



(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 I804518 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：107136278

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 16 日

(51)Int. Cl. : C12N15/861 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

A61P25/14 (2006.01)

(30)優先權：2017/10/16 美國

62/572,702

(71)申請人：美商航海家醫療公司 (美國) VOYAGER THERAPEUTICS, INC. (US)
美國(72)發明人：沙 黛娜 文怡 SAH, DINAH WEN-YEE (US) ; 陳晴明 CHEN, QINGMIN (CN) ;
佩茨克 霍格 PATZKE, HOLGER (US) ; 侯 金兆 HOU, JINZHAO (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 107109407A

WO 2016/077689A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：29 項 圖式數：5 共 314 頁

(54)名稱

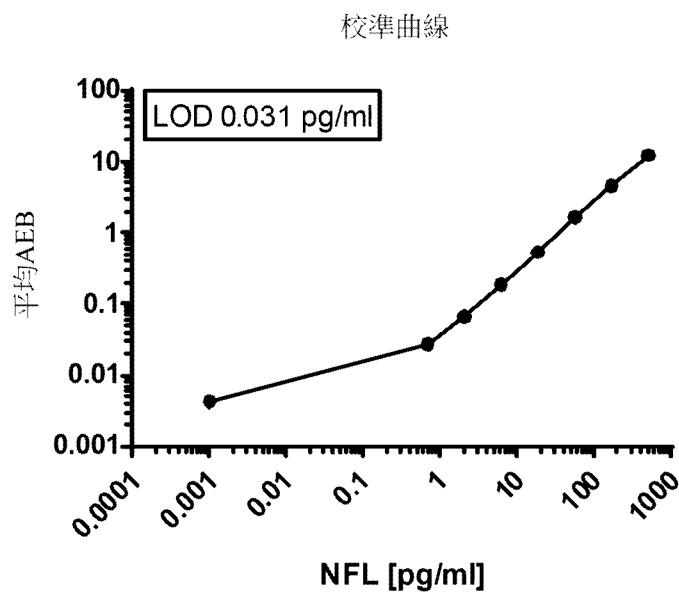
肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之治療

(57)摘要

本發明係關於編碼 SOD1 靶向聚核苷酸之 AAV，其可用於治療肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)及/或犬退化性脊髓病(DM)。

The present invention relates to AAVs encoding a SOD1 targeting polynucleotide which may be used to treat amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and/or canine degenerative myelopathy (DM).

指定代表圖：



【圖1】



I804518

【發明摘要】

【中文發明名稱】

肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

【中文】

本發明係關於編碼SOD1靶向聚核苷酸之AAV，其可用於治療肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)及/或犬退化性脊髓病(DM)。

【英文】

The present invention relates to AAVs encoding a SOD1 targeting polynucleotide which may be used to treat amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and/or canine degenerative myelopathy (DM).

【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】

肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於設計、製備、製造及/或調配聚核苷酸之組合物、方法和製程，該等聚核苷酸包括對靶向超氧化歧化酶1 (SOD1) 基因以干擾SOD1基因表現及/或SOD1酶生成的分子進行靶向或編碼之AAV載體、小干擾RNA (siRNA)雙螺旋體、shRNA、微RNA或其前驅體。在一些實施例中，將聚核苷酸插入至重組腺相關病毒(AAV)載體中。亦揭示用於抑制患有神經退化性疾病之個體中的SOD1基因表現之方法。該方法視情況將至少一種聚核苷酸引入至患有神經退化性疾病之個體中。特定言之，疾病為肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)。

【先前技術】

【0002】 肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)，亦稱為盧·賈里格病(Lou Gehrig's disease)，為致命的進行性神經退化性疾病，其特徵為主要運動皮質、腦幹及脊髓中之運動神經元(MN)顯著損失。運動神經元之損失會使基礎的基本運動，諸如呼吸喪失，且典型地會導致患者在診斷後2至5年內死亡。患者中之運動功能的進行性退化會嚴重破壞其呼吸能力，需要一定形式之呼吸輔助物以使患者存活。其他症狀亦包括手部、手臂、腿部或吞咽肌出現肌無力。一些患者(例如FTD-ALS)亦可能罹患額顳葉型癡呆。

【0003】 根據ALS協會，在美國每年有大約5,600人診斷患有ALS。

ALS的發病率為每100,000人中有兩例，且據估計，在任何給定時間，有多達30,000名美國人可能患上該疾病。

【0004】 描述ALS之兩種形式：一種為偶發性ALS (sALS)，其在美國為最常見形式且佔所有診斷病例之90%至95%；另一種為家族性ALS (fALS)，其出現在主要具有顯性遺傳之家族譜系中且僅佔美國的所有病例之約5%至10%。sALS及fALS在臨床上不可區分。

【0005】 病理學研究顯示，細胞過程中之一些在疾病發作之後特異性地在運動神經元(MN)中出現，其包括ER壓力增加、產生自由基(亦即活性含氧物(reactive oxygen species ; ROS))、粒線體功能障礙、蛋白質聚集、凋亡、發炎及麩胺酸興奮性毒性。

【0006】 ALS之病因具有複雜性且參差不齊。一般而言，認為ALS為一種複雜的遺傳性病症，其中與環境暴露結合之多個基因會結合而使個人易患病。已發現超過十二個與ALS相關之基因，其包括SOD-1 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 超氧化歧化酶)、TDP-43 (TARDBP，TAR DNA結合蛋白-43)、FUS (在肉瘤中融合/在肉瘤中易位)、血管生成素(ANG)、ATXN2 (Ataxin-2)、含纈酪肽蛋白(VCP)、視神經蛋白(Optineurin ; OPTN)及染色體9，開放閱讀框架72 (C9ORF72)中的非編碼GGGGCC六核苷酸重複序列擴增。然而，運動神經元退化之確切機制仍不清楚。

【0007】 當前，不存在治癒性ALS治療。唯一經FDA批准之藥物為利魯唑(Riluzole)，其拮抗麩胺酸鹽反應以減弱ALS之病理發展。然而，據報導，對於早期ALS患者，僅延長了約三個月壽命，且對於晚期ALS患者，並未觀測到治療效益，其表明患者缺乏治療選擇(Bensimon G等人, *J Neurol.* 2002, 249, 609-615)。因此，仍需要可有效地預防疾病進展之新

型治療策略。

【0008】 $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 超氧化歧化酶I型(SOD1)之基因中的突變為fALS之最常見病因，佔所有fALS病例之約20%至30%。近期報告表明，所有sALS病例之約4%亦可與SOD1突變相關(Robberecht及Philip, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2013, 14, 248-264)。SOD1相關fALS最不可能由正常SOD1活性之缺失導致，而係由毒性功能獲得導致。突變型SOD1相關fALS毒性的假設中之一者提出，異常SOD1酶使小分子，諸如過氧亞硝酸鹽或過氧化氫產生破壞性自由基。突變型SOD1神經毒性之其他假設包括抑制蛋白酶體活性、線粒體受損、破壞RNA加工及形成細胞內聚集體。ALS中突變型SOD1變體及/或野生型SOD1之異常積聚會形成鑑別為病理性包涵體之不溶性纖維狀聚集體。聚集之SOD1蛋白可誘導粒線體壓力(Vehvilainen P等人, *Front Cell Neurosci.*, 2014, 8, 126)及對細胞，尤其對運動神經元之其他毒性。

【0009】 此等研究結果表明，SOD1可為家族性及偶發性ALS兩者之潛在治療靶向物。可減少ALS患者之中樞神經系統中所產生的SOD1蛋白(無論野生型或突變型)之療法可改善患者之ALS症狀，諸如運動神經元退化及肌無力以及肌萎縮。旨在預防野生型及/或突變型SOD1蛋白聚集之形成的藥劑及方法可預防疾病進展且使得ALS症狀可得以改善。近年來，RNA干擾(RNAi)介導之基因緘默化已引起研究者之關注。靶向SOD1基因之小雙股RNA (小干擾RNA分子)在治療ALS方面之潛力已在此項技術中教示(參見例如美國專利第7,632,938號及美國專利公開案第20060229268號)。

【0010】 本發明研發出一種基於RNA干擾或基因減弱(knock-down)

之方法來抑制或預防ALS患者中的SOD1基因之表現以治療該疾病。

【0011】 本發明提供新穎聚核苷酸，其包括雙股RNA (dsRNA)構築體及/或siRNA構築體、shRNA構築體及/或微RNA構築體；及其設計方法。此外，此等siRNA構築體可為編碼於表現載體(一個或兩個股)中以遞送至細胞中的合成分子。此類載體包括(但不限於)腺相關病毒載體，諸如任何AAV血清型之載體基因組，或其他病毒遞送運載工具，諸如慢病毒等。

【發明內容】

【0012】 本發明提供編碼SOD1靶向聚核苷酸以干擾SOD1基因表現及/或SOD1蛋白產生之AAV載體及其使用方法。用於治療運動神經元退化疾病，諸如肌萎縮性脊髓側索硬化症之方法亦包括於本發明中。

【0013】 在一個實施例中，相較於未經治療之個體，在用編碼SOD1靶向聚核苷酸之AAV治療的個體中，30% SOD1受到抑制。可以輸注或快速注射形式向個體投與預定劑量下之AAV。作為非限制性實例，在C1至L7下角區看到抑制。

【0014】 本發明係關於特異性干擾基因表現及蛋白產生的經RNA分子介導之基因。用於治療運動神經元退化疾病，諸如肌萎縮性脊髓側索硬化症之方法亦包括於本發明中。包括於本文特性化之組合物中的siRNA涵蓋具有反義股之dsRNA，(該反義股)具有長度為30或小於30個核苷酸，一般19至24個核苷酸之區域，該反義股實質上與SOD1基因之mRNA轉錄物的至少一部分互補。

【0015】 本發明提供短雙股RNA分子，諸如小干擾RNA(siRNA)雙螺旋體，其靶向SOD1 mRNA以干擾SOD1基因表現及/或SOD1蛋白產

生。本發明之siRNA雙螺旋體可干擾與SOD1基因中之任何特定突變無關的SOD1基因之兩個對偶基因，且可尤其與ALS病中所見之彼等者相互作用。

【0016】 在一些實施例中，此類siRNA分子或siRNA分子之單一股插入至腺相關病毒載體中以引入至細胞，具體言之，運動神經元及/或中樞神經系統中之其他周圍細胞中。

【0017】 本發明之siRNA雙螺旋體包含雜交在一起形成雙螺旋結構的反義股及有義股，其中反義股與靶向SOD1基因之核酸序列互補，且其中有義股與靶向SOD1基因之核酸序列同源。在一些態樣中，反義股之5'端具有5'磷酸酯基，且有義股之3'端含有3'羥基。在其他態樣中，在各股之3'端無、有一個或2個核苷酸突出端。

【0018】 根據本發明，靶向SOD1基因的siRNA雙螺旋體之各股長度為19至25個核苷酸，較佳長度為約19個核苷酸、20個核苷酸、21個核苷酸、22個核苷酸、23個核苷酸、24個核苷酸或25個核苷酸。在一些態樣中，siRNA可為未經修飾之RNA分子。

【0019】 在其他態樣中，siRNA可含有至少一個經修飾之核苷酸，諸如鹼基、糖或主鏈修飾。

【0020】 在一個實施例中，siRNA或dsRNA包括至少兩個彼此互補的序列。dsRNA包括具有第一序列之有義股及具有第二序列之反義股。反義股包括實質上與編碼SOD1之mRNA的至少一部分互補的核苷酸序列，且互補區長度為30或小於30個核苷酸且至少15個核苷酸。一般而言，dsRNA長度為19至24個，例如19至21個核苷酸。在一些實施例中，dsRNA長度為約15至約25個核苷酸，且在其他實施例中，dsRNA長度為

約25至約30個核苷酸。

【0021】 dsRNA，在與表現SOD1之細胞接觸後或在表現SOD1之細胞中轉錄後，會抑制或遏制SOD1基因之表現至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%或大於40%，諸如當由如本文所述之方法分析時。

【0022】 根據本發明，產生包含編碼靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體、siRNA雙螺旋體之一個股或dsRNA之核酸的AAV載體，AAV載體血清型可為AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、

AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、
AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、
AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、
AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、
AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、
AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、
AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、
AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、
AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、
AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、
AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、
AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、
AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、
AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、
AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、
AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、
AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、
AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、
AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、
AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、
AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、
AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、
AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、

AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、
 AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、
 AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、
 AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、
 AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、
 AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、
 AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、
 AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、
 AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、
 AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、
 AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、
 AAVrh8R、AAVrh8R A586R突變體、AAVrh8R R533A突變體、AAAV、
 BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、
 AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、
 AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、
 AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、
 AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-
 LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-
 LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-
 LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-
 LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-
 PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-前驅體
 miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、

AAV 改組 100-1、AAV 改組 100-3、AAV 改組 100-7、AAV 改組 10-2、AAV 改組 10-6、AAV 改組 10-8、AAV 改組 100-2、AAV SM 10-1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV128.1/hu.43、真型AAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV

CLv1-1、AAV CLv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、
 AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV CLv1-7、AAV CLv1-8、AAV CLv1-
 9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-
 8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV
 CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、
 AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-
 L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、
 AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV
 CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、
 AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-
 R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV
 CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV
 CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-
 8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、
 AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、
 AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、
 AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、
 AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、
 AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、
 AAVF9/HSC9、AAV-PHP.B、AAV-PHP.A、G2B-26、G2B-13、TH1.1-
 32、TH1.1-35、AAVPHP.B2、AAVPHP.B3、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、
 AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-
 ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、

AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5及其變異體。

【0023】根據本發明，ALS中靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA係選自表4中所列之siRNA雙螺旋體。ALS中靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA係選自由siRNA雙螺旋體：D-4000至D-4025組成之群。

【0024】本發明亦提供包含靶向SOD1基因之至少一個siRNA雙螺旋體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。在一些態樣中，編碼siRNA雙螺旋體之核酸序列插入至AAV載體中。

【0025】在一些實施例中，本發明提供用於抑制/緘默化細胞中之SOD1基因表現的方法。因此，siRNA雙螺旋體或dsRNA可用於實質上抑制細胞中，尤其運動神經元中之SOD1基因表現。在一些態樣中，SOD1基因表現之抑制係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%。SOD1基因可為野生型基因或具有至少一個突變的突變SOD1基因任一者。因此，SOD1蛋白為野生型蛋白或具有至少一個突變的突變多肽任一者。

【0026】 在一些實施例中，本發明提供用於治療或改善需要治療之個體中的與異常SOD1基因及/或SOD1蛋白相關之肌萎縮性脊髓側索硬化症的方法，該方法包含向個體投與醫藥學上有效量之靶向SOD1基因之至少一個siRNA雙螺旋體；將該siRNA雙螺旋體遞送至靶向細胞中；抑制SOD1基因表現及蛋白產生；且改善個體中之ALS症狀。

【0027】 在一些實施例中，向有需要之個體投與包含編碼靶向SOD1基因之至少一個siRNA雙螺旋體的核酸序列之AAV載體以治療及/或改善ALS。AAV載體血清型可選自由以下組成之群：AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV3a、AAV3b、AAV3-3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV6.1、AAV6.2、AAV6.1.2、AAV7、AAV7.2、AAV8、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV16.3、AAV24.1、AAV27.3、AAV42.12、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AAV42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2-15/rh.62、AAV2-3/rh.61、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-9/rh.52、AAV3-11/rh.53、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV4-19/rh.55、AAV5-3/rh.57、AAV5-22/rh.58、AAV7.3/hu.7、AAV16.8/hu.10、

AAV16.12/hu.11、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV106.1/hu.37、
AAV114.3/hu.40、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.3/hu.44、
AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、
AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、
AAV33.8/hu.16、AAV52/hu.19、AAV52.1/hu.20、AAV58.2/hu.25、
AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAVC1、AAVC2、
AAVC5、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAVH2、
AAVrh.72、AAVhu.8、AAVrh.68、AAVrh.70、AAVpi.1、AAVpi.3、
AAVpi.2、AAVrh.60、AAVrh.44、AAVrh.65、AAVrh.55、AAVrh.47、
AAVrh.69、AAVrh.45、AAVrh.59、AAVhu.12、AAVH6、AAVLK03、
AAVH-1/hu.1、AAVH-5/hu.3、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、
AAVLG-9/hu.39、AAVN721-8/rh.43、AAVCh.5、AAVCh.5R1、
AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、
AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAVhu.1、
AAVhu.2、AAVhu.3、AAVhu.4、AAVhu.5、AAVhu.6、AAVhu.7、
AAVhu.9、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.13、AAVhu.15、
AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.20、AAVhu.21、
AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、
AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.31、AAVhu.32、
AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.40、
AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、
AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、
AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、

AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、
 AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、
 AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.14/9、AAVhu.t 19、
 AAVrh.2、AAVrh.2R、AAVrh.8、AAVrh.8R、AAVrh.10、AAVrh.12、
 AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、
 AAVrh.19、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、
 AAVrh.25、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、
 AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVrh.39、
 AAVrh.40、AAVrh.46、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、
 AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、
 AAVrh.54、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.61、AAVrh.64、
 AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.67、AAVrh.73、AAVrh.74、
 AAVrh8R、AAVrh8R A586R突變體、AAVrh8R R533A突變體、AAAV、
 BAAV、山羊AAV、牛AAV、AAVhE1.1、AAVhEr1.5、AAVhER1.14、
 AAVhEr1.8、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhEr1.35、AAVhEr1.7、
 AAVhEr1.36、AAVhEr2.29、AAVhEr2.4、AAVhEr2.16、
 AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhER1.23、
 AAVhEr3.1、AAV2.5T、AAV-PAEC、AAV-LK01、AAV-LK02、AAV-
 LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-
 LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-
 LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK16、AAV-LK17、AAV-
 LK18、AAV-LK19、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-
 PAEC7、AAV-PAEC8、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-2-前驅體

miRNA-101、AAV-8h、AAV-8b、AAV-h、AAV-b、AAV SM 10-2、
 AAV 改組 100-1、AAV 改組 100-3、AAV 改組 100-7、AAV 改組 10-
 2、AAV 改組 10-6、AAV 改組 10-8、AAV 改組 100-2、AAV SM 10-
 1、AAV SM 10-8、AAV SM 100-3、AAV SM 100-10、BNP61 AAV、
 BNP62 AAV、BNP63 AAV、AAVrh.50、AAVrh.43、AAVrh.62、
 AAVrh.48、AAVhu.19、AAVhu.11、AAVhu.53、AAV4-8/rh.64、
 AAVLG-9/hu.39、AAV54.5/hu.23、AAV54.2/hu.22、AAV54.7/hu.24、
 AAV54.1/hu.21、AAV54.4R/hu.27、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、
 AAV128.1/hu.43、真型AAV (ttAAV)、UPENN AAV 10、日本AAV 10血
 清型、AAV CBr-7.1、AAV CBr-7.10、AAV CBr-7.2、AAV CBr-7.3、
 AAV CBr-7.4、AAV CBr-7.5、AAV CBr-7.7、AAV CBr-7.8、AAV CBr-
 B7.3、AAV CBr-B7.4、AAV CBr-E1、AAV CBr-E2、AAV CBr-E3、
 AAV CBr-E4、AAV CBr-E5、AAV CBr-e5、AAV CBr-E6、AAV CBr-
 E7、AAV CBr-E8、AAV CHt-1、AAV CHt-2、AAV CHt-3、AAV CHt-
 6.1、AAV CHt-6.10、AAV CHt-6.5、AAV CHt-6.6、AAV CHt-6.7、
 AAV CHt-6.8、AAV CHt-P1、AAV CHt-P2、AAV CHt-P5、AAV CHt-
 P6、AAV CHt-P8、AAV CHt-P9、AAV CKd-1、AAV CKd-10、AAV
 CKd-2、AAV CKd-3、AAV CKd-4、AAV CKd-6、AAV CKd-7、AAV
 CKd-8、AAV CKd-B1、AAV CKd-B2、AAV CKd-B3、AAV CKd-B4、
 AAV CKd-B5、AAV CKd-B6、AAV CKd-B7、AAV CKd-B8、AAV
 CKd-H1、AAV CKd-H2、AAV CKd-H3、AAV CKd-H4、AAV CKd-
 H5、AAV CKd-H6、AAV CKd-N3、AAV CKd-N4、AAV CKd-N9、
 AAV CLg-F1、AAV CLg-F2、AAV CLg-F3、AAV CLg-F4、AAV CLg-

F5、AAV CLg-F6、AAV CLg-F7、AAV CLg-F8、AAV CLv-1、AAV CLv1-1、AAV CLv1-10、AAV CLv1-2、AAV CLv-12、AAV CLv1-3、AAV CLv-13、AAV CLv1-4、AAV CLv1-7、AAV CLv1-8、AAV CLv1-9、AAV CLv-2、AAV CLv-3、AAV CLv-4、AAV CLv-6、AAV CLv-8、AAV CLv-D1、AAV CLv-D2、AAV CLv-D3、AAV CLv-D4、AAV CLv-D5、AAV CLv-D6、AAV CLv-D7、AAV CLv-D8、AAV CLv-E1、AAV CLv-K1、AAV CLv-K3、AAV CLv-K6、AAV CLv-L4、AAV CLv-L5、AAV CLv-L6、AAV CLv-M1、AAV CLv-M11、AAV CLv-M2、AAV CLv-M5、AAV CLv-M6、AAV CLv-M7、AAV CLv-M8、AAV CLv-M9、AAV CLv-R1、AAV CLv-R2、AAV CLv-R3、AAV CLv-R4、AAV CLv-R5、AAV CLv-R6、AAV CLv-R7、AAV CLv-R8、AAV CLv-R9、AAV CSp-1、AAV CSp-10、AAV CSp-11、AAV CSp-2、AAV CSp-3、AAV CSp-4、AAV CSp-6、AAV CSp-7、AAV CSp-8、AAV CSp-8.10、AAV CSp-8.2、AAV CSp-8.4、AAV CSp-8.5、AAV CSp-8.6、AAV CSp-8.7、AAV CSp-8.8、AAV CSp-8.9、AAV CSp-9、AAV.hu.48R3、AAV.VR-355、AAV3B、AAV4、AAV5、AAVF1/HSC1、AAVF11/HSC11、AAVF12/HSC12、AAVF13/HSC13、AAVF14/HSC14、AAVF15/HSC15、AAVF16/HSC16、AAVF17/HSC17、AAVF2/HSC2、AAVF3/HSC3、AAVF4/HSC4、AAVF5/HSC5、AAVF6/HSC6、AAVF7/HSC7、AAVF8/HSC8、AAVF9/HSC9、AAV-PHP.B、AAV-PHP.A、G2B-26、G2B-13、TH1.1-32、TH1.1-35、AAVPHP.B2、AAVPHP.B3、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-

ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、
AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、
AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、
AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、
AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5及其變異體。

【0028】 在一些態樣中，ALS為與SOD1突變相關之家族性ALS。在其他態樣中，ALS為偶發性ALS，其特徵為SOD1蛋白異常聚集或破壞SOD1蛋白功能或定位，但未必係由於基因突變。藉由本發明方法改善之ALS症狀可包括運動神經元退化、肌無力、肌肉僵硬、言語不清及/或呼吸困難。

【0029】 在一些實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA或包含此類siRNA編碼分子之AAV載體可例如藉由顱內注射直接引入至個體之中樞神經系統中。

【0030】 在一些實施例中，本發明之醫藥組合物用作單獨療法。在其他實施例中，本發明之醫藥組合物與療法組合使用。組合療法可與已針對其對運動神經元退化之神經保護作用進行測試之一或多種神經保護劑組合，該等神經保護劑諸如小分子化合物、生長因子及激素。

【0031】 在一些實施例中，本發明提供用於藉由向有需要之個體投與治療有效量之質體或本文所述之AAV載體來治療或改善肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之方法。ALS可為家族性ALS或偶發性ALS。

【0032】 在一些實施例中，本發明提供用於藉由向有需要之個體投與治療有效量之質體或本文所述之AAV載體來治療或改善犬退化性脊髓病(DM)之方法。

【0033】 在一些實施例中，本發明提供用於藉由向有需要之個體投與治療有效量之質體或本文所述之AAV載體以降低個體中神經絲輕鏈(NF-L)之水準來治療或改善肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之方法。

【0034】 在一些實施例中，本發明提供用於藉由向有需要之個體投與治療有效量之質體或本文所述之AAV載體以降低個體中神經絲輕鏈(NF-L)之水準來治療或改善犬退化性脊髓病(DM)之方法。

【0035】 在一些實施例中，本發明提供用於藉由向有需要之個體投與治療有效量之質體或本文所述之AAV載體來降低個體中神經絲輕鏈(NF-L)之水準的方法。

【圖式簡單說明】

【0036】 前述及其他目標、特徵及優點根據如附圖中所說明之本發明特定實施例的以下描述將顯而易見。附圖不一定按比例繪製，相反側重說明本發明之各個實施例的原理。

【0037】 圖1顯示Quanterix Simoa hNF-L (Beta)分析之NF-L的校準曲線。

【0038】 圖2A及圖2B顯示正常狗之CSF中的NF-L之穩定性。圖2A顯示以pg/ml為單位的NF-L之穩定性，且圖2B顯示呈-80℃對照之百分比形式的穩定性。

【0039】 圖3A及圖3B顯示正常狗之血清中的NF-L之穩定性。圖3A顯示以pg/ml為單位的NF-L之穩定性，且圖3B顯示呈-80℃對照之百分比

形式的穩定性。

【0040】 圖4A及圖4B為顯示DM狗中之NF-L水準的直方圖。圖4A顯示CSF中之NF-L水準，且圖4B顯示血清中之NF-L水準。

【0041】 圖5A、圖5B及圖5C為顯示DM狗中之pNF-H水準的直方圖。圖5A顯示DM狗之CSF中pNF-H水準增加。圖5B顯示CSF中之pNF-H水準不與疾病嚴重程度相關。圖5C顯示CSF中之pNF-H對DM具有特異性。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0042】 本申請案主張標題為肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之治療(Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS))之2017年10月16日申請的臨時專利申請案第62/572,702號之權益，其內容以全文引用之方式併入本文中。

序列表之引用

【0043】 本申請案與電子格式之序列表一起提交。以2018年10月16日創建的且位元組大小為93,285的標題為20571047PCTSL.txt的文檔形式提供序列表。電子格式之序列表中之資訊以全文引用之方式併入本文中。

【0044】 本發明係關於作為治療劑之SOD1靶向聚核苷酸。RNA干擾介導之基因緘默化可特異性地抑制基因表現。因此，本發明提供聚核苷酸，諸如靶向SOD1基因之小雙股RNA (dsRNA)分子(小干擾RNA、siRNA)、shRNA、微RNA及其前驅體；涵蓋此類聚核苷酸之醫藥組合物；以及其設計製程。本發明亦提供其用於抑制SOD1基因表現及蛋白產生，用於治療神經退化性疾病，尤其肌肉萎縮性側索硬化(ALS)之方法。

【0045】 本發明之一或多個實施例詳細闡述於以下隨附描述中。雖然可使用與本文所述類似或等效的任何材料及方法實施或測試本發明，但現對較佳材料及方法加以描述。本發明之其他特徵、目標及優點根據說明書將顯而易見。在描述中，除非上下文另外明確規定，否則單數形式亦包括複數形式。除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所瞭解相同的含義。在有衝突的情況下，以本說明書為準。

肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)與SOD1

【0046】 作為成年發作神經退化性病症，肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)係進行性及致命疾病，其特徵為運動皮質、腦幹及脊髓中之運動神經元選擇性死亡。診斷患有ALS之患者出現進行性肌肉表型，其特徵為痙攣、反射亢進或反射減退、束化、肌肉萎縮及麻痺。此等運動損傷由歸因於運動神經元損失之肌肉的去神經分佈引起。ALS之主要病理學特徵包括皮質脊髓束之退化及下運動神經元(lower motor neurons; LMN)或前角細胞之廣泛損失(Ghatak等人, *J Neuropathol Exp Neurol.*, 1986, 45, 385-395)；主要運動皮質中之貝氏細胞(Betz cell)及其他椎體細胞之退化及損失(Udaka等人, *Acta Neuropathol*, 1986, 70, 289-295；Maekawa等人, *Brain*, 2004, 127, 1237-1251) 及運動皮質及脊髓中之反應性神經膠瘤病(Kawamata等人, *Am J Pathol.*, 1992, 140, 691-707；及Schiffer等人, *J Neurol Sci.*, 1996, 139, 27-33)。由於呼吸缺陷及/或發炎，ALS在診斷之後3至5年內通常為致命的(Rowland LP及Shneibder NA, *N Engl. J. Med.*, 2001, 344, 1688-1700)。

【0047】 ALS之細胞標誌為退化運動神經元及周圍細胞(例如星形膠

質細胞)中之蛋白質、泛素化、細胞質包涵體之存在。泛素化包涵體(亦即路易體樣包涵體或Skein樣包涵體)為ALS中最常見及特異類型之包涵體且發現於脊髓及腦幹之LMN，以及皮質脊髓上運動神經元(upper motor neuron；UMN)中(Matsumoto等人, *J Neurol Sci.*, 1993, 115, 208-213；及Sasak及Maruyama, *Acta Neuropathol.*, 1994, 87, 578-585)。若干蛋白質已鑑別為包涵體之組分，包括泛素、Cu/Zn超氧化歧化酶1 (SOD1)、外周蛋白及Dorfin。神經絲狀包涵體常常發現於ALS中的脊髓運動神經元中之透明聚結包涵體(hyaline conglomerate inclusion；HCI)及軸突『橢球體』。其他類型及較不特異之包涵體包括皮質之上部層中之Bunina小體(含朊抑素C包涵體)及新月形包涵體(Crescent shaped inclusion；SCI)。ALS中所見之其他神經病理學特徵包括高基氏體(Golgi apparatus)之斷裂、粒線體空泡形成及突觸末梢之超微結構異常(Fujita等人, *Acta Neuropathol.* 2002, 103, 243-247)。

【0048】 另外，在額顳葉型癡呆ALS (FTD-ALS)中，亦觀測到皮質萎縮(包括額葉及顳葉)，此可引起FTD-ALS患者中之認知障礙。

【0049】 ALS為複雜及多因性疾病且假設為造成ALS發病機制之多種機制包括蛋白質降解之功能障礙、麩胺酸興奮性毒性、粒線體功能障礙、細胞凋亡、氧化應激、發炎、蛋白質錯誤摺疊及聚集、異常RNA代謝及變化之基因表現。

【0050】 約10% ALS病例具有疾病家族病史，且此等患者稱為家族性ALS (fALS)或遺傳患者，通常具有孟德爾遺傳顯性模式及高外顯率。其餘部分(約90%至95%)歸類為偶發性ALS (sALS)，因為其與所記錄之家族病史不相關，而認為係歸因於其他風險因素，包括環境因素、基因多態性、體細胞突變及可能的基因-環境相互作用。在多數情況下，家族性(或

遺傳的)ALS遺傳為體染色體顯性疾病，但存在具有體染色體隱性及X性聯遺傳及不完全外顯率之譜系。偶發性及家族性形式在臨床上不可區分，表明常見的發病機制。ALS中之運動神經元之選擇性死亡之準確病因仍不清楚。對理解fALS中之遺傳因子之進展可為疾病之兩種形式提供線索。

【0051】最近，對ALS之遺傳學原因之探索已發現已知引起fALS之超過10種不同基因之突變。最常見之一者發現於編碼Cu/Zn超氧化歧化酶1 (SOD1；約20%) (Rosen DR等人, *Nature*, 1993, 362, 59-62)、在肉瘤中融合/在脂肪肉瘤中轉譯(FUS/TLS；1%至5%)及TDP-43 (TARDBP；1%至5%)之基因中。最近，C9orf72基因中之六核苷酸重複擴增(GGGGCC)_n鑑別為西方人群中之fALS之最常見病因(約40%) (Renton等人, *Nat. Neurosci.*, 2014, 17, 17-23綜述)。在ALS中突變之其他基因包括alsin (ALS2)、senataxin (SETX)、囊泡相關之膜蛋白(vesicle-associated membrane protein；VAMP)、血管生成素(ANG)。fALS基因控制不同細胞機制，表明ALS之發病機制為複雜的且可與最後引起運動神經元退化之若干不同過程相關。

【0052】SOD1為在哺乳動物中鑑別及表徵之以下三種人類超氧化歧化酶中之一者：銅-鋅超氧化歧化酶(Cu/ZnSOD或SOD1)、錳超氧化歧化酶(MnSOD或SOD2)及細胞外超氧化歧化酶(ECSOD或SOD3)。SOD1為153-殘基多肽之32 kDa均二聚體，每個次單元具有一個銅結合位點及一個鋅結合位點，其由人類染色體21上之SOD1基因(NCBI參考序列NM_000454.4；SEQ ID NO: 1)編碼(參見表10)。SOD1在結合銅離子處催化分子氧(O₂)及過氧化氫(H₂O₂)中之超氧陰離子(O²⁻)之反應。SOD1之細胞內濃度較高(在10至100 μM範圍內)，佔中樞神經系統(CNS)中之總蛋白質含量之1%。蛋白質不僅位於細胞質中，而且位於真核細胞中之細胞

核、溶酶體、過氧化體及粒線體膜間腔中(Lindenau J等人, *Glia*, 2000, 29, 25-34)。

【0053】 SOD1基因之突變由15%至20% fALS患者及全部ALS病例之1%至2%攜帶。目前，已發現分佈遍及153-胺基酸SOD1多肽之至少170種不同突變引起ALS，且可在ALS在線基因資料庫(ALS online Genetic Database；ALSOD)發現經更新之清單(Wroe R等人, *Amyotroph Lateral Scler.*, 2008, 9, 249-250)。表1列舉ALS中之SOD1之一些突變實例。此等突變主要為單胺基酸取代(亦即錯義突變)，但亦會發生缺失、插入及C末端截短。不同SOD1突變顯示不同地理分佈型樣。舉例而言，患有由SOD1基因突變引起之ALS的全部美國人中有約二分之一具有特定突變Ala4Val (或A4V)。A4V突變典型地與較嚴重之徵兆及症狀相關。I113T突變迄今為止在英國為最常見之突變。在歐洲，最普遍之突變為D90A取代。

表1. ALS中SOD1突變之實例

	突變
外顯子1 (220bp)	Q22L ; E21K,G ; F20C,N19S ; G16A,S ; V14M,S ; G12R ; G10G,V,R ; L8Q,V ; V7E ; C6G,F ; V5L ; A4T,V,S
外顯子2 (97bp)	T54R ; E49K ; H48R,Q ; V47F,A ; H46R ; F45C ; H43R ; G41S,D ; G37R ; V29,insA
外顯子3 (70bp)	D76Y,V ; G72S,C ; L67R ; P66A ; N65S ; S59I,S
外顯子4 (118bp)	D124G,V ; V118L,InsAAAC ; L117V ; T116T ; R115G ; G114A ; I113T,F ; I112M,T ; G108V ; L106V,F ; S106L,delTCACTC ; I104F ; D101G,Y,H,N ; E100G,K ; I99V ; V97L,M ; D96N,V ; A95T,V ; G93S,V,A, C,R,D ; D90V,A ; A89T,V ; T88delACTGCTGAC ; V87A,M ; N86I,S,D,K ; G85R,S ; L84V,F ; H80R
外顯子5 (461bp)	I151T,S ; I149T ; V148I,G ; G147D,R ; C146R, 終 止 ; A145T,G ; L144F,S ; G141E,終 止 ; A140A,G ; N139D,K,H,N ; G138E ; T137R ; S134N ; E133V,delGAA,insTT ; E132insTT ; G127R,InsTGCG ; L126S,delITT,終止 ; D126,delTT

【0054】 為調查與SOD1基因缺陷相關之神經元死亡機制，此項技

術中研發SOD1相關之ALS的若干啮齒動物模型，其表現具有不同突變(包括錯義突變、小缺失或插入)之人類SOD1基因。ALS小鼠模型之一些實例包括SOD1^{G93A}、SOD1^{A4V}、SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R}、SOD1^{D90A}、SOD1^{L84V}、SOD1^{I113T}、SOD1^{H36R/H48Q}、SOD1^{G127X}、SOD1^{L126X}及SOD1^{L126delTT}。存在攜帶兩種不同人類SOD1突變：SOD1^{H46R}及SOD1^{G93R}之兩種轉殖基因大鼠模型。此等啮齒動物ALS模型可出現類似於人類ALS患者之肌無力及反映人類疾病之若干特徵之其他病原特徵，詳言之，脊髓運動神經元之選擇性死亡、運動神經元中之蛋白質包涵體之聚集及微神經膠質細胞活化。此項技術中熟知轉殖基因啮齒動物為人類SOD1相關之ALS疾病之良好模型且提供用於研究疾病發病機制及研發疾病治療之模型。

【0055】 動物及細胞模型之研究顯示SOD1病原性變體藉由功能獲得引起ALS。亦即，當藉由SOD1突變變化時，超氧化歧化酶獲得新型但有害的特性。舉例而言，ALS中之一些SOD1突變變體藉由破壞氧化還原循環增加氧化應激(例如增加之有毒超氧自由基積聚)。其他研究亦表明ALS中之一些SOD1突變變體可獲得與其正常生理學功能無關之有毒特性(諸如錯誤摺疊SOD1變體之異常聚集)。在異常氧化還原化學模型中，突變型SOD1為不穩定的且經由與非習知底物之異常化學相互作用造成活性含氧物(ROS)之過度產生。在蛋白質毒性模型中，不穩定的錯誤摺疊SOD1聚集至細胞質包涵體，隔離對細胞過程至關重要之蛋白質。此等兩種假設並不互相排斥。已顯示結合活性位點中之金屬之所選擇組胺酸殘基的氧化介導SOD1聚集。

【0056】 聚集之突變型SOD1蛋白亦可誘導粒線體功能障礙

(Vehvilainen P等人, *Front Cell Neurosci.*, 2014, 8, 126)、軸突輸送之損傷、異常RNA代謝、膠細胞病理學及麩胺酸興奮性毒性。在一些偶發性ALS病例中，錯誤摺疊野生型SOD1蛋白發現於患病運動神經元中，該蛋白形成類似於家族性ALS相關之SOD1變異體的「有毒構形」(Rotunno MS及Bosco DA, *Front Cell Neurosci.*, 2013, 16, 7, 253)。此類證據表明ALS為類似於其他神經退化性疾病，諸如阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)及帕金森氏病(Parkinson's disease)的蛋白質摺疊疾病。

【0057】目前，尚無治癒性治療可用於患有ALS之患者。唯一經FDA批准之藥物利魯唑(亦稱作力如太(Rilutek))作為麩胺酸釋放之抑制劑對ALS具有中等作用，若其服用18個月則僅延長2至3個月之存活期。不幸地，服用利魯唑之患者不經歷疾病進展之任何減緩或肌肉功能之改善。因此，利魯唑不存在治癒，或甚至有效治療。研究人員繼續尋找較佳治療劑。

【0058】抑制異常SOD1蛋白質聚集之一種方法為緘默化/抑制ALS中之SOD1基因表現。已報導用於特異性基因緘默化突變對偶基因之小干擾RNA對fALS之治療為治療上有益的(例如Ralghe GS等人, *Nat. Medicine*, 2005, 11(4), 429-433；及Raoul C等人, *Nat. Medicine*, 2005, 11(4), 423-428；及Maxwell MM等人, *PNAS*, 2004, 101(9), 3178-3183；及Ding H等人, *Chinese Medical J.*, 2011, 124(1), 106-110；及Scharz DS等人, *Plos Genet.*, 2006, 2(9), e140；其中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0059】靶向SOD1基因且調節ALS中之SOD1表現之多種其他RNA治療劑教示於此項技術中，此類基於RNA之藥劑包括反義寡核苷酸及雙

股小干擾RNA。參見，例如Wang H等人, *J Biol. Chem.*, 2008, 283(23), 15845-15852)；美國專利第7,498,316號、第7,632,938號、第7,678,895號、第7,951,784號、第7,977,314號、第8,183,219號、第8,309,533號及第8,586,554號；及美國專利公開案第2006/0229268號及第2011/0263680號；其中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0060】 本發明採用病毒載體，諸如腺相關病毒(AAV)載體以將siRNA雙螺旋體或SOD1靶向聚核苷酸以高效率遞送至細胞中。本發明之包含RNAi分子，例如siRNA分子的AAV載體可增加將活性劑遞送至運動神經元中。SOD1靶向聚核苷酸可能夠在細胞內顯著抑制SOD1基因表現(例如mRNA水準)；由此，改善細胞內SOD1表現誘導之應激，諸如蛋白質聚集及包涵體形成、增加之自由基、粒線體功能障礙及RNA代謝。

【0061】 此類SOD1靶向聚核苷酸抑制可用於治療ALS。根據本發明，提供用於治療及/或改善患者之ALS的方法，其包括向患者投與有效量的至少一個SOD1靶向聚核苷酸，該等SOD1靶向聚核苷酸在細胞中編碼一或多個siRNA雙螺旋體且使SOD1基因表現抑制/緘默化。

本發明之組合物

載體

【0062】 在一些實施例中，本文所述之siRNA分子可插入至載體，諸如質體或病毒載體中或由其編碼。較佳地，siRNA分子插入至病毒載體中或由其編碼。

【0063】 病毒載體可為疱疹病毒(HSV)載體、反轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體等。在一些具體實施例中，病毒載體為AAV載體。

反轉錄病毒載體

【0064】 在一些實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體可由反轉錄病毒載體編碼(參見例如美國專利第5,399,346號；第5,124,263號；第4,650,764號及第4,980,289號；其中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中)。

腺病毒載體

【0065】 腺病毒為可經修飾以將核酸高效遞送至活體內多種細胞型的真核DNA病毒，且已廣泛地用於基因療法方案中，包括用於使基因靶向神經細胞。已描述針對核酸治療劑之各種複製缺陷腺病毒及最小腺病毒載體(參見例如 PCT專利公開案第WO199426914號、第WO 199502697號、第WO199428152號、第WO199412649號、第WO199502697號及第WO199622378號；其中之每一者之內容以全文引用之方式併入)。此類腺病毒載體亦可用於將本發明之siRNA分子遞送至細胞。

腺相關病(AAV)載體

【0066】 AAV為依賴性小病毒。類似於其他小病毒，AAV為單股、非包膜DNA病毒，其基因組長度為約5000個核苷酸，其含有編碼負責複製(Rep)之蛋白質及衣殼(Cap)之結構蛋白的兩個開放閱讀框架。開放閱讀框架側接兩個反向末端重複(ITR)序列，其充當病毒基因組之複製起點。此外，AAV基因組含有封裝序列，使病毒基因組封裝於AAV衣殼中。AAV載體需要共輔助載體(例如腺病毒)以在感染細胞中經歷產毒性感染。在不存在此類輔助功能下，AAV病毒粒子基本上進入宿主細胞且整合於細胞之基因組中。

【0067】 由於siRNA遞送之若干獨特特徵，AAV載體已研究用於

siRNA遞送。此等特徵包括(i)感染分裂與非分裂細胞之能力；(ii)廣泛的宿主感染範圍，包括人類細胞；(iii)野生型AAV不與任何疾病相關且不可在感染細胞中複製；(iv)缺乏針對載體的細胞介導之免疫反應及(v)整合於宿主染色體中或以游離形式存留之能力，由此產生長期表現之可能性。另外，用AAV載體感染對改變細胞基因表現之型樣具有極小影響 (Stilwell 及 Samulski 等人, *Biotechniques*, 2003, 34, 148)。

【0068】 通常，用於siRNA遞送之AAV載體可為重組病毒載體，其由於在病毒基因組中缺乏編碼功能性Rep及Cap蛋白之序列而為複製缺陷的。在一些情況下，缺陷AAV載體可缺乏所有編碼序列之大多數且基本上僅含有一或兩個AAV ITR序列及封裝序列。

【0069】 AAV載體亦可包含自互補AAV載體(scAAV)。scAAV載體含有黏接在一起以形成雙股DNA之兩個DNA股。藉由跳過第二股合成，scAAV在細胞中實現快速表現。

【0070】 用於產生/修飾AAV載體之方法揭示於此項技術中，諸如假型AAV載體(PCT專利公開案第WO200028004號、第WO200123001號、第WO2004112727號、第WO 2005005610號及第WO 2005072364號，其中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0071】 用於將siRNA分子遞送至哺乳動物細胞中之AAV載體可由不同AAV血清型製備或源自不同的AAV血清型，其包括(但不限於)AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8及AAV-DJ。在一些情況下，不同的AAV血清型可混合在一起或與其他類型的病毒混合以產生嵌合AAV載體。

【0072】 用於siRNA遞送之AAV載體可經修飾以增強遞送效率。含有siRNA表現卡匣之此類經修飾之AAV載體可經高效封裝，且可用以以高頻率及極小毒性成功地感染靶細胞。

【0073】 在一些實施例中，用於遞送本發明之siRNA雙螺旋體的AAV載體可為人類血清型AAV載體。此類人類AAV載體可源自任何已知血清型，例如血清型AAV1至AAV11中之任一者。作為非限制性實例，AAV載體可為：包含AAV1衍生之衣殼中的AAV1衍生之基因組之載體；包含AAV2衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；包含AAV4衍生之衣殼中的AAV4衍生之基因組之載體；包含AAV6衍生之衣殼中的AAV6衍生之基因組之載體；或包含AAV9衍生之衣殼中的AAV9衍生之基因組之載體。

【0074】 在其他實施例中，用於遞送本發明之siRNA雙螺旋體的AAV載體可為假型AAV載體，其含有源自至少兩種不同AAV血清型之序列及/或組分。假型AAV載體可為包含以下之載體：源自一種AAV血清型之AAV基因組及至少部分源自不同AAV血清型之衣殼蛋白。作為非限制性實例，此類假型AAV載體可為：包含AAV1衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；或包含AAV6衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；或包含AAV4衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；或包含AAV9衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體。

【0075】 在其他實施例中，AAV載體可用於將siRNA分子遞送至中樞神經系統(例如美國專利第6,180,613號；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0076】 在一些態樣中，用於遞送本發明之siRNA雙螺旋體的AAV

載體可進一步包含經修飾之衣殼，其包括來自非病毒源之肽。在其他態樣中，AAV載體可含有CNS特異性嵌合衣殼以促進將siRNA雙螺旋體遞送至大腦及脊髓中。舉例而言，來自展現CNS向性之AAV變異體之帽核苷酸序列的對準可經構築以鑑別可變區(VR)序列及結構。

病毒基因組

【0077】 在一個實施例中，如所示，AAV粒子包含具有有效負載區域的病毒基因組。

病毒基因組尺寸

【0078】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為單股或雙股病毒基因組。病毒基因組尺寸可為小尺寸、中等尺寸、大尺寸或最大尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0079】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為小單股病毒基因組。小單股病毒基因組可具有2.7至3.5 kb尺寸，諸如約2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4及3.5 kb尺寸。作為非限制性實例，小單股病毒基因組可具有3.2 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0080】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為小雙股病毒基因組。小雙股病毒基因組可具有1.3至1.7 kb尺寸，諸如約1.3、1.4、1.5、1.6及1.7 kb尺寸。作為非限制性實例，小雙股病毒基因組可具有1.6 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0081】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為中等單股病毒基因組。中等單股病毒基因組可具有3.6至4.3 kb尺寸，諸如約3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2及4.3 kb尺寸。作為非限制性

實例，中等單股病毒基因組可具有4.0 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0082】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為中等雙股病毒基因組。中等雙股病毒基因組可具有1.8至2.1 kb尺寸，諸如約1.8、1.9、2.0及2.1 kb尺寸。作為非限制性實例，中等雙股病毒基因組可具有2.0 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0083】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為大單股病毒基因組。大單股病毒基因組可具有4.4至6.0 kb尺寸，諸如約4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9及6.0 kb尺寸。作為非限制性實例，大單股病毒基因組可具有4.7 kb尺寸。作為另一非限制性實例，大單股病毒基因組可具有4.8 kb尺寸。作為又一非限制性實例，大單股病毒基因組可具有6.0 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

【0084】 在一個實施例中，包含本文所述之有效負載的病毒基因組可為大雙股病毒基因組。大雙股病毒基因組可具有2.2至3.0 kb尺寸，諸如約2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9及3.0 kb尺寸。作為非限制性實例，大雙股病毒基因組可具有2.4 kb尺寸。另外，病毒基因組可包含啟動子及聚腺苷酸尾。

病毒基因組組分：反向末端重複序列(ITR)

【0085】 本發明之AAV粒子包含具有至少一個ITR區域及有效負載區域之病毒基因組。在一個實施例中，病毒基因組具有兩個ITR。此兩個ITR在5'及3'端側接有效負載區域。ITR充當複製起點，包含用於複製之識別位點。ITR包含可互補且對稱地配置之序列區域。併入本發明之病毒基

因組中的ITR可包含天然存在之聚核苷酸序列或以重組方式衍生之聚核苷酸序列。

【0086】 ITR可來源於與衣殼相同的血清型，選自本文之血清型中之任一者，或其衍生物。ITR可具有與衣殼不同的血清型。在一個實施例中，AAV粒子具有超過一個ITR。在一個非限制性實例中，AAV粒子具有包含兩個ITR的病毒基因組。在一個實施例中，ITR具有彼此相同的血清型。在另一實施例中，ITR具有不同血清型。非限制性實例包括零個、一個或兩個具有與衣殼相同之血清型的ITR。在一個實施例中，AAV粒子之病毒基因組的兩個ITR均為AAV2 ITR。

【0087】 獨立地，各ITR長度可為約100至約150個核苷酸。ITR長度可為約100-105個核苷酸，長度106-110個核苷酸，長度111-115個核苷酸，長度116-120個核苷酸，長度121-125個核苷酸，長度126-130個核苷酸，長度131-135個核苷酸，長度136-140個核苷酸，長度141-145個核苷酸或長度146-150個核苷酸。在一個實施例中，ITR長度為140-142個核苷酸。ITR長度之非限制實例為長度102、140、141、142、145個核苷酸，及與其具有至少95%一致性之彼等核苷酸。

【0088】 在一個實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之反(flip) ITR的5'端附近。在另一實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之反ITR的3'端附近。在又另一實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之正(flop) ITR的5'端附近。在又另一實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之正ITR的3'端附近。在一個實施例

中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之反ITR的5'端與正ITR的3'端之間。在一個實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之(例如反ITR之5'端與正ITR之3'端之間的中途，或正ITR的3'端與反ITR的5'端之間的中途)，反ITR的3'端與反ITR的5'端之間。作為非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端下游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超過30個核苷酸內。作為非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端上游1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超過30個核苷酸內。作為另一非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端下游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30個核苷酸內。作為另一非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端上游1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30個核苷酸內。作為非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端上游前1%、2%、

3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超過25%核苷酸內。作為另一非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之ITR (例如反或正ITR)之5'或3'端下游前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%核苷酸內。

病毒基因組組分：啟動子

【0089】 在一個實施例中，病毒基因組之有效負載區域包含至少一個增強轉殖基因標靶特異性及表現之元件(參見例如Powell等人 *Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy*, 2015；該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中)。增強轉殖基因標靶特異性及表現之元件的非限制性實例包括啟動子、內源miRNA、轉錄後調控元件(PRE)、聚腺苷酸化(PolyA)信號序列及上游強化子(USE)、CMV強化子及內含子。

【0090】 熟習此項技術者可認識到，本發明之多肽在靶細胞中的表現可能需要特異性啟動子，包括(但不限於)具有物種特異性、可誘導、組織特異性或細胞週期特異性的啟動子(Parr等人, *Nat. Med.*3:1145-9 (1997)；該文獻的內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0091】 在一個實施例中，當啟動子驅動AAV粒子病毒基因組之有效負載區域中所編碼之多肽表現時，該啟動子視為有效的。

【0092】 在一個實施例中，啟動子為視為有效驅動調節聚核苷酸表現的啟動子。

【0093】 在一個實施例中，當啟動子驅動在所靶向之細胞中表現

時，該啟動子為視為有效之啟動子。

【0094】 在一個實施例中，啟動子驅動有效負載在標靶組織中表現一段時間。由啟動子驅動之表現可持續以下時段：1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、13小時、14小時、15小時、16小時、17小時、18小時、19小時、20小時、21小時、22小時、23小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1週、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2週、15天、16天、17天、18天、19天、20天、3週、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、1 個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、1年、13個月、14個月、15個月、16個月、17個月、18個月、19個月、20個月、21個月、22個月、23個月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或超過10年。表現可持續1-5小時、1-12小時、1-2天、1-5天、1-2週、1-3週、1-4週、1-2個月、1-4個月、1-6個月、2-6個月、3-6個月、3-9個月、4-8個月、6-12個月、1-2年、1-5年、2-5年、3-6年、3-8年、4-8年或5-10年。

【0095】 在一個實施例中，啟動子驅動有效負載表現持續至少1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50

年、55年、60年、65年或超過65年。

【0096】 啟動子可為天然存在的或非天然存在的。啟動子之非限制性實例包括病毒啟動子、植物啟動子及哺乳動物啟動子。在一些實施例中，啟動子可為人類啟動子。在一些實施例中，啟動子可為截短的。

【0097】 在大部分組織中驅動或促進表現的啟動子包括(但不限於)人類延長因子1 α -次單元(EF1 α)、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期強化子及/或啟動子、雞 β -肌動蛋白(CBA)及其衍生物CAG、 β 葡糖醛酸酶(GUSB)或泛素C (UBC)。組織特異性表現元件可用於限定表現為某些細胞型，諸如(但不限於)肌肉特異性啟動子、B細胞啟動子、單核球啟動子、白細胞啟動子、巨噬細胞啟動子、胰臟腺泡細胞啟動子、內皮細胞啟動子、肺組織啟動子、星形膠質細胞啟動子，或可用於限定表現為神經元、星形膠質細胞或寡樹突神經膠質細胞之神經系統啟動子。

【0098】 肌肉特異性啟動子之非限制性實例包括哺乳動物肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子、哺乳動物肌間線蛋白(DES)啟動子、哺乳動物肌鈣蛋白I (TNNT2)啟動子及哺乳動物骨架 α -肌動蛋白(ASKA)啟動子(參見例如美國專利公開案US 20110212529，該公開案之內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0099】 神經元之組織特異性表現元件之非限制性實例包括神經元特異性烯醇酶(NSE)、血小板源生長因子(PDGF)、血小板源生長因子B鏈(PDGF- β)、突觸蛋白(Syn)、甲基-CpG結合蛋白2 (MeCP2)、Ca²⁺/鈣調蛋白依賴性蛋白激酶II (CaMKII)、代謝型麩胺酸受體2 (mGluR2)、神經纖維絲輕鏈(NFL)或重鏈(NFH)、 β -血球蛋白小型基因n β 2、前腦啡肽原(PPE)、腦啡肽(Enk)及激動性胺基酸轉運體2 (EAAT2)啟動子。用於星形

