202227633

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202227633 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：110131628 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 08 月 26 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/86 (2006.01)* *C07K14/47 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P25/28 (2006.01)*

(30)優先權：2020/08/26 美國 63/070,639

(71)申請人：賓州大學委員會 (美國) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (US)
美國

(72)發明人：亨德勒 克里斯欽 HINDERER, CHRISTIAN (US)；米勒 尼羅 MILLER, NIMROD (IL)；威爾森 詹姆士M WILSON, JAMES M. (US)

(74)代理人：王彥評；黃政誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：29 項 圖式數：36 共 268 頁

(54)名稱

用於治療 GRN 相關的成年發病神經退化之重組腺相關病毒

(57)摘要

提供一種有用於治療人類患者的成年發病神經退化性疾病之治療方案，其包含投予具有 AAV1 殼體及含顆粒蛋白前體(GRN)編碼序列之載體基因體的重組腺相關病毒(AAV)載體。亦提供包含重組 AAV 載體之組成物及治療患者之成年發病神經退化性疾病的方法，該方法包含投予該重組 AAV 載體。

A therapeutic regimen useful for treatment of adult-onset neurodegenerative disease in a human patient comprising administration of a recombinant adeno-associated virus (AAV) vector having an AAV1 capsid and a vector genome comprising a progranulin (GRN)coding sequence is provided. Also provided are compositions comprising a recombinant AAV vector and methods of treating adult-onset neurodegenerative disease in a patient comprising administration of the recombinant AAV vector.

202227655
專利案號：110131628

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療 GRN 相關的成年發病神經退化之重組腺相關病毒

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR TREATMENT OF GRN-ASSOCIATED ADULT-ONSET NEURODEGENERATION

【中文】

提供一種有用於治療人類患者的成年發病神經退化性疾病之治療方案，其包含投予具有 AAV1 殼體及含顆粒蛋白前體(*GRN*)編碼序列之載體基因體的重組腺相關病毒(AAV)載體。亦提供包含重組 AAV 載體之組成物及治療患者之成年發病神經退化性疾病的方法，該方法包含投予該重組 AAV 載體。

【英文】

A therapeutic regimen useful for treatment of adult-onset neurodegenerative disease in a human patient comprising administration of a recombinant adeno-associated virus (AAV) vector having an AAV1 capsid and a vector genome comprising a progranulin *(GRN)* coding sequence is provided. Also provided are compositions comprising a recombinant AAV vector and methods of treating adult-onset neurodegenerative disease in a patient comprising administration of the recombinant AAV vector.

【指定代表圖】

無。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療 GRN 相關的成年發病神經退化之重組腺相關病毒

【英文發明名稱】

RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR TREATMENT OF GRN-ASSOCIATED ADULT-ONSET NEURODEGENERATION

【技術領域】

【0001】本發明係關於用於治療 GRN 相關的成年發病神經退化之重組腺相關病毒。

【先前技術】

【0002】額顳葉失智症(Frontotemporal dementia；FTD)係一種致命的神經退化性疾病，其通常於六、七十歲表現，具有於執行功能、行為、言語或語言理解能力的不足。此等症狀與影響額葉皮質及顳葉皮質之腦萎縮的特徵性型態有關。患者普遍表現一種進行性的病程，從症狀發作起平均存活 8 年(Coyle-Gilchrist IT, et al. Neurology. 2016；86(18):1736-43)。

【0003】FTD 為高度遺傳性，約 40%的患者具有陽性家族史(Rohrer JD, et al. Neurology. 2009；73(18):1451-6.)。在 5-10% FTD 患者中，可在編碼顆粒蛋白前體(progranulin；PGRN)(一種普遍存在的溶酶體蛋白質)的顆粒蛋白(granulin；GRN)基因中鑑定出致病性功能喪失型突變(Rohrer JD, et al. Neurology. 2009；73(18):1451-6)。GRN 突變攜帶者表現出迅速且廣泛的

腦萎縮，並可能存在其它神經退化性疾病的臨床特徵，例如進行性核上神經麻痺症(progressive supranuclear palsy)、皮質基底核症候群(corticobasal syndrome)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、路易氏體失智症(dementia with Lewy bodies)或阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)(Le Ber I, et al. Brain: a journal of neurology. 2008；131(3):732-46.)。GRN 突變以體染色體顯性方式遺傳，到 70 歲時外顯率大於 90%(Gass J, et al. Human molecular genetics. 2006；15(20):2988-3001)。雖然單一 GRN 突變的遺傳會導致 FTD 及其它遲發性神經退化性疾病，但具有同基因型組合之功能喪失型突變(homozygous loss-of-function mutations)的患者在生命中更早顯現出神經性類蠟脂褐質病(neuronal ceroid lipofuscinosis；NCL，巴登氏病(Batten disease)，特徵為自體螢光物質(脂褐質(lipofuscin))在神經元溶酶體中蓄積、快速的認知能力下降及視網膜退化(Smith Katherine R, et al. American Journal of Human Genetics. 2012；90(6):1102-7)。儘管 GRN 突變的異基因型組合(heterozygous)患者的症狀發作甚晚，但彼等最終在腦及視網膜中發展出與 NCL 患者相同的溶酶體貯積病灶，且同樣經歷進行性神經退化(Ward ME, et al. Science Translational Medicine. 2017；9(385)；Gotzl JK, et al. Acta neuropathologica. 2014；127(6):845-60)。最近發現顆粒蛋白前體藉由促進溶酶體酸化並充當溶酶體蛋白酶(包括細胞自溶酵素 D(cathepsin D)；

CTSD)的伴護蛋白(chaperone)，在溶酶體功能中扮演關鍵角色(Beel S, et al. Human molecular genetics. 2017 Aug 1；26(15):2850-2863；Tanaka Y, et al. Human molecular genetics. 2017；26(5):969-88)。編碼 CTSD 的基因中的突變亦導致 NCL 表型，支持與溶酶體蛋白酶活性不足有關的常見病理生理學(Siintola E, et al. Brain: a journal of neurology. 2006；129(Pt 6):1438-45)。

【0004】目前尚無針對由 GRN 單套缺失(GRN haploinsufficiency)引起的成年發病神經退化的疾病的改良療法。疾病管理包括目標在降低疾病相關的行為、認知及/或運動的症狀之支持性照護及藥品仿單標示外(off-label)治療(Tsai and Boxer, 2016, J Neurochem. 138 Suppl 1:211-21)。再者，以篩檢具有失智症家族史的個體，更多的患者可在早期被聯繫到，該篩檢目前有鑑於缺乏治療而並非必要的。因此，此疾病譜表示高度未滿足醫療需求的領域。

【0005】對於與 GRN 單套缺失相關的成年發病神經退化性疾病及其相關症狀的治療有所需求。

【發明內容】

【0006】於一態樣，本文提供一種有用於治療人類患者的成年發病神經退化性疾病之治療方案，其中該方案包含投予重組腺相關病毒(AAV)載體，該重組 AAV 載體具有 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(inverted terminal repeat；ITR)、顆粒蛋白前體(*GRN*)編碼序列及引導顆

粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，該投予包含單次劑量之腦大池內(intra-cisterna magna，ICM)注射，該單次劑量包含：(i)約 3.3 x 10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；(ii)約 1.1 x 10^{11} GC/每克腦質量；(iii)約 2.2 x 10^{11} GC/每克腦質量；或(iv)約 3.3 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。在某些具體實施例中，載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。在某些具體實施例中，載體基因體包含 SEQ ID NO：24。在某些具體實施例中，患者已被鑑定為具有 *GRN* 單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【0007】於一態樣，本文提供一種包含重組 AAV 載體之醫藥組成物，該重組 AAV 載體包含 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，其中該組成物被調配用於腦大池內(ICM)注射至有需要之人類患者，以投予以下劑量：(i)約 3.3 x 10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；(ii)約 1.1 x 10^{11} GC/每克腦質量；(iii)約 2.2 x 10^{11} GC/每克腦質量；或(iv)約 3.3 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序

列。在某些具體實施例中，載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。在某些具體實施例中，載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【0008】於一態樣，本文提供一種治療具有成年發病神經退化性疾病之患者的方法，該方法包含藉由 ICM 注射對該患者投予單次劑量之重組 AAV，其中該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV ITR、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，且其中該單次劑量為(i)約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；(ii)約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；(iii)約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或(iv)約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。在某些具體實施例中，載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。在某些具體實施例中，載體基因體包含 SEQ ID NO：24。在某些具體實施例中，患者已被鑑定為具有 *GRN* 單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【0009】於一態樣，本文提供一種單位劑型的醫藥組成物，其包含：含約 1.44×10^{13} 至約 4.33×10^{14} GC 之重組 AAV 載體之緩衝液，其中該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列。

【0010】在某些具體實施例中，顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。在某些具體實施例中，載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。在某些具體實施例中，載體基因體包含 SEQ ID NO：24。在某些具體實施例中，組成物被調配用於 ICM 注射。在某些具體實施例中，醫藥組成物用於治療具有成年發病神經退化性疾病之人類患者的用途。

【0011】由以下本發明的詳細描述，本發明之此等及其它態樣將顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0012】

圖 1 為 AAV1.hPGRN 載體基因體之線性圖譜。AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG(下文稱為 PBFT02)載體基因體包含在普遍存在的 CB7 啟動子控制下的人類 PGRN 編碼序列，其由 CMV IE 強化子及雞 β-肌動蛋白啟動子之間的雜合體所構成。縮寫：BA，β-肌動蛋白；bp，鹼基對；CMV IE，巨細胞病毒立即早期(cytomegalovirus immediate-early)；ITR，反向末端重複；PolyA，多腺核苷酸化；rBG，兔 β-球蛋白。

圖 2 為攜帶載體基因體之順式(cis)質體的線性載體圖譜。

圖 3A-圖 3D 提供 $GRN^{-/-}$小鼠大腦中脂褐質蓄積及己醣胺酶(hexosaminidase)活性的自然史。$GRN^{-/-}$小鼠

(KO)或 $GRN^{+/+}$(WT)對照組在指定的年齡(每個時間點n=10)犧牲。對未染色的大腦切片進行海馬迴、視丘及額葉皮質中的自體螢光物質(脂褐質)成像，並由三位盲審者對脂褐質沉積物進行定量並取平均值(圖 3A–圖 3C)。脂褐質計數以相對於感興趣區域的總面積表示。測定大腦樣品中的己醣胺酶活性，並以總蛋白濃度標準化(圖 3D)。數值表示為對野生型對照組的比率。

圖 4 顯示以表現人類 PGRN 的 AAV 載體或媒劑處理的 *Grn-/-*小鼠的 CFS 及腦中的人類 PGRN 表現。媒劑(PBS)處理的 WT 小鼠、媒劑處理的 *Grn-/-*小鼠及 AAVhu68.hRN(AAV)處理的 *Grn-/-*小鼠(ICV 劑量：1.00 x 10^{11} GC)在投劑後 65 天進行屍體剖檢(N=10/組)。藉由對 CSF(WT+PBS：N=5；*Grn–/–*+PBS：N=6；*Grn–/–*+AAV：N=9)及來自額葉皮層的腦組織(N=10/組)之 ELISA 而測量人類 PGRN 蛋白的濃度。將腦 PGRN 濃度標準化為從腦中單離的總蛋白質。ELISA 的 LOD 對於 CSF 為 1.25 ng/mL 且對於腦為 0.08 ng/mg。

圖 5 顯示以表現人類 PGRN 的 AAV 載體或媒劑處理的 *Grn-/-*小鼠的腦及血清中的己醣胺酶活性。媒劑(PBS)處理的 WT 小鼠、媒劑處理的 *Grn-/-*小鼠及 AAVhu68.hPGRN(AAV)處理的 *Grn-/-*小鼠(ICV 劑量：1.00 x 10^{11} GC)在投劑後 65 天進行屍體剖檢(N=10/組)。在來自額葉皮質的腦組織及血清中測量 HEX 活性(N=10/組，血清 *Grn–/–*+AAV 除外，其中 N=9)。腦 HEX 活性被標準化為從腦中單離的總蛋白質)。單因子變異數分

析(one-way ANOVA)，之後杜凱氏(Tukey)多重比較檢定，*p<0.05，***p<0.001，****p<0.0001。

圖6顯示以表現人類PGRN的AAV載體或媒劑處理的*Grn-/-*小鼠腦中脂褐質沉積物的定量。媒劑(PBS)處理的WT小鼠、媒劑處理的*Grn-/-*小鼠及AAVhu68.hPGRN(AAV)處理的*Grn-/-*小鼠(ICV劑量：1.00 x 10^{11} GC)在投劑後65天進行屍體剖檢(N=10/組)。海馬迴、視丘及額葉皮質未染色冷凍切片中的自體螢光的脂褐質沉積物由盲審者定量(WT+PBS：N=10；*Grn–/–*+PBS：N=8；*Grn–/–*+AAV：N=10)。脂褐質計數以每個高倍視野表示。單因子變異數分析，之後杜凱氏多重比較檢定，*p<0.05，***p<0.001，****p<0.0001。

圖7A-圖7C顯示藉由AAV媒介的PGRN表現，矯正老年$GRN^{-/-}$小鼠的腦小神經膠質細胞增生(brain microgliosis)。$GRN^{-/-}$小鼠(KO)或$GRN^{+/+}$(WT)對照組在7個月齡時以媒劑(PBS)或表現人類PGRN(10^{11} GC)的AAVhu68載體之單次ICV注射治療。在注射4個月後犧牲動物，並將腦切片對CD68染色。海馬迴、視丘及額葉皮質影像中的CD68陽性面積由盲審者使用ImageJ軟體定量。面積以每個高倍視野表示。單因子變異數分析，之後杜凱氏多重比較檢定，*p<0.05，**p<0.005，***p<0.001，****p<0.0001。

圖8顯示在ICM AAV投予後人類PGRN蛋白在NHP的CSF及血漿中的表現。成年NHP(N=2/組)以3.0x10^{13}GC的劑量接受單次ICM投予PBFT02、

AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40。在指定的研究日藉由ELISA測量CSF及血漿中的人類PGRN蛋白。虛線表示健康人類對照樣品中的平均正常PGRN濃度。正常人類對照CSF樣品與NHP樣品同時進行評估，而血漿的正常人類PGRN濃度來自已發表的文獻。AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的血漿分析未在第21天及第28天進行，因為與其它組相比，CSF中的PGRN表現水準較低。

圖9顯示在ICM AAV投予後，NHP的CSF及血清中的抗人類PGRN抗體。成年NHP(N=2/組)接受PBFT02或AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG的單次ICM投予，劑量為 3.0×10^{13} GC。在指定的研究日藉由ELISA測量CSF及血清中的抗人類PGRN抗體。對於AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG及AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40的抗人類PGRN抗體並未評估。

圖10顯示ICM AAV投予後NHP的體重。成年NHP(N=2/組)以 3.0×10^{13} GC的劑量接受單次ICM投予PBFT02、AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40。在指定的時間點測量體重。

圖11顯示ICM AAV遞送後在NHP中的CSF白血球計數。成年NHP(N=2/組)以 3.0×10^{13} GC的劑量接受單次ICM投予PBFT02、AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG)或AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40。

在指定的時間點評估 CSF 白血球計數。在所有分析的樣品中，鑑定的細胞主要是小淋巴細胞。

圖 12 顯示 ICM 投予 AAV1 及 AAVhu68 載體至非人類靈長類動物後的腦轉導水準。將成年恆河獼猴藉由 ICM 注射投予 3 x 10^{13} GC 的由雞 β 肌動蛋白啟動子表現 GFP 之 AAVhu68(n=2)或 AAV1(n=2)載體。投予載體後 28 天，對動物進行屍體剖檢，並藉由 GFP 免疫組織化學或免疫螢光對 GFP 及 DAPI 進行染色，分析大腦右半球五個區域的切片。以特定細胞類型的標記(NeuN、GFAP 及 Olig2)同時染色(costaining)可用於定量轉導的星狀細胞(astrocyte)及寡樹突細胞(oligodendrocyte)。對於所有採樣的腦區域計算各細胞類型的平均轉導。誤差槓=五個切片的 SEM。

圖 13 提供一張表格，其顯示 ICM 投予 AAV1(動物 ID 1826 及 2068)及 AAVhu68(動物 ID 1518 及 2076)載體至非人類靈長類動物後，神經元、星狀細胞及寡樹突細胞轉導的百分比。將成年恆河獼猴在研究第 0 天藉由 ICM 注射投予 3 x 10^{13} GC 的由雞 β 肌動蛋白啟動子表現 GFP 之 AAVhu68(n=2)或 AAV1(n=2)載體。投予載體後 28 天，對動物進行屍體剖檢，並藉由 GFP 免疫螢光對特定細胞類型(NeuN、GFAP 及 Olig2)同時染色，分析大腦右半球五個區域的切片。使用 HALO 軟體定量每種細胞類型的總細胞及每種類型的 GFP 表現細胞的數量。顯示各區域的各細胞類型轉導的百分比。對於某些動物，從區域 5 分析兩個切片。

圖 14 顯示投予 PBFT02 或媒劑的 *Grn-/-*小鼠的體重。*Grn*$^{-/-}$小鼠以 4.4 x 10^9 GC、1.3 x 10^{10} GC、4.4 x 10^{10} GC 或 1.3 x 10^{11} GC 的劑量 ICV 投予 PBFT02(N=15/組)。*Grn*$^{-/-}$小鼠及 WT 小鼠(N=15/組)ICV 投予媒劑(ITFFB)作為對照組。動物每週稱重。誤差槓代表 SEM。

圖 15 顯示在投予 PBFT02 或媒劑的 *Grn-/-*小鼠的腦脊髓液中的轉基因產物表現。*Grn*$^{-/-}$小鼠以 4.4 x 10^9 GC(N=12)、1.3 x 10^{10} GC(N=12)、4.4 x 10^{10} GC(N=13)或 1.3 x 10^{11} GC(N=11)的劑量 ICV 投予 PBFT02。*Grn*$^{-/-}$(N=7)及正常 WT 小鼠(N=11)ICV 投予媒劑(ITFFB)作為對照組。在第 90 天，收集 CSF 並藉由 ELISA 測量 PGRN 表現。誤差槓代表 SEM。對於 1:40 稀釋的 CSF，ELISA 分析的 LOD 為 1.25 ng/mL。

圖 16A-圖 16C 顯示在投予 PBFT02 或媒劑的 *Grn*$^{-/-}$小鼠之腦中的脂褐質沉積物定量。*Grn*$^{-/-}$小鼠以 4.4 x 10^9 GC(N=15)、1.3 x 10^{10} GC(N=14)、4.4 x 10^{10} GC(N=15)、1.3 x 10^{11} GC(N=15)的劑量 ICV 投予 PBFT02。*Grn*$^{-/-}$及野生型小鼠 ICV 投予媒劑(ITFFB)作為對照組(N=15/組)。在第 90 天，收集腦並冷凍切片。使用自動圖像分析軟體，定量在視丘(圖 16A)、皮質(圖 16B)及海馬迴(圖 16C)中的自體螢光的脂褐質沉積物。在第 1 天自未處理 *Grn*$^{-/-}$及野生型小鼠收集的腦被包括作為基線對照組。誤差槓代表 SEM。基於所有第 90 天的組別相對於媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$對照組之單因子變異數

分析、之後的杜凱氏多重比較檢定，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001 及 ****p<0.0001。

圖 17A-圖 17C 顯示投予 PBFT02 或媒劑的 *Grn*$^{-/-}$小鼠之腦中的 CD68 表現的定量。*Grn*$^{-/-}$小鼠以 4.4 x 10^9 GC(N=15)、1.3 x 10^{10} GC(N=14)、4.4 x 10^{10} GC(N=15)、1.3 x 10^{11} GC(N=15)之劑量 ICV 投予 PBFT02。*Grn*$^{-/-}$ 及野生型小鼠以 ICV 投予媒劑(ITFFB)作為對照組(N=15/組)。在第 90 天收集腦，用於 CD68 IHC。使用自動圖像分析軟體，將在視丘(圖 17A)、皮質(圖 17B)及海馬迴(圖 17C)中的 CD68 染色定量作為每個視野的陽性面積。在第 1 天自未處理之 *Grn*$^{-/-}$及野生型小鼠收集的腦被包括作為基線對照組。誤差槓代表 SEM。基於所有第 90 天的組別相對於媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$對照組之單因子變異數分析、之後的杜凱氏多重比較檢定，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001 及****p<0.0001。

圖 18 顯示在投予 PBFT02 或媒劑之 *Grn*$^{-/-}$小鼠腦中之己醣胺酶活性的定量。*Grn*$^{-/-}$小鼠以 4.4 x 10^9 GC(N=15)、1.3 x 10^{10} GC(N=13)、4.4 x 10^{10} GC(N=15)、1.3 x 10^{11} GC(N=15)之劑量 ICV 投予 PBFT02。將 *Grn*$^{-/-}$及野生型小鼠 ICV 投予媒劑(ITFFB)作為對照組(N=15/組)。在第 90 天，收集腦的第三額葉(主要是皮質組織)的腦樣品，並使用螢光基質測量 HEX 活性。來自第 1 天屍體剖檢的未處理的 *Grn*$^{-/-}$及野生型小鼠的腦組織溶胞產物被包括作為基線對照組。誤差槓代表 SEM。基於所有第 90 天的組別相對於媒劑處理的

Grn$^{-/-}$對照組之單因子變異數分析、之後的杜凱氏多重比較檢定，*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001及****p<0.0001。

圖19顯示投予PBFT02或媒劑的野生型小鼠的體重。將野生型小鼠ICV投予PBFT02(1.3 x 10^{11} GC [N=8/組])或媒劑(ITFFB；[N=4/組])。動物在基線(第-4天)及在投劑後每週稱重。將所有投予PBFT02(第2、4、6及8組)的小鼠合併用於分析，並將所有投予媒劑(第1、3、5及7組)的組合併用於分析。誤差槓代表SEM。

圖20顯示對野生型小鼠腦室內投予PBFT02後的載體生物分布。在PBFT02(1.3 x 10^{11} GC [N=8/組])或媒劑(TFFB；[N=4/組])的單次ICV投予後10、30、60及90天，從野生型小鼠屍體剖檢收集腦、心臟、肺臟、肝臟、脾臟、腎臟及骨骼肌(股四頭肌)。每條槓代表每μg DNA檢測到的平均載體基因體。誤差槓代表SEM。LOD為50 GC/μg DNA。

圖21顯示在投予PBFT02或媒劑的野生型小鼠的CNS中的轉基因產物表現。將野生型小鼠ICV投予PBFT02(1.3 x 10^{11} GC [N=8/組])或媒劑(ITFFB；[N=4/組])。在第10、30、60及90天收集CSF、腦及脊髓，並藉由ELISA測量人類PGRN表現。誤差槓代表SEM。基於非成對t檢定，*p<0.05，**p<0.01及****p<0.0001。

圖22顯示在投予PBFT02或媒劑的野生型小鼠血清中的轉基因產物表現。將野生型小鼠ICV投予

PBFT02(1.3 x 10^{11} GC [N=8/組])或媒劑(ITFFB；[N=4/組])。在第10、30、60及90天收集血清，並藉由ELISA測量人類PGRN表現。誤差槓代表SEM。對每個時間點進行非成對t檢定。

圖23A-圖23F顯示在投予PBFT02或媒劑的野生型小鼠的周邊器官中的轉基因產物表現。將野生型小鼠ICV投予PBFT02(1.3 x 10^{11} GC [N=8/組])或媒劑(ITFFB；[N=4/組])。在第10、30、60及90天，收集心臟(圖23A)、肝臟(圖23B)、脾(圖23C)、腎臟(圖23D)、股四頭肌(圖23E)及頸部淋巴節(圖23F)。藉由ELISA測量人類PGRN表現。誤差槓代表SEM。基於非成對t檢定，*$p<0.05$及**$p<0.01$。

圖24顯示來自健康NHP第二趾所記錄的典型正中神經SNAP的典型感覺神經動作電位波。感覺神經傳導速度係藉由將刺激陰極與第二趾處之記錄部位之間的距離除以起始潛伏期(onset latency)(即，刺激及SNAP起始之間的時間)而計算。SNAP振幅計算為SNAP起始與SNAP峰值的電壓差。

圖25顯示ICM投予PBFT02至NHP後的感覺神經動作電位。來自成年NHP在BL以及第28±3天及第90±5天的代表性SNAP波形，該NHP以3.0 x 10^{12} GC(低劑量)、1.0 x 10^{13} GC(中劑量)或3.0 x 10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的劑量接受單次ICM投予PBFT02。動物181323(第1組)、171229(第2組)、171311(第3組)及171246(第4組)分別在媒劑、低、中、高劑量組中所有

動物所獲得的神經傳導數據中為代表性的，除了以下之外：動物 171123(媒劑，第 1 組)及 180668(低劑量，第 2 組)，此等在第 90±5 天顯示單側 SNAP 振幅顯著降低；以及動物 171209(高劑量；第 4 組)，其在第 90±5 天顯示 SNAP 振幅雙側顯著降低。

圖 26A 及圖 26B 顯示 ICM 投予 PBFT02 後，NHP 中的 SNAP 振幅(圖 26A)及神經傳導速度(圖 26B)。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在 BL 以及第 28 天及第 90 天進行感覺神經傳導研究。顯示左右正中神經的 SNAP 振幅及傳導速度。

圖 27 顯示 ICM 投予 PBFT02 後 NHP 的體重。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在第 0、7、14、28、60 及 90 天監測體重。

圖 28 顯示 ICM 投予 PBFT02 或媒劑後 NHP 腦脊髓液中的白血球計數。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在第 0、7、14、28、60 及 90 天收集 CSF。將白血球定量為每 μl CSF 的白血球(WBC)數量。

圖 29 顯示 ICM 投予 PBFT02 後 NHP 中對殼體或轉基因的 IFN-γ T 細胞反應的總結。

圖 30 顯示 ICM 投予 PBFT02 至 NHP 後在 CSF 及血清中的載體藥物動力學。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在第 0、7、14 及 60 天收集 CSF。在第 0、7、14、28 及 60 天收集全血。藉由 TaqMan qPCR 定量載體基因體。

圖 31 顯示 ICM 投予 PBFT02 至 NHP 後尿液及糞便中的載體排出。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在基線及第 5、28、60 及 90 天收集尿液及糞便。藉由 TaqMan qPCR 定量載體基因體。

圖 32 顯示 ICM 投予 PBFT02 至 NHP 後在 NHP 的腦脊髓液及血清中的人類 PGRN 表現。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在第 0、7、14、28、60 及 90 天收集 CSF。在 BL 及第 14、28、60 及 90 天收集血清。藉由 ELISA 分析樣品以評估人類 PGRN 表現水準。

圖 33 顯示 ICM 投予 PBFT02 後 NHP 之腦脊髓液中的人類 PGRN 蛋白。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0×10^{12} GC(低劑量)、1.0×10^{13} GC(中劑量)或 3.0×10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。藉由 ELISA 分析第 14 天所收集的 CSF 以評估人類 PGRN 表現水準。

圖 34 顯示 ICM 投予 PBFT02 後，在 NHP 之 CSF 及血清中的抗人類 PGRN 抗體。成年 NHP 接受單次 ICM 投予媒劑(ITFFB；N=2/組)或劑量為 3.0 x 10^{12} GC(低劑量)、1.0 x 10^{13} GC(中劑量)或 3.0 x 10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)的 PBFT02。在第 0、7、14、28、60 及 90 天收集 CSF。在 BL 及第 14、28、60 及 90 天收集血清。藉由 ELISA 分析樣品以評估抗人類 PGRN 抗體水準。

圖 35 顯示 ICM 投予 PBFT02 至 NHP 後 90 天的載體生物分布。從接受單次 ICM 投予劑量為 3.0 x 10^{12} GC(低劑量)、1.0 x 10^{13} GC(中劑量)或 3.0 x 10^{13} GC(高劑量)(N=3/組)之 PBFT02 後 90 天的成年 NHP 屍體剖檢中收集指定的組織。亦從媒劑(ITFFB)處理的 NHP(N=2)中收集組織作為對照組。每個槓代表每 μg DNA 檢測到的平均載體基因體。誤差槓代表 SEM。LOD 為 50 GC/μg DNA。

PBFT02

圖 36A-圖 36C 顯示首次用於人體研究的事件時間表。

【實施方式】

【0013】提供一種包含重組 AAV 之醫藥組成物，該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及具有顆粒蛋白前體編碼序列之載體基因體。該醫藥組成物係有用於治療人類患者之成年發病神經退化性疾病(包括顆粒蛋白前體(*GRN*)相關額顳葉失智症(FTD))的方法及方案。

【0014】如本文中所使用，術語「AAV.hPGRN」或「rAAV.hPGRN」用於指稱重組腺相關病毒，其具有一其中含載體基因體的AAV殼體，該載體基因體包含在調節序列控制下的人類顆粒蛋白前體(*GRN*，亦為 *PGRN*)編碼序列。可指定特定的殼體類型，舉例而言，例如：AAV1.hPGRN，其係指具有 AAV1 殼體之重組 AAV；AAVhu68.hPGRN，其係指具有 AAVhu68 殼體之重組 AAV；AAV5.hPGRN 係指具有 AAV5 殼體之重組 AAV。

【0015】「重組 AAV」或「rAAV」為一種 DNA 酶抗性病毒顆粒，含有兩個元件：AAV 殼體、以及包裝在AAV殼體內的至少含有非 AAV編碼序列的載體基因體。除非另有說明，否則此術語可與短語「rAAV 載體」互換使用。該 rAAV 為一種「複製缺陷型病毒」或「病毒載體」，因為其缺少任何功能性 AAV rep 基因或功能性 AAV cap 基因且不能產生子代。在某些具體實施例中，唯一的 AAV 序列為 AAV 反向末端重複序列(ITR)，其通常位於載體基因體的 5’及 3’末端，以使位於 ITR 之間的基因及調節序列包裝在 AAV 殼體內。

【0016】如本文中所使用，「載體基因體」係指包裝在形成病毒顆粒的 rAAV 殼體內部的核酸序列。如此的核酸序列含有 AAV 反向末端重複序列(ITR)。在本文實施例中，載體基因體由 5’至 3’，最低限度含有 AAV 5’ ITR、編碼序列及 AAV 3’ ITR。可選擇來自 AAV2(與殼體之來源 AAV 不同)之 ITR、或除了全長以外的 ITR。在某些具體實施例中，ITR係來自與生產過程中提供 rep

功能的 AAV 相同的 AAV 來源或反式互補 AAV。再者，可使用其它 ITR。此外，載體基因體含有引導基因產物表現的調節序列。載體基因體的適當組件於本文中更詳細地討論。

【0017】

治療性蛋白質及編碼序列：

rAAV包括人類顆粒蛋白前體(hPGRN)蛋白質或其執行 hPGRN 的一或多種生物功能的變異體之編碼序列。此蛋白質之編碼序列被工程化至載體基因體內，以於中樞神經系統(CNS)中表現。

【0018】人類 PGRN1(hPGRN)最常以 GenBank NP_002078 的 593 個胺基酸序列表示特徵，其再現於 SEQ ID NO：1。此序列含有在位置 1 至 17 的訊息肽、與包含胺基酸 18 至約 593 之分泌性顆粒蛋白前體蛋白質或分泌性顆粒蛋白。此蛋白質可裂解成 8 條鏈：顆粒蛋白 1(aka 顆粒蛋白 G：約胺基酸 58 至約胺基酸 113)、顆粒蛋白 2(約胺基酸 123 至約 179)、顆粒蛋白 3(約胺基酸 206 至約胺基酸 261)、顆粒蛋白 4(約胺基酸 281 至約胺基酸 336)、顆粒蛋白 5(約胺基酸 364 至約胺基酸 417)、顆粒蛋白 6(約胺基酸 442 至約胺基酸 496)及顆粒蛋白 7(約胺基酸 518 至約胺基酸 573)；參照 SEQ ID NO：1 的編號。在某些具體實施例中，異源訊息肽可取代天然訊息肽。然而，其它具體實施例可包含顆粒蛋白前體與外源訊息肽(例如，人類 IL2 引導子(leader))。亦參見例如 www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia。

因此，考量含有顆粒蛋白前體及/或其片段的融合蛋白質。此類融合蛋白質可包含一或多種活性 GRN(例如，GRN 1、2、3、4、4、6 或 7)與彼此之不同的組合，或者一或多種此等肽可與全長 PGRN 或另一蛋白質或肽(例如，另一活性蛋白質或肽及/或對人類 PGRN 為外源之訊息肽)結合。

【0019】載體基因體被工程化以攜帶此蛋白質之編碼序列，並在人類細胞中表現蛋白質，特別是在中樞神經系統。在某些具體實施例中，該編碼序列可為天然序列，見於 GenBank：NM_002087.3，其再現於 SEQ ID NO：2。

【0020】在某些具體實施例中，編碼序列提供於 SEQ ID NO：3。某些其它具體實施例將包含與 SEQ ID NO：3 具有 95%至 99.9%或 100%同一性的編碼序列，包括彼等之間的值。在一些具體實施例中，為了更好的治療結果，將編碼序列進行密碼子最適化，例如，在哺乳動物細胞中增強表現。可在具有訊息(引導子)序列之全長顆粒蛋白前體的編碼序列上、在不具有訊息(引導子)序列的顆粒蛋白前體上、或在如本文所定義之融合蛋白質的編碼序列的長度上評估同一性。在某些具體實施例中，編碼序列提供於 SEQ ID NO：3。某些其它具體實施例將包含與 SEQ ID NO：4 具有 95%至低於 100%同一性的編碼序列。可在具有訊息(引導子)序列之全長顆粒蛋白前體的編碼序列上、在不具有訊息(引導子)序列的顆粒蛋白前體上、或在如本文所定義之融合蛋白質的編碼序列的長度上評估同一性。

【0021】適當地，此等編碼序列編碼全長顆粒蛋白前體。然而，其它具體實施例中，可包含活性顆粒蛋白鏈與異源訊息肽(例如，人類 IL2 引導子)。亦參見例如 www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia。

【0022】在某些具體實施例中，可使用人類 PGRN 之編碼序列(例如，SEQ ID NO：3 或 SEQ ID NO：4)或與其約 95%至 99.9%或 100%相同之序列的片段。此類片段可編碼活性人類 GRN(aa 18-593)，或者編碼包含具有活性人類 GRN 之異源訊息肽的融合肽。在某些具體實施例中，用於一或多種活性 GRN(例如，GRN1、2、3、4、4、6 或 7)之一或多種編碼序列可以與彼此之各種組合的方式而被包括於載體基因體中，或者一或多種此等肽可與全長 PGRN 或另一編碼序列組合。

