能要等到中年或更晚才出現。病症在肌肉無力之分佈及

程度（一些形式之MD亦影響心肌）、發病年齡、進展速率及遺傳模式方面不同。

【0005】一組MD為肢帶型肌肉萎縮症（LGMD）。LGMD為罕見的情況，且其在發病年齡、肌無力區域、心臟與呼吸受累、進展速率及嚴重程度方面，在不同的人中表現不同。LGMD可以開始於童年、青春期、青年或甚至更晚。兩種性別均受到同等影響。LGMD導致肩部與骨盆肢帶無力，上腿與手臂附近的肌肉有時亦會隨著時間的推移而減弱。腿部無力通常先於手臂出現。面部肌肉通常不受影響。隨著病況進展，人們可能會出現行走問題，且可能需要長時間使用輪椅。肩部與手臂肌肉之受累可能導致難以將手臂舉過頭頂及抬起物體。在一些類型之LGMD中，可能涉及心臟與呼吸肌。

【0006】LGMD之專業測試現在可經由國家診斷計劃國家委員會（NCG）獲得。

【0007】LGMD 2D亞型（LGMD2D）通常稱為 α 肌聚糖病，為一種由 α 肌聚糖基因（SGCA）突變引起之常染色體隱性遺傳病，導致功能蛋白之完全或減少之損失以及肌縮蛋白相關蛋白質複合物的其他結構組分的損失。值得注意的， α 肌聚糖蛋白質之損失會導致進行性肌肉萎縮症，且伴有肌肉功能惡化，發病年齡為3至8歲。症狀包含：步行遲緩、由脂肪替代及纖維化引起之近端肌肉無力、肌酸激酶升高、脊柱側彎及關節攣縮。令人虛弱的疾病通常會導致輪椅依賴且由於呼吸衰竭而死亡。因此，仍然需要用於LGMD2D之治療。

【發明內容】

【0008】本文描述治療有需要之個體之肌肉萎縮症之方法，其包括

投與重組腺相關病毒（rAAV）AAVrh74.tMCK.hSCGA之步驟，其中該rAAV使用全身投與途徑，且基於超螺旋DNA或質體作為定量標準以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量投與。在一個態樣中，本發明係關於表現 α 肌聚糖基因之rAAV及將 α 肌聚糖遞送至肌肉以減少及/或防止纖維化；及/或以增加肌力，及/或以治療罹患肌肉萎縮症之個體中之 α 肌聚糖病的方法。

【0009】 在一個態樣中，本文描述包括編碼 α 肌聚糖蛋白質之多核苷酸序列的重組AAV（rAAV）。在一些實施例中，多核苷酸序列包括與SEQ ID NO: 1中所闡述之核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%一致的序列，且編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。在一些實施例中，多核苷酸序列包括SEQ ID NO: 1中所闡述之核苷酸序列。在另一實施例中，多核苷酸編碼與SEQ ID NO: 2中所闡述之核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%一致的蛋白質。在另一實施例中，多核苷酸編碼包括SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列的蛋白質。

【0010】 在一些實施例中，rAAV包括有包括tMCK啟動子之核苷酸序列。舉例而言，tMCK啟動子包括SEQ ID NO: 3中所闡述之核苷酸序列。另外，rAAV包括SEQ ID NO: 5之5'反向末端重複序列及/或SEQ ID NO: 6之3'反向末端重複序列。在一些實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 7之poly A序列。在一個實施例中，所揭示之rAAV為血清型AAVrh.74。

【0011】 在一個實施例中，多核苷酸包括與SEQ ID NO: 4至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%一致的核苷酸序列。在一個實施例中，多核苷酸包括SEQ ID NO: 4中所闡述之核苷酸序列。

【0012】 本發明提供治療有需要之個體之肌肉萎縮症的方法，其包括投與本文所揭示之rAAV中之任一種之步驟，其中該rAAV利用全身途徑投與。特定言之，在所揭示之方法中之任一種中，該rAAV為AAVrh74.tMCK.hSCGA，其中該rAAV使用全身投與途徑投與。

【0013】 在所揭示之方法中之任一種中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量投與。舉例而言，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg或約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg之劑量投與，或該rAAV以約 5×10^{13} vg/kg、約 6×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 8×10^{13} vg/kg、約 9×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 2×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、約 4×10^{14} vg/kg或約 5×10^{14} vg/kg之劑量投與。

【0014】 在另一實施例中，在所揭示之方法中之任一種中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg之劑量投與。舉例而言，基於線性化DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.0×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.5×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.6×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg之劑量投與。

vg/kg、約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.2×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.4×10^{13} vg/kg至約 7.4×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg或約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg之劑量投與。

【0015】 另外，在所揭示之方法中之任一種中，全身投與途徑為靜脈內途徑。舉例而言，在所揭示之方法中之任一種中，該rAAV利用注射、輸注或植入投與。在一些實施例中，該rAAV經由周邊肢體靜脈利用靜脈內途徑投與。

【0016】 在所揭示之方法中之任一種中，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症。舉例而言，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症2D型（LGMD2D）。

【0017】 在一例示性實施例中，治療肌肉萎縮症之方法包括向罹患肢帶型肌肉萎縮症之個體投與rAAV，且基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV利用靜脈內輸注以約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg之劑量投與，且其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0018】 在一例示性實施例中，本發明提供治療有需要之個體之肌肉萎縮症的方法，該方法包括向該個體投與rAAV之步驟，其中該個體罹患肢帶型肌肉萎縮症，且基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV利用靜脈內輸注以約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg之劑量投與，且其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。舉例而言，在此等方法中，投與rAAV之後個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量與投與rAAV之前的 α 肌聚糖基因表現量相比有所增加。

【0019】 在所揭示之方法中之任一種中，投與rAAV之後個體之細胞

中之 α 肌聚糖基因表現量與投與rAAV之前的 α 肌聚糖基因表現量相比有所增加；及/或其中投與rAAV之後個體中之血清CK含量與投與rAAV之前的血清CK含量相比有所減少；及/或其中運動活動及比力產生增加；其中纖維化減少；其中對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加；及/或其中投與rAAV之後個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維數量與投與rAAV之前的 α 肌聚糖陽性纖維數量相比有所增加；或其中與投與rAAV之前相比，纖維化在投與rAAV之後在該個體中減少；及/或其中與投與rAAV之前相比，纖維化在投與rAAV之後在該個體中減少；及/或其中投與rAAV之後個體之肌肉中之比力、纖維直徑大小及/或離心收縮與投與rAAV之前相比有所增加。

【0020】 在一些實施例中， α 肌聚糖基因表現藉由利用西方墨點法（Western blot）及/或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。

【0021】 在另一態樣中，本發明提供表現細胞中之 α 肌聚糖基因的方法，其包括向個體投與所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供表現細胞中之 α 肌聚糖基因的方法，其包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。另外，在該等方法中之任一種中，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，在該等方法中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0022】 本發明提供減少有需要之個體中之血清CK含量的方法，該方法包括向個體投與所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供

減少有需要之個體中之血清CK含量的方法，該方法包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0023】 在另一態樣中，本發明提供增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的方法，其包括向個體投與所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供增加有需要之個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的方法，該方法包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0024】 本發明亦提供增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的方法，其包括向個體投與所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的方法，該方法包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。另外，在所揭示之方法中之任一種中，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，在該等方法中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0025】 本發明提供治療有需要之個體中之肌肉萎縮症的組合物，其中該組合物包括本文所揭示之rAAV中之任一種，其中該組合物經調配用於利用全身途徑投與。特定言之，在組合物中之任一種中，該rAAV為AAVrh74.tMCK.hSCGA。

【0026】 基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，所揭示之組合物中之任一種以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量包括rAAV。舉

例而言，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg或約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg，或該rAAV之劑量為約 5×10^{13} vg/kg、約 6×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 8×10^{13} vg/kg、約 9×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 2×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、約 4×10^{14} vg/kg或約 5×10^{14} vg/kg。

【0027】 在另一實施例中，在所揭示之組合物中之任一種中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.85×10^{13} vg/kg或約 7.41×10^{13} vg/kg之劑量投與。舉例而言，基於線性化DNA或質體作為定量標準，該rAAV以約 1.0×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.5×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.6×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.2×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.4×10^{13} vg/kg至約 7.4×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg或約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg之劑量投與。

【0028】 另外，所揭示之組合物中之任一種經配製用於利用靜脈內途徑投與，諸如組合物經調配用於利用注射、輸注或植入投與。在一些實施例中，所揭示之組合物經調配用於經由周邊肢體靜脈利用靜脈內途徑投與。

【0029】 所揭示之組合物中之任一種用於治療肢帶型肌肉萎縮症，諸如肢帶型肌肉萎縮症2D型（LGMD2D）。

【0030】 在一例示性實施例中，本發明提供用於治療罹患肢帶型肌

肉萎縮症之個體的組合物，其中基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該組合物包括約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg之劑量之rAAV，且其中該組合物經調配用於利用靜脈內輸注投與，且其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0031】 另外，本發明提供用於治療有需要之個體中之肢帶型肌肉萎縮症的組合物，其中基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該組合物包括約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg之劑量之rAAV，且該組合物經調配用於利用靜脈內輸注投與，且其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。舉例而言，與投與組合物之前的 α 肌聚糖基因表現量相比，投與組合物增加個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量。

【0032】 另外，與投與組合物之前的 α 肌聚糖基因表現量相比，投與所揭示之組合物中之任一種增加個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量；及/或其中與投與組合物之前的血清CK含量相比，投與所揭示之組合物減少個體中之血清CK含量；及/或其中運動活動及比力產生增加；其中纖維化減少；其中對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加；及/或其中與投與組合物之前的 α 肌聚糖陽性纖維數量相比，投與組合物增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維數量；及/或其中與投與rAAV之前相比，投與組合物減少個體中之纖維化；及/或其中與投與組合物之前相比，該組合物減少纖維化；或其中與投與組合物之前相比，投與組合物增加個體之肌肉中之比力、纖維直徑大小及/或離心收縮。在一些實施例中， α 肌聚糖基因表現藉由利用西方墨點法及/或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。

【0033】 在另一態樣中，本發明提供用於表現細胞中之 α 肌聚糖基因的組合物，其中該組合物包括所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供用於表現細胞中之 α 肌聚糖基因的組合物，該等組合物包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。另外，在組合物中之任一種中，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，在該等方法中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0034】 本發明提供用於減少有需要之個體中之血清CK含量的組合物，該組合物包括所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供用於減少有需要之個體中之血清CK含量的組合物，該組合物包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0035】 在另一態樣中，本發明提供用於增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的組合物，其中該組合物包括所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供用於增加個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的組合物，其中該組合物包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0036】 本發明亦提供用於增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的組合物，其中該組合物包括所揭示之rAAV中之任一種。舉例而言，本發明提供用於增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的組合物，其中該組合物包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。另外，投與所揭示之組合物中之任一種之後，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因

的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，投與所揭示之組合物中之任一種之後，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，投與所揭示之組合物中之任一種之後，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0037】 本發明提供所揭示之rAAV中之任一種用於製備用以治療有需要之個體中之肌肉萎縮症之藥物的用途，其中該藥物經調配用於利用全身途徑投與。特定言之，本發明提供AAVrh74.tMCK.hSCGA用於製備用以治療肌肉萎縮症之藥物的用途，其中該藥物經調配用於利用全身投與途徑投與。

【0038】 在所揭示之用途中之任一種中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該藥物以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量包括rAAV。舉例而言，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg或約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg，或該rAAV之劑量為約 5×10^{13} vg/kg、約 6×10^{13} vg/kg、約 7×10^{13} vg/kg、約 8×10^{13} vg/kg、約 9×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg、約 2×10^{14} vg/kg、約 3×10^{14} vg/kg、約 4×10^{14} vg/kg或約 5×10^{14} vg/kg。

【0039】 在另一實施例中，在所揭示之用途中之任一種中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，該藥物以約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg之劑量包括rAAV。舉例而言，基於線性化DNA或質體作為定

量標準，該藥物以約 1.0×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.5×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.6×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.2×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.4×10^{13} vg/kg至約 7.4×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg或約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg之劑量包括rAAV。

【0040】 另外，在所揭示之用途中之任一種中，該藥物經調配用於利用靜脈內途徑投與。舉例而言，在所揭示之用途中之任一種中，該藥物經調配用於利用注射、輸注或植入投與。在一些實施例中，該藥物經調配用於經由周邊肢體靜脈利用靜脈內途徑投與。

【0041】 在所揭示之用途中之任一種中，該藥物用於治療肢帶型肌肉萎縮症，諸如肢帶型肌肉萎縮症2D型（LGMD2D）。

【0042】 在一例示性實施例中，本發明提供rAAV用於製備用以治療肢帶型肌肉萎縮症之藥物的用途，其中該藥物經調配用於利用靜脈內輸注投與，且基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg，且其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。舉例而言，與投與該rAAV之前的 α 肌聚糖基因表現量相比，向有需要之個體投與該藥物使得個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現增加。

【0043】 在所揭示之用途中之任一種中，與投與該藥物之前的 α 肌聚糖基因表現量相比，向有需要之個體投與該藥物使得個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量增加；及/或與投與該藥物之前的血清CK含量相比，向個體投與該藥物使得個體中之血清CK含量減少；及/或其中運動活動及比力

產生增加；其中纖維化減少；其中對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加；及/或與投與該藥物之前的 α 肌聚糖陽性纖維數量相比，向該個體投與該藥物使得個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維數量增加，及/或與投與該藥物之前相比，向有需要之個體投與該藥物使得個體中之纖維化減少；及/或與投與該藥物之前相比，投與該藥物使得個體之肌肉中之比力、纖維直徑大小及/或離心收縮增加。在一些實施例中， α 肌聚糖基因表現藉由利用西方墨點法及/或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。

【0044】 在另一態樣中，本發明提供所揭示之rAAV中之任一種用於製備用以表現有需要之個體的細胞中之 α 肌聚糖基因之藥物的用途。舉例而言，本發明提供scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體用於製備用以表現有需要之個體的細胞中之 α 肌聚糖基因之藥物的用途，其中scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。另外，在該等用途中之任一種中，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，在該等用途中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0045】 本發明提供所揭示之rAAV中之任一種用於製備用以減少有需要之個體中之血清CK含量之藥物的用途。舉例而言，本發明提供scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體用於製備用以減少有需要之個體中之血清CK含量之藥物的用途，其中scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【0046】 在另一態樣中，本發明提供所揭示之rAAV中之任一種用於製備用以增加個體肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維之藥物的用途。舉例而言，本發明提供scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體用於製備用以增加個體肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維之藥物的用途，其中scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【0047】 本發明亦提供所揭示之rAAV中之任一種用於製備用以增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現之藥物的用途。舉例而言，本發明提供scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體用於製備用以增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的藥物的用途，其中scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。另外，在所揭示之用途中之任一種中，個體之細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中根據西方墨點法量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。可替代地，在所揭示之用途中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由在肌肉生檢中利用免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在其他實施例中，個體中之 α 肌聚糖基因之表現藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測。

【0048】 在所揭示之方法、組合物或用途中之任一種中，個體為4至15歲之人類個體，或25至55歲之人類個體，或超過50歲之人類個體。

【0049】 在所揭示之方法、組合物或用途中之任一種中，個體為兒童個體、青少年個體或年輕人個體。可替代地，個體為中年人或老年人個體。

【0050】 舉例而言，在所揭示之方法、組合物或用途中之任一種中，個體為4-15歲之人類個體，在兩個對偶基因中具有經確認之 α 肌聚糖（SGCA）突變，AAVrh74抗體呈陰性，及/或進行了>40%或正常的100

公尺行走測試。

【0051】 在另一態樣中，本發明提供產生在所揭示之方法、組合物或用途中之任一種之方法中投與之rAAV的方法，該方法包括將AAV載體質體轉移至宿主細胞中，其中AAV載體質體包括與SEQ ID NO: 8至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的核苷酸序列。舉例而言，AAV載體質體包括SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。在一些實施例中，載體質體包括與SEQ ID NO: 1、4或8至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的核苷酸序列，或載體質體包括SEQ ID NO: 1、4或8之核苷酸序列。

【0052】 在產生rAAV之所揭示之方法中之任一種中，該方法進一步包括將封裝質體及/或輔助病毒轉移至宿主細胞中。另外，在產生rAAV之所揭示之方法中之任一種中，封裝細胞包括穩定整合之AAV cap基因，及/或封裝細胞包括穩定整合之AAV rep基因。

【0053】 在另一態樣中，本發明提供包括AAV載體質體之宿主細胞，該AAV載體質體包括與SEQ ID NO: 1、4或8至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的核苷酸序列。舉例而言，宿主細胞包括有包括SEQ ID NO: 1、4或8之核苷酸序列的AAV載體質體。

【圖式簡單說明】

【0054】 圖1顯示scAAVrh74.tMCK.hSGCA基因卡匣。

【0055】 圖2顯示用scAAVrh74.tMCK.hSGCA進行之全身治療之後的劑量遞增研究中之轉殖基因表現。(A) 對用 1×10^{12} vg、 3×10^{12} vg及 6×10^{12} vg（或分別為 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg及 2×10^{14} vg/kg，

基於20 g的小鼠)(每組n=6)全身性(靜脈內)治療之小鼠的多個肌肉進行 α 肌聚糖免疫螢光染色。與未治療之對照組相比,治療後12週表現 α 肌聚糖之肌纖維介於70%-93%之範圍內。(B)來自經治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠之肌肉之西方墨點法確認hSGCA蛋白質表現。縮寫:TA,脛前肌;GAS,腓腸肌;QD,四頭肌;TRI,三頭肌;GLUT,臀肌;PSO,腰大肌;DIA,隔膜肌;HRT,心臟;WT,野生型。

【0056】圖3顯示scAAVrh74.tMCK.hSGCA對肌肉形態之改善而與 $sgca^{-/-}$ 小鼠中之劑量無關。(A)用 1×10^{12} vg、 3×10^{12} vg及 6×10^{12} vg(或分別為 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg及 2×10^{14} vg/kg,基於20 g的小鼠)之scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠的多個肌肉之蘇木精及伊紅影像(Hematoxylin & eosin image)。代表性20 $\times$ 影像展示集中式核之顯著減少,且纖維大小之總體標準化與治療劑量無關。(B)證實與經媒劑治療之小鼠及野生型對照組(每組n=6)相比治療組之各種肌肉的肌纖維直徑標準化的定量。(C)與未經治療之小鼠及野生型對照組(每組n=6)相比,經治療小鼠之肌肉中位於中央之核的定量。縮寫:TA,脛前肌;GAS,腓腸肌;QD,四頭肌;GLUT,臀肌;PSO,腰大肌;TRI,三頭肌;DIA,隔膜肌;WT,野生型。

【0057】圖4顯示用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠中纖維化減少。(A)天狼星紅染色顯示,與各種肌肉代表性20 $\times$ 圖像中之經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比所示,經scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之小鼠中纖維化減少,其由膠原蛋白沈積減少指示。(B)多個肌肉中之膠原蛋白含量之定量證實與未治療之小鼠及野生型對照組(每組n=6)相比,所有三個治療組中之膠原蛋白含量減少。縮寫:PSO,腰大肌;DIA,隔

膜；TRI，三頭肌；GLUT，臀肌。

【0058】 圖5顯示用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後對骨骼肌之功能益處。(A) 治療3個月後，搜集脛前(TA)肌(左右兩者)以量測比力及對收縮誘發之損傷(標準化為TA重量)的抗性。比力及離心收縮之定量與未治療之對照組(每組n=6)相比在所有經治療組(劑量之間具有極小差異)中增加。(B) 搜集隔膜肌條以量測比力。治療12週後，經治療小鼠之力與未治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比顯著增加。(C) 治療12週後，與未治療之 $sgca^{-/-}$ 對照組(每組n=6)相比，經由經治療小鼠中之曠場分析在步行及垂直活動有所改善。(D) 與未治療之 $sgca^{-/-}$ 對照組相比，所有治療組中血清中之肌酸激酶含量減少。藉由單向ANOVA，隨後藉由杜凱氏事後分析分析(Tukey's post hoc analysis)對資料進行分析以進行多重比較。除非另有說明，否則與經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比， $*=p<0.05$ ， $**=p<0.01$ ， $***=p<0.001$ ， $****=p<0.0001$ 。縮寫：TA，脛前肌；DIA，隔膜肌；WT，野生型。

【0059】 圖6顯示在用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後，經由血液化學反應無毒性跡象。針對毒性分析肝酶(ALT、AST及ALP/K)及血糖(GLU)含量(每組n=6)。如藉由虛線所指示，經治療小鼠之所有化學值在小鼠之正常/健康界限內。

【0060】 圖7A顯示全身scAAVrh74.tMCK.hSGCA遞送之生物分佈分析—以 3×10^{12} vg及 6×10^{12} vg(或分別為 1×10^{14} vg/kg及 2×10^{14} vg/kg，基於20 g的小鼠)靜脈內遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA之後，在 $sgca^{-/-}$ 小鼠之多個組織中添加至定量聚合酶鏈反應中之每微克DNA之轉錄物之平均vg複本的分佈直方圖。圖7B顯示以 1.0×10^{12} vg(左西方墨點

法)或 6×10^{12} vg (右西方墨點法)用媒劑 (*sgca*^{-/-} LR (乳酸林格氏))或scAArh74.tMCK.hSGCA治療之WT及*sgca*^{-/-}小鼠之肝中之 α 肌聚糖蛋白質表現的西方墨點法。每個泳道代表一隻獨立的小鼠 (M1: 小鼠1; M2: 小鼠2; M3: 小鼠3)。下圖表示紐蛋白 (vinculin), 其用作負載對照物。縮寫: DIA, 隔膜肌; TA, 脛前肌; TRI, 三頭肌。

【0061】 圖8顯示利用免疫螢光染色 (圖8A) 及西方墨點法 (圖8B) 12月齡*sgca*^{-/-}小鼠之骨骼肌中之scAAVrh74.tMCK.hSGCA的表現。圖8C中之圖提供scAAVrh74.tMCK.hSGCA *sgca*^{-/-}小鼠中之陽性肌纖維百分比。縮寫: TA, 脛前肌; GAS, 腓腸肌; QD, 四頭肌; GLUT, 臀肌; TRI, 三頭肌; PSOAS, 腰大肌, 隔膜肌; WT, 野生型, LRS, 乳酸林格氏溶液。

【0062】 圖9顯示 在12月 齡SGCA^{-/-}小 鼠 中 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA之組織學結果。圖9a顯示改善之肌肉病理。圖9b顯示腓腸肌 (GAS) 及三頭肌 (TRI) 中之中央成核減少及平均纖維大小增加。圖9c顯示與未治療之對照組相比纖維化含量減少。縮寫: TA, 脛前肌; GAS, 腓腸肌; QD, 四頭肌; GLUT, 臀肌; PSO, 腰大肌, TRI, 三頭肌; 隔膜肌; WT, 野生型。

【0063】 圖10顯示投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA之後老年小鼠之功能改善。

【實施方式】

【0064】 本發明係基於以下發現: 投與包括表現 α 肌聚糖之多核苷酸的rAAV使得肢帶型肌肉萎縮症動物模型中之肌肉纖維化減少或完全逆轉。如本文在實例中所展示, 投與本文所述之rAAV使得營養不良特點發

生逆轉，包含CK含量減少、肌力增加、行走及垂直活動（vertical activity）及其他運動功能改善。

【0065】除非另有指示，否則本發明之實踐將使用本領域技術範圍內之病毒學、微生物學、分子生物學及重組DNA技術之習知方法。文獻中充分解釋了該等技術。參見例如Sambrook等人《分子克隆：實驗室手冊（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*）》（當前版本）；《DNA選殖：實踐方法（*DNA Cloning: A Practical Approach*）》，第I及II卷(D. Glover編)；《寡核苷酸合成（*Oligonucleotide Synthesis*）》(N. Gait編,當前版本)；《核酸雜交（*Nucleic Acid Hybridization*）》(B. Hames及S. Higgins編,當前版本)；《轉錄及轉譯（*Transcription and Translation*）》(B. Hames及S. Higgins編,當前版本)；《CRC小病毒手冊（*CRC Handbook of Parvoviruses*）》，第I及II卷(P. Tijssen編)；《基本病毒學（*Fundamental Virology*）》，第2版,第I及II卷(B. N. Fields及D. M. Knipe編)；《弗雷什尼動物細胞培養物，基礎技術手冊（*Freshney Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*）》(Wiley-Liss,第三版)；及Ausubel等人(1991)《分子生物學當前方案（*Current Protocols in Molecular Biology*）》(Wiley Interscience, N.Y.)。