膠質細胞之組織特異性表現元件之非限制性實例包括膠質原纖維酸性蛋白 (GFAP)及EAAT2啟動子。用於寡樹突神經膠質細胞之組織特異性表現元件的非限制性實例包括髓磷脂鹼性蛋白(MBP)啟動子。

【0100】 在一個實施例中，啟動子可小於1 kb。啟動子長度可為200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或超過800個核苷酸。啟動子之長度可在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800之間。

【0101】 在一個實施例中，啟動子可為相同或不同起始或親本啟動子中之兩種或超過兩種組分的組合，諸如(但不限於) CMV與CBA。各組分之長度可為200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800或超過800。各組分之長度可在200-300、200-400、200-500、200-600、200-700、200-800、300-400、300-500、300-600、300-700、300-800、

400-500、400-600、400-700、400-800、500-600、500-700、500-800、600-700、600-800或700-800之間。在一個實施例中，啟動子為382個核苷酸CMV強化子序列與260個核苷酸CBA啟動子序列之組合。

【0102】 在一個實施例中，病毒基因組包含普遍存在之啟動子。普遍存在的啟動子之非限制性實例包括CMV、CBA (包括衍生物CAG、CBh等)、EF-1 α 、PGK、UBC、GUSB (hGBp)及UCOE (HNRPA2B1-CBX3之啟動子)。

【0103】 Yu等人(Molecular Pain 2011, 7:63；該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中)評估在大鼠DRG細胞及初級DRG細胞中使用慢病毒載體在CAG、EF1 α 、PGK及UBC啟動子存在下的eGFP之表現，且發現UBC所展示之表現比其他3種啟動子弱且發現所有啟動子均僅存在10%至12%神經膠質表現。Soderblom等人(E. Neuro 2015；該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中)評估在注射至運動皮質之後，eGFP在具有CMV及UBC啟動子之AAV8中的表現及在具有CMV啟動子之AAV2中的表現。鼻內投與含有UBC或EF1 α 啟動子的質體顯示大於使用CMV啟動子的表現之持久呼吸道表現(參見例如Gill等人, Gene Therapy 2001, 第8卷, 1539-1546；該文獻的內容以全文引用之方式併入本文中)。Husain等人(Gene Therapy 2009；該文獻的內容以全文引用之方式併入本文中)評估具有hGUSB啟動子、HSV-1LAT啟動子及NSE啟動子的H β H構築體且發現H β H構築體在小鼠腦中所顯示之表現比NSE弱。Passini及Wolfe (J. Virol. 2001, 12382-12392，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中)評估H β H載體在心室內注射至新生小鼠之後的長期作用，且發現存在至少1年之持續表現。當使用NFL及NFH啟動子時，Xu等人(Gene Therapy 2001,

8, 1323-1332；該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中)發現所有腦區域中之表現低於CMV-lacZ、CMV-luc、EF、GFAP、hENK、nAChR、PPE、PPE + wpre、NSE (0.3 kb)、NSE (1.8 kb)及NSE (1.8 kb + wpre)。Xu等人發現啟動子活性依降序為NSE (1.8 kb)、EF、NSE (0.3 kb)、GFAP、CMV、hENK、PPE、NFL及NFH。NFL為650個核苷酸之啟動子且NFH為920個核苷酸之啟動子，此兩種啟動子在肝臟中均不存在，但NFH在感覺性本體感受性神經元、腦及脊髓中為豐裕的且NFH存在於心臟中。Scn8a為表現於整個DRG、脊髓及腦中的470個核苷酸之啟動子，其中在海馬體神經元及小腦浦金埃氏細胞(Purkinje cell)、皮質、丘腦及下丘腦中發現表現特別高(參見例如Drews等人, *Identification of evolutionary conserved, functional noncoding elements in the promoter region of the sodium channel gene SCN8A*, Mamm Genome (2007) 18:723-731；及Raymond等人, *Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel α -subunit genes*, *Journal of Biological Chemistry* (2004) 279(44) 46234-46241；該等文獻中之每一者的內容均以全文引用之方式併入本文中)。

【0104】 前 述Yu、Soderblom、Gill、Husain、Passini、Xu、Drews或Raymond教示之任一種啟動子均可用於本發明中。

【0105】 在一個實施例中，啟動子不具有細胞特異性。

【0106】 在一個實施例中，啟動子為泛素c (UBC)啟動子。UBC啟動子之尺寸可為300至350個核苷酸。作為非限制性實例，UBC啟動子為332個核苷酸。

【0107】 在一個實施例中，啟動子為 β -葡糖醛酸酶(GUSB)啟動

子。GUSB啟動子之尺寸可為350至400個核苷酸。作為非限制性實例，GUSB啟動子為378個核苷酸。

【0108】 在一個實施例中，啟動子為神經纖維絲輕鏈(NFL)啟動子。NFL啟動子之尺寸可為600至700個核苷酸。作為非限制性實例，NFL啟動子為650個核苷酸。作為非限制性實例，構築體可為AAV-啟動子-CMV/血球蛋白內含子-調節聚核苷酸-RBG，其中AAV可具有自互補性且AAV可具有DJ血清型。

【0109】 在一個實施例中，啟動子為神經纖維絲重鏈(NFH)啟動子。NFH啟動子之尺寸可為900至950個核苷酸。作為非限制性實例，NFH啟動子為920個核苷酸。作為非限制性實例，構築體可為AAV-啟動子-CMV/血球蛋白內含子-調節聚核苷酸-RBG，其中AAV可具有自互補性且AAV可具有DJ血清型。

【0110】 在一個實施例中，啟動子為scn8a啟動子。scn8a啟動子之尺寸可為450至500個核苷酸。作為非限制性實例，scn8a啟動子為470個核苷酸。作為非限制性實例，構築體可為AAV-啟動子-CMV/血球蛋白內含子-調節聚核苷酸-RBG，其中AAV可具有自互補性且AAV可具有DJ血清型。

【0111】 在一個實施例中，病毒基因組包含Pol III啟動子。

【0112】 在一個實施例中，病毒基因組包含P1啟動子。

【0113】 在一個實施例中，病毒基因組包含FXN啟動子。

【0114】 在一個實施例中，啟動子為磷酸甘油酸激酶1 (PGK)啟動子。

【0115】 在一個實施例中，啟動子為雞 β -肌動蛋白(CBA)啟動子。

【0116】 在一個實施例中，啟動子為CAG啟動子，該CAG啟動子為包含細胞巨大病毒(CMV)強化子與雞 β -肌動蛋白(CBA)啟動子融合的構築體。

【0117】 在一個實施例中，啟動子為細胞巨大病毒(CMV)啟動子。

【0118】 在一個實施例中，病毒基因組包含H1啟動子。

【0119】 在一個實施例中，病毒基因組包含U6啟動子。

【0120】 在一個實施例中，啟動子為肝臟或骨骼肌啟動子。肝臟啟動子之非限制性實例包括人類 α -1-抗胰蛋白酶(hAAT)及甲狀腺素結合球蛋白(TBG)。骨骼肌啟動子之非限制性實例包括肌間線蛋白、MCK或合成C5-12。

【0121】 在一個實施例中，啟動子為RNA pol III啟動子。作為非限制性實例，RNA pol III啟動子為U6。作為非限制性實例，RNA pol III啟動子為H1。

【0122】 在一個實施例中，病毒基因組包含兩個啟動子。作為非限制性實例，啟動子為EF1 α 啟動子及CMV啟動子。

【0123】 在一個實施例中，病毒基因組包含強化子元件、啟動子及/或5'UTR內含子。強化子元件，在本文中亦稱為「強化子」，可為(但不限於) CMV強化子，啟動子可為(但不限於) CMV、CBA、UBC、GUSB、NSE、突觸蛋白、MeCP2及GFAP啟動子且5'UTR/內含子可為(但不限於) SV40及CBA-MVM。作為非限制性實例，組合使用的強化子、啟動子及/或內含子可為：(1) CMV強化子、CMV啟動子、SV40 5'UTR內含子；(2) CMV強化子、CBA啟動子、SV 40 5'UTR內含子；(3) CMV強化子、CBA啟動子、CBA-MVM 5'UTR內含子；(4) UBC啟動子；(5) GUSB啟

動子；(6) NSE啟動子；(7)突觸蛋白啟動子；(8) MeCP2啟動子、(9) GFAP啟動子、(10) H1啟動子；及(11) U6啟動子。

【0124】 在一個實施例中，病毒基因組包含經工程改造之啟動子。

【0125】 在另一實施例中，病毒基因組包含來自天然表現之蛋白質的啟動子。

病毒基因組組分：非轉譯區域(UTR)

【0126】 根據定義，基因之野生型非轉譯區域(UTR)經轉錄，但不轉譯。一般而言，5' UTR起始於轉錄起始位點且結束於起始密碼子，而3' UTR緊隨終止密碼子之後起始且持續直至轉錄終止信號為止。

【0127】 典型地發現於經充分表現之特定靶器官基因中的特徵可經工程改造而進入UTR中以增強穩定性及蛋白質產量。作為非限制性實例，在本發明之AAV粒子的病毒基因組中可使用正常表現於肝臟中之mRNA的5' UTR (例如白蛋白、血清澱粉狀蛋白A、脂蛋白元A/B/E、轉鐵蛋白、 α 胎蛋白、紅血球生成素或因子VIII)以增強在肝細胞株或肝臟中之表現。

【0128】 雖然不希望受理論束縛，但野生型5'非轉譯區域(UTR)包括在轉譯起始中起作用之特徵。5' UTR中通常包括Kozak序列，Kozak序列通常已知涉及核糖體藉以引發許多基因之轉譯的過程。Kozak序列具有共同CCR(A/G)CCAUGG，其中R為起始密碼子(ATG)上游三個鹼基處之嘌呤(腺嘌呤或鳥嘌呤)，其之後為另一個『G』。

【0129】 在一個實施例中，病毒基因組中之5'UTR包括Kozak序列。

【0130】 在一個實施例中，病毒基因組中之5'UTR不包括Kozak序列。

【0131】 雖然不希望受理論束縛，但已知野生型3' UTR中嵌有腺苷及尿苷之片段。此等富AU標籤在周轉率較高之基因中尤其普遍。富AU元件(ARE)基於其序列特徵及功能特性可分成三類(Chen等人, 1995, 該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中): I類 ARE, 諸如(但不限於) c-Myc及MyoD, 在富U區域內含有若干個分散之AUUUA基元複本。II類 ARE, 諸如(但不限於) GM-CSF及TNF- α , 具有兩個或超過兩個重疊UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚體。III類AREs, 諸如(但不限於) c-Jun及成肌素, 定義不太明確。此等富U區域不含AUUUA基元。已知結合至ARE的大部分蛋白質使信使去穩定化, 而已記錄到ELAV家族成員(最顯著地, HuR)增加mRNA穩定性。HuR結合於所有三類ARE。將HuR特異性結合位點工程改造至核酸分子之3' UTR中將引起HuR結合, 且因此引起活體內訊息穩定。

【0132】 3' UTR富AU元件(ARE)之引入、移除或修飾可用於調節聚核苷酸之穩定性。在對特異性聚核苷酸(例如病毒基因組之有效負載區域)進行工程改造時, 可引入ARE之一或多個複本以降低聚核苷酸穩定性, 且藉此減少所得蛋白質之轉譯且減少其產量。同樣, 可鑑別出ARE且將其移除或使其突變以增加細胞內穩定性, 且因此增加所得蛋白質之轉譯及產量。

【0133】 在一個實施例中, 病毒基因組之3' UTR可包括用於模板化添加聚腺苷酸尾的寡聚(dT)序列。

【0134】 在一個實施例中, 病毒基因組可包括至少一個miRNA種子、結合位點或全序列。微RNA (或miRNA或miR)為19至25個核苷酸非編碼RNA, 其結合至核酸靶點且藉由降低核酸分子穩定性或藉由抑制轉

譯來下調基因表現。微RNA序列包含「種子」區域，亦即成熟微RNA之位置2-8區域中的序列，該序列相對於核酸之miRNA靶序列具有完美的沃森-克里克互補性(Watson-Crick complementarity)。

【0135】 在一個實施例中，病毒基因組可經工程改造以包括、改變或移除至少一個miRNA結合位點、序列或種子區域。

【0136】 來自此項技術中已知之任何基因的任何UTR可併入AAV粒子之病毒基因組中。此等UTR或其部分之置放取向可與在其所選自之基因中相同，或其取向或位置可變化。在一個實施例中，AAV粒子之病毒基因組中所用的UTR可倒轉、縮短、延長、經製備而具有此項技術中已知的一或多個其他5' UTR或3' UTR。如本文所用，在與UTR相關時，術語「改變」意謂UTR已以某種方式相對於參考序列變化。舉例而言，3'或5' UTR可如上文所教示根據取向或位置的變化而相對於野生型或原生UTR發生改變，或可藉由包括額外核苷酸、核苷酸缺失、核苷酸交換或轉位而發生改變。

【0137】 在一個實施例中，AAV粒子之病毒基因組包含至少一個人工UTR，該等UTR並非野生型UTR之變異體。

【0138】 在一個實施例中，AAV粒子之病毒基因組包含已選自轉錄物家族之UTR，該等轉錄物之蛋白質共有共同的功能、結構、特徵或特性。

病毒基因組組分：聚腺苷酸化序列

【0139】 在一個實施例中，本發明之AAV粒子的病毒基因組包含至少一個聚腺苷酸化序列。AAV粒子之病毒基因組可包含位於有效負載編碼序列之3'端與3'ITR之5'端之間的聚腺苷酸化序列。

【0140】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列或「polyA序列」之長度可在不存在至約500個核苷酸之範圍內。聚腺苷酸化序列之長度可為(但不限於) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、

273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、
285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、
297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、
309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、
321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、
333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、
345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、
357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、
369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、
381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、
393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、
405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、
417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、
429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、
441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、
453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、
465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、
477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、
489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499及500個
核苷酸。

【0141】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為50至100個核苷酸。

【0142】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為50至150個核苷

酸。

【0143】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為50至160個核苷

酸。

【0144】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為50至200個核苷

酸。

【0145】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為60至100個核苷

酸。

【0146】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為60至150個核苷

酸。

【0147】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為60至160個核苷

酸。

【0148】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為60至200個核苷

酸。

【0149】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為70至100個核苷

酸。

【0150】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為70至150個核苷

酸。

【0151】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為70至160個核苷

酸。

【0152】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為70至200個核苷

酸。

【0153】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為80至100個核苷

酸。

【0154】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為80至150個核苷酸。

【0155】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為80至160個核苷酸。

【0156】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為80至200個核苷酸。

【0157】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為90至100個核苷酸。

【0158】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為90至150個核苷酸。

【0159】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為90至160個核苷酸。

【0160】 在一個實施例中，聚腺苷酸化序列長度為90至200個核苷酸。

【0161】 在一個實施例中，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之聚腺苷酸化序列上游。另外，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之具有SV40內含子或人類 β 血球蛋白內含子之啟動子下游，啟動子諸如(但不限於) CMV、U6、CAG、CBA或CBA啟動子。作為非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超過30個核苷酸內。作為另一非限制性實例，

AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30個核苷酸內。作為非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超過25%核苷酸內。作為另一非限制性實例，AAV粒子包含編碼siRNA分子之核酸序列，該核酸序列可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%內。

【0162】 在一個實施例中，AAV粒子包含兔血球蛋白聚腺苷酸化(polyA)信號序列。

【0163】 在一個實施例中，AAV粒子包含人類生長激素聚腺苷酸化(polyA)信號序列。

病毒基因組組分：內含子

【0164】 在一個實施例中，有效負載區域包含至少一個增強表現之元件，諸如一或多個內含子或其部分。內含子之非限制性實例包括MVM (67-97 bps)、F.IX截短之內含子1 (300 bps)、 β -血球蛋白SD/免疫球蛋白重鏈剪接受體(250 bps)、腺病毒剪接供體/免疫球蛋白剪接受體(500 bps)、SV40晚期剪接供體/剪接受體(19S/16S) (180 bps)及雜交腺病毒剪接供體/IgG剪接受體(230 bps)。

【0165】 在一個實施例中，內含子或內含子部分長度可為100至500個核苷酸。內含子之長度可為80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500。內含子之長度可介於80-100、80-120、80-140、80-160、80-180、80-200、80-250、80-300、80-350、80-400、80-450、80-500、200-300、200-400、200-500、300-400、300-500或400-500之間。

【0166】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含啟動子，諸如(但不限於) CMV或U6。作為非限制性實例，包含本發明之siRNA分子的核酸序列的AAV之啟動子為CMV啟動子。作為另一非限制性實例，包含本發明之siRNA分子的核酸序列的AAV之啟動子為U6啟動子。

【0167】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含CMV啟動子。

【0168】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含U6啟動子。

【0169】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含CMV及U6啟動子。

【0170】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含H1啟動子。

【0171】 在一個實施例中，AAV病毒基因組可包含CBA啟動子。

【0172】 在一個實施例中，所編碼的siRNA分子可位於表現載體中之具有內含子(諸如SV40或此項技術中已知的其他內含子)的啟動子下游，啟動子諸如(但不限於) CMV、U6、H1、CBA、CAG或CBA啟動子。另外，所編碼的siRNA分子亦可位於表現載體中之聚腺苷酸化序列上

游。作為非限制性實例，所編碼的siRNA分子可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或超過30個核苷酸內。作為另一非限制性實例，所編碼的siRNA分子可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的1-5、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、5-10、5-15、5-20、5-25、5-30、10-15、10-20、10-25、10-30、15-20、15-25、15-30、20-25、20-30或25-30個核苷酸內。作為非限制性實例，所編碼的siRNA分子可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的前1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或超過25%核苷酸內。作為另一非限制性實例，所編碼的siRNA分子可位於表現載體中之啟動子下游及/或聚腺苷酸化序列上游的前1-5%、1-10%、1-15%、1-20%、1-25%、5-10%、5-15%、5-20%、5-25%、10-15%、10-20%、10-25%、15-20%、15-25%或20-25%內。

病毒基因組組分：填充序列

【0173】 在一個實施例中，病毒基因組包含一或多個填充序列。

【0174】 在一個實施例中，病毒基因組包含一或多個填充序列以便使病毒基因組之長度為最佳的封裝尺寸。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列以便使病毒基因組之長度為約2.3 kb。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列以便使病毒基因組之長度為約4.6 kb。

【0175】 在一個實施例中，病毒基因組包含一或多個填充序列以便降低載體基因組(例如本文所述之調節聚核苷酸)之髮夾結構可在表現及/或

封裝期間以反向末端重複序列(ITR)形式讀取的可能性。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列以便使病毒基因組之長度為約2.3 kb。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列以便使病毒基因組之長度為約4.6 kb。

【0176】 在一個實施例中，病毒基因組為單股(ss)病毒基因組且包含一或多個填充序列，該等填充序列之長度約介於0.1 kb-3.8 kb之間，諸如(但不限於) 0.1 kb、0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、1 kb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb、1.5 kb、1.6 kb、1.7 kb、1.8 kb、1.9 kb、2 kb、2.1 kb、2.2 kb、2.3 kb、2.4 kb、2.5 kb、2.6 kb、2.7 kb、2.8 kb、2.9 kb、3 kb、3.1 kb、3.2 kb、3.3 kb、3.4 kb、3.5 kb、3.6 kb、3.7 kb或3.8 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為3.1 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為2.7 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為0.8 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為0.4 kb。作為非限制性實例，載體基因組中各填充序列之長度為0.8 kb。作為非限制性實例，載體基因組中各填充序列之長度為0.4 kb。

【0177】 在一個實施例中，病毒基因組為自互補(sc)病毒基因組且包含一或多個填充序列，該等填充序列之長度約介於0.1 kb-1.5 kb之間，諸如(但不限於) 0.1 kb、0.2 kb、0.3 kb、0.4 kb、0.5 kb、0.6 kb、0.7 kb、0.8 kb、0.9 kb、1 kb、1.1 kb、1.2 kb、1.3 kb、1.4 kb或1.5 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為0.8 kb。作為非限制性實例，載體基因組中之填充序列總長度為0.4 kb。作為非限制性實例，載體基因組中各填充序列之長度為0.8 kb。作為非限制性實例，載體基因

組中各填充序列之長度為0.4 kb。

【0178】 在一個實施例中，病毒基因組包含填充序列之任何部分。病毒基因組可包含填充序列之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

【0179】 在一個實施例中，病毒基因組為單股(ss)病毒基因組且包含一或多個填充序列以便使病毒基因組之長度為約4.6 kb。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於5' ITR序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於啟動子序列之5'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於3' ITR序列之5'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於兩個內含子序列之間。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於內含子序列內。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於5' ITR序列之3'位且第二填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於啟動子序列之5'位且第二填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於5' ITR序列之3'位且第二填充序列位於5' ITR序列之5'位。

【0180】 在一個實施例中，病毒基因組為自互補(sc)病毒基因組且包含一或多個填充序列以便使病毒基因組之長度為約2.3 kb。作為非限制

性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於5' ITR序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於啟動子序列之5'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於3' ITR序列之5'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於兩個內含子序列之間。作為非限制性實例，病毒基因組包含至少一個填充序列，且該填充序列位於內含子序列內。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於5' ITR序列之3'位且第二填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於啟動子序列之5'位且第二填充序列位於聚腺苷酸化信號序列之3'位。作為非限制性實例，病毒基因組包含兩個填充序列，且第一填充序列位於5' ITR序列之3'位且第二填充序列位於5' ITR序列之5'位。

【0181】 在一個實施例中，病毒基因組可包含處於病毒基因組之一或多個區域之間的一或多個填充序列。在一個實施例中，填充區域可位於諸如(但不限於)以下之區域之前：有效負載區域、反向末端重複序列(ITR)、啟動子區域、內含子區域、強化子區域、聚腺苷酸化信號序列區域及/或外顯子區域。在一個實施例中，填充區域可位於諸如(但不限於)以下之區域之後：有效負載區域、反向末端重複序列(ITR)、啟動子區域、內含子區域、強化子區域、聚腺苷酸化信號序列區域及/或外顯子區域。在一個實施例中，填充區域可位於諸如(但不限於)以下之區域之前及之後：有效負載區域、反向末端重複序列(ITR)、啟動子區域、內含子區

域、強化子區域、聚腺苷酸化信號序列區域及/或外顯子區域。

【0182】 在一個實施例中，病毒基因組可包含一或多個將病毒基因組之至少一個區域分開的填充序列。病毒基因組的分開之區域可包含位於填充序列區域之5'位的該區域之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之10%位於填充序列之5'位且該區域之90%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之20%位於填充序列之5'位且該區域之80%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之30%位於填充序列之5'位且該區域之70%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之40%位於填充序列之5'位且該區域之60%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之50%位於填充序列之5'位且該區域之50%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之60%位於填充序列之5'位且該區域之40%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之70%位於填充序列之5'位且該區域之30%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之80%位於填充序列之5'位且該區域之20%位於填充序列之3'位。作為非限制性實例，填充序列可將至少一個區域分開，以使得該區域之90%位於填充序列之5'位且該區域之10%位於填充序列之3'位。

【0183】 在一個實施例中，病毒基因組包含處於5' ITR之後的填充序列。

【0184】 在一個實施例中，病毒基因組包含處於啟動子區域之後的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於有效負載區域之後的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於內含子區域之後的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於強化子區域之後的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於聚腺苷酸化信號序列區域之後的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於外顯子區域之後的填充序列。

【0185】 在一個實施例中，病毒基因組包含處於啟動子區域之前的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於有效負載區域之前的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於內含子區域之前的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於強化子區域之前的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於聚腺苷酸化信號序列區域之前的填充序列。在一個實施例中，病毒基因組包含處於外顯子區域之前的填充序列。

【0186】 在一個實施例中，病毒基因組包含處於3' ITR之前的填充序列。

【0187】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於) 5' ITR與啟動子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於) 5' ITR與有效負載區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於) 5' ITR與內含子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)

5' ITR與強化子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於) 5' ITR與聚腺苷酸化信號序列區域之間。

【0188】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於) 5' ITR與外顯子區域之間。

【0189】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與有效負載區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與內含子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與強化子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與聚腺苷酸化信號序列區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與外顯子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)啟動子區域與3' ITR之間。

【0190】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)有效負載區域與內含子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)有效負載區域與強化子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)有效負載區域與聚腺苷酸化信號序列區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)有效負載區域與外顯子區域之間。

【0191】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)有效負載區域與3' ITR之間。

【0192】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)內含子區域與強化子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位

於兩個區域之間，諸如(但不限於)內含子區域與聚腺苷酸化信號序列區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)內含子區域與外顯子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)內含子區域與3' ITR之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)強化子區域與聚腺苷酸化信號序列區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)強化子區域與外顯子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)強化子區域與3' ITR之間。

【0193】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)聚腺苷酸化信號序列區域與外顯子區域之間。在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)聚腺苷酸化信號序列區域與3' ITR之間。

【0194】 在一個實施例中，填充序列可位於兩個區域之間，諸如(但不限於)外顯子區域與3' ITR之間。

本發明之有效負載

【0195】 本發明之AAV粒子包含至少一個有效負載區域。如本文所用，「有效負載」或「有效負載區域」係指由病毒基因組編碼或在其內部編碼之一或多個聚核苷酸或聚核苷酸區域、或此類聚核苷酸或聚核苷酸區域之表現產物，例如轉殖基因(一種編碼多肽或多元多肽之聚核苷酸)或調節性核酸或調控性核酸。本發明之有效負載通常編碼調節聚核苷酸或其片段或變異體。

【0196】 有效負載區域可以一定方式構築以反映與天然mRNA組織相似或與其成鏡像之區域。

【0197】 有效負載區域可包含編碼及非編碼核酸序列之組合。

【0198】 在一些實施例中，AAV有效負載區域可對編碼或非編碼RNA進行編碼。

【0199】 在一個實施例中，AAV粒子包含具有包含編碼siRNA、miRNA或其他RNAi劑之核酸序列之有效負載區域的病毒基因組。在此類實施例中，編碼超過一種多肽之病毒基因組可複製且封裝於病毒粒子中。經病毒粒子轉導的靶細胞可在單個細胞內部表現經編碼之siRNA、miRNA或其他RNAi劑。

調節聚核苷酸

【0200】 在一個實施例中，調節聚核苷酸，例如RNA或DNA分子，可用於治療神經退化性疾病，尤其肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)。如本文所用，「調節聚核苷酸」為用以調節(增加或降低)靶基因之水準或量，例如mRNA或蛋白質水準的任何核酸序列。

【0201】 在一個實施例中，調節聚核苷酸可包含至少一種編碼至少一個siRNA分子之核酸序列。若存在超過一種，則核酸可獨立地編碼1、2、3、4、5、6、7、8、9或超過9個siRNA分子。

【0202】 在一個實施例中，分子骨架可位於CMV啟動子、其片段或變異體下游。

【0203】 在一個實施例中，分子骨架可位於CBA啟動子、其片段或變異體下游。

【0204】 在一個實施例中，分子骨架可為位於CMV啟動子之下游之天然pri-miRNA骨架。作為非限制性實例，天然pri-miRNA骨架衍生自人類miR155骨架。

【0205】 在一個實施例中，分子骨架可為位於CBA啟動子之下游之天然pri-miRNA骨架。

【0206】 在一個實施例中，分子骨架及調節聚核苷酸之選擇係藉由一種比較pri-miRNA中之調節聚核苷酸的方法確定(參見例如由Minarikova等人 *Design, Characterization, and Lead Selection of Therapeutic miRNAs Targeting Huntingtin for Development of Gene Therapy for Huntington's Disease*. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* (2016) 5, e297及國際公開案第WO2016102664號所述之方法；該等文獻中之每一者的內容以全文引用之方式併入本文中)。為評估調節聚核苷酸之活性，可使用的所用分子骨架為人類pri-miRNA骨架(例如miR155骨架)且啟動子可為CMV。可使用HEK293T細胞及報導基因(例如螢光素酶)活體外測定活性。

【0207】 為評估調節聚核苷酸之最佳分子骨架，調節聚核苷酸用於CAG啟動子之pri-miRNA骨架。構築體經50 ng之報導基因(例如螢光素酶報導基因)共轉染。在50 ng共轉染下具有超過80%基因減弱之構築體視為高效的。在一個態樣中，具有強引導股活性之構築體係較佳的。分子骨架可在HEK293T細胞中藉由NGS處理以測定引導-隨從比率及處理變化。

【0208】 為評估活體內分子骨架及調節聚核苷酸，包含調節聚核苷酸之分子骨架封裝於AAV中(例如，血清型可為AAV5 (參見例如WO2015060722中所述之方法及構築體，該文獻的內容以全文引用之方式併入本文中))，且向活體內模型投與，且引導-隨從比率、5'及3'端加工、引導與隨從股之比率及基因減弱可在模型之不同區域(例如組織區域)中測定。

【0209】 在一個實施例中，分子骨架及調節聚核苷酸之選擇係藉由比較天然pri-miRNA及合成pri-miRNA中之調節聚核苷酸的方法確定。調節聚核苷酸可但其不限於靶向除外顯子1外之外顯子。為評估調節聚核苷酸之活性，藉由CBA啟動子使用分子骨架。在一個態樣中，活性可使用HEK293T細胞、海拉細胞(HeLa cell)及報導基因(例如螢光素酶)活體外測定，且基因減弱高效調節聚核苷酸在測試細胞中顯示至少80%的SOD1基因減弱。另外，視為最高效之調節聚核苷酸顯示較低至不顯著隨從股(p股)活性。在另一態樣中，內源性SOD1基因減弱功效係藉由使用HEK293T細胞、海拉細胞及報導基因活體外轉染而評估。高效調節聚核苷酸顯示超過50%的內源性SOD1基因減弱。在又一態樣中，內源性SOD1基因減弱係藉由感染(例如AAV2)在不同細胞型(例如來自ALS患者之HEK293、海拉、初級星形膠質細胞、U251星形膠質細胞、SH-SY5Y神經元細胞及纖維母細胞)中評估。高效調節聚核苷酸顯示超過60%的內源性SOD1基因減弱。

【0210】 為了評估活體內分子骨架及調節聚核苷酸，包含調節聚核苷酸之分子骨架封裝於AAV中，且向活體內模型投與，且引導-隨從比率、5'及3'端加工、引導與隨從股之比率及基因減弱可在模型之不同區域(例如組織區域)中測定。分子骨架可自活體內樣本中藉由NGS處理以測定引導-隨從比率及處理變化。

【0211】 在一個實施例中，調節聚核苷酸係使用以下特性中之至少一者設計：環變異體、種子失配/凸出/擺動變異體、莖失配、環變異體及附屬(vassal)莖失配變異體、種子失配及基部莖失配變異體、莖失配及基部莖失配變異體、種子擺動及基部莖擺動變異體或莖序列變異體。

【0212】 本發明在某種程度上係關於用於治療神經退化病症的RNA干擾(RNAi)誘導之基因表現的抑制。提供靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA。此類siRNA雙螺旋體或dsRNA可使細胞，例如運動神經元中之SOD1基因表現緘默化，由此改善ALS之症狀，諸如運動神經死亡及肌肉萎縮。SOD1 siRNA可編碼於重組AAV載體之聚核苷酸中。

【0213】 靶向特異性mRNA之siRNA雙螺旋體或dsRNA可設計且合成為活體外靶SOD1靶向聚核苷酸之部分且引入至細胞中以活化RNAi過程。

siRNA分子

【0214】 本發明係關於用於治療神經退化性病症的RNA干擾(RNAi)誘導之基因表現的抑制。本文提供siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA，其靶向相關基因(本文所提及統稱為「siRNA分子」)。該等siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA可使細胞(諸如(但不限於)中型多棘神經元、皮質神經元及/或星形膠質細胞)中之基因表現減少或緘默化。

【0215】 RNAi (亦稱為轉錄後基因緘默化(PTGS)、壓制或共抑制)為轉錄後基因緘默化方法，其中RNA分子以序列特異性方式抑制基因表現，通常藉由使特異性mRNA分子受到破壞。RNAi之活性組分為短/小雙股RNA (dsRNA)，稱為小干擾RNA (siRNA)，其通常含有15至30個核苷酸(例如19至25、19至24或19至21個核苷酸)及2個核苷酸3'突出端，且其匹配靶基因之核酸序列。此等短RNA物種可藉由切丁酶(Dicer)介導之較大dsRNA的裂解而在活體內天然產生，且其在哺乳動物細胞中具功能性。

【0216】 天然表現之小RNA分子，命名為微RNA (miRNA)，藉由

調控mRNA之表現誘發基因緘默化。含有miRNA之RNA誘導型緘默化複合體(RNA Induced Silencing Complex ; RISC)靶向表現與miRNA之5'區域(其稱為種子區域)中之核苷酸2-7完美序列互補的mRNA，且其他鹼基對與其3'區域互補。miRNA介導的基因表現之下調可由靶mRNA之裂解、靶mRNA之轉譯抑制或mRNA衰變引起。miRNA靶向序列通常位於靶mRNA之3'-UTR中。單個miRNA可靶向超過100個來自各種基因之轉錄物，且一個mRNA可由不同miRNA靶向。

【0217】 靶向特異性mRNA之siRNA雙螺旋體或dsRNA可在活體外設計及合成，且引入細胞中用於活化RNAi過程。Elbashir等人證明21-核苷酸siRNA雙螺旋體(稱為小干擾RNA)能夠在哺乳動物細胞中實現有效及特異性基因之基因減弱而不誘導免疫反應(Elbashir SM等人, *Nature*, 2001, 411, 494-498)。自此初始報導以來，藉由siRNA進行之轉錄後基因緘默化作為用於哺乳動物細胞中遺傳分析之有效工具迅速出現，且具有產生新穎治療劑之潛力。

【0218】 經設計以靶向編碼聚麩醯胺酸重複蛋白(其引起聚麩醯胺酸擴展疾病，諸如亨廷頓氏病(Huntington's Disease))之核酸序列的RNAi分子描述於美國專利第9,169,483號及第9,181,544號及國際專利公開案第WO2015179525號中，該等文獻中之每一者的內容以全文引用之方式併入本文中。美國專利第9,169,483號及第9,181,544號及國際專利公開案第WO2015179525號各自提供包含RNA之第一股(例如15個連續核苷酸)及RNA之第二股(例如與至少12個第一股之連續核苷酸互補)的分離RNA雙螺旋體，其中RNA雙螺旋體之長度為約15至30個鹼基對。RNA之第一股及RNA之第二股可操作地藉由RNA環(約4至50個核苷酸)連接以形成髮夾

結構，其可插入表現卡匣中。環部分之非限制性實例包括美國專利第9,169,483號之SEQ ID NO: 9至SEQ ID NO: 14，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。可用於形成RNA雙螺旋體的RNA之股(全序列或序列之一部分)之非限制性實例包括美國專利第9,169,483號之SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 8及美國專利第9,181,544號之SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 33至SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 208至SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 213至SEQ ID NO: 215及SEQ ID NO: 218至SEQ ID NO: 221，該等專利其中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。RNAi分子之非限制性實例包括美國專利第9,169,483號之SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 8、美國專利第9,181,544號之SEQ ID NO: 1至SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 33至SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 208至SEQ ID NO: 210、SEQ ID NO: 213至SEQ ID NO: 215及SEQ ID NO: 218至SEQ ID NO: 221及國際專利公開案第WO2015179525號之SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 35至SEQ ID NO: 38，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0219】 活體外合成之siRNA分子可引入細胞中以活化RNAi。在其引入細胞中時，類似於內源性dsRNA的外源性siRNA雙螺旋體可經組裝以形成RNA誘導緘默化複合體(RISC)，即與RNA序列(其與siRNA雙螺旋體之兩股中之一者(亦即反義股)互補)相互作用的多單元複合體。在過程期間，siRNA之有義股(或隨從股)自複合體丟失，而siRNA之反義股(或引導股)與其互補去氧核酸匹配。特定言之，含有RISC複合體之siRNA之靶為表現完美序列互補的mRNA。隨後，siRNA介導之基因緘默化藉由裂解、釋放及降解靶而出現。

【0220】 siRNA雙螺旋體包含與靶mRNA同源之有義股，且與靶mRNA互補之反義股提供在靶RNA破壞效率方面與使用單股(ss)-siRNA(例如，反義股RNA或反義寡核苷酸)相比要多得多的優點。在多數情況下，需要較高濃度之ss-siRNA以達成對應雙螺旋體之有效基因緘默化效能。

【0221】 前述分子中之任一者可由病毒基因組編碼。

靶向相關基因之siRNA雙螺旋體之設計及序列

【0222】 本發明提供小干擾RNA (siRNA)雙螺旋體(及編碼其之調節聚核苷酸)，其靶向mRNA以干擾基因表現及/或蛋白產生。

【0223】 本發明之經編碼之siRNA雙螺旋體含有雜交在一起形成雙螺旋結構的反義股及有義股，其中反義股與靶向基因之核酸序列互補，且其中有義股與靶向基因之核酸序列同源。在一些態樣中，反義股之5'端具有5'磷酸酯基，且有義股之3'端含有3'羥基。在其他態樣中，在各股之3'端無、有一個或2個核苷酸突出端。

【0224】 一些設計siRNA之準則已在此項技術中提出。此等準則通常建議產生靶向欲緘默基因中一個區域的19-核苷酸雙螺旋區域、對稱2至3個核苷酸3'突出端、5'-磷酸酯基及3'-羥基。可控管siRNA序列偏好之其他規則包括(但不限於)：(i) A/U在反義股之5'端；(ii) G/C在有義股之5'端；(iii) 至少五個A/U殘基在反義股之5'末端三分之一；及(iv) 不存在任何超過9個核苷酸長度之GC段。根據該考慮，連同靶基因之特異性序列，可輕易設計對於抑制哺乳動物靶基因表現所必需的高效siRNA分子。

【0225】 根據本發明，設計靶向相關基因之siRNA分子(例如siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA)。該等siRNA分子可特異性地抑制基因表現

及蛋白產生。在一些態樣中，siRNA分子經設計且用於選擇性地「基因剔除」細胞中之基因變異體，亦即，突變轉錄物。在一些態樣中，siRNA分子經設計且用於選擇性地「基因減弱」細胞中之基因變異體。在其他態樣中，siRNA分子能夠抑制或遏制相關基因之野生型及突變型兩者。

【0226】 在一個實施例中，本發明之siRNA分子包含有義股及互補反義股，其中兩個股雜交在一起以形成雙螺旋結構。反義股與靶mRNA序列具有足夠的互補性以引導靶特異性RNAi，亦即，siRNA分子具有足以藉由RNAi機制或過程觸發靶mRNA之破壞的序列。

【0227】 在一個實施例中，本發明之siRNA分子包含有義股及互補反義股，其中兩個股雜交在一起以形成雙螺旋結構，且其中雜交至mRNA之起始位點在靶mRNA序列上之核苷酸10與1000之間。作為非限制性實例，起始位點可在靶mRNA序列上之核苷酸10-20、20-30、30-40、40-50、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000之間。作為又一非限制性實例，起始位點可為靶mRNA序列上之核苷酸10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、

111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、
123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、
135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、
147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、
159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、
171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、
183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、
195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、
207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、
219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、
231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、
243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、
255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、
267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、
279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、
291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、
303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、
315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、
327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、
339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、
351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、
363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、
375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、

387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、
399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、
411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、
423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、
435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、
447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、
459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、
471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、
483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、
495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、
507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、
519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、
531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、
543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、
555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、
567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、
579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、
591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、
603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、
615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、
627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、
639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、
651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、

663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、
675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、
687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、
699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、
711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、
723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、
735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、
747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、
759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、
771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、
783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、
795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、805、806、
807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、
819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、
831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、
843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、
855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、
867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、
879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、
891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、901、902、
903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、
915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、
927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、

939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、
951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、
963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、
975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、
987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、
999及1000。

【0228】 在一些實施例中，反義股與靶mRNA序列100%互補。反義股可與靶mRNA序列之任何部分互補。

【0229】 在其他實施例中，反義股與靶mRNA序列包含至少一個失配。作為非限制性實例，反義股與靶mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%互補性。

【0230】 在一個實施例中，siRNA或dsRNA包括至少兩個彼此互補的序列。

【0231】 根據本發明，siRNA分子長度為約10至50或大於50個核苷酸，亦即各股包含10至50個核苷酸(或核苷酸類似物)。較佳地，siRNA分

子在各股中長度為約15至30個，例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個核苷酸，其中各股中之一者與靶區域充分互補。在一個實施例中，siRNA分子之各股之長度為約19至25、19至24或19至21個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為19個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為20個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為21個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為22個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為23個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為24個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為25個核苷酸。

【0232】 在一些實施例中，本發明之siRNA分子可為包含約19個核苷酸至約25個核苷酸及3'端之兩個突出核苷酸的合成RNA雙螺旋體。在一些態樣中，siRNA分子可為未經修飾之RNA分子。在其他態樣中，siRNA分子可含有至少一個經修飾之核苷酸，諸如鹼基、糖或主鏈修飾。

【0233】 在一個實施例中，本發明之siRNA分子可包含反義序列及有義序列或其片段或變異體。作為非限制性實例，反義序列與有義序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-

90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%互補性。

【0234】 在其他實施例中，本發明之siRNA分子可編碼於質體載體、AAV粒子、病毒基因組或其他核酸表現載體中以遞送至細胞。

【0235】 DNA表現質體可用於在細胞中穩定地表現本發明之siRNA雙螺旋體或dsRNA且達成靶基因表現之長期抑制。在一個態樣中，siRNA雙螺旋體之有義股及反義股典型地藉由短間隔序列連接，使得表現稱為短髮夾RNA (shRNA)之莖環結構。髮夾係藉由切丁酶識別且裂解，由此產生成熟siRNA分子。

【0236】 根據本發明，產生包含編碼靶向mRNA之siRNA分子的核酸之AAV粒子，AAV血清型可為本文中所列出之血清型中的任一種。AAV血清型之非限制性實例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A、AAV-PHP.B、AAVPHP.B2、AAVPHP.B3、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、

AAVG2B5及其變異體。

【0237】 在一些實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解)靶mRNA。因此，siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA可用於實質上抑制細胞，例如神經元中之基因表現。在一些態樣中，抑制基因表現係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-45%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、35-45%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-65%、57-68%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、85-99%、90-95%、90-100%或95-100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、

79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-45%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、35-45%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-65%、57-68%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、85-99%、90-95%、90-100%或95-100%。作為非限制性實例，抑制可呈30-40%。作為非限制性實例，抑制可呈30-45%。作為非限制性實例，抑制可呈35-45%。作為非限制性實例，抑制可呈超過50%。作為非限制性實例，抑制可呈50-60%。作為非限制性實例，抑制可呈超過60%。作為非限制性實例，抑制可呈55-65%。作為非限制性實例，抑制可呈57-68%。作為非限制性實例，抑制可呈70-80%。作為非限制性實例，抑制可呈85-99%。作為非限制性實例，抑制可呈35%。作為非限制性實例，抑制可呈36%。作為非限制性實例，抑制可呈40%。作為非限制性實例，抑制可呈41%。作為非限制性實例，抑制可呈43%。作為非限制性實例，抑制可呈45%。作為非限制性實例，抑制可呈49%。作為非限制性實例，抑制可呈62%。作為非限制性實例，抑制可呈64%。作為非限制性實例，抑制可呈74%。作為非限制性實例，抑制可呈77%。作為非限制性實例，抑制可呈84%。作為非限制性實例，抑制可呈87%。作為非限制性實例，抑制可呈95%。作為非限制性實例，抑制可呈99%。作為非限制性實例，抑制可呈100%。

【0238】 在一個實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解)脊髓運動神經元中之靶mRNA。在一些態樣中，抑制基因表現係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-45%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、35-45%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-65%、57-68%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、85-99%、90-95%、90-100%或95-100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%、99%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-

80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-45%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、35-45%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、55-65%、57-68%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、85-99%、90-95%、90-100%或95-100%。作為非限制性實例，抑制可呈30-45%。作為非限制性實例，抑制可呈35-45%。作為非限制性實例，抑制可呈超過50%。作為非限制性實例，抑制可呈超過60%。作為非限制性實例，抑制可呈50-60%。作為非限制性實例，抑制可呈55-65%。作為非限制性實例，抑制可呈57-68%。作為非限制性實例，抑制可呈70-80%。作為非限制性實例，抑制可呈85-99%。作為非限制性實例，抑制可呈35%。作為非限制性實例，抑制可呈36%。作為非限制性實例，抑制可呈40%。作為非限制性實例，抑制可呈41%。作為非限制性實例，抑制可呈43%。作為非限制性實例，抑制可呈45%。作為非限制性實例，抑制可呈49%。作為非限制性實例，抑制可呈62%。作為非限制性實例，抑制可呈64%。作為非限制性實例，抑制可呈74%。作為非限制性實例，抑制可呈77%。作為非限制性實例，抑制可呈84%。作為非限制性實例，抑制可呈87%。作為非限制性實例，抑制可呈95%。作為非限制性實例，抑制可呈99%。作為非限制性實例，抑制可呈100%。

【0239】 在一個實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解)脊髓運動神經元中之靶mRNA 78%。

【0240】 在一個實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之

dsRNA抑制(或降解)脊髓運動神經元中之靶mRNA 45-55%。

【0241】 在一個實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解)運動神經元形態之vg+細胞中之靶mRNA。在一些態樣中，抑制基因表現係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、95%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、45-50%、45-55%、50-

60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

【0242】 在一個實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解)運動神經元形態之vg+細胞中之靶mRNA 53%。

【0243】 在一個實施例中，siRNA分子包含位於引導股中之靶的miRNA種子匹配(seed match)。在另一實施例中，siRNA分子包含位於隨從股中之靶的miRNA種子匹配。在又一實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA不包含位於引導或隨從股中的靶之種子匹配。

【0244】 在一個實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導股可幾乎無顯著全長脫靶作用。在另一實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於隨從股可幾乎無顯著全長脫靶作用。靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於隨從股可具有低於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全長脫靶作用。在又一實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導股或隨從股可幾乎無顯著全長脫靶作用。靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導或隨從股可具有低於1%、2%、3%、4%、5%、6%、

7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全長脫靶作用。

【0245】 在一個實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA在活體外可具有高活性。在另一實施例中，siRNA分子在活體外可具有低活性。在又一實施例中，靶向相關基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA在活體外可具有高引導股活性及低隨從股活性。

【0246】 在一個實施例中，siRNA分子在活體外具有高引導股活性及低隨從股活性。藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)可為至少40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。藉由引導股實現之靶基因減弱可呈40-50%、45-50%、50-55%、50-60%、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作為非限制性實例，藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)大於70%。作為非限制性實例，藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)

大於60%。

【0247】 在一個實施例中，設計siRNA雙螺旋體，使得不存在有義或反義序列至非相關基因序列之miRNA種子匹配。

【0248】 在一個實施例中，針對最近脫靶的引導股之 IC_{50} 大於針對中靶基因的引導股之 IC_{50} 的100倍。作為非限制性實例，若針對最近脫靶的引導股之 IC_{50} 大於針對靶的引導股之 IC_{50} 的100倍，則稱siRNA分子在活體外具有抑制相關基因之高引導股選擇率。

【0249】 在一個實施例中，引導股之5'加工在5'端處具有以下正確開始(correct start) (n)：活體外或活體內時間之至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少99%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少99%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少90%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少90%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少85%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少85%。

【0250】 在一個實施例中，活體外或活體內所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、

4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、
 5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、
 6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、
 8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、
 9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、
 10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、
 20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、
 65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。引導與隨從
 比率係指在細胞內加工初級微RNA之後引導股與隨從股之比率。舉例而
 言，80:20引導與隨從比率將在由前驅體加工的每2個隨從股中具有8個引
 導股。作為非限制性實例，活體外引導股與隨從股比率為8:2。作為非限
 制性實例，活體內引導股與隨從股比率為8:2。作為非限制性實例，活體
 外引導股與隨從股比率為9:1。作為非限制性實例，活體內引導股與隨從
 股比率為9:1。

【0251】 在一個實施例中，引導與隨從(G:P)股比率在1-99、1.3-
 99、5-99、10-99、15-99、20-99、25-99、30-99、35-99、40-99、45-
 99、50-99、55-99、60-99、65-99、70-99、75-99、80-99、85-99、90-
 99、95-99、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、1-35、1-40、1-45、1-
 50、1-55、1-60、1-65、1-70、1-75、1-80、1-85、1-90、1-95、5-10、
 5-15、5-20、5-25、5-30、5-35、5-40、5-45、5-50、5-55、5-60、5-
 65、5-70、5-75、5-80、5-85、5-90、5-95、10-15、10-20、10-25、10-
 30、10-35、10-40、10-45、10-50、10-55、10-60、10-65、10-70、10-
 75、10-80、10-85、10-90、10-95、15-20、15-25、15-30、15-35、15-

40、15-45、15-50、15-55、15-60、15-65、15-70、15-75、15-80、15-85、15-90、15-95、20-25、20-30、20-35、20-40、20-45、20-50、20-55、20-60、20-65、20-70、20-75、20-80、20-85、20-90、20-95、25-30、25-35、25-40、25-45、25-50、25-55、25-60、25-65、25-70、25-75、25-80、25-85、25-90、25-95、30-35、30-40、30-45、30-50、30-55、30-60、30-65、30-70、30-75、30-80、30-85、30-90、30-95、35-40、35-45、35-50、35-55、35-60、35-65、35-70、35-75、35-80、35-85、35-90、35-95、40-45、40-50、40-55、40-60、40-65、40-70、40-75、40-80、40-85、40-90、40-95、45-50、45-55、45-60、45-65、45-70、45-75、45-80、45-85、45-90、45-95、50-55、50-60、50-65、50-70、50-75、50-80、50-85、50-90、50-95、55-60、55-65、55-70、55-75、55-80、55-85、55-90、55-95、60-65、60-70、60-75、60-80、60-85、60-90、60-95、65-70、65-75、65-80、65-85、65-90、65-95、70-75、70-80、70-85、70-90、70-95、75-80、75-85、75-90、75-95、80-85、80-90、80-95、85-90、85-95或90-95範圍內。作為非限制性實例，引導與隨從比率呈1.3至99之範圍。作為非限制性實例，引導與隨從比率呈10至99之範圍。

【0252】 在一個實施例中，引導與隨從(G:P)股比率為10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、

41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、
47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、
53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、
59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65、
65.5、66、66.5、67、67.5、68、68.5、69、69.5、70、70.5、71、
71.5、72、72.5、73、73.5、74、74.5、75、75.5、76、76.5、77、
77.5、78、78.5、79、79.5、80、80.5、81、81.5、82、82.5、83、
83.5、84、84.5、85、85.5、86、86.5、87、87.5、88、88.5、89、
89.5、90、90.5、91、91.5、92、92.5、93、93.5、94、94.5、95、
95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5或99。作為非限制性實例，引導與
隨從(G:P)股比率為11.5。作為非限制性實例，引導與隨從(G:P)股比率為
99。

【0253】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義
與有義)股比率超過1。

【0254】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義
與有義)股比率超過2。

【0255】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義
與有義)股比率超過5。

【0256】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義
與有義)股比率超過10。

【0257】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義
與有義)股比率超過20。

【0258】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義

與有義)股比率超過50。

【0259】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率超過300。

【0260】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為314。

【0261】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率超過400。

【0262】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為434。

【0263】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為至少3:1。

【0264】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為至少5:1。

【0265】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為至少10:1。

【0266】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為至少20:1。

【0267】 在一個實施例中，所表現之引導與隨從(G:P) (亦稱為反義與有義)股比率為至少50:1。

【0268】 在一個實施例中，活體外或活體內所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1;1、2:10、2:9、2:8、2:7、2:6、2:5、2:4、2:3、2:2、2:1、3:10、3:9、3:8、3:7、3:6、3:5、3:4、3:3、3:2、3:1、4:10、

4:9、4:8、4:7、4:6、4:5、4:4、4:3、4:2、4:1、5:10、5:9、5:8、5:7、
 5:6、5:5、5:4、5:3、5:2、5:1、6:10、6:9、6:8、6:7、6:6、6:5、6:4、
 6:3、6:2、6:1、7:10、7:9、7:8、7:7、7:6、7:5、7:4、7:3、7:2、7:1、
 8:10、8:9、8:8、8:7、8:6、8:5、8:4、8:3、8:2、8:1、9:10、9:9、
 9:8、9:7、9:6、9:5、9:4、9:3、9:2、9:1、10:10、10:9、10:8、10:7、
 10:6、10:5、10:4、10:3、10:2、10:1、1:99、5:95、10:90、15:85、
 20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:55、50:50、55:45、60:40、
 65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、95:5或99:1。隨從與引導
 比率係指在細胞內加工初級微RNA之後隨從股與引導股之比率。舉例而
 言，80:20之隨從與引導比率將在由前驅體加工的每2個引導股中具有8個
 隨從股。作為非限制性實例，活體外隨從股與引導股比率為80:20。作為
 非限制性實例，活體內隨從股與引導股比率為80:20。作為非限制性實
 例，活體外隨從股與引導股比率為8:2。作為非限制性實例，活體內隨從
 股與引導股比率為8:2。作為非限制性實例，活體外隨從股與引導股比率
 為9:1。作為非限制性實例，活體內隨從股與引導股比率為9:1。

【0269】 在一個實施例中，隨從與引導(P:G)股比率在1-99、1.3-
 99、5-99、10-99、15-99、20-99、25-99、30-99、35-99、40-99、45-
 99、50-99、55-99、60-99、65-99、70-99、75-99、80-99、85-99、90-
 99、95-99、1-10、1-15、1-20、1-25、1-30、1-35、1-40、1-45、1-
 50、1-55、1-60、1-65、1-70、1-75、1-80、1-85、1-90、1-95、5-10、
 5-15、5-20、5-25、5-30、5-35、5-40、5-45、5-50、5-55、5-60、5-
 65、5-70、5-75、5-80、5-85、5-90、5-95、10-15、10-20、10-25、10-
 30、10-35、10-40、10-45、10-50、10-55、10-60、10-65、10-70、10-