【0023】不希望受到理論的束縛，據信在 CNS 的細胞子集(例如，室管膜細胞)中 AAV 媒介的 PGRN 表現提供分泌的蛋白質的儲存庫。分泌的 PGRN 蛋白質(及/或一或多種 GRN)被其它細胞經由分揀蛋白(sortilin)或甘露糖-6-磷酸(mannose-6-phosphate)受體攝入，隨後被運送至溶酶體。在某些具體實施例中，該分泌的蛋白質為顆粒蛋白前體。在某些具體實施例中，該分泌的蛋白質為顆粒蛋白。在某些具體實施例中，該分泌的蛋白質包括顆粒蛋白前體與顆粒蛋白之混合物。

【0024】在某些具體實施例中，除了顆粒蛋白前體編碼序列外，可包括另一非 AAV 編碼序列，例如，感興趣的肽、多肽、蛋白質、功能性 RNA 分子(例如，

miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。有用的基因產物可包括 miRNA。miRNA 及其它小干擾核酸經由目標 RNA 轉錄本裂解/降解或目標傳訊 RNA(mRNA)的轉譯抑制來調節基因表現。miRNA 係被自然地表現，通常作為最終 19-25 個非轉譯 RNA 產物。miRNA 通過與目標 mRNA 的 3'非轉譯區(UTR)之序列特異性的相互作用來展現其活性。此等內源表現的 miRNA 形成髮夾型前驅物(hairpin precursors)，隨後被加工成 miRNA 雙鏈體(miRNA duplex)，進而加工成「成熟的」單股 miRNA 分子。這種成熟的 miRNA 引導一種多蛋白質複合物 miRISC，其基於彼等之與成熟 miRNA 的互補性來辨識目標 mRNA 的靶位，例如在 3' UTR 區域。

【0025】在某些具體實施例中，表現匣(expression cassette)進一步包含一或多個抑制 hPGRN 在背根節(drg)中表現的 miRNA 標靶序列。在某些具體實施例中，該表現匣包含 drg 特異性 miRNA 標靶序列的至少兩個串接重複序列，其中該至少兩個串接重複序列包含至少一個第一 miRNA 標靶序列及至少一個第二 miRNA 標靶序列，此等可為相同或相異。在某些具體實施例中，該串接 miRNA 標靶序列為連續的或被 1 至 10 個核酸的間隔子(spacer)分隔開，其中該間隔子並非 miRNA 標靶序列。在某些具體實施例中，至少有二個 drg 特異性 miRNA 標靶序列位於 hPGRN 編碼序列 3'側。在某些具體實施例中，該至少兩個 drg 特異性 miRNA 串接重複序列的第一者起始於距離 hPGRN-編碼序列的 3'末端 20 個

核苷酸內。在某些具體實施例中，該至少兩個 drg 特異性 miRNA 串接重複序列的第一者起始於距離 hPGRN-編碼序列的 3’末端至少 100 個核苷酸內。在某些具體實施例中，該 miRNA 串接重複序列包含長度 200 至 1200 個核苷酸。在某些具體實施例中，至少有二個 drg 特異性 miRNA 標靶序列位於 hPGRN 編碼序列 5’ 處。在某些具體實施例中，至少二個 drg 特異性 miRNA 標靶序列位於 hPGRN 編碼序列之 5’及 3’側兩方。在某些具體實施例中，表現匣 mRNA 或 DNA 正股的至少第一及/或至少第二 miRNA 標靶序列的該 miRNA 標靶序列係選自 (i)AGTGAATTCTACCAGTGCCATA(miR183，SEQ ID NO：32)；(ii)AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(SEQ ID NO：33)；(iii)AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(SEQ ID NO：34)；及(iv)AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC(SEQ ID NO：35)。在某些具體實施例中，二個以上的連續 miRNA 標靶序列為連續的且未被間隔子分隔開。在某些具體實施例中，二個以上的 miRNA 標靶序列被間隔子分隔開且各間隔子獨立選自下列之一或多種：(A)GGAT；(B)CACGTG；或(C)GCATGC。在某些具體實施例中，位於 miRNA 標靶序列之間的間隔子可位於第一 miRNA 標靶序列 3’側及/或最後的 miRNA 標靶序列 5’ 側。在某些具體實施例中，miRNA 標靶序列之間的間隔子為相同的。參見 2020 年 2 月 12 日申請之國際專利申請號 PCT/US19/67872，其藉由引用併入本文。

【0026】

AAV1

來自分支群 F(Clade F)的 AAVhu68 可用於製造靶向並在 CNS 中表現 hPGRN 的載體。然而，未預期地觀察到，即使觀察到相當的血漿濃度，與 AAVhu68 相比，AAV1 媒介的 PGRN 遞送在 CNS 中提供了更好的 PGRN 表現。本案發明人等發現，rAAV1.PGRN 的鞘內遞送為本文所述療法的有吸引力的遞送途徑。因此，在特別理想的具體實施例中，選擇 AAV1 殼體。

【0027】在某些具體實施例中，提供一種組成物，其包含適於鞘內注射的水性液體及具有 AAV 殼體的 rAAV 系群(stock)，該殼體優先靶向室管膜細胞，其中 rAAV 進一步包含載體基因體，其具有用於遞送至中樞神經系統(CNS)的 PGRN 編碼序列。在某些具體實施例中，組成物被調配用於枕骨下注射至腦大池中(腦大池內)。在某些具體實施例中，經由電腦斷層掃描(computed tomography；CT)導引的 rAAV 注射來投予 rAAV。在某些具體實施例中，患者被投予單次劑量的組成物。

【0028】AAV1 殼體係指具有 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質的殼體。在特定具體實施例中，AAV1 殼體包含約 1:1:10 預定比例的 AAV vp1 蛋白質、AAV vp2 蛋白質及 AAV vp3 蛋白質組裝成 60 個總 vp 蛋白質的 T1 二十面體殼體。AAV1 殼體能夠包裝基因體序列以形成 AAV 顆粒(例如，重組 AAV，其中基

因體為載體基因體)。一般而言，編碼最長的 vp 蛋白質(即，VP1)的殼體核酸序列在製造具有 AAV1 殼體的 rAAV 的過程中反式(*trans*)表現，敘述於例如美國專利號 6,759,237、美國專利號 7,105,345、美國專利號 7,186,552、美國專利號 8,637,255 及美國專利號 9,567,607，此等藉由引用併入本文。

【0029】殼體編碼序列並不存在於最終組裝的 rAAV1.hPGRN 中。然而，如此的序列用於生產重組 AAV。在某些具體實施例中，AAV1 殼體編碼序列為編碼 SEQ ID NO：26 的全長 AAV1 VP1 蛋白質或其 VP2 或 VP3 區域的任何核酸序列。參見例如美國專利號 6,759,237、美國專利號 7,105,345、美國專利號 7,186,552、美國專利號 8,637,255 及美國專利號 9,567,607，此等藉由引用併入本文。在某些具體實施例中，AAV1 殼體編碼序列為 SEQ ID NO：25。在一些具體實施例中，AAV1 殼體為由 SEQ ID NO：25 編碼序列所生產且具有或不具有轉譯後修飾的蛋白質。然而，此編碼序列的變異體可被工程化及/或其它編碼序列可使用 AAV1 VP1、AAV1 VP2 及/或 AAV VP3 胺基酸序列反轉譯(backtranslated)成所需的表現系統。

【0030】在某些具體實施例中，包含重組 AAV1 之組成物具有殼體，其中 AAV1 含有高度脫醯胺化(N57、N383、N512 及 N718)的五個胺基酸，基於再現於 SEQ ID NO：26 的 AAV1 VP1 的初級序列之編號。

AAV1 修飾								
酵素		胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶	胰蛋白酶
%覆蓋率	N+1	97.6	84.2	92.4	87.4	90.4	85.2	88.9
N35+脫醯胺化	Q	9.5						
~N57+脫醯胺化	G	100.0	100.0	100.0	92.0	89.3	86.1	85.5
~N94+脫醯胺化	H				2.3	3.7	4.9	2.2
N113+脫醯胺化	L		5.6					
~N214+脫醯胺化	N				0.9	0.4	1.0	0.7
~N223+脫醯胺化	A	21.4		25.9				
N227+脫醯胺化	W	4.9		3.1				
~N253+脫醯胺化	H		29.7					
Q259+脫醯胺化	I	24.6		14.2				
~N269+脫醯胺化	D			21.6			5.2	
~N271+脫醯胺化	H	27.7						
N286+脫醯胺化	R	5.4		5.2				
~N302+脫醯胺化	**N**NN	43.7	48.6	18.8	12.4	28.7	16.3	11.9
~N303+脫醯胺化	N**N**N		50.8	19.3				
~N383+脫醯胺化	G	88.5	86.9	82.5	82.1	84.6	83.4	92.3
~N408+脫醯胺化	N	58.2	43.2	40.5	30.1	25.7	28.3	22.8
~N451+脫醯胺化	Q	20.5						
~Q452+脫醯胺化	S	1.7						
N477+脫醯胺化	W	4.4	3.1	39.7	1.2	1.3	1.1	1.8
~N496+脫醯胺化	**N**NN	1.1		69.9				
N512+脫醯胺化	G	93.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.3
N651+脫醯胺化	T	2.0	2.1	1.6	0.6			
N691+脫醯胺化	S			57.1				
~N704+脫醯胺化	Y		9.4					
N718+脫醯胺化	G	98.7	98.1	98.2	89.5	91.9	92.3	87.4

【0031】在某些具體實施例中，AAV1的特徵為一種VP同功型(VP isoforms)的異源性族群(heterogenous population)的殼體組成物，該VP同功型係如下表中所定義被脫醯胺化，基於殼體中VP蛋白質的總量(使用質譜法確定)。在某些具體實施例中，AAV殼體在一或多個下列位置、在以下所提供的範圍內進行修飾(使用質譜法確定)。殘基編號基於公開的AAV1序列，該序列於SEQ ID NO：26中再現。

表	
基於 VP1 編號的 AAV1 殼體位置	%
N35+脫醯胺化	1-15、5-10
~N57+脫醯胺化	65-90、70-95、80-95、75-100、80-100 或 90-100
N113+脫醯胺化	0-8
~N223+脫醯胺化	0-30、0、20-28
N227+脫醯胺化	0、1-5
~N253+脫醯胺化	0、1-35
Q259+脫醯胺化	0、10-25
~N269+脫醯胺化	0-25
~N271+脫醯胺化	0-25
N286+脫醯胺化	2-10
~N302+脫醯胺化	10-50
~N303+脫醯胺化	0-55
~N383+脫醯胺化	65-90、70-95、80-95、75-100、80-100 或 90-100
~N408+脫醯胺化	30-65
~N451+脫醯胺化	0-25
~Q452+脫醯胺化	0-5
N477+脫醯胺化	0-45
~N496+脫醯胺化	0-75
N512+脫醯胺化	75-100、80-100、90-100
N651+脫醯胺化	0-3
N691+脫醯胺化	0、1-60
~N704+脫醯胺化	0-10
N718+脫醯胺化	75-100、80-100、90-100

【0032】適當的修飾包括彼等描述於以上段落中標識為脫醯胺化調控者，其被併入本文中。在某些具體實施例中，一或多個下列位置或N之後的甘胺酸如本文所述被修飾。在某些具體實施例中，構築AAV1突變體，其中保留在57、383、512及/或718位置的N之後的甘胺酸(即保持未修飾的)。在某些具體實施例中，在前句中所指的四個位置的NG以天然序列被保留。殘基編號係基於公開的AAV1 VP1，其再現於SEQ ID NO：26。在某些具體實施例中，人工NG被導入不同於上表中所指的位置之一的位置。

【0033】

rAAV載體

如上所指，具有AAV1殼體的重組AAV為本文所述用於治療FTD的較佳載體。在某些具體實施例中，例如，在下列實例中(例如，AAVhu68或AAV5)，其它AAV殼體可用於產生rAAV。在某些具體實施例中，可選擇AAV1殼體，且包含顆粒蛋白前體(*GRN*)編碼序列之載體基因體的一或多個元件可被取代。

【0034】如本文中所使用，AAVhu68殼體係指一種如WO 2018/160582(藉由引用併入本文)所定義之殼體。如本文所述，rAAVhu68具有由AAVhu68核酸(例如，SEQ ID NO：30)表現殼體的生產系統中所生產的rAAVhu68殼體，該核酸編碼SEQ ID NO：31之vp1胺基酸序列及可選擇地編碼另外的核酸序列，例如編碼不含vp1及/或vp2獨特區域的vp 3蛋白質。使用單一核

酸序列 vp1 的生產所產生的 rAAVhu68 會生產 vp1 蛋白質、vp2 蛋白質及 vp3 蛋白質的異源性族群。更明確而言，AAVhu68 殼體含有 vp1 蛋白質內、vp2 蛋白質內及 vp3 蛋白質內的亞族群，此等亞族群具有來自 SEQ ID NO：31 中預期的胺基酸殘基的修飾。此等亞族群最低限度包括脫醯胺化天冬醯胺酸(N 或 Asn)殘基。例如，天冬醯胺酸-甘胺酸對中的天冬醯胺酸被高度脫醯胺化。在一具體實施例中，AAVhu68 vp1 核酸序列具有 SEQ ID NO：30 的序列或與其互補之股，例如，對應的 mRNA 或 tRNA。在某些具體實施例中，vp2 及/或 vp3 蛋白質可另外地或替代地從不同於 vp1 的核酸序列表現，例如以改變所選擇的表現系統中 vp 蛋白質的比例。某些具體實施例中，亦提供一種核酸序列，其編碼不具有 vp1 獨特區域(約 aa 1 至約 aa 137)及/或 vp2 獨特區域(約 aa 1 至約 aa 202)之 SEQ ID NO：31 的 AAVhu68 vp3 胺基酸序列(約 aa 203 至 736)或與其互補之股，對應的 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO：30 的約 nt 607 至約 nt 2211)。在某些具體實施例中，亦提供一種核酸序列，其編碼不具有 vp1 獨特區域(約 aa 1 至約 137)之 SEQ ID NO：31 的 AAVhu68 vp2 胺基酸序列(約 aa 138 至 736)或與其互補之股，對應的 mRNA 或 tRNA(SEQ ID NO：30 的 nt 411 至 2211)。

【0035】如本文中所使用，AAV5 殼體具有預期的 SEQ ID NO：29 的胺基酸序列。在某些具體實施例中，自 SEQ ID NO：28 的核酸序列表現 AAV5 殼體。

【0036】包裝於 AAV 殼體中並遞送到宿主細胞的基因體序列通常最低限度由轉基因及其調節序列以及 AAV 反向末端重複(ITR)所構成。單股 AAV 及自互補(self-complementary；sc)AAV 二者皆涵括在 rAAV 中。轉基因為一種與載體序列異源之核酸編碼序列，其編碼感興趣的多肽、蛋白質、功能性 RNA 分子(例如，miRNA、miRNA 抑制劑)或其它基因產物。核酸編碼序列係以允許轉基因在目標組織的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與調節組件可操作地連接。

【0037】載體的 AAV 序列通常包含順式作用(cis-acting)的 5'及 3'反向末端重複序列(參見例如 B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990))。ITR 序列長度約為 145 bp。儘管允許此等序列的某些程度上的微小修飾，但較佳為實質上編碼 ITR 的整個序列都使用在分子中。修飾此等 ITR 序列的能力係在本領域的技術範圍內(參見例如，如 Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)；及 K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532(1996)之文獻)。在本發明中使用的這種分子的實例為含有轉基因的「順式作用」質體，其中所選擇的轉基因序列及相關的調控元件兩側為 5'及 3' AAV ITR 序列。在一具體實施例中，ITR 來自與提供殼體的 AAV 不同的 AAV。在一具體實施例中，ITR 序列來自 AAV2。已描述被稱為 ΔITR 的 5' ITR 的縮減版本，其中刪除了 D 序列

(D-sequence)及末端分割位(terminal resolution site；trs)。在其它具體實施例中，使用全長 AAV 5'及 3' ITR。然而，可選擇來自其它 AAV 來源的 ITR。當 ITR 的來源係來自 AAV2，而 AAV 殼體係來自另一 AAV 來源時，所生成的載體可稱為假型化的(pseudotyped)。然而，此等元件的其它配置可為適當的。

【0038】除了上述所指的重組 AAV 載體的主要元件外，該載體亦包括必需的習知控制元件，其以允許轉基因在用質體載體轉染或用本發明所製造的病毒感染的細胞中轉錄、轉譯及/或表現的方式與轉基因可操作地連接。如本文中所使用，「可操作地連接的」序列包括與目的基因相鄰的表現控制序列、及反式或遠距離地作用以控制目的基因的表現控制序列。

【0039】調節控制元件通常含有啟動子序列作為表現控制序列的一部分，例如，位於所選擇的 5' ITR 序列及編碼序列之間。可使用組成型啟動子(constitutive promoter)、可調節的啟動子(regulatable promoter)[參見例如 WO 2011/126808 及 WO 2013/04943]、組織特異性啟動子或對生理提示有反應的啟動子可被用於本文所述的載體。啟動子可選自不同來源，例如，人類巨細胞病毒(CMV)立即早期強化子/啟動子、SV40 早期強化子/啟動子、JC 多瘤病毒(JC polymovirus)啟動子、髓鞘質鹼性蛋白(myelin basic protein；MBP)或神經膠質纖維酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein；GFAP)啟動子、單純泡疹病毒(HSV-1)潛伏相關啟動子(latency

associated promoter；LAP)、勞斯氏肉瘤病毒(rouse sarcoma virus；RSV)長末端重複(long terminal repeat；LTR)啟動子、神經元特異性啟動子(neuron-specific promoter；NSE)、血小板衍生生長因子(platelet derived growth factor；PDGF)啟動子、hSYN、黑色素濃縮激素(melanin-concentrating hormone；MCH)啟動子、CBA、基質金屬蛋白啟動子(matrix metalloprotein promoter；MPP)及雞 β-肌動蛋白啟動子。除了啟動子之外，載體可含有一或多種其它適當的轉錄起始、終止、強化子序列、有效的 RNA 加工訊息(例如剪接及多腺核苷酸化(polyA)訊息)；穩定細胞質 mRNA 的序列，例如 WPRE；增強轉譯效率的序列(即，Kozak 共通序列)；增強蛋白質穩定性的序列；及當需要時，增強所編碼的產物分泌的序列。適當的強化子之實例為 CMV 強化子。其它適當的強化子包括彼等適於所欲目標組織適應症者。在一具體實施例中，表現匣包含一或多種表現強化子。在一具體實施例中，表現匣含有二個以上的表現強化子。此等強化子可相同或可彼此相異。例如，強化子可包括 CMV 立即早期強化子。此強化子可能以位置彼此相鄰的兩個拷貝的方式存在。或者，強化子的雙重拷貝可被一或多個序列分開。在另外的具體實施例中，表現匣進一步含有內含子，例如，雞 β-肌動蛋白內含子。其它適當的內含子包括技術領域中已知者，舉例而言，例如 WO 2011/126808 中所述者。適當的 polyA 序列之實例包括例如：SV40、SV50、牛生長激素(bovine

growth hormone；bGH)、人類生長激素及合成的polyA。可選擇地，可選擇一或多種序列以穩定mRNA。此種序列的實例為經修飾之 WPRE 序列，其可被工程化於polyA序列的上游及編碼序列之下游[參見例如，MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619]。

【0040】在一具體實施例中，載體基因體包含：AAV 5’ ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、人類 PGRN 或包含其之融合蛋白質的編碼序列、poly A 及 AAV 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體包含：AAV 5’ ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、人類 PGRN 或包含其之融合蛋白質的編碼序列、poly A 及 AAV 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體包含：AAV 5’ ITR、啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、hPGRN編碼序列、poly A 及 AAV 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體包含：AAV2 5’ ITR、EF1a啟動子、可選擇的強化子、可選擇的啟動子、hPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體為 AAV2 5’ ITR、UbC 啟動子、可選擇的強化子、可選擇的內含子、hPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體為 AAV2 5’ ITR、CB7 啟動子、內含子、hPGRN、SV40 poly A 及 AAV2 3’ ITR。在某些具體實施例中，載體基因體為 AAV2 5’ ITR、CB7 啟動子、內含子、hPGRN、兔 β 球蛋白 poly A 及 AAV2 3’ ITR。參見例如

SEQ ID NO：22(EF1a.hPGRN.SV40)、SEQ ID NO：23(UbC.PI.hPGRN.SV40)或SEQ ID NO：24(CB7.CI.hPGRN1.rBG)。hPGRN編碼序列係選自本說明書中所定義者。參見例如SEQ ID NO：3或與其95%至99.9%相同之序列、或者SEQ ID NO：4或與其95%至99.9%相同之序列、或者如本文所定義之此等之片段。以下提供實施例中所使用之載體元件的說明性序列，例如，於SEQ ID NO：6(兔球蛋白polyA)、AAV ITR(SEQ ID NO：7及8)、人類CMV IE啟動子(SEQ ID NO：9)、CB啟動子(SEQ ID NO：10)、嵌合內含子(SEQ ID NO：11)、UbC啟動子(SEQ ID NO：12)、EF-1a啟動子(SEQ ID NO：17)、內含子(SEQ ID NO：13)及SV40晚期poly A(SEQ ID NO：14)。對於本發明的某些具體實施例，可選擇載體基因體的其它元件或在此等序列上的改變用於載體基因體。

【0041】

載體生產

為了用於生產AAV病毒載體(例如，重組AAV)，可將表現匣攜帶在遞送至包裝宿主細胞(packaging host cell)的任何適當的載體(例如質體)上。於本發明中有用的質體可被工程化，從而使其適於在原核細胞、昆蟲細胞、哺乳動物細胞等活體外複製及包裝。適當的轉染技術及包裝宿主細胞為本技術領域中具有通常知識者已知及/或可容易地設計。

【0042】產生及單離適於用作載體之 AAV 的方法為技術領域中已知。通常參見例如 Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145；Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733；及下文引用之參考文獻，此等各藉由引用將其整體併入本文。為了將轉基因包裝到病毒粒子(virion)中，在與含有表現匣的核酸分子相同的構築體中，ITR 為順式中唯一所需的 AAV 組件。cap 及 rep 基因可以反式的方式提供。

【0043】在一具體實施例中，本文所述之表現匣被工程化至遺傳元件(例如，穿梭質體(shuttle plasmid))中，將攜帶在其上的免疫球蛋白構築體序列轉移至包裝宿主細胞中以生產病毒載體。在一具體實施例中，所選擇的遺傳元件可藉由任何適當方法遞送至 AAV 包裝細胞，包括轉染、電穿孔、微脂體遞送、膜融合技術、高速 DNA 包覆小粒(high velocity DNA-coated pellet)、病毒感染及原生質體融合。穩定的 AAV 包裝細胞亦可被製造。或者，表現匣可用於產生 AAV 以外的病毒載體，或用於活體外抗體混合物之製造。用於製造此類構築體的方法為核酸操作且包括遺傳工程、重組工程及合成技術的技術人員已知的。參見例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。

【0044】術語「AAV 中間體」或「AAV 載體中間體」係指一種組裝的 rAAV 殼體，其缺少包裝在其中的所欲基因體序列。此等亦可稱為「空(empty)」殼體。此類殼體可不含表現匣的可檢測基因體序列，或僅含有不足以達到基因產物表現的部分包裝的基因體序列。此等空殼體對於將目的基因轉移到宿主細胞係沒有功能的。

【0045】本文所述之重組腺相關病毒(AAV)可使用已知的技術產生。參見例如 WO 2003/042397；WO 2005/033321、WO 2006/110689；US 7588772 B2。此類方法涉及培養含有編碼 AAV 殼體蛋白質之核酸序列的宿主細胞；功能性 rep 基因；最低限度由 AAV 反向末端重複(ITR)及轉基因所構成的表現匣；及足夠的輔助功能，以允許將表現匣包裝至 AAV 殼體蛋白質中。產生殼體的方法、其所用之編碼序列以及製造 rAAV 病毒載體的方法已被描述，參見例如 Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)及 US 2013/0045186A1。

【0046】在一具體實施例中，提供有用於產生重組 AAV 的生產細胞培養物。此類細胞培養物含有在宿主細胞中表現 AAV 殼體蛋白質的核酸；適於包裝至 AAV 殼體中的核酸分子，例如含有 AAV ITR 及編碼基因產物的非 AAV 核酸序列的載體基因體，該非 AAV 核酸序列可操作連接至引導產物在宿主細胞中表現的序列；及足夠的 AAV rep 功能及腺病毒輔助功能，以允許將核酸分子包裝至重組 AAV 殼體中。在一具體實施例中，細胞培養

物係由哺乳動物細胞(例如人類胚腎 293 細胞等)或昆蟲細胞(例如桿狀病毒(baculovirus))所構成。

【0047】通常，rep 功能來自於與提供位於載體基因體兩側之 ITR 的 AAV 相同的 AAV 來源。在本文實施例中，選擇 AAV2 ITR 並使用 AAV2 rep。編碼序列再現於 SEQ ID NO：27。可選擇地，可選擇其它 rep 序列或另一 rep 來源(及可選擇地另一 ITR 來源)。例如，rep 可為但不限於 AAV1 rep 蛋白質、AAV2 rep 蛋白質；或 rep 78、rep 68、rep 52、rep 40、rep68/78 及 rep40/52；或其片段；或另一來源。可選擇地，於細胞培養物中 rep 及 cap 序列在相同遺傳元件上。在 rep 序列及 cap 基因之間可存在間隔子。此等 AAV 或突變體 AAV 殼體序列中的任何一種可在引導其在宿主細胞中表現的外源調節控制序列的控制下。

【0048】在一具體實施例中，細胞在合適的細胞培養(例如，HEK 293)細胞中製造，製造本文所述之基因療法載體的方法包括技術領域中熟知的方法，例如產生用於製造基因療法載體的質體 DNA、產生載體及純化載體。在一些具體實施例中，基因療法載體為 AAV 載體，且所產生的質體為編碼 AAV 基因體及目的基因的 AAV 順式質體、含有 AAV rep 及 cap 基因的 AAV 反式質體、及腺病毒輔助質體。載體產生方法可包括以下方法步驟：例如開始細胞培養、細胞繼代、細胞接種、以質體 DNA 轉染細胞、將轉染後培養基更換為無血清培養基、以及收穫含有載體的細胞及培養基。

【0049】在某些具體實施例中，用於 rAAV.hPGRN 的製造方法涉及以質體 DNA 來短暫轉染(transient transfection)HEK293 細胞。在 PALL iCELLis 生物反應器中藉由 HEK293 細胞之 PEI 媒介的三重轉染，而製造單一批次或多批次。在可能的情況下，在可拋棄式、封閉式生物處理系統中，藉由澄清、TFF、親和性層析及陰離子交換層析依次純化所收穫的 AAV 材料。

【0050】所收穫的含有載體之細胞及培養基在本文中係指粗製細胞收穫物。在另一系統中，藉由以基於桿狀病毒載體感染將基因療法載體導入昆蟲細胞中。關於此等生產系統的綜述，通常參見例如 Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929，其各自的內容藉由引用整體併入本文。製造及使用此等及其它 AAV 生產系統的方法亦敘述於下列美國專利案中，其各自內容藉由引用整體併入本文：5,139,941；5,741,683；6,057,152；6,204,059；6,268,213；6,491,907；6,660,514；6,951,753；7,094,604；7,172,893；7,201,898；7,229,823；及 7,439,065，此等藉由引用併入本文。

【0051】之後，粗製細胞收穫物可施以額外方法步驟，例如載體收穫物的濃縮、載體收穫物的透析過濾(diafiltration)、載體收穫物的微射流體法(microfluidization)、載體收穫物的核酸酶消化、微射流體化中間體的過濾、藉由層析之粗製物純化、藉由超高

速離心的粗製物純化、藉由切向流過濾的緩衝液交換、及/或調配及過濾以製備大量載體。

【0052】使用高鹽濃度下的兩步驟親和性層析純化然後使用陰離子交換樹脂層析以純化載體藥品並除去空殼體。此等方法更詳細描述於2016年12月9日申請之國際專利申請號PCT/US2016/065970，其藉由引用併入本文。關於AAV8的純化方法，2016年12月9日申請之國際專利申請號PCT/US2016/065976；及關於rh10，2016年12月9日申請之國際專利申請號PCT/US16/66013，標題為「Scalable Purification Method for AAVrh10」，亦申請於2015年12月11日；及關於AAV1，2016年12月9日申請之國際專利申請號PCT/US2016/065974；關於「Scalable Purification Method for AAV1」，申請於2015年12月11日，此等全部藉由引用併入本文中。

【0053】為了計算空顆粒及完整(full)顆粒含量，將所選擇的樣品的VP3帶體積(band volume)(例如，在本文實施例中，碘克沙醇(iodixanol)梯度純化的製劑，其中GC#=顆粒#)相對於裝載的GC顆粒作圖。將所產生的線性方程式(y=mx+c)用於計算測試製品峰的帶體積中的顆粒數。然後將每20 μL裝載的顆粒數(pt)乘以50，得到顆粒(pt)/mL。Pt/mL除以GC/mL得到顆粒對基因體拷貝數的比率(pt/GC)。Pt/mL–GC/mL得到空pt/mL。空pt/mL除以pt/mL並x 100得到空顆粒的百分比。

【0054】一般而言，用於分析空殼體及具有包裝的基因體之AAV載體顆粒的方法為技術領域中已知的。參見例如 Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330；Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128。為了測試變性殼體，該方法包括使經處理的 AAV 系群進行 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳，其由能夠分離三種殼體蛋白質的任何凝膠組成，例如，在緩衝液中含有 3-8% Tris-乙酸鹽的梯度凝膠，然後運行凝膠直至樣品材料分離，並將凝膠印漬到尼龍或硝化纖維素膜上，較佳為尼龍。然後使用抗 AAV 殼體抗體作為與變性殼體蛋白質結合的初級抗體，較佳為抗 AAV 殼體單株抗體，最佳為 B1 抗 AAV-2 單株抗體 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293)。然後使用二級抗體，一種與初級抗體結合的抗體並含有用於檢測與初級抗體的結合之手段，更佳為含有與其共價結合之檢測分子的抗 IgG 抗體，最佳為與山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase) 共價連接的綿羊抗小鼠 IgG 抗體。將用於檢測結合的方法用於半定量地測定初級及二級抗體之間的結合，較佳為能夠檢測放射性同位素發射、電磁輻射或比色變化的檢測方法，最佳為化學發光檢測套組。例如，對於 SDS-PAGE，來自管柱流份的樣品可被取出並在含有還原劑 (例如 DTT) 的 SDS-PAGE 裝載緩衝液 (loading buffer) 中加熱，並在預鑄的梯度聚丙烯醯胺凝膠 (例如 Novex) 上分離殼體蛋白質。可使用 SilverXpress (Invitrogen，CA)，根據製造商的說明書進行銀染色，或者其它適當的染色方法，即，

SYPRO ruby 或考馬斯(Coomassie)染色。在一具體實施例中，可藉由定量即時 PCR(Q-PCR)測量管柱流份中 AAV 載體基因體(vg)的濃度。將樣品稀釋並用 DNA 酶 I(或另一適當核酸酶)消化以除去外源 DNA。在核酸酶去活化後，將樣品進一步稀釋並使用引子及對引子之間的 DNA 序列具有特異性的 TaqMan™ 螢光探針進行擴增。在 Applied Biosystems Prism 7700 序列檢測系統上測量各樣品達到定義的螢光水準所需的循環數(閾值循環，Ct)。將含有與 AAV 載體中所含序列之相同序列的質體 DNA 用於在 Q-PCR 反應中產生標準曲線。從樣品獲得的循環閾值(Ct)數值用於藉由將其相對於質體標準曲線的 Ct 值進行標準化來確定載體基因體效價。亦可使用基於數位 PCR 的終點分析(End-point assay)。

【0055】於一態樣，使用最適化的 q-PCR 方法，其利用廣效絲胺酸蛋白酶，例如蛋白酶 K(例如從 Qiagen 購得)。更具體而言，最適化的 qPCR 基因體效價分析與標準分析相似，除了在 DNA 酶 I 消化之後，將樣品以蛋白酶 K 緩衝液稀釋並以蛋白酶 K 處理，然後加熱去活化。適當地，將樣品以等量於樣品大小的蛋白酶 K 緩衝液稀釋。蛋白酶 K 緩衝液可濃縮至 2 倍或更高。通常，蛋白酶 K 處理約為 0.2 mg/mL，但可在 0.1 mg/mL 至約 1 mg/mL 之間變化。處理步驟通常在約 55℃下進行約 15 分鐘，但可在較低溫度(例如，約 37℃至約 50℃)下進行較長一段時間(例如，約 20 分鐘至約 30 分鐘)，或者在較高溫度(例如，高至約 60℃)下進行較短一段時間(例

如，約 5 至 10 分鐘)。類似地，加熱去活化通常在約95℃下約 15 分鐘，但溫度可降低(例如，約 70℃至約90℃)並延長時間(例如，約 20 分鐘至約 30 分鐘)。然後將樣品稀釋(例如，1000 倍)並如標準分析中所述進行TaqMan 分析。

【0056】另外或可替代地，可使用微滴式數位PCR(ddPCR)。例如，藉由 ddPCR 確定單股及自互補AAV 載體基因體效價的方法已被敘述。參見例如 M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr；25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14。

【0057】簡而言之，用於分離具有經包裝之基因體序列的 rAAV 顆粒與缺少基因體的 AAV 中間體的方法涉及對包含重組 AAV 病毒顆粒及 AAV 殼體中間體的懸浮液進行快速表現液相層析(fast performance liquid chromatography)，其中 AAV 病毒顆粒及 AAV 中間體係與在高 pH 平衡的強陰離子交換樹脂結合，並進行鹽度梯度，同時監測洗提液在約 260 及約 280 下的紫外線吸光度。pH 可根據所選擇之 AAV 調整。參見例如 WO 2017/160360(AAV9)、WO2017/100704(AAVrh10)、WO 2017/100676(例如，AAV8)及 WO 2017/100674(AAV1)，此等藉由引用併入本文。在此方法中，當 A260/A280 的比率達到轉折點時，自洗提的流份中收集 AAV 完整殼體。在一實例中，關於親和性層析步驟，可將透析過濾的產物應用於有效捕獲 AAV2 血清型的 Capture Select™