【0066】無論見上文或見下文，本文中所引用之所有公開案、專利及專利申請案皆以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0067】除非上下文另外明確指示，否則如本文所用，單數形式「一(a/an)」及「該」包含複數個指示物。因此，例如，提及「細胞」包含複數個該等細胞，且提及「培養物」包含提及一或多種本領域中熟習此

項技術者已知之培養物及其等效物，諸如此類。提及「重組AAV」包含兩種或更多種rAAV病毒粒子之混合物及其類似物。除非另外明確指示，否則本文所用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之普通技術人員通常理解之意義相同的意義。

【0068】 儘管本揭示案支持指代僅替代及「及/或」之定義，但除非明確指示為指代僅替代或替代相互排斥，否則術語「或」在申請專利範圍中之使用用於意謂「及/或」。

【0069】 在整個本申請案中，術語「約」用於指示值包含用於確定該值之裝置或方法的統計實驗誤差（誤差之標準差）。

【0070】 術語「載體」或「表現載體」意謂任何基因元件，諸如質體、噬菌體、轉位子、黏質體、染色體、病毒、病毒粒子等，其能夠在與適當控制元件結合時複製，且其可在細胞之間轉移基因序列。在一個實施例中，載體為病毒載體。表現載體可含有多種控制序列、結構基因（例如，所關注基因）及亦服務其他功能之核酸序列。

【0071】 如本文所用，術語「AAV」為腺相關病毒之標準縮寫。腺相關病毒為僅在細胞中生長之單股DNA小病毒，在該等細胞中共感染輔助病毒提供特定功能。當前存在十三種已表徵之AAV血清型。AAV之一般資訊及綜述可見於例如Carter, 1989, 《小病毒手冊（Handbook of Parvoviruses）》，第1卷，第169-228頁及Berns, 1990, 《病毒學（Virology）》，第1743-1764頁，雷文出版社（Raven Press），(New York)中。然而，完全預期此等相同原理將適用於額外AAV血清型，因為眾所周知各種血清型在結構上及功能上相當密切相關，甚至在基因層面上亦如此。（參見例如Blacklowe, 1988, 《小病毒及人類疾病（Parvoviruses

and Human Disease)》之第165-174頁, J. R. Pattison編; 及Rose, 《綜合病毒學 (Comprehensive Virology)》 3:1-61 (1974))。舉例而言, 所有AAV血清型明顯展現由同源rep基因介導之極類似的複製特性; 且全部攜帶三種相關衣殼蛋白, 諸如在AAV2中表現之衣殼蛋白。相關性程度藉由基因體長度在血清型之間展現廣泛交叉雜交之異雙螺旋分析; 及對應於「反向末端重複序列」(ITR)之末端處之類似自黏合鏈段之存在進一步表明。類似感染性模式亦表明各血清型中之複製功能受到類似調節控制。

【0072】 術語「AAV載體」係指包括一或多個所關注多核苷酸(或轉殖基因)側接AAV末端重複序列(ITR)之載體。當感染性病毒顆粒存在於經編碼及表現rep及cap基因產物之載體轉染的宿主細胞中時, 該等AAV載體可複製及封裝至感染性病毒顆粒中。在一個實施例中, AAV載體為衍生自腺相關病毒血清型之載體, 該等血清型包含但不限於AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh10及AAV rh74。AAV載體可具有整體或部分缺失之AAV野生型基因中之一或多者, 較佳為rep及/或cap基因, 但保留功能性側接之ITR序列。功能性ITR序列對於AAV病毒粒子之拯救、複製及封裝為必需的。因此, AAV載體在本文中定義為至少包含用於病毒之複製及封裝之順式(例如功能性ITR)中所需之彼等序列。ITR無需為野生型核苷酸序列且可變化, 例如藉由核苷酸之插入、缺失或取代, 只要序列實現功能性拯救、複製及封裝即可。

【0073】 術語「AAV輔助功能」係指AAV源性編碼序列, 其可經表現以提供AAV基因產物, 該等產物轉而以反式起作用以進行生產性AAV複製。因此, AAV輔助功能包括主要AAV開放閱讀框架(ORF)rep及

cap。已展示Rep表現產物具有許多功能，尤其包含：DNA複製之AAV起點的識別、結合及切口（nicking）；DNA解螺旋酶活性；及AAV（或其他異源）啟動子之轉錄調節。Cap表現產物提供必需的封裝功能。AAV輔助功能在本文中用以補充AAV載體中缺失之反式AAV功能。

【0074】「重組病毒」意謂已經基因改變，例如藉由將異源核酸序列添加或插入至病毒顆粒中之病毒。

【0075】「AAV病毒粒子」或「AAV病毒顆粒」或「AAV載體顆粒」係指由至少一個AAV衣殼蛋白及衣殼化多核苷酸AAV載體構成之病毒顆粒。在一個實施例中，AAV病毒粒子包括異源多核苷酸（亦即除野生型AAV基因體外之多核苷酸，諸如待遞送至哺乳動物細胞中之轉殖基因）。在一些實施例中，AAV病毒顆粒之產生包含AAV載體之產生，因此AAV載體顆粒內含有載體。若顆粒包括異源多核苷酸（亦即除野生型AAV基因體外的多核苷酸，諸如待遞送至哺乳動物細胞之轉殖基因），則其通常稱為「rAAV載體」或簡稱為「rAAV顆粒」。因此，AAV載體顆粒之產生必定包含rAAV之產生，因此rAAV載體顆粒內含有rAAV基因體。

【0076】舉例而言，野生型（wt）AAV病毒顆粒包括與AAV衣殼蛋白外殼結合之線性單股AAV核酸基因體。AAV病毒粒子可為單股（ss）AAV或自互補（SC）AAV。在一個實施例中，可將具有互補有義，例如「有義」或「反義」股之單股AAV核酸分子封裝至AAV病毒粒子中，且兩股具有相等的感染性。

【0077】術語「重組AAV」或「rAAV」在本文中定義為由AAV蛋白質殼構成之感染性複製缺乏型病毒，其衣殼化利用AAV ITR側接在兩側上之所關注異源核苷酸序列。在一個實施例中，rAAV在其中引入有AAV載

體、AAV輔助功能及附屬功能之適合的宿主細胞中產生。以此方式，宿主細胞能夠編碼將AAV載體（含有所關注重組核苷酸序列）封裝至感染性重組病毒顆粒中以用於後續基因遞送所需之AAV多肽。

【0078】術語「轉染」係指細胞吸收外來DNA，且在已將外源DNA引入細胞膜內部時，細胞已經「轉染」。多種轉染技術係本領域中通常已知的。參見例如Graham等人(1973)《病毒學（Virology）》，52:456, Sambrook等人(1989)《分子克隆，實驗室手冊（Molecular Cloning, a laboratory manual）》，冷泉港實驗室（Cold Spring Harbor Laboratories），New York, Davis等人(1986)《分子生物學基礎方法（Basic Methods in Molecular Biology）》，Elsevier及Chu等人(1981)《基因（Gene）》13:197。該等技術可用於將一或多個外源DNA部分，諸如核苷酸整合載體及其他核酸分子，引入適合宿主細胞中。

【0079】術語「轉導」表示經由複製缺乏型病毒載體，諸如經由重組AAV病毒粒子將DNA分子活體內或活體外遞送至受體細胞中。

【0080】舉例而言，「宿主細胞」表示可用作或已經用作AAV輔助構築體、AAV載體質體、附屬功能載體或其他轉移DNA之受體的微生物、酵母細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞。術語包含已轉染之原始細胞之子代。因此，如本文所用之「宿主細胞」一般係指已經外源DNA序列轉染之細胞。應理解，單一親本細胞之子代可歸因於天然、偶發或故意突變而不一定與原始親本細胞具有完全一致之形態或基因體或總DNA補體。

【0081】在係關於諸如編碼序列及控制序列之核酸序列時，術語「異源」表示不正常地接合在一起及/或不正常地與特定細胞結合之序列。因此，核酸構建體或載體之「異源」區域為在自然界中未發現與另一

分子結合之另一核酸分子內或附接至該另一核酸分子的核酸的鏈段。舉例而言，核酸構築體之異源區域可包含在自然界中未發現與編碼序列結合之序列側接的編碼序列。異源編碼序列之另一實例為編碼序列本身在自然界中未發現之構築體（例如，具有不同於天然基因之密碼子的合成序列）。類似地，出於本發明之目的，藉由通常不存在於細胞中之構築體轉型之細胞將被視為異源的。如本文所用，對偶基因變異或天然存在之突變事件不產生異源DNA。

【0082】 「編碼序列」或「編碼」特定蛋白質之序列為在處於適當的調節序列之控制下時活體外或活體內經轉錄（在DNA之情況下）及經轉譯（在mRNA之情況下）為多肽的核酸序列。編碼序列之邊界藉由5'（胺基）端處之起始密碼子及3'（羧基）端處之轉譯終止密碼子判定。編碼序列可包含但不限於來自原核或真核mRNA之cDNA、來自原核或真核DNA之基因體DNA序列，及甚至合成DNA序列。轉錄終止序列通常將位於編碼序列之3'處。

【0083】 「核酸」序列係指DNA或RNA序列。核酸包含DNA及RNA之鹼基類似物，包含但不限於4-乙醯基胞嘧啶、8-羥基-N6-甲基腺苷、氮丙啶基胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-(羧基羥基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基胺基甲基尿嘧啶、二氫尿嘧啶、肌苷、N6-異戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鳥嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鳥嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鳥嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、5-甲基胺基甲基尿嘧啶、5-甲氧基胺基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷、5'-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-異戊烯基

腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、氧丁氧苷、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶及2,6-二氨基嘌呤。

【0084】術語DNA「控制序列」共同地指共同地提供受體細胞中之編碼序列之複製、轉錄及轉譯的啟動子序列、多腺苷酸化信號、轉錄終止序列、上游調節域、複製起點、內部核糖體進入位點（「IRES」）、增強子及其類似物。此等控制序列並非全部需要始終存在，只要所選編碼序列能夠在適當的宿主細胞中進行複製、轉錄及/或轉譯即可。

【0085】術語「啟動子」在本文中以其通常意義使用指代包括DNA調節序列之核苷酸區域，其中調節序列衍生自能夠結合RNA聚合酶及起始下游（3'方向）編碼序列之轉錄的基因。轉錄啟動子可包含「可誘導啟動子」（其中可操作地連接至啟動子之多核苷酸序列的表現由分析物、輔因子、調節蛋白等誘導）、「可抑制啟動子」（其中可操作地連接至啟動子之多核苷酸序列的表現由分析物、輔因子、調節蛋白等誘導）及「組成型啟動子」。在一個實施例中，啟動子為肌肉特異性啟動子，其包含但不限於人類骨骼肌動蛋白基因元件、心肌肌動蛋白基因元件、肌間線蛋白啟動子、骨骼 α -肌動蛋白（ASKA）啟動子、肌鈣蛋白I（TNNI2）啟動子、肌細胞特異性增強子結合因子mef結合元件、肌肉肌酸激酶（MCK）啟動子、截斷的MCK（tMCK）啟動子、肌凝蛋白重鏈（MHC）啟動子、雜合 α -肌凝蛋白重鏈增強子-/MCK增強子-啟動子（MHCK7）啟動子、C5-12啟動子、鼠類肌酸激酶增強子元件、骨骼快縮肌鈣蛋白c基因元件、慢縮心肌肌鈣蛋白c基因元件、慢縮肌鈣蛋白i基因元件、低氧誘導核因子

(HIF)-反應元件(HRE)、類固醇誘導元件及糖皮質激素反應元件(gre)。在另一實施例中，啟動子為MCK啟動子、tMCK啟動子或MHCK7啟動子。

【0086】 術語「可操作地連接」係指元件之排列，其中如此描述之組件經組態以便執行其常用功能。因此，可操作地連接至編碼序列之控制序列能夠實現編碼序列之表現。控制序列不必與編碼序列相鄰，只要其用以引導其表現即可。因此，例如，介入於啟動子序列與編碼序列之間的未轉譯但經轉錄序列可存在，且啟動子序列仍可被視為「可操作地連接」至編碼序列。

【0087】 當RNA聚合酶將結合啟動子序列且將編碼序列轉錄成mRNA，隨後將其轉譯成由編碼序列編碼之多肽時，啟動子「引導」細胞中之編碼序列「轉錄」。

【0088】 「表現卡匣」或「表現構築體」係指能夠引導所關注序列或基因表現的組件。如上所述，表現卡匣包含控制元件，諸如可操作地連接至所關注序列或基因（以便引導所關注序列或基因轉錄）的啟動子，且通常亦包含多腺苷酸化序列。在本發明之某些實施例中，本文所述之表現卡匣可以含於質體構築體內。除表現卡匣之組件之外，質體構築體亦可包含一或多種可選標記物、允許質體構築體以單股DNA之形式存在的信號、至少一個多選殖位點及「哺乳動物」複製起點（例如，SV40或腺病毒複製起點）。

【0089】 「經分離」在提及核苷酸序列時意謂指定分子在諸如其他核苷酸序列、染色質材料等之生物巨分子實質上不存在之情況下存在。因此，「編碼特定多肽之經分離核酸分子」係指實質上不含不編碼目標多肽

之其他核酸分子的核酸分子；然而，該分子可包含不會有害地影響組合物之基本特徵之一些額外鹼基或部分。

【0090】 在整個本申請案中出於描述特定核酸分子中之核苷酸序列之相對位置，諸如當將特定核苷酸序列描述為相對於另一序列位於「上游」、「下游」、「3」或「5」時的目的，應理解，所提及之DNA分子之「有義」或「編碼」股中之序列的位置為在本領域中習知的。

【0091】 在核酸或胺基酸序列之情況下，術語「序列一致性」、「序列一致性百分比」或「一致百分比」係指在針對最大對應性進行比對時為相同的兩個序列中之殘基。序列一致性比較之長度可能超過基因體之全長、基因編碼序列之全長，或期望至少約500至5000個核苷酸之片段。然而，亦可期望例如具有至少約九個核苷酸、通常至少約20至24個核苷酸、至少約28至32個核苷酸、至少約36或更多個核苷酸之較小片段中的一致性。序列之一致性百分比可藉由本領域中已知之技術測定。舉例而言，同源性可藉由利用比對序列資訊及使用諸如ALIGN、ClustalW2及BLAST之可易於獲得的電腦程式直接比較兩個多肽分子之間之序列資訊來測定。在一個實施例中，當BLAST用作比對工具時，預設參數如下：遺傳密碼=標準；過濾器=無；股=兩者；截止值=60；期望值=10；矩陣=BLOSUM62；描述=50個序列；排序方式=HIGH SCORE；資料庫=非冗餘，GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS轉譯+Swiss蛋白+Spupdate+PIR。

【0092】 術語「個體」係指動物界之任何成員，其包含但不限於：人類及非人類靈長類動物，諸如黑猩猩及其他猿及猴物種；農畜，諸如牛、綿羊、豬、山羊及馬；家養哺乳動物，諸如狗及貓；實驗室動物，包

含嚙齒動物，諸如小鼠、大鼠及天竺鼠及其類似動物。在一些實施例中，個體為介於出生至2歲、1至10歲之範圍內、或介於4至15歲之範圍內、或介於10至19歲、或20至40歲、或15至29歲或25-55歲之範圍內、或介於40至60歲、或超過50歲、或超過60歲、或超過65歲、或超過70歲之範圍內的人類。舉例而言，個體為人類兒童（2至12歲）、人類青少年（10至19歲）。在一些實施例中，個體為成人（18歲或更大）。特定言之，個體為年輕人（15至29歲）、中年人（25至55歲）或中老年人（超過50歲）或老年人類個體（超過65歲）或古稀人類個體（超過70歲）。

【0093】 「治療效果」意謂本文所述之治療帶來之任何治療益處。舉例而言，此類效果可為所關注肌肉萎縮症中缺乏或缺失的蛋白質或酶之適當的目標組織中之持續表現。另外，治療效果可為所關注疾病或病症之一或多種臨床或亞臨床表現的任何減少或消除。舉例而言，CK含量之減少、纖維化之減少經減少；對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加；及/肌肉中增加之比力以及改善之運動功能向患有LGMD-2D之經治療個體提供治療益處。

【0094】 在另一態樣中，本文所述之重組AAV載體包括編碼與SEQ ID NO: 2之胺基酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的 α 肌聚糖的多核苷酸序列，或蛋白質保留 α 肌聚糖活性。在另一實施例中， α 肌聚糖包括SEQ ID NO: 2中所闡述之多肽序列。

【0095】 在另一態樣中，本文描述包括編碼功能性 α 肌聚糖之多核苷酸序列的重組AAV載體，其包括在嚴格條件下雜合至與SEQ ID NO: 1至

少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的核酸序列或其互補序列的核苷酸序列。在另一實施例中，rAAV包括與SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核苷酸序列。在另一實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【0096】 術語「嚴格」用以指本領域中通常理解為嚴格的條件。雜交嚴格度主要由溫度、離子強度及諸如甲醯胺之變性劑之濃度決定。雜交及洗滌之嚴格條件之實例為在65-68°C下之0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉，或在42°C下之0.015 M氯化鈉、0.0015 M檸檬酸鈉及50%甲醯胺。參見例如Sambrook等人，《分子選殖：實驗室手冊》，第2版，冷泉港實驗室，(紐約冷泉港（Cold Spring Harbor, N.Y.）1989)。亦可使用更嚴格的條件（諸如更高的溫度、更低的離子強度、更高濃度的甲醯胺或其他變性劑），不過，雜交速率將受到影響。在有關其中去氧寡核苷酸之雜交的情況下，其他例示性嚴格雜交條件包含在37°C（針對14個鹼基的寡核苷酸）、48°C（針對17個鹼基的寡核苷酸）、55°C（針對20個鹼基的寡核苷酸）及60°C（針對23個鹼基的寡核苷酸）下在6× SSC 0.05%焦磷酸鈉中洗滌。

【0097】 當本文將範圍用於物理特性，諸如分子量、濃度或劑量時，意欲包含範圍之所有組合及子組合以及其中的具體實施例。術語「約」當涉及數字或數字範圍時意謂所提及之數字或數字範圍為實驗可變性內（或統計實驗誤差內）之近似值，且因此數字或數字範圍可例如在所述數字或數字範圍之1%與15%之間變化。

【0098】 出於減少非特異性及/或背景雜交之目的，可以在雜交及洗

滌緩衝液中包含其他試劑。實例為0.1%牛血清白蛋白、0.1%聚乙基-吡咯啉酮、0.1%焦磷酸鈉、0.1%十二烷基硫酸鈉、 NaDodSO_4 、(SDS)、菲科爾 (ficoll)、鄧哈特溶液 (Denhardt's solution)、音波處理鮭魚精子DNA (或其他非互補DNA) 及硫酸葡聚糖，但亦可使用其他適合之試劑。可以在實質上不影響雜交條件嚴格度的情況下改變此等添加劑的濃度及類型。雜交實驗通常在pH 6.8-7.4下進行，然而，在典型離子強度條件下，雜交速率幾乎與pH無關。參見Anderson等人, 《核酸雜交：實踐方法 (Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach)》，第4章, IRL Press Limited (英格蘭牛津 (Oxford, England))。雜交條件可以由本領域中熟習此項技術者調整，以便適應此等變數且允許具有不同序列相關性的DNA形成雜交體。

【0099】 肢帶型肌肉萎縮症2D型 (LGMD2D) 為進行性肌肉萎縮症，其顯示肌無力、呼吸異常，且在極少數情況下心肌病。LGMD2D由 α 肌聚糖基因之突變引起，該等突變導致損失蛋白質，且同時損失肌聚糖及肌縮蛋白相關糖蛋白複合物。Sgca剔除型 ($sgca^{-/-}$) 小鼠模擬患有LGMD2D之患者的臨床表現型，包含營養不良特點，諸如肌肉壞死及纖維化、血清肌酸激酶 (CK) 升高及絕對肌力及運動活動之產生減少。因此， $sgca^{-/-}$ 小鼠提供用以測試基因置換之安全性及功效之相關模型。因此，本揭示案提供含有由肌肉特異性啟動子：截斷的肌肉肌酸激酶 (tMCK) 驅動之密碼子優化全長人類SGCA (hSGCA) 轉殖基因的自互補AAVrh74載體。與媒劑治療及野生型小鼠相比，使用劑量遞增設計評估 1×10^{12} 、 3×10^{12} 及 6×10^{12} vg之單次全身注射來測試 $sgca^{-/-}$ 小鼠中之scAAVrh74.tMCK.hSGCA之功效及安全性。在 $sgca^{-/-}$ 小鼠中，用

scAAVrh74.tMCK.hSGCA進行之治療在所有所測試劑量下在骨骼肌肉中之肌纖維膜處產生穩固的 α -SG之蛋白質表現。另外，如由纖維化及中央成核減少及肌纖維大小標準化所指示，scAAVrh74.tMCK.hSGCA有效地改善sgca^{-/-}小鼠之肢體及隔膜肌之病理組織學。此等分子變化伴隨有隔膜肌及脛前肌中之比力產生顯著增加、防止離心力損失及血清CK減少。與經媒劑治療之sgca^{-/-}小鼠相比，運動活動在載體治療之所有劑量下有所改善。最後，在血清化學小組中且利用肉眼屍檢偵測到載體相關毒性缺乏。總體而言，該研究在治療LGMD2D之臨床配置中為scAAVrh74.tMCK.hSGCA之全身遞送提供了支持。

【0100】在另一態樣中，本文所述之重組AAV載體可以可操作地連接至肌肉特異性控制元件。舉例而言，肌肉特異性啟動子包括以下中之一或多者：人類骨骼肌動蛋白基因元件、心肌肌動蛋白基因元件、肌間線蛋白啟動子、骨骼 α -肌動蛋白（ASKA）啟動子、肌鈣蛋白I（TNNI2）啟動子、肌細胞特異性增強子結合因子mef結合元件、肌肉肌酸激酶（MCK）啟動子、截斷的MCK（tMCK）啟動子、肌凝蛋白重鏈（MHC）啟動子、雜合 α -肌凝蛋白重鏈增強子-/MCK增強子-啟動子（MHCK7）啟動子、C5-12啟動子、鼠類肌酸激酶增強子元件、骨骼快縮肌鈣蛋白c基因元件、慢縮心肌肌鈣蛋白c基因元件、慢縮肌鈣蛋白i基因元件、低氧誘導核因子（HIF）-反應元件（HRE）、類固醇誘導元件及糖皮質激素反應元件（gre）。

【0101】在一個實施例中，肌肉特異性啟動子為tMCK啟動子，其包括SEQ ID NO: 3之序列。本文所述之例示性rAAV為包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列的AAVrh74.tMCK.hSCGA。在一些實施例中，編碼

AAVrh74.tMCK.hSCGA之多核苷酸序列包括與SEQ ID NO: 4中所闡述之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 1至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%一致的核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%一致的序列。

【0102】 在另一實施例中，編碼AAVrh74.tMCK.hSCGA之多核苷酸序列包括編碼與SEQ ID NO: 1中所闡述之核苷酸序列至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%一致的多肽序列的核苷酸序列。在一些實施例中，多核苷酸序列編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。

【0103】 在一個實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 5之5'反向末端重複序列。在另一實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 6之3'反向末端重複序列。在一些實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 7之poly A序列。

【0104】 AAV可為任何血清型，例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh.10、AAV rh.74或其變異體及衍生物。在一個實施例中，rAAV為血清型AAVrh.74。假模式化rAAV之產生揭示於例如WO 2001/083692中，該文獻以全文引用之方式併入。亦涵蓋其他類型之rAAV變異體，例如具有衣殼突變之rAAV。參見例如Marsic等人，《分子療法 (Molecular Therapy)》，22(11): 1900-1909 (2014)。