75、10-80、10-85、10-90、10-95、15-20、15-25、15-30、15-35、15-40、15-45、15-50、15-55、15-60、15-65、15-70、15-75、15-80、15-85、15-90、15-95、20-25、20-30、20-35、20-40、20-45、20-50、20-55、20-60、20-65、20-70、20-75、20-80、20-85、20-90、20-95、25-30、25-35、25-40、25-45、25-50、25-55、25-60、25-65、25-70、25-75、25-80、25-85、25-90、25-95、30-35、30-40、30-45、30-50、30-55、30-60、30-65、30-70、30-75、30-80、30-85、30-90、30-95、35-40、35-45、35-50、35-55、35-60、35-65、35-70、35-75、35-80、35-85、35-90、35-95、40-45、40-50、40-55、40-60、40-65、40-70、40-75、40-80、40-85、40-90、40-95、45-50、45-55、45-60、45-65、45-70、45-75、45-80、45-85、45-90、45-95、50-55、50-60、50-65、50-70、50-75、50-80、50-85、50-90、50-95、55-60、55-65、55-70、55-75、55-80、55-85、55-90、55-95、60-65、60-70、60-75、60-80、60-85、60-90、60-95、65-70、65-75、65-80、65-85、65-90、65-95、70-75、70-80、70-85、70-90、70-95、75-80、75-85、75-90、75-95、80-85、80-90、80-95、85-90、85-95或90-95範圍內。

【0270】 在一個實施例中，隨從與引導(P:G)股比率為10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、30.5、31、31.5、32、32.5、33、33.5、34、34.5、35、35.5、36、36.5、37、37.5、38、38.5、39、39.5、40、40.5、41、41.5、42、42.5、43、43.5、44、44.5、45、45.5、46、46.5、47、

47.5、48、48.5、49、49.5、50、50.5、51、51.5、52、52.5、53、
53.5、54、54.5、55、55.5、56、56.5、57、57.5、58、58.5、59、
59.5、60、60.5、61、61.5、62、62.5、63、63.5、64、64.5、65、
65.5、66、66.5、67、67.5、68、68.5、69、69.5、70、70.5、71、
71.5、72、72.5、73、73.5、74、74.5、75、75.5、76、76.5、77、
77.5、78、78.5、79、79.5、80、80.5、81、81.5、82、82.5、83、
83.5、84、84.5、85、85.5、86、86.5、87、87.5、88、88.5、89、
89.5、90、90.5、91、91.5、92、92.5、93、93.5、94、94.5、95、
95.5、96、96.5、97、97.5、98、98.5或99。

【0271】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過1。

【0272】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過2。

【0273】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過5。

【0274】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過10。

【0275】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過20。

【0276】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率超過50。

【0277】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為至少3:1。

【0278】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為至少5:1。

【0279】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為至少10:1。

【0280】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為至少20:1。

【0281】 在一個實施例中，所表現之隨從與引導(P:G) (亦稱為有義與反義)股比率為至少50:1。

【0282】 在一個實施例中，在量測加工時，當初級微RNA或前驅體微RNA藉由此項技術中已知及本文所述之方法表明大於引導股與隨從股比率的2倍時，隨從-引導股雙螺旋體視為有效的。作為非限制性實例，當量測加工時，初級微RNA或前驅體微RNA表明大於2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、或2至5倍、2至10倍、2至15倍、3至5倍、3至10倍、3至15倍、4至5倍、4至10倍、4至15倍、5至10倍、5至15倍、6至10倍、6至15倍、7至10倍、7至15倍、8至10倍、8至15倍、9至10倍、9至15倍、10至15倍、11至15倍、12至15倍、13至15倍或14至15倍的引導股與隨從股比率。

【0283】 在一個實施例中，編碼dsRNA之載體基因組包含呈構築體之全長的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超過99%的序列。作為非限制性實例，載體基因組包含呈構築體之全長序列的至少80%的序列。

【0284】 在一個實施例中，siRNA分子可用於藉由靶向相關基因序列上之至少一個外顯子使野生型或突變型相關基因緘默化。外顯子可為外

顯子1、外顯子2、外顯子3、外顯子4、外顯子5、外顯子6、外顯子7、外顯子8、外顯子9、外顯子10、外顯子11、外顯子12、外顯子13、外顯子14、外顯子15、外顯子16、外顯子17、外顯子18、外顯子19、外顯子20、外顯子21、外顯子22、外顯子23、外顯子24、外顯子25、外顯子26、外顯子27、外顯子28、外顯子29、外顯子30、外顯子31、外顯子32、外顯子33、外顯子34、外顯子35、外顯子36、外顯子37、外顯子38、外顯子39、外顯子40、外顯子41、外顯子42、外顯子43、外顯子44、外顯子45、外顯子46、外顯子47、外顯子48、外顯子49、外顯子50、外顯子51、外顯子52、外顯子53、外顯子54、外顯子55、外顯子56、外顯子57、外顯子58、外顯子59、外顯子60、外顯子61、外顯子62、外顯子63、外顯子64、外顯子65、外顯子66及/或外顯子67。

靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體之設計及序列

【0285】 本發明提供小干擾RNA (siRNA)雙螺旋體(及編碼其之調節聚核苷酸)，其靶向SOD1 mRNA以干擾SOD1基因表現及/或SOD1蛋白產生。

【0286】 本發明之經編碼之siRNA雙螺旋體含有雜交在一起形成雙螺旋結構的反義股及有義股，其中反義股與靶向SOD1基因之核酸序列互補，且其中有義股與靶向SOD1基因之核酸序列同源。在一些態樣中，反義股之5'端具有5'磷酸酯基，且有義股之3'端含有3'羥基。在其他態樣中，在各股之3'端無、有一個或2個核苷酸突出端。

【0287】 一些設計siRNA之準則已在此項技術中提出。此等準則通常建議產生靶向欲緘默基因中一個區域的19-核苷酸雙螺旋區域、對稱2至3個核苷酸3'突出端、5'-磷酸酯基及3'-羥基。可控管siRNA序列偏好之其

他規則包括(但不限於)：(i) A/U在反義股之5'端；(ii) G/C在有義股之5'端；(iii) 至少五個A/U殘基在反義股之5'末端三分之一；及(iv) 不存在任何超過9個核苷酸長度之GC段。根據該考慮，連同靶基因之特異性序列，可輕易設計對於抑制SOD1基因表現所必需的高效siRNA分子。

【0288】根據本發明，設計靶向SOD1基因之siRNA分子(例如siRNA雙螺旋體或編碼之dsRNA)。該等siRNA分子可特異性地抑制SOD1基因表現及蛋白產生。在一些態樣中，siRNA分子經設計且用於選擇性「剔除」細胞中之SOD1基因變異體，亦即，在患有ALS疾病之患者中鑑別到的突變SOD1轉錄物。在一些態樣中，siRNA分子經設計且用於選擇性的「減弱」細胞中之SOD1基因變異體。在其他態樣中，siRNA分子能夠抑制或遏制野生型及突變SOD1基因兩者。

【0289】在一個實施例中，本發明之siRNA分子包含有義股及互補反義股，其中兩個股雜交在一起以形成雙螺旋結構。反義股具有與SOD1 mRNA序列足夠的互補性以引導靶特異性RNAi，亦即，siRNA分子具有足以藉由RNAi機制或過程觸發靶mRNA破壞的序列。

【0290】在一個實施例中，本發明之siRNA分子包含有義股及互補反義股，其中兩個股雜交在一起以形成雙螺旋結構，且其中雜交至SOD1 mRNA之起始位點係在SOD1 mRNA序列上核苷酸15與1000之間。作為一個非限制性實例，起始位點可在SOD1 mRNA序列上核苷酸15-25、15-50、15-75、15-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950及950-1000之間。作為又一非限制性實例，起始位點可為SOD1 mRNA序列上核苷酸

26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、74、76、77、78、
149、153、157、160、177、192、193、195、196、197、198、199、
206、209、210、239、241、261、263、264、268、269、276、278、
281、284、290、291、295、296、316、317、329、330、337、350、
351、352、354、357、358、364、375、378、383、384、390、392、
395、404、406、417、418、469、470、475、476、480、487、494、
496、497、501、504、515、518、522、523、524、552、554、555、
562、576、577、578、579、581、583、584、585、587、588、589、
593、594、595、596、597、598、599、602、607、608、609、610、
611、612、613、616、621、633、635、636、639、640、641、642、
643、644、645、654、660、661、666、667、668、669、673、677、
692、698、699、700、701、706、749、770、772、775、781、800、
804、819、829、832、833、851、854、855、857、858、859、861、
869、891、892、906、907、912、913、934、944及947。

【0291】 在一些實施例中，反義股及靶SOD1 mRNA序列100%互補。反義股可與靶SOD1 mRNA序列之任何部分互補。

【0292】 在其他實施例中，反義股及靶SOD1 mRNA序列包含至少一個失配。作為非限制性實例，反義股與靶SOD1 mRNA序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-

60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%互補性。

【0293】 在一個實施例中，靶向SOD1之siRNA或dsRNA包括至少兩個彼此互補的序列。

【0294】 根據本發明，靶向SOD1之siRNA分子的長度為約10至50或超過50個核苷酸、亦即各股包含10至50個核苷酸(或核苷酸類似物)。較佳地，siRNA分子在各股中長度為約15至30個，例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個核苷酸，其中各股中之一者與靶區域充分互補。在一個實施例中，siRNA分子之各股之長度為約19至25、19至24或19至21個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為19個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為20個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為21個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為22個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為23個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為24個核苷酸。在一個實施例中，siRNA分子之至少一個股的長度為25個核苷酸。

【0295】 在一些實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可為包含約19個核苷酸至約25個核苷酸及3'端之兩個突出核苷酸的合成RNA雙螺旋體。在一些態樣中，siRNA分子可為未經修飾之RNA分子。在其他態樣中，siRNA分子可含有至少一個經修飾之核苷酸，諸如鹼基、糖或主鏈修飾。

【0296】 在一個實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可包含核苷酸序列，諸如(但不限於)，表2中的反義(引導)序列或其片段或變異體。作為非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之反義序列為表2中之核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作為另一非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之反義序列包含表2中的核苷酸序列之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或超過21個連續核苷酸。作為又一非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之反義序列包含表2中的序列之核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5

至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

表2. 反義序列

反義ID	序列	SEQ ID NO
A-4000	UCACCACAAGCCAAACGACUU	5
A-4001	UGAUUAAAGUGAGGACCUGUU	6
A-4002	UAUUAAAGUGAGGACCUGCUU	7
A-4003	UACACCACAAGCCAAACGAUU	8
A-4004	GAUUAAAGUGAGGACCUGCUU	9
A-4005	UCACCACAAGCCAAACGACUUU	10
A-4006	UGCCAGCAGUCACAUUGCCUU	11
A-4007	UACAGAUGAGUUAAGGGGUU	12
A-4008	UAUUAAAGUGAGGACCUGCdTdT	13
A-4009	UACACCACAAGCCAAACGAdTdT	14
A-4010	UUGUUUAUUGGGCGAUCCCdTdT	15
A-4011	UGUUUAUUGGGCGAUCCCAAdTdT	16
A-4012	UCACCACAAGCCAAACGACdTdT	17
A-4013	UGAUUAAAGUGAGGACCUGdTdT	18
A-4014	UUUUUAUUGGGCGAUCCCAAdTdT	19
A-4015	UGUCAGCAGUCACAUUGCCdTdT	20
A-4016	UGCGAUCCCAAUUACACCAAdTdT	21

【0297】 在一個實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可包

含核苷酸序列，諸如(但不限於)，表3中的有義(隨從)序列或其片段或變異體。作為非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之有義序列為表3中之核苷酸序列的至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%。作為另一非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之有義序列包含表3中的核苷酸序列之至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或超過21個連續核苷酸。作為又一非限制性實例，用於本發明之siRNA分子中之有義序列包含表3中的序列之核苷酸1至22、1至21、1至20、1至19、1至18、1至17、1至16、1至15、1至14、1至13、1至12、1至11、1至10、1至9、1至8、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、3至22、3至21、3至20、3至19、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、4至22、4至21、4至20、4至19、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、5至22、5至21、5至20、5至19、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、

5至11、5至10、5至9、5至8、6至22、6至21、6至20、6至19、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、7至22、7至21、7至20、7至19、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、8至22、8至21、8至20、8至19、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、9至22、9至21、9至20、9至19、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、10至22、10至21、10至20、10至19、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、11至22、11至21、11至20、11至19、11至18、11至17、11至16、11至15、11至14、12至22、12至21、12至20、12至19、12至18、12至17、12至16、13至22、13至21、13至20、13至19、13至18、13至17、13至16、14至22、14至21、14至20、14至19、14至18、14至17、15至22、15至21、15至20、15至19、15至18、16至22、16至21、16至20、17至22、17至21或18至22。

表3. 有義序列

有義ID	序列	SEQ ID NO
S-4000	GUCGUUUGGCUUGUGGUGGCU	22
S-4001	CAGGUCCUCACUUUAAUCGCU	23
S-4002	GCAGGUCCUCACUUUAAUGCC	24
S-4003	GCAGGUCCUCACUUUAAUGCU	25
S-4004	UCGUUUGGCUUGUGGUGUGCU	26
S-4005	GCAGGUCCUCACUUUAAUCCC	27
S-4006	GUCGUUUGGCUUGUGGUGGCC	28
S-4007	CAGGUCCUCACUUUAAUCGCC	29
S-4008	UCGUUUGGCUUGUGGUGUGCC	30
S-4009	GGCAAUGUGACUGCUGGUGCC	31
S-4010	GGCAAUGUGACUGCUGGUACC	32
S-4011	GGCAAUGUGUCUGCUGGUACC	33
S-4012	GGCAAUGUGACUGCUGGCCCC	34
S-4013	GCAGGUCCUCACUUUAAUUCC	35
S-4014	GCAGGUCCUGACUUUAAUCCC	36
S-4015	CCCCUUAACUCAUUUGUCCC	37
S-4016	GCAGGUCCUCACUUUAAUCdTdT	38
S-4017	UCGUUUGGCUUGUGGUGUCdTdT	39
S-4018	GGGAUCGCCCAAUAAACACdTdT	40
S-4019	UGGGAUCGCCCAAUAAACCDdTdT	41
S-4020	GUCGUUUGGCUUGUGGUGCdTdT	42

S-4021	CAGGUCCUCACUUUAAUCCdTdT	43
S-4022	UUGGGAUCGCCCAAUAAACdTdT	44
S-4023	GGCAAUGUGACUGCUGACCdTdT	45
S-4024	UGGUGUAAUUGGGAUCGCCdTdT	46

【0298】 在一個實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可包含來自表2的反義序列及來自表3的有義序列或其片段或變異體。作為非限制性實例，反義序列與有義序列具有至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-99%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-99%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-99%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-99%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-99%、70-80%、70-90%、70-95%、70-99%、80-90%、80-95%、80-99%、90-95%、90-99%或95-99%互補性。

【0299】 在一個實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可包含如表4中所述的有義及反義siRNA雙螺旋體。作為非限制性實例，針對對內源性SOD1基因表現之活體外抑制活性，可測試此等siRNA雙螺旋體。

表4. SOD1 dsRNA之有義股及反義股序列

siRNA雙螺旋體 ID	SS ID	有義股序列(5'-3')	SS SEQ ID	AS ID	反義股序列(5'-3')	AS SEQ ID
D-4000	S-4016	GCAGGUCCUCACUUUAAUCCdTdT	38	A-4008	UAUUAAAGUGAGGACCUGCdTdT	13
D-4001	S-4017	UCGUUUGGCUUGUGGUGUCdTdT	39	A-4009	UACACCACAAGCCAAACGAdTdT	14
D-4002	S-4018	GGGAUCGCCCAAUAAACACdTdT	40	A-4010	UUGUUUAUUGGCGGAUCCcdTdT	15
D-4003	S-4019	UGGGAUCGCCC	41	A-4011	UGUUUAUUGGG	16

		AAUAAACcdTdT			CGAUCCCAAdTdT	
D-4004	S-4020	GUCGUUUGGCU UGUGGUGCdTdT	42	A-4012	UCACCACAAGC CAAACGACdTdT	17
D-4005	S-4021	CAGGUCCUCACU UUA AUCCdTdT	43	A-4013	UGAUUAAAGUG AGGACCUGdTdT	18
D-4006	S-4022	UUGGGAUCGCC CAAUAAACdTdT	44	A-4014	UUUU AUUGGGC GAUCCCAAdTdT	19
D-4007	S-4023	GGCAAUGUGAC UGCUGACCdTdT	45	A-4015	UGUCAGCAGUC ACAUGCCdTdT	20
D-4008	S-4024	UGGUGUAAUUG GGAUCGCCdTdT	46	A-4016	UGCGAUCCCAA UUACACCAdTdT	21
D-4009	S-4000	GUCGUUUGGCU UGUGGUGGCU	22	A-4000	UCACCACAAGC CAAACGACUU	5
D-4010	S-4001	CAGGUCCUCACU UUA AUCGCU	23	A-4001	UGAUUAAAGUG AGGACCUGUU	6
D-4011	S-4002	GCAGGUCCUCAC UUUAAUGCC	24	A-4002	UAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	7
D-4012	S-4003	GCAGGUCCUCAC UUUAAUGCU	25	A-4002	UAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	7
D-4013	S-4004	UCGUUUGGCUU GUGGUGUGCU	26	A-4003	UACACCACAAG CCAAACGAUU	8
D-4014	S-4005	GCAGGUCCUCAC UUUAAUCCC	27	A-4004	GAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	9
D-4015	S-4006	GUCGUUUGGCU UGUGGUGGCC	28	A-4005	UCACCACAAGC CAAACGACUUU	10
D-4016	S-4007	CAGGUCCUCACU UUA AUCGCC	29	A-4001	UGAUUAAAGUG AGGACCUGUU	6
D-4017	S-4008	UCGUUUGGCUU GUGGUGUGCC	30	A-4003	UACACCACAAG CCAAACGAUU	8
D-4018	S-4009	GGCAAUGUGAC UGCUGGUGCC	31	A-4006	UGCCAGCAGUC ACAUGCCUU	11
D-4019	S-4010	GGCAAUGUGAC UGCUGGUACC	32	A-4006	UGCCAGCAGUC ACAUGCCUU	11
D-4020	S-4011	GGCAAUGUGUC UGCUGGUACC	33	A-4006	UGCCAGCAGUC ACAUGCCUU	11
D-4021	S-4012	GGCAAUGUGAC UGCUGGCCCC	34	A-4006	UGCCAGCAGUC ACAUGCCUU	11
D-4022	S-4013	GCAGGUCCUCAC UUUAAUUCC	35	A-4004	GAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	9
D-4023	S-4014	GCAGGUCCUGA CUUAAUCCC	36	A-4004	GAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	9
D-4024	S-4002	GCAGGUCCUCAC UUUAAUGCC	24	A-4004	GAUAAAAGUGA GGACCUGCUU	9
D-4025	S-4015	CCCCUUAACUCA UUUGUUCCC	37	A-4007	UAACAGAUGAG UUAAGGGGUU	12

【0300】 在其他實施例中，靶向SOD1之本發明之siRNA分子可編碼於質體載體、AAV粒子、病毒基因組或其他核酸表現載體中以遞送至細胞

胞。

【0301】 DNA表現質體可用於在細胞中穩定地表現靶向SOD1的本發明之siRNA雙螺旋體或dsRNA且達成靶基因表現之長期抑制。在一個態樣中，siRNA雙螺旋體之有義股及反義股典型地藉由短間隔序列連接，使得表現稱為短髮夾RNA (shRNA)之莖環結構。髮夾係藉由切丁酶識別且裂解，由此產生成熟siRNA分子。

【0302】 根據本發明，產生包含編碼靶向SOD1 mRNA之siRNA分子的核酸之AAV粒子，AAV血清型可為本文中所列出之血清型中的任一種。AAV血清型之非限制性實例包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAV-PHP.A及/或AAV-PHP.B、AAVPHP.B2、AAVPHP.B3、AAVPHP.N/PHP.B-DGT、AAVPHP.B-EST、AAVPHP.B-GGT、AAVPHP.B-ATP、AAVPHP.B-ATT-T、AAVPHP.B-DGT-T、AAVPHP.B-GGT-T、AAVPHP.B-SGS、AAVPHP.B-AQP、AAVPHP.B-QQP、AAVPHP.B-SNP(3)、AAVPHP.B-SNP、AAVPHP.B-QGT、AAVPHP.B-NQT、AAVPHP.B-EGS、AAVPHP.B-SGN、AAVPHP.B-EGT、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-DST、AAVPHP.B-STP、AAVPHP.B-PQP、AAVPHP.B-SQP、AAVPHP.B-QLP、AAVPHP.B-TMP、AAVPHP.B-TTP、AAVPHP.S/G2A12、AAVG2A15/G2A3、AAVG2B4、AAVG2B5及其變異體。

【0303】 在一些實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA抑制(或降解) SOD1 mRNA。因此，siRNA雙螺旋體或經編碼之

dsRNA可用於實質上抑制細胞中之SOD1基因表現。在一些態樣中，SOD1基因表現之抑制係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%；或至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

【0304】根據本發明，設計且測試siRNA分子之減少經培養細胞中SOD1 mRNA水準之能力。該等siRNA分子可形成雙螺旋體，諸如(但不限於)，包括表4中所列之彼等雙螺旋體。作為非限制性實例，siRNA雙螺旋體可為siRNA雙螺旋體ID：D-4000至D-4025。

【0305】在一個實施例中，siRNA分子包含位於引導股中之SOD1

的miRNA種子匹配。在另一實施例中，siRNA分子包含位於隨從股中之SOD1的miRNA種子匹配。在又一實施例中，靶向SOD1基因的siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA不包含位於引導股或隨從股中之SOD1的種子匹配。

【0306】 在一個實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導股可幾乎無顯著全長脫靶作用。在另一實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於隨從股可幾乎無顯著全長脫靶作用。靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於隨從股可具有低於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全長脫靶作用。在又一實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導股或隨從股可幾乎無顯著全長脫靶作用。靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA對於引導股或隨從股可具有低於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、1-5%、2-6%、3-7%、4-8%、5-9%、5-10%、6-10%、5-15%、5-20%、5-25%、5-30%、10-20%、10-30%、10-40%、10-50%、15-30%、15-40%、15-45%、20-40%、20-50%、25-50%、30-40%、30-50%、35-50%、40-50%、45-50%的全長脫靶作用。

【0307】 在一個實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或經編碼之dsRNA在活體外可具有高活性。在另一實施例中，siRNA分子在活體外可具有低活性。在又一實施例中，靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或dsRNA在活體外可具有高引導股活性及低隨從股活性。

【0308】 在一個實施例中，靶向SOD1之siRNA分子在活體外具有高引導股活性及低隨從股活性。藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)可為至少40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%。藉由引導股實現之靶基因減弱可呈40-50%、45-50%、50-55%、50-60%、60-65%、60-70%、60-75%、60-80%、60-85%、60-90%、60-95%、60-99%、60-99.5%、60-100%、65-70%、65-75%、65-80%、65-85%、65-90%、65-95%、65-99%、65-99.5%、65-100%、70-75%、70-80%、70-85%、70-90%、70-95%、70-99%、70-99.5%、70-100%、75-80%、75-85%、75-90%、75-95%、75-99%、75-99.5%、75-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-99.5%、80-100%、85-90%、85-95%、85-99%、85-99.5%、85-100%、90-95%、90-99%、90-99.5%、90-100%、95-99%、95-99.5%、95-100%、99-99.5%、99-100%或99.5-100%。作為非限制性實例，藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)大於70%。作為非限制性實例，藉由引導股實現之靶基因減弱(KD)大於60%。

【0309】 在一個實施例中，設計靶向SOD1之siRNA雙螺旋體，使得不存在有義序列或反義序列至非SOD1序列之miRNA種子匹配。

【0310】 在一個實施例中，針對最近脫靶的靶向SOD1的siRNA雙螺旋體中之引導股之IC₅₀大於針對中靶基因SOD1的引導股之IC₅₀的100

倍。作為非限制性實例，若針對最近脫靶的引導股之 IC_{50} 大於針對靶的引導股之 IC_{50} 的100倍，則稱siRNA分子在活體外具有抑制SOD1之高引導股選擇率。

【0311】 在一個實施例中，靶向SOD1之siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外或活體內時間之至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少99%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少99%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少90%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少90%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體外時間之至少85%。作為非限制性實例，引導股之5'加工為精確的，且在5'端處具有以下正確開始(n)：活體內時間之至少85%。

【0312】 在一個實施例中，靶向SOD1之siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端處具有在以下範圍內之正確開始(n)：75-95%、75-90%、75-85%、75-80%、80-95%、80-90%、80-85%、85-95%、85-90%或90-95%。作為非限制性實例，靶向SOD1之siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端處具有在75-95%範圍內之正確開始(n)。

【0313】 在一個實施例中，對於75%、75.1%、75.2%、75.3%、75.4%、75.5%、75.6%、75.7%、75.8%、75.9%、76%、76.1%、76.2%、76.3%、76.4%、76.5%、76.6%、76.7%、76.8%、76.9%、

77%、77.1%、77.2%、77.3%、77.4%、77.5%、77.6%、77.7%、
77.8%、77.9%、78%、78.1%、78.2%、78.3%、78.4%、78.5%、
78.6%、78.7%、78.8%、78.9%、79%、79.1%、79.2%、79.3%、
79.4%、79.5%、79.6%、79.7%、79.8%、79.9%、80%、80.1%、
80.2%、80.3%、80.4%、80.5%、80.6%、80.7%、80.8%、80.9%、
81%、81.1%、81.2%、81.3%、81.4%、81.5%、81.6%、81.7%、
81.8%、81.9%、82%、82.1%、82.2%、82.3%、82.4%、82.5%、
82.6%、82.7%、82.8%、82.9%、83%、83.1%、83.2%、83.3%、
83.4%、83.5%、83.6%、83.7%、83.8%、83.9%、84%、84.1%、
84.2%、84.3%、84.4%、84.5%、84.6%、84.7%、84.8%、84.9%、
85%、85.1%、85.2%、85.3%、85.4%、85.5%、85.6%、85.7%、
85.8%、85.9%、86%、86.1%、86.2%、86.3%、86.4%、86.5%、
86.6%、86.7%、86.8%、86.9%、87%、87.1%、87.2%、87.3%、
87.4%、87.5%、87.6%、87.7%、87.8%、87.9%、88%、88.1%、
88.2%、88.3%、88.4%、88.5%、88.6%、88.7%、88.8%、88.9%、
89%、89.1%、89.2%、89.3%、89.4%、89.5%、89.6%、89.7%、
89.8%、89.9%、90%、90.1%、90.2%、90.3%、90.4%、90.5%、
90.6%、90.7%、90.8%、90.9%、91%、91.1%、91.2%、91.3%、
91.4%、91.5%、91.6%、91.7%、91.8%、91.9%、92%、92.1%、
92.2%、92.3%、92.4%、92.5%、92.6%、92.7%、92.8%、92.9%、
93%、93.1%、93.2%、93.3%、93.4%、93.5%、93.6%、93.7%、
93.8%、93.9%、94%、94.1%、94.2%、94.3%、94.4%、94.5%、
94.6%、94.7%、94.8%、94.9%或95%的所表現之構築體，靶向SOD1之

siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端具有正確開始(n)。作為非限制性實例，對於81%的所表現之構築體，靶向SOD1之siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端具有正確開始(n)。作為非限制性實例，對於90%的所表現之構築體，靶向SOD1之siRNA雙螺旋體的引導股之5'加工在5'端具有正確開始(n)。

【0314】 在一個實施例中，在量測加工時，當初級微RNA或前驅體微RNA藉由此項技術中已知及本文所述之方法表明大於引導股與隨從股比率的2倍時，SOD1之隨從-引導股雙螺旋體視為有效的。作為非限制性實例，當量測加工時，初級微RNA或前驅體微RNA表明大於2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、或2至5倍、2至10倍、2至15倍、3至5倍、3至10倍、3至15倍、4至5倍、4至10倍、4至15倍、5至10倍、5至15倍、6至10倍、6至15倍、7至10倍、7至15倍、8至10倍、8至15倍、9至10倍、9至15倍、10至15倍、11至15倍、12至15倍、13至15倍或14至15倍的引導股與隨從股比率。

【0315】 在一個實施例中，siRNA分子可用於藉由靶向SOD1序列上之至少一個外顯子使野生型或突變型SOD1緘默化。外顯子可為外顯子1、外顯子2、外顯子3、外顯子4、外顯子5、外顯子6、外顯子7、外顯子8、外顯子9、外顯子10、外顯子11、外顯子12、外顯子13、外顯子14、外顯子15、外顯子16、外顯子17、外顯子18、外顯子19、外顯子20、外顯子21、外顯子22、外顯子23、外顯子24、外顯子25、外顯子26、外顯子27、外顯子28、外顯子29、外顯子30、外顯子31、外顯子32、外顯子33、外顯子34、外顯子35、外顯子36、外顯子37、外顯子38、外顯子39、外顯子40、外顯子41、外顯子42、外顯子43、外顯子44、外顯子

45、外顯子46、外顯子47、外顯子48、外顯子49、外顯子50、外顯子51、外顯子52、外顯子53、外顯子54、外顯子55、外顯子56、外顯子57、外顯子58、外顯子59、外顯子60、外顯子61、外顯子62、外顯子63、外顯子64、外顯子65、外顯子66及/或外顯子67。

【0316】 在一個實施例中，引導股佔miRNA之總內源庫之範圍為0.001-0.6%、0.005-0.6%、0.01-0.6%、0.015-0.6%、0.02-0.6%、0.025-0.6%、0.03-0.6%、0.035-0.6%、0.04-0.6%、0.045-0.6%、0.05-0.6%、0.055-0.6%、0.06-0.6%、0.065-0.6%、0.07-0.6%、0.075-0.6%、0.08-0.6%、0.085-0.6%、0.09-0.6%、0.095-0.6%、0.1-0.6%、0.15-0.6%、0.2-0.6%、0.25-0.6%、0.3-0.6%、0.35-0.6%、0.4-0.6%、0.45-0.6%、0.5-0.6%、0.55-0.6%、0.001-0.5%、0.005-0.5%、0.01-0.5%、0.015-0.5%、0.02-0.5%、0.025-0.5%、0.03-0.5%、0.035-0.5%、0.04-0.5%、0.045-0.5%、0.05-0.5%、0.055-0.5%、0.06-0.5%、0.065-0.5%、0.07-0.5%、0.075-0.5%、0.08-0.5%、0.085-0.5%、0.09-0.5%、0.095-0.5%、0.1-0.5%、0.15-0.5%、0.2-0.5%、0.25-0.5%、0.3-0.5%、0.35-0.5%、0.4-0.5%、0.45-0.5%、0.001-0.4%、0.005-0.4%、0.01-0.4%、0.015-0.4%、0.02-0.4%、0.025-0.4%、0.03-0.4%、0.035-0.4%、0.04-0.4%、0.045-0.4%、0.05-0.4%、0.055-0.4%、0.06-0.4%、0.065-0.4%、0.07-0.4%、0.075-0.4%、0.08-0.4%、0.085-0.4%、0.09-0.4%、0.095-0.4%、0.1-0.4%、0.15-0.4%、0.2-0.4%、0.25-0.4%、0.3-0.4%、0.35-0.4%、0.001-0.3%、0.005-0.3%、0.01-0.3%、0.015-0.3%、0.02-0.3%、0.025-0.3%、0.03-0.3%、0.035-0.3%、0.04-0.3%、0.045-0.3%、0.05-0.3%、0.055-0.3%、0.06-0.3%、0.065-0.3%、0.07-0.3%、

0.075-0.3%、0.08-0.3%、0.085-0.3%、0.09-0.3%、0.095-0.3%、0.1-0.3%、0.15-0.3%、0.2-0.3%、0.25-0.3%、0.001-0.2%、0.005-0.2%、0.01-0.2%、0.015-0.2%、0.02-0.2%、0.025-0.2%、0.03-0.2%、0.035-0.2%、0.04-0.2%、0.045-0.2%、0.05-0.2%、0.055-0.2%、0.06-0.2%、0.065-0.2%、0.07-0.2%、0.075-0.2%、0.08-0.2%、0.085-0.2%、0.09-0.2%、0.095-0.2%、0.1-0.2%、0.15-0.2%、0.001-0.1%、0.005-0.1%、0.01-0.1%、0.015-0.1%、0.02-0.1%、0.025-0.1%、0.03-0.1%、0.035-0.1%、0.04-0.1%、0.045-0.1%、0.05-0.1%、0.055-0.1%、0.06-0.1%、0.065-0.1%、0.07-0.1%、0.075-0.1%、0.08-0.1%、0.085-0.1%、0.09-0.1%或0.095-0.1%。作為非限制性實例，範圍為0.06-0.6%。作為非限制性實例，範圍為0.4-0.5%。

【0317】 在一個實施例中，引導股佔miRNA之總內源庫之百分比為0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%或0.6%。作為非限制性實例，百分比為0.06%。作為非限制性實例，百分比為0.4%。作為非限制性實例，百分比為0.5%。

siRNA修飾

【0318】 在一些實施例中，本發明之siRNA分子，在不以前驅體或DNA形式遞送時，可經化學修飾以調節RNA分子之一些特徵，諸如(但不限於)，提高活體內siRNA之穩定性。經化學修飾之siRNA分子可用於人類治療性應用，且經改良而不損害siRNA分子之RNAi活性。作為非限制性實例，siRNA分子在有義股及反義股之3'端及5'端處均經修飾。

【0319】 在一些態樣中，本發明之siRNA雙螺旋體可含有一或多種經修飾之核苷酸，諸如(但不限於)，經糖修飾之核苷酸、核鹼基修飾及/或主鏈修飾。在一些態樣中，siRNA分子可含有組合修飾，例如，經組合之核鹼基及主鏈修飾。

【0320】 在一個實施例中，經修飾之核苷酸可為經糖修飾之核苷酸。經修飾之核苷酸包括(但不限於)經2'-氟、2'-胺基及2'-硫基修飾之核糖核苷酸，例如經2'-氟修飾之核糖核苷酸。經修飾之核苷酸可在糖部分，以及具有糖或其非核糖基之類似物的核苷酸上經修飾。舉例而言，糖部分可為或基於甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、4'-硫基核糖及其他糖、雜環或碳環。

【0321】 在一個實施例中，經修飾之核苷酸可為經核鹼基修飾之核苷酸。

【0322】 在一個實施例中，經修飾之核苷酸可為經主鏈修飾之核苷酸。在一些實施例中，本發明之siRNA雙螺旋體可進一步包含主鏈上之其他修飾。如本文所用，常用「主鏈」係指DNA或RNA分子中之重複交替磷酸糖序列。去氧核苷/核糖以酯鍵(亦稱為「磷酸二酯」鍵/連接子(PO鍵))在3'-羥基及5'-羥基處連接至磷酸酯基。PO主鏈可經修飾為「硫代磷酸酯」主鏈(PS鍵)。在一些情況下，天然磷酸二酯鍵可經醯胺鍵置換，但保持兩個糖單元之間的四個原子。該等醯胺修飾可促進寡核苷酸之固相合成且提高由siRNA補體形成之雙螺旋體的熱力學穩定性。參見例如 Mesmaeker 等人, *Pure & Appl. Chem.*, 1997, 3, 437-440；該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0323】 經修飾之鹼基係指核苷酸鹼基，諸如腺嘌呤、鳥嘌呤、胞

嘧啶、胸嘧啶、尿嘧啶、黃嘌呤、肌核苷及Q核苷，其已藉由置換或添加一或多個原子或基團修飾。核鹼基部分上之修飾之一些實例包括(但不限於)獨立地或呈組合形式的烷基化、鹵化、硫醇化、胺化、醯胺化或乙醯化鹼基。更具體實例包括例如5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞嘧啶核苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鳥嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鳥嘌呤、2-胺基腺嘌呤、1-甲基肌核苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞嘧啶核苷、5-甲基尿苷及在5位具有修飾之其他核苷酸、5-(2-胺基)丙基尿苷、5-鹵胞嘧啶核苷、5-鹵尿苷、4-乙醯基胞嘧啶核苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞嘧啶核苷、6-甲基尿苷、2-甲基鳥苷、7-甲基鳥苷、2,2-二甲基鳥苷、5-甲基胺乙基尿苷、5-甲氧基尿苷、去氮核苷酸(諸如7-去氮-腺苷、6-偶氮基尿苷、6-偶氮基胞嘧啶核苷、6-偶氮基胸苷)、5-甲基-2-硫代尿苷、其他硫基鹼基(諸如2-硫代尿苷及4-硫代尿苷及2-硫代胞嘧啶核苷)、二氫尿苷、假尿苷、Q核苷、古嘌呤、蔡基及經取代之蔡基、任何O-烷基化嘌呤及嘧啶及N-烷基化嘌呤及嘧啶(諸如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-氧基乙酸、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮)、苯基及經改質之苯基(諸如胺基苯酚或2,4,6-三甲氧基苯)、經修飾之胞嘧啶(其充當G形夾核苷酸)、8-經取代之腺嘌呤及鳥嘌呤、5-經取代之尿嘧啶及胸嘧啶、氮雜嘧啶、羧基羥基烷基核苷酸、羧基烷基胺基烷基核苷酸及烷基羰基烷基化核苷酸。

【0324】 在一個實施例中，經修飾之核苷酸可僅僅處於有義股上。

【0325】 在另一實施例中，經修飾之核苷酸可僅僅處於反義股上。

【0326】 在一些實施例中，經修飾之核苷酸可處於有義股及反義兩者中。

【0327】 在一些實施例中，經化學修飾之核苷酸不影響反義股與靶 mRNA 序列配對之能力。

【0328】 在一個實施例中，包含編碼本發明之 siRNA 分子之核酸序列的 AAV 粒子可編碼為多順反子分子之 siRNA 分子。siRNA 分子可在 siRNA 分子之區域之間另外包含一或多個連接子。

分子骨架

【0329】 在一個實施例中，siRNA 分子可編碼於亦包含分子骨架之調節聚核苷酸中。如本文所用，「分子骨架」為形成針對其設計或製成後續分子之序列或結構性基礎之構架或起始分子。

【0330】 在一個實施例中，分子骨架包含至少一個 5' 側接區域。作為非限制性實例，5' 側接區域可包含 5' 側接序列，其可具有任何長度且可整體地或部分地衍生自野生型微 RNA 序列，或完全為人工序列。

【0331】 在一個實施例中，分子骨架包含至少一個 3' 側接區域。作為非限制性實例，3' 側接區域可包含 3' 側接序列，其可具有任何長度且可整體地或部分地衍生自野生型微 RNA 序列，或完全為人工序列。

【0332】 在一個實施例中，分子骨架包含至少一個環基元區域。作為非限制性實例，環基元區域可包含可具有任何長度之序列。

【0333】 在一個實施例中，分子骨架包含 5' 側接區域、環基元區域及/或 3' 側接區域。

【0334】 在一個實施例中，至少一種本文所述之 siRNA、miRNA 或其他 RNAi 劑可由亦可包含至少一個分子骨架之調節聚核苷酸編碼。分子骨架可包含 5' 側接序列，其可具有任何長度且可整體地或部分地衍生自野生型微 RNA 序列，或完全為人工的。3' 側接序列可在尺寸及來源上與 5' 側

接序列及/或3'側接序列成鏡像。任一側接序列可不存在。3'側接序列可視情況含有一或多個CNNC基元，其中「N」表示任何核苷酸。

【0335】 形成莖環結構之莖為編碼至少一種本文所述之siRNA劑、miRNA或其他RNAi劑的調節聚核苷酸的最低結果。在一些實施例中，本文所述之siRNA、miRNA或其他RNAi劑包含至少一個核酸序列，其部分地互補或將雜交至靶序列。在一些實施例中，有效負載為siRNA分子或siRNA分子之片段。

【0336】 在一些實施例中，調節聚核苷酸之莖環結構之5'臂包含編碼有義序列之核酸序列。可由調節聚核苷酸編碼之有義序列或其片段或變異體之非限制性實例描述於表3中。

【0337】 在一些實施例中，調節聚核苷酸之莖環之3'臂包含編碼反義序列之核酸序列。在一些情況下，反義序列在5'最末端包含「G」核苷酸。可由調節聚核苷酸編碼之反義序列或其片段或變異體之非限制性實例描述於表2中。

【0338】 在其他實施例中，有義序列可存在於調節聚核苷酸之莖環結構之莖的3'臂上，而反義序列存在於5'臂上。可由調節聚核苷酸編碼之有義序列及反義序列之非限制性實例描述於表2及表3中。

【0339】 在一個實施例中，有義序列及反義序列可在其長度之大部分中完全互補。在其他實施例中，有義序列及反義序列可在獨立地至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%的各股之長度中呈至少70%、80%、90%、95%或99%互補性。

【0340】 有義序列之同一性或反義序列之同源性均不需要與靶序列100%互補。

【0341】 在一個實施例中，分離調節聚核苷酸之莖環結構之有義序列與反義序列的為環序列(亦稱為環基元、連接子或連接子基元)。環序列可具有任何長度：在4-30個核苷酸之間、在4-20個核苷酸之間、在4-15個核苷酸之間、在5-15個核苷酸之間、在6-12個核苷酸之間、6個核苷酸、7個核苷酸、8個核苷酸、9個核苷酸、10個核苷酸、11個核苷酸、12個核苷酸、13個核苷酸、14個核苷酸及/或15個核苷酸。

【0342】 在一些實施例中，環序列包含編碼至少一種UGUG基元之核酸序列。在一些實施例中，編碼UGUG基元之核酸序列位於環序列之5'端。

【0343】 在一個實施例中，間隔區域可存在於調節聚核苷酸中以使一或多個模組(例如，5'側接區域、環基元區域、3'側接區域、有義序列、反義序列)彼此分離。可存在一或多個此類間隔區域。

【0344】 在一個實施例中，8-20，亦即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個核苷酸之間の間隔區域可存在於有義序列與側接區域序列之間。

【0345】 在一個實施例中，間隔區域之長度為13個核苷酸，且位於有義序列之5'端與側接序列之3'端之間。在一個實施例中，間隔子具有足夠的長度以形成序列之大約一個螺旋轉角(helical turn)。

【0346】 在一個實施例中，8-20，亦即8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個核苷酸之間の間隔區域可存在於反義序列與側接序列之間。

【0347】 在一個實施例中，間隔序列在10-13，亦即10、11、12或13個核苷酸之間，且位於反義序列之3'端與側接序列之5'端之間。在一個

實施例中，間隔子具有足夠的長度以形成序列之大約一個螺旋轉角。

【0348】 在一個實施例中，調節聚核苷酸之分子骨架沿5'至3'方向包含5'側接序列、5'臂、環基元、3'臂及3'側接序列。作為非限制性實例，5'臂可包含編碼有義序列之核酸序列，且3'臂包含編碼反義序列之核酸序列。在另一非限制性實例中，5'臂包含編碼反義序列之核酸序列，且3'臂包含編碼有義序列之核酸序列。

【0349】 在一個實施例中，5'臂、有義序列及/或反義序列、環基元及/或3'臂序列可有所改變(例如取代1或多種核苷酸、添加核苷酸及/或缺失核苷酸)。改變可引起構築體之功能的有益變化(例如增加靶序列之基因減弱、減少構築體之降解、減少脫靶作用、提高有效負載之效率及減少有效負載之降解)。

【0350】 在一個實施例中，對準調節聚核苷酸之分子骨架以便使引導股(在本文中亦稱為反義股)之切除率大於隨從股(在本文中亦稱為有義股)之切除率。引導股或隨從股之切除率可獨立地為1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超過99%。作為非限制性實例，引導股之切除率為至少80%。作為另一非限制性實例，引導股之切速率為至少90%。

【0351】 在一個實施例中，引導股之切除率大於隨從股之切除率。在一個態樣中，引導股之切除率可比隨從股大至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或超過99%。

【0352】 在一個實施例中，引導股之切除效率為至少60%, 65%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%或超過99%。作為非限制性實例，引導股之切除效率超過80%。

【0353】 在一個實施例中，引導股之切除效率大於隨從股自分子骨架之切除。引導股之切除可比隨從股自分子骨架之切除高效2、3、4、5、6、7、8、9、10或超過10倍。

【0354】 在一個實施例中，分子骨架包含雙重功能靶向調節聚核苷酸。如本文所用，「雙重功能靶向」調節聚核苷酸為引導股及隨從股基因減弱相同靶或引導股及隨從股基因減弱不同靶的聚核苷酸。

【0355】 在一個實施例中，本文所述之調節聚核苷酸之分子骨架可包含5'側接區域、環基元區域及3'側接區域。本文所述之調節聚核苷酸中之可使用的5'側接區域、環基元區域(亦可稱為連接區域)及3'側接區域之序列或其所用片段之非限制性實例顯示於表5至表7中。

表5. 分子骨架之5'側接區域

5'側接區域名稱	5'側接區域序列	5'側接區域SEQ ID
5F1	CTCCCGCAGAACACCATGCGCTCCACGGAA	47
5F2	GAAGCAAAGAAGGGGCAGAGGGAGCCCGTG AGCTGAGTGGGCCAGGGACTGGGAGAAGGAG TGAGGAGGCAGGGCCGGCATGCCTCTGCTGCT GGCCAGA	48
5F3	GTGCTGGGCGGGGGGCGGCGGGCCCTCCCGC AGAACACCATGCGCTCTTCGGAA	49

表6. 分子骨架之環基元區域

環基元區域名稱	環基元區域序列	環基元區域SEQ ID
L1	GTGGCCACTGAGAAG	50
L2	GTCTGCACCTGTCTACTAG	51
L3	TGTGACCTGG	52
L4	TGTGATTGG	53

表7. 分子骨架之3'側接區域

3'側接區域 名稱	3'側接區域序列	3'側接區域 SEQ ID
3F1	CTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGAG GGCC	54
3F2	TGGCCGTGTAGTGCTACCCAGCGCTGGCTGCC TCCTCAGCATTGCAATTCCTCTCCCATCTGGGC ACCAGTCAGCTACCCTGGTGGGAATCTGGGTA GCC	55
3F3	GGCCGTGTAGTGCTACCCAGCGCTGGCTGCCT CCTCAGCATTGCAATTCCTCTCCCATCTGGGCA CCAGTCAGCTACCCTGGTGGGAATCTGGGTAG CC	56
3F4	CTGAGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGAG GGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	57
3F5	CTGTGGAGCGCCTTGACAGCAGCCATGGGAG GGCCGCCCCCTACCTCAGTGA	58

【0356】 在一個實施例中，分子骨架可包含表5中所列之至少一個5'側接區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，5'側接區域可為5F1、5F2或5F3。

【0357】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個5F1 側接區域。

【0358】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個5F2 側接區域。

【0359】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個5F3 側接區域。

【0360】 在一個實施例中，分子骨架可包含表6中所列之至少一個環基元區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，環基元區域可為L1、L2、L3或L4。

【0361】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個L1環基元區域。

【0362】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個L2環基元區

域。

【0363】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個L3環基元區域。

【0364】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個L4環基元區域。

【0365】 在一個實施例中，分子骨架可包含表7中所列之至少一個3'側接區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，3'側接區域可為3F1、3F2、3F3、3F4或3F5。

【0366】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個3F1 側接區域。

【0367】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個3F2 側接區域。

【0368】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個3F3 側接區域。

【0369】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個3F4 側接區域。

【0370】 在一個實施例中，分子骨架可包含至少一個3F5 側接區域。

【0371】 在一個實施例中，分子骨架可包含如表5及表6中所述之至少一個5'側接區域、其片段或變異體及至少一個環基元區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，5'側接區域及環基元區域可為5F1及L1、5F1及L2、5F1及L3、5F1及L4、5F2及L1、5F2及L2、5F2及L3、5F2及L4、5F3及L1、5F3及L2、5F3及L3以及5F3及L4。

【0372】 在一個實施例中，分子骨架可包含如表6及表7中所述之至少一個3'側接區域、其片段或變異體及至少一個基元區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，3'側接區域及環基元區域可為3F1及L1、3F1及L2、3F1及L3、3F1及L4、3F2及L1、3F2及L2、3F2及L3、3F2及L4、3F3及L1、3F3及L2、3F3及L3、3F3及L4、3F4及L1、3F4及L2、3F4及L3、3F4及L4、3F5及L1、3F5及L2、3F5及L3以及3F5及L4。

【0373】 在一個實施例中，分子骨架可包含如表5及表7中所述之至少一個5'側接區域、其片段或變異體及至少一個3'側接區域、其片段或變異體。作為非限制性實例，側接區域可為5F1及3F1、5F1及3F2、5F1及3F3、5F1及3F4、5F1及3F5、5F2及3F1、5F2及3F2、5F2及3F3、5F2及3F4、5F2及3F5、5F3及3F1、5F3及3F2、5F3及3F3、5F3及3F4、5F3及3F5。

【0374】 在一個實施例中，分子骨架可包含如表5至表7中所述之至少一個5'側接區域、其片段或變異體；至少一個環基元區域、其片段或變異體；及至少一個3'側接區域。作為非限制性實例，側接區域及環基元區域可為5F1、L1及3F1；5F1、L1及3F2；5F1、L1及3F3；5F1、L1及3F4；5F2、L1及3F1；5F2、L1及3F2；5F2、L1及3F3；5F2、L1及3F4；5F2、L1及3F5；5F3、L1及3F1；5F3、L1及3F2；5F3、L1及3F3；5F3、L1及3F4；5F3、L1及3F5；5F1、L2及3F1；5F1、L2及3F2；5F1、L2及3F3；5F1、L2及3F4；5F1、L2及3F5；5F2、L2及3F1；5F2、L2及3F2；5F2、L2及3F3；5F2、L2及3F4；5F2、L2及3F5；5F3、L2及3F1；5F3、L2及3F2；5F3、L2及3F3；5F3、L2及3F4；5F3、L2及3F5；5F3；5F1、L3及3F1；5F1、L3及3F2；5F1、L3

及3F3；5F1、L3及3F4；5F1、L3及3F5；5F2、L3及3F1；5F2、L3及3F2；5F2、L3及3F3；5F2、L3及3F4；5F2、L3及3F5；5F3、L3及3F1；5F3、L3及3F2；5F3、L3及3F3；5F3、L3及3F4；5F3、L3及3F5；5F1、L4及3F1；5F1、L4及3F2；5F1、L4及3F3；5F1、L4及3F4；5F1、L4及3F5；5F2、L4及3F1；5F2、L4及3F2；5F2、L4及3F3；5F2、L4及3F4；5F2、L4及3F5；5F3、L4及3F1；5F3、L4及3F2；5F3、L4及3F3；5F3、L4及3F4；5F3、L4及3F5。

【0375】 在一個實施例中，分子骨架可為天然pri-miRNA骨架。作為非限制性實例，分子骨架可為衍生自人類miR155骨架之骨架。

【0376】 在一個實施例中，分子骨架可包含一或多個此項技術中已知之連接子。連接子可使區域或一個分子骨架與另一者分離。作為非限制性實例，分子骨架可為多順反子的。

包含分子骨架及靶向SOD1之siRNA分子的調節聚核苷酸

【0377】 在一個實施例中，調節聚核苷酸可包含如表8中所述之5'側接區域及3'側接區域、環基元區域及編碼有義序列及反義序列之核酸序列。在表8中，描述隨從股及引導股之DNA序列識別符以及5'側接區域及3'側接區域及環區域(亦稱為連接區域)。在表8中，序列之名稱之「miR」組分不必對應於miRNA基因之序列編號(例如VOYSOD1miR-102為序列之名稱且不必意謂miR-102為序列之一部分)。

表8. SOD1調節聚核苷酸序列區域(5'至3')

調節聚核苷酸構築體名稱	5'側接至3'側接 SEQ ID NO	5'側接 SEQ ID NO	隨從 SEQ ID NO	環SEQ ID NO	G引導 SEQ ID NO	3'側接 SEQ ID NO
VOYSOD1miR102-788	59	49	80	52	101	57
VOYSOD1miR102-805c	60	49	81	52	102	57
VOYSOD1miR104-788	61	49	82	52	103	57
VOYSOD1miR104-788.2	62	47	83	50	104	54

VOYSOD1miR104-789	63	47	84	50	105	54
VOYSOD1miR104-805c	64	49	85	52	106	57
VOYSOD1miR104-829	65	47	86	50	107	54
VOYSOD1miR104-830	66	47	87	50	108	54
VOYSOD1miR109-788	67	49	88	53	109	57
VOYSOD1miR109-805c	68	49	89	53	110	57
VOYSOD1miR114-788	69	49	90	52	111	58
VOYSOD1miR114-805c	70	49	91	52	112	58
VOYSOD1miR116-788	71	49	92	52	113	58
VOYSOD1miR116-805c	72	49	93	52	114	58
VOYSOD1miR127-788	73	48	94	51	115	55
VOYSOD1miR127-788.2	74	48	95	51	116	55
VOYSOD1miR127-789	75	48	96	51	117	55
VOYSOD1miR127-805c	76	48	97	51	118	55
VOYSOD1miR127-829	77	48	98	51	119	56
VOYSOD1miR127-830	78	48	99	51	120	55
VOYSOD1miR127-860	79	48	100	51	121	55

包含調節聚核苷酸之AAV粒子

【0378】 在一個實施例中，AAV粒子包含具有包含調節聚核苷酸序列之有效負載區域之病毒基因組。在此類實施例中，編碼超過一種多肽之病毒基因組可複製且封裝於病毒粒子中。經包含調節聚核苷酸之病毒粒子轉導的靶細胞可在單個細胞中表現經編碼之有義序列及/或反義序列。

【0379】 在一些實施例中，AAV粒子適用於治療、預防、緩和或改善神經疾病及/或病症之藥物的領域中。

【0380】 在一個實施例中，可將包含調節聚核苷酸序列之AAV粒子引入哺乳動物細胞中，該調節聚核苷酸序列包含編碼至少一個siRNA分子的核酸序列。

【0381】 在AAV粒子有效負載區域包含調節聚核苷酸之情況下，調節聚核苷酸可包含有義序列及/或反義序列以基因減弱靶基因。編碼本文所述之調節聚核苷酸的AAV病毒基因組可適用於人類疾病、病毒、感染獸醫應用及各種活體內及活體外設定的領域中。

【0382】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個反

向末端重複(ITR)區域。ITR區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下之長度：75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174及175個核苷酸。病毒基因組之ITR區域之長度可為75-80、75-85、75-100、80-85、80-90、80-105、85-90、85-95、85-110、90-95、90-100、90-115、95-100、95-105、95-120、100-105、100-110、100-125、105-110、105-115、105-130、110-115、110-120、110-135、115-120、115-125、115-140、120-125、120-130、120-145、125-130、125-135、125-150、130-135、130-140、130-155、135-140、135-145、135-160、140-145、140-150、140-165、145-150、145-155、145-170、150-155、150-160、150-175、155-160、155-165、160-165、160-170、165-170、165-175及170-175個核苷酸。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約105個核苷酸之ITR。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約141個核苷酸之ITR。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約130個核苷酸之ITR。