Poros-AAV2/9 親和性樹脂(Life Technologies)。在此等離子條件下，顯著百分比的殘留細胞 DNA 及蛋白質流過管柱，而 AAV 顆粒被有效捕獲。

【0058】

組成物

本文提供含有至少一種 rAAV.hPGRN 系群(例如 rAAV 系群)及可選擇的載劑、賦形劑及/或防腐劑的組成物。

【0059】如本文所用，rAAV 的「系群(stock)」係指 rAAV 族群。儘管由於脫醯胺化作用而彼等之殼體蛋白質存在異質性，但預計系群中的 rAAV 共有相同的載體基因體。系群可包括具有殼體的 rAAV，該殼體具有例如所選擇之 AAV 殼體蛋白質及所選擇之生產系統的異質性脫醯胺化型態特徵。系群可從單一生產系統生產或從生產系統的多次運行中儲集。可選擇多種生產系統，包括但不限於彼等本文所述者。

【0060】在某些具體實施例中，組成物包含一種適用於治療顆粒蛋白前體相關額顳葉失智症(FTD)的重組 AAV(rAAV)的病毒系群，該 rAAV 包含：(a)腺相關病毒 1 殼體；及(b)包裝在 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及引導顆粒蛋白前體表現之調節序列。在某些具體實施例中，該載體基因體包含啟動子、強化子、內含子、人類 PGRN 編碼序列及多腺核苷酸化訊息。在某些具體實施例中，內含子由雞 β 肌動蛋白剪接供給體及

兔β剪接接受體(rabbit β splice acceptor)元件所組成。在某些具體實施例中，載體基因體進一步包含 AAV2 5' ITR 及 AAV2 3' ITR，此等位在載體基因體的所有元件的兩側。

【0061】較佳地懸浮於生理相容性載劑中的 rAAV.hPGRN 可投予至人類或非人類哺乳動物患者。在某些具體實施例中，用於投予至人類患者，rAAV 被適合地懸浮在含有生理鹽水、界面活性劑及生理相容性鹽或鹽類混合物的水溶液中。適當地，將調配物調整至生理上可接受的 pH，例如範圍在 pH 6 至 9、或 pH 6.5 至 7.5、pH 7.0 至 7.7 或 pH 7.2 至 7.8。由於腦脊髓液的 pH 為約 7.28 至約 7.32、或 pH 為 7.2 至 7.4，對於鞘內遞送，可能需要在此 pH 範圍內；而對於靜脈內遞送，可能需要 pH 約 6.8 至約 7.2。然而，可選擇最寬範圍及此等子範圍內的其它 pH 用於其它遞送途徑。

【0062】在某些具體實施例中，調配物可含有不包含碳酸氫鈉的緩衝生理鹽水溶液。此類調配物可含有緩衝生理鹽水溶液，該緩衝生理鹽水溶液在水中包含磷酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂及其混合物中一或多種，例如哈佛氏緩衝液(Harvard's buffer)。水溶液可進一步含有 Kolliphor® P188，一種從 BASF 購得的泊洛沙姆(poloxamer)，其先前以商標名 Lutrol® F68 販售。水溶液可具有 pH 7.2 或 pH 7.4。

【0063】在另一具體實施例中，調配物可含有緩衝生理鹽水溶液，該緩衝生理鹽水溶液包含 1 mM 磷酸鈉

(Na_3PO_4)、150 mM 氯化鈉(NaCl)、3 mM 氯化鉀(KCl)、1.4 mM 氯化鈣($CaCl_2$)、0.8 mM 氯化鎂($MgCl_2$)及 0.001% Kolliphor®188。參見例如 harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html。在某些具體實施例中，較佳為哈佛氏緩衝液。

【0064】在其它具體實施例中，調配物可含有一或多種滲透增強劑。適當的滲透增強劑之實例可包括例如：甘露醇、甘膽酸鈉、牛磺膽酸鈉、脫氧膽酸鈉、水楊酸鈉、辛酸鈉、癸酸鈉、月桂基硫酸鈉、聚氧乙烯-9-月桂基醚或 EDTA。

【0065】在另一具體實施例中，組成物包括載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。鑑於轉移病毒所針對的適應症，本技術領域中具有通常知識者可容易地選擇適當的載劑。例如，一種適當的載劑包括生理鹽水，其可用多種緩衝溶液(例如磷酸鹽緩衝生理鹽水)配製。其它例示性載劑包括無菌生理鹽水、乳糖、蔗糖、磷酸鈣、明膠、葡聚糖、瓊脂、果膠、花生油、芝麻油及水。緩衝劑/載劑應包括防止 rAAV 黏附到輸液管上，但在活體內不干擾 rAAV 結合活性的成分。

【0066】可選擇地，除了 rAAV 及載劑之外，組成物亦可含有其它習知醫藥成分，例如防腐劑或化學穩定劑。適當的例示性防腐劑包括氯丁醇、山梨酸鉀、山梨酸、二氧化硫、沒食子酸丙酯、對羥基苯甲酸酯類(parabens)、乙基香草醛、甘油、苯酚及對氯苯酚。適當的化學穩定劑包括明膠及白蛋白。

【0067】如本文中所使用，「載劑」包括任何及所有的溶劑、分散介質、媒劑、塗料、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體等。此類用於醫藥活性物質的介質及試劑的用途為技術領域中所熟知的。補充活性成分亦可摻入組成物中。短語「醫藥上可接受的」係指當投予至宿主時不會產生過敏或類似不良反應的分子實體及組成物。遞送媒劑，例如微脂體、奈米膠囊、微粒、微球、脂質顆粒、囊泡等可用於將本發明之組成物導入適當的宿主細胞中。特別是，可將遞送轉基因的 rAAV 載體包封在脂質顆粒、微脂體、囊泡、奈米球或奈米顆粒等之中而調配用於遞送。

【0068】在一具體實施例中，組成物包括適於遞送至受試者的最終調配物，例如，為緩衝至生理相容性 pH 及鹽濃度的水性液體懸浮劑。可選擇地，一或多種界面活性劑可存在於調配物中。在另一具體實施例中，組成物可作為濃縮物輸送，該濃縮物係被稀釋而投予至受試者。在另一具體實施例中，組成物可被冷凍乾燥並在投予時復原(reconstituted)。

【0069】適當的界面活性劑或界面活性劑之組合可選自無毒的非離子界面活性劑之中。在一具體實施例中，選擇末端為一級羥基的雙官能嵌段共聚物界面活性劑，例如 Pluronic® F68 [BASF]，也稱為泊洛沙姆 188，其具有中性 pH，平均分子量為 8400。可選擇其它界面活性劑及其它泊洛沙姆，即由兩側為兩個聚氧乙烯(聚

(環氧乙烷))親水鏈的聚氧丙烯(聚(環氧丙烷))中央疏水鏈所構成的非離子三嵌段共聚物、SOLUTOL HS 15(聚乙烯二醇(Macrogol)-15 羥基硬脂酸酯)、LABRASOL(聚氧基辛酸甘油酯(Polyoxy capryllic glyceride))、聚氧基10油基醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯)、乙醇及聚乙二醇。在一具體實施例中，調配物含有泊洛沙姆。此等共聚物通常用字母「P」(用於泊洛沙姆)跟三個數字命名：前兩個數字 x100 給予聚氧丙烯核心的近似分子量，最後一個數字 x10 給予聚氧乙烯含量百分比。在一具體實施例中，選擇泊洛沙姆 188。界面活性劑可以懸浮液的高至約 0.0005%至約 0.001%的量存在。

【0070】以足夠的量將載體投予至轉染細胞並提供足夠水準的基因轉移及表現，以提供治療益處而沒有不適當的副作用，或者具有醫學上可接受的生理作用，此可由醫學領域中具有通常知識者確定。可選擇地，可使用鞘內投予以外的途徑，舉例而言，例如直接遞送至所欲之器官(例如，肝臟(可選擇地經由肝動脈)、肺臟、心臟、眼睛、腎臟)、口服、吸入、鼻內、鞘內、氣管內、動脈內、眼內、靜脈內、肌內、皮下、皮內及其它腸胃外投予途徑。若需要，可組合投予途徑。

【0071】病毒載體的劑量可主要取決於例如所欲治療的病況、患者的年齡、體重及健康等因素，因此可能因患者而異。例如，病毒載體的治療有效人類劑量範圍通常為約 25 至約 1000 微升至約 100 mL 的含有濃度約 $1x10^9$ 至 $1x10^{16}$ 個基因體病毒載體的溶液(治療平均體重

70 公斤的受試者)，包括該範圍內的所有整數或分數量，並對於人類患者較佳為 $1.0x10^{12}$ GC 至 $1.0x10^{14}$ GC。在一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{9}$、$2x10^{9}$、$3x10^{9}$、$4x10^{9}$、$5x10^{9}$、$6x10^{9}$、$7x10^{9}$、$8x10^{9}$ 或 $9x10^{9}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{10}$、$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、$4x10^{10}$、$5x10^{10}$、$6x10^{10}$、$7x10^{10}$、$8x10^{10}$ 或 $9x10^{10}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{11}$、$2x10^{11}$、$3x10^{11}$、$4x10^{11}$、$5x10^{11}$、$6x10^{11}$、$7x10^{11}$、$8x10^{11}$ 或 $9x10^{11}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{12}$、$2x10^{12}$、$3x10^{12}$、$4x10^{12}$、$5x10^{12}$、$6x10^{12}$、$7x10^{12}$、$8x10^{12}$ 或 $9x10^{12}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{13}$、$2x10^{13}$、$3x10^{13}$、$4x10^{13}$、$5x10^{13}$、$6x10^{13}$、$7x10^{13}$、$8x10^{13}$ 或 $9x10^{13}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{14}$、$2x10^{14}$、$3x10^{14}$、$4x10^{14}$、$5x10^{14}$、$6x10^{14}$、$7x10^{14}$、$8x10^{14}$ 或 $9x10^{14}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在另一具體實施例中，將組成物調配成每劑量含有至少 $1x10^{15}$、$2x10^{15}$、$3x10^{15}$、$4x10^{15}$、$5x10^{15}$、$6x10^{15}$、$7x10^{15}$、$8x10^{15}$ 或 $9x10^{15}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。在一具體實施例中，對於

人類投予，劑量範圍可為每劑量 $1x10^{10}$ 至約 $1x10^{12}$ GC，包括該範圍內的所有整數或分數量。

【0072】在某些具體實施例中，劑量範圍為約 1×10^{9} GC/每克腦質量至約 1×10^{12} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量範圍為約 1×10^{10} GC/每克腦質量至約 3.33×10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量範圍為約 3.33×10^{11} GC/每克腦質量至約 1.1×10^{12} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量範圍為約 1.1×10^{12} GC/每克腦質量至約 3.33×10^{13} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量低於 3.33×10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量低於 1.1×10^{12} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量低於 3.33×10^{13} GC/每克腦質量。

【0073】在某些具體實施例中，劑量為約 1×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 2×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 2×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 3×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 4×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 5×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 6×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 7×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 8×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 9×10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 1×10^{11} GC/每克

腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 2 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 3 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 4 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 3.3 x 10^{10} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 1.1 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 2.2 x 10^{11} GC/每克腦質量。在某些具體實施例中，劑量為約 3.3 x 10^{11} GC/每克腦質量。

【0074】在某些具體實施例中，作為固定劑量(flat dose)投予至人類之劑量範圍為約 1.44 x 10^{13} 至 4.33 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，作為固定劑量投予至人類之劑量範圍為約 1.44 x 10^{13} 至 2 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，作為固定劑量投予至人類之劑量範圍為約 3 x 10^{13} 至 1 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，作為固定劑量投予至人類之劑量範圍為約 5 x 10^{13} 至 1 x 10^{14} GC 之 rAAV。

【0075】在某些具體實施例中，組成物被調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍為約 1 x 10^{13} 至 8 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，組成物被調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍為約 1.44 x 10^{13} 至 4.33 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，組成物被調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍為約 3 x 10^{13} 至 1 x 10^{14} GC 之 rAAV。在某些具體實施例中，組成物被調配成劑量單位以含有 AAV 之量，其範圍為約 5 x 10^{13} 至 1 x 10^{14} GC 之 rAAV。

【0076】在某些具體實施例中，投予足以在以下任何一種或多種組織類型中提供 10^3 GC/μg DNA 的單次劑量：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。在某些具體實施例中，投予足以在以下任何一種或多種組織類型中提供 10^4 GC/μg DNA 的單次劑量：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。

【0077】在某些具體實施例中，rAAV 以單次劑量投予至受試者。在某些具體實施例中，需要多劑量(例如 2 個劑量)。

【0078】可調整劑量以平衡治療益處與任何副作用，且此類劑量可根據所採用的重組載體的治療應用而變化。可監測轉基因的表現水準以確定產生病毒載體的劑量頻率，該病毒載體較佳為含有袖珍基因(minigene)的 AAV 載體。可選擇地，相似於所述用於治療目的劑量方案可用於使用本發明組成物之免疫。

【0079】如本文中所使用，術語「鞘內遞送」或「鞘內投予」係指藥物經由注射至脊髓管的投予途徑，更具體而言為注射至蜘蛛膜下腔的投予途徑，以使其到達腦脊髓液(CSF)。鞘內遞送可包括腰椎穿刺、室內(包括腦室內(ICV))、枕骨下/腦池內及/或 C1-2 穿刺。例如，可藉由腰椎穿刺手段而導入物質以在整個蜘蛛膜下

腔擴散。在另一實例中，注射可進入腦大池或經由腦實質內(intraparenchymal)遞送。在某些具體實施例中，經由電腦斷層掃描(CT)導引的枕骨下注射到腦大池中(腦大池內)來投予 rAAV。在某些具體實施例中，該患者被投予單次劑量。

【0080】如本文中所使用，術語「腦池內遞送」或「腦池內投予」係指藥物直接進入腦大池小腦延髓(cisterna magna cerebellomedularis)之腦脊髓液的投予途徑，更具體而言為經由枕骨下穿刺或藉由直接注射至腦大池中，或者經由永久定位的管子。

【0081】在某些具體實施例中，rAAV.hPGRN 的系群被調配在鞘內最終調配緩衝液(ITFFB；具有 0.001% Pluronic F-68 的人工 CSF)中。將批料冷凍，隨後解凍，必要時儲集，調整至目標濃度，通過 0.22 μm 過濾器進行無菌過濾，並填充小瓶。在某些具體實施例中，將包含調配緩衝液、rAAV1.hPGRN 的懸浮液調整至 pH 7.2 至 7.4。

【0082】在一具體實施例中，本文提供的 rAAV1.hPGRN 的劑量遞送的體積、及濃度可由本技術領域中具有通常知識者確定。例如，可選擇體積約 1 μL 至 150 mL，對於成年人選擇更高體積。通常，對於新生嬰兒，適當的體積約為 0.5 mL 至約 10 mL，對於較大的嬰兒，可選擇約 0.5 mL 至約 15 mL。對於幼兒，可選擇約 0.5 mL 至約 20 mL 的體積。對於兒童，可選擇最高至約 30 mL 的體積。對於少年及青少年，可以選擇最高

至約 50 mL 的體積。在另外其它具體實施例中，患者可接受鞘內投予，可選擇體積約 5 mL 至約 15 mL、或約 7.5 mL 至約 10 mL。可確定其它適當的體積及劑量。可調整劑量以平衡治療益處與任何副作用，且這種劑量可根據所採用的重組載體的治療應用而變化。

【0083】在某些具體實施例中，組成物包含：rAAV.EF1a.hPGRN.SV40、rAAV.UbC.PI.hPGRN.SV40 或 rAAVCB7.CI.hPGRN1.rBG。其中 rAAV 殼體為 AAVhu68、AAV5 或 AAV1 的組成物於下述實施例中說明。在特佳的具體實施例中，rAAV 為 AAV1。在某些具體實施例中，hPGRN 編碼序列係選自本說明書中所定義者。參見例如，SEQ ID NO：3 或與其 95%至 99.9%相同之序列，或者 SEQ ID NO：4 或與其 95%至 99.9%相同之序列，或者如本文所定義之此等的片段。提供用於下述實施例之載體元件的說明性序列，例如，於 SEQ ID NO：6(兔球蛋白 polyA)、AAV ITR(SEQ ID NO：7 及 8)、人類 CMV IE 啟動子(SEQ ID NO：9)、CB 啟動子(SEQ ID NO：10)、嵌合內含子(SEQ ID NO：11)、UbC 啟動子(SEQ ID NO：12)、EF-1a 啟動子(SEQ ID NO：17)、內含子(SEQ ID NO：13)及 SV40 晚期 poly A(SEQ ID NO：14)。

【0084】

用途

如本文中所使用，PGRN 單套缺失係指具有 PGRN 基因中的突變的患者，該突變導致不足的 PGRN 及/或不

足的 GRN 水準。rAAV1-PGRN 治療的目標族群包括患有 PGRN 單套缺失的患者及/或具有不足的 PGRN 或不足的 GRN 水準的患者。在某些具體實施例中，對於 PGRN 突變，患者為異基因型組合的。在另一其它具體實施例中，該患者係來自 PGRN 突變的同基因型組合。在某些具體實施例中，對患者投予一種免疫抑制方案組合本文所提供的 rAAV1 媒介的 hPGRN 療法。

【0085】在某些具體實施例中，rAAV1.PGRN 係有用於治療具有 GRN 單套缺失的患者。此類患者可已被診斷患有由 GRN 單套缺失所引起之成年發病神經退化或可為症狀發生前。rAAV1.PGRN 可以單次劑量投予，經由電腦斷層掃描(CT)導引的枕骨下注射至腦大池中(腦大池內[ICM])。單次劑量係以預定劑量水準投予。在 NHP 中以單次 ICM 注射所達成之優異腦轉導導致選擇此投予途徑。在某些具體實施例中，與另一投予途徑(例如，注射至側腦室中)相較之下，投予載體至 ICM 亦造成降低的抗 PGRN T 細胞反應。曾經為一種常見的手術，ICM 注射(亦稱為枕骨下穿刺)先前已被腰椎穿刺取而代之。然而，可選擇及/或使用其它劑量水準及遞送途徑與此 rAAV1 媒介的 hPGRN 療法組合。

【0086】在某些具體實施例中，本文所述的 rAAV1 媒介的療法可提供沒有 GRN 突變(單套缺失)的人類之大約平均、正常、生理水準的 PGRN 表現。然而，即使 PGRN 表現的增加低於正常水準，該治療亦可提供治療效果，提供正常平均水準的約 40%至 99%，例如，

35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或此等範圍之間的其它值。在某些具體實施例中，此可能係由於 PGRN 水準比治療前的患者表現水準增加至少 5%至約 70%或更高。在某些具體實施例中，當投予 rAAV1 媒介的 hPGRN 導致 CSF 中 PGRN 的水準升高(例如，比正常水準高 10 倍到 40 倍)時，該治療可提供治療效果。

【0087】在某些具體實施例中，藉由下列之一或多種來評估效果：CSF 中 PGRN 蛋白質的水準增加及/或大腦皮質厚度變化。在某些具體實施例中，在投予單次 ICM 劑量後，藉由下列之一或多種來測量而評估 rAAV1 媒介的療法的效果：藉由簡易精神狀態檢查(Mini-Mental State Exam；MMSE)、臨床總體印象變化(Clinical Global Impression of Change；CGI-C)、額葉功能測試(Frontal Assessment Battery；FAB)、額顳葉失智症評定量表(Frontotemporal Dementia Rating Scale；FRS)、額葉行為量表(Frontal Behavioral Inventory；FBI)、統一帕金森氏症評定量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale；UPDRS)、語文流暢性測試、用於額顳葉退化加總計分之臨床失智症評定量表(Clinical Dementia Rating for Frontotemporal Lobar Degeneration Sum of Boxes；CDR-FTLD sb)及/或神經精神評估量表(Neuropsychiatric Inventory；NPI)而評估延長生存期、以及改善臨床症狀及日常功能。在某些具體實施例中，藉由改善的神經纖維絲輕鏈(NfL)、tau、磷酸化 tau 及

炎症標記的 CSF 水準及/或增加的 PGRN 之血漿水準而證明功效。在某些具體實施例中，藉由測量小神經膠質細胞增生水準的降低或逆轉來評估功效。在某些具體實施例中，藉由進行 FDG PET 以評估額葉及/或顳葉中的低代謝來證明功效。

【0088】在某些具體實施例中，藉由改善 GRN 患者相關之一或多種臨床症狀來衡量功效，包括例如，行為缺陷(抑制解除、冷漠、失去同情心或同理心、強迫或刻板的行為、或者多食(hyperorality))及認知缺陷(執行功能下降，對情節記憶或視覺空間技能無重大影響)。

【0089】在某些具體實施例中，在其它一些更多的非典型的症狀中觀察到改善，包括精神病學特徵(妄想、幻覺及強迫行為)及/或其它認知缺陷(情節記憶障礙、運用失能症(apraxia)及視覺空間功能障礙)。可使用可評估的 FTDC 基準執行評估，包括對於額葉及/或顳骨退化的徵象之大腦成像、對臨床評定量表的下降之評估(例如用於額顳葉退化之臨床失智症評定量表[CDR-FTLD]、額葉行為量表[FBI]、神經精神評估量表[NPI]及額顳葉失智症評定量表[FRS])、及最終之遺傳測試以確認致病性 GRN 突變。可使用腦脊髓液(CSF)生物標記(包括 tau 及類澱粉蛋白-β)以及類澱粉蛋白質正子發射斷層掃描(positron emission tomography；PET)成像。

【0090】在某些具體實施例中，在具有原發性進行性失語症(PPA)的 *GRN* 突變攜帶者中觀察到改善，原發性進行性失語症的特徵在於與說話及語言有關的症狀。

可使用基於 Mesulam 基準的準則來診斷彼等，該準則區分 PPA 的三種臨床變異型：語義變異型 PPA(semantic variant PPA；svPPA)、非流暢變異型 PPA(nonfluent variant PPA；nfvPPA)及語彙減少變異型 PPA(logopenic variant PPA；lvPPA)(Gorno-Tempini et al.,(2011). "Classification of primary progressive aphasia and its variants." Neurology. 76(11):1006-14)。nfvPPA 的說話表達能力存在缺陷，且其核心特徵包括語言表達的語法缺失、費力說話及言語失用。svPPA 在理解字彙含義的能力上存在缺陷，其核心特徵包括字彙命名及單詞理解能力受損。lvPPA 的特徵在於說話時難以找到適當的字彙，但不會伴隨字彙理解能力的下降。lvPPA 的核心特徵為字彙檢索及重複句子的能力的缺陷。*GRN* 突變攜帶者最常存在 nfvPPA；然而，他們可在 PPA 臨床譜內擁有更廣泛的症狀，從而診斷為「未特定 PPA(PPA-not otherwise specified)」(Gorno-Tempini et al., 2011；Woollacott and Rohrer, 2016)。

【0091】提供一種治療患有與 GRN 單套缺失相關之神經退化性病況的人類患者的方法。在某些具體實施例中，此病況為顆粒蛋白前體相關額顳葉失智症(FTD)。該方法包含經由具有腺相關病毒 1(AAV1)殼體之重組腺相關病毒(rAAV)遞送顆粒蛋白前體之編碼序列至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及引導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0092】提供一種用於治療患有腦病灶之人類患者的方法，該腦病灶係與下列有關：顆粒蛋白前體相關額顳葉失智症、或與 GRN 單套缺失相關之另一神經退化性病況。該方法包含經由具有腺相關病毒 1(AAV1)殼體之重組腺相關病毒(rAAV)而將顆粒蛋白前體之編碼序列投予至中樞神經系統(CNS)，該 rAAV 進一步包含包裝在 AAV 殼體中的載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複、人類顆粒蛋白前體的編碼序列、及引導顆粒蛋白前體表現之調節序列。

【0093】在某些具體實施例中，本文所提供之方法可進一步包含藉由下列來監測治療：(a)非侵入式評估患者的視網膜貯積病灶的減少，作為腦病灶降低之預測因子；(b)進行磁共振成像以評估腦體積；及/或(c)測量 CSF 中顆粒蛋白前體的濃度。可選擇地，可評估血漿中的顆粒蛋白前體濃度。

【0094】在某些具體實施例中，藉由一或多種下列主要認知、主要行為或認知/其它方法來評估 rAAV.hPGRN 組成物的功效。以下描述適當的評估。

【0095】主要認知評估包括語文流暢性測試、FTLD 的臨床失智率或簡易精神狀態檢查(MMSE)。語文流暢性測試係藉由對每位受試者展示相同的圖片/照片並要求口頭描述來進行。在描述過程中，對說話速度(字/分鐘)進行計數、記錄並最終與反映出神經正常成年人的速率進行比較。CDR-FTLD 為典型 CDR 的擴展版本，歷史上一直用於評估阿茲海默氏症譜障礙的嚴重程度。評

估包括 CDR 的原始 6 個領域(記憶、定向、判斷及解決問題、社群事務、家庭及嗜好、個人照護)以及另外兩個領域：語言及行為，從而在檢測 FTLD 下降方面更加敏感。等級「0」表示正常行為或語言，而等級「1」、「2」或「3」表示輕度至重度缺陷。「加總計分」或各別領域得分的總和係用於確定整體失智症的嚴重程度。MMSE 為一種 11 項問題總體認知評估，廣泛用於臨床及研究實踐。詢問例如「哪年?哪一季節?哪一日?一週中的哪天?哪月?」的問題並且在每個正確答案給一個分數，且對於每項問題提供最高分。最高總分為 30 分，其中兩個界限分數為 24 及 27。此等界限為認知能力下降的指標。

【0096】主要運動評估包括例如統一帕金森氏症評定量表(UPDRS)。該 UPDRS 為一種帕金森氏症相關之數種領域的 42 項、4 部分的評估，例如心理、行為以及情緒及日常生活活動。每一項目包括評定量表，範圍通常從 0(通常表示無損害)到 4(通常表示最嚴重的損害)。記錄每一部分的得分以提供疾病嚴重程度的指標，最高得分為 199，表示最嚴重/最大的總失能。

【0097】主要行為評估包括例如神經精神評估量表(NPI)或額葉行為量表(FBI)。NPI 用於闡明存在於患有腦部疾病的患者的心理病理學。最初，其被開發用於阿茲海默氏症族群；然而，對評估其它病況下的行為變化可能係有用的。評估由 10 個行為領域及 2 個神經植物人化區域(neurovegetative areas)所組成，其中有 4 種積

分：頻率、嚴重程度、整體及照護者困擾。NPI 總分係藉由將行為領域的領域得分相加，減去照護者困擾得分得出的。FBI 為一種 24 項目的評估，旨在評估與 bvFTD 特定相關的行為及性格變化，以及鑑別 FTD 與其它失智症。其係作為與主要照護者的面對面訪談來執行，因為以 bvFTD 診斷的患者通常對此等類型的變化沒有足夠的了解。其著重在數個行為及性格相關的區域，每個問題的評分從 0(無)到 3(嚴重/大部分時間)。總分提供深入了解疾病的嚴重程度，並可用於評估隨時間推移的變化。

【0098】其它/認知及運動的評估包括例如：哥倫比亞自殺嚴重程度評定量表(Columbia Suicide Severity Rating Scale；C-SSRS)、臨床總體印象變化(CGI-C)、額葉功能測試(FAB)及/或額顳葉失智症評定量表(FDR)。C-SSRS 為一種 3 部分量表，透過評估自殺意念及行為的問題來衡量自殺意念、意念強度及自殺行為。此評估的結果由直接從量表所得之自殺行為殺傷力等級、自殺意念得分及自殺意念強度等級所構成。根據評估準則，大於 0 的意念得分可表示需要介入。強度等級的範圍為 0 到 25，其中 0 表示不支持自殺意念。CGI-C 為一種簡短、廣泛使用的評估的三個部分之一，該評估由 3 個項目所構成，此等項目係由臨床醫師觀察員評定。CGI-C 的評分為 7 分制，從研究招募開始，無論任何改善是否完全由治療所引起，範圍從 1(大幅改善)到 7(非常差)。FAB 為一種簡短的評估，以幫助鑑別具有額葉執行功能失常表型的失智症及阿茲海默氏症型的失智

症。在輕度失智的患者(MMSE>24)中特別有用。評估由6個部分所組成，針對認知、運動及行為領域，總分為18分及更高得分表明較佳之表現。FDR為針對患有額顳葉失智症的患者的簡短分期評估，其檢測FTD亞型隨時間推移的疾病進展差異。此簡短的訪談係與主要照護者進行，由30個項目所組成，被分類為從不、有時或總是發生。然後計算百分比分數，並將其轉換為對數分數，並最終轉換為嚴重程度分數。嚴重程度評分範圍為非常輕度到深度。

【0099】其它功效的量測包括從診斷點起的生存期增加、在症狀發作後的生存期增加，為一種功效的量測。目前，被診斷為由*GRN*突變引起的神經退化的患者從症狀發作起的預期壽命為7-11年。功效的另一種量測為在中額葉皮質及頂葉區域厚度的穩定化及/或萎縮的增加，該區域為目標族群中所有臨床表現中最常見被影響的大腦區域。此可使用MRI或其它成像技術進行評估。其它評估包括生化生物標記。測量CSF及血漿中PGRN蛋白質的水準，作為AAV轉導的讀數，並預期在投予rAAV1.hPGRN後在患者中會增加。在其它具體實施例中，評估神經纖維絲輕鏈(NFL)、tau、磷酸化tau及其它炎症標記的CSF水準。在某些具體實施例中，此等生物標記水準的調控及/或降低與功效有關。

【0100】儘管以下實施例著重治療與異基因型組合之GRN單套缺失相關的某些病況，在某些具體實施例中，本文所述載體及組成物可用於治療其它疾病，例

如，與 GRN 基因同基因型組合突變有關之疾病，例如神經性類蠟脂褐質病、癌症(例如，卵巢癌、乳癌、腎上腺癌及/或胰臟癌)、動脈粥樣硬化、第 2 型糖尿病及代謝性疾病。

【0101】進一步的具體實施例如以下「A1」至「F1」。

【0102】A1.一種有用於在人類患者中治療成年發病神經退化性疾病之治療方案，其中該方案包含投予具有 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體的重組腺相關病毒(AAV)載體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體*(GRN)*編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，該投予包含單次劑量之腦大池內(ICM)注射，該單次劑量包含：

(i) 約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【0103】A2.如具體實施例 A1 之方案，其中顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【0104】A3.如具體實施例 A1 或 A2 之方案，其中載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【0105】A4.如具體實施例 A1 至 A3 中任一者之方案，其中載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【0106】A5.如具體實施例 A1 至 A4 中任一者之方案，其中患者已被鑑定為具有 *GRN* 單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【0107】A6.如具體實施例 A1 至 A5 中任一者之方案，其中患者年齡至少 35 歲。

【0108】A7.如具體實施例 A1 至 A6 中任一者之方案，其中患者的 CSF 中具有低濃度之顆粒蛋白前體。

【0109】A8.如具體實施例 A7 之方案，其中患者的 CSF 中具有比正常水準的 50%低之顆粒蛋白前體濃度。

【0110】A9.如具體實施例 A7 之方案，其中患者的 CSF 中具有約正常水準的 30%之顆粒蛋白前體濃度。

【0111】A10.如具體實施例 A1 至 A9 中任一者之方案，其進一步包含檢測 CSF、血清及/或血漿中的顆粒蛋白前體的水準。

【0112】A11.如具體實施例 A1 至 A10 中任一者之方案，其進一步包含測量

i) 神經纖維絲輕鏈(NfL)、總 tau(T-tau)及磷酸化 tau(P-tau)中之一種或多種的 CSF 水準；

ii) 評估視網膜脂褐質；

iii) 進行 MRI 以追蹤腦體積、白質完整性、以及中額葉皮質及頂葉區域的厚度中之一種或多種的變化；

iv) 進行 FDG PET 以評估額葉及/或顳葉中的低代謝；及/或

v) 測量 EEG/誘發反應電位以評估疾病相關變化的減緩。

【0113】A12.如具體實施例 A1 至 A11 中任一者之方案，其中該單次劑量足以在以下任何一種或多種組織類型中提供 10^3 GC/μg DNA：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。

【0114】A13.如具體實施例 A1 至 A12 中任一者之方案，其中該單次劑量足以在以下任何一種或多種組織類型中提供 10^4 GC/μg DNA：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。

【0115】B1.一種醫藥組成物，其包含含有 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體的重組 AAV 載體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，其中該組成物被調配用於腦大池內(ICM)注射至有需要的人類患者以投予以下劑量：

(i) 約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【0116】B2.如具體實施例 B1 之醫藥組成物，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【0117】B3.如具體實施例 B1 或 B2 之醫藥組成物，其中該載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【0118】B4.如具體實施例 B1 至 B3 中任一者之醫藥組成物，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【0119】C1.一種治療患有成年發病神經退化性疾病之患者的方法，該方法包含藉由 ICM 注射投予單次劑量的重組 AAV 至該患者，其中該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV ITR、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，且

其中單次劑量為：

(i) 約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【0120】C2.如具體實施例 C1 之方法，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【0121】C3.如具體實施例C1或C2之方法，其中該載體基因體進一步包含CB7啟動子、嵌合內含子及兔β球蛋白poly A。

【0122】C4.如具體實施例C1至C3中任一者之方法，其中該載體基因體包含SEQ ID NO：24。

【0123】C5.如具體實施例C1至C4中任一者之方法，其中該患者已被鑑定為患有*GRN*單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【0124】C6.如具體實施例C1至C5中任一者之方法，其中該患者年齡至少35歲。