【0105】亦涵蓋包括本文所述之rAAV載體中之任一種的組合物。

【0106】提供治療有需要之人類個體之肌肉萎縮症的方法，其包括投與重組腺相關病毒（rAAV）scAAVrh74.tMCK.hSGCA之步驟，其中rAAV使用約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{15} vg/kg之劑量投與。舉例而言，在所提供之方法中之任一種中，所投與之rAAV之劑量介於約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg或約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg之間。在另一實施例中，劑量為約 5.0×10^{13} vg/kg、 1.0×10^{14} vg/kg或 2.0×10^{14} vg/kg。在一個實施例中，rAAV利用全身途徑投與，該全身途徑包括靜脈內途徑。在另一實施例中，rAAV以約 5.0×10^{13} vg/kg、 1.0×10^{14} vg/kg或 2.0×10^{14} vg/kg之劑量靜脈內投與。在一個實施例中，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症。

【0107】另外，所投與之rAAV之劑量為約 1.5×10^{13} vg至約 3.5×10^{16} vg或 3×10^{13} vg至 1×10^{16} vg、或約 1.5×10^{13} vg至約 2×10^{15} vg、或約 1.5×10^{13} vg至約 1×10^{15} vg。另外，在該等方法中之任一種中，rAAV之劑量以約10 mL/kg之濃度投與。在一個實施例中，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症。在一個實施例中，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症2D型。以vg或vg/kg表述之本揭示案中之劑量係基於利用定量PCR（qPCR）之滴定鑑定法。基於qPCR之滴定法在本領域中已知。

【0108】另外，提供治療有需要之個體中之肌肉萎縮症的方法，其包括投與重組腺相關病毒（rAAV）scAAVrh74.tMCK.hSGCA之步驟，其中rAAV使用全身投與途徑且以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg之

劑量投與；其中投與rAAV之後個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量與投與rAAV之前的 α 肌聚糖基因表現量相比有所增加；其中投與rAAV之後個體中之血清CK含量與投與rAAV之前的血清CK含量相比有所減少；及/或其中運動活動及比力產生增加；其中纖維化減少；其中對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加；及其中投與rAAV之後個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維數量與投與rAAV之前的 α 肌聚糖陽性纖維數量相比有所增加；其中投與rAAV之後個體之肌肉組織中之纖維直徑大小與投與rAAV之前的纖維直徑數相比有所增加；或其中投與rAAV之後個體之肌肉組織中之中央成核與投與rAAV之前的中央成核相比有所減少。肌肉組織包含但不限於三頭肌、脛前肌、比目魚肌、腓腸肌、二頭肌、斜方肌、臀肌、腰大肌、三角肌、四頭肌及隔膜肌。在一個實施例中，肌肉組織包括脛前肌、腓腸肌、臀肌、腰大肌及三頭肌。 α 肌聚糖之表現利用本領域普通技術人員已知之方法測定。在一個實施例中，表現在肌肉生檢中利用西方墨點法、免疫化學，及/或藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來測定。

【0109】 在一些實施例中，本揭示案包含治療有需要之個體中之肌肉萎縮症的方法，其包括投與重組腺相關病毒（rAAV）scAAVrh74.tMCK.hSGCA之步驟，其中與投與rAAV之前的該人類個體之運動功能相比，運動功能在該人類個體中顯著改善。

【0110】 提供增加有需要之患者中之 α 肌聚糖的方法，其包括向該患者投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0111】 在所提供的治療肌肉萎縮症之方法、用途及組合物中之任一種中，個體為4-15歲，在兩個對偶基因中具有經確認之 α 肌聚糖（SGCA）突變，AAVrh74抗體呈陰性，及/或進行了>40%或正常的100

公尺行走測試。在所提供的治療肌肉萎縮症之方法、用途及組合物中之任一種中，個體為兒童個體。在一些實施例中，個體為兒童個體，諸如介於1至21歲之範圍內之個體。在一些實施例中，個體為1至10歲、或2至12歲、4至15歲、或10至19歲。在一個實施例中，個體為青少年個體，諸如介於12至21歲之範圍內之個體。另外，在一個實施例中，個體為年輕人個體，諸如介於15至29歲或18-39歲之範圍內之個體。在一些實施例中，個體為中年人或老年人個體，以使得中年人可以在25-55歲之範圍內，中老年人個體可以在超過50歲之範圍內，且老年人個體可以在超過65歲之範圍內。在一些實施例中，rAAV利用注射、輸注或植入投與。舉例而言，rAAV利用輸注在約1至2小時內投與。另外，rAAV經由周邊肢體靜脈藉由靜脈內途徑投與。

【0112】 在治療有需要之人類個體之肌肉萎縮症的方法中，該等方法包括投與重組腺相關病毒（rAAV）scAAVrh74.tMCK.hSGCA之步驟，其中rAAV使用全身投與途徑且以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg之劑量投與，且rAAV包括與SEQ ID NO: 1至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的核苷酸序列。在另一實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 1中所闡述之核苷酸序列。在一個實施例中，rAAV編碼包括與SEQ ID NO: 2至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的多肽序列的蛋白質。在另一實施例中，rAAV包括編碼蛋白質之核苷酸序列，該蛋白質包括SEQ ID NO: 2中所闡述之多肽序列。另外，所揭示之

rAAV中之任一種包括SEQ ID NO: 3之啟動子（諸如tMCK啟動子）序列。在一些實施例中，rAAV為血清型AAVrh.74。另外，rAAV包括SEQ ID NO: 3之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。在一個實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 5之5'反向末端重複序列。在另一實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 6之3'反向末端重複序列。在另一實施例中，rAAV包括SEQ ID NO: 7之poly A序列。

【0113】 AAV劑量可利用多種方法測定，該等方法包含但不限於LISA、逆轉錄酶活性評定、FACS、轉導分析北方墨點法（northern blotting）（例如，半定量北方墨點）、點漬墨法分析（dot blot analysis）或PCR（例如，qPCR）。眾所周知，AAV劑量可藉由利用定量即時PCR（qPCR）量測AAV載體基因體來測定。該等qPCR方法克服習知轉導分析之不一致性或任意性結果。在PCR劑量測定之一個實施例中，質體DNA用作校正標準。質體之形式可能影響qPCR方法之劑量結果。在一個實施例中，環形或超螺旋DNA或質體用作定量標準。在另一實施例中，線性化DNA或質體用作定量標準。

【0114】 術語「超螺旋DNA」或「超螺旋質體」係指不包括游離端之DNA或質體。術語「線性化DNA」或「線性化質體」係指包括不彼此連接之游離5'端及游離3'端的DNA或質體。在一個實施例中，線性化DNA或質體藉由限制性消化環形DNA（例如質體DNA）或藉由限制性消化dbDNA獲得。在另一實施例中，限制性消化使用產生至少一個鈍端之酶進行。

【0115】 在一例示性實施例中，治療有需要之人類個體之肌肉萎縮症的方法包括投與重組腺相關病毒（rAAV）scAAVrh74. tMCK7.hSGCA

之步驟，其中rAAV使用全身投與途徑且以約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg之劑量投與，其中人類個體罹患肢帶型肌肉萎縮症。在一個實施例中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，rAAV利用靜脈內輸注在約1至2小時內以約 5.0×10^{13} vg/kg、 1.0×10^{14} vg/kg或 2.0×10^{14} vg/kg之劑量投與，且其中rAAV包括SEQ ID NO: 3之scAAVrh74.tMCK7.hSGCA構築體核苷酸序列。在另一實施例中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，劑量為約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg。

【0116】 本揭示案亦提供增加個體之肌肉組織中之肌聚糖表現的方法，其包括向個體投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體，該構築體包括與SEQ ID NO: 1及/或4至少90%一致、至少95%一致或99%一致的核苷酸序列。

【0117】 本揭示案進一步提供改善個體之肌肉功能的方法，其包括向個體投與包括與SEQ ID NO: 1及/或4至少90%一致、至少95%一致或99%一致的核苷酸序列之構築體。

【0118】 在一些態樣中，個體受編碼肌聚糖蛋白質之基因中之基因突變或肌肉萎縮症之苦。在一些態樣中，個體受編碼 α 肌聚糖蛋白質之基因中之基因突變之苦。

【0119】 在所提供之方法中之任一種中，投與scAAVrh74.tMCK7.hSGCA構築體之後個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量與投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體之前的 α 肌聚糖基因表現量相比有所增加。

【0120】 另外，在所提供之方法中之任一種中，細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體之前及之後在肌肉生

檢中根據西方墨點法或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。

【0121】在 所 提 供 之 方 法 中 之 任 一 種 中，投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 後 α 肌 聚 糖 蛋 白 質 含 量 增 加。舉 例 而 言，如 藉 由 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 及 之 後 在 肌 肉 生 檢 中 根 據 西 方 墨 點 法 量 測 α 肌 聚 糖 蛋 白 質 含 量 來 偵 測， α 肌 聚 糖 蛋 白 質 含 量 增 加 至 少 33%，或 藉 由 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 及 之 後 在 肌 肉 生 檢 中 利 用 免 疫 組 織 化 學 及 / 或 藉 由 偵 測 每 微 克 基 因 體 DNA 之 載 體 基 因 體 數 量 來 量 測 α 肌 聚 糖 蛋 白 質 含 量。

【0122】在 本 文 所 提 供 之 方 法 中 之 任 一 種 中，投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 後 個 體 中 之 血 清 CK 含 量 與 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 的 血 清 CK 含 量 相 比 有 所 減 少。

【0123】在 本 文 所 提 供 之 方 法 中 之 任 一 種 中，投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 後 個 體 之 肌 肉 組 織 中 之 α 肌 聚 糖 陽 性 纖 維 數 量 與 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 的 α 肌 聚 糖 陽 性 纖 維 數 量 相 比 有 所 增 加。舉 例 而 言， α 肌 聚 糖 陽 性 纖 維 數 量 藉 由 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 及 之 後 在 肌 肉 生 檢 上 利 用 西 方 墨 點 法 或 免 疫 組 織 化 學 量 測 α 肌 聚 糖 蛋 白 質 含 量 來 偵 測。舉 例 而 言，投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 後 個 體 之 肌 肉 組 織 中 之 α 肌 聚 糖 陽 性 纖 維 數 量 有 所 增 加。

【0124】在 本 文 所 提 供 之 方 法 中 之 任 一 種 中，投 與 rAAV 之 後 個 體 中 之 α 肌 聚 糖 含 量 與 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 的 α 肌 聚 糖 含 量 相 比 有 所 增 加。 α 肌 聚 糖 含 量 藉 由 投 與 scAAVrh74.tMCK.hSGCA 構 築 體 之 前 及 之 後 在 肌 肉 生 檢 上 利 用 免 疫 組 織 化 學 或 西 方 墨 點 法 量 測 α 肌 聚 糖 蛋

白質含量來偵測。

【0125】 另一實施例提供表現患者細胞中之 α 肌聚糖基因的方法，其包括向患者投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。在表現患者細胞中之 α 肌聚糖基因的所提供方法中之任一種中，患者細胞中之 α 肌聚糖基因的表現藉由投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體之前及之後在肌肉生檢中根據西方墨點法或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測。在一個實施例中，藉由偵測每個核之超過一個rAAV載體基因體複本來量測患者中之 α 肌聚糖基因。在另一實施例中，藉由偵測每微克基因體DNA之載體基因體數量來量測個體中之 α 肌聚糖基因的表現。

【0126】 亦提供減少有需要之患者中之血清CK含量的方法，該方法包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【0127】 提供增加患者肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維的方法，其包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。在此等方法中之任一種中，藉由投與rAAV之前及之後在肌肉生檢上利用西方墨點法或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測 α 肌聚糖陽性纖維數量。

【0128】 另一實施例提供增加有需要之個體中之 α 肌聚糖的表現的方法，其包括向個體投與SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。在此等方法中之任一種中，藉由投與rAAV之前及之後在肌肉生檢上利用西方墨點法或免疫組織化學量測 α 肌聚糖蛋白質含量來偵測 α 肌聚糖含量。

【0129】亦提供產生重組AAV載體顆粒之方法，其包括培養用本文所述之任何重組AAV載體轉移之宿主細胞以及自經轉染細胞之上清液回收重組AAV顆粒。亦涵蓋包括本文所述之重組AAV載體中之任一種的病毒顆粒。在一個實施例中，產生rAAV之方法包括將AAV載體質體轉移至宿主細胞中。在另一實施例中，重組AAV載體顆粒及/或AAV載體質體包括與SEQ ID NO: 8至少約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%或約89%、更通常約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%或更加一致的核苷酸序列。在另一態樣中，本揭示案提供包括AAV載體質體之宿主細胞，該AAV載體質體包括SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。在一些實施例中，AAV載體質體在宿主細胞中穩定表現。穩定攜帶AAV載體質體之宿主細胞可用於產生rAAV。在一個實施例中，AAV載體質體為pAAV.tMCK.hSGCA.KAN質體（SEQ ID NO: 8）。

【0130】亦提供減少有需要之哺乳動物個體中之纖維化的方法。就此而言，該方法包括向哺乳動物個體投與治療有效量之本文所述之AAV載體（或包括本文所述之AAV載體的組合物）。在一些實施例中，哺乳動物個體罹患肌肉萎縮症。在一個實施例中，肌肉萎縮症為LGMD2D。在一些實施例中，投與本文所述之AAV載體（或包括本文所述之AAV載體的組合物）減少個體之肌肉組織中之纖維化。在一個實施例中，肌肉組織包括腰大肌、隔膜肌、三頭肌及/或臀肌。

【0131】如本文所用之術語「肌肉萎縮症」係指強度及肌肉體積逐漸衰減之病症。肌肉萎縮病之非限制性實例可包含貝氏肌肉萎縮症（Becker muscular dystrophy）、脛骨肌肉萎縮症、杜興氏肌肉萎縮症

(Duchenne muscular dystrophy)、埃默里-德雷弗斯氏肌肉萎縮症 (Emery-Dreifuss muscular dystrophy)、面肩胛臂肌肉萎縮症、肌聚糖病、板素 (merosin) 缺乏型先天性肌肉萎縮症、1D型先天性肌肉萎縮症、福山型 (Fukuyama) 先天性肌肉萎縮症、肢帶型1A型肌肉萎縮症、肢帶型2A型肌肉萎縮症、肢帶型2B型肌肉萎縮症、肢帶型2C型肌肉萎縮症、肢帶型2D型肌肉萎縮症、肢帶型2E型肌肉萎縮症、肢帶型2F型肌肉萎縮症、肢帶型2G型肌肉萎縮症、肢帶型2H型肌肉萎縮症、肢帶型2I型肌肉萎縮症、肢帶型2I型肌肉萎縮症、肢帶型2J型肌肉萎縮症、肢帶型2K型肌肉萎縮症、肢帶型IC型肌肉萎縮症、單純形大疱性表皮鬆懈 (epidermolysis bullosa simplex) 之脊柱強直肌肉萎縮症、眼咽型肌肉萎縮症、眼咽肌肌肉萎縮症、烏爾里希型先天性肌肉萎縮症 (Ullrich congenital muscular dystrophy) 及烏爾里希型硬化肌肉萎縮症 (Ullrich scleroatonic muscular dystrophy)。在一些實施例中，個體罹患肢帶型肌肉萎縮症。在一些實施例中，個體罹患肢帶型肌肉萎縮症2D型 (LGMD2D)。

【0132】 如本文所用之術語「纖維化」係指胞外基質 (ECM) 組件之過量或不受調控之沈積及在損傷之組織 (包含骨骼肌、心肌、肝、肺、腎及胰臟) 的異常修復過程。沈積之ECM組件包含膠原蛋白，例如，膠原蛋白1、膠原蛋白2或膠原蛋白3及纖維結合蛋白。

【0133】 在另一態樣中，本文描述增加肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維、肌肉中之纖維直徑大小、離心收縮、哺乳動物個體中之 α 肌聚糖的肌力及/或表現的方法，其包括向哺乳動物個體投與治療有效量之本文所述之AAV載體 (或包括本文所述之AAV載體的組合物)。本文中亦描述減少

個體中之纖維化、中央成核、CK含量及/或膠原蛋白沈積的方法，其包括向個體投與治療有效量之本文所述之AAV載體（或包括本文所述之AAV載體的組合物）。

【0134】 在本發明之方法中之任一種中，個體可罹患肌肉萎縮症，諸如肢帶型肌肉萎縮症或任何其他肌縮蛋白相關肌肉萎縮症。在一個實施例中，肌肉萎縮症為LGMD-2D。

【0135】 亦提供治療哺乳動物個體之肌肉萎縮症的方法，其包括向哺乳動物個體投與治療有效量之本文所述之AAV載體（或包括本文所述之AAV載體的組合物）。在一些實施例中，肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症。

【0136】 在本發明之方法中之任一種中，rAAV利用肌肉內注射或靜脈內注射投與。另外，在本發明之方法中之任一種中，rAAV全身性投與，諸如利用注射、輸注或植入非經腸投與。

【0137】 本發明之組合物經調配用於肌肉內注射或靜脈內注射。另外，本發明之組合物經調配用於全身投與，諸如利用注射、輸注或植入非經腸投與。

【0138】 另外，組合物中之任一種經調配用於向罹患肌肉萎縮症（諸如肢帶型肌肉萎縮症或任何其他肌縮蛋白相關肌肉萎縮症）之個體投與。在一些實施例中，組合物可進一步包括表現 α 肌聚糖之第二重組AAV載體或包括SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 4中所闡述之多核苷酸序列的第二重組AAV載體。

【0139】 在本發明之用途中之任一種中，藥物經調配用於肌肉內注射或靜脈內注射。另外，在本發明之用途中之任一種中，藥物經調配用於

全身投與，諸如利用注射、輸注或植入非經腸投與。另外，藥物中之任一種可經製備用於向罹患肌肉萎縮症（諸如肢帶型肌肉萎縮症或任何其他肌縮蛋白相關肌肉萎縮症）之個體投與。在一些實施例中，藥物可進一步包括表現 α 肌聚糖之第二重組AAV載體或包括SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 4中之多核苷酸序列的第二重組AAV載體。

【0140】 前述段落並不意欲限定本發明之每一態樣，且額外態樣描述於其他章節，諸如實施方式中。整個文獻意欲以統一揭示內容形式相關，且應理解，即使未發現特點組合在本文獻之相同句子或段落或章節中結合，仍涵蓋本文所述之所有特點組合。作為額外態樣，本發明包含本發明之所有實施例，其範疇以任何方式與由上文具體段落所界定的變化形式相比較窄。舉例而言，在描述為屬之本發明之某些態樣的情況下，應理解，屬之每一成員單獨地係本發明之一態樣。

AAV

【0141】 本發明之重組AAV基因體包括本發明之核酸分子及一或多個側接核酸分子之AAV ITR。rAAV基因體中之AAV DNA可來自能衍生出重組病毒之任何AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13及AAV rh.74。假模式化rAAV之產生揭示於例如WO 01/83692中。亦涵蓋其他類型之rAAV變異體，例如具有衣殼突變之rAAV。

【0142】 本發明之DNA質體包括rAAV基因體。將DNA質體轉移至容許經AAV之輔助病毒（例如腺病毒、E1缺失腺病毒或疱疹病毒）感染之細胞，以將rAAV基因體組裝至感染性病毒顆粒中。產生rAAV之技術為

本領域中之標準技術，其中將待封裝之AAV基因體、rep及cap基因以及輔助病毒功能提供至細胞。rAAV之產生需要單個細胞（本文指示為封裝細胞）內存在以下組分：rAAV基因體、與rAAV基因體分離之（亦即不在其中之）AAV rep及cap基因及輔助病毒功能。AAV rep及cap基因可來自可衍生出重組病毒之任何AAV血清型，且可來自與rAAV基因體ITR不同的AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12、AAV-13、AAV rh10及AAV rh.74。假模式化rAAV之產生揭示於例如WO 2001/083692中，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0143】產生封裝細胞之方法為形成穩定表現AAV顆粒產生所必需之所有組分的細胞株。舉例而言，可將包括缺少AAV rep及cap基因之rAAV基因體、與rAAV基因體分離之AAV rep及cap基因及可選標記物（諸如新黴素抗性基因）的質體（或多個質體）整合至細胞之基因體中。rAAV基因體可藉由諸如GC拖尾（Samulski等人，1982，《美國國家科學院院刊（Proc. Natl. Acad.）》S6.USA, 79:2077-2081）、添加含有限制性核酸內切酶切割位點之合成連接子（Laughlin等人，1983，《基因（Gene）》，23:65-73）或藉由直接的平末端連接（Senapathy & Carter, 1984，《生物化學雜誌（J. Biol. Chem.）》，259:4661-4666）之程序引入細菌質體中。封裝細胞株可隨後經諸如腺病毒之輔助病毒感染。此方法之優勢在於該等細胞為可選的且適於大規模生產rAAV。適合之方法之其他實例使用腺病毒或桿狀病毒而非質體將rAAV基因體及/或rep及cap基因引入至封裝細胞中。

【0144】rAAV產生之一般原理綜述於例如Carter, 1992，《生物技術

之當前觀點 (Current Opinions in Biotechnology)》，1533-539；及 Muzyczka, 1992, 《微生物學及免疫學之當前主題 (Curr. Topics in Microbial. and Immunol.)》，158:97-129) 中。各種方法描述於Ratschin 等人, 《分子與細胞生物學 (Mol. Cell.Biol.)》 4:2072 (1984)； Hermonat等人, 《美國國家科學院院刊》，81:6466 (1984)； Tratschin 等人, 《分子與細胞生物學》 5:3251 (1985)； McLaughlin等人, 《病毒學雜誌 (J. Virol.)》，62:1963 (1988)；及 Lebkowski等人, 1988 《分子與細胞生物學》，7:349 (1988)。Samulski等人 (1989, 《病毒學雜誌》，63:3822-3828)；美國專利第5,173,414號；WO 95/13365及相應的美國專利第5,658,776號；WO 95/13392；WO 96/17947；PCT/US98/18600；WO 97/09441 (PCT/US96/14423)；WO 97/08298 (PCT/US96/13872)；WO 97/21825 (PCT/US96/20777)；WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)；WO 99/11764；Perrin等人 (1995) 《疫苗 (Vaccine)》 13:1244-1250；Paul等人 (1993) 《人類基因療法 (Human Gene Therapy)》 4:609-615；Clark等人 (1996) 《基因療法 (Gene Therapy)》 3:1124-1132；美國專利第5,786,211號；美國專利第5,871,982號；及美國專利第6,258,595號。前述文獻在此以其全文引用之方式併入本文中，其中特定強調文獻中與rAAV產生相關之彼等章節。

【0145】 本發明因此提供產生感染性rAAV之封裝細胞。在一個實施例中，封裝細胞可為經穩定轉型之癌細胞，諸如HeLa細胞、293細胞及PerC.6細胞（同源293株）。在另一個實施例中，封裝細胞可為並非經轉型癌細胞的細胞，諸如低傳代293細胞（用腺病毒之E1轉型的人類胚胎腎細胞）、MRC-5細胞（人類胚胎纖維母細胞）、WI-38細胞（人類胚胎纖維母

細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚胎肺細胞)。

【0146】本發明之重組AAV(亦即感染性衣殼化rAAV顆粒)包括rAAV基因體。實施例包含但不限於稱為pAAV.tMCK.hSCGA之rAAV,其包括SEQ ID NO: 3中所闡述之多核苷酸序列。

【0147】rAAV可藉由此項技術中標準的方法,諸如藉由管柱層析或氯化銫梯度來純化。自輔助病毒純化rAAV載體之方法為本領域中已知的,且可包含例如Clark等人,《人類基因療法(*Hum. Gene Ther.*)》, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp及Clark,《分子醫學方法(*Methods Mol. Med.*)》, 69: 427-443 (2002); 美國專利第6,566,118號及WO 98/09657中所揭示之方法。

【0148】在另一實施例中,本發明涵蓋包括本發明之rAAV的組合物。本文所述之組合物在醫藥學上可接受之載劑中包括rAAV。組合物亦可包括其他成分,諸如稀釋劑及佐劑。可接受之載劑、稀釋劑及佐劑對受體無毒,且較佳在所採用之劑量及濃度下為惰性,且包含緩衝劑,諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽或其他有機酸;抗氧化劑,諸如抗壞血酸;低分子量多肽;蛋白質,諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白;親水性聚合物,諸如聚乙烯吡咯啉酮;胺基酸,諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸;單糖、雙糖及其他碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合劑,諸如EDTA;糖醇,諸如甘露糖醇或山梨糖醇;成鹽相對離子,諸如鈉;及/或非離子型界面活性劑,諸如吐溫(Tween)、普朗尼克(pluronic)或聚乙二醇(PEG)。