【0383】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含兩個反向末端重複(ITR)區域。ITR區域中之每一者可獨立地具有諸如(但不限於)以下

之長度：75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174及175個核苷酸。病毒基因組之ITR區域之長度可為75-80、75-85、75-100、80-85、80-90、80-105、85-90、85-95、85-110、90-95、90-100、90-115、95-100、95-105、95-120、100-105、100-110、100-125、105-110、105-115、105-130、110-115、110-120、110-135、115-120、115-125、115-140、120-125、120-130、120-145、125-130、125-135、125-150、130-135、130-140、130-155、135-140、135-145、135-160、140-145、140-150、140-165、145-150、145-155、145-170、150-155、150-160、150-175、155-160、155-165、160-165、160-170、165-170、165-175及170-175個核苷酸。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約105個核苷酸及長度為約141個核苷酸之ITR。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約105個核苷酸及長度為約130個核苷酸之ITR。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約130個核苷酸及長度為約141個核苷酸之ITR。

【0384】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組包含兩個ITR序列區域。

【0385】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個多填充序列區域。填充區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下長度：50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、

313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、
325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、
337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、
349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、
361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、
373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、
385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、
397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、
409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、
421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、
433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、
445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、
457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、
469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、
481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、
493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、
505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、
517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、
529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、
541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、
553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、
565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、
577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、

589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、
601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、
613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、
625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、
637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、
649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、
661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、
673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、
685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、
697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、
709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、
721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、
733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、
745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、
757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、
769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、
781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、
793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、
805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、
817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、
829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、
841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、
853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、

865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、
877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、
889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、
901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、
913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、
925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、
937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、
949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、
961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、
973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、
985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、
997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、
1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、
1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、
1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、
1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、
1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、
1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、
1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、
1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、
1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、
1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、
1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、

1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、
1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、
1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、
1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、
1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、
1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、
1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、
1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、
1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、
1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、
1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、
1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、
1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、
1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、
1257、1258、1259、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、
1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、
1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、
1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、
1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、
1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、
1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、
1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、
1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、

1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、
1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、
1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、
1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、
1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、
1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、
1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、
1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、
1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、
1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、
1447、1448、1449、1450、1451、1452、1453、1454、1455、1456、
1457、1458、1459、1460、1461、1462、1463、1464、1465、1466、
1467、1468、1469、1470、1471、1472、1473、1474、1475、1476、
1477、1478、1479、1480、1481、1482、1483、1484、1485、1486、
1487、1488、1489、1490、1491、1492、1493、1494、1495、1496、
1497、1498、1499、1500、1501、1502、1503、1504、1505、1506、
1507、1508、1509、1510、1511、1512、1513、1514、1515、1516、
1517、1518、1519、1520、1521、1522、1523、1524、1525、1526、
1527、1528、1529、1530、1531、1532、1533、1534、1535、1536、
1537、1538、1539、1540、1541、1542、1543、1544、1545、1546、
1547、1548、1549、1550、1551、1552、1553、1554、1555、1556、
1557、1558、1559、1560、1561、1562、1563、1564、1565、1566、
1567、1568、1569、1570、1571、1572、1573、1574、1575、1576、

1577、1578、1579、1580、1581、1582、1583、1584、1585、1586、
1587、1588、1589、1590、1591、1592、1593、1594、1595、1596、
1597、1598、1599、1600、1601、1602、1603、1604、1605、1606、
1607、1608、1609、1610、1611、1612、1613、1614、1615、1616、
1617、1618、1619、1620、1621、1622、1623、1624、1625、1626、
1627、1628、1629、1630、1631、1632、1633、1634、1635、1636、
1637、1638、1639、1640、1641、1642、1643、1644、1645、1646、
1647、1648、1649、1650、1651、1652、1653、1654、1655、1656、
1657、1658、1659、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、
1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、1676、
1677、1678、1679、1680、1681、1682、1683、1684、1685、1686、
1687、1688、1689、1690、1691、1692、1693、1694、1695、1696、
1697、1698、1699、1700、1701、1702、1703、1704、1705、1706、
1707、1708、1709、1710、1711、1712、1713、1714、1715、1716、
1717、1718、1719、1720、1721、1722、1723、1724、1725、1726、
1727、1728、1729、1730、1731、1732、1733、1734、1735、1736、
1737、1738、1739、1740、1741、1742、1743、1744、1745、1746、
1747、1748、1749、1750、1751、1752、1753、1754、1755、1756、
1757、1758、1759、1760、1761、1762、1763、1764、1765、1766、
1767、1768、1769、1770、1771、1772、1773、1774、1775、1776、
1777、1778、1779、1780、1781、1782、1783、1784、1785、1786、
1787、1788、1789、1790、1791、1792、1793、1794、1795、1796、
1797、1798、1799、1800、1801、1802、1803、1804、1805、1806、

1807、1808、1809、1810、1811、1812、1813、1814、1815、1816、
1817、1818、1819、1820、1821、1822、1823、1824、1825、1826、
1827、1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835、1836、
1837、1838、1839、1840、1841、1842、1843、1844、1845、1846、
1847、1848、1849、1850、1851、1852、1853、1854、1855、1856、
1857、1858、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1866、
1867、1868、1869、1870、1871、1872、1873、1874、1875、1876、
1877、1878、1879、1880、1881、1882、1883、1884、1885、1886、
1887、1888、1889、1890、1891、1892、1893、1894、1895、1896、
1897、1898、1899、1900、1901、1902、1903、1904、1905、1906、
1907、1908、1909、1910、1911、1912、1913、1914、1915、1916、
1917、1918、1919、1920、1921、1922、1923、1924、1925、1926、
1927、1928、1929、1930、1931、1932、1933、1934、1935、1936、
1937、1938、1939、1940、1941、1942、1943、1944、1945、1946、
1947、1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955、1956、
1957、1958、1959、1960、1961、1962、1963、1964、1965、1966、
1967、1968、1969、1970、1971、1972、1973、1974、1975、1976、
1977、1978、1979、1980、1981、1982、1983、1984、1985、1986、
1987、1988、1989、1990、1991、1992、1993、1994、1995、1996、
1997、1998、1999、2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、
2007、2008、2009、2010、2011、2012、2013、2014、2015、2016、
2017、2018、2019、2020、2021、2022、2023、2024、2025、2026、
2027、2028、2029、2030、2031、2032、2033、2034、2035、2036、

2037、2038、2039、2040、2041、2042、2043、2044、2045、2046、
2047、2048、2049、2050、2051、2052、2053、2054、2055、2056、
2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、
2067、2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、
2077、2078、2079、2080、2081、2082、2083、2084、2085、2086、
2087、2088、2089、2090、2091、2092、2093、2094、2095、2096、
2097、2098、2099、2100、2101、2102、2103、2104、2105、2106、
2107、2108、2109、2110、2111、2112、2113、2114、2115、2116、
2117、2118、2119、2120、2121、2122、2123、2124、2125、2126、
2127、2128、2129、2130、2131、2132、2133、2134、2135、2136、
2137、2138、2139、2140、2141、2142、2143、2144、2145、2146、
2147、2148、2149、2150、2151、2152、2153、2154、2155、2156、
2157、2158、2159、2160、2161、2162、2163、2164、2165、2166、
2167、2168、2169、2170、2171、2172、2173、2174、2175、2176、
2177、2178、2179、2180、2181、2182、2183、2184、2185、2186、
2187、2188、2189、2190、2191、2192、2193、2194、2195、2196、
2197、2198、2199、2200、2201、2202、2203、2204、2205、2206、
2207、2208、2209、2210、2211、2212、2213、2214、2215、2216、
2217、2218、2219、2220、2221、2222、2223、2224、2225、2226、
2227、2228、2229、2230、2231、2232、2233、2234、2235、2236、
2237、2238、2239、2240、2241、2242、2243、2244、2245、2246、
2247、2248、2249、2250、2251、2252、2253、2254、2255、2256、
2257、2258、2259、2260、2261、2262、2263、2264、2265、2266、

2267、2268、2269、2270、2271、2272、2273、2274、2275、2276、
2277、2278、2279、2280、2281、2282、2283、2284、2285、2286、
2287、2288、2289、2290、2291、2292、2293、2294、2295、2296、
2297、2298、2299、2300、2301、2302、2303、2304、2305、2306、
2307、2308、2309、2310、2311、2312、2313、2314、2315、2316、
2317、2318、2319、2320、2321、2322、2323、2324、2325、2326、
2327、2328、2329、2330、2331、2332、2333、2334、2335、2336、
2337、2338、2339、2340、2341、2342、2343、2344、2345、2346、
2347、2348、2349、2350、2351、2352、2353、2354、2355、2356、
2357、2358、2359、2360、2361、2362、2363、2364、2365、2366、
2367、2368、2369、2370、2371、2372、2373、2374、2375、2376、
2377、2378、2379、2380、2381、2382、2383、2384、2385、2386、
2387、2388、2389、2390、2391、2392、2393、2394、2395、2396、
2397、2398、2399、2400、2401、2402、2403、2404、2405、2406、
2407、2408、2409、2410、2411、2412、2413、2414、2415、2416、
2417、2418、2419、2420、2421、2422、2423、2424、2425、2426、
2427、2428、2429、2430、2431、2432、2433、2434、2435、2436、
2437、2438、2439、2440、2441、2442、2443、2444、2445、2446、
2447、2448、2449、2450、2451、2452、2453、2454、2455、2456、
2457、2458、2459、2460、2461、2462、2463、2464、2465、2466、
2467、2468、2469、2470、2471、2472、2473、2474、2475、2476、
2477、2478、2479、2480、2481、2482、2483、2484、2485、2486、
2487、2488、2489、2490、2491、2492、2493、2494、2495、2496、

2497、2498、2499、2500、2501、2502、2503、2504、2505、2506、
2507、2508、2509、2510、2511、2512、2513、2514、2515、2516、
2517、2518、2519、2520、2521、2522、2523、2524、2525、2526、
2527、2528、2529、2530、2531、2532、2533、2534、2535、2536、
2537、2538、2539、2540、2541、2542、2543、2544、2545、2546、
2547、2548、2549、2550、2551、2552、2553、2554、2555、2556、
2557、2558、2559、2560、2561、2562、2563、2564、2565、2566、
2567、2568、2569、2570、2571、2572、2573、2574、2575、2576、
2577、2578、2579、2580、2581、2582、2583、2584、2585、2586、
2587、2588、2589、2590、2591、2592、2593、2594、2595、2596、
2597、2598、2599、2600、2601、2602、2603、2604、2605、2606、
2607、2608、2609、2610、2611、2612、2613、2614、2615、2616、
2617、2618、2619、2620、2621、2622、2623、2624、2625、2626、
2627、2628、2629、2630、2631、2632、2633、2634、2635、2636、
2637、2638、2639、2640、2641、2642、2643、2644、2645、2646、
2647、2648、2649、2650、2651、2652、2653、2654、2655、2656、
2657、2658、2659、2660、2661、2662、2663、2664、2665、2666、
2667、2668、2669、2670、2671、2672、2673、2674、2675、2676、
2677、2678、2679、2680、2681、2682、2683、2684、2685、2686、
2687、2688、2689、2690、2691、2692、2693、2694、2695、2696、
2697、2698、2699、2700、2701、2702、2703、2704、2705、2706、
2707、2708、2709、2710、2711、2712、2713、2714、2715、2716、
2717、2718、2719、2720、2721、2722、2723、2724、2725、2726、

2727、2728、2729、2730、2731、2732、2733、2734、2735、2736、
2737、2738、2739、2740、2741、2742、2743、2744、2745、2746、
2747、2748、2749、2750、2751、2752、2753、2754、2755、2756、
2757、2758、2759、2760、2761、2762、2763、2764、2765、2766、
2767、2768、2769、2770、2771、2772、2773、2774、2775、2776、
2777、2778、2779、2780、2781、2782、2783、2784、2785、2786、
2787、2788、2789、2790、2791、2792、2793、2794、2795、2796、
2797、2798、2799、2800、2801、2802、2803、2804、2805、2806、
2807、2808、2809、2810、2811、2812、2813、2814、2815、2816、
2817、2818、2819、2820、2821、2822、2823、2824、2825、2826、
2827、2828、2829、2830、2831、2832、2833、2834、2835、2836、
2837、2838、2839、2840、2841、2842、2843、2844、2845、2846、
2847、2848、2849、2850、2851、2852、2853、2854、2855、2856、
2857、2858、2859、2860、2861、2862、2863、2864、2865、2866、
2867、2868、2869、2870、2871、2872、2873、2874、2875、2876、
2877、2878、2879、2880、2881、2882、2883、2884、2885、2886、
2887、2888、2889、2890、2891、2892、2893、2894、2895、2896、
2897、2898、2899、2900、2901、2902、2903、2904、2905、2906、
2907、2908、2909、2910、2911、2912、2913、2914、2915、2916、
2917、2918、2919、2920、2921、2922、2923、2924、2925、2926、
2927、2928、2929、2930、2931、2932、2933、2934、2935、2936、
2937、2938、2939、2940、2941、2942、2943、2944、2945、2946、
2947、2948、2949、2950、2951、2952、2953、2954、2955、2956、

2957、2958、2959、2960、2961、2962、2963、2964、2965、2966、
2967、2968、2969、2970、2971、2972、2973、2974、2975、2976、
2977、2978、2979、2980、2981、2982、2983、2984、2985、2986、
2987、2988、2989、2990、2991、2992、2993、2994、2995、2996、
2997、2998、2999、3000、3001、3002、3003、3004、3005、3006、
3007、3008、3009、3010、3011、3012、3013、3014、3015、3016、
3017、3018、3019、3020、3021、3022、3023、3024、3025、3026、
3027、3028、3029、3030、3031、3032、3033、3034、3035、3036、
3037、3038、3039、3040、3041、3042、3043、3044、3045、3046、
3047、3048、3049、3050、3051、3052、3053、3054、3055、3056、
3057、3058、3059、3060、3061、3062、3063、3064、3065、3066、
3067、3068、3069、3070、3071、3072、3073、3074、3075、3076、
3077、3078、3079、3080、3081、3082、3083、3084、3085、3086、
3087、3088、3089、3090、3091、3092、3093、3094、3095、3096、
3097、3098、3099、3100、3101、3102、3103、3104、3105、3106、
3107、3108、3109、3110、3111、3112、3113、3114、3115、3116、
3117、3118、3119、3120、3121、3122、3123、3124、3125、3126、
3127、3128、3129、3130、3131、3132、3133、3134、3135、3136、
3137、3138、3139、3140、3141、3142、3143、3144、3145、3146、
3147、3148、3149、3150、3151、3152、3153、3154、3155、3156、
3157、3158、3159、3160、3161、3162、3163、3164、3165、3166、
3167、3168、3169、3170、3171、3172、3173、3174、3175、3176、
3177、3178、3179、3180、3181、3182、3183、3184、3185、3186、

3187、3188、3189、3190、3191、3192、3193、3194、3195、3196、
3197、3198、3199、3200、3201、3202、3203、3204、3205、3206、
3207、3208、3209、3210、3211、3212、3213、3214、3215、3216、
3217、3218、3219、3220、3221、3222、3223、3224、3225、3226、
3227、3228、3229、3230、3231、3232、3233、3234、3235、3236、
3237、3238、3239、3240、3241、3242、3243、3244、3245、3246、
3247、3248、3249及3250個核苷酸。病毒基因組之任何填充區域之長度
可 為50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-
400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-
750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、
1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-
1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、
1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-
1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、
2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-
2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、
2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-
3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200及3200-3250個
核苷酸。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約55 個核苷酸之填
充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約56 個核苷酸之填
充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約97 個核苷酸之填
充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約103 個核苷酸之填
充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約105 個核苷酸之填

充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約357 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約363 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約712 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約714 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1203 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1209 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1512 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1519 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2395 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2403 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2405 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約3013 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約3021 個核苷酸之填充區域。

【0386】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個多填充序列區域。填充區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下長度：50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、

145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、
157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、
169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、
181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、
193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、
205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、
217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、
229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、
241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、
253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、
265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、
277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、
289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、
301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、
313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、
325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、
337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、
349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、
361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、
373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、
385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、
397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、
409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、

421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、
433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、
445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、
457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、
469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、
481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、
493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、
505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、
517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、
529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、
541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、
553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、
565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、
577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、
589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、
601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、
613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、
625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、
637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、
649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、
661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、
673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、
685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、

697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、
709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、
721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、
733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、
745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、
757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、
769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、
781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、
793、794、795、796、797、798、799、800、801、802、803、804、
805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、
817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、
829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、
841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、
853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、
865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、
877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、
889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899、900、
901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、
913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、
925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、
937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、
949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、
961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、

973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、
985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、
997、998、999、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、
1007、1008、1009、1010、1011、1012、1013、1014、1015、1016、
1017、1018、1019、1020、1021、1022、1023、1024、1025、1026、
1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、1035、1036、
1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、
1047、1048、1049、1050、1051、1052、1053、1054、1055、1056、
1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、1064、1065、1066、
1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、1075、1076、
1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、
1087、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、
1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1106、
1107、1108、1109、1110、1111、1112、1113、1114、1115、1116、
1117、1118、1119、1120、1121、1122、1123、1124、1125、1126、
1127、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134、1135、1136、
1137、1138、1139、1140、1141、1142、1143、1144、1145、1146、
1147、1148、1149、1150、1151、1152、1153、1154、1155、1156、
1157、1158、1159、1160、1161、1162、1163、1164、1165、1166、
1167、1168、1169、1170、1171、1172、1173、1174、1175、1176、
1177、1178、1179、1180、1181、1182、1183、1184、1185、1186、
1187、1188、1189、1190、1191、1192、1193、1194、1195、1196、
1197、1198、1199、1200、1201、1202、1203、1204、1205、1206、

1207、1208、1209、1210、1211、1212、1213、1214、1215、1216、
1217、1218、1219、1220、1221、1222、1223、1224、1225、1226、
1227、1228、1229、1230、1231、1232、1233、1234、1235、1236、
1237、1238、1239、1240、1241、1242、1243、1244、1245、1246、
1247、1248、1249、1250、1251、1252、1253、1254、1255、1256、
1257、1258、1259、1260、1261、1262、1263、1264、1265、1266、
1267、1268、1269、1270、1271、1272、1273、1274、1275、1276、
1277、1278、1279、1280、1281、1282、1283、1284、1285、1286、
1287、1288、1289、1290、1291、1292、1293、1294、1295、1296、
1297、1298、1299、1300、1301、1302、1303、1304、1305、1306、
1307、1308、1309、1310、1311、1312、1313、1314、1315、1316、
1317、1318、1319、1320、1321、1322、1323、1324、1325、1326、
1327、1328、1329、1330、1331、1332、1333、1334、1335、1336、
1337、1338、1339、1340、1341、1342、1343、1344、1345、1346、
1347、1348、1349、1350、1351、1352、1353、1354、1355、1356、
1357、1358、1359、1360、1361、1362、1363、1364、1365、1366、
1367、1368、1369、1370、1371、1372、1373、1374、1375、1376、
1377、1378、1379、1380、1381、1382、1383、1384、1385、1386、
1387、1388、1389、1390、1391、1392、1393、1394、1395、1396、
1397、1398、1399、1400、1401、1402、1403、1404、1405、1406、
1407、1408、1409、1410、1411、1412、1413、1414、1415、1416、
1417、1418、1419、1420、1421、1422、1423、1424、1425、1426、
1427、1428、1429、1430、1431、1432、1433、1434、1435、1436、

1437、1438、1439、1440、1441、1442、1443、1444、1445、1446、
1447、1448、1449、1450、1451、1452、1453、1454、1455、1456、
1457、1458、1459、1460、1461、1462、1463、1464、1465、1466、
1467、1468、1469、1470、1471、1472、1473、1474、1475、1476、
1477、1478、1479、1480、1481、1482、1483、1484、1485、1486、
1487、1488、1489、1490、1491、1492、1493、1494、1495、1496、
1497、1498、1499、1500、1501、1502、1503、1504、1505、1506、
1507、1508、1509、1510、1511、1512、1513、1514、1515、1516、
1517、1518、1519、1520、1521、1522、1523、1524、1525、1526、
1527、1528、1529、1530、1531、1532、1533、1534、1535、1536、
1537、1538、1539、1540、1541、1542、1543、1544、1545、1546、
1547、1548、1549、1550、1551、1552、1553、1554、1555、1556、
1557、1558、1559、1560、1561、1562、1563、1564、1565、1566、
1567、1568、1569、1570、1571、1572、1573、1574、1575、1576、
1577、1578、1579、1580、1581、1582、1583、1584、1585、1586、
1587、1588、1589、1590、1591、1592、1593、1594、1595、1596、
1597、1598、1599、1600、1601、1602、1603、1604、1605、1606、
1607、1608、1609、1610、1611、1612、1613、1614、1615、1616、
1617、1618、1619、1620、1621、1622、1623、1624、1625、1626、
1627、1628、1629、1630、1631、1632、1633、1634、1635、1636、
1637、1638、1639、1640、1641、1642、1643、1644、1645、1646、
1647、1648、1649、1650、1651、1652、1653、1654、1655、1656、
1657、1658、1659、1660、1661、1662、1663、1664、1665、1666、

1667、1668、1669、1670、1671、1672、1673、1674、1675、1676、
1677、1678、1679、1680、1681、1682、1683、1684、1685、1686、
1687、1688、1689、1690、1691、1692、1693、1694、1695、1696、
1697、1698、1699、1700、1701、1702、1703、1704、1705、1706、
1707、1708、1709、1710、1711、1712、1713、1714、1715、1716、
1717、1718、1719、1720、1721、1722、1723、1724、1725、1726、
1727、1728、1729、1730、1731、1732、1733、1734、1735、1736、
1737、1738、1739、1740、1741、1742、1743、1744、1745、1746、
1747、1748、1749、1750、1751、1752、1753、1754、1755、1756、
1757、1758、1759、1760、1761、1762、1763、1764、1765、1766、
1767、1768、1769、1770、1771、1772、1773、1774、1775、1776、
1777、1778、1779、1780、1781、1782、1783、1784、1785、1786、
1787、1788、1789、1790、1791、1792、1793、1794、1795、1796、
1797、1798、1799、1800、1801、1802、1803、1804、1805、1806、
1807、1808、1809、1810、1811、1812、1813、1814、1815、1816、
1817、1818、1819、1820、1821、1822、1823、1824、1825、1826、
1827、1828、1829、1830、1831、1832、1833、1834、1835、1836、
1837、1838、1839、1840、1841、1842、1843、1844、1845、1846、
1847、1848、1849、1850、1851、1852、1853、1854、1855、1856、
1857、1858、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1866、
1867、1868、1869、1870、1871、1872、1873、1874、1875、1876、
1877、1878、1879、1880、1881、1882、1883、1884、1885、1886、
1887、1888、1889、1890、1891、1892、1893、1894、1895、1896、

1897、1898、1899、1900、1901、1902、1903、1904、1905、1906、
1907、1908、1909、1910、1911、1912、1913、1914、1915、1916、
1917、1918、1919、1920、1921、1922、1923、1924、1925、1926、
1927、1928、1929、1930、1931、1932、1933、1934、1935、1936、
1937、1938、1939、1940、1941、1942、1943、1944、1945、1946、
1947、1948、1949、1950、1951、1952、1953、1954、1955、1956、
1957、1958、1959、1960、1961、1962、1963、1964、1965、1966、
1967、1968、1969、1970、1971、1972、1973、1974、1975、1976、
1977、1978、1979、1980、1981、1982、1983、1984、1985、1986、
1987、1988、1989、1990、1991、1992、1993、1994、1995、1996、
1997、1998、1999、2000、2001、2002、2003、2004、2005、2006、
2007、2008、2009、2010、2011、2012、2013、2014、2015、2016、
2017、2018、2019、2020、2021、2022、2023、2024、2025、2026、
2027、2028、2029、2030、2031、2032、2033、2034、2035、2036、
2037、2038、2039、2040、2041、2042、2043、2044、2045、2046、
2047、2048、2049、2050、2051、2052、2053、2054、2055、2056、
2057、2058、2059、2060、2061、2062、2063、2064、2065、2066、
2067、2068、2069、2070、2071、2072、2073、2074、2075、2076、
2077、2078、2079、2080、2081、2082、2083、2084、2085、2086、
2087、2088、2089、2090、2091、2092、2093、2094、2095、2096、
2097、2098、2099、2100、2101、2102、2103、2104、2105、2106、
2107、2108、2109、2110、2111、2112、2113、2114、2115、2116、
2117、2118、2119、2120、2121、2122、2123、2124、2125、2126、

2127、2128、2129、2130、2131、2132、2133、2134、2135、2136、
2137、2138、2139、2140、2141、2142、2143、2144、2145、2146、
2147、2148、2149、2150、2151、2152、2153、2154、2155、2156、
2157、2158、2159、2160、2161、2162、2163、2164、2165、2166、
2167、2168、2169、2170、2171、2172、2173、2174、2175、2176、
2177、2178、2179、2180、2181、2182、2183、2184、2185、2186、
2187、2188、2189、2190、2191、2192、2193、2194、2195、2196、
2197、2198、2199、2200、2201、2202、2203、2204、2205、2206、
2207、2208、2209、2210、2211、2212、2213、2214、2215、2216、
2217、2218、2219、2220、2221、2222、2223、2224、2225、2226、
2227、2228、2229、2230、2231、2232、2233、2234、2235、2236、
2237、2238、2239、2240、2241、2242、2243、2244、2245、2246、
2247、2248、2249、2250、2251、2252、2253、2254、2255、2256、
2257、2258、2259、2260、2261、2262、2263、2264、2265、2266、
2267、2268、2269、2270、2271、2272、2273、2274、2275、2276、
2277、2278、2279、2280、2281、2282、2283、2284、2285、2286、
2287、2288、2289、2290、2291、2292、2293、2294、2295、2296、
2297、2298、2299、2300、2301、2302、2303、2304、2305、2306、
2307、2308、2309、2310、2311、2312、2313、2314、2315、2316、
2317、2318、2319、2320、2321、2322、2323、2324、2325、2326、
2327、2328、2329、2330、2331、2332、2333、2334、2335、2336、
2337、2338、2339、2340、2341、2342、2343、2344、2345、2346、
2347、2348、2349、2350、2351、2352、2353、2354、2355、2356、

2357、2358、2359、2360、2361、2362、2363、2364、2365、2366、
2367、2368、2369、2370、2371、2372、2373、2374、2375、2376、
2377、2378、2379、2380、2381、2382、2383、2384、2385、2386、
2387、2388、2389、2390、2391、2392、2393、2394、2395、2396、
2397、2398、2399、2400、2401、2402、2403、2404、2405、2406、
2407、2408、2409、2410、2411、2412、2413、2414、2415、2416、
2417、2418、2419、2420、2421、2422、2423、2424、2425、2426、
2427、2428、2429、2430、2431、2432、2433、2434、2435、2436、
2437、2438、2439、2440、2441、2442、2443、2444、2445、2446、
2447、2448、2449、2450、2451、2452、2453、2454、2455、2456、
2457、2458、2459、2460、2461、2462、2463、2464、2465、2466、
2467、2468、2469、2470、2471、2472、2473、2474、2475、2476、
2477、2478、2479、2480、2481、2482、2483、2484、2485、2486、
2487、2488、2489、2490、2491、2492、2493、2494、2495、2496、
2497、2498、2499、2500、2501、2502、2503、2504、2505、2506、
2507、2508、2509、2510、2511、2512、2513、2514、2515、2516、
2517、2518、2519、2520、2521、2522、2523、2524、2525、2526、
2527、2528、2529、2530、2531、2532、2533、2534、2535、2536、
2537、2538、2539、2540、2541、2542、2543、2544、2545、2546、
2547、2548、2549、2550、2551、2552、2553、2554、2555、2556、
2557、2558、2559、2560、2561、2562、2563、2564、2565、2566、
2567、2568、2569、2570、2571、2572、2573、2574、2575、2576、
2577、2578、2579、2580、2581、2582、2583、2584、2585、2586、

2587、2588、2589、2590、2591、2592、2593、2594、2595、2596、
2597、2598、2599、2600、2601、2602、2603、2604、2605、2606、
2607、2608、2609、2610、2611、2612、2613、2614、2615、2616、
2617、2618、2619、2620、2621、2622、2623、2624、2625、2626、
2627、2628、2629、2630、2631、2632、2633、2634、2635、2636、
2637、2638、2639、2640、2641、2642、2643、2644、2645、2646、
2647、2648、2649、2650、2651、2652、2653、2654、2655、2656、
2657、2658、2659、2660、2661、2662、2663、2664、2665、2666、
2667、2668、2669、2670、2671、2672、2673、2674、2675、2676、
2677、2678、2679、2680、2681、2682、2683、2684、2685、2686、
2687、2688、2689、2690、2691、2692、2693、2694、2695、2696、
2697、2698、2699、2700、2701、2702、2703、2704、2705、2706、
2707、2708、2709、2710、2711、2712、2713、2714、2715、2716、
2717、2718、2719、2720、2721、2722、2723、2724、2725、2726、
2727、2728、2729、2730、2731、2732、2733、2734、2735、2736、
2737、2738、2739、2740、2741、2742、2743、2744、2745、2746、
2747、2748、2749、2750、2751、2752、2753、2754、2755、2756、
2757、2758、2759、2760、2761、2762、2763、2764、2765、2766、
2767、2768、2769、2770、2771、2772、2773、2774、2775、2776、
2777、2778、2779、2780、2781、2782、2783、2784、2785、2786、
2787、2788、2789、2790、2791、2792、2793、2794、2795、2796、
2797、2798、2799、2800、2801、2802、2803、2804、2805、2806、
2807、2808、2809、2810、2811、2812、2813、2814、2815、2816、

2817、2818、2819、2820、2821、2822、2823、2824、2825、2826、
2827、2828、2829、2830、2831、2832、2833、2834、2835、2836、
2837、2838、2839、2840、2841、2842、2843、2844、2845、2846、
2847、2848、2849、2850、2851、2852、2853、2854、2855、2856、
2857、2858、2859、2860、2861、2862、2863、2864、2865、2866、
2867、2868、2869、2870、2871、2872、2873、2874、2875、2876、
2877、2878、2879、2880、2881、2882、2883、2884、2885、2886、
2887、2888、2889、2890、2891、2892、2893、2894、2895、2896、
2897、2898、2899、2900、2901、2902、2903、2904、2905、2906、
2907、2908、2909、2910、2911、2912、2913、2914、2915、2916、
2917、2918、2919、2920、2921、2922、2923、2924、2925、2926、
2927、2928、2929、2930、2931、2932、2933、2934、2935、2936、
2937、2938、2939、2940、2941、2942、2943、2944、2945、2946、
2947、2948、2949、2950、2951、2952、2953、2954、2955、2956、
2957、2958、2959、2960、2961、2962、2963、2964、2965、2966、
2967、2968、2969、2970、2971、2972、2973、2974、2975、2976、
2977、2978、2979、2980、2981、2982、2983、2984、2985、2986、
2987、2988、2989、2990、2991、2992、2993、2994、2995、2996、
2997、2998、2999、3000、3001、3002、3003、3004、3005、3006、
3007、3008、3009、3010、3011、3012、3013、3014、3015、3016、
3017、3018、3019、3020、3021、3022、3023、3024、3025、3026、
3027、3028、3029、3030、3031、3032、3033、3034、3035、3036、
3037、3038、3039、3040、3041、3042、3043、3044、3045、3046、

3047、3048、3049、3050、3051、3052、3053、3054、3055、3056、
3057、3058、3059、3060、3061、3062、3063、3064、3065、3066、
3067、3068、3069、3070、3071、3072、3073、3074、3075、3076、
3077、3078、3079、3080、3081、3082、3083、3084、3085、3086、
3087、3088、3089、3090、3091、3092、3093、3094、3095、3096、
3097、3098、3099、3100、3101、3102、3103、3104、3105、3106、
3107、3108、3109、3110、3111、3112、3113、3114、3115、3116、
3117、3118、3119、3120、3121、3122、3123、3124、3125、3126、
3127、3128、3129、3130、3131、3132、3133、3134、3135、3136、
3137、3138、3139、3140、3141、3142、3143、3144、3145、3146、
3147、3148、3149、3150、3151、3152、3153、3154、3155、3156、
3157、3158、3159、3160、3161、3162、3163、3164、3165、3166、
3167、3168、3169、3170、3171、3172、3173、3174、3175、3176、
3177、3178、3179、3180、3181、3182、3183、3184、3185、3186、
3187、3188、3189、3190、3191、3192、3193、3194、3195、3196、
3197、3198、3199、3200、3201、3202、3203、3204、3205、3206、
3207、3208、3209、3210、3211、3212、3213、3214、3215、3216、
3217、3218、3219、3220、3221、3222、3223、3224、3225、3226、
3227、3228、3229、3230、3231、3232、3233、3234、3235、3236、
3237、3238、3239、3240、3241、3242、3243、3244、3245、3246、
3247、3248、3249及3250個核苷酸。病毒基因組之任何填充區域之長度
可 為50-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-
400、400-450、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-

750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1150、1150-1200、1200-1250、1250-1300、1300-1350、1350-1400、1400-1450、1450-1500、1500-1550、1550-1600、1600-1650、1650-1700、1700-1750、1750-1800、1800-1850、1850-1900、1900-1950、1950-2000、2000-2050、2050-2100、2100-2150、2150-2200、2200-2250、2250-2300、2300-2350、2350-2400、2400-2450、2450-2500、2500-2550、2550-2600、2600-2650、2650-2700、2700-2750、2750-2800、2800-2850、2850-2900、2900-2950、2950-3000、3000-3050、3050-3100、3100-3150、3150-3200及3200-3250個核苷酸。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約55 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約56 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約97 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約103 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約105 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約357 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約363 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約712 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約714 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1203 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1209 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1512 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約1519 個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2395 個

核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2403個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約2405個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約3013個核苷酸之填充區域。在非限制性實例中，病毒基因組包含長度為約3021個核苷酸之填充區域。

【0387】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個強化子序列區域。強化子序列區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下之長度：300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399及400個核苷酸。病毒基因組之強化子區域之長度可為300-310、300-325、305-315、310-320、315-325、320-330、325-335、325-350、330-340、335-345、340-350、345-355、350-360、350-375、355-365、360-370、365-375、370-380、375-385、375-400、380-390、385-395及390-400個核苷酸。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約303個核苷酸之強化子區域。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約382個核苷酸之強化子區域。

【0388】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個啟

動子序列區域。啟動子序列區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下之長度：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、

288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、
300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、
312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、
324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、
336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、
348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、
360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、
372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、
384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、
396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、
408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、
420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、
432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、
444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、
456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、
468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、
480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、
492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、
504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、
516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、
528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、
540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、
552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、

564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、
576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、
588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599及
600個核苷酸。病毒基因組之啟動子區域之長度可為4-10、10-20、10-
50、20-30、30-40、40-50、50-60、50-100、60-70、70-80、80-90、
90-100、100-110、100-150、110-120、120-130、130-140、140-150、
150-160、150-200、160-170、170-180、180-190、190-200、200-210、
200-250、210-220、220-230、230-240、240-250、250-260、250-300、
260-270、270-280、280-290、290-300、300-310、300-350、310-320、
320-330、330-340、340-350、350-360、350-400、360-370、370-380、
380-390、390-400、400-410、400-450、410-420、420-430、430-440、
440-450、450-460、450-500、460-470、470-480、480-490、490-500、
500-510、500-550、510-520、520-530、530-540、540-550、550-560、
550-600、560-570、570-580、580-590及590-600個核苷酸。作為非限制
性實例，病毒基因組包含長度為約4個核苷酸之啟動子區域。作為非限制
性實例，病毒基因組包含長度為約17個核苷酸之啟動子區域。作為非限制
性實例，病毒基因組包含長度為約204個核苷酸之啟動子區域。作為非限
制性實例，病毒基因組包含長度為約219個核苷酸之啟動子區域。作為非
限制性實例，病毒基因組包含長度為約260個核苷酸之啟動子區域。作為
非限制性實例，病毒基因組包含長度為約303個核苷酸之啟動子區域。作
為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約382個核苷酸之啟動子區域。
作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約588個核苷酸之啟動子區
域。

【0389】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個外顯子序列區域。外顯子區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下之長度：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149及150個核苷酸。病毒基因組之外顯子區域之長度可為2-10、5-10、5-15、10-20、10-30、10-40、15-20、15-25、20-30、20-40、20-50、25-30、25-35、30-40、30-50、30-60、35-40、35-45、40-50、40-60、40-70、45-50、45-55、50-60、50-70、50-80、55-60、55-65、60-70、60-80、60-90、65-70、65-75、70-80、70-90、70-100、75-80、75-85、80-90、80-100、80-110、85-90、85-95、90-100、90-110、90-120、95-100、95-105、100-110、100-120、100-130、105-110、105-115、110-120、110-130、110-140、115-120、115-125、120-130、120-140、120-150、125-130、125-135、130-140、130-150、135-140、135-145、140-150及145-150個核苷酸。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約53個核苷酸之外顯子區域。作為非限制

性實例，病毒基因組包含長度為約134個核苷酸之外顯子區域。

【0390】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個內含子序列區域。內含子區域可獨立地具有諸如(但不限於)以下之長度：

25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、
40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、
55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、
70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、
85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、
100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、
112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、
124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、
136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、
148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、
160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、
172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、
184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、
196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、
208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、
220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、
232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、
244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、
256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、
268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、

280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、
292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、
304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、
316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、
328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、
340、341、342、343、344、345、346、347、348、349及350個核
苷酸。病毒基因組之內含子區域之長度可為25-35、25-50、35-45、45-55、
50-75、55-65、65-75、75-85、75-100、85-95、95-105、100-125、
105-115、115-125、125-135、125-150、135-145、145-155、150-175、
155-165、165-175、175-185、175-200、185-195、195-205、200-225、
205-215、215-225、225-235、225-250、235-245、245-255、250-275、
255-265、265-275、275-285、275-300、285-295、295-305、300-325、
305-315、315-325、325-335、325-350及335-345個核苷酸。作為非限制
性實例，病毒基因組包含長度為約32個核苷酸之內含子區域。作為非限制
性實例，病毒基因組包含長度為約172個核苷酸之內含子區域。作為非限
制性實例，病毒基因組包含長度為約201個核苷酸之內含子區域。作為非
限制性實例，病毒基因組包含長度為約347個核苷酸之內含子區域。

【0391】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組可包含至少一個聚
腺苷酸化信號序列區域。聚腺苷酸化信號序列區域可獨立地具有諸如(但
不限於)以下之長度：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、
16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、
31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、
46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、

61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、
76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、
91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、
105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、
117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、
129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、
141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、
153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、
165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、
177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、
189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、
201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、
213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、
225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、
237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、
249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、
261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、
273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、
285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、
297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、
309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、
321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、
333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、

345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、
357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、
369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、
381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、
393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、
405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、
417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、
429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、
441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、
453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、
465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、
477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、
489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、
501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、
513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、
525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、
537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、
549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、
561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、
573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、
585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、
597、598、599及600個核苷酸。病毒基因組之聚腺苷酸化信號序列區域
之長度可為4-10、10-20、10-50、20-30、30-40、40-50、50-60、50-

100、60-70、70-80、80-90、90-100、100-110、100-150、110-120、120-130、130-140、140-150、150-160、150-200、160-170、170-180、180-190、190-200、200-210、200-250、210-220、220-230、230-240、240-250、250-260、250-300、260-270、270-280、280-290、290-300、300-310、300-350、310-320、320-330、330-340、340-350、350-360、350-400、360-370、370-380、380-390、390-400、400-410、400-450、410-420、420-430、430-440、440-450、450-460、450-500、460-470、470-480、480-490、490-500、500-510、500-550、510-520、520-530、530-540、540-550、550-560、550-600、560-570、570-580、580-590及590-600個核苷酸。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約127個核苷酸之聚腺苷酸化信號序列區域。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約225個核苷酸之聚腺苷酸化信號序列區域。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約476個核苷酸之聚腺苷酸化信號序列區域。作為非限制性實例，病毒基因組包含長度為約477個核苷酸之聚腺苷酸化信號序列區域。

【0392】 在一個實施例中，AAV粒子病毒基因組包含超過一個polyA信號序列區域。

【0393】 包含具有包含調節聚核苷酸序列的有效負載區域之病毒基因組的AAV粒子之ITR至ITR序列之非限制性實例描述於表9中。

表9. 包含調節聚核苷酸之AAV粒子之ITR至ITR序列

ITR至ITR 構築體名稱	ITR至ITR SEQ ID NO	調節聚核苷酸SEQ ID NO
VOYSOD10	122	65
VOYSOD11	123	63
VOYSOD12	124	74
VOYSOD13	125	62
VOYSOD14	126	66

VOYSOD15	127	73
VOYSOD16	128	62
VOYSOD17	129	65
VOYSOD18	130	77
VOYSOD19	131	75
VOYSOD20	132	78
VOYSOD21	133	64
VOYSOD22	134	68
VOYSOD23	135	72
VOYSOD24	136	70
VOYSOD25	137	60
VOYSOD26	138	61
VOYSOD27	139	76
VOYSOD28	140	71
VOYSOD29	141	69
VOYSOD30	142	59
VOYSOD31	143	67
VOYSOD32	144	79
VOYSOD33	145	62
VOYSOD34	146	65

【0394】 在一個實施例中，AAV粒子包含含有與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有一定百分比一致性的序列的病毒基因組。病毒基因組可與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%一致性。病毒基因組可與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有1-10%、10-20%、30-40%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-99%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-99%、60-100%、70-80%、70-90%、70-99%、70-100%、80-85%、80-90%、80-95%、80-99%、80-100%、90-95%、90-99%或90-100%一致性。作為非限制性實例，病毒基因組包含與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有80%一致性之序列。作為另一非限制性實例，病毒基因組包含與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有85%一致性之序列。作為另一非限制性實例，病毒基

因組包含與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有90%一致性之序列。作為另一非限制性實例，病毒基因組包含與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有95%一致性之序列。作為另一非限制性實例，病毒基因組包含與SEQ ID NO: 122至SEQ ID NO: 146中之任一者具有99%一致性之序列。

【0395】 AAV粒子可經修飾以增強遞送效率。包含編碼本發明之siRNA分子之核酸序列的此類經修飾之AAV粒子可經有效封裝且可用於以高頻率及極小毒性成功感染靶細胞。

【0396】 在一些實施例中，包含編碼本發明之siRNA分子之核酸序列的AAV粒子可為人類血清型AAV粒子。此類人類AAV粒子可源自任何已知血清型，例如血清型AAV1至AAV11中之任一者。作為非限制性實例，AAV粒子可為：包含AAV1衍生之衣殼中的AAV1衍生之基因組之載體；包含AAV2衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；包含AAV4衍生之衣殼中的AAV4衍生之基因組之載體；包含AAV6衍生之衣殼中的AAV6衍生之基因組之載體；或包含AAV9衍生之衣殼中的AAV9衍生之基因組之載體。

【0397】 在其他實施例中，包含用於編碼本發明之siRNA分子之核酸序列的AAV粒子可為含有源自至少兩種不同AAV血清型之序列及/或組分之假型雜交或嵌合AAV粒子。假型AAV粒子可為包含以下之載體：源自一種AAV血清型之AAV基因組及至少部分源自不同AAV血清型之衣殼蛋白。作為非限制性實例，此類假型AAV粒子可為：包含AAV1衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；或包含AAV6衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體；或包含AAV4衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之

載體；或包含AAV9衍生之衣殼中的AAV2衍生之基因組之載體。以類似方式，本發明涵蓋任何雜交或嵌合AAV粒子。

【0398】 在其他實施例中，包含編碼本發明之siRNA分子之核酸序列的AAV粒子可用於將siRNA分子遞送至中樞神經系統(例如美國專利第6,180,613號；該專利之內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0399】 在一些態樣中，包含編碼本發明之siRNA分子之核酸序列的AAV粒子可進一步包含包括來自非病毒來源之肽的經修飾之衣殼。在其他態樣中，AAV粒子可含有CNS特異性嵌合衣殼以促進將經編碼之siRNA雙螺旋體遞送至大腦及脊髓中。舉例而言，來自展現CNS向性之AAV變異體之帽核苷酸序列的對準可經構築以鑑別可變區(VR)序列及結構。

【0400】 在其他實施例中，本發明之siRNA分子可編碼於質體載體、病毒載體(例如AAV載體)、基因組或其他核酸表現載體中以遞送至細胞。

【0401】 DNA表現質體可用於在細胞中穩定地表現本發明之siRNA雙螺旋體或dsRNA且達成靶基因之長期抑制。

【0402】 在一個態樣中，由SOD1靶向聚核苷酸編碼之siRNA雙螺旋體的有義股及反義股典型地藉由短間隔序列連接，使得表現稱為短髮夾RNA (shRNA)之莖環結構。髮夾係藉由切丁酶識別且裂解，由此產生成熟siRNA分子。

【0403】 根據本發明，產生包含靶向SOD1 mRNA之siRNA分子的核酸之AAV載體，AAV載體可為AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ8及AAV-DJ以

及其變異體。

【0404】 在一些實施例中，當表現時，本發明之siRNA雙螺旋體或dsRNA抑制(或降解)靶mRNA (亦即SOD1)。因此，由SOD1靶向聚核苷酸編碼之siRNA雙螺旋體或dsRNA可用於實質上抑制細胞，例如運動神經元中之SOD1基因表現。在一些態樣中，SOD1基因表現之抑制係指抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%。因此，靶向基因之蛋白產量可抑制至少約20%，較佳至少約30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%及100%。SOD1基因可為野生型基因或具有至少一個突變的突變SOD1基因任一者。因此，蛋白質為野生型蛋白或具有至少一個突變的突變多肽任一者。

病毒產生

【0405】 本發明提供一種藉由在病毒複製細胞中進行病毒基因組複製來產生小病毒粒子，例如AAV粒子之方法，該方法包含使病毒複製細胞與AAV聚核苷酸或AAV基因組接觸。

【0406】 本發明提供一種用於產生轉導效率得到增強(增加、改良)之AAV粒子的方法，該方法包含以下步驟：1)用穿梭載體及病毒構築體載體及/或AAV有效負載構築體載體共轉染勝任細菌細胞；2)分離所得病毒構築體表現載體及AAV有效負載構築體表現載體且分別轉染病毒複製細胞；3)分離及純化包含病毒構築體表現載體或AAV有效負載構築體表現載體之所得有效負載及病毒構築體粒子；4)用包含病毒構築體表現載體或AAV有效負載構築體表現載體之AAV有效負載及病毒構築體粒子兩者共感染病毒複製細胞；及5)收集及純化包含小病毒基因組之病毒粒子。

【0407】 在一個實施例中，本發明提供一種用於產生AAV粒子之方法，該方法包含以下步驟：1)用有效負載區域、表現rep及cap基因之構築體及輔助構築體同時共轉染哺乳動物細胞，諸如(但不限於) HEK293細胞；2)收集及純化包含病毒基因組之AAV粒子。

細胞

【0408】 本發明提供一種包含AAV聚核苷酸及/或AAV基因組之細胞。

【0409】 本文所揭示之病毒產生描述用於產生AAV粒子之製程及方法，該等AAV粒子接觸靶細胞以遞送有效負載構築體(例如重組病毒構築體)，該有效負載構築體包含編碼有效負載分子之聚核苷酸序列。

【0410】 在一個實施例中，AAV粒子可在包含昆蟲細胞之病毒複製細胞中產生。

【0411】 在培養物中昆蟲細胞之生長條件及在培養物中昆蟲細胞中之異源產物之產生為此項技術中熟知的，參見美國專利第6,204,059號，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0412】 可根據本發明使用允許小病毒之複製且可維持於培養物中之任何昆蟲細胞。可使用來自草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)之細胞株，包括(但不限於)Sf9或Sf21細胞株、果蠅(*Drosophila*)細胞株、或諸如白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)衍生之細胞株的蚊子細胞株。使用昆蟲細胞表現異源蛋白質為有據可查的，因為其為將核酸，諸如載體，例如昆蟲-細胞相容載體引入至此類細胞中之方法及將此類細胞維持於培養物中之方法。參見例如Methods in Molecular Biology, 編 Richard, Humana Press, NJ (1995)；O'Reilly等人, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory

Manual, Oxford Univ. Press (1994) ; Samulski等人, *J. Vir.*63:3822-8 (1989) ; Kajigaya等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88: 4646-50 (1991) ; Ruffing等人, *J. Vir.* 66:6922-30 (1992) ; Kimbauer等人, *Vir.*219:37-44 (1996) ; Zhao等人, *Vir.*272:382-93 (2000) ; 及 Samulski等人, 美國專利第6,204,059號, 該等文獻中之每一者之內容以引用之方法併入本文中。

【0413】 病毒複製細胞可選自任何生物生物體, 包括原核(例如細菌)細胞, 及真核細胞, 包括昆蟲細胞、酵母細胞及哺乳動物細胞。病毒複製細胞可包含哺乳動物細胞, 諸如A549、WEH1、3T3、10T1/2、BHK、MDCK、COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO. W138、海拉、HEK293、Saos、C2C12、L細胞、HT1080、HepG2及源自哺乳動物之初級纖維母細胞、肝細胞及肌母細胞。病毒複製細胞包含源自哺乳動物物種(包括(但不限於)人類、猴、小鼠、大鼠、兔及倉鼠)之細胞或細胞型, 包括(但不限於)纖維母細胞、肝細胞、腫瘤細胞、細胞株轉化之細胞等。

哺乳動物細胞(小規模)產生

【0414】 本文所揭示之病毒產生描述用於產生AAV粒子之製程及方法, 該等AAV粒子接觸靶細胞以遞送有效負載(例如重組病毒構築體), 該有效負載包含編碼有效負載之聚核苷酸序列。

【0415】 在一個實施例中, AAV粒子可在包含哺乳動物細胞之病毒複製細胞中產生。

【0416】 常用於產生重組AAV粒子之病毒複製細胞包括(但不限於)293細胞、COS細胞、海拉細胞、KB細胞及如以下中所述之其他哺乳動物

細胞株：美國專利第6,156,303號、美國專利第5,387,484號、美國專利第5,741,683號、美國專利第5,691,176號及美國專利第5,688,676號、美國專利申請案2002/0081721及國際專利申請案WO 00/47757、WO 00/24916及WO 96/17947，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0417】 在一個實施例中，AAV粒子在哺乳動物細胞中產生，其中全部三種VP蛋白質以接近1:1:10 (VP1:VP2:VP3)之化學計量表現。允許此受控之表現量之調節機制包括兩種mRNA之產生，一種針對VP1且另一種針對VP2及VP3，其藉由差別剪接產生。

【0418】 在另一實施例中，AAV粒子使用三重轉染法在哺乳動物細胞中產生，其中有效負載構築體、小病毒Rep及小病毒Cap以及輔助構築體包含於三種不同構築體內。AAV粒子產生之三種組分之三重轉染法可用於產生小批量病毒以用於包括轉導效率、靶組織(向性)評估及穩定性之分析。

桿狀病毒

【0419】 本文所揭示之粒子產生描述用於產生AAV粒子之製程及方法，該等AAV粒子接觸靶細胞以遞送包含編碼有效負載之聚核苷酸序列的有效負載構築體。

【0420】 簡言之，病毒構築體載體及AAV有效負載構築體載體係藉由熟習此項技術者已知且執行之標準分子生物學技術由轉座子供體/受體系統各自併入至亦稱為桿狀病毒質體之穿梭載體中。分離病毒複製細胞群之轉染會產生兩種桿狀病毒，一種包含病毒構築體表現載體，且另一種包含AAV有效負載構築體表現載體。兩種桿狀病毒可用於感染用於產生

AAV粒子之單個病毒複製細胞群。

【0421】 用於在昆蟲細胞(包括(但不限於)草地黏蟲(Sf9)細胞)中產生病毒粒子之桿狀病毒表現載體提供高效價之病毒粒子產物。編碼病毒構築體表現載體及AAV有效負載構築體表現載體之重組桿狀病毒引發病毒複製細胞之噬菌體感染。自原發性感染釋放之傳染性桿狀病毒粒子二次感染培養物中之其他細胞，在許多感染循環中按指數律成比例感染整個細胞培養物群，其為初始感染倍率之函數，參見Urabe, M.等人, J Virol. 2006年2月; 80 (4):1874-85，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0422】 在昆蟲細胞系統中產生具有桿狀病毒之AAV粒子可解決已知桿狀病毒基因及物理不穩定性。在一個實施例中，製造系統藉由利用無效價之感染細胞保存及規模放大系統相比於多種通道解決桿狀病毒不穩定性。產生病毒之細胞之小規模種菌培養用編碼病毒粒子之結構性、非結構性組分之病毒表現構築體轉染。將產生桿狀病毒感染之病毒的細胞收集至可在液氮中低溫保藏之等分試樣中；等分試樣保留存活性及感染性以用於感染產生大規模病毒之細胞培養物，Wasilko DJ等人, Protein Expr Purif. 2009年6月; 65(2):122-32，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0423】 遺傳穩定之桿狀病毒可用於產生用以在無脊椎動物細胞中產生AAV粒子之組分中的一或多者之源。在一個實施例中，缺陷桿狀病毒表現載體可游離地維持在昆蟲細胞中。在此類實施例中，穿梭載體用複製控制元件，包括(但不限於)啟動子、強化子及/或細胞週期調節之複製元件工程改造。

【0424】 在一個實施例中，桿狀病毒可用(非)可選標記工程改造以用於重組至殼質酶/組織蛋白酶基因座中。chia/v-cath基因座對於在組織

培養物中繁殖桿狀病毒為非必要的，且V-cath (EC 3.4.22.50)係對含有底物之Arg-Arg二肽活性最強之半胱胺酸內切蛋白酶。Arg-Arg二肽存在於濃核病毒及小病毒衣殼結構蛋白中但偶爾出現於依賴病毒VP1中。