【0125】C7.如具體實施例C1至C6中任一者之方法，其中該患者的CSF中具有低濃度的顆粒蛋白前體。

【0126】C8.如具體實施例C7之方法，其中該患者的CSF中具有比正常水準之50%低的顆粒蛋白前體濃度。

【0127】C9.如具體實施例C7之方法，其中該患者的CSF中具有約正常水準之30%的顆粒蛋白前體濃度。

【0128】C10.如具體實施例C1至C9中任一者之方法，其進一步包含檢測CSF、血清及/或血漿中的顆粒蛋白前體濃度。

【0129】C11.如具體實施例C1至C10中任一者之方法，其進一步包含測量：

i) 神經纖維絲輕鏈(NfL)、總tau(T-tau)及磷酸化tau(P-tau)中之一種或多種的CSF濃度；

ii) 評估視網膜脂褐質；

iii) 進行MRI以追蹤腦體積、白質完整性、以及中額葉皮質及頂葉區域的厚度中之一種或多種的變化；

iv) 進行 FDG PET 以評估額葉及/或顳葉中的低代謝；及/或

v) 測量 EEG/誘發反應電位以評估疾病相關變化的減緩。

【0130】D1.一種單位劑型的醫藥組成物，其包含：

含約 1.44×10^{13} 至約 4.33×10^{14} GC 的重組 AAV 載體之緩衝液，

其中該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及包裝於其中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列。

【0131】D2.如具體實施例 D2 之醫藥組成物，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【0132】D2.如具體實施例 D1 或 D2 之醫藥組成物，其中該載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【0133】D4.如具體實施例 D1 至 D3 中任一者之醫藥組成物，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【0134】D5.如具體實施例 D1 至 D4 中任一者之醫藥組成物，其中該組成物被調配用於 ICM 注射。

【0135】D6.如具體實施例D1至D5中任一者之醫藥組成物，其中該緩衝液包含磷酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂及泊洛沙姆188(poloxamer 188)。

【0136】D7.如具體實施例D1至D6中任一者之醫藥組成物，其中該緩衝液包含1 mM磷酸鈉、150 mM氯化鈉、3 mM氯化鉀、1.4 mM氯化鈣、0.8 mM氯化鎂及0.001%泊洛沙姆188。

【0137】D8.如具體實施例D1至D6中任一者之醫藥組成物，其具有約3.0 mL、約4.0mL或約5.0 mL的體積。

【0138】E1.如具體實施例D1至D8中任一者之醫藥組成物，其用於治療患有成年發病神經退化性疾病的人類患者。

【0139】E2.如具體實施例E1之用途的醫藥組成物，其中該患者已被鑑定為患有*GRN*單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【0140】E3.如具體實施例E1或E2之用途的醫藥組成物，其中該組成物被調配以投予以下劑量：

(i) 約3.3×10^{10}基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【0141】F1.一種如具體實施例14至25中任一者之醫藥組成物用於製備治療成年發病神經退化性疾病之醫藥品的用途。

【0142】如本文中所使用，術語電腦斷層掃描(CT)係指放射線照相術，其中身體結構的三維影像係藉由電腦從沿軸線製作的一系列平面橫截面影像所構築。

【0143】當提及核酸或其片段時，術語「實質上同源」或「實質上相似」表示：當利用適當的核苷酸插入或刪除而與另一核酸(或其互補股)最佳排比時，在至少約95%至99%的排比的序列中有核苷酸序列同一性。較佳地，同源為在全長序列、或其開讀框、或長度為至少15個核苷酸的另一適當片段。本文描述了適當片段的實例。

【0144】在核酸序列之上下文中，術語「序列同一性」、「序列同一性百分比」或「同一性百分比」係指：當用於最大對應排比時，兩個序列中相同的殘基。序列同一性比較的長度理想可為整個基因體的全長、基因編碼序列的全長或至少約500至5000個核苷酸的片段。然而，較小片段之間的同一性亦為理想，例如至少約9個核苷酸、通常至少約20至24個核苷酸、至少約28至32個核苷酸、至少約36個或更多個核苷酸。類似地，對於胺基酸序列，可在整個蛋白質的全長或其片段容易地確定「序列同一性百分比」。適當地，片段長度為至少約8個胺基酸，並且可多至約700個胺基酸。本文描述了適當片段的實例。

【0145】當提及胺基酸或其片段時，術語「實質上同源」或「實質上相似」表示：當利用適當的胺基酸插入或刪除而與另一胺基酸(或其互補股)最佳排比時，在

至少約 95%至 99%的排比的序列中有胺基酸序列同一性。較佳地，同源為在全長序列、或其蛋白質，例如cap蛋白質、rep蛋白質、或者長度為至少8個胺基酸、或更理想地係長度為至少 15 個胺基酸的片段。本文描述了合適片段的實例。

【0146】術語「高度保留的」意指至少 80%同一性，較佳為至少 90%同一性，更佳為大於 97%同一性。藉由本技術領域中具有通常知識者已知的演算法及電腦程式，本技術領域中具有通常知識者可容易地確定同一性。

【0147】一般而言，當於兩個不同腺相關病毒之間提及「同一性」、「同源性」或「相似性」時，「同一性」、「同源性」或「相似性」係參照「排比的(aligned)」序列來確定。「排比的」序列或「排比」係指多個核酸序列或蛋白質(胺基酸)序列，與參考序列相比，通常含有缺失或額外的鹼基或胺基酸的校正。在實施例中，使用公開的 AAV9 序列作為參考點進行 AAV 排比。使用許多公開或市售的多序列排比程式中的任何一種進行排比。這類程式之實例包括「Clustal Omega」、「Clustal W」、「CAP Sequence Assembly」、「MAP」及「MEME」，此等可透過網際網路上的網站伺服器進行存取。此類程式的其它來源為本技術領域中具有通常知識者已知的。或者，亦可使用載體 NTI 公用程式。還有許多技術領域中已知可用於測量核苷酸序列同一性的演算法，包括上述程式中含有的演算法。作為

另一實例，可使用 Fasta™(GCG 版本 6.1 的程式)比較多核苷酸序列。Fasta™提供在查詢及檢索序列之間最佳重疊區域的排比及序列同一性百分比。例如，核酸序列之間的序列同一性百分比可使用 Fasta™及其如 GCG 版本 6.1 中所提供的內定參數確定(字組大小為 6 及用於得分矩陣的 NOPAM 因數)，藉由引用併入本文。胺基酸序列也可使用多序列排比程式，例如，「Clustal Omega」、「Clustal X」、「MAP」、「PIMA」、「MSA」、「BLOCKMAKER」、「MEME」及「Match-Box」程式。一般而言，此等程式之任一者皆於內定值下使用，儘管本技術領域中具有通常知識者可根據需要改變此等設定。或者，本技術領域中具有通常知識者可利用另一演算法或電腦程式，其至少提供如參考的演算法及程式所提供的同一性或排比的水準。參見例如 J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999)。

【0148】應注意的為，術語「一」或「一個」係指一個(種)或多個(種)。因此，術語「一(或一個)」、「一個或多個」及「至少一個」在本文中可互換使用。

【0149】詞語「包含(comprise/comprises/comprising)」係包括性地而非排他性地解釋。詞語「由...組成(consist/consisting)」及其變化係排他性地而非包括性地解釋。雖然說明書中的多個具體實施例使用「包含」語句來呈現，但在其它情況下，相關具體實施例亦旨在

使用「由...組成」或「實質上由...組成」語句來解釋及描述。

【0150】如本文中所使用，除非另有指明，術語「約」意指與給定參考值間有 10%(±10%，例如，±1、±2、±3、±4、±5、±6、±7、±8、±9、±10、或此等之間的值)的變化。

【0151】如本文中所使用，「疾病」、「障礙」及「病況」可互換使用，以表示受試者的不正常狀態。

【0152】除非在本說明書中另有定義，否則本文所使用的技術及科學術語具有與本領域中具有通常知識者所通常理解的及參考公開文本所通常理解的相同的含義，該公開文本為本技術領域中具有通常知識者提供了本申請案中使用的許多術語的一般指引。

【0153】術語「表現」在本文中以其最廣泛的含義使用，且包含 RNA 的產生或者 RNA 及蛋白質的產生。關於 RNA，術語「表現」或「轉譯」特別涉及肽或蛋白質的產生。表現可為短暫的或可為穩定的。

【0154】如本文中所使用，「表現匣」係指包含編碼序列、啟動子並且可包括其它調節序列的核酸分子，該表現匣可經由遺傳元件(例如，質體)遞送至包裝宿主細胞，並包裝到病毒載體(例如，病毒顆粒)的殼體中。通常，此類用於產生病毒載體的表現匣含有本文所述基因產物的編碼序列，其兩側為病毒基因體的包裝訊息及其它表現控制序列，例如本文所述的彼等。

【0155】如本文中所使用，術語「可操作地連接」係指相鄰於目的基因的表現控制序列、及反式或遠距離地作用以控制目的基因的表現控制序列二者。

【0156】當提及蛋白質或核酸而使用時，術語「異源的」表示蛋白質或核酸包含在自然界中彼此之間沒有相同關係的兩個以上的序列或子序列。例如，通常重組產生的核酸，具有二個以上的來自無關基因的序列，其排列以產生新的功能性核酸。例如，在一具體實施例中，該核酸具有來自一個基因的啟動子，其被安排以引導來自不同基因的編碼序列的表現。因此，參照編碼序列，該啟動子為異源的。

【0157】在本發明的上下文中，術語「轉譯」係關於核糖體的過程，其中 mRNA 股控制胺基酸序列的組裝以產生蛋白質或肽。

【0158】以下實施例僅為說明性的，並不意圖限制本發明。

實施例

縮寫	描述
A	吸光度(Absorbance)
aa	胺基酸
AAV	腺相關病毒
AAV1	腺相關病毒血清型 1
AAV2	腺相關病毒血清型 2
AAV5	腺相關病毒血清型 5
AAVhu68	腺相關病毒血清型 hu68
ACMG	美國醫學遺傳學學會(American College of Medical Genetics)

縮寫	描述
AD	阿茲海默氏症
AD & FDM	阿茲海默氏症及額顳葉失智症突變資料庫 (Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Mutation Database)
Ad5	腺病毒血清型 5(Adenovirus Serotype 5)
AE	不良事件(Adverse Events)
AEX	陰離子交換(Anion Exchange)
AmpR	安比西林(Ampicillin)抗性(基因)
ANOVA	變異數分析
ARTFL	額顳葉退化之前瞻研究與治療 (Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration)
AUC	分析型超高速離心(Analytical Ultracentrifugation)
BA	β-肌動蛋白
BCA	二喹啉甲酸(Bicinchoninic Acid)
BDS	大批原料藥(Bulk Drug Substance)
BMCB	細菌主細胞庫(Bacterial Master Cell Bank)
bp	鹼基對
BRF	批次紀錄表(Batch Record Form)
BSA	牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)
BSE	牛海綿狀腦病變(Bovine spongiform encephalopathy)
BSC	生物安全櫃(Biological Safety Cabinet)
bvFTD	行為變異型額顳葉失智症(Behavioral Variant Frontotemporal Dementia)
BWCB	細菌工作細胞庫(Bacterial Working Cell Bank)
C9orf72	染色體 9 開讀框 72(基因，人類)
cap	殼體(基因)
CB7	雞 β-肌動蛋白啟動子及 CMV 強化子
CBC	全血細胞計數(Complete Blood Count)
CBER	生物製品評估與研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research)
CBS	皮質基底核症候群(Corticobasal Syndrome)
CDR-FTLD sb	用於額顳葉退化加總計分之臨床失智症評定(CDR)量表

縮寫	描述
CFR	聯邦法規(Code of Federal Regulations)
CFU	菌落形成單位(Colony Forming Units)
CGI-C	臨床總體印象變化
CI	嵌合內含子(Chimeric Intron)
CMC	化學製造與控制(Chemistry Manufacturing and Controls)
CMO	受託製造機構(Contract Manufacturing Organization)
CMV IE	巨細胞病毒立即早期強化子(Cytomegalovirus Immediate-Early Enhancer)
CNS	中樞神經系統
COA	檢驗證明書(Certificate of Analysis)
CPE	細胞病變作用(Cytopathic Effects)
CRL	查爾斯河實驗室(Charles River Laboratories)
CRO	受託研究機構(Contract Research Organization)
CSF	腦脊髓液(Cerebrospinal Fluid)
C-SSRS	哥倫比亞自殺嚴重程度評定量表(Columbia-Suicide Severity Rating Scale)
CT	電腦斷層掃描(Computed Tomography)
CTL	胞毒型 T 淋巴球(Cytotoxic T Lymphocyte)
CTSD	細胞自溶酵素 D(Cathepsin D)
ddPCR	微滴式數位聚合酶連鎖反應(Droplet Digital Polymerase Chain Reaction)
DLS	動態光散射(Dynamic Light Scattering)
DMEM	達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMF	原料藥主檔案(Drug Master File)
DNA	去氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)
DO	溶氧(Dissolved Oxygen)
DP	藥品(Drug Product)
DRG	背根節(Dorsal Root Ganglia)
DS	原料藥(Drug Substance)
E1A	早期區域 1A(Early Region 1A)(基因)

縮寫	描述
ECG	心電圖(Electrocardiogram)
EDTA	乙二胺四乙酸
ELISA	酶聯免疫吸附分析法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ELISpot	酶聯免疫斑點法(Enzyme-Linked Immunospot)
EU	內毒素單位
F	女性
F/U	追蹤(Follow-Up)
FAB	額葉功能測試(Frontal Assessment Battery)
FBI	額葉行為量表(Frontal Behavioral Inventory)
FBS	胎牛血清(Fetal Bovine Serum)
FDA	食品藥物管理局(Food and Drug Administration)
FDP	填充藥品(Filled Drug Product)
FFB	最終調配緩衝液(Final Formulation Buffer)
FIH	首次用於人體(First-in-Human)
FRS	額顳葉失智症評定量表(Frontotemporal Dementia Rating Scale)
FTD	額顳葉失智症(Frontotemporal Dementia)
FTLD	額顳葉退化(Frontotemporal Lobar Degeneration)
FTDC	國際行為變異型額顳葉失智症基準協會 (International Behavioral Variant FTD Criteria Consortium)
GC	基因體拷貝數(Genome Copies)
GENFI	遺傳性額顳葉失智症倡議(Genetic Frontotemporal Dementia Initiative)
GLP	優良實驗室操作規範(Good Laboratory Practice)
GMP	優良藥品製造規範(Good Manufacturing Practice)
HCDNA	宿主細胞去氧核糖核酸
HCP	宿主細胞蛋白
HEK293	人類胚腎 293
HEX	己醣胺酶(蛋白)
hPGRN	人類顆粒蛋白前體(Human Progranulin)

縮寫	描述
hPGRN v2	人類顆粒蛋白前體 2 版
ICH	國際藥品法規協和會(International Conference on Harmonization)
ICM	腦大池內(Intra-Cisterna Magna)
ICP	顱內壓(Intracranial Pressure)
ICV	腦室內(Intracerebroventricular)
IDS	艾杜糖醛酸鹽硫酸脂酶(Iduronate-2-Sulfatase)
IDUA	艾杜糖醛酸酶(Iduronidase)
IFN-γ	干擾素 γ
IND	研究中新藥(Investigational New Drug)
IT	鞘內(Intrathecally)
ITFFB	鞘內最終調配緩衝液(Intrathecal Final Formulation Buffer)
ITR	反向末端重複(Inverted Terminal Repeat)
IU	感染單位(Infectious Unit)
IV	靜脈內(Intravenous)
KanR	康黴素抗性(Kanamycin Resistance)(基因)
kb	千鹼基(kilobases)
KO	剔除(Knockout)
LAL	鱟變形細胞溶胞產物(Limulus Amoebocyte Lysate)
LBD	路易氏體失智症(Lewy Body Dementia)
LEFFTDS	家族性額顳葉失智症受試者縱向評估 (Longitudinal Evaluation of Familial Frontotemporal Dementia Subjects)
LFTs	肝功能檢查(Liver Function Tests)
LLOQ	最低定量極限
LOD	偵測極限
LP	腰椎穿刺(Lumbar Puncture)
LTFU	長期追踪(Long-Term Follow-Up)
lvPPA	語彙減少變異型原發性進行性失語症 (Logopenic Variant Primary Progressive Aphasia)
M	男性

縮寫	描述
MAPT	微管相關 tau 蛋白質(Microtubule-Associated Protein Tau)(基因，人類)
MBR	主批次紀錄(Master Batch Record)
MCB	主細胞庫(Master Cell Bank)
MED	最小有效劑量(Minimum Effective Dose)
MMSE	簡易精神狀態檢查(Mini-Mental State Exam)
MRI	磁共振成像
mRNA	傳訊核糖核酸
MS	質譜法
MTD	最大耐受劑量
N	受試者或動物數量
N/A	不適用
NAbs	中和抗體
NCL	神經性類蠟脂褐質病(Neuronal Ceroid Lipofuscinosis)
nfvPPA	非流暢變異型原發性進行性失語症(Nonfluent Variant Primary Progressive Aphasia)
NFL	神經纖維絲輕鏈(Neurofilament Light Chain)
NGS	次世代定序法(Next-Generation Sequencing)
NHP	非人類靈長類動物(Non-Human Primate)
NHS	自然史研究(Natural History Study)
NPI	神經精神評估量表(Neuropsychiatric Inventory)
NSAID	非類固醇類消炎藥(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug)
OL	開放性(Open-Label)
PBS	磷酸鹽緩衝生理鹽水
PD	帕金森氏症(Parkinson's Disease)
PEI	聚乙烯亞胺
PES	聚醚碸
PET	正子發射斷層掃瞄(Positron Emission Tomography)
PGRN	顆粒蛋白前體(蛋白質)

縮寫	描述
PI	計畫主持人(Principal Investigator)
POC	概念驗證(Proof-of-Concept)
polyA	多腺核苷酸化(Polyadenylation)
PPA	原發性進行性失語症(Primary Progressive Aphasia)
PSP	進行性核上神經麻痺症(Progressive Supranuclear Palsy)
QA	品質保證(Quality Assurance)
QC	品質管制(Quality Control)
qPCR	定量聚合酶連鎖反應
rAAV	重組腺相關病毒
ROA	投予途徑(Route of Administration)
rcAAV	具複製能力腺相關病毒(Replication-Competent Adeno-Associated Virus)
rBG	兔 β-球蛋白
rDNA	核糖體去氧核糖核酸
rep	複製酶(基因)
RNA	核糖核酸
SA	單臂(Single Arm)
SAE	嚴重不良事件(Serious Adverse Events)
SDS	十二烷基硫酸鈉
SDS-PAGE	十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳
SRT	安全性審查觸發(Safety Review Trigger)
ssDNA	單股去氧核糖核酸
svPPA	語義變異型原發性進行性失語症(Semantic Variant Primary Progressive Aphasia)
TBD	待確定(To Be Determined)
$TCID_{50}$	50% 組織培養感染劑量
TDP-43	TAR DNA 結合蛋白 43 (TAR DNA-Binding Protein 43) (蛋白質)
TE	Tris-EDTA
TFF	切向流過濾(Tangential Flow Filtration)

縮寫	描述
UbC	泛蛋白 C(Ubiquitin C)
UCSF	加州大學舊金山分校(University of California at San Francisco)
UPenn	賓州大學(University of Pennsylvania)
UPDRS	統一帕金森氏症評定量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale)
UPLC	超高效液相層析
US	美國
WT	野生型(Wild Type)

【0159】

實施例 1：材料與方法

載體

將工程化人類 PGRN cDNA 選殖到含有雞 β 肌動蛋白啟動子與巨細胞病毒早期強化子、嵌合內含子及兔 β-球蛋白多腺核苷酸化序列的表現構築體中(圖 1)。將第二工程化人類 PGRN cDNA 選殖到含有人類泛蛋白 C 啟動子之表現構築體中。該表現構築體的兩側為 AAV2 反向末端重複。如前所述(Lock M, et al. Hum Gene Ther. 2010；21(10):1259-71)，藉由三重轉染 HEK 293 細胞及碘克沙醇純化，由此構築體產生腺相關病毒血清型 1、5 及人類 68(AAVhu68)。

【0160】

動物程序

所有動物方案均由賓州大學的機構動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。GRN 剔除小鼠的繁殖對係購自 The Jackson Laboratory(庫存編號#013175)並在賓州大學保留了一個

族群。野生型 C57BL/6(庫存編號#000664)作為對照組。在第一項研究中，將 2 月齡小鼠以異氟烷(isoflurane)麻醉，並以體積 5 μL 之 $1x10^{11}$ 載體基因體拷貝數(GC)注射於側腦室(ICV)。注射 60 日後，藉由在氯胺酮(ketamine)/賽拉嗪(xylazine)麻醉下放血使小鼠安樂死，並藉由頸椎脫臼確認死亡。在第二項研究中，小鼠在 7 月齡時接受治療，並在 11 月齡時犧牲。在屍體剖檢時，藉由心臟穿刺收集血清並藉由枕骨下穿刺用 32 號針連接到聚乙烯配管收集 CSF。血清及 CSF 樣品立即在乾冰上冷凍並儲存於-80 度直至分析。收集額葉皮質用於生物化學處理，並立即在乾冰上冷凍，而其餘的大腦則以 10%福馬林固定以進行組織學檢查。

【0161】3-4 歲之恆河獼猴購自 Covance。以經由枕骨下穿刺進入腦大池之特定的測試物品的單次注射(ICM 注射)對動物投劑。使用相同裝置及程序對所有動物投劑。在研究的第 0 天，在投予前使動物鎮靜。在投予測試物品之前，對動物稱重並記錄生命徵象。向動物提供鎮痛劑。

【0162】然後將麻醉的獼猴從動物留置空間轉移並以側臥姿置於 X 光檢驗台上，頭部向前彎曲以收集 CSF 並投劑至腦大池內。對注射部位無菌地進行準備。使用無菌技術，將 21-27 號 Quincke 脊椎穿刺針(Becton Dickinson)推進枕骨下空間，直到觀察到 CSF 流出。其次，在投劑前收集 1.0 mL CSF 用於基線分析。穿過的解剖結構包括皮膚、皮下脂肪、硬膜外腔、硬膜及蛛枕關

節筋膜。針頭朝向腦大池更寬的上部間隙，以避免血液污染及潛在的腦幹損傷。可使用螢光鏡(OEC9800 C-Arm, GE)經由脊髓腔攝影來驗證針穿刺的正確位置。CSF 收集後，將魯爾(leur)通路延長導管連接至脊椎穿刺針以促進碘苯六醇(Iohexol)(商標名：Omnipaque 180 mg/mL，General Electric Healthcare)造影劑及測試物品的投劑。經由導管及脊椎穿刺針投予至多 2 mL 之碘苯六醇。確認針頭位置後，將含有測試物品的注射器(體積等於 1.0 mL 加上注射器及接頭無效空間的體積)連接到撓性接頭並注射 30 ± 5 秒。投予後，移除針頭，對穿刺部位施加直接壓力。

【0163】

組織學與影像學

將小鼠大腦固定於 10%福馬林中，冷凍保存在蔗糖中，包埋於最佳切削溫度(optimal cutting temperature；OCT)化合物中，並低溫切片。拍攝感興趣區域的自體螢光物質(脂褐質)的低倍影像。使用 Image J 軟體以盲測法對脂褐質沉積物進行定量。非人類靈長類動物組織固定於 10%福馬林中，石蠟包埋並以蘇木精-伊紅(Hematoxylin and Eosin；H&E)染色。玻片經認證的獸醫病理學家(ELB)審查。對於以 GFP 載體治療的動物，將腦切片用針對 olig2、GFAP 或 NeuN 的抗體進行染色。所有切片均用 DAPI 及針對 GFP 的抗體進行共同染色，然後用螢光二級抗體進行染色。在 Leica Aperio Versa 200 玻片掃描儀上掃描玻片，並從 eSlide Manager

下載，以在 HALO 成像軟體(Indica Labs)上進行分析。對每隻動物右腦半球取樣五個區域，並對具有每種細胞類型標記的細胞進行定量。藉由調整以下設定來檢測細胞：在細胞核檢測標籤下的「最小核強度」、「核大小」、「核分割積極性(nuclear segmentation aggressiveness)」及「最小核圓度」。然後，對於每種單獨的染料定義基準，以進一步鑑定細胞並為每種標記產生定量的總細胞數。基於檢測所欲細胞類型的敏感性及可靠性而依據經驗地確定設定；在一些情況下，設定例如細胞質中的 NeuN 檢測並不能反映標記的真正細胞內定位，但可提供更高的檢測的特異性及靈敏度。藉由自動方式檢測到的所有細胞均經過手動驗證。對於神經元，在「染料 1」標籤下，調整「細胞核陽性閾值」及「細胞質陽性閾值」以便只檢測在細胞核及細胞質中都存在 NeuN 的細胞。對於星狀細胞，選擇 DAPI 及 GFAP 標記，且兩者都必須存在於細胞的細胞核及細胞質中才能將該細胞包括在計數中。對於寡樹突細胞，細胞如果 DAPI 及 olig2 皆存在於該細胞的細胞核但均不存在於細胞質中，則被計數。對於共定位，使用相同的設定，但是 GFP 被包括作為在神經元的細胞核中，以及在星狀細胞的細胞核及細胞質兩者中的額外染料。將不表現所有選定標記的細胞，藉由使用細胞核或細胞質「遮蔽」功能對其進行「遮蔽」而從所產生之結果表中消除。由於缺少與 olig2 共同定位的 GFP 陽性細胞，而對轉導的寡樹突細胞進行手動計數。在一些情況下，脈絡叢

(choroid plexus)的血管或部分呈現自體螢光，並使用「裁剪」工具手動勾勒出輪廓並排除。所得之值係表示為每種細胞類型標記的 GFP 陽性細胞的百分比。

【0164】

評估神經炎症(CD68 免疫組織化學)

對每隻動物的大腦進行冷凍切片，對 CD68 進行免疫組織化學染色。簡而言之，藉由在 100°C 下，在以 1:100 稀釋於 diH_2O 的基於檸檬酸鹽之抗原修復緩衝液(Vector Laboratories，目錄編號#H-3300)中，將玻片培育 20 分鐘來進行抗原修復。然後洗滌玻片並在含有 0.2% Triton-X 的 1%驢血清中室溫阻斷 15 分鐘。玻片與兔抗小鼠 CD68 初級抗體(Abcam，目錄編號#125212)在 4°C 下陪育隔夜。次日，洗滌玻片並與抗兔 IgG TritC 結合的二級抗體在室溫下培育 1 小時。玻片在 PBS 中洗滌，然後用 diH2O 洗滌 1 分鐘。以 Fluoromount G 或含有 DAPI 的類似介質作為核複染劑蓋上玻片。使用 VIS 圖像分析軟體將 CD68 染色定量為每個視野的陽性面積。藉由將平均視野大小除以視野大小，然後乘以 CD68 陽性面積，而將 CD68 面積標準化為總視野面積(Visiopharm；Hoersholm, Denmark；Version 2019.07.0.6328)。

【0165】

用於己醣胺酶(Hex)分析之樣品製備

藉由在 96 孔黑色塑料分析盤中混合 10 μg 腦組織溶胞產物或 5 μl 血清與 95 μL 反應混合物(1 mM 4-甲基傘形酮-N-乙醯基-β-D-胺基葡萄糖苷(4-Methylumbelliferyl

N acetyl-β-D-glucosaminide)[Sigma M2133]、0.15 M NaCl、0.05% Triton X-100 及 0.1 M 乙酸鈉，pH 3.58)來測量 HEX 活性。將盤密封並在 37°C 下培育 30 分鐘，藉由添加 150 μL 終止溶液(290 mM 甘胺酸及 180 mM 檸檬酸鈉，pH 10.9)終止反應。在 365 nm 激發時，在 450 nm 的發射波長測量來自反應產物的螢光。

【0166】

DNA 萃取及生物分布(TaqMan qPCR)

使用 TaqMan 定量聚合酶鏈反應(qPCR)，對所收集用於載體生物分布分析的組織進行去氧核糖核酸(DNA)萃取及基因體拷貝數定量。簡而言之，將組織機械性均質化並以蛋白酶 K 消化。以 RNA 酶 A 處理樣品，並藉由在 70°C 下，在緩衝液 AL(目錄編號 #19075，QIAGEN)中培育 1 小時來使細胞溶胞。在 QIAGEN 離心管柱上萃取及純化 DNA。在稀釋至≥90 且≤110 ng/μl 的濃度後，使用載體特異性引子及/或轉基因特異性引子重複進行 qPCR 反應。將信號與來自同一研究的幼年動物或陰性對照組動物的已知 DNA 濃度背景下的線性化質體 DNA 的標準曲線進行比較。計算每微克 DNA 的基因體拷貝數。使用額外的對照組來排除 PCR 反應中的交叉污染及樣品干擾。根據預先定義的 Ct 值可接受基準來分析原始數據，並確定每次運行的定量限度。所有數據均包括在批次記錄表中及/或附於批次記錄表中。

【0167】

評估轉基因表現(ELISA)

使用 Qiagen TissueLyzer 將來自額葉皮質的腦組織冷凍樣品在含有 0.9% NaCl(pH 4.0)及 0.05% Triton-X100 的溶液中於 30Hz 下均質化 2 分鐘。樣品在乾冰上冷凍，在室溫下解凍，並短暫渦旋。藉由在桌上型離心機中以 10,000 RPM 離心 10 分鐘來使溶胞產物澄清。

【0168】使用三明治酶聯免疫吸附分析法(ELISA)在腦組織溶胞產物或 CSF 中測量人類 PGRN 表現。簡而言之，ELISA 盤在 4°C 下以抗人類 PGRN 捕獲抗體塗布隔夜。將盤洗滌，然後在含 1%牛血清白蛋白之 PBS 中於室溫下阻斷 2 小時。將盤倒空，將 100 µl 腦組織溶胞產物或 CSF 在室溫下培育 1 小時。將盤洗滌並與經生物素結合的抗人類 IgG 抗體於室溫下培育 1 小時。將盤洗滌並與經卵白素結合的山葵過氧化酶於室溫下培育 1 小時。將盤洗滌並於室溫下在含有 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)顯色基質及 0.004% H_2O_2 之顯影溶液中培育。觀察反應的顯色時間長達 30 分鐘，直到任何孔的顏色顯露出達到飽和。然後藉由添加含有 H_2S0_4 的終止緩衝液淬滅反應，並於 450 nm 測量吸光度。

【0169】

抗轉基因抗體的評估(ELISA)

藉由間接 ELISA 測量血清及 CSF 中的抗人類 PGRN 抗體。簡而言之，將 ELISA 盤以重組人類 PGRN 蛋白(1 µg/mL)於 4°C 塗布隔夜。將盤洗滌，然後在含 1%牛血清白蛋白之 DPBS 中於室溫阻斷 1 小時。將血清樣品以 1:250 稀釋於 DPBS，而 CSF 樣品以 1:5 稀釋。將稀釋的

樣品以一式兩份添加至 ELISA 盤的孔中，並於 37°C 培育 1 小時。將盤洗滌，並與生物素化抗小鼠 IgG 抗體於室溫培育 1 小時，之後洗滌並與經卵白素結合的山葵過氧化酶二級抗體培育 1 小時。將盤洗滌，並於室溫下在含有 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)顯色基質及 0.004% H_2O_2 之顯影溶液中培育。觀察反應的顯色時間長達 30 分鐘，直到任何孔的顏色顯露出達到飽和。藉由添加含有 H_2S0_4 的終止緩衝液淬滅反應，並於 450 nm 測量吸光度。

【0170】

用於 ELISpot 分析的周邊血液單核細胞及淋巴細胞單離

周邊血液單核細胞單離

在預先加標籤的 50 mL 離心管中，以無菌 Hank 平衡鹽溶液(Hank's balanced salt solution；HBSS)稀釋多達 10 mL 的血液。充分混合樣品，然後經 100% Ficoll-Paque Plus 密度梯度離心。去除上層血漿部分。將下面含有 PBMC 的層置於新試管中，洗滌，並使用 ACK 溶胞緩衝液使細胞溶胞。以 DNA 酶 I 處理懸浮液，離心，並去除由溶胞的紅血球所組成的上清液。使白血球沉澱物鬆散、洗滌、以 DNA 酶 I 處理並離心。將沉澱物再懸浮於完全 RPMI 培養基(含有補充有 L-麩醯胺酸、胎牛血清 [FBS]、4-(2-羥乙基)-1-哌咁乙磺酸 [HEPES]、pen/strep 及硫酸鍵他黴素(gentamycin)的 RPMI 1650 培養基)中。

【0171】

肝淋巴細胞單離

收集每隻動物的肝臟切片並於室溫置於無菌 RPMI 1640 培養基中。肝臟收集後不久，將其於培養皿中切成小塊。將此等塊在磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)中洗滌，並使用手動處理器切成 1 mm 大小的碎片或使用自動組織分離器(tissue dissociator)均質化。組織以膠原酶消化並通過 100 μm 及 40 μm 過濾器過濾。將樣品離心，並以補充有 1% FBS 的 PBS 洗滌沉澱物以去除膠原酶。將沉澱物再懸浮於補充有 5% FBS 的 RPMI 1640 培養基中。然後經由 Percoll 梯度，在 20°C(±2°C)下以 2000 RPM 離心 20 分鐘來單離肝淋巴細胞。將肝淋巴細胞在補充有 1% FBS 的 PBS 中洗滌兩次，之後以 1600 RPM 離心 5 分鐘，每次在 20°C(±2°C)下洗滌。將肝淋巴細胞再懸浮於 RPMI 1640 培養基中。

【0172】

脾淋巴細胞單離

收集每隻動物的脾臟切片並於室溫置於無菌 L15 培養基中。隨後將其切成小塊，並使用自動組織分離器研磨或均質化。將漿液通過細胞過濾器過濾至 50 mL 錐形離心管中。將樣品以 1700 RPM 於 20°C(±2°C)離心 5 分鐘，並丟棄上清液。將細胞沉澱物於室溫再懸浮於 ACK 溶胞緩衝液中 3 分鐘。然後，將含有 DNA 酶 I 之 RPMI 1640 培養基添加至樣品，之後立即在 20°C(±2°C)下以 1700 RPM 離心 5 分鐘。細胞沉澱物以 RPMI 1640 培養基洗滌以去除 DNA 酶 I 及溶胞緩衝液並離心。將經洗滌的脾細胞再懸浮於 RPMI 1640 培養基中。

【0173】

骨髓淋巴細胞單離

將骨髓於室溫收集到含有肝素及PBS的管中。骨髓在無菌HBSS中稀釋並通過70 μm過濾器過濾，之後通過40 μm過濾器過濾，或者使用自動組織分離器均質化。將過濾的骨髓置於新試管中的Ficoll-Paque層頂部，並以2500 RPM離心25分鐘來離心分離。去除上層部分，並將含有骨髓淋巴細胞的部分移入新試管中。細胞以HBSS洗滌並以1700 RPM離心5分鐘。將細胞沉澱物再次以完全RPMI培養基(含有補充有L-麩醯胺酸、FBS、HEPES、pen/strep及硫酸鏈他黴素的RPMI 1650培養基)洗滌，並以1700 RPM離心5分鐘。將沉澱物再懸浮於RPMI 1640培養基中。

【0174】

中和抗體分析

如前所述評估針對AAVhu68的中和抗體(Calcedo R, et al. J Infect Dis. 2009；199(3):381-90)。

【0175】

感覺神經傳導研究

以氯胺酮/右美托咪定(dexmedetomidine)的組合使動物鎮靜。將經鎮靜動物以側臥或背臥放在帶有加熱袋的手術台上，以保持體溫。由於可能會干擾電信號採集，而未使用電子加熱設備。

【0176】感覺神經傳導研究(NCS)，亦稱為感覺神經傳導速度(NCV)測試，使用Nicolet EDX®系統(Natus

Neurology)及 Viking®分析軟體進行，以測量感覺神經動作電位(SNAP)振幅及傳導速度。簡而言之，將刺激探針放置在正中神經上，陰極最靠近記錄部位。將兩個針狀電極皮下插入到第二趾的遠端趾骨(參考電極)及近端趾骨(記錄電極)的水準，而接地電極放置在刺激探針(陰極)的近端。使用 WR50 Comfort Plus Probe 兒科刺激器(Natus Neurology)。激發的反應被有差異地放大並顯示在監視器上。最初的採集刺激強度設置為 0.0 mA，以便確認缺乏背景電信號。為了找到最佳的刺激位置，將刺激強度增加至 10.0 mA，並在沿正中神經移動探針時產生一連串刺激，直到找到最佳位置為止(由最大確定波形決定)。將探針保持在最佳位置，刺激強度以逐步的方式逐漸增加至 10.0 mA，直到峰值振幅響應不再增加為止。最後 30 個刺激反應被記錄並保存於軟體中。對於正中神經，平均最多 10 次最大刺激反應並報告。測量從記錄部位到刺激陰極的距離(cm)，並將其輸入軟體中。使用反應的起始潛伏期及距離(cm)計算傳導速度。報告傳導速度及 SNAP 振幅的平均值兩者。對雙側正中神經進行測試。儀器生成的所有原始數據皆被保留作為研究文件的一部分。

【0177】

實施例 2：重組 AAV1.hPGRN

藉由 HEK293 細胞之三重質體轉染，利用以下產生 rAAV1.PGRN：1)兩側為 AAV ITR 的編碼轉基因表現匣的 AAV 順式質體(稱為 pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.