【0149】在本發明之方法中待投與之rAAV的滴定量將視例如特定rAAV、投與模式、治療目標、個體及所靶向之細胞類型而變化,且可藉

由本領域術中標準之方法來測定。rAAV之滴定量可在每毫升約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 至約 1×10^{14} 或更多個耐脫氧核糖核酸酶顆粒（DRP）之範圍內。如利用qPCR所量測，劑量可以病毒基因體（vg）為單位來表述。

【0150】 本發明涵蓋用rAAV活體內或活體外轉導目標細胞之方法。活體內方法包括向有需要之動物（包含人類）投與有效劑量或有效多次劑量之包括本發明之rAAV的組合物的步驟。若在罹患病症/疾病之前投與該劑量，則投與係預防性的。若在罹患病症/疾病之後投與該劑量，則投與係治療性的。在本發明之實施例中，有效劑量為緩解（消除或減少）至少一種與所治療病症/疾病病況相關之症狀的劑量、減緩或預防病症/疾病病況進展的劑量、減緩或預防病症/疾病病況進展的劑量、減輕疾病程度的劑量、引起疾病緩解（局部或總體）的劑量及/或延長存活期的劑量。用本發明之方法進行預防或治療所涵蓋之疾病的實例為肌肉萎縮症，諸如肢帶型肌肉萎縮症。因此，提供用包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列之rAAV scAAVrh74.tMCK.hSGCA轉導目標細胞的方法。

【0151】 在另一實施例中，本揭示案提供產生rAAV scAAVrh74.tMCK.hSGCA之方法，其包括將AAV載體質體轉移至宿主細胞中。將DNA轉移至宿主細胞之方法為本領域中所熟知的，其包含但不限於轉染、感染、轉型、電穿孔及轉導。在一個實施例中，載體質體包括與SEQ ID NO: 8至少約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%或約89%、更通常約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%或更加一致的核苷酸序列。在另一實施例中，載體

質體包括與SEQ ID NO: 8至少90%、95%或99%一致的核苷酸序列。在另一實施例中，載體質體包括SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。在另一態樣中，本揭示案提供包括AAV載體質體之宿主細胞，該AAV載體質體包括SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。在一些實施例中，AAV載體質體在宿主細胞中穩定表現。穩定攜帶AAV載體質體之宿主細胞可用於產生rAAV。在一個實施例中，AAV載體質體為pAAV.tMCK.hSGCA.KAN質體。

【0152】 在一個實施例中，載體質體包括與SEQ ID NO: 1、4或8至少約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%或約89%、更通常約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%或更加一致的核苷酸序列。

【0153】 在一個實施例中，載體質體包括與SEQ ID NO: 1、4或8至少約90%、95%或99%一致的核苷酸序列。在一個實施例中，載體質體包括SEQ ID NO: 1、4或8之核苷酸序列。在一個實施例中，產生rAAV之方法進一步包括將封裝質體及/或輔助病毒轉移至宿主細胞中。在一些實施例中，在封裝質體中包括可操作地連接至啟動子之AAV rep及/或cap基因。在一個實施例中，啟動子為AAV轉錄啟動子。在一個實施例中，宿主細胞為封裝細胞。在一個實施例中，封裝細胞包括穩定整合之AAV cap基因。在另一實施例中，封裝細胞包括穩定整合之AAV rep基因。

【0154】 如本文所用，術語「宿主細胞」係指可用於表現外源DNA序列之細胞。宿主細胞之非限制性實例包括微生物、酵母細胞、昆蟲細胞及/或哺乳動物細胞。宿主細胞可用作AAV輔助構築體、封裝質體、AAV載體質體、附屬功能載體或其他DNA之受體。如此處所用之術語涵蓋表

現原始宿主細胞中之外源DNA序列之後的原始細胞後代。用於AAV產生之宿主細胞之非限制性實例包含Sf9昆蟲細胞及HEK 293T細胞。可以藉由感染（病毒或桿狀病毒）、使用試劑（例如脂質體、磷酸鈣）之瞬時轉染或物理方式（例如電穿孔）或本領域中已知之其他方式將AAV載體質粒引入宿主細胞，例如Sf9或293T中。在另一實施例中，宿主細胞株用rAAV質體穩定整合至其基因體中。該等穩定細胞株可藉由將所選標記物併入載體質體中來確立。

[0098]在一個實施例中，宿主細胞為用於產生AAV病毒顆粒之封裝細胞。因此，在另一態樣中，本揭示案提供包括AAV載體質體之宿主細胞，該AAV載體質體包括與SEQ ID NO: 8至少90%、95%或99%一致的核苷酸序列。在一個實施例中，AAV載體質體包括SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。在另一實施例中，宿主細胞包括SEQ ID NO: 1、4或8之核苷酸序列。

【0155】 本發明亦涵蓋組合療法。如本文所用之組合包含同步治療或依序治療兩者。特定涵蓋本發明之方法與標準醫學治療劑（例如，類固醇、皮質類固醇及/或糖皮質激素，包含但不限於潑尼松（prednisone）、潑尼松龍（prednisolone）及地夫可特（deflazacort）中之一或多者）之組合，正如與新穎療法之組合。就此而言，組合包含在向個體投與本發明方法之rAAV之前、與向個體投與rAAV同時或在向個體投與rAAV之後，向個體投與一或多種類固醇、皮質類固醇及/或糖皮質激素，包含但不限於潑尼松、潑尼松龍及地夫可特中之一或多者。

【0156】 在本發明涵蓋之組合療法之相關實施例中，糖皮質激素包含但不限於倍氯米松（beclomethasone）、倍他米松（betamethasone）、

布地奈德 (budesonide)、皮質酮 (cortisone)、地塞米松 (dexamethasone)、氫化可的松 (hydrocortisone)、甲基潑尼松龍 (methylprednisolone) 或曲安西龍 (triamcinolone)。

【0157】應認識到，抗原特異性T細胞反應可在用rAAV載體投與之個體中進行。此為基因轉移後2-4週之間的預期反應。該等抗原特異性T細胞反應之一種可能結果為清除經轉導細胞及損失轉殖基因表現。為減弱對基於rAAV之療法之宿主免疫反應，在療法之前，例如在療法程序之前二十四小時，個體可利用口腔以60毫克/天之最大劑量按照大約1毫克/公斤/天的預防性潑尼松或相當的糖皮質激素開始。若需要，則亦將允許IV投與1毫克/公斤/天之大致劑量的相當糖皮質激素。治療將持續大約一個月。用於潑尼松或相當的糖皮質激素之逐漸減少之方案可基於各個個體對基因轉移之免疫反應實施，該免疫反應利用ELISpot分析以及藉由利用GGT之肝功能監測進行評估。

【0158】rAAV載體之治療有效量為介於約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg或約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg之間之範圍內的rAAV之劑量。在另一實施例中，劑量為約 5.0×10^{13} vg/kg、約 1.0×10^{14} vg/kg或約 2.0×10^{14} vg/kg。在另一實施例中，劑量為 5.0×10^{13} vg/kg、 1.0×10^{14} vg/kg或 2.0×10^{14} vg/kg。亦預期本發明包含包括此等範圍之rAAV載體的組合物。

【0159】劑量可以病毒基因體 (vg) 為單位來表述。rAAV之滴定量可利用超螺旋DNA或質體定量標準或線性化DNA或質體定量標準測定。AAV載體之滴定量或劑量可基於質體或DNA之物理形式作為定量標準而

改變。舉例而言，滴定量或劑量之值可基於超螺旋標準qPCR滴定法或線性標準qPCR滴定法而改變。在一個實施例中，本揭示案中之劑量係基於超螺旋DNA或質體作為定量標準。在另一實施例中，本揭示案中之劑量係基於線性化DNA或質體作為定量標準。因此，在一個實施例中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，rAAV載體之治療有效量為介於約 1.0×10^{12} vg/kg至約 2.0×10^{15} vg/kg、約 5×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{15} vg/kg、約 1.0×10^{13} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg、約 5×10^{13} vg/kg至約 2×10^{14} vg/kg或約 2.0×10^{13} vg/kg至約 3.0×10^{14} vg/kg之範圍內的rAAV之劑量。在另一實施例中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，劑量為約 5.0×10^{13} vg/kg、約 1.0×10^{14} vg/kg或約 2.0×10^{14} vg/kg。在另一實施例中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，劑量為 5.0×10^{13} vg/kg、 1.0×10^{14} vg/kg或 2.0×10^{14} vg/kg。

【0160】 在另一實施例中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，rAAV載體之治療有效量為介於約 1.0×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.5×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.6×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg、約 1.2×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg、約 1.4×10^{13} vg/kg至約 7.4×10^{13} vg/kg、約 1.9×10^{13} vg/kg至約 7.5×10^{13} vg/kg或約 1.8×10^{13} vg/kg至約 8.0×10^{13} vg/kg範圍內的rAAV之劑量。舉例而言，基於線性化DNA或質體作為定量標準，rAAV載體之治療有效量為約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg之劑量。

【0161】 在一個實施例中，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準之 5.0×10^{13} vg/kg之劑量等於基於線性化DNA或質體作為定量標準之1.85

$\times 10^{13}$ vg/kg之劑量。在另一實施例中，基於超螺旋DNA或質體之 2.0×10^{14} vg/kg之劑量等於基於線性化DNA或質體作為定量標準之 7.41×10^{13} vg/kg。因此，在另一實施例中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg。

【0162】 投與有效劑量之組合物可利用本領域中標準的途徑，包含但不限於肌肉內、非經腸、靜脈內、經口、頰內、鼻、肺部、顱內、骨內、眼內、經直腸或陰道。可由本領域中熟習此項技術者考慮所治療之感染及/或疾病病況及待表現 α 肌聚糖之目標細胞/組織選擇及/或匹配本發明之rAAV（特定言之，AAV ITR及衣殼蛋白）之AAV組分的投與途徑及血清型。

【0163】 本發明提供有效劑量之本發明之rAAV及組合物的局部投與及全身投與。舉例而言，全身投與為投與至循環系統中以使得影響全身。全身投與包含經由胃腸道之腸內投與，諸如吸收，及經由注射、輸注或植入之非經腸投與。

【0164】 特定言之，本發明之rAAV之實際投與可藉由使用將rAAV重組載體輸送至動物之目標組織中之任何物理方法實現。根據本發明之投與包含但不限於注射至肌肉、血流中及/或直接注射至肝中。已證明簡單地將rAAV再懸浮於磷酸鹽緩衝鹽水中足以提供適用於肌肉組織表現之媒劑，且對於可與rAAV一起共投與之載劑或其他組分不存在已知限制（但在利用rAAV之正常方式中應避免降解DNA之組合物）。rAAV之衣殼蛋白可經修飾以使得rAAV靶向所關注特定目標組織，諸如肌肉。參見例如WO 02/053703，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0165】 醫藥組合物可製備為可注射調配物或藉由經皮輸送遞送至

肌肉之局部調配物。先前已研發出用於肌肉內注射及經皮輸送兩者之多種調配物，且其可用於本發明之實踐中。為了易於投與及處置，rAAV可與任何醫藥學上可接受之載劑一起使用。因此，在另一態樣中，本申請案係關於一種調配物，其包括有包括AAVrh74衍生之衣殼之rAAV、緩衝劑、離子強度劑及界面活性劑。在一個實施例中，rAAV之濃度為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 5.0×10^{14} vg/kg。在另一實施例中，rAAV之濃度為約 5.0×10^{12} vg/kg至約 1.0×10^{14} vg/kg。在另一實施例中，rAAV之濃度為約 5×10^{13} vg/kg、約 1×10^{14} vg/kg及/或約 2×10^{14} vg/kg。在一個實施例中，劑量係基於超螺旋DNA或質體作為定量標準。在一個實施例中，rAAV為scAAVrh74.tMCK.hSGCA載體。在一個實施例中，緩衝劑包括tris、麥黃酮（tricine）、雙麥黃酮、HEPES、MOPS、TES、TAPS、PIPES及CAPS中之一或多者。在另一實施例中，緩衝劑包括濃度為約5 mM至約40 mM之具有pH 8.0之tris。在一個實施例中，緩衝劑包括約20 mM之具有pH 8.0之tris。在一個實施例中，離子強度劑包括以下中之一或多種：氯化鉀（KCl）、乙酸鉀、硫酸鉀、硫酸銨、氯化銨（ NH_4Cl ）、乙酸銨、氯化鎂（ MgCl_2 ）、乙酸鎂、硫酸鎂、氯化錳（ MnCl_2 ）、乙酸錳、硫酸錳、氯化鈉（NaCl）、乙酸鈉、氯化鋰（LiCl）及乙酸鋰。在一個實施例中，離子強度劑包括濃度為約0.2 mM至約4 mM之 MgCl_2 。在另一實施例中，離子強度劑包括濃度為約50 mM至約500 mM之NaCl。在另一實施例中，離子強度劑包括濃度為約0.2 mM至約4 mM之 MgCl_2 及濃度為約50 mM至約500 mM之NaCl。在另一實施例中，離子強度劑包括濃度為約1 mM之 MgCl_2 及濃度為約200 mM之NaCl。在一個實施例中，界面活性劑包括磺酸鹽、硫酸鹽、膦酸鹽、磷酸鹽、泊洛沙姆（Poloxamer）及陽離子型界

面活性劑中之一或多者。在一個實施例中，泊洛沙姆包括以下中之一或多者：泊洛沙姆124、泊洛沙姆181、泊洛沙姆184、泊洛沙姆188、泊洛沙姆237、泊洛沙姆331、泊洛沙姆338及泊洛沙姆407。在一個具體實施例中，界面活性劑包括濃度為約0.00001%至約1%之泊洛沙姆。在另一實施例中，界面活性劑包括濃度為約0.001%之泊洛沙姆188。出於肌肉內注射之目的，可採用佐劑（諸如芝麻油或花生油）或水性丙二醇中之溶液以及無菌水溶液。必要時，該等水溶液可經緩衝，且首先用生理鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑呈等張性。可在水中適合地與諸如羥丙基纖維素之界面活性劑混合製備作為游離酸（DNA含有酸性磷酸根基）或藥理學上可接受之鹽的rAAV的溶液。rAAV之分散液亦可在甘油、液體聚乙二醇及其混合物中及在油中製備。在一般儲存及使用條件下，此等製劑含有防腐劑以防止微生物生長。與此相關，所採用無菌水性介質所有皆可容易地藉由本領域中熟習此項技術者熟知之標準技術獲得。

【0166】 適合於可注射用途之醫藥形式包含無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉劑。在所有情況下，形式必須為無菌的且必須為流體，達到存在可容易注射性之程度。其在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須防止諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液體聚乙二醇及其類似物）、其適合的混合物及植物油之溶劑或分散介質。適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之類塗層、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。微生物作用之預防可藉由各種抗菌劑及抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及其類似物來實現。在多數情況下，其較佳地包含等張劑，例如糖或氯化

鈉。可注射組合物之延長吸收可藉由使用延緩吸收之藥劑（例如單硬脂酸鋁及明膠）來實現。

【0167】 無菌可注射溶液藉由以下製備：將所需量之rAAV視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌。一般而言，藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在無菌粉劑用於製備無菌可注射溶液之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其自其預先無菌過濾之溶液產生活性成分粉劑加任何額外所需成分之粉劑。

【0168】 用rAAV進行轉導亦可在活體外進行。在一個實施例中，所需目標肌肉細胞自個體移出，經rAAV轉導且再引入個體中。可替代地，可使用同基因型或異種肌肉細胞，在此情況下，彼等細胞在個體中將不會產生不當的免疫反應。

【0169】 用於轉導且將經轉導細胞再引入個體中之適合方法係本領域中已知的。在一個實施例中，可在活體外，例如在適當媒劑中藉由組合rAAV與肌肉細胞來轉導細胞，且使用習知技術，諸如南方墨點法（Southern blot）及/或PCR，或藉由使用可選標記物篩檢含有所關注的DNA的彼等細胞。然後可將經轉導細胞調配成醫藥組合物，且藉由各種技術將組合物引入個體中，該等技術諸如利用肌肉內、靜脈內、皮下及腹膜內注射，或藉由使用例如導管注射至平滑肌及心肌中。

【0170】 用本發明之rAAV轉導細胞引起 α 肌聚糖之持續表現。因此，本發明提供向哺乳動物個體、較佳人類投與/遞送表現 α 肌聚糖之rAAV的方法。此等方法包含用本發明之一或多種rAAV轉導組織（（包含但不限於組織，諸如肌肉；器官，諸如肝及腦；及腺體，諸如唾液腺）。

轉導可藉由包括組織特異性控制元件之基因卡匣進行。舉例而言，本發明之一個實施例提供轉導由肌肉特異性控制元件引導之肌肉細胞及肌肉組織之方法，該等肌肉特異性控制元件包含但不限於源自肌動蛋白及肌凝蛋白基因家族，諸如源自myoD基因家族[參見Weintraub等人，《科學》(*Science*)，251: 761-766 (1991)]之控制元件、肌細胞特異性增強子結合因子MEF-2[Cserjesi及Olson，《分子與細胞生物學》，11: 4854-4862 (1991)]、源自人類骨骼肌動蛋白基因之控制元件[Muscat等人，《分子與細胞生物學》，7: 4089-4099 (1987)]、心臟肌動蛋白基因、肌肉肌酸激酶序列元件[參見Johnson等人，《分子與細胞生物學》，9:3393-3399 (1989)]及鼠類肌酸激酶增強子(mCK)元件、源自骨骼快縮肌鈣蛋白C基因、慢縮心臟肌鈣蛋白C基因及慢縮肌鈣蛋白I基因之控制元件：低氧誘導核因子(Semenza等人，《美國國家科學院院刊》，88: 5680-5684 (1991))、類固醇誘導元件及包含糖皮質激素反應元件(GRE)之啟動子(參見Mader及White，《美國國家科學院院刊》，90: 5603-5607 (1993))，及其他控制元件。

【0171】 肌肉組織為活體內DNA遞送之誘人標靶，因為其不為生命器官且容易獲取。本發明涵蓋來自經轉導肌纖維之miRNA的持續表現。

【0172】 「肌肉細胞」或「肌肉組織」意謂來源於任何種類之肌肉（例如骨骼肌及平滑肌，例如來自消化道、膀胱、血管或心肌組織）之細胞或細胞群。該等肌肉細胞可為分化或未分化的，諸如肌母細胞、肌細胞、肌管、心肌細胞及心肌母細胞(cardiomyoblast)。

【0173】 術語「轉導」用以指經由所描述之複製缺陷型rAAV將所關注多核苷酸（例如，編碼 α 肌聚糖之多核苷酸序列）活體內或活體外投與/

遞送至受體細胞中，使得受體細胞表現 α 肌聚糖。

【0174】 因此，本文亦描述向有需要之哺乳動物個體投與有效劑量（或基本上同時投與之劑量或以間隔給予之劑量）的編碼 α 肌聚糖之rAAV的方法。

【0175】 本文提及之所有公開案及專利皆以全文引用之方式併入本文中，好像各個別公開案或專利具體地且單獨地以引用之方式併入本文中。在有衝突的情況下，以本申請案（包含本文中之任何定義）為準。所描述之數字範圍包含各範圍內之每一整數值且包含最小及最大的所陳述整數在內。

【0176】 以下實例中進一步描述本發明，該等實例不限制申請專利範圍中所述的本發明之範疇。

實例

【0177】 使用AAVrh74.tMCK.hSCGA之臨床前研究描述於國際專利公開案第WO 2013/078316號及美國專利第9,434,928號及第10,105,453號中，該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

實例1

材料及方法

動物模型

【0178】 所有程序皆由全國兒童醫院機構動物護理及使用委員會的研究機構（The Research Institute at the Nationwide Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee）批准。基因敲除（sgca^{-/-}）小鼠在全國兒童醫院研究機構之動物資源中心（the Animal Resources Core at the Research Institute at Nationwide Children's Hospital）中之

標準化條件下飼養且維持為同型動物。根據具有12:12小時暗:亮循環之Teklad Global Rodent Diet（3.8%纖維、18.8%蛋白質、5%脂肪食物）維持小鼠。所有動物任意圈養在具有食物及水之標準小鼠籠中。

基因分型

【0179】 DNA基因分型用於鑑別 $sgca^{-/-}$ 小鼠。分離來自尾部剪裁之DNA且藉由聚合酶鏈反應（PCR），使用OneTaq DNA聚合酶（馬薩諸塞州伊普斯維奇新英格蘭生物實驗室（New England Biolabs, Ipswich, MA））分析。一系列引子用於PCR分析以測定 α -SG基因敲除狀態。使用以下引子及條件：內含子1（CAGGGCTGGGAGCTGGGTTCTG；SEQ ID NO: 9）；突變引子-內含子3（CCCAGGGCCTTGATGCCT；SEQ ID NO: 10）；及NEOTR（GCTATCAGGACATAGCGTTGGCTA；SEQ ID NO: 11）。在以下條件下，在基因體DNA上將反應進行30次循環：94℃，5分鐘；94℃，1分鐘；64℃，1分鐘；72℃，2.5分鐘；及72℃，7分鐘。

α -SG基因構築

【0180】 scAAVrh74.tMCK.hSGCA轉殖基因卡匣使用腺病毒相關病毒（AAV）載體DNA質體pAAV.tMCK.aSG-neo，藉由將驅動密碼子優化人類 α -SG cDNA序列（人類cDNA，Genbank寄存編號U08895）之tMCK表現卡匣插入自互補載體主鏈pHpa7中來製備。此載體中所包含之唯一病毒序列為AAV2之反向末端重複序列，其為病毒DNA複製及rAAV載體基因體之封裝兩者所需的。反向末端重複序列（ITR）中之一者具有末端解析位點（TRS）之靶向缺失，由此ITR限制複製，以便於產生用於自互補載體封裝之二聚複製形式。AAVrh74病毒已在小鼠、非人類靈長類動物（NHP）及人類中證實在血管障壁中轉導肌肉方面為安全且高效的。

載體產生

【0181】 重組AAV (sc)rAAVrh74.tMCK.hSGCA利用三重轉染製備。基於qPCR滴定法用於利用Prism 7500 Fast Taqman偵測器系統 (PE 應用生物系統 (PE Applied Biosystems)) 測定囊封vg滴定量。構築體包括促進高水準表現之嵌合內含子。嵌合內含子由以下構成：5'供體位點，其來自人類β血球蛋白基因之第一內含子及分支點；及3'剪接受體位點，其來自在免疫球蛋白基因重鏈可變區之前導子與主體之間的內含子。rAAV亦包括合成SV40多腺苷酸化信號，其用於有效轉錄終止。表現卡匣之示意圖展示於下文圖1中。載體使用側接AAV2 ITR序列且衣殼化至AAVrh74病毒粒子中之人類α肌聚糖 (α-SG) 基因產生。構築體含有tMCK即刻早期啟動子/增強子 (GenBank寄存編號M21390) 且使用β血球蛋白內含子用於高水準表現。

基因遞送

【0182】 小鼠中之全身遞送係藉由將載體注射至sgca^{-/-}小鼠之尾部靜脈中來達成。向小鼠注射 1×10^{12} vg、 3×10^{12} vg或 6×10^{12} vg總劑量 (介於13-20 g之範圍內的小鼠； 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg及 2×10^{14} vg/kg-劑量係基於超螺旋DNA或質體作為定量標準--分別基20 g的小鼠) 之scAAVrh74.tMCK.hSGCA，使用30標準尺寸之超細胰島素注射器將其稀釋於200-250 μL體積之乳酸林格氏溶液中。所有經治療小鼠在4-5週齡經注射，且在注射後12週處死。在另一實施例中，基於線性化DNA或質體作為定量標準，劑量為約 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg。