【0425】 在一個實施例中，容許桿狀病毒感染的穩定病毒複製細胞用AAV複製及病毒粒子產生所必需之元件中之任一者的至少一個穩定整合複本工程改造，該複本包括(但不限於)完整AAV基因組、Rep及Cap基因、Rep基因、Cap基因、呈獨立轉錄卡匣形式之各Rep蛋白質、呈獨立轉錄卡匣形式之各VP蛋白質、AAP (組裝活化蛋白)或至少一種具有天然或非天然啟動子之桿狀病毒輔助基因。

【0426】 本文所述之AAV粒子可由三重轉染或桿狀病毒介導之病毒產生或此項技術中已知的任何其他方法產生。可採用此項技術中已知的任何適合之容許或封裝細胞來產生載體。哺乳動物細胞係通常較佳的。提供自複製缺陷輔助病毒缺失之功能的反式互補封裝細胞株，例如293細胞或其他E1a反式互補細胞亦為較佳的。

【0427】 基因卡匣可含有小病毒(例如AAV) cap及rep基因中之一些或全部。然而，較佳地，藉由將編碼衣殼及/或Rep蛋白質之封裝載體引入至細胞中來以反式形式提供cap及rep功能中之一些或全部。最佳地，基因卡匣不編碼衣殼或Rep蛋白質。可替代地，使用經穩定轉化以表現cap及/或rep基因之封裝細胞株。

【0428】 在一些情況下，根據如US20160032254中所述之程序產生且自培養上清液純化重組AAV病毒粒子，該文獻之內容以引用之方式併入。產生亦可涉及此項技術中已知之方法，包括使用293T細胞、sf9昆蟲細胞、三重轉染或任何適合製造方法之方法。

【0429】 在一些情況下，用聚乙烯亞胺(PEI)及用於產生AAV所需之質體，亦即AAV2 rep、腺病毒輔助構築體及ITR側接轉殖基因卡匣轉染293T細胞(黏著物/懸浮液)。AAV2 rep質體亦含有正在研究中之特定病毒之cap序列。在具有/不具有血清之DMEM/F17中進行轉染之後二十四小時(懸浮液無培養基變化)，用具有或不具有血清之新製培養基替代該培養基。轉染之後三(3)天，自293黏附細胞之培養基取得樣本。之後刮下細胞或集結懸浮液細胞且轉移至容器中。對於黏著物細胞，在離心以移除細胞集結粒之後，自刮下之後的上清液取得第二樣本。隨後，藉由三個連續凍融循環(-80℃至37℃)或添加清潔劑曲拉通(triton)來達成細胞溶解。藉由離心或深度過濾移除細胞碎片，且自培養基取得第3樣本。藉由DNA qPCR藉由抗DNA酶基因組滴定針對AAV粒子對樣本進行定量。根據此類轉染之總製造產量與第3樣本之粒子濃度相等。

【0430】 根據基因組複本數(每毫升基因組粒子數)量測AAV粒子效價。基因組粒子濃度係基於如先前所報導的載體DNA之DNA qPCR (Clark等人 (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk等人 (2002) Mol. Ther., 6:272-278)。

大規模生產

【0431】 在一些實施例中，AAV粒子生產可經調整以提高生產規模。根據本發明之大規模病毒生產方法可包括教示於以下中之彼等方法中之任一者：美國專利第5,756,283號、第6,258,595號、第6,261,551號、第6,270,996號、第6,281,010號、第6,365,394號、第6,475,769號、第6,482,634號、第6,485,966號、第6,943,019號、第6,953,690號、第7,022,519號、第7,238,526號、第7,291,498號及第7,491,508號或國際公

開案第WO1996039530號、第WO1998010088號、第WO1999014354號、第WO1999015685號、第WO1999047691號、第WO2000055342號、第WO2000075353號及第WO2001023597號，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。提高病毒粒子生產規模之方法典型地包含增加病毒複製細胞之數目。在一些實施例中，病毒複製細胞包含黏附細胞。為提高藉由黏附病毒複製細胞進行之病毒粒子生產之規模，需要較大細胞培養物表面。在一些情況下，大規模生產方法包含使用滾瓶(roller bottle)以增加細胞培養物表面。具有增加之表面積的其他細胞培養底物係此項技術中已知的。具有增加之表面積的其他黏附細胞培養產物的實例包括(但不限於) CELLSTACK[®]、CELLCUBE[®] (Corning公司, Corning, NY)及 NUNC[™] CELL FACTORY[™] (Thermo Scientific, Waltham, MA.)。在一些情況下，大規模黏附細胞表面可包含約1,000 cm²至約100,000 cm²。在一些情況下，大規模黏附細胞培養物可包含約10⁷至約10⁹個細胞、約10⁸至約10¹⁰個細胞、約10⁹至約10¹²個細胞或至少10¹²個細胞。在一些情況下，大規模黏附培養物可產生約10⁹至約10¹²個、約10¹⁰至約10¹³個、約10¹¹至約10¹⁴個、約10¹²至約10¹⁵個或至少10¹⁵個病毒粒子。

【0432】 在一些實施例中，本發明之大規模病毒生產方法可包含使用懸浮液細胞培養物。懸浮液細胞培養物允許顯著增加之細胞數。典型地，可在約10至50 cm²表面積上生長之黏附細胞之數目可在懸浮液中之約1 cm³體積中生長。

【0433】 大規模培養物型式中之複製細胞之轉染可根據此項技術中已知之任何方法進行。對於大規模黏附細胞培養物而言，轉染法可包括(但不限於)使用無機化合物(例如磷酸鈣)、有機化合物[例如聚乙烯亞胺

(PEI)]或使用非化學方法(例如電致孔)。在細胞在懸浮液中生長之情況下，轉染法可包括(但不限於)使用磷酸鈣及使用PEI。在一些情況下，大規模懸浮培養物之轉染可根據Feng, L.等人, 2008. *Biotechnol Appl. Biochem.* 50:121-32中所述之名為「轉染程序(Transfection Procedure)」之章節進行，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。根據此類實施例，可形成PEI-DNA複合體以用於引入待轉染之質體。在一些情況下，用PEI-DNA複合體轉染之細胞可在轉染之前進行『休克(shock)』。此包含將細胞培養物溫度降低至4°C持續約1小時之時段。在一些情況下，細胞培養物可休克持續約10分鐘至約5小時之時段。在一些情況下，細胞培養物可在約0°C至約20°C之溫度下休克。

【0434】 在一些情況下，轉染可包括用於表現RNA效應分子以減少來自一或多個AAV有效負載構築體之核酸之表現的一或多種載體。此類方法可藉由減少在表現有效負載構築體上廢棄之細胞資源來提高病毒粒子之生產。在一些情況下，此類方法可根據美國公開案第US2014/0099666號中所教示之彼等者進行，該公開案之內容以全文引用之方式併入本文中。

生物反應器

【0435】 在一些實施例中，細胞培養物生物反應器可用於大規模病毒生產。在一些情況下，生物反應器包含攪拌槽反應器。此類反應器一般包含具有攪拌器(例如葉輪)之容器，其形狀通常為圓柱形。在一些實施例中，此類生物反應器容器可置放於水套中以控制容器溫度及/或將環境溫度變化之影響降至最低。生物反應器容器體積之尺寸可介於以下範圍：約500 ml至約2 L、約1 L至約5 L、約2.5 L至約20 L、約10 L至約50 L、約25 L至約100 L、約75 L至約500 L、約250 L至約2,000 L、約1,000 L至

約10,000 L、約5,000 L至約50,000 L或至少50,000 L。容器底部可為圓形或平坦的。在一些情況下，動物細胞培養物可維持在具有圓形容器底部之生物反應器中。

【0436】 在一些情況下，生物反應器容器可經由使用熱循環器升溫。熱循環器泵加熱水套周圍的水。在一些情況下，經加熱之水可經由存在於生物反應器容器中之管道(例如蛇形管)泵送。在一些情況下，暖氣可在生物反應器周圍循環，包括(但不限於)培養基正上方之空氣空間。另外，可維持pH值及CO₂含量以最佳化細胞存活率。

【0437】 在一些情況下，生物反應器包含中空纖維反應器。中空纖維生物反應器可負載固著依賴及固著非依賴性細胞兩者之培養物。其他生物反應器可包括(但不限於)填充床或固定床生物反應器。此類生物反應器可包含具有用於黏附細胞附著之玻璃珠的容器。其他填充床反應器可包含陶瓷珠粒。

【0438】 在一些情況下，病毒粒子經由使用拋棄式生物反應器產生。在一些實施例中，此類生物反應器可包括WAVE™拋棄式生物反應器。

【0439】 在一些實施例中，動物細胞生物反應器培養物之AAV粒子生產可根據美國專利第5,064,764號、第6,194,191號、第6,566,118號、第8,137,948號或美國專利申請案第US2011/0229971號中所教示之方法進行，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

細胞溶解

【0440】 包括(但不限於)病毒生產細胞的本發明之細胞可根據此項技術中已知之任何方法經歷細胞溶解。可進行細胞溶解以獲得存在於本發

明之任何細胞中的一或多種劑(例如病毒粒子)。在一些實施例中，細胞溶解可根據以下中所列之方法中之任一者進行：美國專利第7,326,555號、第7,579,181號、第7,048,920號、第6,410,300號、第6,436,394號、第7,732,129號、第7,510,875號、第7,445,930號、第6,726,907號、第6,194,191號、第7,125,706號、第6,995,006號、第6,676,935號、第7,968,333號、第5,756,283號、第6,258,595號、第6,261,551號、第6,270,996號、第6,281,010號、第6,365,394號、第6,475,769號、第6,482,634號、第6,485,966號、第6,943,019號、第6,953,690號、第7,022,519號、第7,238,526號、第7,291,498號及第7,491,508號，或國際公開案第WO1996039530號、第WO1998010088號、第WO1999014354號、第WO1999015685號、第WO1999047691號、第WO2000055342號、第WO2000075353號及第WO2001023597號，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。細胞溶解方法可為化學或機械的。化學細胞溶解典型地包含使一或多種細胞與一或多種溶解劑接觸。機械溶解典型地包含使一或多種細胞經歷一或多種溶解條件及/或一或多種溶解力。

【0441】 在一些實施例中，化學溶解可用於溶解細胞。如本文所用，術語「溶解劑」係指可有助於破壞細胞之任何試劑。在一些情況下，將溶解劑引入稱為溶解溶液或溶解緩衝液之溶液中。如本文所用，術語「溶解溶液」係指包含一或多種溶解劑之溶液(典型地呈水溶液)。除了溶解劑之外，溶解溶液亦可包括一或多種緩衝劑、增溶劑、界面活性劑、防腐劑、低溫保護劑、酶、酶抑制劑及/或螯合劑。溶解緩衝液為包含一或多種緩衝劑之溶解溶液。溶解溶液之其他組分可包括一或多種增溶劑。如本文所用，術語「增溶劑」係指提高溶液之一或多種組分之溶解度及/或

施加溶液之一或多種實體之溶解度的化合物。在一些情況下，增溶劑提高蛋白質溶解度。在一些情況下，基於其提高蛋白質溶解度同時維持蛋白質構形及/或活性之能力選擇增溶劑。

【0442】 例示性溶解劑可包括描述於以下中之彼等溶解劑中之任一者：美國專利第8,685,734號、第7,901,921號、第7,732,129號、第7,223,585號、第7,125,706號、第8,236,495號、第8,110,351號、第7,419,956號、第7,300,797號、第6,699,706號及第6,143,567號，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些情況下，溶解劑可選自溶解鹽、兩性試劑、陽離子型試劑、離子型清潔劑及非離子型清潔劑。溶解鹽可包括(但不限於)氯化鈉(NaCl)及氯化鉀(KCl)。其他溶解鹽可包括描述於以下中之彼等溶解鹽中之任一者：美國專利第8,614,101號、第7,326,555號、第7,579,181號、第7,048,920號、第6,410,300號、第6,436,394號、第7,732,129號、第7,510,875號、第7,445,930號、第6,726,907號、第6,194,191號、第7,125,706號、第6,995,006號、第6,676,935號及第7,968,333號，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。可提高或降低鹽濃度以獲得用於細胞膜破裂之有效濃度。如本文中所提及之兩性試劑為能夠呈酸或鹼形式進行反應之化合物。兩性試劑可包括(但不限於)溶血磷脂醯膽鹼、3-((3-膽醯胺基丙基)二甲基銨)-1-丙磺酸鹽(CHAPS)、ZWITTERGENT®及類似物。陽離子型試劑可包括(但不限於)溴化鯨蠟基三甲銨(C (16) TAB)及氯化苯甲烴銨(Benzalkonium chloride)。包含清潔劑之溶解劑可包括離子型清潔劑或非離子型清潔劑。清潔劑可用以分裂或溶解細胞結構，該等細胞結構包括(但不限於)細胞膜、細胞壁、脂質、碳水化合物、脂蛋白及糖蛋白。例示

性離子型清潔劑包括美國專利第7,625,570號及第6,593,123號或美國公開案第US2014/0087361號中所教示之彼等離子型清潔劑中之任一者，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。一些離子型清潔劑可包括(但不限於)十二烷基硫酸鈉(SDS)、膽酸鹽及去氧膽酸鹽。在一些情況下，離子型清潔劑可以增溶劑形式包括於溶解溶液中。非離子型清潔劑可包括(但不限於)辛基葡糖苷、毛地黃皂苷、蘆布若爾(lubrol)、C12E8、TWEEN®-20、TWEEN®-80、Triton X-100及Nonidet P-40。非離子型清潔劑通常為較弱溶解劑，但可以增溶劑形式包括在內以用於溶解細胞及/或病毒蛋白。其他溶解劑可包括酶及脲。在一些情況下，一或多種溶解劑可併入至裂解溶液中以便提高細胞溶解及蛋白質溶解度中之一或多者。在一些情況下，酶抑制劑可包括於溶解溶液中以便防止可能由細胞膜破壞觸發之蛋白分解。

【0443】 在一些實施例中，進行機械細胞溶解。機械細胞溶解方法可包括使用一或多種溶解條件及/或一或多種溶解力。如本文所用，術語「溶解條件」係指促進細胞破壞之狀態或環境。溶解條件可包含特定溫度、壓力、滲透純度、鹽度及其類似者。在一些情況下，溶解條件包含增加或降低之溫度。根據一些實施例，溶解條件包含溫度變化以促進細胞破壞。根據此類實施例進行之細胞溶解可包括凍融溶解。如本文所用，術語「凍融溶解」係指其中細胞溶液經歷一或多個凍融循環之細胞溶解。根據凍融溶解方法，溶液中之細胞經冷凍以誘導由冰晶體形成及擴展引起之細胞膜的機械破壞。根據凍融溶解方法使用之細胞溶液可進一步包含一或多種溶解劑、增溶劑、緩衝劑、低溫保護劑、界面活性劑、防腐劑、酶、酶抑制劑及/或螯合劑。在經歷冷凍之細胞溶液融化後，此類組分可促進所

需細胞產物之回收。在一些情況下，一或多種低溫保護劑包括於經歷凍融溶解之細胞溶液中。如本文所用，術語「低溫保護劑」係指用於保護一或多種物質免於由於冷凍而受損的試劑。低溫保護劑可包括美國公開案第US2013/0323302號或美國專利第6,503,888號、第6,180,613號、第7,888,096號、第7,091,030號中所教示之彼等低溫保護劑中之任一者，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些情況下，低溫保護劑可包括(但不限於)二甲亞砷、1,2-丙二醇、2,3-丁二醇、甲醯胺、丙三醇、乙二醇、1,3-丙二醇及n-二甲基甲醯胺、聚乙烯吡咯啉酮、羥乙基澱粉、瓊脂糖、葡聚糖、肌醇、葡萄糖、羥乙基澱粉、乳糖、山梨糖醇、甲基葡萄糖、蔗糖及脲。在一些實施例中，可根據美國專利第7,704,721號中所述之方法中之任一者進行凍融溶解，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0444】 如本文所用，術語「溶解力」係指用於破壞細胞之物理活動。溶解力可包括(但不限於)機械力、聲波力、重力、光學力、電力及其類似者。藉由機械力進行之細胞溶解在本文中稱為「機械溶解」。可根據機械溶解使用之機械力可包括高剪切流體力。根據機械溶解之此類方法，可使用微流化床。微流化床典型地包含其中可施加細胞溶液之入口儲集器。隨後可經由泵(例如高壓泵)在高速及/或高壓下將細胞溶液泵送至相互作用腔室中以產生剪切流體力。所得溶解產物隨後可收集於一或多個輸出儲集器中。可調節泵速度及/或壓力以調節細胞溶解且促進產物(例如病毒粒子)之回收。其他機械溶解方法可包括藉由刮擦進行的細胞之物理破壞。

【0445】 可基於待溶解之細胞之細胞培養物形式選擇細胞溶解方

法。舉例而言，對於黏附細胞培養物，可使用一些化學及機械溶解方法。此類機械溶解方法可包括凍融溶解或刮擦。在另一實例中，黏附細胞培養物之化學溶解可經由與包含界面活性劑(諸如Triton-X-100)之溶解溶液一起培育來進行。在一些情況下，由黏附細胞培養物產生之細胞溶解產物可用一種多種核酸酶處理以降低由釋放之DNA引起之溶解產物的黏度。

【0446】 在一個實施例中，用於在無溶解下收穫AAV粒子之方法可用於有效的及可擴充式AAV粒子生產。在非限制性實例中，AAV粒子可藉由以下產生：培養缺乏肝素結合位點之AAV粒子，由此允許AAV粒子進入細胞培養物中之上清液中，自培養物收集上清液；且使AAV粒子與上清液分離，如美國專利申請案20090275107中所述，該申請案之內容以全文引用之方式併入本文中。

澄清

【0447】 包含病毒粒子之細胞溶胞物可經歷澄清。澄清係指在純化來自細胞溶胞物之病毒粒子中所採取之初始步驟。澄清用以製備溶胞物以藉由移除較大的不溶性碎片進行進一步純化。澄清步驟可包括(但不限於)離心及過濾。在澄清期間，離心可在低速下進行以僅移除較大碎片。類似地，過濾可使用具有較大孔徑之過濾器進行使得僅移除較大碎片。在一些情況下，可在澄清期間使用切向流過濾。病毒澄清之目的包括高通量處理細胞溶胞物及最佳化最終病毒回收。包括澄清步驟之優勢包括處理較大體積之溶胞物之可擴充性。在一些實施例中，澄清可根據以下中所呈現之方法中之任一者進行：美國專利第8,524,446號、第5,756,283號、第6,258,595號、第6,261,551號、第6,270,996號、第6,281,010號、第6,365,394號、第6,475,769號、第6,482,634號、第6,485,966號、第

6,943,019號、第6,953,690號、第7,022,519號、第7,238,526號、第7,291,498號、第7,491,508號，美國公開案第US2013/0045186號、第US2011/0263027號、第US2011/0151434號、第US2003/0138772號，及國際公開案第WO2002012455號、第WO1996039530號、第WO1998010088號、第WO1999014354號、第WO1999015685號、第WO1999047691號、第WO2000055342號、第WO2000075353號及第WO2001023597號，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0448】藉由過濾進行細胞溶胞物澄清之方法為此項技術中所充分理解且可根據包括(但不限於)被動過濾及流式過濾之多種可用方法進行。所用過濾器可包含多種材料及孔徑。舉例而言，細胞溶胞物過濾器可包含約1 μM 至約5 μM 、約0.5 μM 至約2 μM 、約0.1 μM 至約1 μM 、約0.05 μM 至約0.05 μM 及約0.001 μM 至約0.1 μM 之孔徑。細胞溶胞物過濾器之例示性孔徑可包括(但不限於)2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05、0.22、0.21、0.20、0.19、0.18、0.17、0.16、0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.02、0.019、0.018、0.017、0.016、0.015、0.014、0.013、0.012、0.011、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.001及0.001 μM 。在一個實施例中，澄清可包含經由孔徑為2.0 μM 之過濾器進行過濾以移除大碎片，之後穿過孔徑為0.45 μM 之過濾器以移除完整細胞。

【0449】過濾器材可由多種材料構成。此類材料可包括(但不限於)聚合材料及金屬材料(例如燒結金屬及多孔鋁)。例示性材料可包括(但不限於)耐綸、纖維素材料(例如乙酸纖維素)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚醚砜、聚醯胺、聚砜、聚丙烯及聚對苯二甲酸伸乙酯。在一些情況下，適用於澄清細胞溶胞物之過濾器可包括(但不限於)ULTIPLEAT PROFILE™過濾器(Pall公司, Port Washington, NY)、SUPOR™膜過濾器(Pall公司, Port Washington, NY)。

【0450】在一些情況下，可進行流式過濾以提高過濾速度及/或效果。在一些情況下，流式過濾可包含真空過濾。根據此類方法，在與待過濾之細胞溶胞物之側部相對的過濾器側部上產生真空。在一些情況下，細胞溶胞物可藉由離心力穿過過濾器。在一些情況下，使用泵迫使細胞溶胞物穿過澄清過濾器。細胞溶胞物穿過一或多個過濾器之流動速率可藉由調整通道尺寸及/或流體壓力中之一者來調節。

【0451】根據一些實施例，細胞溶胞物可藉由離心澄清。可使用離心使溶胞物中之不溶性粒子集結。在澄清期間，離心強度[按重力單位(g)表示，其表示標準重力之倍數]可低於後續純化步驟中之離心強度。在一些情況下，可以約200 g至約800 g、約500 g至約1500 g、約1000 g至約5000 g、約1200 g至約10000 g，或約8000 g至約15000 g對細胞溶胞物進行離心。在一些實施例中，細胞溶胞物離心係在8000 g進行15分鐘。在一些情況下，可進行密度梯度離心以藉由沈降速率分配細胞溶胞物中之微粒。根據本發明之方法使用之梯度可包括(但不限於)氯化銫梯度及碘克沙醇(iodixanol)階段梯度。

純化：層析

【0452】 在一些情況下，AAV粒子可藉由一或多種層析方法自澄清之細胞溶胞物純化。層析係指此技術中已知之用於自混合物分離出一或多種元素之任何數目的方法。此方法可包括(但不限於)離子交換層析法(例如陽離子交換層析法及陰離子交換層析法)、免疫親和層析法及尺寸排阻層析法。在一些實施例中，病毒層析方法可包括任何教示於以下之方法：美國專利第5,756,283號、第6,258,595號、第6,261,551號、第6,270,996號、第6,281,010號、第6,365,394號、第6,475,769號、第6,482,634號、第6,485,966號、第6,943,019號、第6,953,690號、第7,022,519號、第7,238,526號、第7,291,498號及第7,491,508號，或國際公開案第WO1996039530號、第WO1998010088號、第WO1999014354號、第WO1999015685號、第WO1999047691號、第WO2000055342號、第WO2000075353號及第WO2001023597號，該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0453】 在一些實施例中，可使用離子交換層析法分離病毒粒子。使用離子交換層析法，基於存在於固定相(通常為病毒製備物(例如澄清溶胞物)通過之管柱)上之衣殼蛋白與帶電位點之間的電荷-電荷相互作用結合病毒粒子。在施加病毒製備物之後，隨後可藉由施加溶離溶液以破壞電荷-電荷相互作用而溶離結合之病毒粒子。溶離溶液可藉由調整鹽濃度及/或pH而最佳化以促進經結合之病毒粒子回收。視所分離之病毒衣殼之電荷而定，可選擇陽離子或陰離子交換層析法。離子交換層析之方法可包括(但不限於)美國專利第7,419,817號、第6,143,548號、第7,094,604號、第6,593,123號、第7,015,026號及第8,137,948號中所教示之任何方法，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0454】 在一些實施例中，可使用免疫親和層析法。免疫親和層析法係利用一或多種免疫化合物(例如抗體或抗體相關結構)以保留病毒粒子之層析形式。免疫化合物可特異性地結合於病毒粒子表面上之一或多種結構，包括(但不限於)一或多種病毒鞘蛋白。在一些情況下，免疫化合物可對特定病毒變異體具有特異性。在一些情況下，免疫化合物可與多種病毒變異體結合。在一些實施例中，免疫化合物可包括重組單鏈抗體。此類重組單鏈抗體可包括Smith, R.H.等人, 2009. Mol. Ther. 17(11):1888-96中所述之彼等重組單鏈抗體該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。此類免疫化合物能夠與包括(但不限於)AAV1、AAV2、AAV6及AAV8之若干AAV衣殼變異體結合。

【0455】 在一些實施例中，可使用尺寸排阻層析法(SEC)。SEC可包含使用凝膠以根據尺寸分離粒子。在病毒粒子純化中，SEC過濾有時稱作「拋光」。在一些情況下，可進行SEC以產生幾乎均質之最終產物。此類最終產物可在某些情況下用於臨床前研究及/或臨床研究(Kotin, R.M. 2011. Human Molecular Genetics. 20(1):R2-R6，其內容以全文引用之方式併入本文中)。在一些情況下，SEC可根據以下中所教示之方法中之任一者進行：美國專利第6,143,548號、第7,015,026號、第8,476,418號、第6,410,300號、第8,476,418號、第7,419,817號、第7,094,604號、第6,593,123號及第8,137,948號，該等專利中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0456】 在一個實施例中，包含至少一種AAV粒子之組合物可使用美國專利第US 6146874號中所述之方法分離或純化，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0457】 在一個實施例中，包含至少一種AAV粒子之組合物可使用美國專利第US 6660514號中所述之方法分離或純化，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0458】 在一個實施例中，包含至少一種AAV粒子之組合物可使用美國專利第US 8283151號中所述之方法分離或純化，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0459】 在一個實施例中，包含至少一種AAV粒子之組合物可使用美國專利第US 8524446號中所述之方法分離或純化，該專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

引入至細胞中

【0460】 為了確保siRNA雙螺旋體之化學及生物穩定性，將編碼siRNA之聚核苷酸遞送至靶細胞內為至關重要的。可使用多種方法中之任一者將本發明之聚核苷酸引入至細胞中。

【0461】 在一些實施例中，藉由使細胞與聚核苷酸接觸而將本發明之聚核苷酸引入至細胞中。在一些實施例中，藉由使細胞與包含聚核苷酸及親脂性載劑之組合物接觸而將聚核苷酸引入至細胞中。在其他實施例中，藉由用載體轉染或感染細胞而將聚核苷酸引入至細胞中，該載體包含能夠在細胞中進行轉錄時產生siRNA雙螺旋體之核酸序列。

【0462】 在一些實施例中，藉由將載體注入細胞中而將siRNA雙螺旋體引入至細胞中，該載體包含能夠在細胞中進行轉錄時產生siRNA雙螺旋體之核酸序列。

【0463】 在其他實施例中，可藉由電致孔將本發明之聚核苷酸遞送至細胞中(例如美國專利公開案第20050014264號；其內容以全文引用之

方式併入本文中)。

【0464】 此外，插入至病毒載體(例如AAV載體)中之siRNA分子可藉由病毒感染遞送至細胞中。此等病毒載體經工程改造及最佳化以促進siRNA分子進入可經轉染輕易修改之細胞。此外，一些合成病毒載體能夠將shRNA整合至細胞基因組中，進而引起穩定siRNA表現及靶基因之長期基因減弱。以此方式，病毒載體經工程改造為用於特異性遞送，同時缺乏發現於野生型病毒中之有害複製及/或整合特徵的工具。

【0465】 在一些實施例中，細胞可包括(但不限於)哺乳動物來源之細胞、人類來源之細胞、胚胎幹細胞、誘導性多潛能幹細胞、神經幹細胞及神經祖細胞。

醫藥組合物及調配物

【0466】 除了醫藥組合物，例如待遞送之siRNA雙螺旋體(包括編碼質體或表現載體，諸如病毒，例如AAV)之外，本文所提供的主要涉及適用於向人類投與之醫藥組合物，但熟習此項技術者應理解，此類組合物一般亦適用於向任何其他動物，例如非人類動物，例如非人類哺乳動物投與。應充分理解，為使組合物適用於向各種動物投與，對適用於向人類投與之醫藥組合物進行修改，且一般熟練的獸醫藥理學家可僅用一般實驗(若存在)設計及/或進行此類修改。醫藥組合物之投藥所涵蓋的個體包括(但不限於)人類及/或其他靈長類動物；哺乳動物，包括商業相關之哺乳動物，諸如牛、豬、馬、綿羊、貓、狗、小鼠及/或大鼠，；及/或鳥類，包括商業相關之鳥類，諸如家禽、雞、鴨、鵝及/或火雞。

【0467】 在一些實施例中，向人類、人類患者或個體投與組合物。出於本發明之目的，片語「活性成分」一般係指合成siRNA雙螺旋體；或

攜載siRNA雙螺旋體之病毒載體；或由如本文所述之病毒載體遞送的siRNA分子。

【0468】 本文所述之醫藥組合物的調配物可藉由藥理學技術中已知或此後研發之任何方法來進行製備。一般而言，此類製備方法包括以下步驟：使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他附屬成分結合，且隨後視需要及/或期望地將產物分割、塑形及/或封裝成所需單劑量或多劑量單元。

【0469】 根據本發明之醫藥組合物中的活性成分、醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何其他成分的相對量將視治療個體之身分、身材及/或病狀而定且進一步視投與組合物所藉由之途徑而定。

【0470】 可使用一或多種賦形劑調配siRNA雙螺旋體或編碼其之病毒載體以(1)增加穩定性；(2)增加細胞轉染或轉導；(3)允許持續或延遲釋放；或(4)改變生物分佈(例如將病毒載體靶向諸如大腦及運動神經元之特定組織或細胞型)。

【0471】 本發明之調配物可包括(但不限於)鹽水、類脂質(lipidoid)、脂質體、脂質奈米粒子、聚合物、脂複合體、核殼奈米粒子、肽、蛋白質、用病毒載體轉染之細胞(例如用於移植於個體中)、奈米粒子模仿物以及其組合。此外，本發明之病毒載體可使用自組裝核酸奈米粒子調配。

【0472】 本文所述之醫藥組合物的調配物可藉由藥理學技術中已知或此後研發之任何方法來進行製備。一般而言，此類製備方法包括使活性成分與賦形劑及/或一或多種其他附屬成分結合之步驟。

【0473】 根據本發明之醫藥組合物可以散裝、以單個單位劑量形式及/或以複數個單個單位劑量形式製備、封裝及/或出售。如本文所用，

「單位劑量」係指包含預定量之活性成分之醫藥組合物的離散量。活性成分之量一般等於將向個體投與之活性成分之劑量及/或此類劑量之適宜分數，諸如此類劑量之一半或三分之一。

【0474】 根據本發明之醫藥組合物中之活性成分、醫藥學上可接受之賦形劑及/或任何其他成分的相對量可視治療個體之身分、身材及/或病狀而定且進一步視投與組合物所藉由之途徑而變化。舉例而言，組合物可包含0.1%與99% (w/w)之間的活性成分。舉例而言，組合物可包含0.1%與100%，例如.5%與50%之間、1%至30%之間、5%至80%之間、至少80% (w/w)活性成分。

【0475】 在一些實施例中，本文所述之調配物可含有至少一種SOD1靶向聚核苷酸。作為非限制性實例，調配物可含有1、2、3、4或5種在不同位點靶向SOD1基因之聚核苷酸。

【0476】 在一些實施例中，醫藥學上可接受之賦形劑可為至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%純。在一些實施例中，賦形劑經批准用於人類及用於獸醫學用途。在一些實施例中，賦形劑可經美國食品及藥物管理局(the United States Food and Drug Administration)批准。在一些實施例中，賦形劑可屬於醫藥級。在一些實施例中，賦形劑可滿足美國藥典(the United States Pharmacopoeia ; USP)、歐洲藥典(the European Pharmacopoeia ; EP)、英國藥典及/或國際藥典之標準。

【0477】 如本文所用，賦形劑包括(但不限於)適用於所需特定劑型之形式的任何及全部溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體媒劑、分散或懸浮助劑、界面活性劑、等張劑、增稠或乳化劑、防腐劑及其類似者。用於

調配醫藥組合物之各種賦形劑及用於製備該組合物之技術為此項技術中已知的(參見Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006 ; 其以全文引用之方式併入本文中)。除非任何習知賦形劑介質與物質或其衍生物不相容, 諸如藉由產生任何不合期望之生物學作用或在其它方面以有害方式與醫藥組合物之任何其他組分相互作用而不相容, 否則使用習知賦形劑介質可涵蓋於本發明之範疇內。

【0478】 例示性稀釋劑包括(但不限於)碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉、粉糖等及/或其組合。

【0479】 在一些實施例中, 調配物可包含至少一種非活性成分。如本文所用, 術語「非活性成分」係指包括於調配物中之一或多種非活性試劑。在一些實施例中, 可用於本發明調配物中之非活性成分中的全部、無一者或一些可經美國食品及藥物管理局(FDA)批准。

【0480】 攜載本文所揭示之SOD1靶向聚核苷酸的病毒載體之調配物可包括陽離子或陰離子。在一個實施例中, 調配物包括金屬陽離子, 諸如(但不限於) Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{+} 及其組合。

【0481】 如本文所用, 「醫藥學上可接受之鹽」係指所揭示之化合物之衍生物, 其中母體化合物藉由將現有酸或鹼部分轉化為其鹽形式(例如藉由使游離鹼基與適合有機酸反應)來改性。醫藥學上可接受之鹽的實例包括(但不限於)鹼性殘基(諸如胺)之無機酸鹽或有機酸鹽; 酸性殘基(諸如羧酸)之鹼金屬鹽或有機鹽; 及其類似者。代表性酸加成鹽包括乙酸

鹽、乙酸、己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯磺酸、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫溴酸鹽、鹽酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似者。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及其類似者，以及無毒性銨、四級銨及胺陽離子，包括(但不限於)銨、四甲銨、四乙銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺及其類似者。本發明的醫藥學上可接受之鹽包括例如由無毒無機酸或有機酸形成的母體化合物之習知無毒鹽。本發明的醫藥學上可接受之鹽可藉由習知化學方法由含有鹼性或酸性部分之母體化合物合成。一般而言，此類鹽可藉由使此等化合物之游離酸或鹼形式與化學計量之適當鹼或酸在水中或在有機溶劑中或在兩者之混合物中反應來製備；一般而言，非水性介質(如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈)為較佳的。適合之鹽的清單見於*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第1418頁；*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl及C.G. Wermuth (編), Wiley-VCH, 2008，及Berge等人, *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977)中；該等文獻中之每一者的內容以全文引用之方式併入本

文中。

【0482】如本文所用，術語「醫藥學上可接受之溶劑合物」意謂其中適合溶劑之分子併入晶格中的本發明化合物。適合溶劑在所投與之劑量下為生理學上可耐受的。舉例而言，溶劑合物可藉由自包括有機溶劑、水或其混合物之溶液結晶、再結晶或沈澱來加以製備。適合溶劑之實例為乙醇、水(例如單水合物、二水合物及三水合物)、*N*-甲基吡咯啉酮(NMP)、二甲亞砜(DMSO)、*N,N'*-二甲基甲醯胺(DMF)、*N,N'*-二甲基乙醯胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氫-2-(1H)嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯啉酮、苯甲酸苯甲酯及其類似者。當水為溶劑時，該溶劑合物稱為「水合物」。

【0483】根據本發明，SOD1靶向聚核苷酸或包含其之AAV載體可經配製用於CNS遞送。可使用穿過腦血障之試劑。舉例而言，可將siRNA分子靶向至腦血障內皮之一些細胞穿透肽可用於調配靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體(例如Mathupala, *Expert Opin Ther Pat.*, 2009, 19, 137-140；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

投藥

【0484】本發明之SOD1靶向聚核苷酸可藉由產生治療有效之結果的任何途徑投與。此等途徑包括(但不限於)腸內(至腸中)、胃腸內、硬膜上(至硬腦膜中)、口服(藉助於嘴)、經皮、硬膜外、腦內(至大腦中)、腦室內(至腦室內)、上表皮(塗覆至皮膚上)、皮內(至皮膚自身中)、皮下(在皮膚下)、經鼻投藥(經由鼻)、靜脈內(至靜脈中)、靜脈內注射、靜脈內滴液、動脈內(至動脈中)、肌肉內(至肌肉中)、心內(至心臟中)、骨內輸注

(至骨髓中)、鞘內(至脊髓管中)、腹膜內(輸注或注射至腹膜中)、膀胱內輸注、玻璃體內(經由眼睛)、海綿竇內注射(至病理性腔體中)、腔內(至陰莖底部)、陰道內投藥、子宮內、羊膜外投藥、經皮(經由全身分佈之完整皮膚擴散)、經黏膜(經由黏膜擴散)、經陰道、吹入(通氣)、舌下、唇下、灌腸、滴眼(至結膜上)、耳內滴液、經耳(在耳中或藉助於耳)、頰內(指向頰部)、結膜、皮膚、牙齒(至一或多個牙齒)、電滲透、子宮頸內、竇內(endosinusal)、氣管內、體外、血液透析、滲入、間質、腹內、羊膜內、關節內、膽道內、支氣管內、囊內、軟骨內(在軟骨內)、尾部內(馬尾內)、腦池內(小腦延髓池內)、角膜內(在角膜內)、牙冠內、冠狀動脈內(在冠狀動脈內)、海綿體內孔(陰莖之海綿體之可膨脹空間)、椎間盤內(在盤內)、管內(腺管內)、十二指腸內(在十二指腸內)、硬膜內(在硬腦膜內或下方)、表皮內(至表皮)、食道內(至食道)、胃內(在胃內)、齒齦內(在齒齦內)、迴腸內(小腸之遠端部分內)、病灶內(在局部病變內或直接引入至局部病變)、管腔內(在管腔內)、淋巴管內(在淋巴內)、髓內(骨之骨髓腔內)、腦脊膜內(在腦膜內)、眼內(眼部內)、卵巢內(在卵巢內)、心包內(心包內部)、胸膜內(胸膜內部)、前列腺內(前列腺內部)、肺內(肺部或其支氣管內)、竇內(經鼻或眶周竇)、脊柱內(脊柱內部)、滑膜內(關節之滑液腔內)、腱內(肌腱內)、睪丸內(睪丸內部)、鞘內(在腦脊髓軸之任何水準處之腦脊髓液內)、胸內(胸部內)、小管內(器官之小管內)、瘤內(腫瘤內部)、鼓膜內(中耳內)、血管內(一或多個血管內)、室內(腦室內)、離子導入療法(藉助於電流，其中可溶性鹽之離子遷移至身體組織中)、沖洗(沖洗或沖刷開放性傷口或體腔)、喉部(直接在喉上)、鼻胃管(經由鼻且進入胃中)、封閉敷料技術(局部途徑投藥，隨後由封閉該區域之敷料覆

蓋)、經眼(至外眼)、口咽(直接至嘴及咽)、非經腸、經皮、關節周、硬膜外、神經周、牙周、經直腸、呼吸(呼吸道內，藉由經口或經鼻吸入以實現局部或全身作用)、眼球後(腦橋後方或眼球後方)、軟組織、蛛膜下、結膜下、黏膜下、局部、經胎盤(經由或穿過胎盤)、經氣管(穿過氣管壁)、經鼓膜(穿過或經由鼓腔)、輸尿管(至輸尿管)、尿道(至尿道)、陰道、骯管阻滯(caudal block)、診斷、神經阻滯、膽道灌注、心肌灌注、光除去法或脊髓。

【0485】在特定實施例中，包括包含至少一種SOD1靶向聚核苷酸之AAV載體的組合物可以允許其進入中樞神經系統且滲透至運動神經元中之方式投與。

【0486】在一些實施例中，本發明之治療劑可藉由肌肉注射進行投與。Rizvanov等人首次證明，靶向突變型人類SOD1 mRNA之siRNA分子會經坐骨神經吸收，逆行輸送至運動神經元之核周體，且抑制SOD1^{G93A}轉殖基因ALS小鼠中之突變型SOD1 mRNA(Rizvanov AA等人, *Exp. Brain Res.*, 2009, 195(1), 1-4；其內容以全文引用之方式併入本文中)。另一研究亦證明，表現針對突變型SOD1基因之小髮夾RNA (shRNA)的AAV之肌肉遞送會在肌肉以及受神經支配的運動神經元中引起顯著突變型SOD1基因減弱(Towne C等人, *Mol Ther.*, 2011; 19(2): 274-283；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0487】在一些實施例中，表現本發明之siRNA雙螺旋體的AAV載體可藉由外周注射及/或鼻內遞送向個體投與。此項技術中揭示可將針對siRNA雙螺旋體之AAV載體之外周投藥輸送至中樞神經系統，例如至神經元(例如美國專利公開案第20100240739號及第20100130594號；該等專利

公開案中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0488】 在其他實施例中，包含至少一種本發明之siRNA雙螺旋體的組合物可藉由顱內遞送投與個體(參見例如美國專利第8,119,611號；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0489】 本發明之SOD1靶向聚核苷酸可呈任何適合之形式投與，呈液體溶液或懸浮液形式，呈適用於液體溶液或液體溶液中之懸浮液之固體形式。其可使用任何適當及醫藥學上可接受之賦形劑調配。

【0490】 本發明之SOD1靶向聚核苷酸可以「治療有效」量，亦即足以緩解及/或預防與疾病相關之至少一種症狀或提供個體病狀之改善的量投與。

給藥

【0491】 可使用對預防及治療SOD1相關病症(例如ALS)有效之任何量向個體投與本發明之醫藥組合物。視個體之物種、年齡及一般條件、疾病之嚴重強度、特定組合物、其投藥模式、其活動模式及其類似因素而定，所要求之確切量將隨各個體而變化。

【0492】 本發明之組合物典型地以單位劑型調配以易於投藥及劑量均勻。然而，應理解，本發明之組合物的總日用量可由主治醫師在合理醫學判斷範疇內決定。對於任何特定患者之特定治療性效果可視多種因素而定，該等因素包括所治療之病症及該病症之嚴重度；所採用之特定化合物之活性；所採用之特定組合物；患者之年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食；投藥時間及投藥途徑；治療持續時間；與所採用之特定化合物組合或同時使用之藥物；及醫學技術中熟知之類似因素。

【0493】 在一些具體實施例中，用於遞送本發明之siRNA雙螺旋體

的AAV載體之劑量可進行調整，其與疾病狀況、個體及治療策略等相關。典型地，每劑量可投與約 10^5 、 10^6 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 至 10^{16} 個病毒基因組(單元)。

【0494】 所需劑量可一天三次、一天兩次、一天一次、每隔一天、每三天、每週、每兩週、每三週或每四週遞送。

【0495】 在某些實施例中，所需劑量可使用多次投藥進行遞送(例如兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或超過十四次投藥)。當採用多次投藥時，可使用分次給藥方案，諸如本文中所述之彼等方案。如本文所用，「分次劑量」係將單個單位劑量或總日劑量分為兩次或多於兩次劑量，例如單個單位劑量之兩次或多於兩次投藥。如本文所用，「單個單位劑量」為以一次劑量/一次性/單一途徑/單一接觸點，亦即單一投藥事件治療性投與之任何調節聚核苷酸的劑量。如本文所用，「總日劑量」為在24小時時段中給定或規定之量。其可以單個單位劑量形式進行投與。在一個實施例中，包含本發明之SOD1靶向聚核苷酸的病毒載體以分次劑量向個體投與。其可僅在緩衝液中或在本文中所述之調配物中調配。

ALS及/或犬退化性脊髓病(DM)之治療方法

【0496】 本發明中所提供的包括用於將本文所述之SOD1靶向聚核苷酸引入至細胞中之方法，該方法包含將聚核苷酸中之任一者以足以使靶SOD1 mRNA發生降解之量引入至該等細胞中。在一些態樣中，細胞可為幹細胞、諸如運動神經元之神經元、肌肉細胞及諸如星形膠質細胞之膠細胞。

【0497】 本發明中所揭示的亦包括用於治療需要治療之個體中之與

異常SOD1功能相關的ALS之方法。該方法視情況包含向個體投與治療有效量之組合物，該組合物包含或編碼至少一種靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體。該siRNA雙螺旋體將使SOD1基因表現緘默化且抑制SOD1蛋白產生，且減少個體中之一或多種ALS症狀以使得ALS在治療學上得到治療。

【0498】 在一些實施例中，向個體之中樞神經系統投與本發明之SOD1靶向聚核苷酸或包含或編碼此聚核苷酸之組合物。在其他實施例中，向個體之肌肉投與本發明之siRNA雙螺旋體或包含其之組合物。

【0499】 特定言之，SOD1靶向聚核苷酸可遞送至靶向細胞之特定類型中，包括運動神經元；膠細胞，包括寡樹突神經膠質細胞、星形膠質細胞及微神經膠質細胞；及/或神經元周圍之其他細胞，諸如T細胞。人類ALS患者及動物SOD1 ALS模型中進行之研究表明，膠細胞在ALS神經元之功能障礙及死亡早期起一定作用。圍繞的保護性膠細胞中之正常SOD1可預防運動神經元死亡，儘管突變型SOD1存在於運動神經元中(例如 Philips及Rothstein, *Exp. Neurol.*, 2014年5月22日. pii: S0014-4886(14)00157-5所綜述；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0500】 在一些具體實施例中，用作ALS療法之至少一種靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體插入於病毒載體，諸如AAV載體中。

【0501】 在一些實施例中，本發明組合物以單一療法或組合療法形式投與以用於治療ALS。

【0502】 包含或編碼靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體的病毒載體可與一或多種其他治療劑組合使用。「與……組合」並不意欲暗示藥劑必須同時投與及/或調配成一起遞送，但此等遞送方法處於本發明之範疇

內。組合物可與一或多種其他所需治療劑或醫療程序同時、在其之前或在其之後投與。一般而言，各藥劑將以根據該藥劑所確定之劑量及/或時程來進行投與。

【0503】可與本發明之SOD1靶向聚核苷酸組合使用之治療劑可為小分子化合物，其為抗氧化劑、消炎劑、抗細胞凋亡劑、鈣調節劑、抗穀胺酸劑、結構蛋白抑制劑及參與金屬離子調節之化合物。

【0504】可組合使用以治療ALS之化合物可包括(但不限於)減少氧化應激之藥劑，諸如自由基清除劑及/或依達拉奉(*edaravone*) (*Radicava*)；抗穀胺酸劑：利魯唑、托吡酯(*Topiramate*)、他侖帕奈(*Talampanel*)、拉莫三嗪(*Lamotrigine*)、右甲嗎喃(*Dextromethorphan*)、加巴噴丁(*Gabapentin*)及AMPA拮抗劑；抗細胞凋亡劑：二甲胺四環素、苯丁酸鈉及阿莫氯醇(*Arimoclomol*)；消炎劑：神經節苷脂(*ganglioside*)、塞內昔布(*Celecoxib*)、環孢靈、硫唑嘌呤、環磷醯胺、血漿去除術(*Plasmaphoresis*)、乙酸格拉替雷(*Glatiramer acetate*)及沙立度胺(*thalidomide*)；頭孢曲松(*Ceftriaxone*) (Berry等人, *Plos One*, 2013, 8(4))； β -內醯胺抗生素；普拉克索(*Pramipexole*) (多巴胺促效劑) (Wang等人, *Amyotrophic Lateral Scler.*, 2008, 9(1), 50-58)；美國專利公開案第20060074991號中之尼美舒利(*Nimesulide*)；美國專利公開案第20130143873號中所揭示之二氫嗪；美國專利公開案第20080161378號中所揭示之二氫吡唑酮衍生物；抑制氧化應激誘導之細胞死亡之自由基清除劑，諸如溴麥角環肽(*bromocriptine*) (美國專利公開案第20110105517號)；PCT專利公開案第2013100571號中所論述之胺基甲酸苯酯化合物；美國專利第6,933,310號及第8,399,514號及美國專利公開案第

20110237907號及第20140038927號中所揭示之神經保護性化合物；及美國專利公開案第20070185012號中所教示之糖肽；該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0505】 可用於與本發明之靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體用於組合療法中的治療劑可為可保護神經元損失之激素或變異體，諸如促腎上腺皮質激素(ACTH)或其片段(例如美國專利公開案第20130259875號)；雌激素(例如美國專利第6,334,998號及第6,592,845號)；該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0506】 神經營養因子可與本發明之靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體用於組合療法中以治療ALS。一般而言，神經營養因子定義為促進神經元之存活、生長、分化、增殖及/或成熟或刺激增加的神經元之活性的物質。在一些實施例中，本發明方法進一步包含將一或多種營養因子遞送至需要治療之個體中。營養因子可包括(但不限於) IGF-I、GDNF、BDNF、CTNF、VEGF、科利維林(Colivelin)、紮利羅登(Xaliproden)、促甲狀腺素釋放激素及ADNF以及其變異體。

【0507】 在一個態樣中，包含至少一種靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體的AAV載體可與表現神經營養因子之AAV載體共投與，該等AAV載體諸如AAV-IGF-I(Vincent等人, *Neuromolecular medicine*, 2004, 6, 79-85；其內容以全文引用之方式併入本文中)及AAV-GDNF (Wang等人, *J Neurosci.*, 2002, 22, 6920-6928；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0508】 在一些實施例中，向有需要之個體靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、鞘內及/或腦室內投與用於治療ALS之本發明之組合物，使

siRNA雙螺旋體或包含siRNA雙螺旋體之載體穿過血腦障及血液脊髓障中之一或兩者。在一些態樣中，該方法包括向個體之中樞神經系統(CNS)直接投與(例如腦室內投與及/或鞘內投與) (使用例如輸注泵及/或遞送骨架)治療有效量之組合物，該組合物包含至少一種靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體或包含至少一種靶向SOD1基因之siRNA雙螺旋體的AAV載體，減默化或抑制SOD1基因表現，且減少個體中之ALS之一或多種症狀，以使得ALS在治療學上得到治療。

【0509】 在某些態樣中，ALS之症狀包括運動神經元退化、肌無力、肌肉萎縮、肌肉僵硬、呼吸困難、言語不清、束化出現、額顳葉型癡呆及/或過早死亡在所治療之個體中得到改善。在其他態樣中，將本發明之組合物施用於大腦及脊髓中之一或兩者。在其他態樣中，肌肉協調及肌肉功能中之一或兩者得到改善。在其他態樣中，個體存活期得以延長。

【0510】 本文所述之組合物可在動物模型中進行測試。作為非限制性實例，動物可為嚙齒動物(例如大鼠或小鼠)或哺乳動物(例如非人類靈長類動物或狗)。在一個實施例中，動物模型為患有犬退化性脊髓病(DM)之狗。犬DM可為ALS之模型，因為狗在其神經系統方面具有相當大小及複雜性，且狗具有運動神經元損失及類似SOD1化學水準。犬DM為由於SOD1突變(E40K、T18S)之晚齡發作疾病(8至14歲)，且當前尚未有可用之治療。使用犬DM作為ALS之疾病模型的一些益處包括(但不限於)跨物種共用投藥及療法藥效學，且在犬DM中重複轉殖基因嚙齒動物ALS模型及人類ALS中所共用之疾病措施的能力。

【0511】 在犬DM中，存在4個期。DM狗中之1期(早期)神經徵兆包括(但不限於)進行性全身性本體感受性共濟失調、非對稱性痙攣性後軀輕

癱及/或完整脊髓反射。DM狗中之2期(早期)神經徵兆包括(但不限於)輕度至中度肌塊損失、下肢中之脊髓反射減少至缺失及/或尿失禁及大便失禁。DM狗中之3期(晚期)神經徵兆包括(但不限於)上肢輕癱、馳緩性截癱、下肢中之肌塊嚴重損失及/或尿失禁及大便失禁之徵兆。DM狗中之4期(晚期)神經徵兆包括(但不限於)馳緩性四肢麻痺、吞咽及舌部運動困難、皮膚肌幹反射減少至缺失、肌塊之全身性及嚴重損失及/或尿失禁及大便失禁。

【0512】 不同量測可用於追蹤動物研究中所用之犬DM狗及正常狗。此等量測包括(但不限於)神經生理學測試(例如運動及感覺神經傳導研究(NCS)、運動單位數目估計(motor unit number estimation; MUNE)、複合肌動作電位(compound muscle action potential; CMAP)及電阻抗肌動描記法(EIM))、神經病變、神經成像(例如MRS、DTI、PET/CT)、基因組學(例如使用遺傳修飾基因)、樣本剖析(例如針對SOD1、NF-H及/或NF-L之血清及CSF)、自然病史度量標準及/或嚴重程度評定量表(例如Olby運動量表; 參見例如Olby NJ等人 Am J Vet Res 2001, 其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0513】 在一個實施例中, 結構蛋白可用作與疾病進展及/或治療作用相關之生物標記。個體之血液及/或CSF中的結構蛋白之水準可用於測定疾病進展及/或治療作用。

【0514】 在一個實施例中, 神經纖維絲蛋白可用作與疾病進展及/或治療作用相關之生物標記。個體之血液及/或CSF中的神經纖維絲蛋白之水準可用於測定疾病進展及/或治療作用。作為非限制性實例, 神經纖維絲蛋白為神經纖維絲輕鏈(NF-L)。作為非限制性實例, 神經纖維絲蛋白為

神經纖維絲重鏈(NF-H)。

【0515】 在一個實施例中，神經纖維絲輕鏈(NF-L)蛋白可用作與疾病進展及/或治療作用相關之生物標記。個體之血液及/或CSF中的NF-L之水準可用於測定疾病進展及/或治療作用。

【0516】 在一個實施例中，神經纖維絲重鏈(NF-H)蛋白可用作與疾病進展及/或治療作用相關之生物標記。個體之血液及/或CSF中的NF-H之水準可用於測定疾病進展及/或治療作用。

定義

【0517】 除非另外說明，否則以下術語及片語具有下文描述之含義。定義本質上並不意欲為限制性的且用以提供本發明之某些態樣之更清晰理解。

【0518】 如本文所用，術語「核酸」、「聚核苷酸」及「寡核苷酸」係指由聚去氧核糖核苷酸(含有2-去氧-D-核糖)或聚核糖核苷酸(含有D-核糖)構成之任何核酸聚合物，或任何其他類型之聚核苷酸，其為嘌呤或嘧啶鹼基或經修飾之嘌呤或嘧啶鹼基之N糖苷。在術語「核酸」、「聚核苷酸」及「寡核苷酸」之間不存在預期長度區別，且此等術語將可互換使用。此等術語僅係指分子之一級結構。因此，此等術語包括雙股及單股DNA，以及雙股及單股RNA。