KanR)；2)編碼 AAV2 *rep* 及 AAV1 *cap* 基因的 AAV 反式質體(稱為 pAAV2/1.KanR)；及 3)輔助腺病毒質體(稱為 pAdΔF6.KanR)。

A.AAV 載體基因體質體序列元件

【0178】來自順式質體(稱為 pENN.AAV.CB7.CI.hPGRN.rBG.KanR(p4862))中的載體基因體的線性圖譜。參見圖 2。

【0179】順式質體含有以下載體基因體序列元件：

1.反向末端重複(ITR)：ITR 為源自 AAV2 之相同、反向互補的序列(130 個鹼基對[bp]，GenBank：NC_001401)，其位於載體基因體所有組件的兩側。當反式提供 AAV 及腺病毒輔助功能時，ITR 功能為載體 DNA 複製的起始與載體基因體的包裝訊息二者。從而，ITR 序列代表載體基因體複製及包裝所需的唯一順式序列。

2.人類巨細胞病毒立即早期強化子(CMV IE)：獲自人類衍生之 CMV 的此強化子序列(382 bp，GenBank：K03104.1)增加下游轉基因的表現。

3.雞 β-肌動蛋白啟動子(BA)：選擇此普遍存在的啟動子(282 bp，GenBank：X00182.1)來驅動任何 CNS 細胞類型中的轉基因表現。

4.嵌合內含子(CI)：雜合的內含子由雞 β-肌動蛋白剪接供給體(973 bp，GenBank：X00182.1)與兔 β-球蛋白剪接接受體元件所組成。內含子被轉錄，但藉由剪接將其從成熟的 mRNA 中移除，從而將其任一側的序列匯集在一起。在表現匣中內含子的存在已顯示促進 mRNA

從細胞核到細胞質的運送，因此增強用於轉譯之 mRNA 之穩定水準的蓄積。此為欲增加基因表現水準的基因載體的共同特徵。

5.編碼序列：人類 *GRN* 基因的工程化 cDNA(1785 bp，包括兩個終止密碼子)，編碼人類 PGRN(hPGRN)蛋白(593 個胺基酸[aa]，GenBank：NP_002078)，其涉及溶酶體功能及其它神經系統角色。

6.兔 β-球蛋白多腺核苷酸化訊息(rBG PolyA)：rBG polyA 訊息(127 bp，GenBank：V00882.1)以順式促進轉基因 mRNA 的高效多腺核苷酸化。此元件用作轉錄終止的訊息、在初生轉錄本的 3'端的特異性裂解事件及添加長多腺核苷酸尾。

B.AAV1 反式質體：pAAV2/1.KanR(p0069)

【0180】AAV2/1 反式質體為 pAAV2/1.KanR(p0069)。pAAV2/1.KanR 質體為 8113 bp 長且編碼複製及包裝 AAV 載體基因體所需的四種野生型 AAV2 複製酶(Rep)蛋白。pAAV2/1.KanR 亦編碼三種野生型 AAV1 病毒顆粒子蛋白質殼體(Cap)蛋白，此等組裝成 AAV 血清型 1(AAV1)的病毒粒子外殼，以容納 AAV 載體基因體。包含於 pAAV2/1.KanR 中的 AAV1 *cap* 基因係單離自猿猴來源。

【0181】為了創建 pAAV2/1.KanR 構築體，將來自 p5E18(2/2)的 3.0 千鹼基(kb)片段、來自 pAV1H 的 2.3kb 片段及來自 p5E18(2/2)的 1.7kb 片段合併以形成 pAAV2/1(p0001)，其在安比西林抗性(AmpR)匣中含有 AAV2 *rep* 及 AAV1 *cap*(在文獻中稱為 p5E18[2/1])。此選

殖策略亦將 AAV *p5* 啟動子序列(通常驅動 *rep* 表現)從 *rep* 的 5'端遷移至 *cap* 的 3'端，在 *rep* 的上游留下一個截短的 *p5* 啟動子。此截短的啟動子調降 *rep* 的表現，從而使載體的產量最大化(Xiao et al., (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 73(5):3994-4003)。

【0182】為了產生用於臨床產品生產的 pAAV2/1.KanR，將 pAAV2/1 主鏈序列中的安比西林抗性(*AmpR*)基因替換為康黴素抗性(*KanR*)基因。反式質體的所有組件部分均已藉由直接定序驗證。

【0183】

C.腺病毒輔助質體：pAdDeltaF6(KanR)

質體 pAdDeltaF6(KanR)在賓州大學的 James M. Wilson 博士及其同事的實驗室中構築而成，大小為 15,774 bp。該質體含有對 AAV 複製很重要的腺病毒基因體區域；即，*E2A*、*E4* 及 *VA* RNA(腺病毒 E1 之功能由 HEK293 細胞提供)。然而，該質體並不含有其它腺病毒複製或結構基因。該質體並不含有對複製重要的順式元件，例如腺病毒 ITR；因此，預期不會產生感染性腺病毒。質體源自 Ad5 之 E1、E3 缺失分子殖株(pBHG10，一種 pBR322 系質體)。將缺失導入至 Ad5 中以去除不必要之腺病毒基因的表現並將腺病毒 DNA 的量從 32 kb 減少到 12 kb。最後，以康黴素抗性基因替換安比西林抗性基因，以產生 pAdeltaF6(KanR)。保留在此質體中的 *E2*、*E4* 及 *VAI* 腺病毒基因，以及存在於 HEK293 細胞中的 *E1*，對於 AAV 載體生產都是必需的。

【0184】根據 USP<791>確定的最終產物的 pH 值應在 6.2 至 7.7 範圍內，根據 USP<785>確定的滲透壓成分應為 260 至 320 mOsm/kg，且藉由 ddPCR 測定的 GC 效價大於或等於 2.5×10^{13} GC/mL(Lock et al, (2014). "Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR." Hum Gene Ther Methods. 25(2):115-25)。

【0185】

實施例 3：在鼠類疾病模式中的人類 PGRN 轉基因之 AAV 媒介的遞送

使用例如 WO 2018/160582 所述之已公開的三重轉染技術，產生具有 AAVhu68 殼體且在 CB7 啟動子及嵌合內含子(CB7.CI.hPGRN.rBG)的控制下表現人類 PGRN(SEQ ID NO：3)之重組 AAV 載體。

【0186】在 *Grn* 剔除小鼠模式中評估人類 *Grn* 轉基因的 AAV 媒介的遞送。用於 *Grn* 突變(*Grn*+/-)的小鼠異基因型組合並未呈現與 *Grn* 相關的神經退化性疾病的病理學特徵，可能是因為小鼠的壽命未能允許發展出 GRN 單套缺失的後遺症，GRN 單套缺失在人類中數十年後才首次呈現徵兆。相較之下，*Grn*-/-小鼠中完全 PGRN 缺失則概括了在人類中 *Grn* 單套缺失的幾個早期特徵，例如溶酶體功能受損、自體螢光的溶酶體貯積物質(脂褐質)的蓄積及小神經膠質細胞的活化，雖然 *Grn*-/-小鼠直至兩歲都沒有呈現神經元損失(Lui H, et al. Cell.

2016；165(4):921-35；Ward ME, et al. Sci Transl Med. 2017 Apr 12；9(385):pii: eaah5642)。*Grn*+/-及 *Grn*-/-小鼠均被報導表現出行為異常，但各組之間的發現不一致(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010；177(1):311-24；Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012；228(1):67-76；Ghoshal N, et al. Neurobiology of Disease. 2012；45(1):395-408；Filiano AJ, et al. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013；33(12):5352-61；Yin F, et al. The FASEB Journal. 2010；24(12):4639-47)。同樣地，一些報告表明 *Grn*-/-小鼠的生存期降低，而另一些報告則發現 *Grn*-/-小鼠的壽命正常，這與我們的經驗一致(Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010；177(1):311-24；Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012；228(1):67-76)。儘管 *Grn*-/-小鼠並未呈現明顯的神經退化或神經病學徵象，但與人類中 *Grn* 單套缺失的顯著生化及組織學相似性，使其成為評估新穎療法的潛在有益模式。因此，將分析聚焦於在 *Grn*-/-小鼠中的此等生化及組織學上的發現。

【0187】這項研究的目的為評估將人類 *Grn* 基因遞送至大腦是否可在 *Grn*-/-小鼠中消除現有的溶酶體貯積物質並正常化溶酶體的功能。對於溶酶體貯積的反應，細胞調升溶酶體酵素的表現，其可用作溶酶體貯積病的生物標記(Hinderer C, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014；22(12):2018-27；Gurda BL, et al. Molecular therapy : the

journal of the American Society of Gene Therapy. 2016；24(2):206-16；Karageorgos LE, et al. Experimental Cell Research. 1997；234(1):85-97)。評估來自不同年齡的*Grn*-/-及*Grn*+/+小鼠的腦組織中的溶酶體酵素己醣胺酶的活性、以及皮質、海馬迴及視丘中的脂褐質沉積物(圖 3A-圖 3D)。在整個生命中，己醣胺酶活性的升高為明顯的，而脂褐質則呈現漸進的蓄積。脂褐質早在 2 個月齡時就很明顯，此與先前的發現一致(Klein ZA, et al. Neuron. 2017；95(2):281-96 e6)。以基於天然單離物 AAVhu68 的 AAV 載體進行初步研究，該單離物與分支群 F 單離物 AAV9 密切相關。以腦室內(ICV)注射表現人類 *Grn* 的 AAVhu68 載體或媒劑(PBS)治療 2-3 月齡之*Grn*-/-小鼠(每組 N=10)。此外，以媒劑注射同齡群(cohort)的野生型小鼠(N=10)。因為 2 月齡小鼠的小尺寸難以經由 ICM 途徑而可靠地投予載體，所以使用 ICV ROA(涉及將 AAV 載體直接注射到腦室的 CSF 中)，ICM 途徑為用於 NHP 研究及擬議的 FIH 臨床試驗的 ROA。先前的研究證實，以本研究選擇的劑量(10^{11} GC)，AAVhu68 之 ICV 投予造成僅限於經注射的腦室的附近大腦區域之轉導作用，使其成為一種有用系統，以評估是否可透過藉由小細胞族群分泌 PGRN 而實現全面改善腦病灶。

【0188】投予載體兩個月後，對動物實施安樂死，並收集大腦、CSF 及血清。大腦中人類 PGRN 蛋白質水準的定量證實 AAV 治療組的轉導(圖 4)。PGRN 為一種

可在 CSF 中測定的分泌性蛋白質，且在人類 GRN 突變攜帶者的 CSF 中會降低(Lui H, et al. Cell. 2016；165(4):921-35；Meeter LH, et al. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2016；6(2):330-40)。因此，評估經 AAV 治療的 *Grn*$^{-/-}$小鼠之 CSF 中 PGRN 蛋白質的水準，其顯示平均 CSF 濃度為 14 ng/mL，而在經媒劑處理之組別中，人類 PGRN 低於檢測水準(圖 4)。PGRN 的表現伴隨著溶酶體酵素表現的正常化，在經 AAV 治療的 *Grn*$^{-/-}$小鼠的大腦中 Hex 活性水準恢復到接近正常水準(圖 5)。在血清中，經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠的 HEX 活性顯著高於經媒劑處理的 WT 小鼠。相較之下，經 AAV 治療的 *Grn*$^{-/-}$小鼠中的 HEX 活性顯著低於經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠，並與經媒劑處理的 WT 小鼠相似。

【0189】確認在 *Grn*$^{-/-}$小鼠的大腦中的 PGRN 表現後，評估 PGRN 表現是否減少海馬迴、視丘及皮質中脂褐質沉積物的數量。為此目的，將未染色的經固定之大腦切片置於蓋玻片上，並以盲測法對自體螢光的脂褐質進行成像並定量。與經媒劑處理的 WT 小鼠相比，經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠的海馬迴、視丘及額葉皮質中存在明顯更多的脂褐質沉積物。相較之下，AAV 投予顯著減少 *Grn*$^{-/-}$小鼠所有三個腦區域中脂褐質沉積物的數量至與經媒劑處理的 WT 小鼠相當的水準(圖 6)。

【0190】概念研究的初步驗證證明，當貯積物質剛開始出現在大腦中時，早期治療的小鼠中 AAV 媒介的 PGRN 表現的治療活性。隨後評估基因轉移對具有早已

存在更嚴重之病理的老年小鼠的影響。在此研究中，7月齡之 *Grn*$^{-/-}$小鼠接受單次 ICV 注射表現人類 PGRN 之 AAVhu68 載體或媒劑，並於 11 月齡時犧牲。除了廣泛的腦脂褐質沉積物外，11 月齡的 *Grn*$^{-/-}$小鼠呈現廣泛的小神經膠質細胞增生，類似於患有由 *Grn* 突變引起的 FTD 的患者(圖 7A–圖 7C)(Ahmed Z, et al. Journal of neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2007 Feb 11；4:7)。GRN 基因的轉移減少了老年小鼠的腦 Hex 活性及脂褐質沉積物，這與在較年幼動物中的發現相似。此外，小神經膠質細胞的大小及數量在經治療的小鼠大腦中被正常化。

【0191】在累計上，將表現人類 PGRN 之 AAV 載體以 ICV 遞送到 *Grn*$^{-/-}$小鼠的腦清除了脂褐質聚集體，且幾乎完全正常化溶酶體酵素活性，表明 PGRN 基因遞送可有效改正 *Grn* 相關神經退化性疾病的潛在病理生理學的關鍵方面。

【0192】

實施例 4：於非人類靈長類動物中之 AAV 媒介的 GRN 基因遞送

此研究評估四種載體(PBFT02、AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG、AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40 及 AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG)，其表現人類顆粒蛋白前驅物(GRN)基因，該基因編碼顆粒蛋白前體(PGRN)蛋白。然而，各候選物由不同的血清型、啟動子、工程化轉基因(SEQ ID NO：3 或 4)及轉錄終止子組合所組成。

【0193】載體以 3.0 x 10^{13} 基因體拷貝數(GC)/動物的單次腦大池內(ICM)劑量投予至成年非人類靈長類動物(NHP)。生活中的評估包括日常觀察、體重測量、血液及腦脊髓液(CSF)臨床病理學測定盤(細胞計數、差異、臨床化學及/或總蛋白)，以及對 CSF 及血清中轉基因表現的評估。亦在顯示最高轉基因表現水準的組別中測量 CSF 及血清中針對轉基因的抗體。在第 35 天或第 60 天對所有 NHP 進行屍體剖檢，並評估來自具有最高轉基因表現水準組別的腦及脊髓的組織病理學。

【0194】分組後，每隻動物以 3.0 x 10^{13} GC(3.3 x 10^{11} GC/g 腦)的劑量接受以下測試物品之一的單次 ICM 注射：

1.PBFT02

2.AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG

3.AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG

4.AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40

研究設計總結於下表中。

組別	處理	動物 ID	性別	劑量 (GC/動物)	劑量 (GC/g 腦)[a]	屍體剖檢日
1	PBFT02	RA3151	M	3.0 x 10^{13}	3.3 x 10^{11}	35±2
		RA3170	M			
2	AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG	RA3155	M	3.0 x 10^{13}	3.3 x 10^{11}	35±2
		RA3160	M			
3	AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG	RA2981	F	3.0 x 10^{13}	3.3 x 10^{11}	35±2
		RA2982	F			
4	AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40	RA3027	M	3.0 x 10^{13}	3.3 x 10^{11}	60±4
		RA3153	M			

[a] 對於成年恆河獼猴使用 90 克腦質量計算數值

*縮寫：*F，雌性；GC，基因體拷貝數；ICM，腦大池內；ID，識別號；M，雄性；N/A，不適用；ROA，投予途徑。

【0195】在 CSF 中，對於所有測試的載體，在第 7 天檢測到人類 PGRN 的表現。到第 14 天，對於所有測試的載體，PGRN 的表現皆超過在健康人類對照樣品中所發現的平均表現水準。在投予 PBFT02 的 NHP 的 CSF 中表現始終最高。從第 7–35 天，投予 PBFT02 的動物的平均 PGRN 濃度比正常人類 CSF PGRN 水準高約 40 倍(圖 8)。對於投予 PBFT02 的兩隻 NHP，CSF PGRN 水準似乎在第 21-28 天左右達到峰值。在血漿中，對於所有測試的載體，在第 7 天檢測到人類 PGRN 的表現。在第 7 天及第 14 天，在投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 中的 PGRN 表現水準超過健康人類對照樣品所公開的 PGRN 濃度，且兩種載體的表現似乎在第 14-21 天左右達到峰值。相較之下，投予 AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 在血漿中顯示出較低水準的 PGRN(圖 8)。

【0196】因為與其它組別相比，在研究期間，投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 在 CFS 及血漿中呈現出更高水準的 PGRN，而僅評估此等組別對轉基因的抗體反應。在 CSF 中，在 7-35 天內，於投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 中檢測到抗 PGRN 抗體的存在。與投予 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的彼等 NHP 相比，投予 PBFT02 的 NHP 顯示出更早的抗體反應(圖 9)。在血清中，在 7-14 天內，於投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 中檢測到抗 PGRN

抗體的存在。兩個治療組別之間出現抗體反應的時間相似(圖 9)。

【0197】所有 NHP 都存活至預定的研究終點(第 1-3 組為第 35±2 天，第 4 組為第 60±4 天)。對所有動物進行屍體剖檢。在日常觀察中沒有發現與治療相關的異常。在整個研究過程中，所有動物的體重都是穩定的(圖 10)。

【0198】CSF 分析顯示，所有投予的載體在 AAV 投予後 7-21 天開始出現無症狀的淋巴細胞增多症(圖 11)。與研究中的其它動物相比，投予 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG(RA2981 及 RA2982)的兩隻動物及投予 AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40(RA3153)的一隻動物顯示出一般較溫和的細胞增多症。CSF 白血球計數從峰值水準下降，但在研究中的大多數動物屍體剖檢時仍保持升高的水準。

【0199】在所研究的任何動物中都沒有與治療相關的大體病理學發現。由於在研究期間投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 在 CSF 及血漿中表現出更高水準的 PGRN，而僅對此等組別進行腦及脊髓的組織病理學檢查。投予 PBFT02 或 AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG 的 NHP 在腦膜及脈絡叢中顯示偶爾的最小淋巴細胞浸潤。在一些 DRG 及脊髓切片中亦觀察到感覺神經元及其相關軸突的退化。感覺神經元的發現在嚴重程度上從典型極輕微至輕微，且與臨床徵象無關。

【0200】

ICM 投予 AAV1 及 AAVhu68 載體至非人類靈長類動物後 CNS 轉導的不同型態

以 AAV1 載體治療的 NHP 的 CSF 中表現明顯較高 PGRN，促使進一步探索 AAV1、AAV5 及 AAVhu68 載體轉導型態的差異。對 NHP 進行單次 ICM 注射表現 GFP 報導基因的 AAV1、AAV5 或 AAVhu68 載體($3x10^{13}$ GC，每種載體 n=2)。注射後 28 天犧牲動物用於腦轉導的組織學分析。

【0201】免疫組織化學顯示，以 AAV1 及 AAVhu68 載體治療的 NHP 大腦遍及瀰漫性、片狀的轉導。在接受 AAV5 載體的動物大腦中明顯為最小的轉導。為了更準確地特性化 AAV1 與 AAVhu68 之間的轉導差異，開發一種半自動方法以定量從多個大腦區域所收集的切片中的轉導細胞。使用以針對 GFP 的螢光標識抗體染色的切片、及特定細胞類型的標記，分別藉由 NeuN、olig2 及 GFAP 染色對神經元、寡樹突細胞及星狀細胞的總數進行定量，之後定量各類型的 GFP 表現細胞(圖 12、圖 13)。在所有檢測的區域中，AAV1 及 AAVhu68 型各自轉導不到各種細胞類的百分之一。兩種載體之間神經元的轉導幾乎相等，而 AAVhu68 似乎適度轉導了更多數量的星狀細胞及寡樹突細胞。

【0202】鑑於以 AAV1 達到的 CSF PGRN 水準明顯更高，用 AAV1 及 AAVhu68 載體所觀察到的大致等效的腦轉導為出乎意料的。藉由免疫組織化學在以 AAVhu68 治

療的動物及以 AAV1 治療的動物 RA1826 的側腦室及第四腦室的多個區域中評估室管膜細胞的轉導。令人感興趣的是，來自經 AAV1 治療的動物(RA1826)的多個腦切片(含有部分腦室系統)證實沿腦室排列的室管膜細胞的廣泛轉導，其在經 AAVhu68 治療的動物中均未觀察到(未顯示)。在所有採樣區域，包括側腦室及第四腦室的額角、顳角及枕角，平均轉導 48%的室管膜細胞。相反地，在給予 AAVhu68 載體之動物的相同大腦區域中，只有 1-2%的室管膜細胞被轉導。在第二隻經 AAV1 治療的動物中，僅可評估一個側腦室的小片段，該動物顯示出大約 1%的室管膜細胞轉導，儘管分析僅限於小的取樣區域。此等發現暗示，在兩個血清型之間其它類型的細胞轉導顯示相似的情況下，在經 AAV1 治療的動物中之高度轉導的室管膜細胞可能是 CSF 中之高水準 PGRN 的來源。由分泌的 PGRN 媒介的旁觀者效應(bystander effect)使得由 GRN 突變引起的 FTD 特別適於 AAV 基因治療。由於細胞外 PGRN 可被神經元吸收，因此以 AAV1 載體達到高 CSF PGRN 水準(顯然由強健的室管膜細胞轉導所媒介)使 AAV1 成為一種 GRN 基因治療的理想選擇。

【0203】累積起來，此等研究確立了鞘內 AAV 遞送在大型動物模式的 CSF 中實現治療性 PGRN 表現水準的潛力。

【0204】

實施例 5：在 *Grn*$^{-/-}$小鼠腦室內投予後 PBFT02 的功效以確定最小有效劑量(MED)

本藥理學研究的目的為在 *Grn*$^{-/-}$小鼠腦室內(ICV)投予 PBFT02 後評估最小有效劑量(MED)及轉基因表現水準，該 PBFT02 為一種重組腺相關病毒(AAV)血清型 1 載體，表現人類顆粒蛋白前驅物(GRN)基因，該基因編碼顆粒蛋白前體(PGRN)蛋白。

【0205】成年 *Grn*$^{-/-}$ 小鼠(6.5–8.5 月齡)以 4.4 x 10^9 基因體拷貝數[GC]/動物、1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動物或 1.3 x 10^{11} GC/動物(分別為 1.1 x 10^{10} GC/g 腦、3.3 x 10^{10} GC/g 腦、1.1 x 10^{11} GC/g 腦、3.3 x 10^{11} GC/g 腦)的四個劑量水準之一接受單次 ICV 投予 PBFT02。另外的 *Grn*$^{-/-}$小鼠及 C57BL/6J 野生型小鼠投予媒劑(鞘內最終調配緩衝液[鞘內最終調配緩衝液，ITFFB])作為對照組。

【0206】下表列出各組名稱、劑量水準及投予途徑(ROA)。

表.組別、劑量水準及投予途徑

組別號	N 及性別	基因型	治療	劑量 (GC/動物)	劑量 (GC/g 腦)[a]	劑量體積 (μL)	ROA	投劑日	屍體剖檢日
1	6 M，9 F	*Grn*$^{-/-}$	PBFT02	1.3 x 10^{11}	3.3 x 10^{11}	7.0	ICV	1	90±3
2	9 M，6 F	*Grn*$^{-/-}$	PBFT02	4.4 x 10^{10}	1.1 x 10^{11}	7.0	ICV	1	90±3
3	9 M，6 F	*Grn*$^{-/-}$	PBFT02	1.3 x 10^{10}	3.3 x 10^{10}	7.0	ICV	1	90±3
4	9 M，6 F	*Grn*$^{-/-}$	PBFT02	4.4 x 10^{9}	1.1 x 10^{10}	7.0	ICV	1	90±3
5	6 M，9 F	*Grn*$^{-/-}$	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90±3
6	6 M，9 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90±3
7	6 M，9 F	*Grn*$^{-/-}$	未處理	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1[b]
8	9 M，6 F	野生型	未處理	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1[b]

[a] 對於成年小鼠使用 0.4 g 腦質量計算數值

[b] 未處理的基線同齡群(第 7 組及第 8 組)在第 7 天進行屍體剖檢，但為了分析的目的將其稱為第 1 天。

*縮寫：*F，雌性；GC，基因體拷貝數；*Grn*，顆粒蛋白前驅物(基因，小鼠)；ICV，腦室內；ID，識別號；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；M，雄性；N，動物數量；N/A，不適用；ROA，投予途徑。

【0207】在基線(第-7 天至第 0 天)，在投劑前從動物採血並儲存用於將來分析。在投劑當天(第 1 天)，成年 *Grn*$^{-/-}$小鼠(6.5-8.5 月齡)接受單次 ICV 投予 PBFT02(4.4 x 10^9 GC/動物、1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動物或 1.3 x 10^{11} GC/動物)或媒劑(ITFFB)。年齡相符的野生型小鼠亦投予媒劑作為對照組。在投予當天(第 1 天)，亦將未處理的 *Grn1*$^{-/-}$小鼠及野生型小鼠屍體剖檢作為對照組，以評估臨床病理學及組織病理學的基線異常，以及 PBFT02 對疾病相關之腦異常的進展或解決的影響。

【0208】每天監測給予 PBFT02 或媒劑的小鼠的生存力並每週稱重。在第 90 天，對所有生存的老鼠進行屍體剖檢。在屍體剖檢時，分別收集血液及組織用於臨床病理學(CBC 及血清化學)及組織病理學。收集 CSF 以測量轉基因產物表現(人類 PGRN 蛋白)。收集腦組織以評估 *Grn*$^{-/-}$小鼠模式的疾病相關生物標記特徵。此等生物標記包括大腦貯積物質蓄積(脂褐質沉積物)及神經炎症(CD68免疫組織化學來標記小神經膠質細胞)，此等在視丘、皮質及海馬迴中被定量。大腦第三額葉部分(包括額葉皮質)的溶胞產物用於評估溶酶體酵素 HEX 的活性。

【0209】在研究期間，所有組別在 PBFT02 或媒劑投予後均維持體重(圖 14)。

【0210】在 PBFT02 投予後 90 天，在屍體剖檢小鼠的 CSF 中測量轉基因產物的表現(人類 PGRN 蛋白)。相

較於經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$對照組，人類 PGRN 在 CSF 的表現在 PBFT02 的兩種最高劑量(4.4 x 10^{10} GC 及 1.3 x 10^{11} GC)下增加(圖 15)。在投予兩種最低劑量(4.4 x 10^{9} GC 或 1.3 x 10^{10} GC)之 PBFT02 的 *Grn*$^{-/-}$小鼠中，人類 PGRN 表現似乎與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠及野生型對照組相似。然而，PGRN ELISA 分析的 LOD 為 1.25 ng/mL，因此限制了檢測兩種最低劑量以及經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$及野生型對照組中 PGRN 表現上變化的能力。

【0211】與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$對照組相比，在第 90 天的 CBC 或血清化學檢測盤上未觀察到與 PBFT02 投予的相關異常。在盲測肉眼觀察及顯微鏡觀察評估中，沒有與 PBFT02 投予相關的組織病理學發現。

【0212】在基線及 PBFT02 投予後 90 天，在屍體剖檢小鼠的三個腦區域(視丘、皮質及海馬迴)中定量脂褐質沉積物。在基線及第 90 天，與皮質及海馬迴相比，視丘中的脂褐質沉積物皆更豐富，這暗示視丘可能比其它腦區域對評估脂褐質聚集物提供更高的敏感性。在視丘中，在未處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠中觀察到的基線脂褐質計數比未處理的野生型對照組更高。在第 90 天，經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠的平均脂褐質計數高於未經處理的 *Grn*$^{-/-}$基線對照組，表明脂褐質沉積物逐漸增加。相較之下，所有經 PBFT02 處理的組別(4.4 x 10^{9} GC/動物、1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動物及 1.3 x 10^{11} GC/動物)均顯示脂褐質計數顯著低於經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠。未觀察到劑量依賴性反應，因為所有 PBFT02 劑量

組別的脂褐質計數相似。由於所有 PBFT02 處理組別的平均脂褐質計數與未處理的 *Grn*$^{-/-}$基線對照組相似，而在 90 天的研究期間，所有劑量水準的 PBFT02 投予似乎都防止脂褐質的逐步蓄積(圖 16A–圖 16C)。在皮質及海馬迴中，在基線時，未處理的 *Grn*-/-小鼠中所觀察到的平均脂褐質計數高於未處理的野生型對照組。類似地，在第 90 天，在經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠亦觀察到比經媒劑處理的野生型小鼠更高的平均脂褐質計數。所有經 PBFT02 治療的組別(4.4 x 10^{9} GC/動物、1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動物及 1.3 x 10^{11} GC/動物)在第 90 天的平均脂褐質計數均顯示低於經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠，儘管該減少僅在 1.3 x 10^{10} GC/動物的劑量時在皮質具有統計學意義。未觀察到劑量依賴性反應，因為所有四個 PBFT02 劑量組別的脂褐質計數相似。

【0213】在基線及 PBFT02 投予後 90 天，在屍體剖檢小鼠的三個腦區域(視丘、皮質及海馬迴)中定量神經炎症標記 CD68。藉由定量 CD68 染色陽性的組織面積來評估 CD68 表現。在基線時，當與未處理的野生型對照組相比，未處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠在視丘、皮質及海馬迴中觀察到更高的平均 CD68 表現。類似地，在第 90 天，與經媒劑處理的野生型對照組相比，在經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠的視丘、皮質及海馬迴中觀察到更高的平均 CD68 表現。在第 90 天的視丘中，觀察到一般劑量依賴性反應，及當與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠相比，三種最高 PBFT02 劑量組別(1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動

物及 1.3 x 10^{11} GC/動物)顯示出顯著降低的 CD68 表現(圖 17A)。值得注意的是，與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠相比，投予最高劑量的 PBFT02(1.3 x 10^{11} GC/動物)的小鼠顯示 CD68 表現降低約 4 倍。在第 90 天的皮質中，所有經 PBFT02 處理之組別的平均 CD68 表現均降低，儘管該降低與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠中的 CD68 表現沒有顯著差異。未觀察到劑量依賴性反應(圖 17B)。在第 90 天的海馬迴中，與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠相比，所有 PBFT02 劑量組別(4.4 x 10^{9} GC/動物、1.3 x 10^{10} GC/動物、4.4 x 10^{10} GC/動物及 1.3 x 10^{11} GC/動物)均顯示顯著較低的 CD68 表現。此外，對於所有劑量的 PBFT02，CD68 表現與經媒劑處理的野生型對照組相似。此反應並非劑量依賴性的，因為在所有劑量的 PBFT02 中 CD68 的表現都相似(圖 17C)。

【0214】在基線及 PBFT02 投予後第 90 天，對主要由皮質組織組成的腦第三額葉部分的溶胞產物進行 HEX 活性分析。在基線，在未處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠中腦 HEX 活性高於未處理的野生型對照組。在第 90 天，與經媒劑處理的 *Grn*$^{-/-}$小鼠相比，投予最高 PBFT02 劑量(1.3 x 10^{11} GC/動物)之 *Grn*$^{-/-}$小鼠顯示顯著降低的腦 HEX 活性。再者，在最高劑量組別(1.3 x 10^{11} GC/動物)的 HEX 活性相似於經媒劑處理的野生型對照組，顯示在此劑量下腦 HEX 水準正常化(圖 18)。