血清肌酸激酶量測

【0183】 肌酸激酶之含量在野生型C57BL/6小鼠 (n = 6)、媒劑 (乳

酸林格氏溶液) 治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠 ($n = 6$) 及scAAVrh74.tMCK.hSGCA 治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠 (每劑量 $n = 6$) 之血清中使用肌酸激酶SL分析 (Creatine Kinase SL Assay) 及對應的製造商方案 (Sekisui Diagnostics; Charlottetown, PE, Canada) (目錄號326-10) 量測。簡言之, 25 μ L血清與1 mL加工試劑混合, 且添加至光析槽中。在分光光度計上設定動力學分析以每30秒量測340 nm下之吸光率, 持續180秒。使用吸光率讀數及下文所列之方程式計算肌酸激酶含量:

$$U/L = [\Delta \text{Abs.}/\text{min}) \times 1.025 \times 1000] / [1 \times 6.22 \times 0.025] = (\Delta \text{Abs.}/\text{min}) \times 6592。$$

強直性

【0184】處死小鼠, 且在肋部連接及中央肌腱完整之情況下分割隔膜 (DIA), 且置放於K-H緩衝劑中。分離2-4 mm寬之DIA部分。將DIA條在中央肌腱處與經編織手術絲 (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) 牢固地連接, 且經由附連至條遠端之一部分肋骨縫合。將各肌肉轉移至填充有維持在37°C下之含氧K-H溶液之水浴中。肌肉經水平地比對, 且在固定接腳與雙模式力轉導蛋白-伺服馬達 (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canada) 之間直接連接。將兩個鉑盤電極安置於器官浴中以便側接肌肉之長度。將肌肉拉伸至最佳長度以便量測抽搐性收縮, 且隨後使其靜置10分鐘, 隨後開始強直性方案。一旦肌肉穩定, 則將其設定至最佳長度為1 g且經歷升溫, 其由每30秒三次1 Hz抽搐隨後每分鐘三次150 Hz抽搐組成。3分鐘休息時段之後, DIA在20、50、80、120、150、180 Hz下刺激, 允許各刺激之間的2分鐘休息期, 各刺激持續時間為250毫秒以測定最大強直力。量測肌肉長度及重量。針對肌肉重量及長度標準

化力。

用於功能性評估之脛前 (TA) 強直收縮

【0185】 TA評估程序遵循Hakim等人, 《分子與生物學方法 (Methods Mol Bio)》1; 709:75-89 (2011)中所列之方案。經由腹膜內腔使用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物(分別為100 mg/kg及10 mg/kg)麻醉小鼠。在分割範疇下, 移除後肢皮膚以暴露TA肌肉及髌骨。雙正方形圍繞帶有4-0縫合線之髌骨肌腱連接。隨後切割TA遠端肌腱, 且雙正方形節點並不圍繞帶有4-0縫合線之肌腱連接, 所述縫合線儘可能靠近肌肉, 且隨後切斷肌腱。經暴露之肌肉連續地用生理食鹽水弄濕。隨後將小鼠轉移至熱控制平台且維持在37°C下。用髌骨肌腱縫合線將膝蓋固定至金屬接腳, 且將遠端TA肌腱縫合至力轉導蛋白 (Aurora Scientific, Aurora, Canada) 之水平臂上。將電極置放於坐骨神經附近以刺激其。一旦肌肉穩定, 則將靜止張力設定為一長度 (最佳長度), 其中抽搐收縮最大。3分鐘休息期之後, 在50、100、150及200 Hz下刺激TA, 允許各刺激之間存在1分鐘休息。在5分鐘休息之後, 隨後用10%拉伸再延長程序對肌肉進行一系列10次等距收縮, 其在1分鐘時間間隔下發生。離心收縮後, 隨後處死小鼠且切割TA肌肉且冷凍以用於組織學。

免疫螢光

【0186】 對來自TA、腓腸肌 (GAS)、四頭肌 (QD)、腰大肌 (PSOAS)、臀肌 (GLUT)、三頭肌 (TRI)、DIA及心臟 (HRT) 肌肉之冷凍切片(12 μ m厚)進行hSGCA轉殖基因之免疫螢光染色。在1:100之稀釋度下, 切片與兔單株 α -SG初級抗體 (Abcam; Cambridge, UK;目錄號ab189254) 一起培育。使用Zeiss (德國) AxioCam MRC5相機拍攝覆蓋

肌肉部分之四個不同象限的四張隨機20×影像。測定各影像之 α -SG染色呈陽性之纖維相比於對照物之百分比且對各肌肉取平均值。陽性 α -SG纖維表現定義為具有至少30%的比經媒劑治療之 $sgca$ -/-對照組更亮的纖維染色。

西方墨點分析

【0187】 來自野生型C57BL/6小鼠、經媒劑治療之 $sgca$ -/-小鼠及經載劑給藥之 $sgca$ -/-小鼠的樣品用於各西方墨點法。兔單株 α -SG抗體（Abcam,目錄號ab189254）之1:10,000稀釋度及小鼠單株 α 輔肌動蛋白抗體（Sigma-Aldrich,目錄號A7811）之1:5,000稀釋度用於hSGCA墨點法。亦使用兔單株小鼠紐蛋白抗體（Invitrogen，目錄號70062）之1:1,000稀釋度。抗小鼠（Millipore,目錄號AP308P）及抗兔（Life Technologies,目錄號656120）二級辣根過氧化酶抗體用於增強的化學螢光免疫偵測。西方墨點法定量利用密度測定法使用ImageQuantTL 1D 8.1.0（GE Healthcare Life Sciences）執行。

形態量測分析

【0188】 蘇木精及伊紅（H&E）染色在16-17週齡的野生型C57BL/6小鼠（n=6）、經媒劑治療之 $sgca$ -/-小鼠（n=6）及scAAVrh74.tMCK.hSGCA 16-17週齡的經治療之 $sgca$ -/-小鼠（每劑量n=6）之12 μ m厚的冷凍切片上進行以用於分析。在TA、GAS、QD、GLUT、PSOAS及TRI肌肉中測定具有中央核之肌纖維百分比。另外，在TA、GAS、QD、TRI以及PSOAS肌肉中量測肌肉纖維直徑。用Zeiss AxioCam MRC5相機拍攝每隻動物每個肌肉四張隨機20×影像。使用美國國家衛生研究院（the National Institutes of Health）ImageJ軟體定量中

心成核纖維，且使用Zeiss Axiovision LE4軟體量測纖維直徑。

生物分佈定量聚合酶鏈反應 (PCR) 分析

【0189】 進行Taqman定量PCR以定量如先前所述之靶向及非靶向對側肌肉以及非靶向器官中所存在之載體基因體複本數量。載體特異性引子探針組用於擴增直接位於tMCK啟動子下游之內含子區域之序列，該tMCK啟動子為獨特的且位於scAAVrh.74.tMCK.hSGCA轉殖基因卡匣內。以下引子及探針用於此研究中：tMCK內含子正向引子5'-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3'；tMCK內含子反向引子5'-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3'；及tMCK內含子探針5'-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C- IABkFQ-3' (Integrated DNA Technologies)。複本數報導為每微克基因體DNA之載體基因體。

天狼星紅染色及膠原蛋白定量

【0190】 進行天狼星紅染色以測定肌肉組織中膠原蛋白沈積之含量。染色在來自16-17週齡野生型C57BL/6 (n=6)、經媒劑治療之sgca^{-/-} (n=6) 及16-17週齡的經scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之sgca^{-/-} (每劑量n=6) GLUT、PSOAS、TRI及DIA肌肉之12 μm冷凍切片上進行。每隻小鼠每個肌肉拍攝四張20×影像，且用ImageJ軟體程式測定膠原蛋白沈積量。計算所有組之各肌肉之平均膠原蛋白百分比。

雷射監測曠場籠活動

【0191】 使用曠場活動室測定實驗小鼠之總體活動。對來自野生型C57BL/6 (n=6) 之16-17週齡的小鼠及未治療之sgca^{-/-} (n=6) 對照組以及16-17週齡的經scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之sgca^{-/-}小鼠 (每劑量n=6) 進行分析。當小鼠最活躍時，在白天之相同時間、在接近夜晚循環

結束之清晨，測試所有小鼠。所有小鼠皆在隔室中在昏暗的光下且每次用相同處理器進行測試。此外，為了減少焦慮且保持行為變量處於可潛在地影響小鼠之正常活動且因此影響分析結果之最小值，吾人測試未單獨圈養之小鼠。使用光束活動系統（San Diego Instruments, San Diego, CA）監測小鼠活動。此系統使用在前後及左右橫穿動物腔室之不可見紅外線光束之柵格，以監測小鼠在x-y-z平面內之位置及移動。以5分鐘間隔記錄活動，持續1小時的循環。在開始資料獲取之前數天，使小鼠適應於活動測試房間，歷時初始1小時階段。在四個組中之個別腔室中測試小鼠。在每次使用之間清潔測試設備以減少可改變結果之小鼠環境行為變數。將資料轉化為微軟（Microsoft）Excel工作表，且在Excel程式內進行所有計算。向各小鼠上添加用於在x及y平面中移動之個別光束中斷以表示全步行，且添加在z平面中之光束中斷直至在1小時時間間隔內獲得垂直活性。

安全性研究

血液學

【0192】自心臟穿刺中取出全血用於血液化學分析。血液在血清分離管中收集且以15,000 rpm離心10分鐘。將血清收集，冷凍且送至查爾斯河實驗室（Charles River Laboratories）以用於化學測試。肝酶及葡萄糖化學物質在血液學分析中優先排序。

組織病理學

【0193】在屍檢時，將肌肉新鮮冷凍於液氮冷卻之甲基-丁烷中；搜集所有其他器官且固定於福馬林（formalin）中且包埋於石蠟中。處理後，將組織用H&E染色，且將切片及所有組織送至GEMPath公司，由獸醫病理學家進行正式檢查。

統計分析

【0194】 除非另外指定，否則資料表示為平均值±SEM（誤差條），且使用單向ANOVA進行分析，且使用GraphPad Prism 5（GraphPad Software, La Jolla, CA）藉由杜凱氏事後分析測試評估各組之間的多重比較。

實例2

全身遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA之效率

【0195】 起始小型預備試驗以藉由以 1×10^{12} vg總劑量（基於20 g的小鼠， 5×10^{13} vg/kg，n=4）之劑量靜脈內注射至*sgca*^{-/-}小鼠之橫向尾部靜脈中來觀測基因遞送之功效。在基因轉移4週後對所搜集之肌肉進行免疫螢光分析。在以下七種不同肢體骨骼肌中之hSGCA轉殖基因表現量：TA、GAS、GLUT、QD、PSOAS及TRI及DIA。缺乏α-SG之小鼠在藉由免疫螢光分析時顯示蛋白質完全不存在（圖2A；TA、GAS、TRI及DIA之代表性影像）。 1×10^{12} vg總劑量之治療劑量在基因遞送後4週在所有骨骼肌（包含DIA）中產生平均 $54 \pm 23.81\%$ 載體轉導。

全身性遞送至*sgca*^{-/-}小鼠之scAAVrh74.tMCK.hSGCA之劑量遞增研究

【0196】 為了測定最安全且最有效的劑量，在劑量遞增研究中研究遞送三個單獨劑量之載體，其中用 1×10^{12} vg總劑量（ 5×10^{13} vg/kg）、 3×10^{12} vg總劑量（ 1×10^{14} vg/kg）或 6×10^{12} vg總劑量（ 2×10^{14} vg/kg）之scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療4週齡*sgca*^{-/-}小鼠之橫向尾部靜脈。基因遞送後12週處死小鼠以使用免疫螢光評估TA、GAS、QD、GLUT、PSOAS、TRI、DIA及HRT肌肉中之hSGCA轉殖基因表現。用最低劑量之 1×10^{12} vg總劑量（ 5×10^{13} vg/kg）治療之小鼠中之平均hSGCA表現在骨骼肌（包含直徑）中為 $70.07 \pm 3.71\%$ 總體總體。用 $3 \times$

10¹² vg總劑量 (1 × 10¹⁴ vg/kg) 之中間劑量治療之小鼠中之平均hSGCA表現在所有骨骼肌中為85.35±2.36%。用最高劑量之6 × 10¹² vg總劑量 (2 × 10¹⁴ vg/kg) 治療之小鼠中之平均hSGCA表現在所有骨骼肌中為93.86±2.02%。為了清楚起見，基於超螺旋DNA或質體作為定量標準計算劑量。HRT肌肉中之hSGCA表現保持在75%而與劑量無關。組織之代表性影像展示於圖2A中。穩固的hSGCA表現顯示基因遞送在所有三種劑量下之功效。基因遞送靶向前肢及後肢兩者中之多個肌肉，展示在所有三種劑量下在小鼠中之優越的α-SG表現。最重要地，在遞送之後，至關重要的隔膜肌亦展示SG基因表現。圖2B中所示之西方墨點確認所有三個給藥組之經治療小鼠的所有肌肉中之蛋白質表現。小鼠中之心肌亦展示治療後之α-SG表現。

【0197】 缺乏α-SG蛋白質之人類及小鼠兩者之組織病理學特徵包含中心成核、纖維大小分佈之不規則性、壞死及纖維化。H&E染色用於可視化肌肉形態，包含纖維大小和中央成核（圖3）。如圖3A及3B中所示，與經媒劑治療之*sgca*^{-/-}對照相比，在經scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之*sgca*^{-/-}小鼠之TA、QD及TRI中觀測到纖維尺寸分佈（類似於在野生型對照中所觀測到之纖維尺寸分佈）的校正。與經媒劑治療之*sgca*^{-/-}對照小鼠相比，纖維之平均直徑大小在TA、QD及TRI肌肉中在所有劑量下顯著增加（表1）。

表1

組織	纖維直徑 (μm)			
	未治療	最低劑量	中間劑量	最高劑量
TA	40.23±19.33	46.24±18.06****	43.16± 15.88****	41.37±13.54*
QD	30.87±15.56	48.10±19.96****	43.00±16.87****	45.65±14.51****
TRI	25.05±12.09	36.47±16.50****	37.01±14.14****	36.63±11.58****

* = p <0.05 , **** = p <0,0。縮寫：TA，脛前肌，AD：四頭肌；及

TRI，三頭肌。最低劑量： 1.0×10^{12} vg；中間劑量： 3.0×10^{12} vg；最高劑量： 6.0×10^{12} vg。

【0198】 在用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之*sgca*^{-/-}小鼠中，亦觀測到中央成核減少。經媒劑治療之*sgca*^{-/-}小鼠之骨骼肌具有68.72±3.01%之位於中央之核的纖維。用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後，所有肌肉組織中之中央成核之總值減少，具有最低劑量之scAAVrh74.tMCK.hSGCA，產生55.60±3.25%之展示位於中央之核的骨骼肌纖維（表2）。

表2

	中央成核（%）			
組織	未治療	最低劑量	中間劑量	最高劑量
TA	82.08	61.6****	64.61	51.29****
GAS	78.01	44.98***	48.43	16.19****
QD	78.28	63.82	70.35	42.79****
GLUT	60.61	51.73	58.28	31.18
PSO	43.42	50.99	58.78	44.42
TRI	68.34	59.57	70.37	41.72
AVG	68.72±3.01	55.60±3.25	61.85±4.00	37.93±12.46

****=p<0.0001。縮寫：TA，脛前；GAS，腓腸肌；QD，四頭肌；GLUT，臀肌；PSO，腰大肌，AVG，平均；及TRI，三頭肌。

【0199】 用中間劑量治療之小鼠具有61.85±4.00%之具有集中式核之肌纖維，而用最高劑量治療之肌纖維之成核減少至37.93±12.46%（圖3C）。

【0200】 LGMD患者的肌肉經常發生組織被膠原蛋白克服的纖維化，導致瘢痕組織的形成。使用天狼星紅染色評估纖維化，以檢測膠原蛋白I及III含量，作為纖維化的標記物。如圖4所示，在用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後，在*sgca*^{-/-}小鼠中觀察到紅色染色穩固

減少。定量揭示與經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 對照小鼠相比，經scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠中在所有肌肉中之膠原蛋白含量顯著減少（圖4B）。總之，此等資料表明hSGCA轉殖基因之成功全身遞送，如藉由肌肉組織中之穩固表現及與 $sgca^{-/-}$ 小鼠中缺乏 α -SG蛋白質相關之組織病理學標誌的改善所指示。

實例3

scAAVrh74.tMCK.hSGCA rAAV改善隔膜肌及脛前肌功能且提高運動能力

【0201】由於近端肌肉無力及功能損失為LGMD2D之主要症狀，且呼吸衰竭為LGMD2D死亡之主要原因，因此改善TA及DIA之功能性及強度對於增加患有LGMD2D之個體之壽命及生活品質至關重要。使用DIA和整個TA肌肉條來確認hSGCA表現與肌肉強度之間的相關性。如圖5A及5B中所示，與野生型小鼠相比，在TA中鑑別出比力及對收縮誘發之損傷的抗性缺陷，且在 $sgca^{-/-}$ 未治療之小鼠之DIA肌肉中鑑別出比力缺陷。

【0202】與野生型小鼠相比， $sgca^{-/-}$ 小鼠之TA肌肉展現顯著功能性缺陷，比力輸出減少44%（分別 161.6 ± 8.20 mN/mm²對比 291.7 ± 6.17 mN/mm²； $p < 0.0001$ ），以及遵循苛刻的離心收縮方案產生的力損失更大（ $sgca^{-/-}$ 小鼠中損失 $44.0 \pm 6.0\%$ ；野生型小鼠中損失 $18.0 \pm 1.0\%$ ； $p < 0.0001$ ）（圖5A）。尾部靜脈遞送之後十二週，申請人注意到，用低劑量、中間劑量及高劑量之scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後比力輸出顯著改善，其分別增加至 218 ± 11.94 mN/mm²、 227 ± 11.7 mN/mm²及 255 ± 11.7 mN/mm²。與經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比，遵循離心收縮方案之對損傷之抗性亦得到改善，其中低劑量、中間劑量及高劑量治療之小鼠僅分別損

失 $22.0\pm4.0\%$ 、 $22.0\pm3.0\%$ 及 $12.0\pm1.0\%$ （與經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比， $p<0.0001$ ）（圖5A）。

【0203】在經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠之DIA中，所產生之比力展示與野生型小鼠相比強度減少41%（ $131.5\pm12.07\text{ mN/mm}^2$ 對比 $223.8\pm15.85\text{ mN/mm}^2$ ）。在所有三種劑量下用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後觀測到力得到改善，其中低劑量小鼠中之DIA之比力增加至 $179.2\pm21.03\text{ mN/mm}^2$ ，中間劑量之小鼠中之DIA之比力增加至 $201.2\pm22.94\text{ mN/mm}^2$ 且高劑量小鼠中之DIA之比力增加至 $261.46\pm9.73\text{ mN/mm}^2$ （圖65B）。此等資料顯示 $sgca^{-/-}$ 小鼠中之TA及DIA肌肉具有力缺陷，且比野生型小鼠耗竭更快。然而，遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA之後，達成功能性恢復。

【0204】LGMD2D之額外症狀包含運動不耐受及活動及步行減少，這可能歸因於肌肉損傷，引起疼痛及肌肉疲勞。為了評估身體活動量，對 $sgca^{-/-}$ 及野生型C57BL/6小鼠進行類似於前述報導中所用之曠場活動方案。監測小鼠之步行相關活動以確定與野生型小鼠相比， $sgca^{-/-}$ 小鼠中 α -SG之缺乏是否導致步行減少。圖5C中之圖描繪了與野生型對照組相比， $sgca^{-/-}$ 小鼠模型中之步行及垂直直立減少。 $sgca^{-/-}$ 小鼠中記錄之平均水平可走動光束中斷為 2000 ± 159 次光束中斷/小時，與野生型對照組中 8911 ± 1193 次光束中斷/小時相比步行減少77.5%。 $sgca^{-/-}$ 小鼠中記錄之平均垂直直立光束中斷為 24.75 ± 11.47 次光束中斷/小時，與野生型對照組中 803.3 ± 55.03 次光束中斷/小時相比垂直直立減少97%。用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後，小鼠之步行及垂直直立活動在基因遞送後12週增加。在用 $1\times10^{12}\text{ vg}$ 總劑量治療之小鼠中平均水平步行增加至

3595±55.03次光束中斷/小時，用 3×10^{12} vg總劑量治療之小鼠中5238±861.9次光束中斷/小時，及用 6×10^{12} vg總劑量治療之小鼠中6487±467.9次光束中斷/小時。用 1×10^{12} vg總劑量治療之小鼠中平均垂直直立活動增加至377±146.1次光束中斷/小時，用 3×10^{12} vg總劑量治療之小鼠中321±126.1次光束中斷/小時，及用 6×10^{12} vg總劑量治療之小鼠中448.8±53.43次光束中斷/小時（圖5C）。經治療小鼠之身體活動展示與經媒劑治療之 $sgca^{-/-}$ 小鼠相比步行改善44%-69%，且垂直直立改善92%-94%。另外，所有經治療組中之血清肌酸激酶含量與未治療之小鼠相比顯著減少（圖5D）。總之，此等資料展示-SG之遞送恢復身體活動且防止 $sgca^{-/-}$ 小鼠中之肌肉分解。

*scAAVrh74.tMCK.hSGCA*之安全性及生物分佈分析

【0205】為安全起見，對載體給藥之 $sgca^{-/-}$ 及野生型小鼠進行血液化學及血液學研究。所有值皆在小鼠之正常參考範圍內（圖6）。此外，將scAAVrh74.tMCK.hSGCA給藥之 $sgca^{-/-}$ 及野生型小鼠的H&E染色之所有肌肉及器官的組織切片送至獸醫病理學家以進行正式檢查。在來自scAAVrh74.tMCK.hSGCA給藥之 $sgca^{-/-}$ 及野生型小鼠中之任一種的任何樣品中未注意到副作用。除功效以外，此等資料證明，所有三種劑量之scAAVrh74.tMCK.hSGCA的全身遞送對 $sgca^{-/-}$ 及野生型小鼠具有良好耐受性、安全且無毒。

【0206】為測試遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA之潛在毒性或安全問題，進行載體生物分佈定量PCR以定量載體基因體存在（圖7A）。使用載體特異性tMCK.hSGCA引子探針組偵測自scAAVrh74.tMCK/hSGCA給藥之 $sgca^{-/-}$ 小鼠測試之所有肌肉及器官中之載體基因體。如所預期，載體基

因體存在於所測試組織中，其中本最高複數在肝中，其次為肌肉。用媒劑（*sgca*^{-/-} LR）或scAArh74.tMCK.hSGCA治療之WT及*sgca*^{-/-}小鼠之肝中的 α 肌聚糖蛋白質之西方墨點法顯示於圖7B中。

【0207】為改善 α -SG表現之效率，在一個實施例中，將hSGCA cDNA序列封裝至自互補載體中。自互補AAV載體含有促進dsDNA形成之反向重複基因體，因此允許複製及轉錄在不需要多個載體基因體促進此等過程之情況下發生。因此，使用自互補載體消除允許更快速地表現轉殖基因之速率限制步驟。申請人已展示，在LGMD2D患者中血管內遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA與以 1×10^{12} 及 3×10^{12} 之劑量基因轉移後180天的 α -SG表現增加相關。

【0208】與經媒劑治療之對照組相比，靜脈內遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA提供在所有三個載經體治療組中之脛前肌及隔膜肌中強度及對收縮誘發之損傷的抗性增加的肌肉。另外，用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療使得CK顯著減少。另外，在用scAAVrh74.tMCK.hSGCA治療後，小鼠能夠比經媒劑治療之小鼠更頻繁地步行及靠後肢直立。

【0209】通常經由在hSGCA遞送之後LGMD2D患者之肌肉生檢觀測到包含位於中央之核、纖維大小之廣泛變化性、炎症、壞死及纖維化的顯著組織病理學，與經媒劑治療之小鼠相比，小鼠之CN減少、肌纖維大小之分佈更均勻及膠原蛋白含量減少，且肌肉具有總體更健康的外觀。組織病理學及疤痕組織之總體減少同時與經載體治療小鼠中之肌肉之總體正常功能及生理學的改善相關。