【0519】 如本文所用，術語「RNA」或「RNA分子」或「核糖核酸分子」係指核糖核苷酸之聚合物；術語「DNA」或「DNA分子」或「去氧核糖核酸分子」係指去氧核糖核苷酸之聚合物。DNA及RNA可分別例如藉由DNA複製及DNA轉錄天然合成；或化學合成。DNA及RNA可為單股(亦即分別為ssRNA或ssDNA)或多股(例如雙股，亦即分別為dsRNA及

dsDNA)。如本文所用，術語「mRNA」或「信使RNA」係指編碼一或多種多肽鏈之胺基酸序列的單股RNA。

【0520】 如本文所用，術語「RNA干擾」或「RNAi」係指由RNA分子介導之序列特異性調節機制，其引起對應的蛋白質編碼基因之表現之抑制或干擾或「緘默化」。已在許多類型之生物體中觀測到RNAi，該等生物體包括植物、動物及真菌。RNAi出現在天然移除外來RNA（例如病毒RNA）之細胞中。天然RNAi經由自游離dsRNA裂解之片段前進，其將降解機制引導至其他類似RNA序列。RNAi受RNA誘導型緘默化複合體(RISC)控制且由細胞質中之短/小dsRNA分子起始，其中其與催化RISC組分阿爾古(argonaute)相互作用。可將dsRNA分子外源地引入至細胞中。外源性dsRNA藉由活化核糖核酸酶蛋白切丁酶起始RNAi，該切丁酶結合且分解dsRNA以產生具有21至25個鹼基對之雙股片段，其在各端上具有若干未配對之突出鹼基。此等短雙股片段稱為小干擾RNA (siRNA)。

【0521】 如本文所用，術語「小/短干擾RNA」或「siRNA」係指能夠引導或介導RNAi之包含在約5至60個之間的核苷酸(或核苷酸類似物)之RNA分子(或RNA類似物)。較佳地，siRNA分子包含介於約15至30個之間的核苷酸或核苷酸類似物，更佳介於約16至25個之間的核苷酸(或核苷酸類似物)，甚至更佳介於約18至23個之間的核苷酸(或核苷酸類似物)，且甚至更佳介於約19至22個之間的核苷酸(或核苷酸類似物)（例如19、20、21或22個核苷酸或核苷酸類似物）。術語「短」siRNA係指包含5至23個核苷酸，較佳21個核苷酸(或核苷酸類似物)，例如19、20、21或22個核苷酸之siRNA。術語「長」siRNA係指包含24至60個核苷酸，較佳約24至25個核苷酸，例如23、24、25或26個核苷酸之siRNA。短siRNA

在一些實例中可包括少於19個核苷酸，例如16、17或18個核苷酸、或少至5個核苷酸，其限制條件為較短的siRNA保留介導RNAi之能力。同樣地，在一些情況下，長siRNA可包括超過26個核苷酸，例如27、28、29、30、35、40、45、50、55或甚至60個核苷酸，其限制條件為較長siRNA保留介導RNAi或轉譯抑制而不需進一步加工，例如酶加工為短siRNA之能力。siRNA可為單股RNA分子(ss-siRNA)或雙股RNA分子(ds-siRNA)，其包含雜交以形成稱為siRNA雙螺旋體之雙螺旋結構的有義股及反義股。根據本發明，重組AAV載體可編碼一或多個RNAi分子，諸如siRNA、shRNA、微RNA或其前驅體。

【0522】如本文所用，術語siRNA分子之「反義股」或「第一股」或「引導股」係指實質上與具有經靶向以用於緘默化之基因之mRNA的約10至50個核苷酸、例如約15至30個、16至25個、18至23個或19至22個核苷酸之部分互補之股。反義股或第一股具有與所需靶mRNA序列充分互補之序列以引導靶特異性之緘默化，例如足以藉由RNAi機制或過程觸發所需靶mRNA之破壞的互補性。

【0523】如本文所用，術語siRNA分子之「有義股」或「第二股」或「隨從股」係指與反義股或第一股互補之股。siRNA分子之反義股及有義股經雜交以形成雙螺旋結構。如本文所用，「siRNA雙螺旋體」包括與經靶向以用於緘默化之基因之mRNA的約10至50個核苷酸之部分具有足夠互補性的siRNA股，及與該siRNA股具有足夠互補性以形成雙螺旋體的siRNA股。根據本發明，重組AAV載體可編碼有義及/或反義股。

【0524】如本文所用，術語「互補」係指聚核苷酸彼此形成鹼基對之能力。鹼基對典型地由反平行聚核苷酸股中之核苷酸單元之間的氫鍵形

成。互補聚核苷酸股可以瓦生克立克方式(Watson-Crick manner) (例如A對T、A對U、C對G)或以使得可形成雙螺旋體之任何其他方式形成鹼基對。如熟習此項技術者所瞭解，當使用RNA而非DNA時，尿嘧啶而非胸腺嘧啶為視為與腺苷互補之鹼基。然而，除非另外說明，否則當在本發明之上下文中指示U時，則暗示取代T之能力。完美互補性或100%互補性係指一個聚核苷酸股之各核苷酸單元可與第二聚核苷酸股之核苷酸單元形成氫鍵之情況。次完美互補性係指兩股之一些但並非所有核苷酸單元可彼此形成氫鍵的情況。舉例而言，對於兩種20-聚體，若僅各股上之兩個鹼基對可彼此形成氫鍵，則聚核苷酸股展現10%互補性。在同一實例中，若各股上18個鹼基對可彼此形成氫鍵，則該等聚核苷酸股展現90%互補性。

【0525】 如本文所用，「靶向」意謂將雜交至靶核酸且誘導所需作用之核酸序列之設計及選擇過程。

【0526】 術語「基因表現」係指以下過程，藉由該過程核酸序列經歷成功轉錄且在大多數情況下經歷成功轉譯以產生蛋白質或肽。為了清楚起見，當提及「基因表現」之量測時，此應理解為意謂可量測轉錄之核酸產物，例如RNA或mRNA，或轉譯之胺基酸產物，例如多肽或肽。量測RNA、mRNA、多肽及肽之量或水準的方法為此項技術中熟知的。

【0527】 如本文所用，術語「突變」係指基因結構之任何變化，產生可傳遞至後代之變異體(亦稱為「突變型」)形式。基因突變可由DNA中之單鹼基之交替、或基因或染色體之較大部分之缺失、插入或重排引起。

【0528】 如本文所用，術語「載體」意謂輸送、轉導或以其他方式充當異源分子(諸如本發明之SOD1靶向聚核苷酸)之載劑之任何分子或部分。「病毒載體」為包含一或多個編碼或包含相關分子，例如轉殖基因、

編碼一個多肽或多個多肽之聚核苷酸或調節核酸，諸如小干擾RNA(siRNA)的聚核苷酸區域之載體。病毒載體常用於將遺傳物質遞送至細胞中。病毒載體常常經修飾以用於特定應用。病毒載體之類型包括反轉錄病毒載體、腺病毒載體及腺相關病毒載體。

【0529】如本文所用，術語「腺相關病毒」或「AAV」或「AAV載體」係指包含或源自腺相關載體之組分且適合於感染哺乳動物細胞，較佳人類細胞之任何載體。術語AAV載體典型地表示AAV型病毒粒子(viral particle/virion)，其包含編碼siRNA雙螺旋體之核酸分子。AAV載體可源自各種血清型，包括血清型(亦即「假型」AAV)之組合，或源自各種基因組(例如單股或自互補)。另外，AAV載體可為有複製缺陷及/或經靶向的。

【0530】如本文所用，片語「抑制基因表現」意謂引起基因表現產物之量減少。表現產物可為自基因轉錄之RNA分子(例如mRNA)或自mRNA轉譯之多肽，該mRNA自基因轉錄。典型地，mRNA水準之減少引起自其轉譯之多肽的水準減少。表現量可使用量測mRNA或蛋白質之標準技術來測定。

【0531】如本文所用，術語「活體外」係指發生在人工環境中(例如試管或反應容器中、細胞培養物中、皮氏培養皿(Petri dish)中等)而非發生在生物體(例如動物、植物或微生物)中的事件。

【0532】如本文所用，術語「活體內」係指發生在生物體(例如動物、植物或微生物或其細胞或組織)中之事件。

【0533】如本文所用，術語「經修飾」係指本發明之分子之變化的狀態或結構。可以多種方式修飾分子，包括在化學上、結構上及功能上。

【0534】如本文所用，術語「合成」意謂藉由人工產生、製備及/或製造。聚核苷酸或多肽或本發明之其他分子的合成可為化學或酶促合成。

【0535】如本文所用，術語「轉染」係指將外源性核酸引入細胞中之方法。轉染法包括(但不限於)化學方法、物理處理及陽離子型脂質或混合物。可轉染至細胞的之藥劑之清單較大且包括(但不限於)siRNA、有義序列及/或反義序列、AAV載體或粒子、編碼一或多個基因且組織至表現質體中之DNA、蛋白質、蛋白質片段等。

【0536】如本文所用，「脫靶」係指對任何一或多種靶向物、基因或細胞轉錄物之任何非預期作用。

【0537】如本文所用，片語「醫藥學上可接受」在本文中用於指在合理醫學判斷範疇內，適用於與人類及動物之組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏反應或其他問題或併發症，與合理益處/風險比相匹配的彼等化合物、物質、組合物及/或劑型。

【0538】如本文所用，術語試劑之「有效量」為足以實現有益或所需結果，例如臨床結果之量，且因此「有效量」視其應用情形而定。舉例而言，在投與治療ALS之藥劑之情形下，藥劑之有效量係例如相比於在未投與藥劑下所獲得之反應，足以實現ALS之如本文所定義之治療的量。

【0539】如本文所用，術語「治療有效量」意謂待遞送之藥劑(例如核酸、藥物、治療劑、診斷劑、預防劑等)之量，當向患有或易患感染、疾病、病症及/或病狀之個體投與時，該量足以治療；改善感染、疾病、病症及/或病狀之症狀；診斷；預防及/或延遲其發作。

【0540】如本文所用，術語「個體」或「患者」係指例如出於實驗、診斷、預防及/或治療目的，可投與根據本發明之組合物的任何生物

體。典型的個體包括動物(例如諸如小鼠、大鼠、兔之哺乳動物，諸如黑猩猩及其他猿及猴物種之非人類靈長類動物，及人類)及/或植物。

【0541】如本文所用，術語「預防(preventing/prevention)」係指延遲或預先阻止病狀或疾病之發作、罹患或進展持續一段時間，包括數週、數月或數年。

【0542】如本文所用，術語「治療(treatment/treating)」係指用於治癒或改善疾病之一或多種具體程序之應用。在某些實施例中，具體程序為投與一或多種醫藥劑。在本發明之上下文中，具體程序為投與靶向SOD1基因之一或多種siRNA雙螺旋體或dsRNA。

【0543】如本文所用，術語「改善(amelioration/ameliorating)」係指病狀或疾病之至少一種指標的嚴重程度減輕。舉例而言，在神經退化病症之情形下，改善包括神經元損失之減少。

【0544】如本文所用，術語「投與」係指向個體提供醫藥劑或組合物。

【0545】如本文所用，術語「神經退化」係指導致神經細胞死亡之病理狀態。大量神經病症共有呈常見病理狀態形式之神經退化。舉例而言，阿茲海默氏病、帕金森氏病、亨廷頓氏病及肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)均會引起慢性神經退化，其特徵為經若干年之時段緩慢的進行性神經細胞死亡，而急性神經退化之特徵在於由諸如中風之局部缺血或諸如創傷性腦損傷之外傷引起，或由例如脊髓損傷或多發性硬化症引起之脫髓鞘或外傷所造成之軸突橫斷引起的神經細胞死亡之突然發作。在一些神經病症中，主要一類神經元細胞為退化的，例如ALS中之運動神經元退化。

實例

實例1. SOD1靶向聚核苷酸設計(siRNA)

【0546】 進行siRNA設計以鑑別靶向人類SOD1基因之siRNA。該設計分別使用來自人類(NCBI參考序列NM_000454.4；SEQ ID NO: 1)、食蟹獼猴(NCBI參考序列NM_001285406.1；SEQ ID NO: 2)、恆河猴(NCBI參考序列NM_001032804.1；SEQ ID NO: 2)及家犬(NCBI參考序列NM_0013035；SEQ ID NO: 4)之SOD1轉錄物(表10)。siRNA雙螺旋體設計成對於反義股之位置2-18與人類SOD1轉錄物具有100%一致性，且對於反義股之位置2-18與非人類靈長類動物SOD1轉錄物具有部分或100%一致性。在所有siRNA雙螺旋體中，將反義股之位置1工程改造成U，且將有義股之位置19工程改造成C，以便使雙螺旋體在此位置處不配對。

表10. SOD1基因序列

SOD1轉錄物	寄存編號	SEQ ID NO.	序列
人類 SOD1 cDNA (981bp)	NM_000454.4	1	GTTTGGGGCCAGAGTGGGCGAGGCGCGGAGGTCTGGCC TATAAAGTAGTCGCGGAGACGGGGTGCTGGTTTTCGTCG TAGTCTCCTGCAGCGTCTGGGGTTTCCGTTGCAGTCCTCG GAACCAGGACCTCGGCGTGGCCTAGCGAGTTATGGCGAC GAAGGCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCCAGTGC AGGGCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGAC CAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTAAAGGACTGACTGAA GGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATA CAGCAGGCTGTACCAAGTGCAGGTCCTCACTTTAATCCTCT ATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAAGGATGAAGAGAGGC ATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGACAAAGATG GTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACT CTCAGGAGACCATTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGGT CCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGAATG AAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTTG GCTTGTGGTGTAAATTGGGATCGCCCAATAAACATTCCCTT GGATGTAGTCTGAGGCCCTTAACTCATCTGTTATCCTGCT AGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTAAACACTGTAA TCTTAAAAGTGTAATTGTGTGACTTTTTCAGAGTTGCTTT AAAGTACCTGTAGTGAGAACTGATTTATGATCACTTGGA AGATTTGTATAGTTTTATAAACTCAGTTAAAATGTCTGTT TCAATGACCTGTATTTTGCAGACTTAAATCACAGATGGG TATTAACTTGTGAGAATTTCTTTGTCATTCAAGCCTGTG AATAAAAACCCTGTATGGCACTTATTATGAGGCTATTAAA AGAATCCAAATTCAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
食蟹獼猴 SOD1 cDNA (465bp)	NM_001285406.1	2	ATGGCGATGAAGGCCGTGTGCGTGTTGAAGGGCGACAGC CCAGTGCAGGGCACCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGT AATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTACAGGATTG ACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATCAGTTTGGAG ATAATACACAAGGCTGTACCAAGTGCAGGTCCTCACTTTAA

			TCCTCTATCCAGACAACACGGTGGGCCAAAGGATGAAGA GAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTGCTGGCAA AGATGGTGTGGCCAAGGTGTCTTTCAAGATTCTGTGATC TCGCTCTCAGGAGACCATTCCATCATTGGCCGCACATTGG TGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGA AATGAAGAAAGTAAAAAGACAGGAAACGCTGGAGGTCTG TCTGGCTTGTGGTGTAAATTGGGATCGCCCAATAA
恆河猴 SOD1 cDNA (465bp)	NM_001032804.1	2	ATGGCGATGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGCGACAGC CCAGTGCAGGGCACCATCAATTTGAGCAGAAGGAAAGT AATGGACCAAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATTACAGGATTG ACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATCAGTTTGGAG ATAATACACAAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAA TCCTCTATCCAGACAACACGGTGGGCCAAAGGATGAAGA GAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTGCTGGCAA AGATGGTGTGGCCAAGGTGTCTTTCAAGATTCTGTGATC TCGCTCTCAGGAGACCATTCCATCATTGGCCGCACATTGG TGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGA AATGAAGAAAGTAAAAAGACAGGAAACGCTGGAGGTCTG TCTGGCTTGTGGTGTAAATTGGGATCGCCCAATAA
家犬 SOD1 cDNA (474 bp)	NM_001003035 (GI: 50978673)	4	CGAGTCATGGAGATGAAGGCCGTGTGCGTGTGAAGGGC CAGGGCCCGGTGGAGGGCACCATCCACTTCGTGCAGAA GGGAAGTGGGCCTGTTGTGGTATCAGGAACCATTACAGG GCTGACTGAAGGCGAGCATGGATTCCACGTCCATCAGTT TGAAGATAANACACAAGGCTGTACTAGTGCAGGTCCTCA CTTTAATCCTCTGTCCAAAAAACATGGTGGGCCAAAAGA TCAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTGC TGGCAAGGATGGCGTGGCCATTGTGTCCATAGAAGATTCT CTGATTGCACTCTCAGGAGACTATTCCATCATTGGCCGCA CCATGGTGGTCCACGAGAAACGAGATGACTTGGGCAAA GGTGACAATGAAGAAAGTACACAGACAGGAAACGCCGG GAGTCGTTTGGCTTGTGGTGTTCATTGGGATCGCCCAATAA ACATTC

實例2. ALS動物模型

【0547】 可使用狗來研究靶向SOD1以治療ALS的AAV基因療法之功效。犬退化性脊髓病(DM)為理想疾病模型，因為天然存在之SOD1突變(E40K)會引起犬DM，狗具有相對較大之脊髓/大腦，受DM影響之狗具有疾病進展及組織病理學研究結果之均一型樣，且DM中之功能缺陷與人類ALS之上運動神經元發病之一些形式共有相似性(Awano等人 全基因組關聯分析顯示犬退化性脊髓病中之SOD1突變，其與肌萎縮性脊髓側索硬化症相似；PNAS 2009二月;106(8); 2794-2799，其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0548】 犬DM為天然存在的成年發作之進行性疾病，其與ALS類似，會導致麻痺及死亡(Averill, DJ. Degenerative myelopathy in the

aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. J Am Vet Med Assoc 1973;162:1045-1051；其內容以全文引用之方式併入本文中)。當狗為8歲或大於8歲時，最早期臨床徵兆開始出現。DM會影響多種狗種，總發病率為0.19%。疾病發作及臨床進展在所有品種中均為單一的，呈現感官及上及下運動神經元退化。臨床表現已分類為四個臨床疾病期(Coates JR，Wininger FA. Canine degenerative myelopathy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010;40:929-950及Kanazono S，Pithua P，Johnson GC等人 Clinical progression of canine degenerative myelopathy. 2013年美國獸醫內科學會年度論壇(2013 American College of Veterinary Internal Medicine Annual Forum). Seattle, WA 2013年六月16-18日. J Vet Int Med 2013;24(3):699；該等文獻中之每一者的內容均以全文引用之方式併入本文中)。臨床徵兆顯現為非對稱性痙攣性後軀輕癱及全身性本體感受性共濟失調(I期)，在自疾病發作開始1年內，發展至不能走動之後軀輕癱/截癱，伴隨下肢下運動神經元徵兆(II期)。當狗下肢不能走動時，狗主人通常會選擇進行安樂死。神經缺陷發展成包括上肢無力(III期)，之後馳緩性四肢麻痺、全身性肌肉萎縮及腦幹功能障礙(IV期)。

【0549】 DM之病理學特徵與ALS之特徵相似，包括軸突缺失、繼發性脫髓鞘及星形膠質細胞增殖(硬化)，其在外側索之背側部分處及中胸區至下胸區之背柱處最為嚴重。由於患有DM之伴侶狗之主人在疾病進展之不同階段將其寵物安樂死，因此可藉由檢查來自安樂死時所收集的此等狗之組織來研究進展之所有階段時的疾病，且由此獲得對脊髓、外周神經及肌肉中所出現的病變之間的時序關係之較佳理解。顯著感官神經元退化亦在運動神經元病變之任何跡象之前。因此，病變分佈及DM之臨床疾病

進展與針對UMN發病ALS所報導相似，伴隨受DM影響之狗中之UMN徵兆隨後發展成LMN徵兆。

【0550】 初步資料顯示，1期(能走動，徵兆發作)至2期(不能走動)之疾病進展之中值期為10個月(95% CI，9至12個月)(Kanazono S，Pithua P，Johnson GC等 人 Clinical progression of canine degenerative myelopathy. 2013年美國獸醫內科學會年度論壇. Seattle, WA 2013年六月16-18日. J Vet Int Med 2013;24(3):699；其內容以全文引用之方式併入本文中)。在不同品種中，1期至2期之過渡在時間上不存在明顯差異。因此，DM之單一疾病進展將促進治療功效之縱向量測及偵測。當將ALS療法自動物轉換至人類或反過來時，需要物種間共有的敏感性及客觀疾病標記來進行診斷及監測疾病進展，以使得治療功效可為準確的。

【0551】 可使用犬DM模型研究本文所述的靶向SOD1之AAV中之任一者。

實例3. 量測犬DM之方法

綜述

【0552】 用於量測上(大腦及脊髓)及下(肌肉及神經)運動神經元受損之進展的可靠方法將提供DM之早期診斷，確定病變對臨床症候群之作用，且充當治療試驗中之疾病進展的客觀功能量度或生物標記。另外，此等技術可提供用於監測與ALS患者中之試驗平行的療法試驗中之疾病進展的結果評定。吾人之研究將評估經IT遞送之AAV.iSOD1以減緩疾病進展。處理與未處理組之間的縱向疾病之間顯著差異將提供受DM影響之狗中保持LMN及UMN之可定量量測。下文為用於縱向監測進展的犬DM中之功能性疾病標記的簡要總結。

神經纖維絲蛋白(NFs)

【0553】神經纖維絲蛋白(NFs)為有髓鞘之軸突的含量最大之細胞骨架蛋白，數量超過微管5至10倍。NFs為神經纖維絲輕鏈(NF-L)、中鏈(NF-M)及重鏈(NF-H)蛋白。活體內NFs為與髓鞘形成同時出現的軸突直徑之大量增加所需的。血液及CSF中之NF-L及NF-H水準已經分析作為多種疾病中之生物標記。具體而言，對於人類ALS，血液及CSF中之NFs之分析聚焦於NF-H之磷酸化形式(pNF-H)。自確診的ALS病例分離的CSF中之pNF-H水準與存活期負相關，其表明pNF-H為疾病期之可靠標記。另外，ALS中之疾病進展涉及經縱向評估之血漿NF-H水準之限定軌跡，其反映神經衰退之速度及存活期。

【0554】融化冷凍的血清及CSF樣本且用稀釋緩衝液進行三倍稀釋。根據Shaw博士實驗室方案用使用人類pNF-H抗體之商用ELISA套組(BioVendor Research and Diagnostic Products, Modrice, Czech Republic)來進行pNF-H分析；藉由以對數標度繪製相對於已知濃度的標準物之平均吸收度來構築標準曲線。

【0555】CSF及血液pNF-H應為狗中之DM之可靠生物標記且可用作AAV-iSOD1藥效學之侵襲性最低之縱向量度。

磁共振成像(MRI)

【0556】包括擴散張量成像(DTI)及質子磁共振光譜分析(MRS)之先進磁共振成像(MRI)可作為用於在ALS分析中定量評定UMN系統之技術。DTI能夠表徵活體內水分子之擴散特性。DTI可藉由分率各向異性定量活體內局部微結構中之擴散各向異性。通常使用兩個基於DTI之純量指數來表徵局部腦組織所述微觀結構：表觀擴散係數(ADC)及分率各向異性

(FA)。ADC為擴散之定向平均化量值之量度且與局部腦組織之完整性相關。FA表示擴散各向異性之程度且反映細胞結構之對準程度。其表明，各向異性之降低可反映外周及中樞神經系統兩者中出現軸突纖維退化及髓鞘破壞。先前已報導，經降低之各向異性會在患有ALS之患者的皮質脊髓束(CST)及胼胝體中看到，發生在病程早期且與疾病嚴重程度相關。作為ALS之病理標誌之CST退化與受DM影響之狗中看到之外側索退化相似。外側索及背索退化與背根神經節退化(亦即脊髓小腦束退化)相似(March PA, Coates JR, Abyad R等人 Degenerative Myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi Dogs. Vet Pathol 2009;241-250；其內容以全文引用之方式併入本文中)。

【0557】 MRS使得可量測活體內大腦之特定區域之神經化學特徵曲線，且典型地依賴於N-乙醯基化合物共振(主要為N-乙醯天冬胺酸(NAA)，神經元完整性之標記)之量測，其表示為NAA與肌酸(Cr)之比率。若干研究已證明，在患有ALS之患者之運動皮質之層級上NAA與NAA/Cr比率會有所降低(Pioro EP, Majors AW, Mitsumoto H等人 H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla. Neurology 1999;53:71-79及Rooney WD, Miller RG, Gelinas D等人 Decreased N-acetylaspartate in motor cortex and corticospinal tract in ALS. Neurology 1998;50:1800-1805；該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中)。儘管普遍認為DM為脊髓疾病，但其與ALS之另外極大相似性有待在亦可出現於大腦中之神經化學變化之存在方面進行研究。此等神經化學變化有可能在不存在可在組織病理學上可鑑別的其他微觀結構變化下存在。

【0558】 MRI可用於研究IT投與AAV-iSO1之作用，其包括處理與未處理的受DM影響之狗之間在抑制相關CNS區中DTI上經降低之各向異性水準及經降低之NAA水準方面之差異。

運動單位數目估計(MUNE)

【0559】 運動單位數目估計(MUNE)為用於對LMN或運動單位之損失進行定量之無創電生理學技術。MUNE已用於證明臨床症狀發作之前LMN功能喪失且用作ALS中之進展之預測因子。藉由使超極限複合肌動作電位(supramaximal compound muscle action potential；CMAP)除以平均單個運動單位電位(SMUP)來測定MUNE (McComas AJ，Fawcett PR，Campbell MJ，Sica REP. Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1971;34:121-131；其內容以全文引用之方式併入本文中)。可使用負峰面積或幅度來計算SMUP及CMAP。計算產生估計使肌肉群受神經支配的運動神經軸突之數目的無單位數。研究顯示，MUNE計數之降低與ALS患者中之疾病進展密切相關(Shefner JM，Cudkowicz ME，Zhang H等人 The use of statistical MUNE in a multicenter clinical trial. Muscle Nerve 2004;30:463-469；其內容以全文引用之方式併入本文中)。縱向監測具有ALS之早期徵兆之患者的值為其隨時間推移之變化率，由此可需要進行連續量測。MUNE技術之不同之處在於如何獲得平均SMUP。在調節型遞增刺激中，刺激電極保持處於相同位置且向外周神經施加漸變電刺激以獲得連續遞增之誘發電位(McComas等人, 1971)。針對趾短伸肌之調節型遞增刺激MUNE技術可用於受DM影響之狗的縱向研究中。在犬DM中與動態DM研究中的其他臨床標準一起利用MUNE將不僅提供LMN之疾病進展之

敏感性及特定量測(標記)，且亦提供對平行於ALS患者中所用替代標記之療法的反應的敏感性及特定量測(標記)。

半定量運動量表

【0560】 半定量程序可根據順序運動等級量表對動物之功能進行評分。Olby等人對BBB量表，啮齒動物中所用之擴展型運動量表進行了調整(Olby NJ, De Risio L, Munana KR等人 Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. Am J Vet Res. 2001;62:1624-1628；其內容以全文引用之方式併入本文中)。該量表經驗證來評估急性脊髓損傷之後癱瘓的狗中下肢及尾部功能(運動及感官功能)之恢復(Olby NJ, Harris T, Burr J等人 Recovery of pelvic limb function in dogs following acute intervertebral disc herniations. J Neurotrauma. 2004;21:49-59；其內容以全文引用之方式併入本文中)。恢復劃分成14個不同等級。Olby運動等級量表可經調節以便評估受DM影響之狗中之走動狀態。出於觀測者內可靠性，歷經2週之時段(伴隨重複觀測之間至少48小時)由5名對節段進行評分之觀測者審閱視訊3次。各狗所分配的評分之平均值及SD用於藉由使用弗雷斯卡帕統計法(Fleiss Kappa-statistics)計算觀測者內及觀測者間變異係數。類1及類2間之評級存在中度一致，且類3至類5存在實質一致[偏差校正值： κ (95% CI) = 0.670 (0.53-0.796)]。此經調節之運動等級量表將用以以較敏感方式縱向評估能走動(1期)至不能走動狀態(2期)之步態。此等級量表可用於較精細地監測走動之嚴重程度，例如評分9相當於當狗變得不能走動時的10個月之時間點。

電阻抗肌動描記法(EIM)

【0561】電阻抗肌動描記法(EIM)為量測局部組織阻抗之無創電生理學技術。所有阻抗方法均依賴於以下基本原則：若高頻率及低強度之交流電施加至物質，則能量將隨其行進通過該物質而耗散。由此產生可量測電壓。因此，電阻抗可用於量測組織對施加電流之作用。可基於歐姆定律(Ohm's law)： $V_{\text{電壓}} = I_{\text{電流}} \times R_{\text{電阻}}$ 或 $V = I \times Z$ 以數學方式描述阻抗，其中Z表示電路之複阻抗，其固有電阻及其電抗(X)之組合；後者為由電路中之電容器及/或電感器之存在而產生的電流之阻塞。骨骼肌具有強各向異性或對電流之方向依賴性的特有特徵。肌細胞為圓柱形，其使得電流可易於在視電流方向而定的不同阻抗值情況下流動。肌細胞膜之脂質雙層充當電容器，電抗(X)之源，且細胞內及細胞外流體充當電阻器，其電阻(R)之源。使用關係 $\Theta = \arctan (X/R)$ ，主要EIM結果變數為相角(Θ)。使用跨越相關區域之多個電極或空間平均值 $\Theta_{\text{平均}}$ (主要結果值/變數)來進行量測。

【0562】在患病肌肉中，結構及組成之變化將反映在肌肉之局部阻抗之變化中。患病肌肉可藉由肌纖維萎縮、增加之肌內膜結締組織及脂肪及水腫來體現；所有均可影響電阻及電抗。很大程度上基於來自ALS及DM患者之組織的死後檢查，普遍地咸信ALS之肌肉萎縮特徵為運動神經元之繼發性退化。然而，肌肉萎縮可能在很大程度上獨立於ALS及DM中之運動神經元退化且甚至在其之前出現。出於鑑別疾病變化之型樣，EIM參數可充當疾病進展及結果量測之標記。基於神經根病變及發炎肌病之研究，較低 $\Theta_{\text{平均}}$ 值反映較嚴重疾病。ALS患者及轉殖基因ALS大鼠之長期研究已顯示 $\Theta_{\text{平均}}$ 值之穩定下降(Wang LL, Spieker AJ, Li J, Rutkove SB. Electrical impedance myography for monitoring motor neuron loss in the SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis rat. Clin Neurophysiol. 2011

Dec;122(12):2505-11; Tarulli AW, Garmirian LP, Fogerson PM, Rutkove SB. Localized muscle impedance abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. J Clin Neuromuscul Dis. 2009;10(3):90-6; 該等文獻中之每一者之內容以全文引用之方式併入本文中), 且與存活期之相關性及其他習知量測, 亦即用力肺活量及ALS功能等級量表。目前, 受DM影響之狗中缺乏關於使用EIM之此類資料。應用EIM的主要優點在於其易於在清醒動物中進行, 而迄今論述的大多數其他診斷性標記則需要進行全身麻醉。受DM影響之狗在EIM值方面應具有與人類ALS患者相似之變化, 且AAV.iSOD1處理將影響此等值。

實例4. 靶向SOD1以治療ALS

綜述

【0563】將使用針對犬退化性脊髓病(DM)之基因治療方法研究用於治療ALS之靶向SOD1之AAV基因療法, 該DM為類似於ALS之一些形式的伴侶狗之天然存在之疾病。研究將評估給藥範式以便測定出至靶區域的基因轉移之均勻分佈。鞘內(IT)投與AAV先前已顯示出與全身給藥相比, 較高程度之CNS分佈, 其包括運動神經元之顯著轉導; 較少外周組織暴露及降低之免疫反應。可評估正常狗及天然存在之ALS、犬DM之動物模型中伴隨IT投藥, 靶向SOD1之AAV基因療法的安全性、藥理學(包括分佈)及功效。

構築體、衣殼及給藥範式之選擇

【0564】為了鑑別最佳RNAi序列, 設計、合成且在海拉細胞中活體外測試169個選擇性地靶向SOD1之序列。在100 pM下, 大約有25個序列抑制SOD1 mRNA超過80%。

給藥

【0565】 AAV需要以給藥範式遞送，該給藥範式提供基因轉移沿CNS之嘴側-尾側軸線之相對均勻分佈。此分佈應顯示療法轉換以治療人類ALS。參數，諸如輸注體積、速率及持續時間可有所變化，以便具有用於治療ALS的轉殖基因表現之最佳分佈。

實例5. 正常狗中靶向SOD1之AAV的藥理學研究

給藥方案

【0566】 在HEK293細胞中使用三重轉染產生靶向SOD1之AAV (AAV.iSOD1)。在測試狗之前藉由評定直接CNS投藥之後hSOD1轉殖基因小鼠(Tg(SOD1)3Cje/J；The Jackson Laboratory)中之SOD1抑制來測試AAV.iSOD1以確保其活體內具有藥理學活性。

【0567】 將針對預先存在之對AAV衣殼之免疫性藉由在活體外中和抗體分析中評估血清樣本來篩選達至大約80隻雄性雜種狗(Marshall BioResources, North Rose, NY, USA)。抗體效價< 1:10之動物將為研究之候選者。16隻雄性雜種狗(包括2隻替代狗)將以手術方式植入有導管。該等狗將劃分成四個處理組且用AAV.iSOD1或媒劑藉由IT給藥投與，如表11中所示。部位將為腰椎或小腦延髓池。

表11. 研究設計

組號	測試物	速率	劑量 (vg)	濃度 (vg/ml)	體積 (ml)	動物數量	屍檢日
1	AAV.iSOD1	輸注-速率 TBD	3×10^{13}	1×10^{13}	3	4	D28
2	AAV.iSOD1	快速注射 (1 毫升/分鐘)	3×10^{13}	1×10^{13}	3	4	D28
3	AAV.iSOD1	輸注-速率 TBD	1×10^{14}	1×10^{13}	10	4	D28
4	媒劑	進行輸注以匹配第1組與第3組	0	0	3	2	D28

【0568】 預定間隔之後，將針對臨床觀測結果、體重、功能性觀測組、神經檢查、臨床病理學、器官重量、大體病理學、組織病理學(H&E、擴展神經病變圖)、脊髓及其他組織中之SOD1抑制及載體基因組之分佈以及CSF中潛在生物標記對狗加以評估。

安全性及藥理學

【0569】 將使用注射時重量為15至30 kg之雄性雜種狗(Marshall BioResources, North Rose, NY, USA)。給藥之後，將針對一般外觀及特性之變化監測各狗。將自給藥第一天開始，針對罹病率及死亡率每日至少觀測動物兩次。在整個研究期間，術後每日至少記錄臨床症狀兩次。在研究期間瀕死之任何測定動物將處死。將每週進行全面神經檢查一次。將在術前、手術當天、研究期間每週一次及屍檢時記錄所有動物之體重。自術前開始且在治療期間持續每日收集食物消耗量。

【0570】 將針對臨床病理學(第1天給藥前、第3天及第28天臨屍檢之前)、血清抗體分析(第1天給藥前、第3天及第28天臨屍檢之前)及細胞介素分析(第1天給藥前及第28天臨屍檢之前)自禁食動物收集血液及尿液樣本。將在臨給藥之前及第28天收集CSF樣本以進行抗體分析及潛在生物標記分析。AAV投藥之後四週，將所有動物安樂死且用生理鹽水加以灌注，之後收集包括大腦、脊髓、背根神經節、肝臟、心臟、脾臟、腎臟及其他器官之組織。將記錄器官重量及大體病理學。

【0571】 安樂死時，將在大腦基質中以3 mm冠狀切片厚度對大腦進行切割。將對左半腦切片進行急凍且儲存於-60℃或低於-60℃下直至運送。脊髓將切割成大約25個節段，包括頸椎節段、胸椎節段、腰椎節段及骶骨節段。將對選定節段進行急凍且儲存於-60℃或低於-60℃下直至運

送。亦將收集脊神經根及背根神經節(DRG)。右半腦切片及選定脊髓節段(例如C1、C7、T8及L6/7)及對應於C1、C7、T8、L6及S2的脊神經之DRG對將浸沒固定於4%冷凍多聚甲醛(PFA)中且在攪拌下保持在1℃至8℃下72小時。隨後組織將轉移至於0.1M磷酸鹽緩衝鹽水中之30%蔗糖溶液且加以冷凍(2℃至8℃)直至運送。新製冷凍組織將用於分析，其可包括對載體基因組、mRNA及/或轉殖基因表現進行定量。後固定組織將用於包括蘇木精及伊紅(H&E)染色及擴展神經病理學圖之組織病理學。

臨床病理學

【0572】將進行臨床病理學，其將包括血液學、血清生物化學、CSF分析、尿分析及凝血評估。儘管將標記參考範圍之外的任何參數，但將使用ANOVA以統計方式比較平均肝酶ALT、GGT及ALP、肝功能指數(白蛋白、葡萄糖、膽固醇、膽紅素、血尿素氮(BUN))及肌酸。若任何肝酶處於已獲實驗室確認之參考範圍之外，則將分析空腹血氨濃度以評估該狗中之肝功能。除了BUN及肌酐、尿液比重之外，將使用尿蛋白及尿管型(urine cast)來評估腎功能。若偵測到蛋白尿處於大於痕量下，則將表現蛋白質:肌酸比率。將針對凝血異常評估凝血酶原時間、部分凝血活酶時間及賴內黏膜出血時間。將針對蛋白質濃度、細胞性及細胞類型評估CSF。

抗體分析

【0573】將使用活體外基於細胞之分析進行針對中和抗體的血清及CSF之分析，以針對使用報導子之AAV轉導功能抑制評定血清或CSF樣本。

細胞介素分析

【0574】 將使用犬特異性分析進行血液及CSF之細胞介素分析。將評估之細胞介素包括IL-1 β 、IL-1RA、IL-6、IFN- γ 及TNF- α 。

組織學程序

【0575】 將進行組織學程序及評估。脊髓及其他組織樣本將加以微調，包埋於石蠟中且加以切片(大約5微米)，且用H&E染色且進行擴展神經病理學圖。H&E染色將用於評估一般組織病理學變化，而Fluoro-Jade B及針對細胞型特異性標記(例如NeuN、GFAP、Iba1)之免疫組織化學將用於評定神經病理學變化。

SOD1 mRNA定量

【0576】 脊髓、DRG及其他組織樣本中之SOD1抑制將使用定量RT-PCR評定以量測mRNA水準。簡言之，將藉由qRT-PCR使用標準方法測定SOD1之mRNA水準及內源性GAPDH及/或 β -肌動蛋白mRNA。對於各樣本，SOD1 mRNA之平均水準將標準化至內源性對照mRNA之平均水準。樣本將包括脊髓及完整DRG以及運動神經元、星形膠質細胞及分別藉由形態及免疫組織化學標記，諸如膽鹼乙醯基轉移酶、GFAP及小白蛋白鑑別，且隨後藉由雷射捕獲顯微解剖收集之大感官神經元的截面。

SOD1 蛋白分析

【0577】 脊髓及其他組織樣本中之SOD1抑制將使用西方墨點分析評定。將採用標準方法。

載體基因組定量

【0578】 脊髓及其他組織樣本中之載體基因組將使用定量PCR評定。簡言之，將藉由定量PCR使用標準方法測定載體基因組及宿主二倍體基因組之複本。對於各樣本，載體基因組之複本之平均水準將標準化至宿

主二倍體基因組之複本。

生物標記分析

【0579】 可在CSF樣本中評估生物標記。對於CSF胞外體之後續分離，將藉由離心及過濾，之後立即收集，且隨後急凍且儲存於-60°C或低於-60°C下直至運送來處理樣本。

實例6. 受DM影響之狗中的靶向SOD1之AAV的功效研究

用於研究的動物之選擇

【0580】 將選擇基於輕度全身性本體感受性共濟失調之體徵的DM之1期中的受DM影響之伴侶狗(n=20)進行研究。DM之診斷將基於臨床症狀、整個脊髓及CSF分析之正常MRI、缺乏電生理學異常及*SOD1:c.118A*對偶基因之純合性。亦將針對其他主要身體疾病對狗進行篩選。

給藥方案

【0581】 靶向SOD1之AAV(AAV.iSOD1)係藉由HEK293細胞方法中之桿狀/Sf9系統或三重轉染任一者產生。在測試狗之前藉由評定直接CNS投藥之後hSOD1轉殖基因小鼠(Tg(SOD1)3Cje/J; The Jackson Laboratory)中之SOD1抑制來測試AAV.iSOD1以確保其活體內具有藥理學活性。

【0582】 將針對預先存在的對AAV衣殼之免疫性藉由在活體外中和抗體分析中評估血清樣本來篩選受DM影響之狗。抗體效價< 1:10之動物將為研究之候選者。狗將劃分成兩個處理組且使用在正常狗研究中展示為安全及藥理學活性之IT給藥範式(速率、劑量及體積) (參見實施例5)投與AAV.iSOD1或媒劑。表12顯示針對受DM影響之狗之研究設計。部位將為腰椎或小腦延髓池。

表12. 研究設計

組號	測試物	速率	劑量 (vg)	濃度 (vg/ml)	體積 (ml)	動物數 量
1	AAV.iSOD1	TBD	TBD	1 x 10 ¹³	TBD	15
2	媒劑	TBD	0	0	TBD	5

【0583】 預定間隔之後，將針對神經缺陷、臨床症狀發作至不能走動之後軀輕癱之時間、步態分級量表、神經傳導研究、肌電描記術、運動單位數目估計(MUNE)、電阻抗肌動描記法(EIM)、磁共振成像(MRI)、臨床病理學研究、潛在CSF生物標記及組織病理學來評估各狗。

受DM影響之狗的檢測

【0584】 將針對身體及神經檢查、血項、CSF取樣及尿分析且針對縱向評定評估動物2至3個月(基線及至多4次)，且每月將審查動物之步態。評定時間概述於下表13中：

表13. 評定

疾病量度	基線	3個月	6個月	9個月	11個月
<i>pNF-H</i>	X	X	X	X	X
<i>DTI/MRS</i>	X	-	X	-	X
<i>電診斷</i> <i>MUNE</i>	X	X	X	X	X
<i>EIM</i>	X	X	X	X	X

監測步態及神經結果

【0585】 將自1期(能走動，徵兆發作)至2期(不能走動)監測疾病進展。未處理之受DM影響之狗將有可能以10個月(95% CI，9至12)自1期進展至2期。將使用卡本-麥爾(Kaplan-Meier；KM)圖來追蹤群組當中DM之進展，且有可能追蹤自DM 1期轉變成2期的群組之比例。因此，將計算出未進展成2期的狗之比例(及相關單側95% CI)。疾病1期與2期之間的狗之步態將錄成視訊且使用Olby運動等級量表由2名有經驗之觀測者進行分級。另外，將在其整個病程期間監測各狗直至安樂死。

pNF-H

【0586】 將在處理及未處理之受DM影響之狗中的血清及CSF中監測pNF-H。將在指定時間及安樂死時收集血清及CSF樣本。將對所有樣本進行分批且傳送至EnCor (Gainesville, FL)用於檢定及分析。將藉由重複措施ANOVA，之後進行Holm-Sidak成對比較在處理組之間進行比較。

細胞介素分析

【0587】 將使用犬特異性分析進行血液及CSF之細胞介素分析。將評估之細胞介素包括IL-1 β 、IL-1RA、IL-6、IFN- γ 及TNF- α 。

DTI及MRS

【0588】 將在3個時間點對經AAV.iSOD1處理之狗進行MRI。將使用具有先前已獲確認之犬參數的3 Tesla Toshiba掃描儀進行所有大腦之MRI研究。出於優良解析度，將沿30個方向進行DTI。除了使用MPRAGE序列進行標準3D T1解剖成像之外，將生成FA、ADC及色圖以用於資料分析。將用先前已獲確認之方案對所有狗之大腦進行單一及多立體像素MRS採集，聚焦於丘腦、紅核及尾核作為關注區。

【0589】 將計算ADC、FA、NAA濃度及NAA/Cr之平均值、中值及標準差之描述性統計資料。受DM影響與不受影響之狗中之此等值之間的差將用配對史都登氏 t 測試(paired student's t test)進行評估($P < 0.05$)。相關係數將獲確認以比較MR值與疾病嚴重程度。

電診斷測試及MUNE

【0590】 將在規定時間點進行預期電診斷評估。將使用Cadwell SIERRA-WAVETM電診斷器進行測試。由於疾病發作通常為非對稱的，因此將EDB肌肉之經調節之遞增刺激MUNE技術應用至兩個下肢。確認一個次閾

水準，將施加刺激增量直至觀測到不同誘發電位。將記錄下10個誘發電位且用作單一運動單位電位(SMUP)。超極限複合肌動作電位除以平均SMUP將產生MUNE。每階段將進行兩個連續試驗且平均化以降低變化性。亦將進行尺骨及坐骨-腓骨神經之常規全身EMG及神經傳導研究(包括F波)。

【0591】 將生成頻率分佈圖以檢查處於疾病1期及2期的受DM影響的經處理及未處理狗中之MUNE資料之正態分佈且與年齡匹配之正常狗相比。將針對各肢體評定MUNE之縱向偏差。將對未正態分佈之原始資料進行log轉換。將計算各疾病期(1-2)中之平均MUNE且使用雙樣本 t 測試比較各組(處理與未處理狗)與疾病期(1-2)之間的差異。將應用龐費洛尼調整(Bonferroni's adjustment)以得到各DM期之間經估算之MUNE平均值的多重比較結果。對應各臨床期的各平均值將構成受DM影響之狗中之疾病進展的定量標記。

電阻抗肌動描記法(EIM)

【0592】 將如此項技術中所述且如裝置(DF50 (Impedimed公司, San Diego California))之方案中所述藉由技術進行EIM量測。阻抗量測系統由與提供0.5至1000 kHz之資料的極低電容有源探針耦合的多頻鎖定放大器組成。所選肌肉將包括下肢之前脛及股二頭肌；上肢之長撓腕伸肌及三頭肌；及舌。將覆蓋各肢肌肉之相關區域移除毛髮。為了確保評估時間之間相關肌肉上之電壓及電流電極的相似定位，將施加單點刺標(pinpoint tattoo)作為參考點。所獲得的值將包括電阻(R)及電抗(X)，由其獲得第三參數，相位(θ)。將在不同頻率下計算電抗斜率、相位斜率及電阻對數斜率。程序將在指定時間點進行且與徵兆發作至不能走動狀態之時間、步態

評分及MUNE值相關。

【0593】 將生成頻率分佈圖以評估資料之正態分佈。若原始資料未正態分佈，則將利用對數轉換以標準化資料。因此，將計算各疾病期(1-2)中之總體平均MUNE定量結果，且使用雙樣本 t 測試比較各疾病期(1-2)與正常狗之間的差異。將進行龐費洛尼調整以解決由各DM期之間MUNE及EIM平均值的多重比較造成的潛在問題。EIM及MUNE資料將彼此比較，且與徵兆發作至不能走動狀態之時間及步態評分進行比較。對於所有相關分析，將進行斯皮爾曼等級相關(Spearman rank correlation)。將使用曼-惠特尼測試(Mann-Whitney test)進行雙組比較。統計顯著性將為 $p < 0.05$ 。將在實驗結束時進行檢定力分析(power analysis)以測定用於未來研究之顯著性及群組大小所需的其他樣本之數目。Rutkove博士將輔助資料說明及統計學比較。

實例7. 靶向狗SOD1之構築體的活體外研究

A. 靶向狗SOD1之siRNA的篩選

【0594】 將七個靶向狗SOD1 (dSOD1)之siRNA構築體(10 nM)及媒劑(陰性對照)轉染於D-17細胞(ATCC目錄號ATCC® CRL-1430™)或cf2Th細胞(ATCC目錄號ATCC® CRL-183™)中。兩種細胞型之細胞培養基為含有2mM GlutaMAX™補充劑、1× MEM非必需胺基酸溶液、10mM HEPES及10% FBS(所有試劑均來自Life Technologies)之DMEM/F-12。

【0595】 24小時之後，收集培養物以用於藉由RT-qPCR量測SOD1及GAPDH mRNA。將SOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水準，且隨後相對於媒劑(陰性對照)組表示經標準化之SOD1 mRNA水準。用SOD1 siRNA (siSOD1)處理後的兩種細胞型之相對SOD1 mRNA水準顯示

於表14中。

表14. SOD1 siRNA構築體轉染之後的D-17及cf2Th細胞中之相對SOD1 mRNA水準

雙螺旋體ID	相對dSOD1 mRNA水準(媒劑之%)	
	D-17	Cf2Th
D-4000	43 ± 8	43 ± 3
D-4001	35 ± 4	40 ± 5
D-4002	84 ± 3	100 ± 12
D-4003	77 ± 8	87 ± 8
D-4004	36 ± 3	40 ± 2
D-4005	36 ± 1	49 ± 2
D-4006	95 ± 8	100 ± 15
對照	100 ± 9	100 ± 10

【0596】 用具有雙螺旋體ID D-4000、D-4001、D-4004及D-4005之SOD1 siRNA構築體處理會在D-17細胞及cf2Th細胞兩者中引起dSOD1 mRNA水準的抑制率大於50%。

B. 自互補載體之藥理學評估

【0597】 對於此研究，將編碼靶向狗SOD1 (dSOD1)之siRNA構築體的自互補載體封裝於AAV2中。對於此研究，使用退化性脊髓病(DM)狗初級腦星形膠質細胞、DM狗初級脊髓星形膠質細胞及D-17細胞(ATCC目錄號ATCC® CRL-1430™)來測試構築體。D-17細胞之細胞培養基為含有2mM GlutaMAX™補充劑、1× MEM非必需胺基酸溶液、10mM HEPES及10% FBS(所有試劑均來自Life Technologies)之DMEM/F-12。初級星形膠質細胞之細胞培養基為AGM™星形膠質細胞生長培養基(目錄號：CC-3186，Lonza)。將細胞塗鋪於96孔板中且一式三份地用AAV2-dSOD1 miRNA載體感染((1至2 × 10⁴個細胞/孔於200 µl細胞培養基中)。

【0598】 用載體感染之後48小時，藉由RT-qPCR量測狗SOD1及GAPDH mRNA。將SOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水準，且

隨後相對於陰性對照組表示。

【0599】 表15顯示用scAAV2-dSOD1 miR載體以 1×10^5 之MOI感染之後，DM狗初級腦星形膠質細胞、DM狗初級脊髓星形膠質細胞及D-17細胞中之相對dSOD1 mRNA水準。

表15. 用scAAV2-dSOD1 miR載體感染之後的相對SOD1 mRNA水準

構築體	相對dSOD1 mRNA水準(%) (標準化至對照)		
	DM狗初級腦星形膠質細胞	狗初級脊髓星形膠質細胞	DM狗初級腦星形膠質細胞
VOYSOD1mir104-788.2	18 ± 2	18 ± 1	12 ± 3
VOYSOD1miR104-829	39 ± 6	34 ± 2	22 ± 3
VOYSOD1miR104-789	31 ± 3	26 ± 3	11 ± 1
VOYSOD1miR127-788.2	32 ± 2	22 ± 3	10 ± 2
VOYSOD1miR104-830	26 ± 3	25 ± 4	9 ± 1
VOYSOD1mir127-788	54 ± 0	40 ± 0	20 ± 0
VOYSOD1miR127-829	68 ± 5	56 ± 2	41 ± 7
VOYSOD1miR127-789	73 ± 9	45 ± 4	19 ± 2
VOYSOD1miR127-830	60 ± 11	41 ± 2	20 ± 3

【0600】 用封裝於AAV2中之構築體VOYSOD1mir104-788.2、VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR127-788.2、VOYSOD1miR104-830及VOYSOD1mir127-788處理會有效抑制所有三種細胞型中之dSOD1 mRNA至少45%。

【0601】 表16顯示用scAAV2-dSOD1 miR載體以不同MOI (1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 或 1×10^5)感染之後，DM狗初級脊髓星形膠質細胞中之相對dSOD1 mRNA水準，該等載體含有構築體VOYSOD1mir104-788.2、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR127-788.2或VOYSOD1miR104-830。亦在此等MOI下評估對照AAV2.eGFP載體。

表16. 用scAAV2-dSOD1 miR載體或對照載體(AAV2.eGFP)劑量-反應感染之後DM狗初級脊髓星形膠質細胞中之相對SOD1 mRNA水準

MOI	相對dSOD1 mRNA水準(%) (標準化至對照)				
	VOYSOD1miR 104-788.2	VOYSOD1miR 104-789	VOYSOD1miR 127-788.2	VOYSOD1miR 104-830	eGFP
1×10^2	61 ± 11	91 ± 5	86 ± 3	72 ± 3	105 ± 3
1×10^3	24 ± 2	32 ± 8	42 ± 6	33 ± 2	83 ± 2

1×10^4	16 ± 2	23 ± 4	22 ± 3	17 ± 2	110 ± 4
1×10^5	15 ± 3	21 ± 6	17 ± 4	19 ± 2	103 ± 6

C. SOD1 構築體之篩選

【0602】 將四個靶向狗SOD1之siRNA構築體 (D-4000、D-4007、D-4008、D-4002)轉染於cf2Th細胞(ATCC目錄號ATCC® CRL-183™)中(96孔板中 2×10^4 個細胞/孔，針對各條件一式三份)。細胞培養基為含有2mM GlutaMAX™補充劑、1× MEM非必需胺基酸溶液、10mM HEPES及10% FBS(所有試劑均來自Life Technologies)之DMEM/F-12。

【0603】 48小時之後，收集培養物以用於量測SOD1及GAPDH mRNA水準。將dSOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水準，且隨後相對於陰性對照組表示。此等相對dSOD1 mRNA水準顯示於表17中。

表17. 以不同劑量轉染狗SOD1 siRNA之後的cf2Th細胞中之相對SOD1 mRNA水準

狗SOD1 siRNA之劑量 (nM)	相對dSOD1 mRNA水準(倍數) (標準化至對照)			
	D-4000	D-4007	D-4008	D-4002
0	1.00 ± 0.11	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.02
0.31	0.69 ± 0.07	0.83 ± 0.20	0.86 ± 0.06	0.93 ± 0.08
0.62	0.66 ± 0.09	0.63 ± 0.09	0.74 ± 0.04	0.73 ± 0.09
1.25	0.66 ± 0.13	0.70 ± 0.08	0.81 ± 0.06	0.78 ± 0.07
2.5	0.52 ± 0.07	0.48 ± 0.03	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.06
5	0.47 ± 0.04	0.57 ± 0.02	0.75 ± 0.07	0.75 ± 0.05
10	0.39 ± 0.02	0.45 ± 0.09	0.67 ± 0.04	0.74 ± 0.06
20	0.36 ± 0.02	0.43 ± 0.06	0.66 ± 0.05	0.7 ± 0.06