【0215】累積地，*Grn*$^{-/-}$小鼠的 PBFT02 處理導致劑量相關的組織學矯正，在最高劑量(1.3 x 10^{11} GC [3.3 x

10^{11} GC/g 腦])觀察到對脂褐質、神經炎症及溶酶體酵素活性的最廣泛的處理相關影響。最低劑量的 PBFT02(4.4 x 10^{9} GC [1.1 x 10^{10} GC/g 腦])顯著地改善在患有 *GRN* 相關神經退化之患者中所發現的關鍵神經病理學特徵，包括預防視丘中的脂褐質蓄積及減少海馬迴中小神經膠質細胞浸潤(即藉由 CD68 表現所定義的神經炎症)。雖然在此劑量下，組織學矯正僅限於受檢測之腦區域的子集(可能是由於與 $Grn^{-/-}$小鼠的皮質及海馬迴相比，視丘中脂褐質沉積物及 CD68 表現細胞的總體富集程度更高)，且溶酶體酵素活性(藉由 HEX 活性測量)並未正常化，但 MED 被確定為 4.4 x 10^{9} GC(1.1 x 10^{10} GC/g 腦)。

【0216】

實施例 6：野生型小鼠腦室內投予後 PBFT02 的生物分布及轉基因表現

此藥理學研究的目的為評估 PBFT02(一種表現人類顆粒蛋白前驅物(*GRN*)基因的重組腺相關病毒(AAV)血清型 1 載體，該 *GRN* 基因編碼顆粒蛋白前體(PGRN)蛋白)腦室內(ICV)投予後在野生型小鼠中的載體的生物分布及轉基因表現水準。

【0217】在投劑當日(第 1 日)，成年 C57BL/6J 野生型小鼠(3.5-5.5 月齡)接受 PBFT02(1.3 x 10^{11} 基因體拷貝數[GC]/動物[3.3 x 10^{11} GC/g 腦])或媒劑(鞘內最終調配緩衝液[ITFFB])的單次 ICV 投予。

【0218】下表列出各組名稱、劑量水準及投予途徑(ROA)。

表.組別名稱、劑量水準及投予途徑

組別號	N 及性別	基因型	治療	劑量 (GC/動物)	劑量 (GC/g 腦)[a]	劑量體積 (μL)	ROA	投劑日	屍體剖檢日
1	2 M，2 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	10±2
2	4 M，4 F	野生型	PBFT02	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	10±2
3	2 M，2 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	30±3
4	4 M，4 F	野生型	PBFT02	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	30±3
5	2 M，2 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	60±3
6	4 M，4 F	野生型	PBFT02	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	60±3
7	2 M，2 F	野生型	ITFFB	N/A	N/A	7.0	ICV	1	90±5
8	4 M，4 F	野生型	PBFT02	1.3×10^{11}	3.3×10^{11}	7.0	ICV	1	90±5

[a] 對於成年小鼠使用 0.4 g 腦質量計算數值

*縮寫：*F，雌性；GC，基因體拷貝數；ICV，腦室內；ID，識別號；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；M，雄性；N，動物數量；N/A，不適用；ROA，投予途徑。

【0219】選擇 1.3×10^{11} GC/動物的 PBFT02 劑量，因為其為劑量範圍研究中評估的最高劑量，在該劑量範圍研究中確定了最小有效劑量(實施例 5)，且接近小鼠中的最大可行劑量，其受限於體積限制及預期的載體效價。此劑量被預期能夠在小鼠的目標系統(CNS)以及血液及周邊組織中綜合評估載體分布及轉基因產物表現。

【0220】在投予當日(第 1 日)，成年野生型小鼠(3.5-5.5 月齡)接受 PBFT02(1.3×10^{11} GC/動物)或媒劑(ITFFB)的單次 ICV 投予。每天監測所有小鼠的生存力且每週稱重一次。在第 10、30、60 及 90 天的屍體剖檢中收集 CSF、血清及完整的組織清單，以評估載體生物分布及轉基因產物表現(人類 PGRN 蛋白)。

【0221】在整個研究過程中並未發現與 PBFT02 投予相關的臨床異常。在研究期間，所有組別在 PBFT02 或媒劑投予後均維持體重(圖 9)。

【0222】到載體投予後第 10 天，在經 PBFT02 處理之小鼠的目標組織(腦)及所有周邊組織(心臟、肺臟、肝臟、脾臟、腎臟及骨骼肌)中可檢測到 PBFT02 載體基因體。雖然在一些器官的組織內載體基因體水準在第 30、60 及 90 天變動，但通常在第 10 天後觀察到 v 載體基因體水準的下降趨勢，所有組織最終在第 90 天表現出低於第 10 天的載體基因體水準。一個值得注意的例外為腎臟，其在第 90 天顯示出與第 10 天相似的載體基因體水準。在整個研究過程中，與所有其它組織相比，腦表現出最高濃度的載體基因體。在肝臟、脾臟、腎臟及心臟中觀察到較低水準的載體基因體。在整個研究過程中，肺臟及骨骼肌表現出最低水準的載體基因體(圖 20)。

【0223】在整個研究過程中，除了第 60 天的腦及肺臟(分別為動物 8 及 7[第 5 組])及第 30 天的心臟(動物 18[第 3 組])之外，PBFT02 載體基因體在經媒劑處理的小鼠組織中檢測不到。因為在此等組織中觀察到低水準的載體基因體，彼等在經媒劑處理的小鼠中的存在可能是由於樣品處理過程中的污染。

【0224】在 PBFT02 或媒劑投予至野生型小鼠後的第 10、30、60 及 90 天，在目標器官系統(CNS)以及在血清及周邊器官中測量轉基因產物表現(人類 PGRN 蛋白)。在 CSF 中，在整個研究中所評估的所有經媒劑處理的小鼠(14/14 動物)中皆檢測不到人類 PGRN 表現水準。相較之下，與經媒劑處理的對照組相比，PBFT02 的投予導

致在第 10 天及第 30 天的 CSF 中人類 PGRN 表現水準顯著升高。雖然與經媒劑處理的對照組相比，第 60 天及第 90 天的表現水準並未顯著升高，但在大多數受評估的經 PBFT02 處理的小鼠(在第 60 天的 2/5 動物及在第 90 天的 7/8 動物)的 CSF 中仍可檢測到人類 PGRN 表現。

【0225】在第 10、30 及 90 天，經 PBFT02 處理的小鼠顯示平均人類 PGRN CSF 濃度分別為 49.93 ng/mL、34.97 ng/mL 及 31.41 ng/mL。第 60 天為唯一的離群值，平均人類 PGRN 濃度較低，為 1.46 ng/mL。尚不清楚為什麼第 60 天的人類 PGRN 表現水準低於其它時間點的經 PBFT02 治療的組別的表現水準。在此研究中並未分析對於人類轉基因產物的抗體；然而，在第 60 天的經 PBFT02 治療的組別中，動物可能對人類轉基因產物具有抗體反應(圖 21)。

【0226】在大腦中，在第 10、30 及 90 天，與相同時間點的經媒劑處理的對照組相比，經 PBFT02 處理的小鼠顯示出顯著升高的人類 PGRN 水準。與在 CSF 中觀察到的相似，與經媒劑處理的對照組相比，第 60 天在腦中的人類 PGRN 表現水準並未顯著升高，這可能是由於第 60 天的組別中對人類轉基因產物的抗體反應(圖 21)。

【0227】在第 10、30、60 或 90 天，在脊髓中，PBFT02 投予並未顯著增加人類 PGRN 表現高於經媒劑處理的對照組水準(圖 21)。

【0228】在第 10、30、60 或 90 天，在血清中，PBFT02 投予並未顯著增加人類 PGRN 表現高於經媒劑處理的對照組水準(圖 22)。

【0229】在研究期間，在經 PBFT02 處理的小鼠的腎臟、骨骼肌或頸部淋巴結中並未觀察到人類 PGRN 表現的顯著升高。然而，經 PBFT02 處理的小鼠顯示在心臟、肝臟及脾臟中人類 PGRN 表現的短暫升高。在心臟及肝臟中，與經媒劑處理的對照組相比，經 PBFT02 處理的小鼠顯示在第 60 天的人類 PGRN 表現水準顯著升高，但在第 10、30 或 90 天則不然。在脾臟中，與經媒劑處理的對照組相比，經 PBFT02 處理的小鼠顯示第 10 天的人類 PGRN 水準顯著升高，但在第 30、60 或 90 天則不然(圖 23A-圖 23F)。

【0230】雖然 PBFT02 載體基因體在鞘內投予後廣泛分布於組織中，但在整個研究過程中，對於治療 *GRN* 相關神經退化的目標器官系統(即 CNS)顯示出最高的全面載體轉導水準及持續的轉基因產物表現。

【0231】

實施例 7：成年恆河獼猴腦池內投予 PBFT02 的毒物學及生物分布

此毒物學研究的目的為評估 PBFT02(一種表現人類顆粒蛋白前體(PGRN)蛋白的重組腺相關病毒血清型 1(AAV1)載體)在非人類靈長類動物(NHP)的腦大池內(ICM)投予後的安全性、耐受性、生物分布及分泌(泄出)概貌。

【0232】成年雄性及雌性恆河獼猴接受媒劑(鞘內最終調配緩衝液[ITFFB])或劑量為 3.0×10^{12} 基因體拷貝數(GC)(低劑量；3.3×10^{10} GC/g 腦)、1.0×10^{13} GC(中劑量；1.1×10^{11} GC/g 腦)或 3.0×10^{13} GC(高劑量；3.3×10^{11} GC/g 腦)的 PBFT02 的單次 ICM 投予。

【0233】投予日(第 0 天)與代表盡可能多之研究組別的動物在投予日期之間錯開。研究設計總結於下表中。

表.組別名稱、劑量水準及投予途徑

組別	處理(劑量)	劑量(GC)	劑量(GC/g 腦)	動物 ID	性別	ROA	投予體積(mL)	投劑日	屍體剖檢日
1	ITFFB(媒劑)	N/A	N/A	171123	雌性	ICM	1.5	0	90±5
				181323	雄性				
2	PBFT02(低劑量)	3.0×10^{12}	3.3×10^{10}	171229	雌性				
				171250	雌性				
				180668	雄性				
3	PBFT02(中劑量)	1.0×10^{13}	1.1×10^{11}	171118	雌性				
				171306	雄性				
				171311	雄性				
4	PBFT02(高劑量)	3.0×10^{13}	3.3×10^{11}	171209	雄性				
				171246	雌性				
				181330	雄性				

*縮寫：*GC，基因體拷貝數；ICM，腦大池內；ID，識別號；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；N/A，不適用；ROA，投予途徑。

【0234】評估的最高劑量(3.0×10^{13} GC)為基於預期的載體效價及最大投予體積的最大可行劑量。中劑量(1.0×10^{13} GC)及低劑量(3.0×10^{12} GC)分別低於最大可行劑量的 3 倍及 10 倍。選擇此範圍以確保劑量為不同的，並包含在小鼠藥理學研究中所評估的劑量範圍。

【0235】此研究包括第 90 天的屍體剖檢時間點。在先前的 ICM 程序中，已觀察到 DRG 及 TRG 神經元毒性具有可再現的動力學。DRG 及 TRG 神經元在載體投予

後 14-21 天內持續退化。在細胞體退化後，周邊神經及脊髓背柱中的此等細胞的軸突的後續退化(軸突病變(axonopathy))出現在載體投予後約 30 天。在載體投予後 90 天犧牲的動物中，軸突變化持續可見。在載體投予後 180 天，組織學病灶的嚴重程度有時與第 30 天或第 90 天相似，但通常有所改善，可能是因為退化的神經元及其相關軸突已被巨噬細胞清除，巨噬細胞在較早的犧牲時間點即存在。基於此等動力學，我們預計 90 天的屍體剖檢時間點將足以評估 DRG 及 TRG 組織學上的發現以及任何相關的臨床徵象。

【0236】在 PBFT02 投予前的基線及投予後第 14、28 及 90 天進行標準化神經學檢查。動物偶爾不配合檢測，從而妨礙一些評估。然而，在大多數時間點對每隻動物評估檢測的所有必需內容。一隻接受中等劑量之 PBFT02 的動物(1.0 x 10^{13} GC；動物 171311，第 3 組，N=1/3)在第 90 天沒有縮回反射。然而，注意到該動物用雙手及雙腳抓住籠條及網格並正常行走。無反應歸因於焦慮而非深度痛覺的喪失。在整個研究過程中沒有發現其它異常的神經徵象。

【0237】在 PBFT02 投予前的基線及第 28 天及第 90 天對所有動物進行感覺神經傳導研究，以測量雙側正中神經感覺動作電位振幅及傳導速度(圖 25)。

【0238】對於 SNAP 振幅，動物間及動物內的變異性很明顯，但數值通常保持在基線測量範圍內(圖 26A)。一隻經媒劑處理的動物(ITFFB；動物 171123，第 1 組，

1/2 動物)及一隻投予低劑量 PBFT02 的動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 180668，第 2 組，1/3 動物)在第 90 天顯示單側正中神經 SNAP 振幅顯著降低。一隻投予高劑量 PBFT02 的動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 171209，第 4 組，1/3 動物)顯示到第 90 天左右正中神經的雙側正中神經 SNAP 振幅顯著降低。這三隻動物的臨床表現均無異常；然而，在投予高劑量 PBFT02(3.0 x 10^{13} GC)後，動物 171209 的 NCS 的發現確實與正中神經的組織病理學的發現相關。對於正中神經傳導速度，在整個研究過程中沒有觀察到任何動物的顯著變化(圖 26B)。

【0239】在整個研究過程中，所有動物均保持正常體重(圖 27)。

【0240】在血液 CBC、凝血研究或血清化學檢測盤中沒有發現與測試物品相關的顯著異常。所有組別中的數隻動物(5/11)在基線及/或第 0 天顯示出短暫的肌酸磷酸激酶(CPK)升高(>1000 U/L)。由於所有升高都涉及 CPK 的骨骼肌同功型，CPK 升高可能繼發於鎮靜或靜脈穿刺期間的肌肉創傷，因此被認為與測試物品無關。少數經 PBFT02 處理的動物(2/9；動物 180668，3.0 x 10^{12} GC，第 2 組；動物 171209，3.0 x 10^{13} GC，第 4 組)顯示出血清鹼性磷酸酶(ALP；>600 U/L)輕度增加，最初出現在基線或第 60 天。兩隻動物的 ALP 升高一直持續到第 90 天的屍體剖檢。ALP 具有多種同功型，包括在肝臟、腎臟及骨骼中發現的同功型，由於動物的年齡，此等變化被認為最有可能是天然生理性的。在第 90

天，在投予低劑量 PBFT02 的單一動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 17229，第 2 組)中觀察到輕度血小板減少症，但缺乏相關的臨床徵象及低發生率，暗示這種減少可能是人為造成的。

【0241】一些 CSF 樣品含有紅血球，其歸因於 CSF 收集過程中的血液污染。在 5/9(56%)經 PBFT02 處理的動物及 0/2(0%)經媒劑處理的對照組中發生輕度細胞增多症(定義為≥6 個白血球[WBC]/μL)。細胞增多症為淋巴細胞性的(主要由淋巴細胞或淋巴細胞與巨噬細胞的混合物所組成)，且被認為與測試物品相關(圖 28)。8–18 WBCs/μL 之 CSF WBC 計數峰值發生於第 7 天的一隻高劑量的動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 171209，第 4 組)、第 14 天的一隻高劑量的動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 181330，第 4 組)、第 28 天的一隻中劑量的動物(1.0 x 10^{13} GC；動物 171306，第 3 組)及第 60 天的一隻低劑量的動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 171229，第 2 組)。在中劑量組別的一隻動物(1.0 x 10^{13} GC；動物 171118，第 3 組)中於第 28 天及第 90 天顯示出二個 18 WBCs/μL 之 CSF WBC 計數峰值，儘管第 28 天的結果可能是由於樣品中的血液污染所人為造成的。在所有動物中，細胞增多症為自限性的(self-limited)，且與臨床後遺症無關。

【0242】在投予 PBFT02 之前，在 3/11 動物(27%)的血清中可檢測到預先存在的針對 AAV1 殼體的 NAb。到第 90 天，經媒劑處理的動物顯示血清 Nab 效價並沒有變化，而所有投予 PBFT02 的動物皆顯示出到第 90 天的

血清 Nab 效價的增加。低劑量(3.0 x 10^{12} GC)、中劑量(1.0 x 10^{13} GC)及高劑量(3.0 x 10^{13} GC)組別的 Nab 效價在第 90 天相當，表示缺乏劑量依賴性反應。此外，在任何評估劑量下，AAV1 NAb 反應規模似乎不受 PBFT02 投予之前所預先存在的 AAV1 NAb 的存在的影響。下表總結血清中 NAb 對 AAV1 的反應。

表.在 ICM 投予 PBFT02 後，血清中針對 AAV1 殼體的中和抗體的存在

組別	處理	劑量 (GC)	動物 ID	HEK293 細胞中的 AAV1 NAb [1,2]		
				BL	第 0 天	第 90 天
1	ITFFB	N/A	171123	160	320*	160
			181323	< 5	< 5	< 5
2	PBFT02	3.0 x 10^{12}	171229	< 5	< 5	5120*
			171250	20	40	2560*
			180668	< 5	< 5*†	5120*
3	PBFT02	1.0 x 10^{13}	171306	< 5	< 5*†	2560+
			171118	< 5	< 5*†	10240+
			171311	< 5	< 5*†	2560*
4	PBFT02	3.0 x 10^{13}	171209	< 5	< 5*†	5120+
			171246	160	80*†	5120
			181330	< 5	< 5	5120+

顯示在 BL 以及研究第 0 天及第 90 天對每隻動物抑制 AAV1.CMV.LacZ 轉導(β-gal 表現)≥50%的血清稀釋度的倒數。藍色陰影表示陰性 NAb 反應(<5；低於分析的 LOD)，而橙色表示陽性 NAb 反應。

*表示對樣品進行兩次測定以確定終點效價，且第二組數據集顯示在表中。+表示對樣品進行 3 次測定以確定終點效價，且第三組數據集顯示在表中。†表示因第一次分析中的高背景而再次測試樣品。由於高背景而重新測試的所有樣品均顯示 Nab 效價在原始數值的 2 倍稀釋範圍內。

*縮寫：*AAV1，腺相關病毒血清型 1；BL，基線；GC，基因體拷貝數；HEK293，人類胚腎 293；ID，識別號；ITFFB，鞘內最終調配緩衝液；LOD，偵測極限；N/A，不適用；NAb，中和抗體。

【0243】如圖 29 中總結的，在整個研究期間，兩隻經媒劑處理的對照組動物(ITFFB；2/2 動物)對殼體(AAV1)及轉基因產物(人類 PGRN)的 IFN-γ T 細胞反應

保持陰性。相較之下，PBFT02 投予在 8/9(89%)的 NHP 中引發對 AAV1 殼體及/或人類 PGRN 的 IFN-γ T 細胞反應。單一無反應者為投予中劑量的動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 171311，第 3 組)。

【0244】在表現出 IFN-γ T 細胞反應的動物中，6/8(75%)表現出對 AAV1 殼體的陽性反應，且 6/8(75%)具有針對人類 PGRN 的反應。在此等動物中，2/8(25%)的 NHP 僅對 AAV1 殼體顯示出 T 細胞反應，而 2/8(25%)的 NHP 僅對人類 PGRN 顯示出 T 細胞反應。對 AAV1 殼體的 IFN-γ 反應很低，範圍為每百萬個細胞 58-188 個點形成單位(SFU)。在對 AAV1 殼體表現出反應的六隻動物中，3/6(50%)在研究期間的單個時間點顯示低的短暫 IFN-γ 反應，包括低劑量組別中的一隻動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 171250，第 2 組)、中劑量組別中的一隻動物(1.0 x 10^{13} GC；動物 171118，第 3 組)及高劑量組別中的一隻動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 171209，第 4 組)。其餘 3/6 動物(50%)證實更持久的反應，其從 PBMC 開始，並在第 90 天屍體剖檢時通過至少一個組織淋巴細胞群進行。在肝臟中，只有 2/6(33%)的 NHP 具有可檢測的對 AAV1 殼體之 IFN-γ 反應。

【0245】對於對人類 PGRN 顯示出 IFN-γ 反應的 6/8 動物，除了高劑量組中的單隻動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 171209，第 4 組)在第 90 天肝臟中的反應觀察到中度至高度陽性反應(每百萬個細胞 280 至 520 SFU)外，其餘所有觀察到的反應均較低(範圍為每百萬個細胞 60-200

SFU)。對於人類 PGRN 的 IFN-γ 反應，在屍體剖檢時單離的肝淋巴細胞中(6/6 動物[100%])比在 PBMC(4/6 動物[67%])或脾細胞(2/6 動物[33%])中更為普遍。

【0246】T 細胞對殼體及轉基因產物的反應與異常臨床觀察或血液學、凝血及血清化學參數的變化無關。

【0247】沒有觀察到與測試物品相關的大體的發現。所有大體的發現都被認為是偶發的。主要在 DRG、三叉神經節 TRG、脊髓背側白質束及周邊神經中觀察到與測試物品相關的發現。此等發現由在背根神經節(DRG)及三叉神經節(TRG)內具有單核細胞浸潤的神經元退化所組成，並伴隨在脊髓背側白質束及周邊神經內具有或不具有纖維化的軸突退化(即，軸突病變)。總體而言，在所有經 PBFT02 處理的組別中都觀察到此等發現。中劑量(1.0×10^{13} GC)及高劑量(3.0×10^{13} GC)組的動物的此等發現的嚴重程度往往更高。無論劑量如何，脊髓及周邊神經中 DRG/TRG 退化及軸突病變的發生率都相似，而在中劑量(1.0×10^{13} GC)及高劑量(3.0×10^{13} GC)中觀察到更高的纖維化發生率。其它與測試物相關的發現包括在注射部位之骨骼肌及脂肪組織的慢性炎症。

【0248】

DRG/TRG 神經元退化

在所有經 PBFT02 處理的組別中都在 DRG 中觀察到具有單核細胞浸潤之神經元細胞體退化，且認為與測試物相關，DRG 延伸軸突集中至脊髓的背側白質束中，並

在外圍延伸到周邊神經。在TRG中觀察到類似的發現。DRG/TRG 神經元退化的嚴重程度在低劑量時最低(最小；[3.0 x 10^{12} GC；第 2 組，2/3 動物，6/12 神經節])，隨後為高劑量組(最小至輕度；[3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，3/3 動物，6/12 神經節])。雖然中劑量組的嚴重程度總體最高(最小到輕度；[1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，3/3 動物，7/12 神經節])，但在中劑量組與高劑量組之間未觀察到明顯的劑量反應。所有經 PBFT02 處理的組別(第 2-4 組)的發生率相似。一隻經媒劑處理的對照組(動物 171123 [ITFFB；第 1 組，1/2 動物])發生最小的神經元細胞體退化，但無法確立這一發現與程序及背景之間的關係。此外，在中劑量組的一隻動物(動物 171306 [1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，1/3 動物])及高劑量組的一隻動物(動物 171209 [3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，1/3 動物])的腦神經 IX、X、及/或 XI 中觀察到最小的軸突病變。

【0249】

脊髓之軸突病變

DRG 退化導致脊髓背側白質束的軸突病變。雖然所有經 PBFT02 處理的組別的軸突病變發生率相似，但觀察到嚴重程度呈劑量依賴性增加。嚴重程度從低劑量組(3.0 x 10^{12} GC；第 2 組，3/3 動物)中的最低增加至中劑量(1.0 x 10^{13} GC [第 3 組，3/3 動物])及高劑量組(3.0 x 10^{13} GC [第 4 組，3/3 動物])中的最低至顯著。值得注意的是，中劑量組中的一隻動物(動物 171306 [1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，1/3 動物])及高劑量組中的一隻動物(動物

171209 [3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，1/3 動物])表現出比投予相同劑量的其它動物更高的總體嚴重程度。

【0250】

周邊神經之軸突病變

DRG 退化導致周邊神經的軸突病變。周邊神經軸突病變顯示出劑量依賴性反應。低劑量組的嚴重程度最低(最小至輕度；[3.0 x 10^{12} GC；第 2 組，23/30 神經])，且從中劑量組(最小至中等；[1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，26/30 神經])到高劑量組(最小至中等；[3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，23/30 神經])地增加。然而，所有經 PBFT02 處理的組別之間的發生率相對相似。在對照組動物(動物 171123 [ITFFB；第 1 組，1/30 神經])中很少觀察到最小的軸突病變，而被認為是偶發的。

【0251】

神經內膜纖維化

在周邊神經中觀察到劑量依賴性神經內膜纖維化(亦稱為軸突周圍纖維化或神經周圍纖維化)，並被認為是繼發於軸突損傷。在低劑量組(3.0 x 10^{12} GC；第 2 組)的周邊神經中未觀察到纖維化，而觀察到從中劑量組(1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，2/3 動物，4/30 神經)至高劑量組(3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，2/3 動物，6/30 神經)中的發生率及嚴重程度兩者由最小至中度漸增的纖維化。在中劑量組的一隻動物(動物 171306 [1.0 x 10^{13} GC；第 3 組，1/3 動物])及高劑量組的一隻動物(動物 171209 [3.0 x 10^{13} GC；第 4 組，1/3 動物])中觀察到周邊神經中纖

維化的最高發生率及嚴重程度，其與脊髓中軸突病變的發現的嚴重程度相關。在中劑量組中一隻動物(動物171306 [1.0 x 10^{13} GC；第3組，1/3動物，1/12神經節])的腰部DRG神經根內亦觀察到輕度神經內膜纖維化，並被認為是繼發於軸突損傷。

【0252】

注射部位的發現

在所有組別中觀察到局部注射部位的發現，包括對照組動物。在ICM注射/CSF收集部位及周圍區域，經媒劑處理的對照組動物在骨骼肌筋膜內顯示出最小的局部急性炎症或骨骼肌內的單核細胞浸潤(ITFFB，第1組，2/2動物)。經PBFT02處理的動物顯示出此等發現的加重的嚴重程度，包括骨骼肌及脂肪組織內輕度至中度的慢性炎症(9/9動物)以及相關的肌纖維變化(8/9動物)。在經PBFT02處理的動物中注射部位的發現的嚴重程度並非劑量依賴性的。此等注射部位的發現部分地被認為與ICM注射及/或重複的CSF收集在程序上有關。然而，出自於局部對測試物品的反應而可能會加劇。

【0253】在ICM投予後，可在CSF及周邊血液中檢測到PBFT02載體DNA。CSF中PBFT02的濃度在評估的第一個時間點(第7天)後迅速下降，並且到第60天時，除了在低劑量組中的一隻動物(3.0 x 10^{12} GC；動物171229，第2組)及高劑量組中的一隻動物(3.0 x 10^{13} GC；動物181330，第4組)外，在大多數動物中檢測不到。對於動物171229及動物181330，CSF中的

PBFT02 載體 DNA 濃度在第 60 天的最後一個採樣時間點呈下降趨勢。在血液中的 PBFT02 載體 DNA 濃度下降較慢，其可能歸因於周邊血液細胞的轉導。在 CSF 或周邊血液中，峰值載體濃度並不出現劑量依賴性(圖 30)。

【0254】在第 0 天，在中劑量組的兩隻動物(動物 171306 及 171311 [1.0 x 10^{13} GC；第 3 組])的 CSF 中檢測到 PBFT02 載體 DNA，但未在血液中檢測到。對於第 0 天 PBFT02 呈陽性的 CSF 樣品進行重新測試以確認結果。在第 0 天於 CSF 中檢測到低水準的 PBFT02 載體 DNA 可能由於在 ICM 投予過程中 CSF 樣品受到污染所致。

【0255】在載體投予後的第 5 天，在 8/9 動物的尿液及所有能夠分析之動物(5/5 動物)的糞便中可檢測到 PBFT02 載體 DNA。到 PBFT02 投予後第 28 天，在所有動物(9/9 動物)的尿液中檢測不到 PBFT02 載體 DNA。PBFT02 載體 DNA 在所有能夠在第 28 天進行分析之動物(3/3 動物)的糞便中檢測不到，並在第 60 天(9/9 動物)的所有糞便樣品中確認檢測不到。尿液及糞便載體濃度峰值並未出現劑量依賴性。

【0256】在經媒劑處理的對照組動物的 CSF 中檢測不到轉基因產物表現(人類 PGRN 蛋白)。在 ICM 投予 PBFT02 後，到第 7 天時在所有動物的 CSF 及血清中可檢測到人類 PGRN，除了一隻低劑量動物(3.0 x 10^{12} GC；動物 171250，第 2 組)及一隻高劑量動物(3.0 x 10^{13} GC；動物 171246，第 4 組)直到第 14 天才在 CSF 中表

現可檢測到的人類PGRN。這兩隻動物都具有針對AAV1殼體的基線NAb。CSF及血清的表現皆為劑量依賴性的(圖32)。

【0257】在CSF中，第14天在1/3中劑量動物(1.0 x 10^{13} GC；第3組)及2/3高劑量動物(3.0 x 10^{13} GC；第4組)中觀察到最大人類PGRN表現。低劑量組(3.0 x 10^{12} GC；第2組，N=3/3)中的所有動物在第28天達到最大表現，中劑量組(1.0 x 10^{13} GC；第3組)中的2/3動物及高劑量組(3.0 x 10^{13} GC；第4組)中的1/3動物亦為如此。在最大表現時，中劑量組(11.58 ng/mL)及高劑量組(11.77 ng/mL)中觀察到的人類PGRN平均濃度比低劑量組(5.27 ng/mL)高約2倍(圖32)。

【0258】在血清中，大多數動物在第14天觀察到最大的人類PGRN表現，除了低劑量組中的一隻動物(3.0 x 10^{12} GC；動物171229，第2組)及中劑量組中的一隻動物(1.0 x 10^{13} GC；動物171118，第3組)，其二隻動物均在第28天顯示最大表現。觀察到低劑量組(3.0 x 10^{12} GC，第2組)、中劑量組(1.0 x 10^{13} GC，第3組)及高劑量組(3.0 x 10^{13} GC，第4組)的平均最大表現水準分別為109.03 ng/mL、240.12 ng/mL及430.52 ng/mL(圖33)。

【0259】到第60天，CSF及血清中的人類PGRN表現在所有經PBFT02處理的動物中從最高水準下降(圖34)。此下降持續到第90天，並與所有經PBFT02處理的動物的CSF及血清兩者中所出現的抗人類PGRN抗體相關(圖34)。

【0260】在第 90 天，在腦、脊髓、DRG、肝臟及脾臟中檢測到高水準的載體基因體(圖 35)。在 CNS 組織中檢測到的載體基因體的數量通常被觀察到為劑量依賴性的。與所有其它經 PBFT02 處理的 NHP 相比，一隻低劑量動物(3.0×10^{12} GC；動物 171250，第 2 組)及一隻高劑量動物(3.0×10^{13} GC；動物 171246，第 4 組)中所存在的針對 AAV1 殼體的基線 NAb 與肝臟實質減少的載體分布相關。

【0261】PBFT02 投予導致 DRG 及 TRG 感覺神經元(8/9 動物)以及其相關的中樞及周邊軸突(9/9 動物)之無症狀的退化。此等病灶的嚴重程度從最小到輕微。此等發現顯示中劑量組及高劑量組中有更嚴重病灶的趨勢。在顯示出最嚴重的脊髓軸突損失及周邊神經纖維化的兩隻動物中，一隻高劑量組中的動物(動物 171209；3.0×10^{13} GC [3.3×10^{11} GC/g 腦])顯示出第 90 天在雙側正中神經感覺動作電位振幅的顯著減少。由於所有劑量組別中都存在無症狀的感覺神經元病灶，而未定義未觀察到的不良反應水準(no-observed-adverse-effect level；NOAEL)。評估的最高劑量(3.0×10^{13} GC)被認為是最大耐受劑量(MTD)。

【0262】

實施例 8：人體試驗

於患有由 GRN 基因突變引起的成年發病神經退化性疾病(包括額顳葉失智症)患者進行單次投予 PBFT02)之首次用於人體(FIH)第 1b 期劑量遞增研究(匯總於下

表)。PBFT02 旨在取代 GRN 基因。目前沒有針對由 GRN 單套缺失引起的成年發病神經退化的疾病改善療法。疾病管理包括目的在於減少與疾病相關的行為、認知及/或運動症狀之支持性照護及藥品仿單標示外治療。因此，此疾病譜代表一個高度未被滿足的醫療需求領域。此 FIH 研究評估了安全性及耐受性，並收集有關療效的初步數據。

方案名稱：	第 1b 期開放性、多中心劑量遞增研究以評估將單次劑量 PBFT02 遞送至具有額顳葉失智症(FTD)及顆粒蛋白前體基因(*GRN*)突變之成年受試者的腦大池(ICM)中的安全性、耐受性及藥效學作用
方法	前瞻性、多世代、開放性、劑量遞增研究。
研究期間	此為為期 24 個月的研究。招募以滾動審查(rolling basis)進行。24 個月的研究之後為 36 個月的延伸期。每位受試者總計被招募 5 年。
研究族群	受試者年齡為≥35 至≤75 歲，具有 FTD(界定為臨床失智症評定量表[Clinical Dementia Rating Scale；CDR®]加上國家阿茲海默氏症協調中心額顳葉退化[National Alzheimer's Coordinating Center Frontotemporal Lobar Degeneration；NACC FTLD]總分=0.5 或 1.0)及 GRN 突變的遺傳證據(FTD-GRN)
受試者數量：	最多至 15 個可評估之受試者
目標：	主要： 投予單一 ICM 劑量後，評估 PBFT02 之全面安全性及耐受性。 次要： 評估單次 ICM 劑量投予後，以 PBFT02 治療對 CSF 及血漿 PGRN 水準的藥效學(PD)作用。 評估以 PBFT02 治療對 FTLD 進展的作用，如以神經影像學、神經退化的體液及眼部生物標記所評估。 評估以 PBFT02 治療對 FTD 臨床進展(認知功能、行為、語言、運動徵象及症狀以及生活機能性活動品質)的作用。 評估單次 ICM 劑量投予後，轉基因表現(血漿及 CSF PGRN)的持久性。 評估 PBFT02 對生存的影響。
研究設計概述	此為第 1b 期，首次用於人體(FIH)，前瞻性、多世代、開放性、單臂、多中心、劑量遞增研究。計劃招募 9 名年齡≥35 且≤75 歲並患有早期症狀性 FTD-GRN 的受試者參與該研究。符合條件的受試者藉由 ICM 投予接受單次劑量的 PBFT02。從 PBFT02 投予前 1 天開始，投予全身性皮質類固醇 14 天，然後將皮質類固醇劑量逐漸減少。對於每位受試者的總研究時間計劃為總共 5 年；該設計包括篩選期、基線