【0210】最後，經由定量PCR、血清化學分析及組織病理學進行之

安全性研究未檢查到毒性跡象。tMCK啟動子僅在靶向性組織（所有肌肉）中偵測到，且在其他（非肌肉）器官中不存在，除了肝。肝中之tMCK偵測不常見或與其為清除器官無關。經認證之獸醫病理學家對所有組織（包含肝）進行之病理組織學檢查推斷，全身遞送scAAVrh74.tMCK.hSGCA不僅在所有組織中安全，且基因遞送顯著減少經媒劑治療之sgca^{-/-}小鼠之骨骼肌中發現的營養不良病理。在經載體治療之小鼠之血液樣品上進行之化學分析亦支持毒性缺乏。

【0211】如在本揭示案中，劑量遞增研究提供臨床前資料以支持在本文中全身性測試之最低劑量，亦即總計 1×10^{12} vg (5×10^{13} vg/kg)，足以減少與 α -SG蛋白質損失相關之病徵及症狀。在最低劑量下，如藉由強度及運動行為（步行及直立）增加所證明，在經載體治療之小鼠中觀測到所有肌肉中所測試之功能改善。安全性研究顯示，即使在總計 6×10^{12} vg (2×10^{14} vg/kg) 之最高遞送劑量下亦無毒性跡象。

實例4

老年患者及耐久性

【0212】rAAVrh74.tMCK.hSGCA介導之基因置換已展示治療LGMD-2D及其他相關疾病之積極結果。此研究經設計以測試rAAVrh74.tMCK.hSGCA治療老年人受影響更嚴重的肌肉之能力，且經設計以確定AAV病毒載體之長期耐久性。

【0213】所有程序皆根據全國兒童醫院機構動物護理及使用委員會的研究機構批准進行。將小鼠維持在12:12小時光:暗循環之標準化條件下，其中食物及水任意提供。首先，利用尾部靜脈注射將rAAVrh74.tMCK.hSGCA以三種劑量（ 1.0×10^{12} 、 3.0×10^{12} 及 6.0×10^{12}

vg) 全身性投與至12月齡的 $sgca^{-/-}$ 小鼠 (n=5), 其呈現嚴重肌肉組織病理學。對照組包含乳酸林格氏溶液 (LRS) 注射之 $sgca^{-/-}$ 小鼠 (n=5) 及 LRS 注射之BL6野生型小鼠 (n=4)。在治療後6個月終點, 評估來自經治療小鼠之肌肉之SCGA蛋白質表現、組織學拯救及功能改善。所有三種劑量展示與對照組相比, 肌纖維膜處之 α -SG之蛋白質表現穩固、組織病理學改善、運動活動及比力產生增加、防止離心力損失及血清CK減少。未偵測到載體毒性。在老齡小鼠中, 治療引起所分析之肌肉中廣泛、高水準蛋白質表現、纖維化減少及對脛前肌中之收縮誘發之損傷的抗性增加。

【0214】特 定 言 之 , 向12月 齡 $sgca^{-/-}$ 小 鼠IV投 與 rAAVrh74.tMCK.hSGCA在整個下肢、上肢及近端軀幹肌肉, 包含隔膜及心臟中產生肌肉中廣泛高水準蛋白質表現 (圖8)。

【0215】投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA之後觀測到肌肉病理之總體改善 (圖9a) 及中央成核減少。另外, 在投與之後, 平均纖維大小增大至類似於在腓腸肌 (GAS) 及三頭肌 (TRI) 中之WT纖維之水準的水準 (圖9b)。

【0216】膠原蛋白沈積量定量為纖維化之量度。投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA與未治療之對照組相比產生纖維化之量減少 (圖9c)。投與scAAVrh74.tMCK.hSGCA之後的功能改善藉由脛前 (TA) 肌及隔膜 (DIA) 肌之力輸出 (比力) 改善及對TA肌肉中之收縮誘發之損傷的抗性增加證明 (圖10)。

【0217】為進一步研究基因療法之長期耐久性, 向4週齡之 $sgca^{-/-}$ 小鼠全身性投與rAAVrh74.tMCK.hSGCA。治療後超過24個月, 在所有經測試之經轉導肌肉 (TA、TRI、DIA、GLUT、PSOAS、GAS及QUAD) 中

利用qPCR偵測載體基因體複本數。藉由經治療肌肉之免疫螢光染色研究蛋白質表現及定位

【0218】 儘管本發明已根據具體實施例形式進行描述，但應理解本領域中熟習此項技術者將進行變化及修改。因此，本揭示案應僅受如申請專利範圍中所呈現之該等限制的限制。

【0219】 本申請案中提及之所有文獻均以全文引用之方式併入本文中。

SEQ ID NO: 1

SGCA cDNA密碼子優化序列：

ATGGCCGAGACACTGTTCTGGACTCCTCTGCTGGTGGTGCTGCTGGCTGGACTGGGAGATACCGAGGCTC
AGCAGACCACACTGCACCCACTGGTGGGCGGGTGTTCGTGCACACCCTGGACCATGAGACATTTCTGAGT
CTGCCAGAACACGTGGCTGTGCCACCTGCTGTGCATATCACTTACCACGCCCATCTGCAGGGCCATCCTGA
TCTGCCACGGTGGCTGAGATACACCCAGAGATCACCCACCATCCTGGATTCTGTATGGAAGCGCTACCC
CAGAGGACAGGGGACTGCAGGTGATCGAAGTGACAGCTTACAACCGCGACAGTTTTGATACTACCAGGCAG
CGCCTGGTGCTGGAGATTGGGGATCCAGAAGGACCCCTGCTGCCTTATCAGGCCGAGTTCCTGGTGCGGT
CACACGACGCTGAGGAAGTGCTGCCATCAACACCCGCCAGCAGATTTCTGTCCGCTCTGGGAGGACTGTG
GGAGCCAGGAGAACTGCAGCTGCTGAATGTGACTAGCGCTCTGGATAGGGGAGGAAGGGTGCCACTGCCA
ATCGAGGGAAGGAAGGAAGGGGTGTACATTAAAGTGGGAAGCGCTTCCCCATTCTCCACCTGCCTGAAGAT
GGTGGCTTCTCCTGATAGTCACGCTAGGTGCGCTCAGGGACAGCCACCACTGCTGTCCCTGTTATGACACAC
TGGCCCCCATTTTCGCGTGGACTGGTGCAACGTGACTCTGGTGGATAAATCTGTGCCTGAGCCAGCTGAC
GAAGTGCCAACCCCTGGAGACGGAATCCTGGAGCACGATCCTTTCTTTGTCTCCAACAGAAGCCCCAGA
CAGGGATTTCTGGTGGACGCTCTGGTGACTCTGCTGGTGCCTCTGCTGGTGGCTCTGCTGCTGACCCCTGC
TGCTGGCTTATGTGATGTGCTGTCTGGAGAGAGGGACGGCTGAAGAGAGACCTGGCCACATCTGATATCCAG
ATGGTGCACCATTTGTACTATTCACGGCAACACCGAGGAACTGCGCCAGATGGCTGCTTCTAGGGAGGTGCC
AAGGCCACTGAGTACACTGCCTATGTTTAATGTGCACACTGGCGAACGGCTGCCCCCTAGAGTGGATAGCG
CCCAGGTGCCACTGATTCTGGACCAGCATTGA

SEQ ID NO: 2

人類SGCA蛋白序列：

MAETLFWTPLLVLLAGLDTEAQQTTLHPLVGRVHVHTLDHETFLSLPEHVAVPPAVHITYHAHLQGHDPDLPRW
LRYTQRSPHHPGFLYGSATPEDRGLQVIEVTAYNRDSFDTTQRQLVLEIGDPEGPLLPHYQAEFLVRSHDAEEVLP
STPASRFLSALGGLWEPGELQLLNVTSALDRGGRVPLPIEGRKEGVYIKVGSASPFSTCLKMVASPD SHARCAQ
GQPPLLSCYDTLAPHFRVDWCNVTLVDKSVPEPADEVPTPGDGILEHDPFFCPPTTEAPDRDFLVDALVTLLVPLL
VALLLTLLLAYVMCCRREGRLKRDLATSDIQMVHHC TIHGNTTEELRQMAASREVPRPLSTLPMFNVHTGERLPPR
VDSAQVPLILDQH*

SEQ ID NO: 3

tMCK啟動子序列：

CCACTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTA
ACCCCAACACCTGCTGCCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTGAGCGGTTACCCACCCCGGT
GCCTGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGATC
CACTACGGGTCTATGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTA
CCCCAACACCTGCTGCCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTGAGCGGTTACCCACCCCGGTG
CCTGGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTGGACCA
CTACGGGTCTAGGCTGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAACC
CCAACACCTGCTGCCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTGAGCGGTTACCCACCCCGGTGCCT
GGGTCTTAGGCTCTGTACACCATGGAGGAGAAGCTCGCTCTAAAAATAACCCTGTCCCTGGTCCCTCCCTGG
GGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCC
CGGGTCAC

SEQ ID NO: 4

AAVrh74-tMCK-SGCA:

CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCC
GGCGACCTTT GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG
GAGTGGGGTT AACCAATTGG CGGCCGCAA CTTGCATGCC CCACTACGGG
TCTAGGCTGC CCATGTAAGG AGGCAAGGCC TGGGGACACC CGAGATGCCT
GGTTATAATT AACCCCAACA CCTGCTGCCC CCCCCCCCC AACACCTGCT
GCCTGAGCCT GAGCGGTTAC CCCACCCCGG TGCCTGGGTC TTAGGCTCTG
TACACCATGG AGGAGAAGCT CGCTCTAAAA ATAACCCTGT CCCTGGTGGA
TCCACTACGG GTCTATGCTG CCCATGTAAG GAGGCAAGGC CTGGGGACAC
CCGAGATGCC TGGTTATAAT TAACCCCAAC ACCTGCTGCC CCCCCCCCC
CAACACCTGC TGCCTGAGCC TGAGCGGTTA CCCACCCCG GTGCCTGGGT

CTTAGGCTCT GTACACCATG GAGGAGAAGC TCGCTCTAAA AATAACCCTG

TCCCTGGTGG ACCACTACGG GTCTAGGCTG CCCATGTAAG GAGGCAAGGC

CTGGGGACAC CCGAGATGCC TGGTTATAAT TAACCCCAAC ACCTGCTGCC

CCCCCCCCC AACACCTGCT GCCTGAGCCT GAGCGGTTAC CCCACCCCGG

TGCCTGGGTC TTAGGCTCTG TACACCATGG AGGAGAAGCT CGCTCTAAAA

ATAACCCTGT CCCTGGTCCT CCCTGGGGAC AGCCCCTCCT GGCTAGTCAC

ACCCTGTAGG CTCCTCTATA TAACCCAGGG GCACAGGGGC TGCCCCCGGG

TCACCTGCAG AAGTTGGTCG TGAGGCACTG GGCAGGTAAG TATCAAGGTT

ACAAGACAGG TTTAAGGAGA CCAATAGAAA CTGGGCTTGT CGAGACAGAG

AAGACTCTTG CGTTTCTGAT AGGCACCTAT TGGTCTTACT GACATCCACT

TTGCCTTTCT CTCCACAGGT GTCCACTCCC AGTTCAATTA CAGCGCGTGG

TACCACCATG GCCGAGACAC TGTTCTGGAC TCCTCTGCTG GTGGTGCTGC

TGGCTGGACT GGGAGATACC GAGGCTCAGC AGACCACACT GCACCCACTG

GTGGGCCGGG TGTTCGTGCA CACCCTGGAC CATGAGACAT TTCTGAGTCT

GCCAGAACAC GTGGCTGTGC CACCTGCTGT GCATATCACT TACCACGCCC

ATCTGCAGGG CCATCCTGAT CTGCCACGGT GGCTGAGATA CACCCAGAGA

TCACCCACC ATCCTGGATT CCTGTATGGA AGCGCTACCC CAGAGGACAG

GGGACTGCAG GTGATCGAAG TGACAGCTTA CAACCGCGAC AGTTTTGATA

CTACCAGGCA GCGCCTGGTG CTGGAGATTG GGGATCCAGA AGGACCCCTG

CTGCCTTATC AGGCCGAGTT CCTGGTGCGG TCACACGACG CTGAGGAAGT

GCTGCCATCA ACACCCGCCA GCAGATTTCT GTCCGCTCTG GGAGGACTGT
GGGAGCCAGG AGAACTGCAG CTGCTGAATG TGACTIONCGC TCTGGATAGG
GGAGGAAGGG TGCCACTGCC AATCGAGGGA AGGAAGGAAG GGGTGTACAT
TAAAGTGGGA AGCGCTTCCC CATTCTCCAC CTGCCTGAAG ATGGTGGCTT
CTCCTGATAG TCACGCTAGG TCGCTCAGG GACAGCCACC ACTGCTGTCC
TGTTATGACA CACTGGCCCC CCATTTTCGC GTGGACTGGT GCAACGTGAC
TCTGGTGGAT AAATCTGTGC CTGAGCCAGC TGACGAAGTG CCAACCCCTG
GAGACGGAAT CCTGGAGCAC GATCCTTTCT TTTGTCCTCC AACAGAAGCC
CCAGACAGGG ATTCCTGGT GGACGCTCTG GTGACTCTGC TGGTGCCTCT
GCTGGTGGCT CTGCTGCTGA CCCTGCTGCT GGCTTATGTG ATGTGCTGTC
GGAGAGAGGG ACGGCTGAAG AGAGACCTGG CCACATCTGA TATCCAGATG
GTGCACCATT GTACTATTCA CGGCAACACC GAGGAACTGC GCCAGATGGC
TGCTTCTAGG GAGGTGCCAA GGCCACTGAG TACACTGCCT ATGTTTAATG
TGCACACTGG CGAACGGCTG CCCCCTAGAG TGGATAGCGC CCAGGTGCCA
CTGATTCTGG ACCAGCATTG AGGCCGCAAT AAAAGATCTT TATTTTCATT
AGATCTGTGT GTTGTTTTT TGTGTGCCT GCAGGGGCGC GCCTCTAGAG
CATGGCTACG TAGATAAGTA GCATGGCGGG TTAATCATT ACTACAAGGA
ACCCCTAGTG ATGGAGTTGG CCACTCCCTC TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA
CTGAGGCCGG GCGACCAAAG GTCGCCCCGAC GCCCGGGCTT TGCCCGGGCG
GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGCAG

SEQ ID NO: 5

5'ITR

CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GGCGACCTTT
GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGGGTT

SEQ ID NO: 6

3'ITR

CCACTCCCTC TCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGG GCGACCAAAG GTCGCCCCGAC
GCCCGGGCTT TGCCCGGGCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC GCGC

SEQ ID NO: 7

PolyA

GGCCGCAAT AAAAGATCTT TATTTTCATT AGATCTGTGT GTTGTTTTT TGTG

SEQ ID NO: 8

ATGCAGCTGC GCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCCGCCCGGG CAAAGCCCCG GCGTCGGGCG 60
ACCTTTGGTC GCCCGGCCTC AGTGAGCGAG CGAGCGCGCA GAGAGGGAGT GGGGTAAACC 120
AATTGGCGGC CGCAAACCTG CATGCCCCAC TACGGGTCTA GGCTGCCCAT GTAAGGAGGC 180
AAGGCCTGGG GACACCCGAG ATGCCTGGTT ATAATTAACC CCAACACCTG CTGCCCCCCC 240
CCCCCAACA CCTGCTGCCT GAGCCTGAGC GGTTACCCCA CCCCAGTGCC TGGGTCTTAG 300
GCTCTGTACA CCATGGAGGA GAAGCTCGCT CTAAAAATAA CCCTGTCCCT GGTGGATCCA 360
CTACGGGTCT ATGCTGCCCA TGTAAGGAGG CAAGGCCTGG GGACACCCGA GATGCCTGGT 420
TATAATTAAC CCCAACACCT GCTGCCCCCC CCCCCCAAC ACCTGCTGCC TGAGCCTGAG 480
CGGTTACCCC ACCCCGGTGC CTGGGTCTTA GGCTCTGTAC ACCATGGAGG AGAAGCTCGC 540
TCTAAAAATA ACCCTGTCCC TGGTGGACCA CTACGGGTCT AGGCTGCCCA TGTAAGGAGG 600
CAAGGCCTGG GGACACCCGA GATGCCTGGT TATAATTAAC CCCAACACCT GCTGCCCCCC 660
CCCCCAACA CCTGCTGCCT GAGCCTGAGC GGTTACCCCA CCCCAGTGCC TGGGTCTTAG 720
GCTCTGTACA CCATGGAGGA GAAGCTCGCT CTAAAAATAA CCCTGTCCCT GGTCTCCCT 780
GGGACAGCC CCTCCTGGCT AGTCACACCC TGTAGGCTCC TCTATATAAC CCAGGGGCAC 840
AGGGGCTGCC CCCGGGTCAC CTGCAGAAGT TGGTCGTGAG GCACTGGGCA GGTAAGTATC 900
AAGGTTACAA GACAGGTTTA AGGAGACCAA TAGAACTGG GCTTGTGAG ACAGAGAAGA 960

CTCTTGCGTT TCTGATAGGC ACCTATTGGT CTTACTGACA TCCACTTTGC CTTTCTCTCC 1020
ACAGGTGTCC ACTCCCAGTT CAATTACAGC GCGTGGTACC ACCATGGCCG AGACACTGTT 1080
CTGGACTCCT CTGCTGGTGG TGCTGCTGGC TGGACTGGGA GATACCGAGG CTCAGCAGAC 1140
CACACTGCAC CCACTGGTGG GCCGGGTGTT CGTGACACACC CTGGACCATG AGACATTTCT 1200
GAGTCTGCCA GAACACGTGG CTGTGCCACC TGCTGTGCAT ATCACTTACC ACGCCCATCT 1260
GCAGGGCCAT CCTGATCTGC CACGGTGGCT GAGATACACC CAGAGATCAC CCCACCATCC 1320
TGGATTCCTG TATGGAAGCG CTACCCCAGA GGACAGGGGA CTGCAGGTGA TCGAAGTGAC 1380
AGCTTACAAC CGCGACAGTT TTGATACTAC CAGGCAGCGC CTGGTGCTGG AGATTGGGGA 1440
TCCAGAAGGA CCCCTGCTGC CTTATCAGGC CGAGTTCCTG GTGCGGTCAC ACGACGCTGA 1500
GGAAGTGCTG CCATCAACAC CCGCCAGCAG ATTTCTGTCC GCTCTGGGAG GACTGTGGGA 1560
GCCAGGAGAA CTGCAGCTGC TGAATGTGAC TAGCGCTCTG GATAGGGGAG GAAGGGTGCC 1620
ACTGCCAATC GAGGGAAGGA AGGAAGGGGT GTACATTAAG GTGGGAAGCG CTTCCCCATT 1680
CTCCACCTGC CTGAAGATGG TGGCTTCTCC TGATAGTCAC GCTAGGTGCG CTCAGGGACA 1740
GCCACCACTG CTGTCCTGTT ATGACACACT GGCCCCCAT TTTCGCGTGG ACTGGTGCAA 1800
CGTGACTCTG GTGGATAAAT CTGTGCCTGA GCCAGCTGAC GAAGTGCCAA CCCCTGGAGA 1860
CGGAATCCTG GAGCACGATC CTTTCTTTTG TCCTCCAACA GAAGCCCCAG ACAGGGATTT 1920
CCTGGTGGAC GCTCTGGTGA CTCTGCTGGT GCCTCTGCTG GTGGCTCTGC TGCTGACCCT 1980
GCTGCTGGCT TATGTGATGT GCTGTGCGAG AGAGGGACGG CTGAAGAGAG ACCTGGCCAC 2040
ATCTGATATC CAGATGGTGC ACCATTGTAC TATTCACGGC AACACCGAGG AACTGCGCCA 2100
GATGGCTGCT TCTAGGGAGG TGCCAAGGCC ACTGAGTACA CTGCCTATGT TTAATGTGCA 2160
CACTGGCGAA CGGCTGCCCC CTAGAGTGGG TAGCGCCAG GTGCCACTGA TTCTGGACCA 2220
GCATTGAGGC CGCAATAAAA GATCTTTATT TTCATTAGAT CTGTGTGTTG GTTTTTTGTG 2280
TGTCCTGCAG GGGCGCGCCT CTAGAGCATG GCTACGTAGA TAAGTAGCAT GGCGGGTTAA 2340
TCATTAATA CAAGGAACCC CTAGTGATGG AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG CGCGCTCGCT 2400
CGCTCACTGA GGCCGGGCGA CCAAAGGTCG CCCGACGCCC GGGCTTTGCC CGGGCGGCCT 2460
CAGTGAGCGA GCGAGCGCGC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT 2520
CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGATTCCG TTGCAATGGC TGGCGGTAAT 2580
ATTGTTCTGG ATATTACCAG CAAGGCCGAT AGTTTGAGTT CTTCTACTCA GGCAAGTGAT 2640
GTTATTACTA ATCAAAGAAG TATTGCGACA ACGGTTAATT TGCGTGATGG ACAGACTCTT 2700
TTACTCGGTG GCCTCACTGA TTATAAAAAC ACTTCTCAGG ATTCTGGCGT ACCGTTCTCTG 2760
TCTAAAATCC CTTTAATCGG CCTCCTGTTT AGCTCCCGCT CTGATTCTAA CGAGGAAAGC 2820
ACGTTATACG TGCTCGTCAA AGCAACCATA GTACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC 2880
GGCGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC 2940
TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTCTCGC CACGTTGCGC ATCTTCAAAT ATGTATCCGC 3000
TCATGAGACA ATAACCCTGA TAAATGCTTC AATAATATTG AAAAAGGAAG AGTCCTGAGG 3060
CGGAAAGAAC CAGCTGTGGA ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC 3120
AGCAGGCAGA AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCAGGT GTGGAAAGTC 3180
CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAT 3240
AGTCCCGCCC CTAAGTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA 3300
GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG 3360

CTTTTGCAAA GATCGATCAA GAGACAGGAT GAGGATCGTT TCGCATGATT GAACAAGATG 3420
GATTGCACGC AGGTTCTCCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC 3480
AACAGACAAT CGGCTGCTCT GATGCCGCCG TGTTCCGGCT GTCAGCGCAG GGGCGCCCGG 3540
TTCTTTTGT CAAGACCGAC CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAAGAC GAGGCAGCGC 3600
GGCTATCGTG GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG 3660
AAGCGGGAAG GGA CTGCTGGCTG CTATTGGGCG AAGTGCCGGG GCAGGATCTC CTGTCATCTC 3720
ACCTTGCTCC TGCCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGCGG CTGCATACGC 3780
TTGATCCGGC TACCTGCCCA TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA 3840
CTCGGATGGA AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG 3900
CGCCAGCCGA ACTGTTGCC AGGCTCAAGG CGAGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTCG 3960
TGACCCATGG CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGGTGGA AAATGGCCGC TTTTCTGGAT 4020
TCATCGACTG TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC 4080
GTGATATTGC TGAAGAGCTT GGCGGCGAAT GGGCTGACCG TTCTCTCGTG CTTTACGGTA 4140
TCGCCGCTCC CGATTGCGAG CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG 4200
CGGGACTCTG GGGTTCGAAA TGACCGACCA AGCGACGCC AACCTGCCAT CACGAGATTT 4260
CGATTCCACC GCCGCCTTCT ATGAAAGGTT GGGCTTCGGA ATCGTTTTCC GGGACGCCGG 4320
CTGGATGATC CTCCAGCGCG GGGATCTCAT GCTGGAGTTC TTCGCCACC CTAGGGGGAG 4380
GCTAACTGAA ACACGGAAGG AGACAATACC GGAAGGAACC CGCGCTATGA CGGCAATAAA 4440
AAGACAGAAT AAAAACGTTG CGCAAATAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC 4500
GGCAACAATT AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG 4560
CCCTTCCGGC TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG 4620
GTATCATTGC AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA 4680
CGGGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC 4740
TGATTAAGCA TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTAA 4800
AACTTCATTT TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA 4860
AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG 4920
GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC 4980
CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGGATC AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGGTAA 5040
CTGGCTTCA GAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC 5100
ACCACTTCAA GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG 5160
TGGCTGCTGC CAGTGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGT GGA CTCAAGA CGATAGTTAC 5220
CGGATAAGGC GCAGCGGTCTG GGCTGAACGG GGGGTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGAGC 5280
GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC 5340
CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC AGGTATCCG TAAGCGGCAG GGTGGAACA GGAGAGCGCA 5400
CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTGCGG TTTGCCACC 5460
TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG 5520
CCAGCAACGC GGCCTTTTTA CGGTTCTTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTTCT 5580
TTCCTGCGTT ATCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA 5640
CCGCTCGCCG CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC 5700
GCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATG 5749