【0604】 D-4000、D-4007、D-4008或D-4002之轉染引起cf2Th細胞中劑量依賴性SOD1緘默化。D-4000提供dSOD1 mRNA之最大抑制率(約64%抑制率)。

【0605】 將七個靶向狗SOD1 (dSOD1)之siRNA構築體及對照轉染(10 nM)於HEK293T、cf2Th、D-17及狗初級脊髓星形膠質細胞中。24小時之後，收集培養物以用於量測SOD1 mRNA水準。相對SOD1 mRNA水

準顯示於表18中。

表18. 相對SOD1 mRNA水準

雙螺旋體ID	相對dSOD1 mRNA水準(對照之%)			
	HEK293T	cf2Th	D-17	狗初級脊髓星形膠質細胞
D-4000	12 ± 9	43 ± 3	43 ± 8	69 ± 8
D-4001	7 ± 2	40 ± 5	35 ± 4	57 ± 3
D-4002	12 ± 2	100 ± 12	84 ± 3	105 ± 15
D-4003	8 ± 1	87 ± 8	77 ± 8	94 ± 3
D-4004	17 ± 1	40 ± 2	36 ± 3	65 ± 5
D-4005	21 ± 1	49 ± 2	36 ± 1	87 ± 7
D-4006	24 ± 2	100 ± 15	95 ± 8	97 ± 8
對照	100 ± 3	100 ± 10	100 ± 9	100 ± 11

【0606】 在HEK293T細胞中，所有狗SOD1 siRNA (10nM)均引起SOD1 mRNA水準得到穩健抑制(抑制75%至95%)。在cf2Th細胞中，10 nM下之狗SOD1 siRNA (D-4000、D-4005、D-4004、D-4001)之轉染引起SOD1 mRNA水準抑制50%至60%。在D-17細胞中，10 nM下之狗SOD1 siRNA (D-4000、D-4005、D-4004、D-4001)之轉染引起SOD1基因減弱55%至65%。在狗初級脊髓星形膠質細胞中，10 nM下之狗SOD1 siRNA (D-4000、D-4004、D-4001)之轉染引起SOD1 mRNA水準抑制30%至45%。選擇雙螺旋體D-4000、D-4001、D-4004或D-4005進行進一步研究。

D. HEK293T中AAV2載體之評估

【0607】 對於此研究，將具有靶向狗SOD1 (dSOD1)之siRNA構築體的AAV載體封裝於AAV2中。將HEK293T細胞塗鋪於96孔板中且一式三份地用AAV2-dSOD1 miRNA載體以 1×10^5 、 1×10^4 之MOI或對照感染(4×10^4 個細胞/孔於200 μ l細胞培養基中)。

【0608】 用載體感染之後48小時，藉由RT-qPCR量測狗SOD1及GAPDH mRNA水準。將SOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水

準，且隨後相對於陰性對照組表示。

【0609】 表19顯示用scAAV2-dSOD1 miR載體以 1×10^5 之MOI感染之後，HEK293T細胞中之相對SOD1 mRNA水準。

表19. 以 1×10^5 之MOI AAV感染之後的HEK293T細胞中之相對SOD1 mRNA水準

構築體名稱	相對SOD1 mRNA水準(對照之%)
	HEK293T
VOYSOD1miR104-805c	109.7 ± 6.8
碘克沙醇/對照	100.4 ± 4.4
VOYSOD1miR109-805c	82.5 ± 2.7
VOYSOD1miR116-805c	78.4 ± 3.2
VOYSOD1miR114-805c	74.7 ± 1.8
VOYSOD1mir102-805c	69.0 ± 1.3
VOYSOD1miR104-788	48.7 ± 1.0
VOYSOD1miR127-805c	37.0 ± 1.6
VOYSOD1miR116-788	31.7 ± 1.9
VOYSOD1miR114-788	31.6 ± 0.7
VOYSOD1miR102-788	27.5 ± 0.7
VOYSOD1miR109-788	26.1 ± 1.0
VOYSOD1miR127-788	0.2 ± 0.0

【0610】 表20顯示用scAAV2-dSOD1 miR載體以 1×10^4 之MOI感染之後，HEK293T細胞中之相對SOD1 mRNA水準。用載體感染之後48小時，藉由RT-qPCR量測狗SOD1及GAPDH mRNA水準。將SOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水準，且隨後相對於陰性對照組表示。

表20. 以 1×10^4 之MOI AAV感染之後的HEK293T細胞中之相對SOD1 mRNA水準

構築體名稱	相對SOD1 mRNA水準(對照之%)
	HEK293T
VOYSOD1miR104-788-2	3.9 ± 0.2
VOYSOD1miR104-789	5.0 ± 9.2
VOYSOD1miR104-829	11.9 ± 0.5
VOYSOD1miR104-830	1.1 ± 0.0
VOYSOD1miR127-788-2	7.9 ± 0.3
VOYSOD1miR127-789	43.5 ± 0.5
VOYSOD1miR127-829	32.0 ± 1.2
VOYSOD1miR127-830	15.0 ± 0.3
dsCherry (以SEQ ID NO:	100.0 ± 0.8

147形式提供之ITR至ITR序列)	
VOYSOD1miR127-860陽性對照	2.1 ± 0.1
未感染	61.7 ± 1.5

【0611】 在1 × 10⁵之MOI下，VOYSOD1miR127-805c、VOYSOD1miR116-788、VOYSOD1miR114-788、VOYSOD1miR102-788、VOYSOD1miR109-788及VOYSOD1miR127-788在HEK293細胞中提供至少60% SOD1 mRNA降低率。VOYSOD1miR127-788引起HEK293T細胞中之SOD1 mRNA下降99%。在IE4之MOI下，VOYSOD1miR127-789及VOYSOD1miR127-829引起SOD1 mRNA下降57%至68%，且VOYSOD1miR104-788-2、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-830及VOYSOD1miR127-830引起SOD1 mRNA下降85%至99%。

E. 封裝於AAV2中的構築體之評估

【0612】 將靶向狗SOD1 (dSOD1)之siRNA構築體封裝於AAV2中且感染於cf2Th、D-17細胞、狗脊髓星形膠質細胞及纖維母細胞中。D-17細胞及cf2Th細胞之細胞培養基為含有2mM GlutaMAX™補充劑、1× MEM非必需胺基酸溶液、10mM HEPES及10% FBS(所有試劑均購自Life Technologies)之DMEM/F-12。初級星形膠質細胞之細胞培養基為AGM™星形膠質細胞生長培養基(目錄號：CC-3186，Lonza)。纖維母細胞之細胞培養基為含有2mM GlutaMAX™補充劑、1× MEM非必需胺基酸溶液、10mM HEPES及10% FBS、2 ng/ml人類FGF-2及5 µg/ml人類胰島素(所有試劑均購自Life Technologies)之DMEM/F-12。將細胞塗鋪於96孔板中且一式三份地用AAV2-dSOD1 miRNA載體感染((1至2E4個細胞/孔於200 µl細胞培養基中)。

【0613】 用載體以 1×10^5 或 1×10^6 之MOI感染之後，藉由RT-qPCR量測狗SOD1及GAPDH mRNA 48小時。將dSOD1 mRNA水準標準化至GAPDH mRNA水準，且隨後相對於陰性對照組表示。

【0614】 表21及表22顯示用scAAV2-dSOD1 miR載體以 1×10^5 之MOI感染之後的相對dSOD1 mRNA水準。

表21. 以 1×10^5 之MOI AAV感染之後的cf2Th、D-17、狗脊髓星形膠質細胞及狗纖維母細胞中之相對dSOD1 mRNA水準

構築體名稱	相對dSOD1 mRNA水準(mCherry之%)			
	cf2Th	D-17	狗脊髓星形膠質細胞	狗纖維母細胞
mCherry	101 ± 6	101 ± 5	103 ± 6	101 ± 8
VOYSOD1miR109-805c	86 ± 3	84 ± 2	96 ± 3	99 ± 2
VOYSOD1miR114-805c	85 ± 2	83 ± 3	94 ± 3	98 ± 3
VOYSOD1miR102-805c	82 ± 3	81 ± 2	94 ± 2	97 ± 7
VOYSOD1miR104-805c	81 ± 5	80 ± 3	93 ± 4	97 ± 3
VOYSOD1miR116-805c	74 ± 2	74 ± 3	85 ± 3	96 ± 3
VOYSOD1miR104-788	68 ± 3	64 ± 3	84 ± 3	93 ± 2
VOYSOD1miR114-788	63 ± 4	59 ± 3	82 ± 3	89 ± 3
VOYSOD1miR127-805c	62 ± 4	59 ± 2	79 ± 4	86 ± 3
VOYSOD1miR109-788	61 ± 3	58 ± 2	72 ± 2	85 ± 2
VOYSOD1miR102-788	59 ± 7	57 ± 1	72 ± 2	80 ± 3
VOYSOD1miR116-788	55 ± 3	54 ± 4	71 ± 4	78 ± 3
VOYSOD1miR127-788	31 ± 4	19 ± 2	54 ± 2	65 ± 1

【0615】 在cf2Th及D17細胞中，以 1×10^5 之MOI用含有VOYSOD1miR104-788、VOYSOD1miR114-788、VOYSOD1miR127-805c、VOYSOD1miR109-788、VOYSOD1miR102-788或VOYSOD1miR116-788 scAAV2-dSOD1 miR載體感染引起SOD1 mRNA水準抑制約30%至45%。然而，以 1×10^5 之MOI用含有VOYSOD1miR127-788之scAAV2-dSOD1 miR載體引起SOD1 mRNA水準抑制約70%至80%。在狗初級細胞(脊髓星形膠質細胞及纖維母細胞)中，VOYSOD1miR127-788以 1×10^5 之MOI引起SOD1 mRNA基因減弱約35%至45%。

表22. 以 1×10^5 之MOI AAV感染之後的狗腦星形膠質細胞、D-17細胞、狗脊髓星形膠質細胞及狗纖維母細胞中之相對dSOD1 mRNA水準

構築體名稱	相對dSOD1 mRNA水準(mCherry之%)			
	狗腦星形膠質細胞	D-17	狗脊髓星形膠質細胞	狗纖維母細胞
mCherry	100 ± 4	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 3
VOYSOD1miR127-829	68 ± 2	41 ± 3	56 ± 1	74 ± 3
VOYSOD1miR127-789	73 ± 4	19 ± 1	45 ± 2	74 ± 2
VOYSOD1miR127-830	60 ± 4	20 ± 1	41 ± 1	73 ± 2
VOYSOD1miR104-829	39 ± 2	22 ± 1	34 ± 1	51 ± 1
VOYSOD1miR104-789	31 ± 1	11 ± 0	26 ± 1	50 ± 1
VOYSOD1miR127-788.2	32 ± 1	10 ± 1	22 ± 1	41 ± 1
VOYSOD1miR104-830	26 ± 1	9 ± 0	25 ± 2	37 ± 1
VOYSOD1miR104-788.2	18 ± 1	12 ± 1	18 ± 0	21 ± 1

【0616】 在狗腦星形膠質細胞、狗脊髓星形膠質細胞、狗纖維母細胞及D-17細胞中，顯示用含有VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR127-788.2、VOYSOD1miR104-830或VOYSOD1miR104-788.2之scAAV2-dSOD1 miR載體感染會抑制SOD1 mRNA至少大約50%。

【0617】 表23顯示以 1×10^6 之MOI用scAAV2-dSOD1 miR載體感染之後的相對dSOD1 mRNA水準。

表23. 以 1×10^6 之MOI AAV感染之後的狗腦星形膠質細胞、D-17細胞、狗脊髓星形膠質細胞及狗纖維母細胞中之相對dSOD1 mRNA水準

構築體名稱	相對dSOD1 mRNA水準(mCherry之%)			
	D-17	狗腦星形膠質細胞	狗脊髓星形膠質細胞	狗纖維母細胞
mCherry	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 2	100 ± 4
VOYSOD1miR109-805c	91 ± 2	101 ± 3	110 ± 3	112 ± 4
VOYSOD1miR114-805c	79 ± 5	90 ± 6	102 ± 4	106 ± 3
VOYSOD1miR102-805c	76 ± 4	103 ± 7	92 ± 3	101 ± 4
VOYSOD1miR104-805c	91 ± 3	98 ± 3	107 ± 4	101 ± 1
VOYSOD1miR116-805c	86 ± 8	94 ± 3	100 ± 3	104 ± 2
VOYSOD1miR104-788	76 ± 6	87 ± 5	84 ± 2	109 ± 2
VOYSOD1miR114-788	43 ± 1	80 ± 4	79 ± 1	102 ± 4
VOYSOD1miR127-805c	62 ± 7	83 ± 2	91 ± 4	97 ± 3
VOYSOD1miR109-788	59 ± 5	91 ± 7	80 ± 4	104 ± 3
VOYSOD1miR102-788	71 ± 3	92 ± 2	82 ± 4	105 ± 4
VOYSOD1miR116-788	51 ± 4	88 ± 4	82 ± 2	99 ± 4
VOYSOD1miR127-788	10 ± 1	42 ± 4	33 ± 1	56 ± 1

【0618】在D17細胞中，以 1×10^6 之MOI用含有VOYSOD1miR127-788之scAAV2-dSOD1 miR載體感染產生SOD1 mRNA最大抑制率(約90%)。在狗初級細胞中， 1×10^6 之MOI下的VOYSOD1miR127-788引起SOD1 mRNA抑制44%至67%。

【0619】在脊髓星形膠質細胞及D-17細胞中，以 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 及 1×10^6 之MOI用含有VOYSOD1miR104-788.2、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-830或VOYSOD1miR127-788.2之scAAV2-dSOD1 miR載體進行感染來進行劑量-反應研究。在含有VOYSOD1miR104-788.2、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-830及VOYSOD1miR127-788.2之scAAV2-dSOD1 miR載體的情況下，藉由在兩種細胞型中以 1×10^2 及 1×10^3 之MOI進行AAV SOD1 miRNA載體之感染來達成D-17細胞及脊髓星形膠質細胞中劑量依賴性SOD1 mRNA減默化及50% SOD1 mRNA基因減弱。

【0620】在狗腦星形膠質細胞、脊髓星形膠質細胞、cf2Th細胞及D-17細胞中以 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 及 1×10^6 之MOI用含有VOYSOD1miR127-788之scAAV2-dSOD1 miR載體進行另一劑量-反應研究。在cf2Th細胞、D-17細胞及脊髓星形膠質細胞中，以 1×10^3 及 1×10^4 之MOI達成SOD1 mRNA之50%基因減弱。在狗腦星形膠質細胞中，用至少 1×10^5 之MOI達成SOD1 mRNA之50%基因減弱。

實例8. 構築體之活體內研究

A. 小鼠中之活體內選擇研究

【0621】藉由以0.5 μ L/min單側紋狀體內輸注5 μ L測試物而向表現人類野生型SOD1之轉殖基因小鼠(C57BL/6-Tg(SOD1)3Cje/J)投與封裝於

AAVDJ中之六種候選物(VOYSOD1miR104-829、VOYSOD1miR104-789、VOYSOD1miR127-788.2、VOYSOD1miR104-788.2、VOYSOD1miR104-830、VOYSOD1miR127-788)中之一者或媒劑。載體濃度為 1.5×10^{12} vg/mL，其對應於 7.5×10^9 vg之總投與劑量。

【0622】給藥之後四週，相對於媒劑組藉由RT-qPCR針對SOD1 mRNA抑制，且藉由深度定序針對pri-miRNA加工來評估來自投藥部位之紋狀體組織。

【0623】表24中顯示標準化至甘油醛-3-磷酸鹽脫氫酶(GAPDH)之SOD1 mRNA水準，且隨後相對於媒劑組(每組n=5)表示。

表24. 藉由封裝於AAVDJ中之pri-miRNA構築體抑制人類野生型SOD1小鼠中之hSOD1 mRNA

構築體名稱	hSOD1 mRNA (標準化至mGAPDH) (相對於媒劑之倍數變化) (平均值±SD)
VOYSOD1miR104-829	0.31±0.06
VOYSOD1miR104-789	0.53±0.19
VOYSOD1miR127-788.2	0.70±0.09
VOYSOD1miR104-788.2	0.38±0.05
VOYSOD1miR104-830	0.45±0.17
VOYSOD1miR127-788	0.33±0.11
媒劑	1±0.11

【0624】亦使用次世代定序評估VOYSOD1miR104-788.2及VOYSOD1miR104-829以評定pri-miRNA加工之精度及效率；結果顯示於表25中。在表25中，G/P比率意謂引導/隨從股比率。

表25. 投與AAVDJ.CB6.miRSOD1之後人類野生型SOD1小鼠中pri-miRNA加工之精度及功效

構築體名稱	G/P比率	相對於內源性miRNA之豐度(%)	5'端加工精度(%N)
VOYSOD1miR104-788.2	314	11.1	89
VOYSOD1miR104-829	434	16.4	78

B. 正常狗中之活體內藥理學及安全性研究

【0625】 在HEK293細胞中使用三重轉染法產生此等研究之AAV載體。

【0626】 以 2×10^{13} vg或 6×10^{13} vg之劑量用scAAVrh10.H1.miR104-788.2 (以SEQ ID NO: 145形式提供之ITR至ITR序列)或scAAVrh10.H1.miR104-829 (以SEQ ID NO: 146形式提供之ITR至ITR序列)或媒劑(每組n=4)向正常狗鞘內投配。4週之後將動物安樂死且收集樣本以進行進一步分析。

【0627】 針對犬SOD1 (dSOD1)、GAPDH、丙胺醯基-tRNA合成酶(AARS)及X-脯胺醯基胺基肽酶1(XPNPEP1) mRNA之水準藉由RT-qPCR評定來自L5、T7或C4之背根神經節(DRG)。將dSOD1 mRNA水準標準化至管家基因(GAPDH、AARS及XPNPEP1)之幾何平均值，且隨後相對於媒劑組表示。表26顯示伴隨及無免疫抑制下針對scAAVrh10.H1.miR104-788.2的DRG中之相對SOD1 mRNA水準。表27顯示伴隨免疫抑制的針對scAAVrh10.H1.miR104-829的DRG中之相對SOD1 mRNA水準。

表26. 用scAAVrh10.H1.miR104-788.2處理後的DRG中之SOD1 mRNA表現

免疫抑制	劑量 (vg)	標準化至幾何平均值(GAPDH、AARS及XPNPEP1)之SOD mRNA (相對於媒劑) (平均值±SD)		
		L5 DRG	T7 DRG	C4 DRG
伴隨免疫抑制	2×10^{13}	0.54±0.10	0.66±0.07	0.74±0.08
	6×10^{13}	0.30±0.09	0.34±0.06	0.40±0.21
	媒劑	1±0.27	1±0.26	1±0.24
無免疫抑制	6×10^{13}	0.40±0.12	0.43±0.06	0.39±0.11
	媒劑	1±0.25	1±0.14	1±0.12

表27. 用scAAVrh10.H1.miR104-829處理後的DRG中之SOD1 mRNA表現

免疫抑制	劑 量 (vg)	標準化至幾何平均值(GAPDH、AARS及XPNPEP1)之SOD mRNA (相對於媒劑)		
		L5 DRG	T7 DRG	C4 DRG
伴隨免疫抑制	2×10^{13}	0.87 ± 0.16	0.74 ± 0.10	0.61 ± 0.09
	6×10^{13}	0.64 ± 0.27	0.57 ± 0.08	0.74 ± 0.40
	媒劑	1 ± 0.25	1 ± 0.14	1 ± 0.12

【0628】 在 肝 臟 中 評 估dSOD1 mRNA之 水 準 且 scAAVrh10.H1.miR104-788.2之結果顯示於表28中。

表28. 用scAAVrh10.H1.miR104-788.2處理後的肝臟中之SOD1 mRNA表現

免疫抑制	劑 量 (vg)	標準化至幾何平均值(GAPDH、AARS及XPNPEP1)之SOD mRNA (相對於媒劑)
		肝臟
伴隨免疫抑制	2×10^{13}	0.23 ± 0.16
	6×10^{13}	0.17 ± 0.07
	媒劑	1 ± 0.15
無免疫抑制	6×10^{13}	0.42 ± 0.14
	媒劑	1 ± 0.15

【0629】 對於脊髓中之dSOD1 mRNA水準， 6×10^{13} vg之劑量下之scAAVrh10.H1.miR104-788.2(伴隨免疫抑制)相對於媒劑抑制 $41 \pm 9\%$ (平均值 $\pm$ 標準差) (dSOD1之脊髓下角mRNA水準標準化至GAPDH、AARS及XPNPEP1之幾何平均值)。

【0630】 使用用於共偵測脊髓之下角中之vg及dSOD1 mRNA的DuplexRNAscope原位雜交，在下角中看到 6×10^{13} vg之劑量下之scAAVrh10.H1.miR104-788.2相對於媒劑組使vg+細胞中之SOD1 mRNA降低。

【0631】 6×10^{13} vg之劑量下之scAAVrh10.H1.miR104-788.2亦具有高引導/隨從股比率(DRG中呈170且脊髓下角中呈373)、在引導股之5'

端處進行精確加工(>90%)且相對於miRNA之總內源庫具有低水準之引導及隨從股(對於DRG, 6.7 +/- 5.1%; 且針對脊髓下角, 0.9 +/- 0.6%)。

【0632】 在伴隨及無免疫抑制下, scAAVrh10.H1.miR104-788.2在所有動物中均得到良好耐受。對體重、臨床症狀、臨床病理學(第15天及第29天)、腦脊髓液(CSF)、化學作用(第29天)或CSF總細胞計數(第29天)沒有顯著載體相關作用。不存在大體損傷, 且DRG、脊髓及腦之組織病理學未顯示顯著載體相關發現。

【0633】 選擇scAAVrh10.H1.miR104-788.2用於其他研究, 因為其證明有安全性、活體外劑量依賴性基因減弱、在人類野生型SOD1轉殖基因小鼠中SOD1 mRNA基因減弱62%, 且在SOD1之正常狗中在DRG中基因減弱達至74%且在脊髓中基因減弱達至41%。

實例9. 正常狗中的AAV之耐受性及分佈

【0634】 先前並未報導AAVrh10衣殼之分佈, 因此需要進行研究以證實AAVrh10分佈至狗之運動神經元及DRG神經元, 如同其他物種。此預備試驗之主要目標在於評定犬模型中之AAV腰椎IT遞送之急性耐受性。未進行神經病理學或臨床病理學/毒理學分析。

【0635】 針對血清中和抗體對AAVrh10及AAV9之效價預篩選出六隻13月齡之成年雄性米格魯犬(10至13 kg)。六隻動物植入有伴隨尖端位於上腰椎處且終止於皮下進入口的鞘內(IT)導管。給藥之前, 使用環孢靈及黴酚酸酯免疫抑制動物。鎮靜的同時, 以1小時時間間隔向動物投與三個測物(劑量 2.7×10^{13} vg)之1-mL注射液(1毫升/分鐘)持續大約2.5小時之總時間。第六隻動物(第4組)用於收集對照組織。表29顯示研究設計。在表29受測物中, 「sc」意謂自互補, CBA為CBA啟動子, hFXN為人類共

濟蛋白且HA為HA標籤。

表29. 研究設計

組	n	測試物	速 率 (mL/min)	總 體 積 (mL)	濃 度 (vg/mL)	劑量 (vg)
1	1	媒劑	1	3	0	0
2	2	scAAV9-CBA-hFXN-HA	1	3	9.0×10^{12}	2.7×10^{13}
3	2	scAAVrh10-CBA-hFXN-HA	1	3	9.0×10^{12}	2.7×10^{13}
4	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

【0636】 使用AAV9或AAVrh10衣殼任一者用AAV載體(scAAVx-CBA-hFXN-HA)注射動物。2.5週之後，用生理鹽水灌注動物，且處理脊髓、DRG及腦以用於分析。將樣本之二分之一後固定於4%多聚甲醛中持續72小時至96小時，而另一半新鮮冷凍。

【0637】 第1組至第3組中之動物的生命觀測及量測包括體重、食物消耗量及臨床觀測結果。此研究期間不存在測試物相關臨床症狀。體重或食物消耗量方面不存在測試物相關變化。屍檢時未觀測到測試物相關大體損傷。

【0638】 伴隨HA-免疫組織化學的脊髓及DRG之組織學評估證明在所有動物中之L5脊髓中最顯著之運動神經元轉導。伴隨展現較少運動神經元染色之嘴側水準觀測到梯度型樣(C1 < T4 < L5)，其與治療組無關。在兩個處理組中在來自所有水準(頸椎、胸及腰椎)之DRG中觀測到感官神經元轉導。綜上所述，AAV9及AAVrh10構築體兩者之IT遞送在脊髓及DRG神經元兩者中產生陽性抗HA免疫反應性。此等結果顯示，由三個每小時1 mL腰椎注射液組成的IT給藥範式尤其在脊髓之較尾側區域達成目標轉導水準，而在脊髓之較嘴側區域達成較少轉導。

實例10. 作為生物標記之CSF及血清神經纖維絲輕鏈水準

背景

【0639】 犬退化性脊髓病(DM)為影響多種純種及混種狗的晚發作型進行性神經退化性疾病。臨床症狀為涉及中央及外周神經系統的多系統神經退化之結果。DM首先體現為痙攣性上運動神經元後軀輕癱及全身性本體感受性共濟失調(1期)。進行性神經退化會引起不能走動的後軀輕癱/截癱(2期)及上肢輕癱(3期)。末期疾病伴隨弛緩性四肢麻痺、分佈廣泛之肌肉萎縮及延髓功能障礙(4期)。超氧化歧化酶1基因(SOD1)突變(SOD1:c.118A、SOD1: c.52T)為DM之風險因素、其中大多數病例係由體染色體隱性遺傳引起。在病因、進展及預後方面，該疾病視為與人類肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之一些形式相似。診斷係基於排除其他類似疾病，且DM之確定性診斷此時可僅在死後藉由脊髓之組織病理學檢查來進行。神經纖維絲輕鏈(NF-L)，一種豐富的有髓鞘運動軸突之結構蛋白，為動物及人類運動神經元疾病，包括ALS之有前景的體液生物標記。血液及CSF NF-L水準在ALS中具有診斷價值，且可與疾病進展相關且由此充當治療作用之生物標記。進行研究以評定作為DM狗中之診斷及疾病進展的潛在生物標記的血清及CSF NF-L水準。

研究設計

【0640】 對於此研究，分析來自三種類型之狗的血清樣本及CSF樣本。第1組包括幼齡(1至5歲)及老齡(> 9歲)正常對照狗(n = 13至17)，第2組包括1期至4期之受DM影響之狗(SOD1c.118A對偶基因同種接合) (n = 22至25)，且第3組包括年老無症狀的狗(SOD1c.118A對偶基因同種接合)。

分析及結果：正常狗

【0641】 進行樣本測試之前，在正常狗之CSF及血清中針對NFL之

稀釋線性、穩定性及加標回收率評定數位ELISA。使用針對人類NF-L(其與犬NFL呈98%保守)之市售數位ELISA (Quanterix)來進行分析。圖1顯示Quanterix Simoa hNF-L (Beta)分析之代表性NF-L校準曲線。偵測極限(LOD)被計算為每珠粒平均酶(AEB)下之NF-L水準，相當於零校準器+ 2.5SD之平均值。

【0642】 在八隻正常狗之CSF中測試NF-L之數位ELISA之稀釋線性。如表30中所示，相較於1:40，在1:100之稀釋度下觀測到± 20%內之濃度。針對狗CSF，在1:100之極小稀釋度下進行後續分析。在表30中，N/A意謂未獲得數量，且*表示標準曲線範圍外讀取之樣本。

表30. 正常狗中之CSF的稀釋濃度及線性(1:40)

狗CSF樣本(CSF)	稀釋度	稀釋校正濃度(pg/mL)	線性% (1:40)
1	1:4	10316*	-
	1:10	16005*	-
	1:40	18037	-
	1:100	19349	107%
2	1:4	N/A*	-
	1:10	20091*	-
	1:40	20347	-
	1:100	19536	96%
3	1:4	8070*	-
	1:10	9909*	-
	1:40	11775	-
	1:100	11230	95%
4	1:4	N/A*	-
	1:10	19548*	-
	1:40	21483*	-
	1:100	21731	101%
5	1:4	N/A*	-
	1:10	25275*	-
	1:40	33277	-
	1:100	36038	108%
6	1:4	7259*	-
	1:10	8449*	-
	1:40	7977	-
	1:100	7339	92%

7	1:4	6090*	-
	1:10	7440*	-
	1:40	7875	-
	1:100	8073	103%
8	1:4	3129*	-
	1:10	3613	-
	1:40	4001	-
	1:100	4323	108%

【0643】 在三隻正常狗之血清中測試針對NFL的數位ELISA之稀釋線性。如表31中所示，相較於1:100，在1:200之稀釋度下觀測到± 20%內之濃度。針對狗血清，在1:200之極小稀釋度下進行後續分析。

表31. 正常狗中之血清的稀釋濃度及線性(1:40、1:100、1:200)

狗血清樣本(S)	狗血清樣本稀釋度	稀釋校正濃度	線性(1:40)	線性(1:100)	線性(1:200)
1	1:40	90.4	-	-	-
	1:100	116	128%	-	-
	1:200	131	145%	113%	-
	1:400	154	170%	133%	118%
5	1:40	247	-	-	-
	1:100	266	108%	-	-
	1:200	310	125%	116%	-
	1:400	319	129%	120%	103%
6	1:40	231	-	-	-
	1:100	245	106%	-	-
	1:200	268	116%	109%	-
	1:400	320	139%	131%	119%

【0644】 在四隻正常狗之CSF (圖2A及2B中所示之資料)及血清(圖3A及圖3B中所示之資料)中測試NF-L之樣本穩定性。使樣本經歷不同處理條件，其包括-80℃、4℃隔夜、室溫持續4小時或3次凍/融循環。在圖2A、圖2B、圖3A及圖3B中，O/N =隔夜，RT =室溫，F/T =凍/融循環。NFL濃度係藉由數位ELISA (Quanterix)一式兩份地測定。三次F/T循環對樣本NF-L濃度僅具有微小影響。圖2B顯示圖2A中之資料，其表示為-80℃對照之百分比，且圖3B顯示圖3A中之資料，其表示為-80℃對照之百分比。若儲存於冰上，則樣本在實驗程序之持續期間呈現穩定。

【0645】 藉由補充緩衝液對照、具有增加濃度之重組人類NF-L的兩

隻正常狗之CSF或血清來測試NF-L之加標回收率。在1:100稀釋度下分析CSF樣本，在1:400下分析血清樣本。如表32中所示，平均加標回收率接近於或在接受準則內，但在加標水準之間觀測到較大變化性。在表32中，NF-L樣本欄中之「CSF」係指CSF樣本，且「S」係指血清樣本。

表32.狗CSF及血清中之NF-L回收率

NF-L樣本	加標(pg/ml)	稀釋校正濃度(pg/ml)	回收率	緩衝液校正回收率	平均回收率
緩衝液	100	51.0	51%	-	-
	500	387	77%	-	
	1000	716	72%	-	
	5000	3703	74%	-	
	10000	7473	75%	-	
CSF 7	0	4978	-	-	122%
	1000	5964	99%	138%	
	5000	9227	85%	115%	
	10000	13527	85%	114%	
CSF 8	0	2949			106%
	1000	3796	85%	118%	
	5000	7038	82%	110%	
	10000	9678	67%	90%	
S 5	0	102			88%
	100	166	65%	127%	
	500	363	52%	67%	
	1000	599	50%	69%	
S 6	0	116			94%
	100	183	67%	131%	
	500	396	56%	72%	
	1000	689	57%	80%	

分析及結果：DM狗

【0646】 比較DM狗與對照狗之CSF中之NF-L濃度且結果(各動物之平均值)顯示於圖4A中。在1:500稀釋度下一式兩份地分析樣本(%CV值範圍為0至10%；誤差為SEM；伴隨杜凱氏多重對比測試之單向ANOVA；*p<0.05，**p<0.01對老齡對照)。

【0647】 與老齡(> 9歲)及幼齡(1至5歲)對照組相比，所有期之DM

狗均顯示CSF NF-L明顯增加。與老齡對照組相比中之6,864 pg/ml相比，經合併之DM群組顯示47,068 pg/ml之平均NF-L濃度(人類CSF為約2100 pg/ml)。NF-L中之增加在初始疾病期時呈現為最明顯且看到隨嚴重程度而增加。相較於DM1組，DM2組傾向於具有增加之NF-L水準($p=0.1$)。另外，如與幼齡對照組相比，犬老齡對照組顯示較高NF-L水準(6864 pg/ml對3053 pg/ml)，其表明正常狗之CSF中之年齡依賴性NF-L增加。

【0648】 比較DM狗與對照狗之血清中之NF-L濃度且結果(各動物之平均值)顯示於圖4B中。在1:200稀釋度下一式兩份地分析樣本(誤差為SEM；伴隨杜凱氏多重對比測試之單向ANOVA)。

【0649】 相較於幼齡對照組(72 pg/ml)，老齡對照組中之血清NF-L中存在明顯增加(297 pg/ml)，其表明正常狗中之年齡依賴性增加。不同於CSF，在任何期時，與老齡對照組相比，DM狗之血清並未顯示NF-L明顯增加。然而，平均NF-L水準可自經合併之DM1/2期(302 pg/ml)增加至經合併之DM3/4期(572 pg/ml)。當幼齡對照組NF-L水準比正常人類血清NF-L高約10倍(72 pg/ml對約8 pg/ml)，則與狗相比，人類中之低血清NF-L水準將難以偵測。

【0650】 對照及DM狗之血清及CSF中之NF-L之相關圖顯示，當合併所有組時，不存在明顯線性相關性，但幼齡對照及老齡對照組之結合資料表明血清與CSF NF-L水準之線性相關性。

總結

【0651】 最佳化針對hNFL之數位ELISA分析(Quanterix Simoa平台)以滿足正常狗之CSF及血清中之稀釋線性、穩定性及hNFL加標回收率的預先界定之接受準則。使用此ELISA分析，對來自正常及DM狗之CSF

及血清水準進行分析。

【0652】 與老齡對照相比，期1至期4之受DM影響之狗中之CSF NF-L水準實質上升高，且CSF NF-L在初始疾病期時增加最為明顯。

【0653】 不同於CSF，在任何期時，與老齡對照組相比，DM狗之血清並未顯示NF-L明顯增加。相對於幼齡對照組，在老齡對照組中觀測到血清NF-L實質上增加，其表明正常狗中之年齡依賴性增加。在CSF中證明了類似相對增加結果。在對照狗中，CSF及血清NFL水準可能線性相關。

【0654】 因此，血清及CSF中之NF-L濃度有可能隨衰老增加且與老齡對照狗相比，在DM狗中有所升高。CSF NFL濃度亦可表示早期疾病進展之生物標記。

實例11. 作為生物標記之磷酸化神經纖維絲重鏈水準

【0655】 DM首先體現為痙攣性上運動神經元後軀輕癱及全身性本體感受性共濟失調(1期)。進行性神經退化會引起不能走動的後軀輕癱/截癱(2期)及上肢輕癱(3期)。末期疾病伴隨弛緩性四肢麻痺、分佈廣泛之肌肉萎縮及延髓功能障礙(4期)。在病因、進展及預後方面，該疾病視為與人類肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之一些形式相似。磷酸化神經纖維絲重鏈(pNF-H)具有作為DM及ALS之跨物種生物標記的潛力。血液及CSF中之增加之pNF-H濃度已顯示出高診斷效能且與診斷患有ALS之患者中之疾病進展相關。在受DM影響之狗中，CSF pNF-H為用於具有高特異性之診斷的敏感生物標記，且具有>20.25 ng/mL之經測定之截止值，其具有80.4%敏感度(CI 66.09-90.64%)及93.6%特異性(CI 78.5-99.21%)。

【0656】 如圖5A、圖5B及圖5C中所示，pNF-H在受DM影響之狗之

CSF中增加。圖5A顯示相較於正常狗，中值CSF pNF-H在處於所有疾病期(1期，n=10， $p<0.05$ ；2期，n=13， $p<0.0001$ ；3期，n=14， $p<0.001$ ；4期 n=9， $p<0.01$)的受DM影響之狗中有所增加(比較係基於利用因果型鄧恩法(*post hoc* Dunn's method)之克魯斯卡爾-沃利斯等級ANOVA (Kruskal-Wallis ANOVA)；條狀物表示組中值及四分位數範圍)。圖5B顯示單個時間點CSF pNF-H濃度與DM疾病期之間不存在相關性($p=0.4050$)。圖5C表明pNF-H可為疾病進展之適用生物標記，因為在來自受DM影響之狗的縱向配對樣本中，CSF pNF-H濃度隨時間推移而有所增加。

【0657】處理與未處理組之間的pNF-H結果中之顯著差異將提供受DM影響之狗中之可定量量測。

實例12. 受DM影響之狗中之活體內研究

【0658】為了研究靶向SOD1之AAV之治療功效，用AAV SOD1構築體鞘內(CM及腰椎)投配DM狗，該等AAV SOD1構築體由桿狀病毒或三重轉染製造方法任一者產生。將使用5隻狗之組來進行此研究(n=3，用AAV給藥；且n=2，用媒劑給藥)。為了包括於此研究中，將需要動物處於DM之早期，經歷NSF健康狀況篩選，具有正常CSF水準，正常EMG，經歷NSF T-L脊髓MRI，具有A/A基因型及/或具有低於1:10之AAV天然抗體。投與AAV或僅投與媒劑之前，將收集基線體液樣本且將向各動物投與免疫抑制劑。

【0659】將進行毒理學及縱向研究大約12個月(可有所延長)，且隨後將動物安樂死。毒理學研究將包括(但不限於)身體檢查、CBC水準、血液生物化學分析、尿分析及/或CSF分析。縱向研究將包括(但不限於)神經

檢查、視訊步態評分、CSF pNF-H水準、CSF之收集及儲存(最佳在-80℃下)、血清及尿液樣本。例示性篩選圖以表33顯示於下文。

表33. 分析時間表

所進行之分析/所收集之樣本	進入研究之評估	第0天	第1個月、第3個月、第6個月、第9個月、第12個月	每 3個月進行再檢查直至研究結束	研究結束
物理及神經檢查	X	X	X	X	X
視訊記錄步態	X	X	X	X	X
CBC	X	X	X		X
化學圖	X	X	X		X
尿分析	X	X	X		X
胸放射線照片	X				
腹部超音波	X				
脊髓MRI	X				
CSF收集(分析/儲存)	X	X	X		X
血清、血漿收集(儲存)	X	X	X		X
AAV效價	X				

【0660】 預期經AAV處理之動物將具有自發作至不能走動狀態之延長之中值時間及穩定化至較低CSF pNF-H水準。

等效物及範疇

【0661】 熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即可確定本文所述的根據本發明之具體實施例的許多等效物。本發明之範疇並不意欲限於以上描述，而是如所附申請專利範圍中所闡述。

【0662】 在申請專利範圍中，除非相反地指示或以其他方式自上下文顯而易見，否則諸如「一(a/an)」及「該」之冠詞可意謂一或大於一。除非相反地指示或以其他方式自上下文顯而易見，否則若一個、超過一個或所有群成員存在於給定產物或方法中、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關，則在該群的一或多個成員之間包括「或」的申請專利範圍或描述視為滿足。本發明包括其中群中恰好一個成員存在於

給定產物或方法中、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關的實施例。本發明包括超過一個或所有組成員存在於、用於給定產物或方法中或以其他方式與給定產物或方法相關之實施例。

【0663】 亦應注意，術語「包含」意欲為開放的且准許但不要求包括額外要素或步驟。當本文使用術語「包含」時，亦因此涵蓋及揭示術語「由……組成」。

【0664】 當給出範圍時，包括端點。此外，應理解，除非另外指示或以其他方式自上下文及一般熟習此項技術者之理解顯而易見，否則表示為範圍之值可在本發明之不同實施例中採用所陳述範圍內之任何具體值或子範圍，除非上下文另外明確規定，否則達到該範圍下限之單位的十分之一。

【0665】 另外，應理解，屬於先前技術的本發明之任何特定實施例均可自技術方案中之任何一或多者明確排除。因為認為此類實施例為一般熟習此項技術者已知的，所以可對其進行排除，即使未在本文中明確地闡述該排除亦可。出於任何原因，無論是否與先前技術之存在相關，本發明之組合物之任何特定實施例(例如任何抗生素、療法或活性成分；任何生產方法；任何使用方法；等)可自任何一或多個技術方案排除。

【0666】 應瞭解，所使用之字組係描述而非限制之字組，且可在隨附申請專利範圍之範圍內進行變化而不背離其較廣泛態樣中之本發明之真實範疇及精神。

【0667】 雖然已相對於若干所描述之實施例以一定篇幅及一些特殊性描述本發明，但並非意欲其應受限於任何此類特性或實施例或任何特定實施例，而應視為參考隨附申請專利範圍進行理解以便鑒於先前技術提供

此類申請專利範圍之可能的最廣泛解釋，且因此有效地涵蓋本發明之預期範疇。

【0668】 即使未在引用中明確陳述，所引用之所有來源，例如本文所引用之參考文獻、公開案、資料庫、資料庫條目及技術仍均以引用之方式併入本申請案中。在所引用之來源與本申請案的陳述衝突的情況下，應以本申請案中之陳述為準。

【0669】 章節及表格標題並不意欲為限制性的。

【序列表】

<110> 美商航海家醫療公司(VOYAGER THERAPEUTICS, INC.)

<120> 肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之治療

<140> TW 107136278

<141> 2018-10-16

<150> 62/572,702

<151> 2017-10-16

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 981

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1
gtttggggcc agagtgggcg aggcgcggag gtctggccta taaagtagtc gcggagacgg 60
ggtgctgggt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctgggggt ttccgttgca gtcctcggaa 120
ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtgaa 240
ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgagtt 300
tgagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa 360
acacggtggg ccaaaggatg aagagaggca tgttggagac ttgggcaatg tgactgctga 420
caaagatggt gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtg 540
aatgaagaa agtacaaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaacact gtaatcttaa aagtgttaatt 720
gtgtgacttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
tggaagatgt gtatagtttt ataaaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
ctgtgaataa aaacctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaattcaa 960
actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981

<210> 2

<211> 465

<212> DNA

<213> 食蟹獼猴(Macaca fascicularis)

<400> 2
atggcgatga aggccgtgtg cgtgttgaag ggcgacagcc cagtgcaggg caccatcaat 60
ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattac aggattgact 120
gaaggcctgc atggattcca tgttcatcag tttggagata atacacaagg ctgtaccagt 180
gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga caacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
catgttggag acctgggcaa tgtgactgct ggcaaagatg gtgtggccaa ggtgtctttc 300
gaagattctg tgatctcgct ctcaggagac cattccatca ttggccgcac attggtggtc 360
catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtaaaaa gacaggaaac 420
gctggaggtc gtctggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aataa 465

<210> 3

<400> 3
000

<210> 4
<211> 474
<212> DNA
<213> 家犬(Canis lupus familiaris)

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)..(165)
<223> n為a、c、g或t

<400> 4
cgagtcattg agatgaaggc cgtgtgctgt ttgaagggcc agggcccggg ggagggcacc 60
atccacttcg tgcagaaggg aagtgggcct gttgtggtat caggaacat tacagggctg 120
actgaaggcg agcatggatt ccacgtccat cagtttgaag ataanacaca aggctgtact 180
agtgcaggtc ctcactttaa tcctctgtcc aaaaaacatg gtgggccaaa agatcaagag 240
agggcatgtg gagacctggg caatgtgact gctggcaagg atggcgtggc cattgtgtcc 300
atagaagatt ctctgattgc actctcagga gactattcca tcattggccg caccatggtg 360
gtccacgaga aacgagatga cttgggcaaa ggtgacaatg aagaaagtac acagacagga 420
aacgccggga gtcgtttggc ttgtggtgtc attgggatcg cccaataaac attc 474

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 5 ucaccacaag ccaaacgacu u	21
<210> 6 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 6 ugauuaaagu gaggaccugu u	21
<210> 7 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 7 uauuaaagug aggaccugcu u	21
<210> 8 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 8 uacaccacaa gccaaacgau u	21
<210> 9 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 9 gauuaaagug aggaccugcu u	21
<210> 10 <211> 22 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 10 ucaccacaag ccaaacgacu uu	22

<210>	11	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	11	
	ugccagcagu cacauugccu u	21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	12	
	uaacagauga guuaaggggu u	21
<210>	13	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	13	
	uauuaaagug aggaccugcn n	21
<210>	14	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	14	
	uacaccacaa gccaaacgan n	21
<210>	15	

<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	m為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	15	
	uuguuuauug ggcgaucn n	21
<210>	16	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	m為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	16	
	uguuuauugg ggcgaucn n	21
<210>	17	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	m為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	17	
	ucaccacaag ccaaacgacn n	21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		

<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	18	
	ugauuaaagu gaggaccugn n	21
<210>	19	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	19	
	uuuuauuggg cgaucccaan n	21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	20	
	ugucagcagu cacauugccn n	21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	21	
	ugcgauccca auuacaccan n	21
<210>	22	

<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	22	
	gucguuuggc uugugguggc u	21
<210>	23	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	23	
	cagguccuca cuuuaaucgc u	21
<210>	24	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	24	
	gcagguccuc acuuuaaugc c	21
<210>	25	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	25	
	gcagguccuc acuuuaaugc u	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	26	
	ucguuuggc uugugguggc u	21
<210>	27	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	

<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	27		
gcagguccuc acuuuaaucc c			21
<210>	28		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	28		
gucguuuggc uugugguggc c			21
<210>	29		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	29		
cagguccuca cuuuaaucgc c			21
<210>	30		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	30		
ucguuuggcu uguggugugc c			21
<210>	31		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	31		
ggcaauguga cugcuggugc c			21
<210>	32		
<211>	21		
<212>	RNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		

<400> 32 ggcaauguga cugcugguac c	21
<210> 33 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 33 ggcaaugugu cugcugguac c	21
<210> 34 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 34 ggcaauguga cugcuggccc c	21
<210> 35 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 35 gcagguccuc acuuuaauuc c	21
<210> 36 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 36 gcagguccug acuuuaaucc c	21
<210> 37 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 37 ccccuaacu cauuuguucc c	21

<210>	38	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	38	
	gcagguccuc acuuuaauch n	21
<210>	39	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	39	
	ucguuuggcu ugugguguch n	21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	40	
	gggaucgccc aauaaacach n	21
<210>	41	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	41	
	ugggaucgcc caauaaacn n	21
<210>	42	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	42	
	gucguuuggc uuguggucn n	21
<210>	43	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	43	
	cagguccuca cuuuaaaccn n	21
<210>	44	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nn為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	44	
	uugggaucgc ccaauaaacn n	21

<210>	45	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	45	
	ggcaauguga cugcugacn n	21
<210>	46	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(20)..(21)	
<223>	nm為去氧胸苷二核苷酸	
<400>	46	
	ugguguaauu gggaucgccn n	21
<210>	47	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	47	
	ctcccgcaga acaccatgcg ctccacggaa	30
<210>	48	
<211>	100	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	48	
	gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga	60
	gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga	100

<210>	49	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	49	
gtgctgggcg	gggggcggcg	ggccctcccg
cagaacacca	tgcgctcttc	ggaa
		54
<210>	50	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	50	
gtggccactg	agaag	
		15
<210>	51	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	51	
gtctgcacct	gtcactag	
		18
<210>	52	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	52	
tgtgacctgg		
		10
<210>	53	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	53	
tgtgatttgg		
		10
<210>	54	
<211>	35	

<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	54		
ctgaggagcg	ccttgacagc agccatggga gggcc		35
<210>	55		
<211>	100		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	55		
tggccgtgta	gtgctaccca gcgctggctg cctcctcagc attgcaattc ctctcccatc		60
tgggcaccag	tcagctaccc tgggtgggaat ctgggtagcc		100
<210>	56		
<211>	99		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	56		
ggccgtgtag	tgctaccag cgctggctgc ctctcagca ttgcaattcc tctcccatct		60
gggcaccagt	cagctaccct ggtgggaatc tgggtagcc		99
<210>	57		
<211>	52		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	57		
ctgaggagcg	ccttgacagc agccatggga gggccgcccc ctacctcagt ga		52
<210>	58		
<211>	52		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸		
<400>	58		
ctgtggagcg	ccttgacagc agccatggga gggccgcccc ctacctcagt ga		52
<210>	59		

<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 59
gtgctgggcg gggggcggcg ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggt 60
cctcacttta atgcctgtga cctgggatta aagtgaggac ctgcttctga ggagcgcctt 120
gacagcagcc atgggagggc cgccccctac ctcagtga 158

<210> 60
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 60
gtgctgggcg gggggcggcg ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaaggcaat 60
gtgactgctg gcccctgtga cctggtgccg gcagtcacat tgccttctga ggagcgcctt 120
gacagcagcc atgggagggc cgccccctac ctcagtga 158

<210> 61
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 61
gtgctgggcg gggggcggcg ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggt 60
cctcacttta attcctgtga cctgggatta aagtgaggac ctgcttctga ggagcgcctt 120
gacagcagcc atgggagggc cgccccctac ctcagtga 158

<210> 62
<211> 122
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 62
ctccccgaga acaccatgcg ctccacggaa gcaggtcctc actttaatgc tgtggccact 60
gagaagtatt aaagtgagga cctgcttctg aggagcgcct tgacagcagc catgggaggg 120
cc 122

<210>	63	
<211>	122	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	63	
ctcccg	caga acaccatg	cg ctccacggaa caggtcctca ctttaatcgc tgtggccact 60
gagaagt	gat taaagtga	gg acctgttctg aggagcgcct tgacagcagc catgggaggg 120
cc		122
<210>	64	
<211>	158	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	64	
gtgctg	ggcg gggggcggcg	ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaaggcaat 60
gtgactg	ctg gtgcctgtga	cctggtgcca gcagtcacat tgccttctga ggagcgcctt 120
gacagcag	cc atgggagggc	cgccccctac ctcagtga 158
<210>	65	
<211>	122	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	65	
ctcccg	caga acaccatg	cg ctccacggaa gtcgtttggc ttgtggtggc tgtggccact 60
gagaagtc	ac cacaagccaa	acgacttctg aggagcgcct tgacagcagc catgggaggg 120
cc		122
<210>	66	
<211>	122	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	66	
ctcccg	caga acaccatg	cg ctccacggaa tcgtttggct tgtggtgtgc tgtggccact 60
gagaagt	taca ccacaagcca	aacgattctg aggagcgcct tgacagcagc catgggaggg 120
cc		122

<210>	67	
<211>	158	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	67	
gtgctggg	cg gggggcgggc	ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggt 60
cctcacttta	atccctgtga	tttgggatta aagtgaggac ctgcttctga ggagcgcctt 120
gacagcagcc	atgggagggc	cgccccctac ctcagtga 158
<210>	68	
<211>	158	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	68	
gtgctggg	cg gggggcgggc	ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaaggcaat 60
gtgactgctg	gtacctgtga	tttggtgccg gcagtcacat tgccttctga ggagcgcctt 120
gacagcagcc	atgggagggc	cgccccctac ctcagtga 158
<210>	69	
<211>	158	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	69	
gtgctggg	cg gggggcgggc	ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggt 60
cctgacttta	atccctgtga	cctgggatta aagtgaggac ctgcttctgt ggagcgcctt 120
gacagcagcc	atgggagggc	cgccccctac ctcagtga 158
<210>	70	
<211>	158	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	70	
gtgctggg	cg gggggcgggc	ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaaggcaat 60
gtgtctgctg	gtacctgtga	cctggtgccg gcagtcacat tgccttctgt ggagcgcctt 120
gacagcagcc	atgggagggc	cgccccctac ctcagtga 158

<210> 71
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 71
gtgctgggcg gggggcgggcg ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggt 60
cctcacttta atccctgtga cctgggatta aagtgaggac ctgcttctgt ggagcgctt 120
gacagcagcc atgggagggc cgccccctac ctcagtga 158

<210> 72
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 72
gtgctgggcg gggggcgggcg ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaaggcaat 60
gtgactgctg gtacctgtga cctggtgccg gcagtcacat tgccttctgt ggagcgctt 120
gacagcagcc atgggagggc cgccccctac ctcagtga 158

<210> 73
<211> 260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 73
gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga 60
gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga gcaggctctc actttaatcc 120
cgtctgcacc tgtcactagg attaaagtga ggacctgctt tggccgtgta gtgctaccca 180
gcgctggctg cctcctcagc attgcaattc ctctcccatc tgggcaccag tcagctaccc 240
tggtgggaat ctgggtagcc 260

<210> 74
<211> 260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 74

gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga 60
gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga gcaggtcctc actttaatgc 120
cgtctgcacc tgtcactagt attaaagtga ggacctgctt tggccgtgta gtgctaccca 180
gcgctggctg cctcctcagc attgcaattc ctctcccatc tgggcaccag tcagctaccc 240
tggtgggaat ctgggtagcc 260

<210> 75
<211> 260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 75
gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga 60
gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga caggtcctca ctttaatgc 120
cgtctgcacc tgtcactagt gattaaagtg aggacctgtt tggccgtgta gtgctaccca 180
gcgctggctg cctcctcagc attgcaattc ctctcccatc tgggcaccag tcagctaccc 240
tggtgggaat ctgggtagcc 260

<210> 76
<211> 260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 76
gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga 60
gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga ggcaatgtga ctgctggtac 120
cgtctgcacc tgtcactagt gccagcagtc acattgcctt tggccgtgta gtgctaccca 180
gcgctggctg cctcctcagc attgcaattc ctctcccatc tgggcaccag tcagctaccc 240
tggtgggaat ctgggtagcc 260