	確定及載體投予(即治療)期以及追蹤期。5 年的追蹤期從投劑當天開始。研究分兩部分進行：一項為期 24 個月的主要研究及一項為期 36 個月的延伸。安全性及耐受性的主要終點在投劑後 12 個月，次要終點在投予後 12、18 及 24 個月之多個時間點進行評估並分析。在 36 個月的延伸中，評估安全性及所有次要目標，以衡量對生物標記及疾病進展的作用的持久性。 計劃最多 3 個劑量遞增同齡群，各有 3 名受試者。同齡群中的個體受試者的招募在受試者之間至少間隔 60 天，以允許評估 30 天的生物標記及神經傳導研究(NCS)數據以及 60 天的安全性數據。此 60 天的間隔用於同齡群中的所有受試者(即最多 5 個受試者)。60 天的交錯間隔足以確保有足夠的時間監測急性及預測亞急性的神經毒性，並允許在下一個受試者投劑前對包括安全性、NCS、生物標記及臨床/神經學觀察在內的匯總數據進行綜合分析。在考慮劑量遞增之前，招募 3 名受試者至給定劑量的同齡群。安全性由試驗委託者(Sponsor)及獨立數據監測委員會(Independent Data Monitoring Committee；IDMC)監測，且進行中的受試者的安全性管理係基於不良事件(AE)及方案中預期定義的停止規則。在第一同齡群中所有受試者的 90 天安全性及生物標記數據經審核並經 IDMC 確定合格後，研究可繼續進行，招募受試者至下一個同齡群。
受試者數量	在美國及美國以外的多個臨床中心，多達 15 名具有 FTD 及 *GRN* 單套缺失的成年患者。
主要的納入及排除基準	納入基準 1.在招募時男性或女性≥35 歲且≤75 歲 2.由臨床實驗室改善修正案[Clinical Laboratory Improvement Amendments；CLIA]批准的實驗室、或美國以外國家的當地監管機構所接受的 CLIA 等效實驗室(在歐盟，基因分型測試必須符合歐洲標準[Conformité Européenne；CE]標記)記錄為 GRN 突變攜帶者(在篩選期間被評估或者基於記錄的病史)，作為 FTD 的原因，符合以下基準之一： a.由阿茲海默氏症及額顳葉失智症突變資料庫(AD&FTDMDB)歸類為致病性的突變(Moore et al 2020) b.不應有可解釋疾病的存在的 GRN 以外的突變(例如，C9ORF 擴增>30 次重複)之歷史基因檢測證據(如果有) c.若篩選時的血漿 PGRN 水準>61.55 ng/mL(Galimberti D et al., Neurobiol Aging. 2018:62:245.e9-245.e12)，可在允許招募之前考慮重新檢查基因的確認及可能進一步評估受試者的 GRN 突變狀態。 3.根據當前國際共識診斷基準的臨床診斷(詳見第 6.3 節的基準)： a.根據 Rascovsky(2011)基準的可能的行為變異型 FTD(bvFTD)，或 b.根據 Gorno-Tempini(2011)基準的原發性進行性失語症(PPA)變異型(非流暢變異型[nfvPPA]、語義變異型[svPPA]或語彙減少變異型[lvPPA]) 符合基準 a 或 b 的受試者可伴隨表現進行性核上神經麻痺(PSP)症候群、皮質基底症候群(CBS)或肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)，但受試者在篩選時僅具有運動症狀(不符合基準 a 或 b)不具招募資格。 4.血漿 NfL 水準>50 pg/mL 5.具有一位可靠的情報提供者/照護者(及後備情報提供者/照護者)，至少每週親自與該受試者交談或看到該受試者 6.CDR plus NACC FTLD 總分為 0.5 或 1.0 7.應該住在社區(即，不住在療養院)；根據研究者的裁量，可允許某

	些程度的輔助生活 排除基準 1.阿茲海默氏症(AD)的生物標記證據。若受試者在過去 12 個月內未接受過阿茲海默氏症生物標記測試，則對他/她進行第 181 個胺基酸經磷酸化的血漿 tau 蛋白(ptau181)水準的篩選；如果血漿 ptau181 符合 AD 病理(>15 pg/mL)，則排除該受試者 2.在 AD&FTDMDB 中將 GRN 突變分類為「非致病性」、「可能是良性變異」、「良性變異」或「致病性質不明」 3.以前接受過任何基因療法的治療。在進入此研究之前，任何其它可能改變 PGRN 水準的療法必須經過至少 5 個半衰期 4.同基因型組合 GRN 突變攜帶者 5.Rosen 改良型 Hachinski 缺血量表得分>7 6.已知存在可合理解釋有症狀受試者的症狀的結構性腦病灶(例如，腫瘤、皮質梗塞) 7.根據基因檢測歷史(如果進行)，在 PSEN1、PSEN2 或 APP 中已知存在導致 AD 的突變 8.柯沙可夫氏腦病變、嚴重酒精或物質依賴(失智症發病 5 年內)的先前病史，但在 FTD 疾病發作時飲酒量增加的情況除外 9.未經治療的 B12 缺乏症病史為排除性的，除非後續實驗室測試(升半胱胺酸及甲基丙二酸)表明該值不具有生理意義。以 B12 補充治療的受試者可在研究者審查他們的診斷及治療歷史記錄後被招募，以確保疾病/治療的穩定性及順應性 10.未經調節的甲狀腺功能低下症之透過病史或實驗室檢測的證據(促甲狀腺激素[TSH] >正常值的 150%) 11.血清肌酸酐 > 2 mg/dL 12.肝臟酵素升高(丙胺酸轉胺酶[ALT]或天冬胺酸轉胺酶[AST] >2×正常上限[ULN]或者總膽紅素>ULN) 13.需要補充氧氣的呼吸衰竭 14.無法提供完全同意或缺乏可提供同意的具有充分聯繫的合法授權的照護者 15.任何對 MRI 或腰椎穿刺(LP)的禁忌症(例如，局部感染、血小板減少症病史、凝血病) 16.對 ICM 投予程序的任何禁忌症，包括對成像、靜內造影劑及麻醉的禁忌症，或者任何會增加 ICM 程序不良結果風險的病況，包括但不限於存在導致腫塊效應或顱內壓升高徵象的佔位性病灶(space occupying lesion)、非交通性水腦症、後顱窩(posterior fossa)或枕骨大孔的佔位性病灶、血管解剖學異常(例如大範圍中線小腦後下動脈(large midline posterior inferior cerebellar artery))、靜脈異常(如大範圍中線小腦靜脈或枕竇)、先天性解剖學異常(如希阿里畸形(Chiari malformation)) 17.會增加腦大池內注射、麻醉、LP 及/或 MRI 併發症的風險之醫療條件或實驗室或生命徵象異常(溫度>38°C、室內空氣或基線氧氣需求的氧飽和度低於 95%、受試者年齡的心率或呼吸頻率異常、年齡的血壓異常、感染證據) 18.免疫功能不全的患者 19.周邊軸索感覺神經病變 20.在投劑 14 天內接受疫苗 21.人類免疫缺陷病毒(HIV)或者 B 型或 C 型肝炎的陽性檢測結果；在篩選 1 年內或在篩選時確定結核分枝桿菌檢測呈陽性

	22.惡性腫瘤(局部皮膚癌除外)或遺傳性癌症症候群的紀錄病史。可納入先前經成功治療惡性腫瘤並有足夠追踪以排除復發的受試者(基於腫瘤科醫師的意見)。受試者的年齡及性別適當的癌症篩檢必須為最新的 23.研究者認為可能導致與 GRN 突變無關的認知障礙的任何並行疾病，包括失智症的其它原因、神經梅毒、水腦症、中風、小血管缺血性疾病、不受控制的甲狀腺功能低下症、或維生素缺乏症 24.過去 6 個月內當前或近期有臨床意義的自殺意念病史，對應於哥倫比亞自殺嚴重程度評定量表(C-SSRS)意念的 4 分(有一定行動意圖但沒有具體計劃的主動自殺意念)或 5 分(具有特定計劃及意圖的主動自殺意念)，或者過去一年內有自殺行為史，在篩選時藉由 C-SSRS 驗證。在過去 10 年內有任何類型的先前自殺企圖或先前有嚴重自殺意念/計劃的受試者，應仔細篩選當前的自殺意念，並且僅在研究者記錄評估後才包括在內。 25.對於有生育能力的女性，在篩檢訪視時呈陽性的血清妊娠試驗、在投予研究產物的第 1 天前的陽性的血清結果、或不願意在研究期間進行其它妊娠試驗。有生育能力的女性必須使用高效的避孕方法或在投劑後 90 天內禁慾 26.哺乳期婦女 27.對於有生育能力的男性，從篩檢日起至投劑後 90 天，不願意使用醫學上認可的雙重屏障避孕方法(例如與避孕藥一起使用的避孕套/隔膜)或禁慾 28.研究者認為會給受試者帶來不適當的風險的任何病況(例如，任何疾病病史、任何當前疾病的證據、身體檢查的任何發現或任何實驗室異常)，或者研究者認為會干擾對研究產品的評估、或對受試者安全性或研究結果的解釋的任何病況 29.在招募 30 天內需要住院的任何急性疾病 30.不符合方案規定的凝血試驗基準的受試者 31.在篩選前 2 週內使用抗凝血劑或在研究期間預期使用抗凝血劑為排除性的。抗血小板治療可為可接受的 32.對皮質類固醇的使用過敏或禁忌症 33.已知或懷疑對 PBFT02、其任何成分或密切相關的化合物不耐或過敏
結果評量	主要結果評量： •安全性/耐受性 次要結果評量： •藥效學：CSF 及血漿 PGRN 水準 •疾病進展 •疾病病理生理學的生物標記： –NfL、血漿及 CSF– 神經膠質纖維酸性蛋白(GFAP)、血漿 •腦體積、皮質厚度及白質完整性之 MRI 測量 •光同調斷層掃描(OCT，評估視網膜厚度及視網膜脂褐質沉積物) •臨床進展 •CDR plus NACC FTLD 的加總計分(SB) •神經認知評估：多語言命名測試(Multilingual Naming Test；MINT)、數字廣度測試(Number Span Test)、語義流暢性(Semantic Fluency)、語文流暢性(Verbal Fluency)、路徑描繪測試(Trail Making Test) A 及 B、加州語文學習測試(California Verbal Learning Test；CVLT)、班森複雜圖形複製(Benson Complex Figure Copy) (即時及延

	遲回憶)及蒙特利爾認知評估(Montreal Cognitive Assessment；MoCA) •其它評估：額顳葉失智症評定量表(FRS)、劍橋行為量表修訂版(CBI-R)、臨床總體印象的嚴重程度及變化(CGI-S、CGI-C)、機能性活動問卷(FAQ)以及施瓦布及英格蘭日常生活活動量表(Schwab and England Activities of Daily Living scale；SEADL) •生存
投予途徑	PBFT02 作為單次劑量在第 1 天經由電腦斷層掃描(CT)導引的枕骨下注射投予至受試者腦大池中(腦大池內)。在第 1 天，使用藥房手冊中提供的劑量計算之研究藥物的適當濃度係由現場研究藥房準備。根據為研究所建立的注射程序，將產品遞送至腦大池中。
安全性評估	安全性評估，包括不良事件(AE)及嚴重不良事件(SAE)的收集、身體及神經檢查、生命徵象、臨床實驗室檢查(血清化學、血液學、凝血、肝臟酵素及膽紅素、尿液分析)、心電圖(ECG)、神經傳導研究(NCS)、總神經病變評分-護理(Total Neuropathy Score-Nurse；TNSn)、哥倫比亞自殺嚴重程度評定量表(C-SSRS)、載體殼體蛋白質及轉基因產物免疫原性、載體泄出、CSF 細胞學及化學(細胞計數、蛋白質、葡萄糖)在研究時間表中指定的時間進行。潛在治療相關性惡性腫瘤的監測：受試者的驗血通過全血細胞計數(CBC)檢測盤進行監測，並在 5 年的追蹤期間，受試者每年經由腦及脊髓之利用釓造影劑的 MRI 進行監測。
排除基準：	參見上述

【0263】

目標族群：具有 FTD 及 GRN 單套缺失的輕度症狀的受試者

研究族群由患有具有致病性異基因型組合 *GRN* 突變的早期 FTD(CDR plus NACC FTLD 總分=0.5-1.0)的受試者所組成。在此等患者中，病程通常範圍為 4.9-10.0 年。因此，此族群提供有利的風險/益處概貌，因為他們在接受治療時已經具有疾病的早期臨床表現，並且預期在試驗過程中會經歷其初期臨床症候群的進展以及其它 FTD 表現的發作；但因為他們還沒有發生晚期及廣泛的神經退化，他們將從顯著減緩或阻止 FTLD 病理生理學進展的干預中受益。

【0264】FTD 症狀發作的平均年齡範圍為 54.8-69.5 歲。75 歲的最大年齡確保包括具有合理生存可能性的患者，此允許分析擬議的終點並減少包括可能具有促成認知障礙的未發現合併症之高齡患者的可能性。

【0265】具有同基因型組合 GRN 突變的受試者已被描述為具有更嚴重及更早發病的巴登氏病，一種影響青少年及年輕人的溶酶體貯積病，因此被排除在本試驗之外。

【0266】GRN 單套缺失導致成年發病的神經退化。因此，我們認為，具有經確認的 GRN 單套缺失的 35-75 歲患者代表被預期從此研究性治療中獲益最多的族群，同時將潛在風險降至最低。

【0267】

增加 CNS 顆粒蛋白前體水準以減緩 FTLD 神經退化的疾病機制及基本原理

GRN 編碼 PGRN 蛋白產物(以下稱為 PGRN)，其為分泌性糖蛋白。*GRN* 在整個身體的多種組織中表現，包括神經系統。雖然 PGRN 的精確分子功能尚不清楚，但新出現的證據暗示，其促使成年發病神經退化的致病作用與溶酶體中的關鍵作用有關。

【0268】最近發現 PGRN 促進溶酶體酸化並作為溶酶體蛋白酶的伴護蛋白，包括細胞自溶酵素 D(CTSD)。與此等活動一致，具有 *GRN* 單套缺失的患者表現出稱為脂褐質之自體螢光物質的溶酶體蓄積。相似地，至少有 12 種不同的遺傳性疾病會導致神經元溶酶體中脂褐質的

異常蓄積。所有此等疾病都是由必需溶酶體蛋白缺乏所引起的，並且都會導致神經退化。在具有同基因型組合功能喪失型*GRN*突變的患者中同樣觀察到組織學上相同的溶酶體貯積病灶，該患者在生命中更早出現進行性神經退化性疾病，神經性類蠟脂褐質病(NCL)(亦稱為巴登氏病)。再者，編碼溶酶體蛋白酶CTSD之基因中的同基因型組合突變導致巴登氏病表型，類似於由PGRN缺陷所引起的表型。累積起來，此等觀察結果暗示，增加中樞PGRN可矯正FTLD中的溶酶體病理學並減緩神經退化。

【0269】

以PBFT02基因治療的基本原理

由GRN單套缺失所引起的成年發病神經退化為一個有吸引力的基因治療候選者，因為其為一種由分泌性蛋白缺乏引起的單基因疾病。雖然新合成的PGRN可直接從反式高基氏體網絡運送到溶酶體，但其也可被分泌並經由分揀蛋白或甘露糖-6-磷酸受體被其它細胞吸收，然後被運送到溶酶體。在選擇性刪除神經元中的*Grn*後，在轉基因小鼠中證實了PGRN分泌的一個重要後果。與在所有細胞類型中完全缺乏PGRN蛋白的*Grn*-/-動物相比，僅在神經元中摘除PGRN表現不會導致神經元脂褐質蓄積，這表明其它中樞神經系統(CNS)細胞對缺乏PGRN的神經元提供該蛋白質。因此，在CNS的細胞子集中過度表現PGRN可提供一個分泌的蛋白的儲存庫，其可被周圍的細胞吸收，從而產生交叉矯正的潛

力。在研究動物中，AAV 載體的 IT 遞送已顯示在整個 CNS 中轉導細胞，使該途徑成為治療由 GRN 單套缺失所引起之 FTLD 的一種有吸引力的方法。此外，我們在 *Grn*-/-剔除小鼠及 NHP 中的非臨床研究證實，除了解決與 *Grn*-/-剔除小鼠中 PGRN 缺陷相關的溶酶體貯積病灶外，IT AAV 遞送還導致在 CSF 及 CNS 中健全的 PGRN 表現。

【0270】

研究基本原理

FTLD 係由五種已知疾病基因之一的突變所引起，包括顆粒蛋白前體(*GRN*)基因。*GRN* 編碼顆粒蛋白前體(PGRN)蛋白質產物，其為分泌性糖蛋白。*GRN* 在整個身體的多種組織中表現，包括神經系統。雖然 PGRN 的精確分子功能尚不清楚，但新出現的證據暗示其促使 FTLD 的致病作用與溶酶體中的關鍵作用有關。

【0271】*GRN* 中的所有病理性突變都被證實或預測會造成功能喪失並導致降低顆粒蛋白前體(PGN)mRNA 水準(~50%)及蛋白質水準(~33%)。在具有 *GRN* 單套缺失的突變攜帶者中，症狀發作的平均年齡為 59 ± 7 歲，到 70 歲時疾病外顯率超過 90%。患者普遍顯示出進行性病程。症狀發作後平均存活 8 年，導致平均預期壽命為 68 ± 8 歲。

【0272】由 GRN 單套缺失引起的 FTLD 為基因治療的一個有吸引力的候選者，因為其為一種由分泌性蛋白缺乏引起的單基因疾病。雖然新合成的 PGRN 可直接從

反式高基氏體網絡運送到溶酶體，但其也可被分泌並經由分揀蛋白或甘露糖-6-磷酸受體被其它細胞吸收，然後被運送到溶酶體。在研究動物中，AAV 載體的鞘內(IT)遞送已顯示在整個 CNS 中轉導細胞，使此途徑成為治療 FTLD-GRN 單套缺失的一種有吸引力的方法。此外，我們在 *Grn*-/-剔除小鼠及 NHP 中的非臨床研究證實，IT AAV 遞送導致在 CSF 及 CNS 中健全的 PGRN 表現並解決與 *Grn*-/-剔除小鼠中 PGRN 缺陷相關的溶酶體貯積病灶。

【0273】

研究目標

主要目標

評估 PBFT02 的總體安全性及耐受性，以及 PBFT02 在投予單次 ICM 劑量後對 CSF 及血漿顆粒蛋白前體水準的藥效學作用。

次要目標

- 評估 PBFT02 在單次 ICM 劑量後對 CSF 及血漿顆粒蛋白前體水準的藥效學作用的持久性。
- 評估以 PBFT02 治療對 FTLD 進展的作用，如以神經影像學、神經退化的體液及眼部生物標記評估。
- 評估以 PBFT02 治療對 FTD 臨床進展(認知功能、行為、語言以及運動徵象及症狀)的作用。
- 評估 PBFT02 對生存的影響。

研究設計及基本原理

研究設計概述

【0274】這為一項 1/2 期、FIH、開放性、單臂、多中心劑量遞增研究，在具有早期 FTD 及 GRN 單套缺失的 35-75 歲受試者中 5 年內評估作為單次 ICM 輸注投予的 PBFT02 之安全性、耐受性及藥效學。安全性、耐受性、藥效學及臨床療效在 2 年內進行評估，並且所有受試者在 PBFT02 投予後 5 年內進行追蹤，用於安全性、耐受性、藥效學及臨床結果的長期評估。

【0275】該研究包含篩選期，以確定從大約第-35 天到第-7 天的每名潛在受試者的資格。確認合格後，受試者接受基線評估，包括腦及脊髓磁共振成像(MRI)、腰椎穿刺收集 CFS、抽血、收集尿液、生命徵象、ECG、身體檢查、神經檢查、總神經病變評分-護理(TNSn)、神經傳導研究及臨床評估。在投予 PBFT02 之前，基線評估發生在第-14 天及第 0 天(含)之間。在治療期的期間，受試者在第 1 天早上入院。受試者在第 1 天接受單次 ICM 劑量的 PBFT02，並在投劑後留院觀察至少 24 小時。隨後的研究訪問發生在投劑後的第 7 天、第 14 天、第 30 天以及 3 個月及 6 個月，隨後在投劑後的首 2 年內每 6 個月進行一次。長期追蹤訪問以每 12 個月一次的頻率再進行 3 年，直至投劑後 5 年。

【0276】該研究由最多 3 個同齡群，每同齡群 3 名受試者所組成，每名受試者均以單次 ICM 注射投予 PBFT02。在第一同齡群中，每位受試者被依次招募並給予最低計劃劑量，每名受試者之間有 4 週的安全觀察期。若沒有觀察到預先定義的安全審查觸發(參見第

6.1.1節)，在第一同齡群中的第三名受試者投予PBFT02後4週，由獨立數據監測委員會(IDMC)審查第一同齡群的所有可用數據。

【0277】若決定進行更高劑量，依次招募隨後的3名受試者並接受更高劑量，每名受試者之間有4週的安全觀察期。若沒有觀察到預先定義的安全審查觸發，由獨立數據監測委員會(IDMC)審查第二同齡群的所有可用數據。

【0278】若尚未達到最大可行劑量，可隨之招募選擇性的第三同齡群並投劑比第二同齡群更高的劑量，每名受試者之間有4週的安全觀察期。

【0279】情報提供者(例如親戚、伴侶或朋友)亦為本研究的必需的參與者(參見納入基準)。情報提供者提供臨床量表上的受試者資料，並可幫助AE的報告。由於情報提供者在本研究中發揮的關鍵作用，亦應確定第二後備情報提供者，較佳為在第0天之前。

【0280】

安全審查觸發

研究藥物投予後，觀察每名受試者28天的任何安全審查觸發(SRT)事件。此等係研究者認為4級或5級的任何不良及嚴重不良事件，或者被視為與研究藥物相關的任何3級事件(參見第13節)。在投予後28日期間內的任何時間，若事件發生，IDMC需要審查該事件並確定是否應繼續或停止研究。

【0281】若認為 3 級事件與研究藥物無關，或者存在任何技術問題，則該事件將由臨床研究醫療團隊審查。若團隊確定 IDMC 需要進一步審查，則召開 IDMC 進行審查。如果不需要 IDMC 審查，則研究繼續進行。

【0282】若沒有報告 SRT 事件，臨床研究醫療團隊在研究藥物投予後 28 天審查任何報告的不良及/或嚴重不良事件以及可用的安全性數據。醫療團隊確定事件是否需要 IDMC 進一步審查並相應地進行。

【0283】此循環一直持續到該同齡群的第 3 名受試者被招募及審查。

【0284】當來自第 3 名受試者的 28 天資料可用時，將來自該同齡群的所有可用數據匯總並提交給 IDMC 以確定是否應進行劑量遞增或應停止研究。

【0285】若決定增加劑量，招募受試者至同齡群 2 以接受更高劑量的 PBFT02。招募遵循上述對於低劑量的相同程序。如前所述，當來自第 3 名受試者的數據可用時，將該同齡群中的所有可用數據匯總並提交給 DSMB 以確定是否應繼續進行研究或應停止研究。

【0286】若 PBFT02 在第二同齡群中耐受性良好並且更高劑量為可行的，則可招募第三同齡群，在依序的受試者之間至少間隔 28 天以評估安全性及耐受性。

【0287】任何受試者於研究藥物投予後 28 天內經歷安全審查觸發(SRT)事件，該研究將停止，並召開 IDMC 會議審查研究該事件中的數據。SRT 事件被定義成研究者認為 4 級或 5 級的任何 AE 或 SAE，或者被認為與研究藥物相關的任何 3 級事件(第 13 節)。

【0288】除了觸發 SRT 的事件外，若滿足以下任一基準，則研究將停止並且不再招募新受試者：

- 由研究者評估，任何被認為與研究產品或 ICM 注射程序相關的死亡
- 由研究者評估，被認為與研究產品或 ICM 注射程序相關的 CNS 出血、中風或急性麻痺

【0289】獨立數據監測委員會審查此等不良事件，並就繼續進行研究及受試者招募做出決定。

【0290】

劑量遞增基準

劑量遞增係基於對安全性(包括臨床及實驗室評估)、耐受性的評估及對 CSF PGRN 水準的作用的評估。在每名受試者被招募到每個同齡群後進行評估。在每個同齡群之後也進行總結評估。安全性審查觸發基準已經建立，且於以下提供一個演算法來確定何時臨時召開正式獨立數據監測委員會會議。否則，若沒有發現嚴重的安全問題，則當每個同齡群的匯總數據可用時定期召開獨立數據監測委員會會議，他們可提供指引是否繼續進行更高劑量。除了安全性考量外，進行 CFS 顆粒蛋白前體水準的評估以確定 PBFT02 具有所欲藥效學作用的程度。

【0291】

研究設計基本原理

盲測、對照組、研究期、治療組

此為開放性、劑量遞增的研究設計。每個同齡群由3名接受積極治療的受試者所組成。研究最初兩年部分足以評估臨床及生物標記疾病進展在主要終點及潛在一些次要終點的作用。另外3年延伸期適用於評估長期安全性。最初，計劃兩個同齡群，一個低劑量同齡群及一個較高劑量同齡群。若PBFT02在第二劑量同齡群中的耐受性良好並且增加劑量為可行的，則可以比第二同齡群更高的劑量招募第三同齡群。這能夠基於安全性、耐受性及於生物標記(包括CSF PGRN水準以及神經退化的其它體液及神經影像生物標記)上的治療效果而確定最佳劑量。

【0292】

研究族群

本研究的目標族群由35至75歲(含)的受試者所組成；具有輕微的FTD徵象及症狀(由CDR plus NACC FTLD總分0.5-1.0定義)；及藉由低CSF PGRN水準及異基因型組合致病性GRN突變的遺傳生物標記證據所確認的GRN單套缺失(由AD&FDMDB分類)；或ACMG指南中「致病性不明」或「顯著性不確定」的GRN變異，以及一等親患有FTD或相關運動症候群(ALS、PSP、CBD)。具有與阿茲海默氏症或其它可能混淆FTLD治療評估的CNS疾病一致的臨床病史或生物標記特徵的受試者被排除在外。

【0293】作為一種基因療法，PBFT02具有使患有由GRN之一個或兩個拷貝中致病性突變所引起的神經退化

性疾病的患者受益的潛力。已知的 GRN 突變經 AD&FTDMDB 定義為致病性的，該 AD&FTDMDB 遵循人類基因體變異協會(Human Genome Variation Society)所建立的指南，對 AD 及 FTLD 患者中的所有已知突變及非致病性編碼變異進行編目。這種突變解釋方法被評估此等患者的臨床醫生普遍接受，並在與 FTLD 疾病專家的討論下被採用於此試驗中。

【0294】由 GRN 單套缺失引起的成年發病神經退化的早期臨床表現為異質性的。此異質性導致各種初始臨床表現，隨著疾病的發展還會出現另外的症狀。由於患有 FTD 的患者在其第一個症狀發作後通常會迅速衰退，而本研究招募表現任一主要臨床 FTD 表型的受試者，包括行為變異型(bvFTD)(其中行為改變及執行功能障礙為顯著的早期表現)、以及原發性進行性失語症(ppaFTD)(其中語言的理解及/或產生受到損害)。PPA 根據特定語言缺陷進一步區分為非流暢變異型 PPA(nfvPPA)及語義變異型 PPA(svPPA)，兩者均符合招募條件。若阿茲海默氏症的生物標記與並行的 AD 不一致，則 PPA 的第三種亞型，語彙減少變異型 lPPA，也有資格受招募。

【0295】FTD 譜亦包括運動障礙表型，包括進行性核上性麻痺症候群、皮質基底核症候群(CBS)及 ALS。為確保此項相對較小的第 1 期研究中臨床病程的同質性，僅具有運動症狀的受試者並不具備招募資格。然而，本研究中包括具有此等運動障礙伴隨表現的 bvFTD 或 ppaFTD 的受試者。

【0296】合格的受試者以 CDR plus NACC FTLD 量表進行篩選，其旨在評估所有 FTD 臨床表現的症狀嚴重程度，包括記憶、定向、判斷及解決問題、社群事務、家庭及嗜好、個人照護、行為及語言。CDR plus NACC FTLD 總分 0.5(包括輕度症狀患者)允許將有症狀患者納入神經退化的早期階段，在此階段基因治療的益處可能被最大化。在此早期階段招募患者還允許隨後檢測疾病進展的變化或穩定以及延遲其它症狀的發作。

【0297】為了最大限度地降低受試者的風險，此研究排除了對臨床程序有禁忌症、缺乏被預測為致病性的 GRN 突變、或患有與神經系統或免疫系統相關的疾病的患者。

【0298】此外，此研究包括將與癌症相關的風險最小化的排除基準。擬議與癌症相關的排除基準係因為已在多種腫瘤中觀察到 PGRN 過度表現。PGRN 過度表現已被假設促進癌症的進展。因此，我們排除患有惡性腫瘤(局部皮膚癌除外)或有遺傳性癌症症候群記錄病史的患者。然而，根據研究者的裁量，可包括具有先前成功治療的惡性腫瘤及充分追蹤以排除復發的受試者。此外，預計此基因治療不會導致血清 PGRN 表現高於生理水準。在非人類靈長類動物研究中使用的 PBFT02 劑量高於該此 FIH 試驗中所使用的劑量，發現 PGRN 在 PBFT02 ICM 投予後在血清中以接近正常水準表現。由於在 FIH 試驗所招募的受試者在治療前具有循環性 PGRN 水準約為正常值的 30%，因此預計循環性血清

PGRN 水準最多會恢復到正常。因此，我們不預期任何異常高的 PGRN 全身性暴露。

【0299】由於 CNS 中一些腦區域的 PGRN 水準可能高於正常，而密切監測患者可能的 CNS 腫瘤的徵象。通過 CBC 檢測盤監測受試者的驗血，並且在圖 36A–圖 36C 中指定的追蹤時間點，每年經由利用釓造影劑的 MRI 監測受試者的腦及脊髓，持續 5 年。與釓滯留相關的潛在風險係公認的，但被認為與 GRN 媒介的腫瘤的潛在風險相平衡。

【0300】

劑量選擇(PBFT02)

PBFT02 旨在取代 GRN 基因並提高中樞 PGRN 水準。由 GRN 單套缺失引起的 FTLD 為基因療法的一個有吸引力的候選者，因為其為一種由分泌性蛋白缺乏引起的單基因疾病。雖然新合成的 PGRN 可直接從反式高基氏體網絡運送至溶酶體，但其亦可被分泌並經由分揀蛋白或甘露糖-6-磷酸受體被其它細胞吸收，然後再運送至溶酶體。在選擇性刪除神經元中的 Grn 後，在轉基因小鼠中證實 PGRN 分泌的一個重要後果。與在所有細胞類型中完全缺乏 PGRN 蛋白的 *Grn*-/-動物相比，僅在神經元中摘除 PGRN 表現不會導致神經元脂褐質蓄積，這表明其它中樞神經系統(CNS)細胞對缺乏 PGRN 的神經元提供該蛋白質。因此，在 CNS 的細胞子集中過度表現 PGRN 可提供一個分泌的蛋白的儲存庫，其可被周圍的細胞吸收，從而產生交叉矯正的潛力。

【0301】起始的 PBFT02 劑量水準由 GLP NHP 毒理學研究及鼠類 MED 研究確定。此 FIH 劑量遞增研究由 1-3 個劑量同齡群所組成。所有測試的劑量都有可能產生治療效果。依序投予劑量(低劑量後高劑量)，以便能根據安全性、耐受性及於生物標記(包括 CSF PGRN 水準，以及神經退化的其它體液及神經影像生物標記)上的治療效果來確定最佳劑量。

【0302】

終點

除了測量安全性及耐受性作為主要終點外，基於當前文獻並與專門研究額顳葉失智症的主要臨床醫生諮詢，為此研究選擇次要功效終點。此等終點追踪臨床結果及疾病生物標記，目的在於為隨後的登錄試驗(registrational trial)確定合適的終點。在圖 36A–圖 36C 中所示的時間點測量終點。選擇此等時間點以促進對 PBFT02 安全性及耐受性的徹底評估。亦考慮 GRN 患者的疾病進展速度而選擇此等時間點，以便能評估臨床療效措施。根據草案“FDA Guidance for Industry: Long Term Follow-Up after Administration of Human Gene Therapy Products”(July 2018)，在 PBFT02 投予後，繼續監測受試者的安全性及有效性共 5 年。

【0303】

生物標記

下表概述此研究中要評估的生物標記及其總體目的。此等生物標記被詳細描述於此方案的後續章節。除

了方案中預先指定的生物標記分析之外，還獲得了對其它生物標記分析的知情同意。

生物標記	受試者選擇	藥效學	疾病病理生理學進展/改變
GRN 單套缺失的基因檢測	X		
血漿總 tau、p-tau$_{181}$	X		X
PGRN 水準(CFS、血漿)	X	X	
神經纖維絲輕鏈(NfL) (從基線下降)	X		X
視網膜脂褐質 (從基線下降)			X
大腦 MRI (在皮質體積、皮質厚度、白質完整性上之疾病相關變化的減緩)	X		X
FDG-PET (腦代謝降低的減緩)	X		X
EEG/誘發反應電位 (疾病相關變化的減緩)			X

【0304】

GRN 單套缺失之確定

必須基於作為受試者醫療記錄之一部分的經驗證之分析結果或基於作為本研究篩選程序之一部分的臨床現場所進行的基因分型，將受試者記錄為 GRN 突變攜帶者。

【0305】

排除具有阿茲海默氏症病理學受試者的生物標記

阿茲海默氏症可能被誤認為為 FTD，或可能以合併症存在於患有 FTD 的患者中。因此，為了避免 AD 對本試驗結果解釋的混淆影響，排除具有阿茲海默氏症病理學生物標記證據的受試者。使用排除基準中概述的經驗證之分析來評估受試者是否存在阿茲海默氏症。

【0306】

基線及治療後 CSF 及血漿 PGRN 水準的確定

測量 CSF 及血漿中 PGRN 蛋白在基線(用於納入)及隨後的治療後的水準以作為 AAV 轉導的指標。投予 PBFT02 後，預計患者的 PGRN 水準會增加。CSF 及血漿 PGRN 水準的治療相關性增加為本試驗中的劑量遞增及後續試驗的劑量選擇提供了依據。