【序列表】

<110> 美國全美兒童醫院之研究學會(Research Institute at Nationwide Children's Hospital)

<120> α 肌聚糖之腺相關病毒載體遞送及肌肉萎縮症之治療

<140> TW 109128653

<141> 2020-08-21

<150> US 62/889,749

<151> 2019-08-21

<150> US 63/014,934

<151> 2020-04-24

<150> US 63/022,843

<151> 2020-05-11

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1164

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

atggccgaga cactgttctg gactcctctg ctggtggtgc tgctggctgg actgggagat	60
accgaggctc agcagaccac actgcaccca ctggtgggcc ggggtgttcgt gcacaccctg	120
gaccatgaga catttctgag tctgccagaa cacgtggctg tgccacctgc tgtgcatatc	180
acttaccacg cccatctgca gggccatcct gatctgccac ggtggctgag atacaccag	240
agatcacccc accatcctgg attcctgtat ggaagcgcta cccagagga caggggactg	300
caggtgatcg aagtgcagc ttacaaccgc gacagttttg atactaccag gcagcgcctg	360
gtgctggaga ttggggatcc agaaggaccc ctgctgccct atcaggccga gttcctggtg	420
cggtcacacg acgctgagga agtgctgcca tcaacaccgc ccagcagatt tctgtccgct	480
ctgggaggac tgtgggagcc aggagaactg cagctgctga atgtgactag cgctctggat	540
aggggaggaa gggtgccact gccaatcgag ggaaggaagg aaggggtgta cattaaagtg	600
ggaagcgctt cccattctc cacctgcctg aagatggtgg cttctcctga tagtcacgct	660

aggatgcgctc agggacagcc accactgctg tctgttatg acacactggc cccccathtt 720

cgcggtggact ggtgcaacgt gactctgggtg gataaatctg tgcctgagcc agctgacgaa 780

gtgccaaccc ctggagacgg aatcctggag cacgatacctt tcttttgtcc tccaacagaa 840

gccccagaca gggatttcct ggtggacgct ctgggtgactc tgctggtgcc tctgctgggtg 900

gctctgctgc tgacctgct gctggcttat gtgatgtgct gtcggagaga gggacggctg 960

aagagagacc tggccacatc tgatatccag atggtgcacc attgtactat tcacggcaac 1020

accgaggaac tgcgccagat ggctgcttct agggagggtgc caaggccact gagtacactg 1080

cctatgttta atgtgcacac tggcgaacgg ctgcccccta gagtggatag cgcccaggtg 1140

ccactgattc tggaccagca ttga 1164

<210> 2

<211> 387

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Ala Glu Thr Leu Phe Trp Thr Pro Leu Leu Val Val Leu Leu Ala

1 5 10 15

Gly Leu Gly Asp Thr Glu Ala Gln Gln Thr Thr Leu His Pro Leu Val

20 25 30

Gly Arg Val Phe Val His Thr Leu Asp His Glu Thr Phe Leu Ser Leu

35 40 45

Pro Glu His Val Ala Val Pro Pro Ala Val His Ile Thr Tyr His Ala

50 55 60

His Leu Gln Gly His Pro Asp Leu Pro Arg Trp Leu Arg Tyr Thr Gln

65 70 75 80

Arg Ser Pro His His Pro Gly Phe Leu Tyr Gly Ser Ala Thr Pro Glu

85 90 95

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

290 295 300

Thr Leu Leu Leu Ala Tyr Val Met Cys Cys Arg Arg Glu Gly Arg Leu
305 310 315 320

Lys Arg Asp Leu Ala Thr Ser Asp Ile Gln Met Val His His Cys Thr
325 330 335

Ile His Gly Asn Thr Glu Glu Leu Arg Gln Met Ala Ala Ser Arg Glu
340 345 350

Val Pro Arg Pro Leu Ser Thr Leu Pro Met Phe Asn Val His Thr Gly
355 360 365

Glu Arg Leu Pro Pro Arg Val Asp Ser Ala Gln Val Pro Leu Ile Leu
370 375 380

Asp Gln His
385

<210> 3
<211> 714
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 3
ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60

ggttataatt aacccaaca cctgctgccc ccccccccc aacacctgct gcctgagcct 120

gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180

cgctctaaaa ataacctgt ccctggtgga tccactacgg gtctatgctg cccatgtaag 240

gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc 300

ccccccccc caacacctgc tgcctgagcc tgagcggta cccaccccgt gtgcctgggt 360

cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataacctg tccctggtgg 420

accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc	480
tggttataat taaccccaac acctgctgcc cccccccccc aacacctgct gcctgagcct	540
gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct	600
cgctctaaaa ataaccctgt ccctggtcct ccctggggac agccccctct ggctagtcac	660
accctgtagg ctccctctata taaccaggg gcacaggggc tgcccccggg tcac	714

<210> 4
<211> 2476
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 4	
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt	60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggggtt aaccaattgg	120
cggccgcaaa cttgcatgcc ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc	180
tggggacacc cgagatgcct gggttataatt aaccccaaca cctgctgccc ccccccccc	240
aacacctgct gcctgagcct gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg	300
tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctggtgga tccactacgg	360
gtctatgctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat	420
taaccccaac acctgctgcc cccccccccc caacacctgc tgcctgagcc tgagcggtta	480
ccccacccg gtgcctgggt cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa	540
aataaccctg tccttgggtg accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc	600
ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taaccccaac acctgctgcc cccccccccc	660
aacacctgct gcctgagcct gagcggttac cccaccccgg tgcctgggtc ttaggctctg	720
tacaccatgg aggagaagct cgctctaaaa ataaccctgt ccctggtcct ccctggggac	780
agccccctct ggctagtcac accctgtagg ctccctctata taaccaggg gcacaggggc	840
tgcccccggg tcacctgcag aagttaggtc tgaggcactg ggcaggtaa tatcaaggtt	900

acaagacagg ttttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag aagactcttg	960
cgtttctgat aggcacctat tggctcttact gacatccact ttgcctttct ctccacaggt	1020
gtccactccc agttcaatta cagcgcgtgg taccaccatg gccgagacac tgttctggac	1080
tcctctgctg gtgggtgctgc tggctggact gggagatacc gaggctcagc agaccacact	1140
gcacccactg gtgggccggg tgttcgtgca caccctggac catgagacat ttctgagtct	1200
gccagaacac gtggctgtgc cacctgctgt gcataatcact taccacgccc atctgcaggg	1260
ccatcctgat ctgccacggt ggctgagata caccagaga tcacccacc atcctggatt	1320
cctgtatgga agcgttacc cagaggacag gggactgcag gtgatcgaag tgacagctta	1380
caaccgcgac agttttgata ctaccaggca gcgcctggtg ctggagattg gggatccaga	1440
aggacccctg ctgccattac aggccgagtt cctggtgcgg tcacacgacg ctgaggaagt	1500
gctgccatca acaccgcca gcagatttct gtccgctctg ggaggactgt gggagccagg	1560
agaactgcag ctgctgaatg tgactagcgc tctggatagg ggaggaaggg tgccactgcc	1620
aatcgaggga aggaaggaag ggggtgtacat taaagtggga agcgttccc cattctccac	1680
ctgcctgaag atggtggttt ctctgatag tcacgctagg tgcgctcagg gacagccacc	1740
actgctgtcc tgttatgaca cactggcccc ccattttcgc gtggactggt gcaacgtgac	1800
tctggtggat aaatctgtgc ctgagccagc tgacgaagtg ccaaccctg gagacggaat	1860
cctggagcac gatcctttct tttgtcctcc aacagaagcc ccagacaggg atttctggt	1920
ggacgctctg gtgactctgc tgggtgcctct gctggtggct ctgctgctga ccctgctgct	1980
ggcttatgtg atgtgctgtc ggagagaggg acggctgaag agagacctgg ccacatctga	2040
tatccagatg gtgcaccatt gtactattca cggcaacacc gaggaactgc gccagatggc	2100
tgcttctagg gaggtgccaa ggccactgag tacactgcct atgtttaatg tgcacactgg	2160
cgaacggctg ccccttagag tggatagcgc ccaggtgcca ctgattctgg accagcattg	2220
aggccgcaat aaaagatctt tattttcatt agatctgtgt gttggttttt tgtgtgtcct	2280
gcaggggctc gcctctagag catggctacg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta	2340
actacaagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc tctgcgcgct cgctcgtca	2400

ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga 2460

gcgagcgagc gcgcag 2476

<210> 5
<211> 110
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 5
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcggccgg cctcagtga cgagcgagcg gcgagagagg gagtggggtt 110

<210> 6
<211> 104
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6
ccactccctc tctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgac 60

gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgc 104

<210> 7
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7
ggccgcaata aaagatcttt attttcatta gatctgtgtg ttggtttttt gtg 53

<210> 8
<211> 5749
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 8	
atgcagctgc gcgctcgtc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg	60
acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggggttaacc	120
aattggcggc cgcaaacttg catgccccac tacgggtcta ggctgcccac gtaaggaggc	180
aaggcctggg gacacccgag atgcctgggt ataattaacc ccaacacctg ctgccccccc	240
ccccccaaca cctgctgcct gagcctgagc gggtacccca ccccggtgcc tgggtcttag	300
gctctgtaca ccatggagga gaagctcgt ctaaaaataa ccctgtccct ggtggatcca	360
ctacgggtct atgctgccc tgtaaggagg caaggcctgg ggacaccga gatgcctggt	420
tataattaac cccaacacct gctgcccccc ccccccaac acctgctgcc tgagcctgag	480
cgggtacccc accccggtgc ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc	540
tctaaaaata accctgtccc tgggtgacca ctacgggtct aggctgccc tgtaaggagg	600
caaggcctgg ggacaccga gatgcctggt tataattaac cccaacacct gctgcccccc	660
ccccccaaca cctgctgcct gagcctgagc gggtacccca ccccggtgcc tgggtcttag	720
gctctgtaca ccatggagga gaagctcgt ctaaaaataa ccctgtccct ggtcctccct	780
ggggacagcc cctcctggct agtcacacc tglaggctcc tctatataac ccaggggcac	840
aggggctgcc cccgggtcac ctgcagaagt tggtcgtgag gcactgggca ggttaagtatc	900
aaggttacaa gacaggttta aggagaccaa tagaaactgg gcttgtcgag acagagaaga	960
ctcttgctt tctgataggc acctattggt ctactgaca tccactttgc ctttctctcc	1020
acagggtgcc actcccagtt caattacagc gcgtggtacc accatggccg agacactgtt	1080
ctggactcct ctgctgggtg tgctgctggc tggactggga gataccgagg ctcagcagac	1140
cacactgcac ccactgggtg gccgggtgtt cgtgcacacc ctggacatg agacatttct	1200
gagtctgcca gaacacgtgg ctgtgccacc tgcgtgcat atcacttacc acgcccatt	1260
gcagggccat cctgatctgc cacggtggct gagatacacc cagagatcac cccaccatcc	1320
tggattcctg tatggaagcg ctaccccaga ggacagggga ctgcaggtga tcgaagtgc	1380

agcttacaac cgcgacagtt ttgatactac caggcagcgc ctggtgctgg agattgggga	1440
tccagaagga cccctgctgc cttatcaggc cgagttcctg gtgcggtcac acgacgtga	1500
ggaagtgctg ccatcaacac ccgccagcag atttctgtcc gctctgggag gactgtggga	1560
gccaggagaa ctgcagctgc tgaatgtgac tagcgtctg gataggggag gaagggtgcc	1620
actgccaatc gagggaagga aggaaggggt gtacattaaa gtgggaagcg cttccccatt	1680
ctccacctgc ctgaagatgg tggcttctcc tgatagtcac gctaggtgcg ctcagggaca	1740
gccaccactg ctgtcctgtt atgacacact ggccccccat tttcgcgtgg actggtgcaa	1800
cgtgactctg gtggataaat ctgtgcctga gccagctgac gaagtgccaa cccctggaga	1860
cggaatcctg gagcacgac ctttcttttg tctccaaca gaagccccag acagggattt	1920
cctggtggac gctctggtga ctctgctggt gcctctgctg gtggtctctg tgctgacct	1980
gctgctggct tatgtgatgt gctgtcgag agagggacgg ctgaagagag acctggccac	2040
atctgatatc cagatggtgc accattgtac tattcacggc aacaccgagg aactgcgcca	2100
gatggctgct tctagggagg tgccaaggcc actgagtaca ctgcctatgt ttaatgtgca	2160
cactggcgaa cggctgcccc ctagagtga tagcggccag gtgccactga ttctggacca	2220
gcattgaggc cgcaataaaa gatctttatt ttcattagat ctgtgtgttg gttttttgtg	2280
tgtcctgcag gggcgcgcct ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa	2340
tcattaacta caaggaaacc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt	2400
cgtcactga ggccgggcga ccaaaggtcg ccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct	2460
cagtgagcga gcgagcgcgc agctggcgta atagcgaaga ggccgcacc gatcgccctt	2520
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgattccg ttgcaatggc tggcggtaat	2580
attgttctgg atattaccag caaggccgat agtttgagtt ctctactca ggcaagtgat	2640
gttattacta atcaaagaag tattgcgaca acggttaatt tgctgatgg acagactctt	2700
ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac acttctcagg attctggcgt accgttctg	2760
tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt agtccccgt ctgattctaa cgaggaaagc	2820
acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc	2880

ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgtacacit gccagcgccc tagcgcccgc	2940
tcctttcgct ttctttccctt cctttctcgc cacgttcgcc atcttcaa atgtatccgc	3000
tcatgagaca ataacctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtcctgagg	3060
cggaaagaac cagctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc	3120
agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc	3180
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaacat	3240
agtccccccc ctaactccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga	3300
ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg	3360
cttttgcaaa gatcgatcaa gagacaggat gaggatcggt tcgcatgatt gaacaagatg	3420
gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac	3480
aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg	3540
ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg cctgaaatga actgcaagac gaggcagcgc	3600
ggctatcgtg gctggccacg acgggcggtc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg	3660
aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc	3720
accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc	3780
ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta	3840
ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg	3900
cgccagccga actgttcgcc aggtcgaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg	3960
tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat	4020
tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc	4080
gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta	4140
tcgccgctcc cgattcgcag cgcatgcct tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag	4200
cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat cacgagattt	4260
cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg	4320
ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagtgc ttcgccacc ctagggggag	4380

gctaactgaa acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga cggcaataaa	4440
aagacagaat aaaaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact ctagcttccc	4500
ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg	4560
cccttcgggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc	4620
gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga	4680
cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac	4740
tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa	4800
aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca	4860
aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag	4920
gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac	4980
cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa	5040
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc	5100
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag	5160
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac	5220
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc	5280
gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgttc	5340
ccgaagggag aaagcgggac aggtatccgg taagcggcag ggtcgggaaca ggagagcgca	5400
cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc	5460
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg	5520
ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct	5580
ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata	5640
ccgctcggcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc	5700
gccaataacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatg	5749

<210> 9
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引子

<400> 9

cagggctggg agctgggttc tg 22

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引子

<400> 10

cccagggcct tgatgcct 18

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引子

<400> 11

gctatcagga catagcgttg gcta 24

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種重組腺相關病毒（rAAV）AAVrh74.tMCK.hSGCA用於製備用以治療有需要之個體之肌肉萎縮症的藥物的用途，其中基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為 5×10^{13} vg/kg至 2×10^{14} vg/kg，且其中該藥物經調配用於全身投與途徑，其中該rAAV包含與SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核苷酸序列，以及該核苷酸序列編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為 5×10^{13} vg/kg、 1×10^{14} vg/kg或 2×10^{14} vg/kg。

【請求項3】

一種重組腺相關病毒（rAAV）AAVrh74.tMCK.hSGCA用於製備用以治療有需要之個體之肌肉萎縮症的藥物的用途，其中基於線性化DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為 1.0×10^{13} vg/kg至 8.0×10^{13} vg/kg，且其中該藥物經調配用於全身投與途徑，其中該rAAV包含與SEQ ID NO: 4具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之核苷酸序列，以及該核苷酸序列編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。

【請求項4】

如請求項3之用途，其中基於線性化DNA或質體作為定量標準，該AAVrh74.tMCK.hSGCA之劑量為 1.85×10^{13} vg/kg或 7.41×10^{13} vg/kg。

【請求項5】

如請求項4之用途，其中該rAAV包括SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之用途，其中投與該藥物之後該個體之細胞中之 α 肌聚糖基因表現量與投與該藥物之前的 α 肌聚糖基因表現量相比有所增加；或其中投與該藥物之後該個體中之血清肌酸激酶(CK)含量與投與該藥物之前的血清CK含量相比有所減少；或其中投與該藥物之後該個體之肌肉組織中之 α 肌聚糖陽性纖維數量與投與該藥物之前的 α 肌聚糖陽性纖維數量相比有所增加。

【請求項7】

如請求項1之用途，其中該全身投與途徑為靜脈內途徑。

【請求項8】

如請求項1之用途，其中該藥物經調配用於利用注射、輸注或植入投與。

【請求項9】

如請求項1之用途，其中該藥物經調配用於利用輸注投與。

【請求項10】

如請求項1之用途，其中該藥物經調配用於經由周邊肢體靜脈利用靜脈內途徑投與。

【請求項11】

如請求項1之用途，其中該肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症。

【請求項12】

如請求項1之用途，其中該肌肉萎縮症為肢帶型肌肉萎縮症2D型 (LGMD2D)。

【請求項13】

如請求項1之用途，其中該個體罹患肢帶型肌肉萎縮症，且該藥物經調配用於靜脈內輸注，且基於超螺旋DNA或質體作為定量標準，該rAAV之劑量為 5×10^{13} vg/kg至 2×10^{14} vg/kg，且其中該rAAV包括該SEQ ID NO: 4之scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體核苷酸序列。

【請求項14】

一種scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體用於製備用以減少有需要之個體中之血清肌酸激酶(CK)含量的藥物的用途，其中該scAAVrh74.tMCK.hSGCA構築體包括SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【請求項15】

一種多核苷酸，其包含與SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 8至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之核苷酸序列，其中該核苷酸序列編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。

【請求項16】

如請求項15之多核苷酸，其中該多核苷酸包含SEQ ID NO: 4之核苷酸序列。

【請求項17】

如請求項16之多核苷酸，其中該多核苷酸包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列。

【請求項18】

一種質體，其包含如請求項15至17中任一項之多核苷酸。

【請求項19】

一種活體外產生rAAV之方法，其包含將如請求項18之質體或如請求項15至17中任一項之多核苷酸轉移至細胞。

【請求項20】

一種細胞，其包含如請求項15至17中任一項之多核苷酸。

【請求項21】

如請求項20之細胞，其中該細胞為酵母細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞或細菌細胞。

【請求項22】

如請求項21之細胞，其中該細胞為HeLa細胞、293細胞、PerC.6細胞、HEK 293細胞或Sf9細胞。

【請求項23】

一種重組AAV載體，其包含與SEQ ID NO: 4至少95%一致之核苷酸序列，其中該核苷酸序列編碼保留 α 肌聚糖活性之蛋白質。

【請求項24】

一種重組AAV載體，其包含SEQ ID NO: 4所示之核苷酸序列。

【請求項25】

如請求項23或24之重組AAV載體，其中該載體為血清型AAVrh.74。

【請求項26】

一種組合物，其包含如請求項23至25中任一項之重組AAV載體。

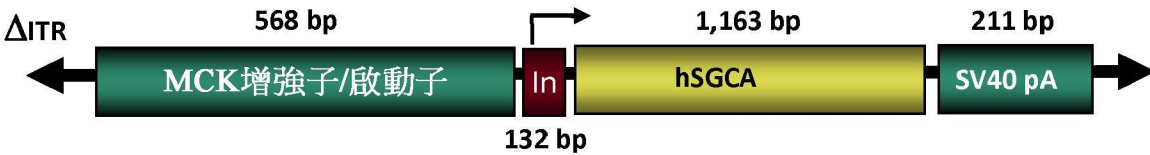
【請求項27】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該個體為4至15歲、25至55歲或超過50歲之人類個體。