<210> 77
<211> 260
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 77
gaagcaaaga aggggcagag ggagcccgtg agctgagtgg gccagggact gggagaagga 60
gtgaggaggc agggccggca tgcctctgct gctggccaga gtcgtttggc ttgtggtggc 120

cgtctgcacc	tgtcactagt	caccacaagc	caaacgactt	tggccgtgta	gtgctaccca	180
gcgctggctg	cctcctcagc	attgcaattc	ctctcccatc	tgggcaccag	tcagctaccc	240
tggtgggaat	ctgggtagcc					260
<210>	78					
<211>	260					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸					
<400>	78					
gaagcaaaga	aggggcagag	ggagcccgtg	agctgagtgg	gccagggact	gggagaagga	60
gtgaggaggc	agggccggca	tgcctctgct	gctggccaga	tcgtttggct	tgtggtgtgc	120
cgtctgcacc	tgtcactagt	acaccacaag	ccaaacgatt	tggccgtgta	gtgctaccca	180
gcgctggctg	cctcctcagc	attgcaattc	ctctcccatc	tgggcaccag	tcagctaccc	240
tggtgggaat	ctgggtagcc					260
<210>	79					
<211>	260					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸					
<400>	79					
gaagcaaaga	aggggcagag	ggagcccgtg	agctgagtgg	gccagggact	gggagaagga	60
gtgaggaggc	agggccggca	tgcctctgct	gctggccaga	ccccttaact	catttggttc	120
cgtctgcacc	tgtcactagt	aacagatgag	ttaaggggtt	tggccgtgta	gtgctaccca	180
gcgctggctg	cctcctcagc	attgcaattc	ctctcccatc	tgggcaccag	tcagctaccc	240
tggtgggaat	ctgggtagcc					260
<210>	80					
<211>	21					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸					
<400>	80					
gcaggtcctc	actttaatgc	c				21
<210>	81					
<211>	21					
<212>	DNA					

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	81	
	ggcaatgtga ctgctggccc c	21
<210>	82	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	82	
	gcaggtcctc actttaattc c	21
<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	83	
	gcaggtcctc actttaatgc t	21
<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	84	
	caggtcctca ctttaatcgc t	21
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	85	
	ggcaatgtga ctgctggtgc c	21
<210>	86	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 86 gtcgtttggc ttgtggtggc t	21
<210> 87	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 87 tcgtttggct tgtggtgtgc t	21
<210> 88	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 88 gcaggtcctc actttaatcc c	21
<210> 89	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 89 ggcaatgtga ctgctggtac c	21
<210> 90	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 90 gcaggtcctg actttaatcc c	21
<210> 91	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 91	

ggcaatgtgt ctgctggtac c	21
<210> 92	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 92	
gcaggtcctc actttaatcc c	21
<210> 93	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 93	
ggcaatgtga ctgctggtac c	21
<210> 94	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 94	
gcaggtcctc actttaatcc c	21
<210> 95	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 95	
gcaggtcctc actttaatgc c	21
<210> 96	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 96	
caggtcctca ctttaatcgc c	21

<210>	97	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	97	
	ggcaatgtga ctgctggtac c	21
<210>	98	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	98	
	gtcgtttggc ttgtggtggc c	21
<210>	99	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	99	
	tcgtttggct tgtggtgtgc c	21
<210>	100	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	100	
	ccccttaact catttggtcc c	21
<210>	101	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	101	
	gattaaagtg aggacctgct t	21
<210>	102	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	102	
	tgccagcagt cacattgcct t	21
<210>	103	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	103	
	gattaaagtg aggacctgct t	21
<210>	104	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	104	
	tattaaagtg aggacctgct t	21
<210>	105	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	105	
	tgattaaagt gaggacctgt t	21
<210>	106	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	106	
	tgccagcagt cacattgcct t	21
<210>	107	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	107	
	tcaccacaag ccaaacgact t	21
<210>	108	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	108	
	tacaccacaa gccaaacgat t	21
<210>	109	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	109	
	gattaaagtg aggacctgct t	21
<210>	110	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	110	
	tgccagcagt cacattgcct t	21
<210>	111	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	111	
	gattaaagtg aggacctgct t	21
<210>	112	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	112	

tgccagcagt cacattgcct t	21
<210> 113	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 113	
gattaaagtg aggacctgct t	21
<210> 114	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 114	
tgccagcagt cacattgcct t	21
<210> 115	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 115	
gattaaagtg aggacctgct t	21
<210> 116	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 116	
tattaaagtg aggacctgct t	21
<210> 117	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400> 117	
tgattaaagt gaggacctgt t	21

<210>	118	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	118	
	tgccagcagt cacattgcct t	21
<210>	119	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	119	
	tcaccacaag ccaaacgact tt	22
<210>	120	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	120	
	tacaccacaa gccaaacgat t	21
<210>	121	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	121	
	taacagatga gttaaggggt t	21
<210>	122	
<211>	1453	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列之描述：合成聚核苷酸	
<400>	122	
	ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
	ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg	120
	aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	180

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt	420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc	540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tattttttaa	600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg	660
gcgagggggcg gggcgggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg	720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg	780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc	840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggg caaatcaaag aactgtctct	900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct	960
gcggaattgt acccgcgcc gatccaccgg taccgagctc tcccgcagaa caccatgcgc	1020
tccacggaag tcgtttggct tgtggtggct gtggccactg agaagtcacc acaagccaaa	1080
cgacttctga ggagcgcctt gacagcagcc atgggagggc ctcgaggacg gggtgaaacta	1140
cgcctgagga tccgatcttt ttccctctgc caaaaattat ggggacatca tgaagcccct	1200
tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgga	1260
tttttgtgt ctctcactcg gcctaggtag ataagtagca tggcggggta atcattaact	1320
acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg	1380
aggccggggc accaaaggct gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg	1440
agcgagcgcg cag	1453

<210> 123
<211> 1453
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 123	
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg	120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	180
tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	300

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggt 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt ttttttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gcaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggg gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggt aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtgggtggg caaatcaaag aactgtctct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcgcc gatccaccgg taccgagctc tcccgcagaa caccatgcgc 1020
tccacggaac aggtcctcac tttaatcgct gtggccactg agaagtgatt aaagtgagga 1080
cctgttctga ggagcgcctt gacagcagcc atgggagggc ctcgaggacg ggggtgaacta 1140
cgctgagga tccgatcttt ttccctctgc caaaaattat ggggacatca tgaagcccct 1200
tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgaa 1260
ttttttgtgt ctctcactcg gcctaggtag ataagtagca tggcggggta atcattaact 1320
acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg 1380
aggccggggc accaaaggtc gcccgcgccc cgggctttgc ccgggcgggc tcagtgcgcg 1440
agcgagcgcg cag 1453

<210> 124
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 124
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tgccccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggt 360

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc	540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tatttttttaa	600
ttatttttgt cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg	660
gcgagggggc gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg	720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg	780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagttagtc	840
tttttgcttt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct	900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct	960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tgaagcaaag aaggggcaga gggagcccgt	1020
gagctgagtg ggccagggac tgggagaagg agtgaggagg cagggccggc atgcctctgc	1080
tgctggccag agcaggctct cactttaatg ccgtctgcac ctgtcactag tattaaagt	1140
aggacctgct ttggccgtgt agtgctaccc agcgctggct gcctcctcag cattgcaatt	1200
cctctcccat ctgggcacca gtcagctacc ctggtgggaa tctgggtagc cctcgaggac	1260
ggggtgaact acgcctgagg atccgatctt ttccctctg ccaaaaatta tggggacatc	1320
atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aattttattt cattgcaata	1380
gtgtgttggg aatttttgtg tctctcactc ggcctaggta gataagtagc atggcggggt	1440
aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggc actccctctc tgcgcgctcg	1500
ctcgctcact gagggcgggc gaccaaaggt cgcccgcgc ccgggctttg cccgggcggc	1560
ctcagtgagc gagcgagcgc gcag	1584

<210> 125
<211> 1453
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 125	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt	60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg	120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	360

aactgcccac	ttggcagtac	atcaagtgta	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	420
caatgacggg	aaatggcccc	cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc	480
tacttggcag	tacatctacg	tattagtcac	cgctattacc	atgtcgaggc	cacgttctgc	540
ttcactctcc	ccatctcccc	ccccctcccc	cccccaattt	tgtattttatt	tatttttttaa	600
ttattttgtg	cagcgatggg	ggcggggggg	gggggcgcgc	gccaggcggg	gcggggcggg	660
gcgagggggc	gggcggggcg	aggcggagag	gtgcggcggc	agccaatcag	agcggcgcg	720
tccgaaagt	tccttttatg	gcgaggcggc	ggcggcgggc	gccctataaa	aagcgaagcg	780
cgcggcgggc	gggagcaagc	ttgaactgaa	aaaccagaaa	gttaactggg	aagtttagtc	840
tttttgtctt	ttatttcagg	tcccggatcc	gggtggtggtg	caaatcaaag	aactgctcct	900
cagtggatgt	tgcttttact	tctaggcctg	tacggaagtg	ttacttctgc	tctaaaagct	960
gcggaattgt	acccgcggcc	gatccaccgg	taccgagctc	tcccgcagaa	caccatgcgc	1020
tccacggaag	caggctctca	ctttaatgct	gtggccactg	agaagtatta	aagtgaggac	1080
ctgcttctga	ggagcgcctt	gacagcagcc	atgggagggc	ctcgaggacg	gggtgaacta	1140
cgcctgagga	tccgatcttt	ttccctctgc	caaaaattat	ggggacatca	tgaagcccct	1200
tgagcatctg	acttctggct	aataaaggaa	atttattttt	attgcaatag	tgtgttgga	1260
ttttttgtgt	ctctcactcg	gcctaggtag	ataagtagca	tggcgggtta	atcattaact	1320
acaaggaacc	cctagtgatg	gagttggcca	ctccctctct	gcgcgctcgc	tcgctcactg	1380
aggccggggc	accaaaggct	gcccgcagcc	cgggctttgc	ccgggcggcc	tcagtgcg	1440
agcgagcgcg	cag					1453

<210> 126
<211> 1453
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400>	126						
ctgcgcgctc	gctcgcctac	tgaggccgccc	cggggcaaagc	ccgggcgctcg	ggcgaccttt		60
ggtcgccccg	cctcagtgag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtgtagcc	atgctctagg		120
aagatcaatt	caattcacgc	gtcgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat		180
tacgggggtca	ttagttcata	gcccataatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa		240
tggcccgcc	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt		300
tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta		360
aactgcccac	ttggcagtac	atcaagtgta	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt		420

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tatttttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggggggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctc tcccgagaa caccatgcgc 1020
tccacggaat cgtttggctt gtggtgtgct gtggccactg agaagtacac cacaagccaa 1080
acgattctga ggagcgctt gacagcagcc atgggagggc ctcgaggacg ggggtgaacta 1140
cgctgagga tccgatcttt tccccctgc caaaaattat ggggacatca tgaagcccct 1200
tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttattttc attgcaatag tgtgttgaa 1260
tttttgtgt ctctcactcg gcctaggtag ataagtagca tggcggggta atcattaact 1320
acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg 1380
aggccgggcg accaaaggct gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg 1440
agcgagcgcg cag 1453

<210> 127
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 127
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaataaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540

ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tatttttttaa	600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg	660
gcgagggggc gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg	720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcggc ggcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg	780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc	840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtgggtggg caaatcaaag aactgctcct	900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct	960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tgaagcaaag aaggggcaga gggagcccgt	1020
gagctgagtg ggccagggac tgggagaagg agtgaggagg cagggccggc atgcctctgc	1080
tgctggccag agcaggctct cactttaatc ccgtctgcac ctgtcactag gattaaagtg	1140
aggacctgct ttggccgtgt agtgctaccc agcgtggct gcctcctcag cattgcaatt	1200
cctctcccat ctgggcacca gtcagctacc ctgggtgggaa tctgggtagc cctcgaggac	1260
ggggtgaact acgcctgagg atccgatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc	1320
atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aattttatatt cattgcaata	1380
gtgtgttggg attttttgtg tctctcactc ggcctaggta gataagtagc atggcggggt	1440
aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg	1500
ctcgctcact gagggcgggc gaccaaaggt cggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc	1560
ctcagtgagc gagcgagcgc gcag	1584

<210> 128
<211> 1406
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 128	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt	60
ggtcgcgccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg	120
aagatcaatt caattcacgc gtccatggct tagaaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga	180
tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact catttgcacc	240
actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat ttggaatcac	300
acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat acactcctta	360
attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga attagataaa	420
tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgttggtatat aaaattattc	480

ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg 540
aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc aaccccgagg 600
ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaagggtggag agagagacag agacagatcc 660
attcgattag tgaacggatc tcgacgggat cgatcacgag actagcctcg agcggccgca 720
attcgaacgc tgacgtcatc aacccgctcc aaggaatcgc gggcccagtg tctactaggcg 780
ggaacaccca gcgcgcgtgc gccctggcag gaagatggct gtgagggaca gggagtggcg 840
ccctgcaata tttgcatgtc gctatgtgtt ctgggaaatc accataaacg tgaaatgtct 900
ttggatttgg gaatcttata agttctgtat gagaccacac cggtagcgag ctctcccgca 960
gaacaccatg cgctccacgg aagcaggctc tcactttaat gctgtggcca ctgagaagta 1020
ttaaagtgag gacctgcttc tgaggagcgc cttgacagca gccatgggag ggcctcgagg 1080
acgggggtgaa ctacgcctga ggatccgatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca 1140
tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa 1200
tagtggtgtg gaattttttg tgtctctcac tcggcctagg tagataagta gcatggcggg 1260
ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttgg ccaactccctc tctgcgcgct 1320
cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccagc gcccgggctt tgcccgggcg 1380
gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag 1406

<210> 129
<211> 1406
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 129
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtccatggct tagaaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga 180
tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact catttgcacc 240
actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat ttggaatcac 300
acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat acactcctta 360
attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga attagataaa 420
tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaatggc tgtggtatat aaaattattc 480
ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg 540
aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc aaccccgagg 600
ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaagggtggag agagagacag agacagatcc 660

attcgattag tgaacggatc tcgacggtat cgatcacgag actagcctcg agcggccgca 720
attcgaacgc tgacgtcatc aacccgctcc aaggaatcgc gggcccagtg tcactaggcg 780
ggaacaccca gcgcgcgtgc gccctggcag gaagatggct gtgagggaca gggagtggcg 840
ccctgcaata tttgcatgtc gctatgtgtt ctgggaaatc accataaacg tgaaatgtct 900
ttggatttgg gaatcttata agttctgtat gagaccacac cggtagccgag ctctcccgca 960
gaacaccatg cgctccacgg aagtcgtttg gcttgtggtg gctgtggcca ctgagaagtc 1020
accacaagcc aaacgacttc tgaggagcgc cttgacagca gccatgggag ggcctcgagg 1080
acggggtgaa ctacgcctga ggatccgac tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca 1140
tcatgaagcc ctttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaattttatt ttcattgcaa 1200
tagtgtgttg gaattttttg tgtctctcac tcggcctagg tagataagta gcatggcggg 1260
ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttag ccactccctc tctgcgcgct 1320
cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccagc gcccgggctt tgcccgggcg 1380
gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag 1406

<210> 130
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 130
ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg 780

cgcgggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggt aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tgaagcaaag aaggggcaga gggagcccg 1020
gagctgagtg ggccagggac tgggagaagg agtgaggagg cagggccggc atgcctctgc 1080
tgctggccag agtcgttttg cttgtggtgg ccgtctgcac ctgtcactag tcaccacaag 1140
ccaaacgact ttggccgtgt agtgctaccc agcgctggct gcctcctcag cattgcaatt 1200
cctctcccat ctgggcacca gtcagctacc ctggtgggaa tctgggtagc cctcgaggac 1260
ggggtgaact acgcctgagg atccgatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc 1320
atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aattttatatt cattgcaata 1380
gtgtgtttgga attttttgtg tctctcactc ggcctaggta gataagtagc atggcggggtt 1440
aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg 1500
ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc 1560
ctcagtgagc gagcgagcgc gcag 1584

<210> 131
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 131
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780

cgcggcgggc	gggagcaagc	ttgaactgaa	aaaccagaaa	gttaactggt	aagtttagtc	840
tttttgtctt	ttatttcagg	tcccggatcc	ggtggtggtg	caaatcaaag	aactgctcct	900
cagtggatgt	tgcctttact	tctagggctg	tacggaagtg	ttactttctgc	tctaaaagct	960
gcggaattgt	acccgcggcc	gatccaccgg	tgaagcaaag	aaggggcaga	gggagcccg	1020
gagctgagt	ggccagggac	tgggagaagg	agtgaggagg	cagggccggc	atgcctctgc	1080
tgctggccag	acaggtcctc	actttaatcg	ccgtctgcac	ctgtcactag	tgattaaagt	1140
gaggacctgt	ttggccgtgt	agtgtctacc	agcgtgggt	gcctcctcag	cattgcaatt	1200
cctctcccat	ctgggcacca	gtcagctacc	ctggtgggaa	tctgggtagc	cctcgaggac	1260
ggggtgaact	acgcctgagg	atccgatctt	tttccctctg	ccaaaaatta	tggggacatc	1320
atgaagcccc	ttgagcatct	gacttctggc	taataaagga	aatttatatt	cattgcaata	1380
gtgtgttgg	atgttttgtg	tctctcactc	ggcctaggta	gataagtagc	atggcgggtt	1440
aatcattaac	tacaaggaac	ccctagtgat	ggagttggcc	actccctctc	tgcgcgctcg	1500
ctcgtcact	gaggccgggc	gaccaaaggt	cggccgacgc	ccgggctttg	cccgggcggc	1560
ctcagtgagc	gagcgagcgc	gcag				1584

<210> 132
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 132						
ctgcgcgctc	gctcgtcac	tgaggccgcc	cgggcaaagc	ccgggcgctc	ggcgaccttt	60
ggtcgccccg	cctcagttag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtgtagcc	atgctctagg	120
aagatcaatt	caattcacgc	gtcgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	180
tacgggggtca	ttagttcata	gccccatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	240
tggcccgcc	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	300
tcccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	360
aactgcccac	ttggcagtag	atcaagtgt	tcatatgcca	agtacgcccc	ctattgacgt	420
caatgacggt	aaatggcccc	cctggcatta	tgcccagtag	atgaccttat	gggactttcc	480
tacttggcag	tacatctacg	tattagtcac	cgctattacc	atgtcgaggc	cacgttctgc	540
ttcactctcc	ccatctcccc	cccctcccca	cccccaattt	tgtattttatt	tattttttaa	600
ttattttgtg	cagcgatggg	ggcggggggg	gggggcgcgc	gccaggcggg	gcggggcggg	660
gcgagggggc	gggcgggggc	aggcggagag	gtgcggcggc	agccaatcag	agcgggcgcgc	720

tccgaaagtt	tccttttatg	gcgaggcggc	ggcggcggcg	gccctataaa	aagcgaagcg	780
cgcggcgggc	gggagcaagc	ttgaactgaa	aaaccagaaa	gttaactggt	aagtttagtc	840
tttttgtctt	ttatttcagg	tcccggatcc	ggtggtggtg	caaatcaaag	aactgctcct	900
cagtggatgt	tgcctttact	tctaggcctg	tacggaagtg	ttactttctgc	tctaaaagct	960
gcggaattgt	acccgcggcc	gatccaccgg	tgaagcaaag	aaggggcaga	gggagcccgt	1020
gagctgagtg	ggccagggac	tgggagaagg	agtgaggagg	cagggccggc	atgcctctgc	1080
tgctggccag	atcgtttggc	ttgtggtgtg	ccgtctgcac	ctgtcactag	tacaccacaa	1140
gccaaacgat	ttggccgtgt	agtgtacccc	agcgtgggct	gcctcctcag	cattgcaatt	1200
cctctcccat	ctgggcacca	gtcagctacc	ctggtgggaa	tctgggtagc	cctcgaggac	1260
ggggtgaact	acgcctgagg	atccgatctt	tttccctctg	ccaaaaatta	tggggacatc	1320
atgaagcccc	ttgagcatct	gacttctggc	taataaagga	aattttatttt	cattgcaata	1380
gtgtgttggg	atTTTTTgtg	tctctcactc	ggcctaggta	gataagtagc	atggcggggt	1440
aatcattaac	tacaaggaac	ccctagtgat	ggagttggcc	actccctctc	tgcgcgctcg	1500
ctcgctcact	gaggccgggc	gaccaaaggt	cgcccgcgc	ccgggctttg	cccgggcggc	1560
ctcagtgagc	gagcgagcgc	gcag				1584

<210> 133
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 133							
ctgcgcgctc	gctcgctcac	tgaggccgcc	cgggcaaagc	ccgggcgctcg	ggcgaccttt		60
ggtcgccccg	cctcagtgag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtgtagcc	atgctctagg		120
aagatcaatt	caattcacgc	gtcgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat		180
tacgggggtca	ttagttcata	gccccatata	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa		240
tggccccgct	ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt		300
tccccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta		360
aactgccccac	ttggcagtac	atcaagtgtg	tcatatgcc	agtacgcccc	ctattgacgt		420
caatgacggg	aaatggcccc	cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc		480
tacttggcag	tacatctacg	tattagtc	cgctattacc	atgtcgaggc	cacgttctgc		540
ttcactctcc	ccatctcccc	ccccctcccc	cccccaattt	tgtattttatt	tatttttttaa		600
ttattttgtg	cagcgatggg	ggcggggggg	gggggcgcgc	gccaggcggg	gcggggcggg		660
gcgagggggc	gggcggggcg	aggcggagag	gtgcggcggc	agccaatcag	agcgggcgcgc		720

tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgcttt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctcccgc agaacaccat gcgctcttcg gaaggcaatg tgactgctgg tgcctgtgac 1080
ctggtgccag cagtcacatt gccttctgag gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaaccctc agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 134
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 134
ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtag atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 780

cgcgggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggt aagtttagtc 840
tttttgcttt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctccgc agaacaccat gcgctcttcg gaaggcaatg tgactgctgg tacctgtgat 1080
ttggtgccag cagtcacatt gccttctgag gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaaccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 135
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 135
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtag atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggt aagtttagtc 840
tttttgcttt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900

cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctccgc agaacaccat gcgctcttcg gaaggcaatg tgactgctgg tacctgtgac 1080
ctggtgccag cagtcacatt gcctttctgtg gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcggcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaaccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 136
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 136
ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttactttctgc tctaaaagct 960

gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctcccgc agaacaccat gcgctcttcg gaaggcaatg tgtctgctgg tacctgtgac 1080
ctggtgccag cagtcacatt gccttctgtg gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tatttttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaacccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgccccg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 137
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 137
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcaactctc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgg ggcgggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gtttaactgg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccgatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtgatgtg tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctcccgc agaacaccat gcgctcttcg gaaggcaatg tgactgctgg cccctgtgac 1080

ctggtgccag cagtcacatt gccttctgag gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tatttttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcactcggcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaacccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg cggggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgagc 1490

<210> 138
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 138
ctgcgcgtc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gtttaactgg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgccctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctccgc agaacaccat gcgctcttcg gaagcaggtc ctcactttaa ttctgtgac 1080
ctgggattaa agtgaggacc tgcttctgag gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140

gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaatt 1260
aaaggaaatt tatttttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcactcggcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaaactaca aggaacccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 139
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 139
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca ccccaattt tgtatttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tgaagcaaag aaggggcaga gggagcccgt 1020
gagctgagtg ggccagggac tgggagaagg agtgaggagg cagggccggc atgcctctgc 1080
tgctggccag aggcaatgtg actgctggta ccgtctgcac ctgtcactag tgccagcagt 1140
cacattgcct ttggccgtgt agtgctaccc agcgtggct gcctcctcag cattgcaatt 1200
cctctcccat ctgggcacca gtcagctacc ctggtgggaa tctgggtagc cctcgaggac 1260

ggggtgaact acgcctgagg atccgatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc 1320
atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatattt cattgcaata 1380
gtgtgttggga atttttttgtg tctctcactc ggcctaggta gataagtagc atggcggggtt 1440
aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg 1500
ctcgctcact gagggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg cccgggcggc 1560
ctcagtgagc gagcgagcgc gcag 1584

<210> 140
<211> 1491
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 140
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacggggtca ttagttcata gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tatttttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg cccaggcggg gcggggcggg 660
gcgaggggcg gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg gtgctgggcg gggggcggcg 1020
ggccctcccg cagaacacca tgcgctcttc ggaagcaggc cctcacttta atccctgtga 1080
cctgggatta aagtgaggac ctgcttctgt ggagcgctt gacagcagcc atgggagggc 1140
cgccccctac ctcagtgact cgaggacggg gtgaactacg cctgaggatc cgatcttttt 1200

ccctctgcc aaaaattatgg ggacatcatg aagcccccttg agcatctgac ttctggctaa 1260
taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgggaatt ttttgtgtct ctactcggc 1320
ctaggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 1380
gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggctgc 1440
ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca g 1491

<210> 141
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 141
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccg ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tatttttta 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcgcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg gggcgggcgg 1020
gccctcccgc agaacaccat gcgctcttcg gaagcaggct ctgactttaa tccctgtgac 1080
ctgggattaa agtgaggacc tgcttctgtg gagcgccctg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgaact gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcactctgact tctggcta 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgcc 1320

taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca aggaaccct agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggctcgcc 1440
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 1490

<210> 142
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 142
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtag atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttcactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt tgtatttatt tatttttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcgc ggcgggcggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg gggcgggcgg 1020
gccctccgc agaacaccat gcgctcttcg gaagcaggtc ctcactttaa tgcctgtgac 1080
ctgggattaa agtgaggacc tgcttctgag gagcgcttg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgcaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tctactggcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca aggaaccct agtgatggag 1380

ttggccactc cctctctgcg cgtctgctcg ctcaactgagg ccggggcgacc aaagggtcgcc 1440
cgacgccccg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgagc 1490

<210> 143
<211> 1490
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 143
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccggggcgctg ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc 540
ttactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tattttttaa 600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg 660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg 720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg 780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagttagtc 840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct 900
cagtggatgt tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct 960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg taccgagctg tgctgggcgg ggggcggcgg 1020
gccctcccgc agaacaccat gcgctcttcg gaagcaggtc ctcactttaa tccctgtgat 1080
ttgggattaa agtgaggacc tgcttctgag gagcgccctg acagcagcca tgggagggcc 1140
gccccctacc tcagtgactc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc 1200
cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccctga gcatctgact tctggctaata 1260
aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc tcaactcggcc 1320
taggtagata agtagcatgg cgggttaatc attactaca aggaaccctt agtgatggag 1380
ttggccactc cctctctgcg cgtctgctcg ctcaactgagg ccggggcgacc aaagggtcgcc 1440
cgacgccccg gctttgcccc ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgagc 1490

<210> 144
<211> 1584
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 144	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg	120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	180
tacgggggtca ttagttcata gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	240
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc	540
ttcactctcc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt tatttttta	600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg	660
gcgaggggcg gggcggggag aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg	720
tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg	780
cgcggcgggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttactggg aagtttagtc	840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct	900
cagtggatgt tgcctttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct	960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tgaagcaaag aaggggcaga gggagccgt	1020
gagctgagtg ggccagggac tgggagaagg agtgaggagg cagggccggc atgcctctgc	1080
tgttggccag acccctaac tcatttgttc ccgtctgcac ctgtcactag taacagatga	1140
gttaaggggt ttggccgtgt agtgctaccc agcgctggct gcctcctcag cattgcaatt	1200
cctctcccat ctgggcacca gtcagctacc ctggtgggaa tctgggtagc cctcaggac	1260
ggggtgaact acgcctgagg atccgatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc	1320
atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatttt cattgcaata	1380
gtgtgttggg attttttgtg tctctcactc ggcctaggta gataagtagc atggcgggtt	1440
aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg	1500
ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cggccgacgc ccgggctttg cccgggcggc	1560

ctcagtgagc gagcgagcgc gcag 1584

<210> 145
<211> 1406
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 145
ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtccatggct tagaaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga 180
tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact catttgcacc 240
actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat ttggaatcac 300
acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat acactcctta 360
attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga attagataaa 420
tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat aaaattattc 480
ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg 540
aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc aaccccgagg 600
ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag agacagatcc 660
attcgattag tgaacggatc tcgacgggat cgatcacgag actagcctcg agcggccgca 720
attcgaacgc tgacgtcatc aacccgctcc aaggaatcgc gggcccagtg tcactaggcg 780
ggaacaccca gcgcgcgtgc gccctggcag gaagatggct gtgagggaca gggagtggcg 840
ccctgcaata tttgcatgtc gctatgtgtt ctgggaaatc accataaacg tgaaatgtct 900
ttggatttgg gaatcttata agttctgtat gagaccacac cggtagcgag ctctcccgca 960
gaacaccatg cgctccacgg aagcagggtc tcactttaat gctgtggcca ctgagaagta 1020
ttaaagtgag gacctgcttc tgaggagcgc cttgacagca gccatgggag ggcctcgagg 1080
acggggtgaa ctacgcctga ggatccgatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca 1140
tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa 1200
tagtgtgttg gaattttttg tgtctctcac tcggcctagg tagataagta gcatggcggg 1260
ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttag ccactccctc tctgcgcgct 1320
cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc gcccgggctt tgcccgggcg 1380
gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag 1406

<210> 146
<211> 1406

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 146
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgtagcc atgctctagg 120
aagatcaatt caattcacgc gtccatggct tagaaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga 180
tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact catttgcacc 240
actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat ttggaatcac 300
acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttaat acactcctta 360
attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aattattgga attagataaa 420
tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc tgtggtatat aaaattattc 480
ataatgatag taggaggctt ggtagggtta agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg 540
aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga cccacctccc aacccccagg 600
ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaagggtggag agagagacag agacagatcc 660
attcgattag tgaacggatc tcgacgggat cgatcacgag actagcctcg agcggccgca 720
attcgaacgc tgacgtcatc aacccgctcc aaggaatcgc gggcccagtg tcactaggcg 780
ggaacaccca gcgcgcgtgc gccctggcag gaagatggct gtgagggaca gggagtggcg 840
ccctgcaata tttgcatgtc gctatgtgtt ctgggaaatc accataaacg tgaaatgtct 900
ttggatttgg gaatcttata agttctgtat gagaccacac cggtagcgag ctctcccgca 960
gaacaccatg cgctccacgg aagtcgtttg gcttgtggtg gctgtggcca ctgagaagtc 1020
accacaagcc aaacgacttc tgaggagcgc cttgacagca gccatgggag ggcctcgagg 1080
acggggtgaa ctacgcctga ggatccgatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca 1140
tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa 1200
tagtgtgttg gaattttttg tgtctctcac tcggcctagg tagataagta gcatggcggg 1260
ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttag ccactccctc tctgcgcgct 1320
cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcg gcccgggctt tgcccgggcg 1380
gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag 1406

<210> 147
<211> 2052
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 147	
ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcacaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt	60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gaggtagcc atgctctagg	120
aagatcaatt caattcacgc gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	180
tacgggggtca ttagttcata gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	240
tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggt	360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt	420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	480
tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgtcgaggc cacgttctgc	540
ttactctccc ccatctcccc cccctcccca cccccaattt tgtattttatt ttttttttaa	600
ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggcgcg gccaggcggg gcggggcggg	660
gcgagggggc gggcgggggc aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg	720
tccgaaagtt tccttttatg gcgagggcg gcggcgggc gccctataaa aagcgaagcg	780
cgcgggcggc gggagcaagc ttgaactgaa aaaccagaaa gttaactggg aagtttagtc	840
tttttgtctt ttatttcagg tcccggatcc ggtggtggtg caaatcaaag aactgctcct	900
cagtggatgt tgcccttact tctaggcctg tacggaagtg ttacttctgc tctaaaagct	960
gcggaattgt acccgcggcc gatccaccgg tcaccatggg gagcaagggc gaggaggata	1020
acatggccat catcaaggag ttcatgcgct tcaagggtgca catggagggc tccgtgaacg	1080
gccacgagtt cgagatcgag ggcgagggcg agggccgccc ctacgagggc acccagaccg	1140
ccaagctgaa ggtgaccaag ggtggccccc tgcccttcgc ctgggacatc ctgtccctc	1200
agttcatgta cggtccaag gcctacgtga agcaccgcc cgacatcccc gactacttga	1260
agctgtcctt ccccgagggc ttcaagtggg agcgctgat gaacttcgag gacggcggcg	1320
tgggtgaccgt gaccaggac tcctccctgc aggacggcga gttcatctac aagggtgaagc	1380
tgcgcggcac caacttcccc tccgacggcc ccgtaatgca gaagaagacc atgggctggg	1440
aggcctctc cgagcggatg taccgcgagg acggcgccct gaaggcgag atcaagcaga	1500
ggctgaagct gaaggacggc ggccactacg acgctgaggt caagaccacc tacaaggcca	1560
agaagcccgt gcagctgccc ggcgccatac acgtcaacat caagttggac atcacctccc	1620
acaacgagga ctacaccatc gtggaacagt acgaacgcg cgagggccgc cactccaccg	1680
gcggcatgga cgagctgtac aagtccggac tcagatagtc tcgaggacgg ggtgaactac	1740
gcctgaggat ccgatctttt tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagcccctt	1800
gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat	1860

tttttgtgtc tctcactcgg cctaggtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta	1920
caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgtcactga	1980
ggccggggcga ccaaaggteg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga	2040
gcgagcgcg c ag	2052

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種調節聚核苷酸，其包含：

- (i) 5'側接區域，其中編碼該5'側接區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：47之核苷酸序列；
- (ii) 環區域，其中編碼該環區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：50之核苷酸序列；
- (iii) 3'側接區域，其中編碼該3'側接區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：54之核苷酸序列；及
- (iv) 反義股序列及有義股序列，其中該有義股序列包含SEQ ID NO：25之核苷酸序列，且該反義股序列包含SEQ ID NO：7之核苷酸序列。

【請求項2】

如請求項1之調節聚核苷酸，其中該有義股序列之長度係22個核苷酸；及其中該反義股序列之長度係22個核苷酸。

【請求項3】

一種調節聚核苷酸，其包含由SEQ ID NO：62之核苷酸序列所編碼之核苷酸序列。

【請求項4】

一種調節聚核苷酸，其係由SEQ ID NO：62之核苷酸序列所編碼之核苷酸序列所組成。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之調節聚核苷酸，其中該調節聚核苷酸係pri-

微RNA。

【請求項6】

如請求項1至4中任一項之調節聚核苷酸，其自5'端至3'端包含：

- (i) 5'側接區域，其中編碼該5'側接區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：47之核苷酸序列；
- (ii) 有義股序列，其包含SEQ ID NO：25；
- (iii) 環區域，其中編碼該環區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：50之核苷酸序列；
- (iv) 反義股序列，其包含SEQ ID NO：7；及
- (v) 3'側接區域，其中編碼該3'側接區域之核苷酸序列包含SEQ ID NO：54之核苷酸序列。

【請求項7】

一種腺相關病毒(AAV)病毒基因組，其包含定位於兩個反向末端重複序列(ITR)之間的核酸序列，其中該核酸序列編碼如請求項1至6中任一項之調節聚核苷酸。

【請求項8】

如請求項7之AAV病毒基因組，其進一步包含：

- (i) 啟動子；
- (ii) 強化子；
- (iii) 內含子；
- (iv) 填充序列；及/或
- (v) 聚腺苷酸化(PolyA)信號序列。

【請求項9】

如請求項8之AAV病毒基因組，其中該啟動子包含H1啟動子。

【請求項10】

一種重組腺相關病毒(AAV)顆粒，其包含如請求項7至9中任一項之AAV病毒基因組及AAV衣殼。

【請求項11】

如請求項10之重組AAV顆粒，其中該AAV衣殼包含AAV9衣殼或其變異體、AAV5衣殼或其變異體或AAVrh10衣殼或其變異體。

【請求項12】

一種醫藥組合物，其包含如請求項10之重組AAV顆粒及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項13】

一種包含如請求項10之重組AAV顆粒的組合物之用途，其用於製造用於治療及/或改善肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)之藥劑。

【請求項14】

如請求項13之用途，其中該組合物係投與至個體之脊髓。

【請求項15】

一種包含如請求項10之重組AAV顆粒的組合物之用途，其用於製造用於抑制細胞中SOD1基因表現之藥劑。

【請求項16】

如請求項15之用途，其中該細胞係：

- (i) 哺乳動物細胞；
- (ii) 中樞神經系統(CNS)細胞；
- (iii) 神經元；

- (iv) 運動神經元或中型多棘神經元；
- (v) 星形膠質細胞；及/或
- (vi) 於個體中。

【請求項17】

如請求項16之用途，其中該個體具有ALS。

【請求項18】

如請求項13或17之用途，其中該ALS係偶發性ALS或家族性ALS。

【請求項19】

如請求項15之用途，其中SOD1之表現抑制或遏制約20%至約100%。

【請求項20】

如請求項15之用途，其中SOD1之表現抑制或遏制約50%至約100%。

【請求項21】

如請求項15之用途，其中該SOD1基因包含野生型SOD1基因、突變SOD1基因或其組合。

【請求項22】

一種製造重組AAV之方法，其包含以包含以下之聚核苷酸轉染細胞：如請求項7之AAV病毒基因組、至少一個編碼AAV rep基因之聚核苷酸及至少一個編碼AAV cap基因之聚核苷酸；及自該細胞收集該重組AAV。

【請求項23】

如請求項22之方法，其中該細胞包含昆蟲細胞、哺乳動物細胞或細菌細胞。

【請求項24】

一種腺相關病毒(AAV)病毒基因組，其包含定位於兩個反向末端重複序列(ITR)之間的核酸序列，其中該核酸序列包含SEQ ID NO：62之序列。

【請求項25】

如請求項24之AAV病毒基因組，其進一步包含：

- (i) 啟動子；
- (ii) 強化子；
- (iii) 外顯子；
- (iv) 內含子；
- (v) 填充序列；及/或
- (vi) 聚腺苷酸化(PolyA)信號序列。

【請求項26】

如請求項25之AAV病毒基因組，其中該啟動子包含H1啟動子。

【請求項27】

一種重組腺相關病毒(AAV)顆粒，其包含如請求項24之AAV病毒基因組及AAV衣殼。

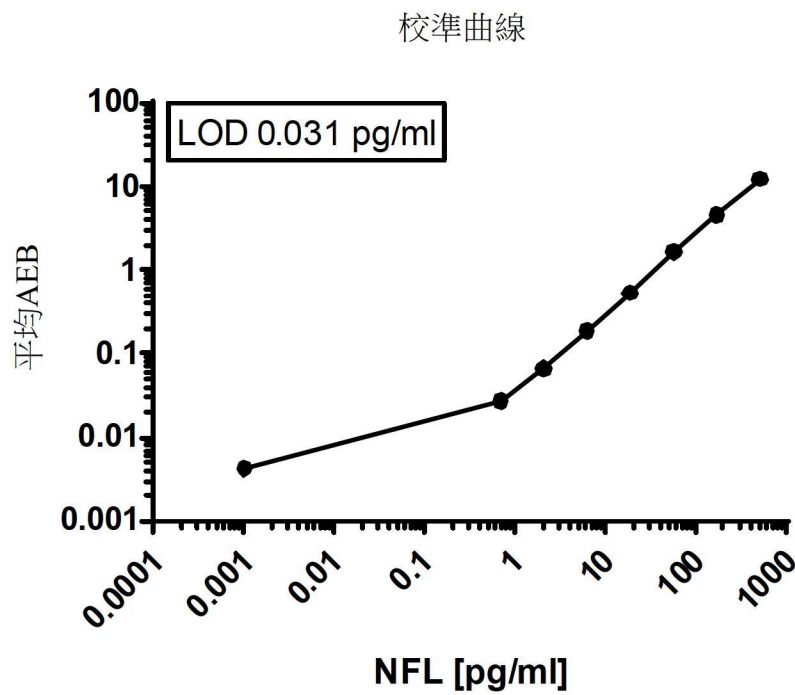
【請求項28】

如請求項27之重組AAV顆粒，其中該AAV衣殼包含AAV9衣殼或其變異體、AAV5衣殼或其變異體或AAVrh10衣殼或其變異體。

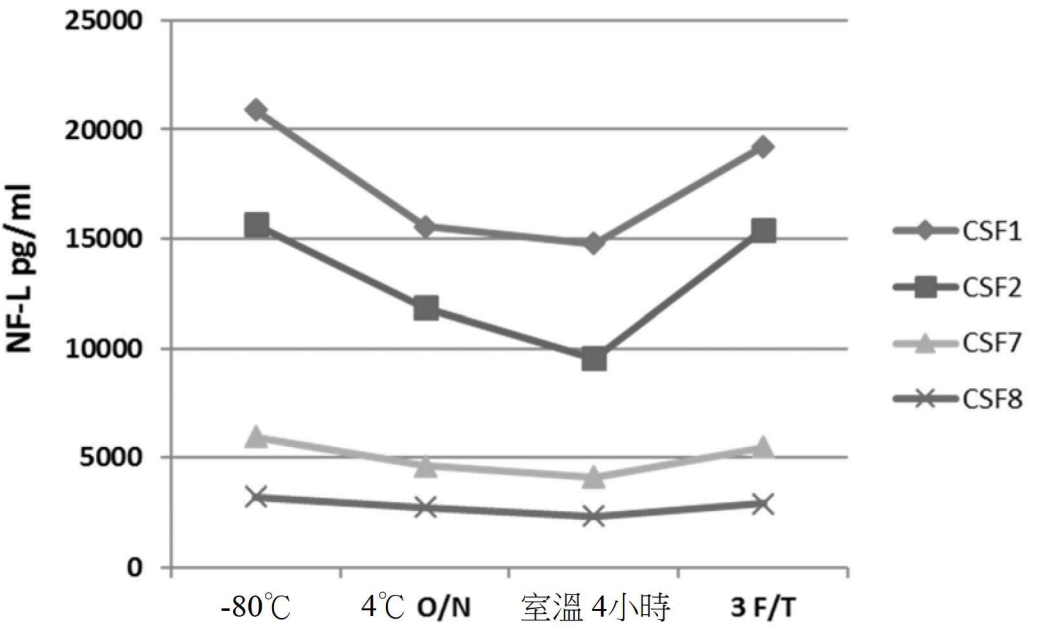
【請求項29】

一種醫藥組合物，其包含如請求項27之重組AAV顆粒及醫藥學上可接受之賦形劑。

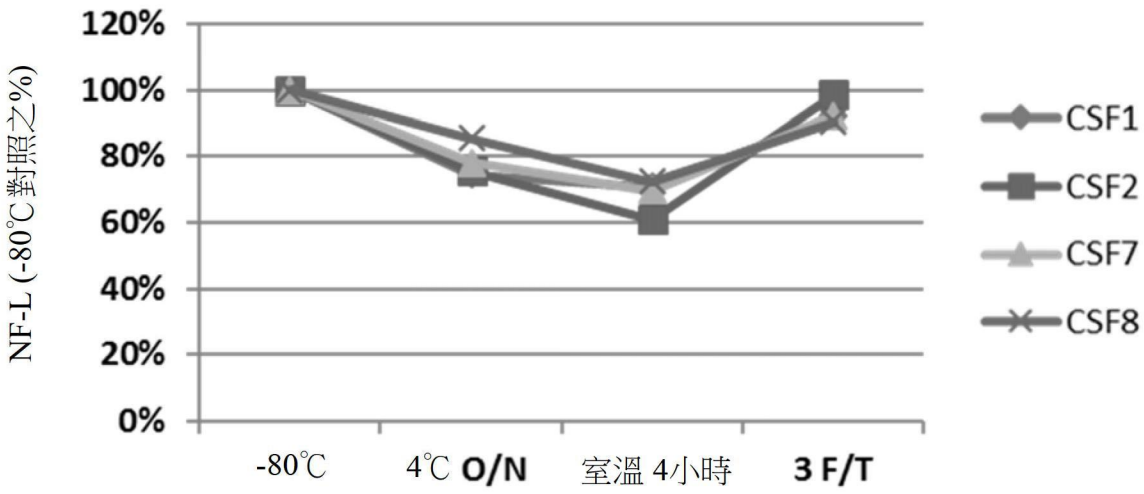
【發明圖式】



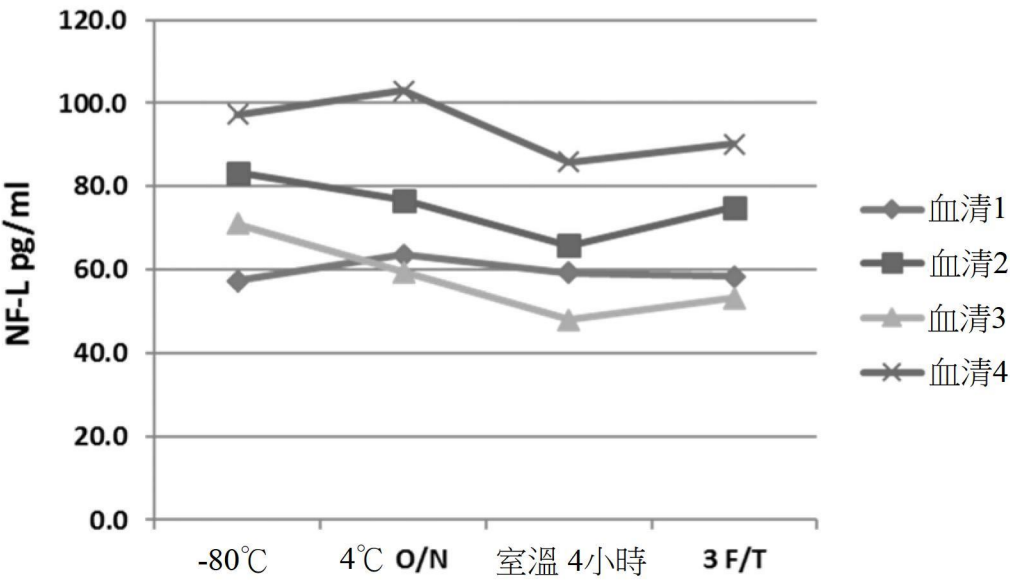
【圖1】



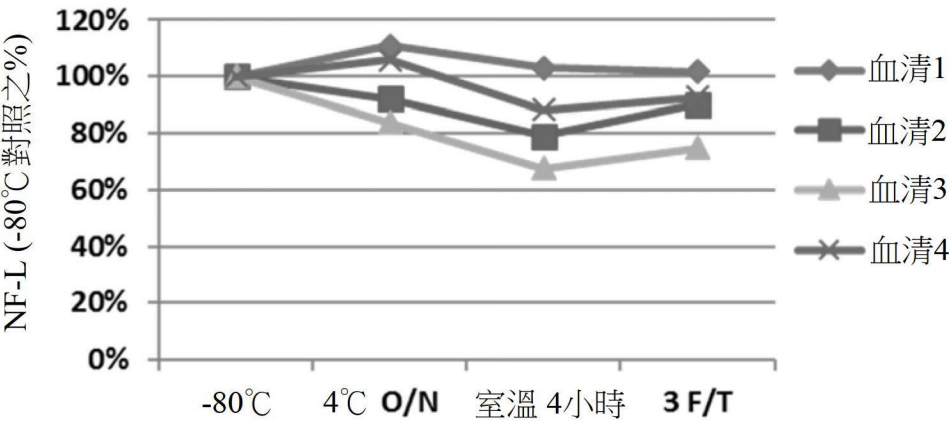
【圖2A】



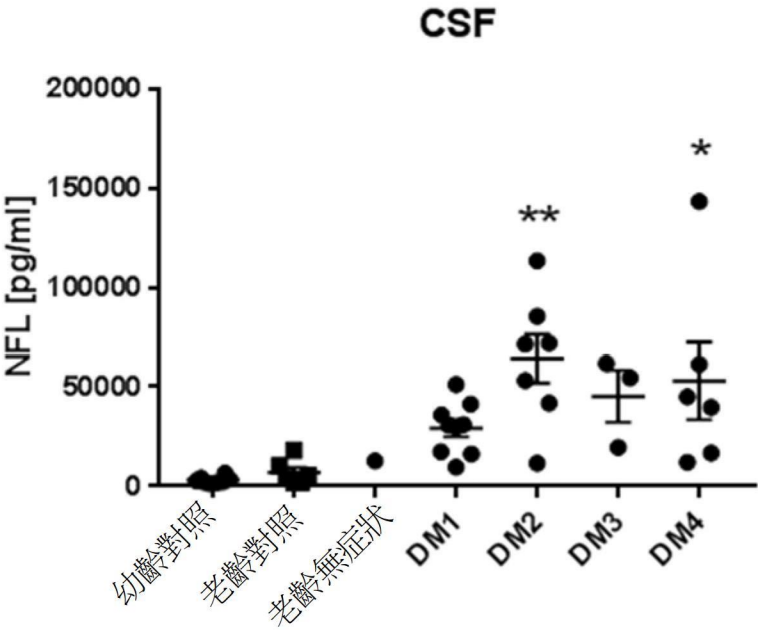
【圖2B】



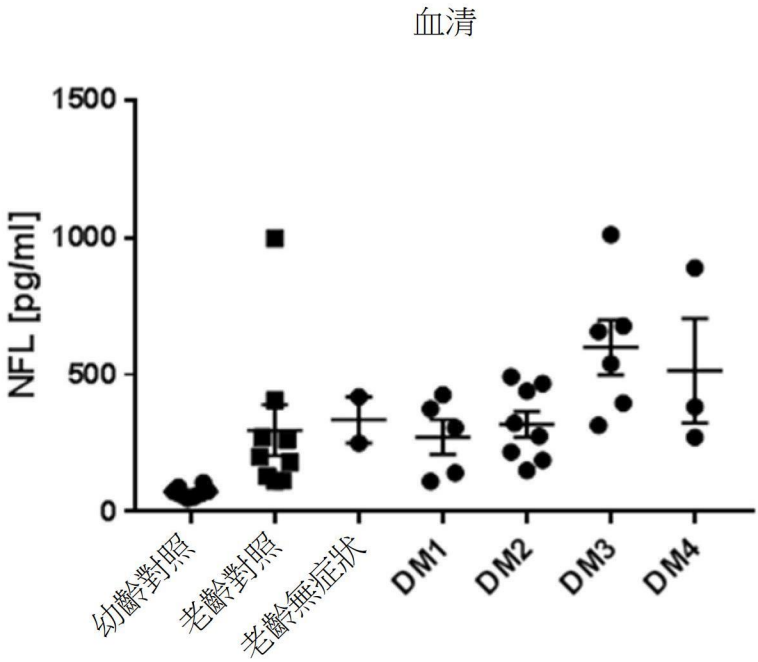
【圖3A】



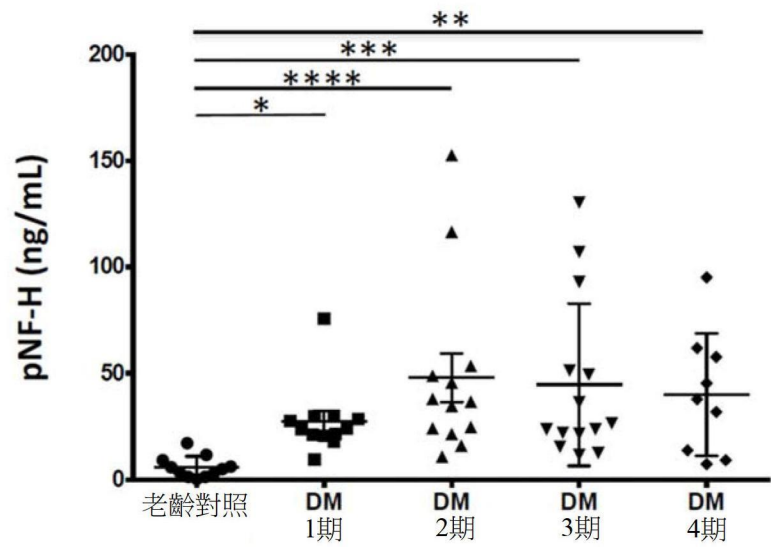
【圖3B】



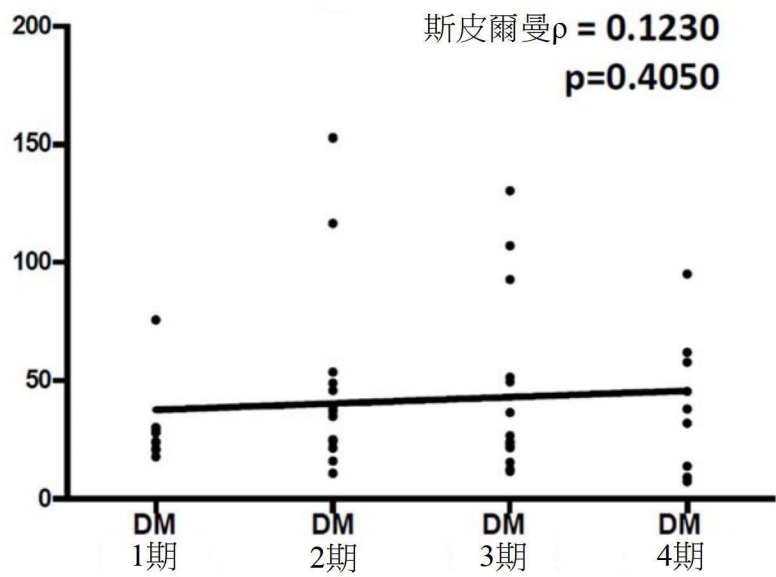
【圖4A】



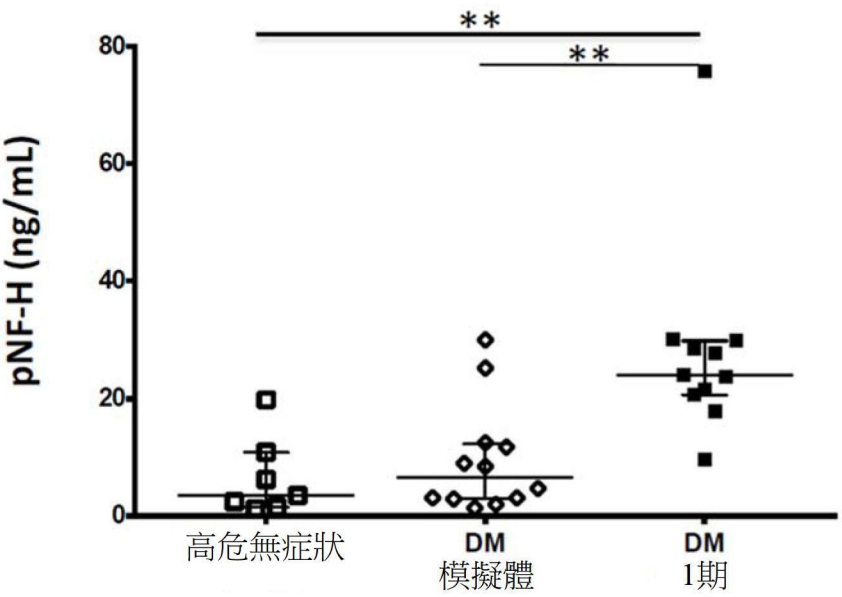
【圖4B】



【圖5A】



【圖5B】



【圖5C】