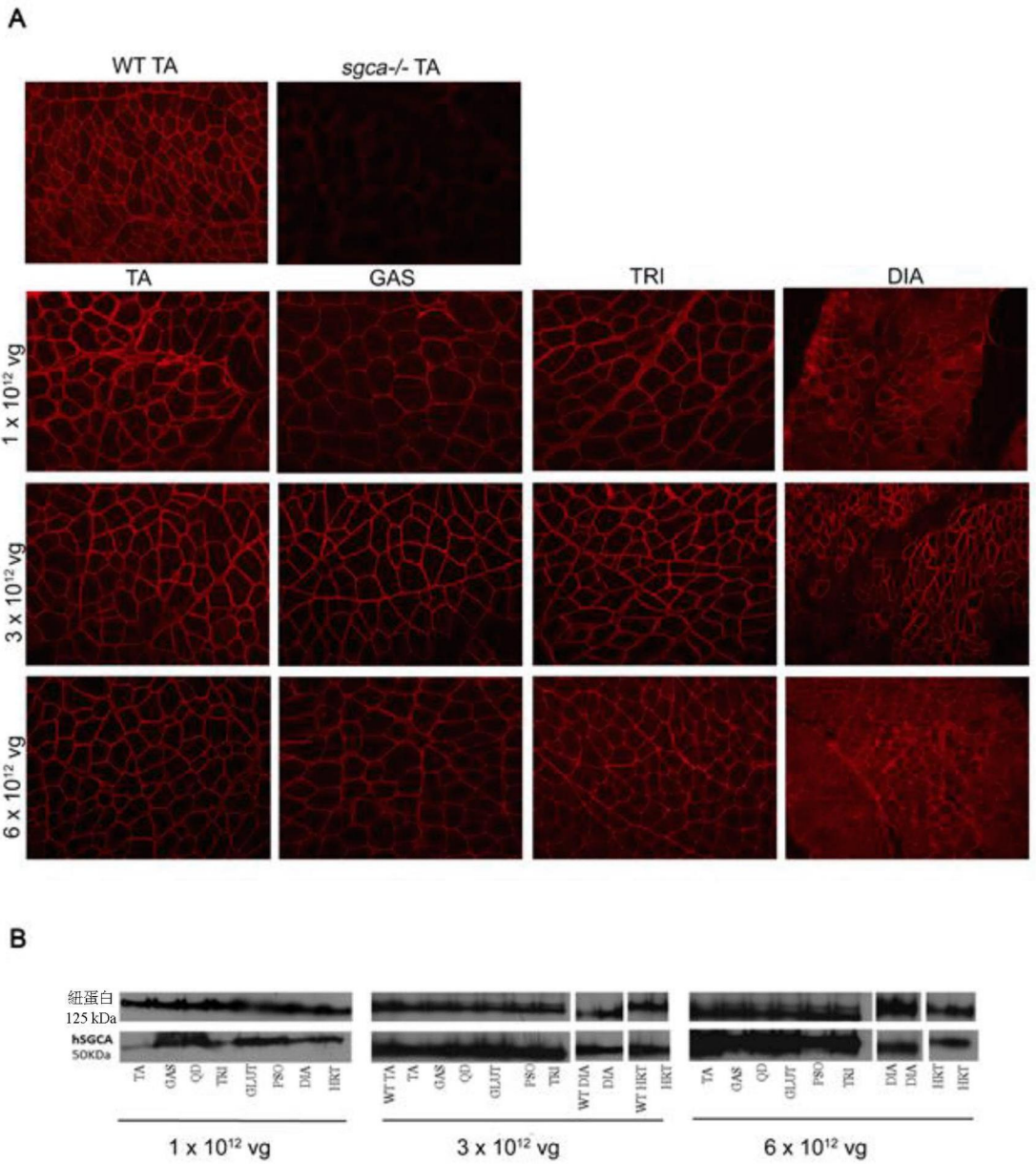
【請求項28】

如請求項1至5中任一項之用途，其中該個體為4至15歲之人類個體，其在兩個對偶基因中具有經確認之 α 肌聚糖(SGCA)突變及/或AAVrh74抗體呈陰性。

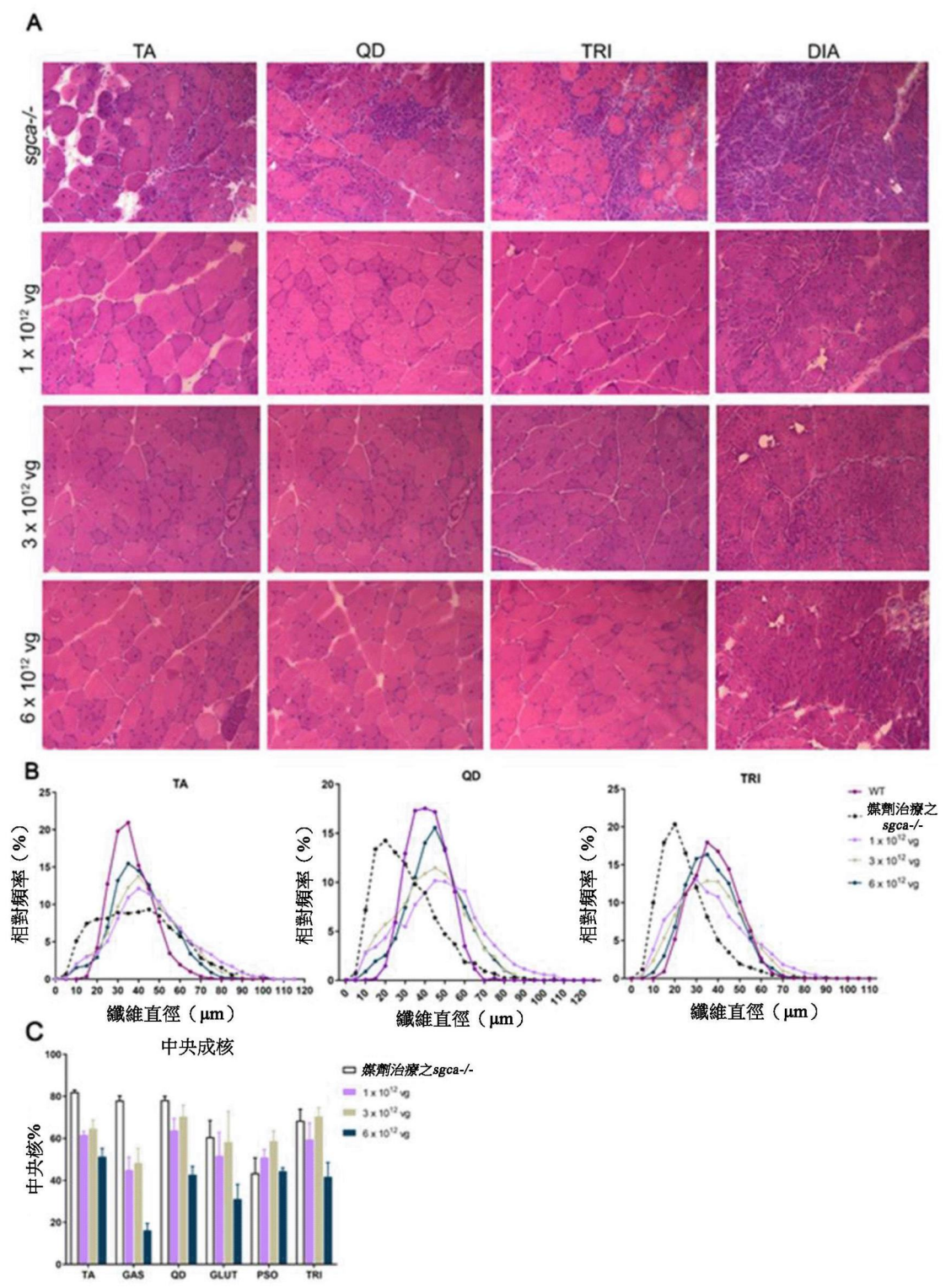
【發明圖式】



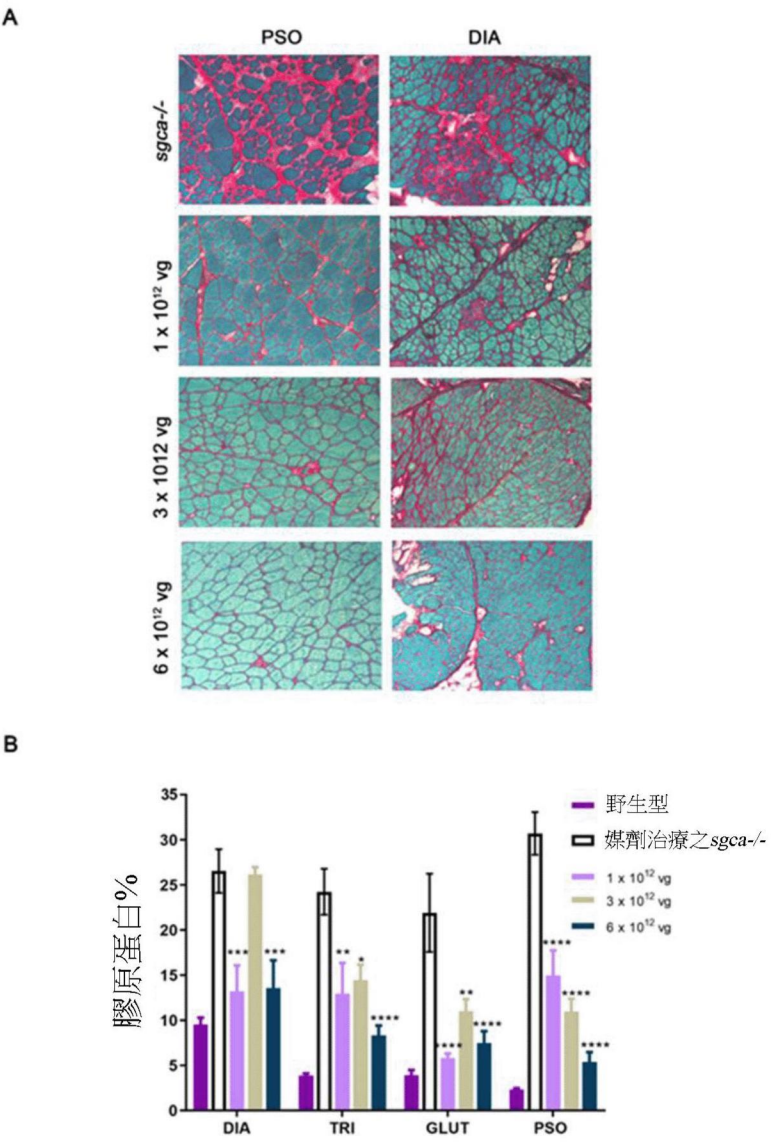
【圖1】



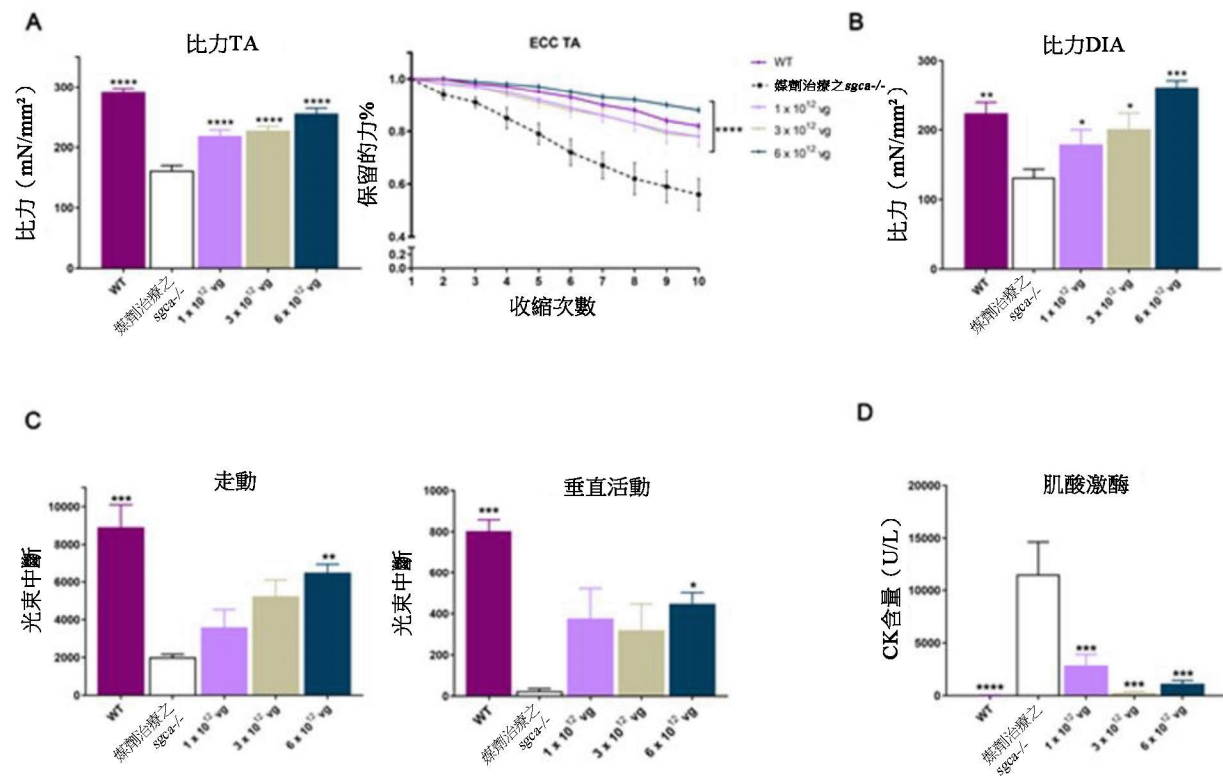
【圖2】



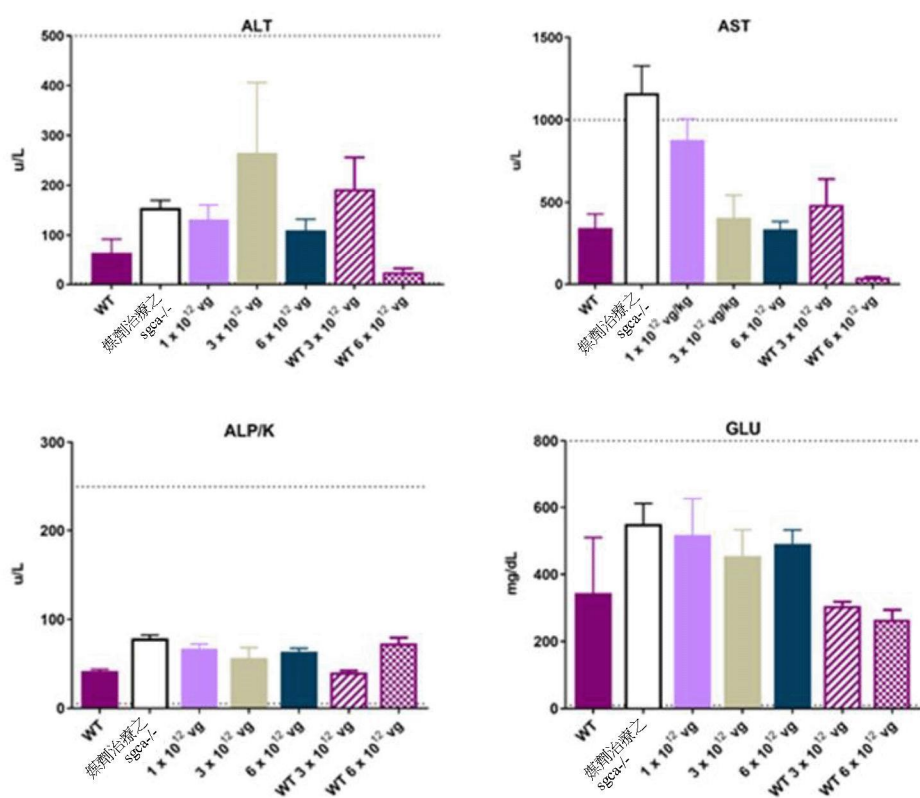
【圖3】



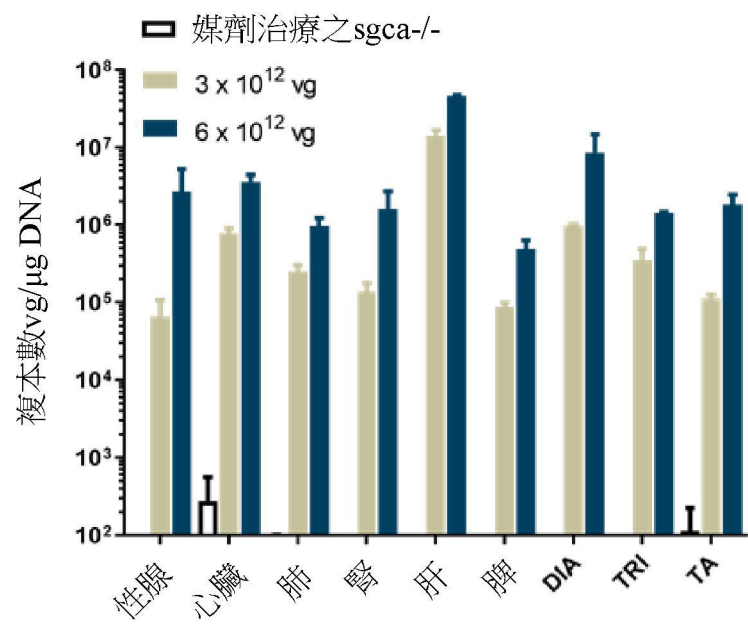
【圖4】



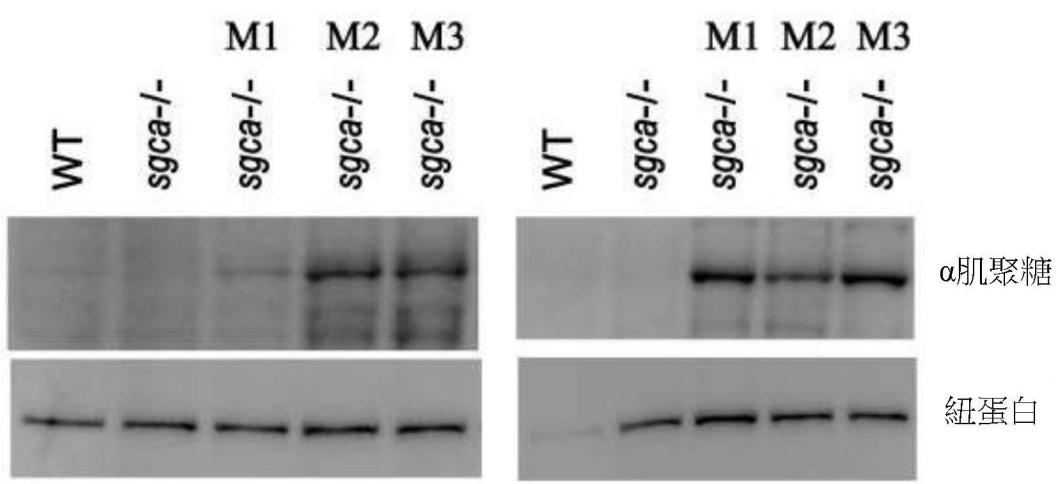
【圖5】



【圖6】

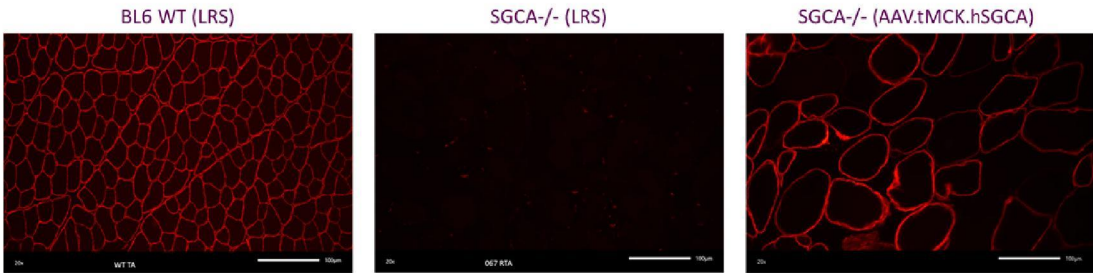


【圖7A】

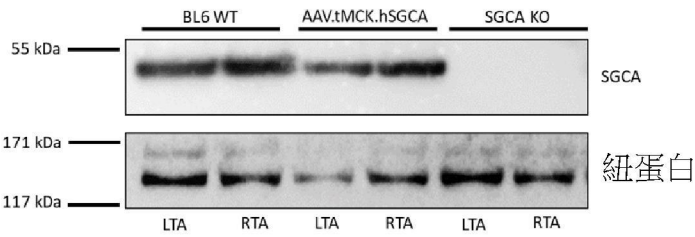


【圖7B】

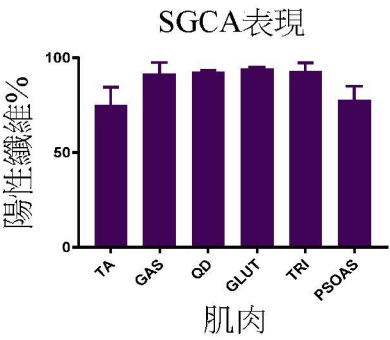
A



B



C



【圖8】

圖9a

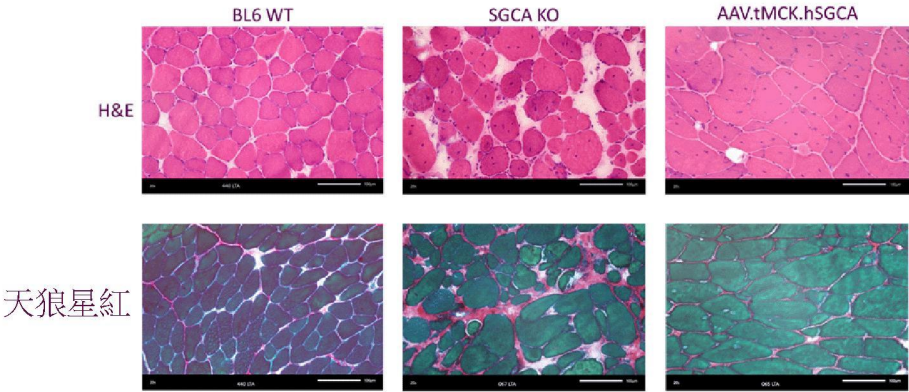
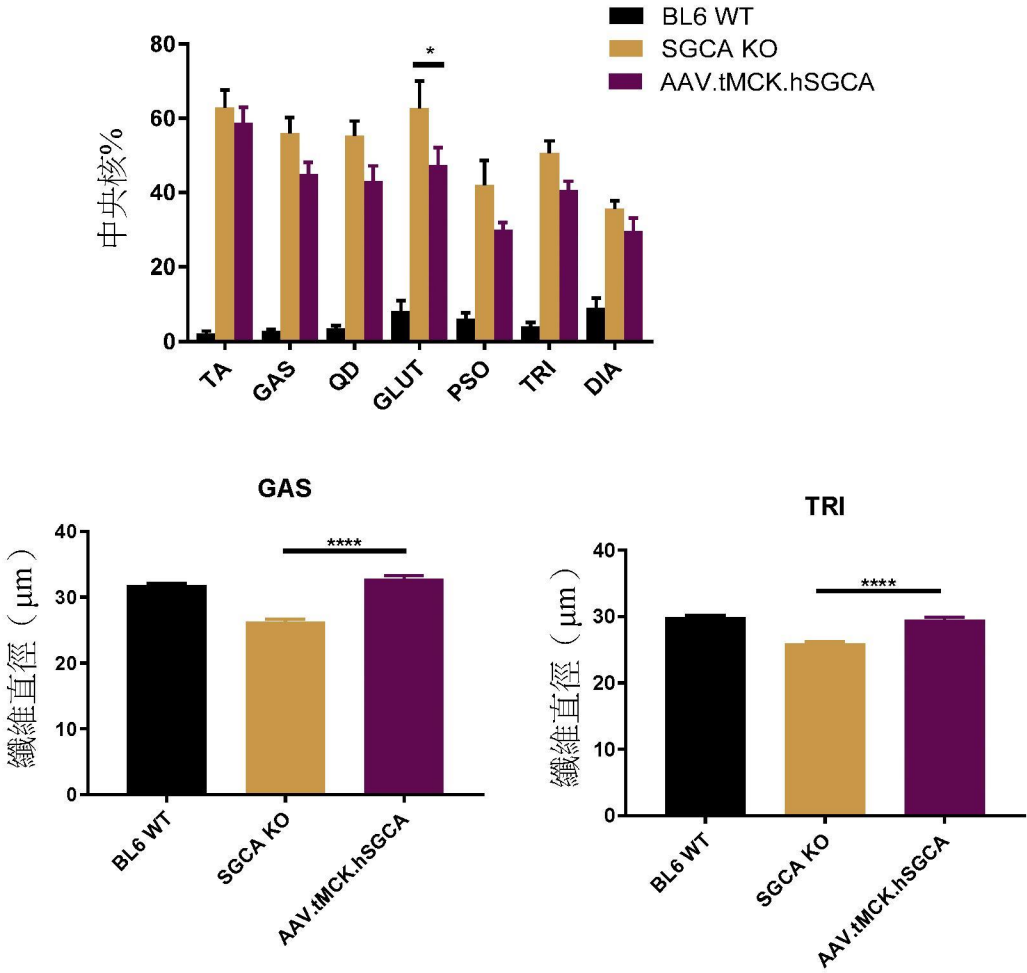
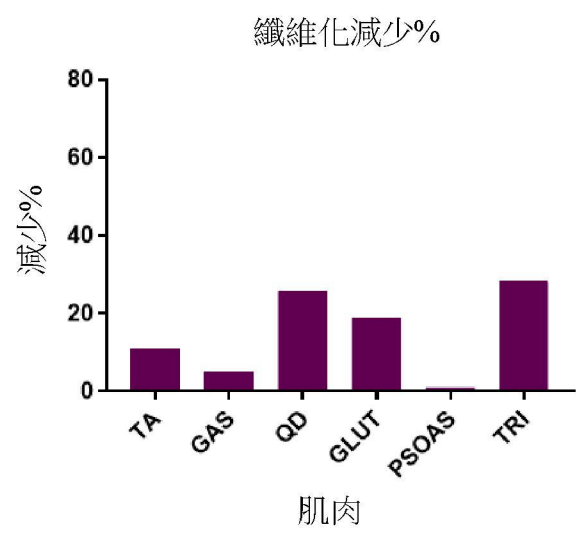


圖9b

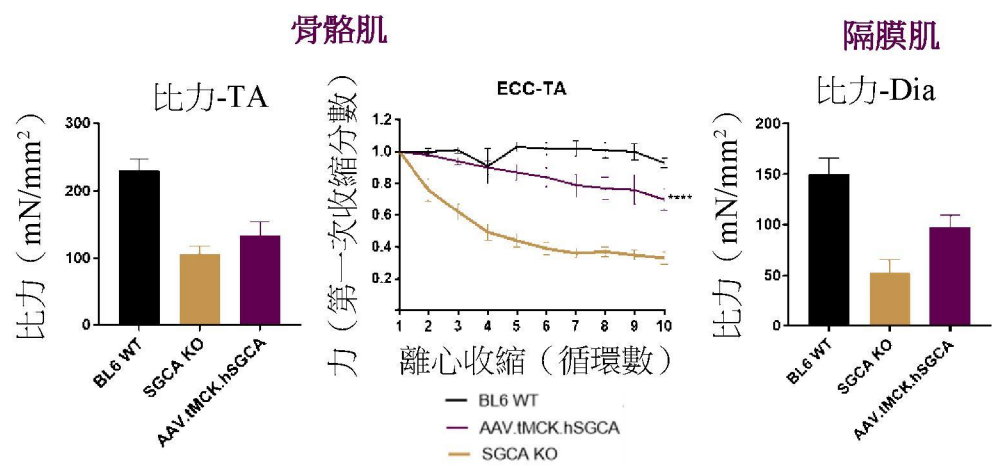


【圖9】

圖9c



【圖9】(續)



【圖10】