【0307】

神經退化之體液生物標記的評估

收集體液的生物標記以評估對神經退化的潛在治療效果，以及相關的神經炎症及小神經膠質細胞的活性。在研究過程中還追蹤了神經纖維絲輕鏈(NfL)、總 tau(T-tau)、磷酸化 tau(P-tau)的 CSF 水準的治療相關性變化，儘管疾病穩定對此等終點的預測影響尚不清楚。

【0308】

NfL

神經纖維絲為軸突細胞骨架的結構蛋白。在 FTD 中，與阿茲海默氏症(AD)相比，已顯示 NfL 次單位的 CSF 濃度較高。儘管 CSF NfL 被認為是神經退化的通用生物標記，但最近對其在記憶臨床環境中的有用性之評估暗示，其可用於積極識別 FTD，尤其是 bvFTD。較高濃度的 CSF NfL 與較短的 FTD 生存期相關，這暗示其為疾病強度/嚴重程度的標記。NfL 的血漿濃度與 CSF 密切相關，且最近的數據顯示 FTD 中 NfL 的血清或血漿水準增加，反映出疾病強度並預測未來的臨床惡化及磁共振成像的腦體積損失。與此一致的是，NfL 濃度似乎僅在

有症狀期間升高，症狀前的水準與對照組相似。NfL 被認為是神經元喪失或損傷的一般指標。

【0309】

Tau

Tau 及磷酸化 tau 係與 AD、PD 及某些形式的 FTD 亞型中所見的病理相關，且通常與神經元損傷或退化相關，而與亞群無關(除了與潛在 AD 病理相關的語彙減少變異型原發性進行性失語症[lvPPA])。FTD 患者在 CFS 中的 P-tau 對 T-tau 的比率似乎較低。

【0310】

視網膜脂褐質

視網膜退化發生在臨床前異基因型組合 GRN 突變攜帶者中，這種表型亦於 Grn 基因剔除小鼠中觀察到。Grn 剔除小鼠亦會在整個中樞神經系統中形成自體螢光的聚集體(稱為脂褐質)的顯著沉積物。非侵入式視網膜成像揭示了異基因型組合 GRN 突變攜帶者的臨床前視網膜脂褐質病。此研究中使用眼部同調斷層掃描(Ocular coherence tomography；OCT)來評估在篩選時及圖 36A-圖 36C 中概述之時間點的視網膜脂褐質。

【0311】

神經退化之神經影像生物標記的評估

磁共振成像(MRI)

具有 GRN 單套缺失的患者主要表現出額葉及顳葉皮質中的神經元細胞喪失，症狀發作後全腦體積通常以每年 3.4%的速度減少。因此，此利用 T1 加權的 MRI 來

追蹤腦體積、白質完整性以及中額葉皮質及頂葉區域厚度的變化，此等區域為目標族群的所有臨床表現中最常受影響的大腦區域。隨著時間的推移，投予 PBFT02 預期會將此等區域萎縮中的衰退穩定下來。收集來自其它皮質或皮質下大腦區域的其它探察的資料，因為萎縮影響的大腦區域在各種臨床表現中可能有所不同，而此等資料可能有助於了解 GRN 相關神經退化的自然病程。在篩選期間及在圖 36A-圖 36C 中概述之時間點進行 MRI。

【0312】

氟化去氧葡萄糖正子發射斷層掃描(Fluorodeoxyglucose positron emission tomography；FDG PET)

在 FTD 中，低代謝通常見於額葉及前顳葉，更具體地見於雙側內側、下及上外側額葉皮質、前扣帶迴(anterior cingulate)、左顳葉及右頂葉皮質以及尾狀核(caudate nuclei)。通常，低代謝與 MRI 上的萎縮相關，但通常先於萎縮。對於 FTD，FDG PET 掃描的靈敏度範圍為 47%到 90%；特異性為 68%到 98%。隨著時間的推移，可見到異常的增加，表明 FDG PET 作為疾病進展的生物標記的潛在有用性。隨著時間的推移，投予 PBFT02 預期會將此等區域觀察到的低代謝穩定下來。FDG PET 成像在篩選期間及在圖 36A-圖 36C 中概述之時間點進行。

【0313】

EEG/誘發反應電位

事件相關的EEG活動的振幅或來源活動係探測感覺及認知運動訊息過程中視丘皮質及上升活動系統的同步/解同步及耦合/去耦合機制，並可揭示輕度認知障礙及阿茲海默氏症及干預的漸進影響，尤其是在早期疾病階段，並可能對其它形式的失智症有用。

【0314】

臨床結果評量

評估 PBFT02 對臨床進展、生活品質及功能的影響。由於目標患者族群表現出表型異質性，而採用在臨床呈現範圍內捕捉所表現之症狀進展的量表來量測隨時間推移的變化。此等功效評估旨在捕捉 PBFT02 隨著時間的推移穩定症狀下降的能力。在具有不同臨床表現的患者的各種臨床參數間進一步衰退的速率的數據，被用於進一步告知適當終點的選擇，並為了登錄試驗確定具有臨床意義的變化。

【0315】

行為、語言及認知的評估

CDR plus NACC FTLD

CDR plus NACC FTLD為典型臨床失智症評定(CDR)量表的擴展版本，其歷史上一直用於評估 AD 譜疾病的嚴重程度。評估包括 CDR 的原始六個領域(記憶、定向、判斷及解決問題、社群事務、家庭及嗜好、個人照護)。其亦包括語言及行為二個額外領域，可使得在檢測 FTLD 譜患者衰退方面具有更高的靈敏度。綜合評定

得分0表示正常行為或語言，而得分0.5、1、2或3表示輕度到嚴重缺陷。CDR plus NACC FTLD的加總計分(CDR plus NACC FTLD sb)得分代表各個領域的總和，並用於確定個別領域及跨多個領域的疾病嚴重程度的進展。

【0316】

額顳葉功能測試(Frontotemporal Assessment Battery；FAB)

FAB為評估執行功能的簡要評估。在輕度失智的患者(MMSE>24)中特別有用。評估由6個部分所組成，針對認知、運動及行為領域。總分為18分及更高得分表明較佳之表現。

【0317】

額顳葉失智症評定量表(FRS)

FRS衡量疾病進展。其係由對30個探索性問題的項目分析所建構，此等探索性問題係從兩個旨在測量失智相關的行為及失能的較舊工具中挑選出來的。計算統計上定義的閾值以定義嚴重程度。FRS檢測FTD之隨時間推移的疾病進展差異。此簡短的訪談係與主要照護者進行，由30個項目所組成，被分類為從不、有時或總是發生。然後計算百分比分數，並將其轉換為對數分數，並最終轉換為嚴重程度分數。嚴重程度評分的範圍從「非常輕度」到「嚴重」。

【0318】

波斯頓命名測試(Boston Naming Test；BNT)

BNT 為一種廣泛使用的評估對證命名能力(confrontation naming ability)的工具。BNT 由 60 幅物體的黑白線條圖所組成，此等線條圖按照詞彙詞頻從床(bed)到算盤(abacus)排序。考慮圖片刺激之順序，發現具有舉名困難(dysnomia)的個體在命名低頻率物體時通常有更大的困難。

【0319】

多語言命名測試(MINT)

32 項 MINT 為 BNT 的替代方案，BNT 最初開發用於測試 4 種語言(英語、西班牙語、希伯來語及中文)的命名，MINT 注意使語言間項目的難度水準相等。MINT 對阿茲海默氏症的命名障礙很敏感。

【0320】

數字廣度測試

數字廣度測試用於衡量個人的工作記憶數字存儲能力，而且為執行功能的測量。參與者會看到一系列數字(例如，「8、3、4」)，並且必須立即重複此等數字。若他們成功地做到，他們會獲得一個更長的列表(例如，「9、2、4、0」)。一個人能記住的最長列表的長度即為這個人的數字廣度。雖然要求參與者在順向數字廣度任務中以給定順序輸入數字，但在反向數字廣度任務中，參與者需要顛倒數字的順序。

【0321】

語文流暢性(音素測試)

單字流暢性係以語義及字母單字列表生成測試及兩個字母生成任務來衡量。每項任務需要 60 秒，並合計正確的項目。注明錯誤及違反規則。

【0322】

路徑描繪測試(口語適應)

路徑描繪測試的口語版本為一種神經心理學測量，其提供對連續心向轉移(sequential set-shifting)的評估，而無需書面路徑描繪測試的運動及視覺要求。最初的目的係作為書面路徑描繪測試的口語模擬，口語版本提供了一種評估身體受限患者的方法。其為一種執行功能的臨床測量。

【0323】

班森複雜圖形複製(10 分鐘回憶)

班森複雜圖形為對建構能力的測試。圖形元素係對存在及位置進行評分。在延遲之後測試複製力以測量永久記憶。

【0324】

加州語文學習測試(CVLT)，第二版

CVLT 作為情節語文學習及記憶的量測的建構效度，在神經心理學文獻中獲得了相當多的支持。此測量使用在四次學習試驗中呈現的 9 字列表來評估最近的情節記憶。在 30 秒的轉移注意力任務之後立即進行自由回憶。延遲 10 分鐘後進行自由回憶及語義提示回憶試驗。

【0325】

蒙特利爾認知評估(MoCA)

MoCA為一頁30分的測試，旨在作為輕度認知功能障礙的快速篩選工具。其評估不同的認知領域：注意力及專注力、執行功能、記憶、語言、視覺建構技能、概念思維、計算及定向。

【0326】

生活品質及機能性活動的評估

機能性活動問卷(FAQ)

FAQ衡量日常生活中的工具性活動，例如準備均衡膳食及管理個人財務。由於機能變化在失智症過程中較早被注意到，以及與日常生活的基本活動相比，日常生活的工具性活動需要更高的認知能力，而此工具有用於監測此等機能隨時間推移的變化。

【0327】

施瓦布及英格蘭日常生活活動量表(SEADL)

施瓦布-英格蘭量表在0-100%的範圍內對日常生活能力活動進行評分，其中100%為完全獨立且沒有失能。此量表有用地整體衡量日常生活活動的獨立性及表現。

【0328】

臨床總體印象變化

CGI-C為一種簡短、廣泛使用的評估的三個部分之一。該評估由3個項目所構成，此等項目係由臨床醫師觀察員評定。CGI-C的評分為7分制，從研究招募開始，無論任何改善是否完全由治療所引起，範圍從1(大幅改善)到7(非常差)。

【0329】

其它評估

C-SSRS

使用哥倫比亞自殺嚴重程度評定量表(C-SSRS)評估自殺風險。C-SSRS為一種3部分量表，衡量自殺意念、意念強度及自殺行為。此評估的結果由直接從量表所得之自殺行為殺傷力等級、自殺意念得分及自殺意念強度等級所構成。根據評估準則，大於0的意念得分可表示需要介入。強度等級的範圍為0到25，其中0表示不支持自殺意念。

【0330】

安全性評估

在治療期期間，定期進行安全性評估，如圖36A–圖36C中所列。此等安全性評估包括但不限於AE及伴隨藥物監測；用於臨床實驗室測試測定(血液學、臨床化學、尿液分析)的血液樣品採集；生命徵象測量；身體及神經學檢查、神經傳導研究及TNSn。

【0331】為了將受試者的風險降至最低，此研究排除了對臨床程序有禁忌症、缺乏被預測為致病性的GRN突變、或患有與神經系統或免疫系統相關的疾病的患者。

【0332】由於CNS中一些大腦區域的PGRN水準可能高於正常水準，而密切監測患者是否有潛在CNS腫瘤的徵象。通過CBC檢測盤監測受試者的驗血，且在圖36A–圖36C中指定的追蹤時間點，每年經由利用釓造影

劑的 MRI 對受試者進行腦及脊髓的監測，持續 5 年。與釓滯留相關的潛在風險係被承認的，但認為與 GRN 媒介的腫瘤的潛在風險相平衡。

【0333】

研究族群及參與期間

研究參與期間

每位受試者的研究期間為 60 個月(安全性及有效性的期間分析：24 個月)。

【0334】

目標族群

目標族群為年齡≥35 歲且≤75 歲並已被診斷為由 GRN 單套缺失引起的成人發病神經退化的患者。

【0335】

受試者的數量及位置

在美國及歐洲的多達 12 個中心招募多達 9 名成人受試者。在向機構提交期間或通過醫院/醫生轉診來確定受試者。亦利用地方、區域及國家受試者宣導小組夥伴關係來提高對研究的認識。

【0336】

納入基準

1.招募時≥35 歲且≤75 歲

2.根據以下基準之一確認 *GRN* 突變(在篩選期間或基於使用經驗證之分析的記錄病史)為原因：

•根據美國醫學遺傳學學會(ACMG)發布的指南，由阿茲海默氏症及額顳葉失智症突變資料庫(Alzheimer

Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database；AD&FTDMDB)歸類為致病性的突變

•在 AD&FDMDB 中歸類為「致病性不明」或被 ACMG 指南歸類為「顯著性不確定的變異」，且患者具有相同或相關神經退化性疾病(額顳葉失智症(所有變異型)、進行性核上神經麻痺症、皮質基底核症候群或肌肉萎縮性脊髓側索硬化症)的家族史

•應無證據表明 GRN 以外的突變可解釋疾病的存在。

3.依據目前國際共識診斷基準的可能的 bvFTD 或 PPA(非流暢變異型[nfvPPA]、語義變異型[svPPA]或語彙減少變異型[lPPA])之臨床及影像學診斷：

•根據 Rascovsky(2011)基準的可能的 bvFTD

A. 必須存在以下三種行為/認知症狀(A-F)。需要確定症狀為持續的或反復出現的，而不是單一的或罕見事件。

A. 早期*行為的抑制解除[必須存在以下症狀(A.1–A.3)之一]：

A.1. 社會不當行為

A.2. 失去禮貌或禮儀

A.3. 衝動、魯莽或粗心的行為

B. 早期的冷漠或惰性[必須存在以下症狀(B.1–B.2)之一]：

B.1. 冷漠

B.2. 惰性

C. 早期的失去同情心或同理心[必須存在以下症狀(C.1–C.2)之一]：

C.1. 對他人需求及感受的反應減弱

C.2. 社會興趣、相互聯繫或個人熱情的減少

D. 早期的固執的、刻板的或強迫性/儀式化行為[必須存在以下症狀(D.1–D.3)之一]：

D.1. 簡單的重複動作

D.2. 複雜的、強迫性的或儀式化的行為

D.3. 言詞的刻板化

E. 多食及飲食變化[必須存在以下症狀(E.1–E.3)之一]：

E.1. 改變食物偏好

E.2. 暴飲暴食，增加飲酒或吸煙

E.3. 口腔探索或食用不可食用的物品

F. 神經心理學概貌：記憶及視覺空間功能相對保留的執行/世代缺陷[必須存在以下所有症狀(F.1–F.3)]：

F.1. 執行任務的缺陷

F.2. 情節記憶的相對保留

F.3. 視覺空間技能的相對保留

B. 表現出顯著的功能衰退(藉由照護者報告或者由臨床失智症評定量表或機能性活動問卷得分證明)

C. 成像結果與 bvFTD 一致[必須存在以下(C.1–C.2)之一]：

C.1. MRI 上的額葉及/或前顳葉萎縮

C.2. PET 上的額葉及/或前顳葉低代謝

•根據 Gorno-Tempini(2011)基準的原發性進行性失語症變異型

根據 Mesulam(2001)的基準診斷 PPA

1.最顯著的臨床特徵為語言困難

2.此等缺陷為日常生活活動受損的主要原因

3.失語症應該為症狀發作時及疾病初期最顯著的缺陷

一旦確定 PPA 診斷，應使用以下內容對 PPA 變異型進行分類：

A. 非流暢變異型[nfvPPA]

-必須至少存在以下兩個核心特徵之一：

1.語言產生中的語法缺失

2.費力、停頓的說話，伴隨不一致的語音錯誤及失真(言語失用)

-必須存在以下 3 個其它特徵中的至少 2 個：

1.對語法複雜的句子的理解受損

2.多餘的單詞理解

3.多餘的客觀知識

-成像必須顯示以下一個或多個結果：

a. MRI 上主要的左後額腦島萎縮，或

b. PET 上主要的左後額腦島低代謝

B. 語義變異型 PPA [svPPA]

-必須存在以下兩個核心特徵：

1.對證命名受損

2.單詞的理解受損

-必須存在以下其它診斷特徵中的至少 3 個：

1.客觀知識受損，特別是對於低頻率或不熟悉的項目

2.表層閱讀障礙或書寫障礙

3.多餘的複誦

4.多餘的言語產生(語法及運動言語)

-成像必須顯示以下一個或多個結果：

a. MRI 上主要的前顳葉萎縮

b. PET 上主要的前顳葉低代謝

C. 語彙減少變異型[lPPA])

-必須存在以下兩個核心特徵：

1.自發說話及命名中的單詞檢索受損

2.句子及短語的重複受損

-必須存在以下其它特徵中的至少 3 個：

1.自發說話及命名中的言語(音韻)錯誤

2.多餘的單詞理解及客觀知識

3.多餘的運動言語

4.缺乏直率的語法

-成像必須顯示以下至少一個結果：

a. MRI 上主要的左後薛氏腦裂周圍或頂葉萎縮

b. PET 上主要的左後薛氏腦裂周圍或頂葉低代謝

4.包括具有 bvFTD 或 ppaFTD(如基準#2 中定義)的受試者，其伴隨表現進行性核上神經麻痺症候群(PSP)、皮質基底症候群(CBS)或肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)(僅具有運動症狀的受試者不符合招募條件)。

5.具有可靠的情報提供者，其至少每週親自與該受試者交談或見到該受試者

6.CDR plus NACC FTLD 總分 0.5

7.低顆粒蛋白前體水準：篩選沒有病歷證實的低 CSF 顆粒蛋白前體水準之受試者的血漿顆粒蛋白前體水準。若血漿顆粒蛋白前體水準低，則可招募該受試者。

8.提高的 NfL：篩選沒有病歷證實的高 NfL CSF 水準之受試者的血漿 NfL 水準。若血漿 NfL 水準升高，則可招募該受試者。

【0337】

排除基準

1.阿茲海默氏症的生物標記證據。先前未被鑑定出具有阿茲海默氏症生物標誌證據，或在過去 12 個月內未接受過阿茲海默氏症生物標記測試的受試者，篩選該受試者血漿 ptau181 的水準；如果血漿 ptau181 符合 AD 病理，則排除該受試者。

2.Rosen 改良型 Hachinski 缺血量表得分>7。

3.MRI 上的 Fazekas 得分>1。

4.已知存在可合理解釋有症狀受試者的症狀的結構性腦病灶(例如，腫瘤、皮質梗塞)。

5.在 PSEN1、PSEN2 或 APP 中已知存在導致阿茲海默氏症的突變。

6.柯沙可夫氏腦病變、嚴重酒精依賴(失智症發病 5 年內)經常飲酒或其它物質中毒的先前病史。

7.B12 缺乏症之經由病史或實驗室測試的證據為排除性的，除非後續實驗室測試(升半胱胺酸及甲基丙二酸)表明該值不具有生理意義。以 B12 補充治療的受試者可在研究者審查他們的診斷及治療歷史記錄並經試驗委託者的醫學監督書面同意後被招募，以確保疾病/治療的穩定性及順應性。

8.未經調節的甲狀腺功能低下症之經由病史或實驗室檢測的證據([TSH]>正常值的 150%)。

9.腎衰竭(肌酸酐>2)。

10.肝衰竭(ALT 或 AST>正常值的二倍)。

11.需要補充氧氣的呼吸衰竭。

12.大的融合性白質病灶。

13.嚴重的全身性疾病，如心血管疾病惡化。

14.無法提供完全同意或缺乏可提供同意的具有充分聯繫的合法授權的照護者。

15.MRI、ICM 遞送或 LP 的禁忌症(例如，局部感染、血小板減少症、凝血病、顱內壓升高([ICP]由於佔位性病灶))。

16.在 AD&FDMDB 中將 GRN 突變分類為「非致病性」、「可能的良性變異」或「良性變異」。

17.免疫功能不全的患者。

18.對於人類免疫缺陷病毒(HIV)或 C 型肝炎呈陽性測試結果的患者。

19.非 GRN 突變引起的其它惡性腫瘤或慢性 CNS 病症。

20.研究者認為可能對受試者構成風險的藥物，例如免疫抑制藥物或全身性皮質類固醇。若在篩選前30天使用穩定劑量並同意在試驗期間保持相同劑量，則可使用非類固醇類消炎藥(NSAID)。

21.惡性腫瘤(局部皮膚癌除外)或有遺傳性癌症症候群的記錄病史。在試驗委託者或指定人員討論及批准後，可包括具有先前已成功治療的惡性腫瘤並充分追蹤以排除復發(基於腫瘤科醫師的意見)的受試者。

22.研究者認為可能導致與 GRN 突變無關的認知障礙的任何並行疾病，包括失智症的其它原因、神經梅毒、水腦症、中風、小血管缺血性疾病、不受控制的甲狀腺功能低下症、或維生素缺乏症。

23.對於有生育能力的女性，在篩檢訪視時藉由血清妊娠試驗證實尿液呈陽性、在投予研究產物前第 1 天由血清結果證實尿液呈陽性、或不願意在研究期間進行其它妊娠試驗。

24.對於有生育能力的男性及女性，從篩檢日起至投予載體後52週，不願意使用醫學上認可的雙重屏障避孕方法(例如與避孕藥一起使用的避孕套/隔膜)或禁慾

25.研究者認為會給受試者帶來不適當的風險的任何病況(例如，任何疾病病史、任何當前疾病的證據、身體檢查的任何發現或任何實驗室異常)，或者研究者認為會干擾對研究產品的評估、或對受試者安全性或研究結果的解釋

26.在招募 30 天內需要住院的任何急性疾病

【0338】

禁令及限制

潛在受試者必須願意並能夠在研究過程中遵守以下禁令及限制，才有資格參與：

- 在研究完成(即最後的追蹤訪問)後至少90天內避免捐血。
- 與伴隨藥物相關的任何禁令或限制。
- 在預定訪問研究地點之前的 24 小時內不允許使用含酒精的產品。

【0339】

劑量及投予

劑量

腦大池內輸注

為了避開靜脈內(IV)全身性AAV投予以治療CNS的局限性，本研究使用鞘內(IT)載體遞送到腦大池。使用CSF作為用於分散載體的媒劑，IT投予有可能以單次微創程序實現整個CNS的轉基因遞送。動物研究證實，藉由消除穿越血腦屏障的需要，IT遞送產生實質上更有效的CNS基因轉移，且載體劑量比IV方法低得多。對於進入CSF存在多種途徑，包括腰椎穿刺(LP)及腦大池內(ICM)。研究顯示，與以腦大池的水準注射載體相比，經由LP將AAV載體遞送到CFS中，在轉導大腦及脊髓細胞方面的效率至少低10倍。

【0340】

預先研究及伴隨藥物

在篩選開始前最多 30 天所進行的所有研究前治療必須在篩選時記錄。

【0341】從簽署初始 ICF 開始，直到研究結束訪視(後續追蹤訪視)，必須在整個研究過程中記錄所有伴隨治療。具體而言，任何與研究藥物不同的療法(處方藥或非處方藥，包括疫苗、維生素、草藥補充劑；非藥物療法，如電神經刺激、針灸、特殊飲食、運動方案)都必須記錄在受試者的來源記錄中並輸入 eCRF。

【0342】超過此時間的伴隨治療也應與新的或惡化的 AE 一起記錄，直到事件解決。指示受試者在開始任何新藥物或補充劑之前以及在改變任何當前伴隨藥物或補充劑的劑量之前須諮詢研究者或研究中心的其它適當研究人員。

【0343】在 eCRF 中單獨收集有關使用特別感興趣的特定伴隨藥物(即 AChE 抑制劑、美金剛(memantine)、苯二氮卓類及抗抑鬱藥)的資訊，包括劑量及投予途徑、投予日期及使用適應症。必須提前(或在此後儘快)通知試驗委託者任何投予違禁療法的情況。

【0344】與 AD 相關之症狀的進展不應被記錄為 AE，除非根據研究者的意見，彼等被認為是加速的。然而，任何對症治療都會記錄到研究結束訪視(追蹤訪視)。對於將受試者招募至研究的明確目的，不應修改有效的預先存在的治療方法。

【0345】如果受試者在研究藥物投劑開始前至少 6 週服用穩定的藥物，則允許穩定醫療狀況的治療，這在

老年族群中可能很常見。如果可能，受試者應在研究期間保持穩定的藥物治療。僅當臨床顯示且必須在 eCRF 的伴隨藥物部分進行記錄時，才允許更改或添加藥物。

【0346】在招募至研究時，以認知增強劑(例如，AChE 抑制劑)或用於治療認知缺陷的藥物進行治療為排他性的。基於醫療需要，允許在研究期間出現認知下降的受試者接受已批准的 AD 療法，但未經試驗委託者明確許可，不允許接受此等預計會對認知表現產生影響的新療法或療法調整(例如，AChE 抑制劑或美金剛)。在受試者開始、停止或改變預期對認知有影響的治療劑量之前，必須聯繫試驗委託者的醫學監督以確定受試者是否應繼續參與研究，以及是否應執行臨床結果評量。

【0347】研究期間不允許連續(每日)使用苯二氮卓類；但是，允許偶爾攝入短效苯二氮卓類。如果受試者需要以苯二氮卓類進行間歇性治療，則從苯二氮卓類的最後一次投劑與隨後的認知評估之間的間隔必須至少為該化合物的 4 個半衰期或 24 小時，以較長者為準。若在任何訪視時或任何短期使用鎮靜藥物用於研究程序(例如，MRI、PET 掃描、腰椎穿刺)，則所有認知評估都必須在投予鎮靜劑之前、或者在投予鎮靜劑至少 24 小時或 4 個半衰期之後(以較長者為準)進行並完成。

【0348】如果打算在整個研究過程中保持劑量不變，則可能會給予其它影響中樞神經系統(CNS)功能的伴隨藥物。從隨機化前 6 週開始，此等化合物的劑量應保持恆定。為了避免對認知評估的影響，除非有記錄的醫療必要性，以下適用與試驗委託者的醫學監督討論：

•在隨機化前至少 6 週接受穩定劑量之影響 CNS 功能的藥物的受試者不應在研究期間停止投予該藥物，也不應改變該藥物的劑量。

•在研究期間，受試者不應添加任何影響 CNS 功能的藥物。

【0349】若在研究期間出現影響 CNS 功能的任何不可預見的開始、停止或更改為穩定劑量的治療，必須聯繫試驗委託者的醫學監督以確定受試者是否應繼續參與研究以及是否應執行臨床結果評量。

【0350】對於 CSF 採樣，除非本節另有說明，否則應遵循與伴隨治療相關的當地站點說明。討論可能為患者開具的伴隨精神作用藥物的使用。

【0351】

研究程序

進行的評估

在圖 36A-圖 36C 所示的研究訪視中，所有受試者都需要以下章節中所確定的研究程序。

【0352】

書面知情同意

在任何與研究相關的程序(包括篩選評估)之前，患者/照護者必須簽署 IRB/IEC 批准的知情同意書(ICF)。

【0353】

病史及身體檢查

研究者收集並記錄受試者的人口統計數據、既往病史、既往及伴隨藥物、身高及體重。一次全面的身體檢

查及一次全面的神經檢查，包括力量、感覺、協調性及反射測試，由醫生在基線訪視時進行。討論病史的任何變化，包括不良事件或藥物。

【0354】

血漿及血清生物標記

在同意後抽血用於血漿、自然、DNA及RNA。標準安全實驗室在現場實驗室或由現場簽約的當地實驗室進行，現場工作人員將實驗室數值輸入到eCRF中。如研究操作手冊中所述，由中央實驗室處理的樣品係在現場儲存並由現場在乾冰上分批運輸。在每次研究訪問時，由有經驗的研究人員使用標準程序進行抽血。抽血不需要禁食。如果受試者正在接受全身麻醉，則可在此期間進行抽血以減輕疼痛及不適。

【0355】

神經傳導研究(NCS)

神經傳導研究(NCS)包括使用研究手冊中指定的標準表面記錄技術測量兩條感覺神經(一條在手臂，一條在腿)的遠端節段的神經傳導速度及振幅。在基線及指定的時間點進行評估NCS。在每個時間點，採取重複測量以最大限度地減少變異性。感覺神經傳導速度以公尺/秒為單位測量，並在反應起始時記錄。以微伏特為單位測量從基線到峰值的感覺神經振幅。在整個研究過程中，所有NCS均在個體受試者身體的同一側進行，並仔細記錄及保持皮膚溫度。臨床站點由集中的核心實驗室專家對NCS進行培訓及認證，經由核心實驗室及試驗委託者的持續審查來確保NCS資料的品質控制。

【0356】

心電圖(ECG)

心電圖係一種使用連接到受試者胸部、手臂及腿部的電極來記錄心臟中的電活動並檢測異常情況的測試。訪視時測量生命徵象，應先完成心電圖。

【0357】

腦部磁共振成像(MRI)

在受試者同意後，在圖 36A–圖 36C 所示的研究訪視中對受試者進行 MRI。

【0358】獲得 T1 加權的 MRI 成像以評估疾病進展及以釓造影劑進行安全監測。

【0359】

腰椎穿刺及 CSF 生物標記

在受試者同意後，在圖 36A–圖 36C 所示的研究訪視中為所有受試者收集 CSF。該過程涉及腰椎穿刺。在對病史的最初討論期間，確定受試者當前是否正在服用抗血小板藥物。如果受試者正在服用抗血小板藥物，則該訪視不進行腰椎穿刺。

【0360】腰椎穿刺由合格的現場工作人員根據標準醫院程序進行。所有適當的測試前程序都在腰椎穿刺之前進行。腰椎穿刺及 CSF 採集可在全身麻醉下進行。

【0361】標準 CSF 化學及細胞學測試在現場實驗室或由現場簽約的當地實驗室進行，由現場工作人員將實驗室數值輸入 eCRF。由中央實驗室處理的樣品係由現場工作人員在現場儲存並在乾冰上分批運輸，用於 FTD

特異性生物標記測試(PGRN蛋白、載體DNA、載體中和抗體)及未來的研究(如果獲得同意)。

【0362】在研究操作手冊中的所有研究特定樣品的收集、處理及儲存程序都提供給站點。在指定的研究訪視時為受試者收集 CSF。在每次此等訪問中，確定受試者當前是否正在服用血液稀釋劑。如果受試者正在服用抗血小板藥物，則不對該訪問進行腰椎穿刺。

【0363】

總神經病變評分-護理

總神經病變評分-護理包括對於治療突發的感覺、運動及自主神經症狀、以及定量感覺測試(振動及針)對受試者進行針對性的提問。使用 Rydel-Seiffer C64 分級音叉進行振動測試，使用 NeuroPen 進行針測試。在臨床現場執行 TNSn 的個人應具有醫學背景及患者照護經驗(例如，護士、醫師助理、醫師-非神經病學家、經驗豐富的臨床技術人員)。他們應該能夠輕鬆應對患者並收集臨床資料。所有執行 TNSn 的現場人員都必須使用 NeuroPen 及 Rydel-Seiffer C64 刻度音叉完成由試驗委託者開發的培訓模組及培訓文件。

【0364】

受試者退出及提前終止

受試者可隨時退出研究而不影響他們的護理。出於欠缺依從研究程序或訪視時間表，根據研究者的裁量亦可將他們從研究中終止。出於保護受試者的安全相關原因或出於行政原因，研究者亦可使違反研究計劃的受試

者退出。eCRF 中記錄了每個受試者是否完成了研究以及提前退出/終止的原因(如果適用)。提前退出的受試者，包括因開始接受任何妨礙他們繼續參與的研究產品的治療而提前終止的受試者，應盡一切努力參加最終的研究結束臨床訪視(於第 720 天訪視)，在此期間進行所有研究結束程序。如果提前終止的原因為死亡，這應該記錄在 eCRF 及收集的文件中，並與受試者的來源一起保存。

【0365】對/從退出研究或提前終止的受試者收集的資料繼續用於分析，直至他們退出或終止。在提前終止後，照護者可撤回對運送到中央實驗室或生物庫的實驗室樣品進行進一步測試的同意；但是，任何已經去識別化的樣品/樣品資料不能從數據集中排除。

【0366】(序列表之非關鍵詞文字)

對於含有在數字識別號<223>下的非關鍵詞文字的序列，提供下列資訊。

SEQ ID NO	在<223>下的非關鍵詞文字
3	<223> 工程化人類 PGRN1 編碼序列
4	<223> 工程化 hPGRN2 編碼序列 <220> <221> CDS <222> (1)..(1779)
5	<223> 合成構築體
6	<223> 兔球蛋白 polyA
7	<223> 3' AAV ITR
8	<223> 5' AAV ITR
9	<223> 人類 CMV IE 強化子
10	<223> CB 啟動子
11	<223> 嵌合內含子
12	<223> UbC 啟動子

13	<223> 內含子
14	<223> SV40 晚期 polyA
15	<223> 安比西林抗性基因
16	<223> COL E1 起始
17	<223> EF-1a 啟動子
18	<223> F1 ori
19	<223> 康黴素抗性基因
20	<223> P5 啟動子
21	<223> LacZ 啟動子
22	<223> EF1a.hPGRN.SV40 <220> <221> 重複區域 <222> (1)..(130)
23	<223> Ubc.PI.hPGRN.SV40
24	<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE 強化子 <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> 雞 β-肌動蛋白啟動子 <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> 嵌合內含子 <220> <221> misc_feature <222> (1942)..(3726) <223> hPGRN <220> <221> misc_feature <222> (3787)..(3913) <223> 兔 β 球蛋白 poly A <220> <221> misc_feature <222> (4002)..(4131) <223> 3' ITR

25	<223> AAV1 VP1 gen <220> <221> CDS <222> (1)..(2208)
26	<223> 合成構築體
27	<223> AAV2 rep
28	<223> AAV5 殼體 VP1 基因 <220> <221> CDS <222> (1)..(2172)
29	<223> 合成構築體
30	<223> AAVhu68 VP1 殼體 <220> <221> CDS <222> (1)..(2211)
31	<223> 合成構築體
32	<223> miRNA 標靶序列
33	<223> miRNA 標靶序列
34	<223> miRNA 標靶序列
35	<223> miRNA 標靶序列

【0367】本說明書中引用的所有文獻皆藉由引用併入本文。在此申請的名為「21-9658PCT_ST25.txt」的序列表及其序列及正文藉由引用併入本文。2019年2月22日申請之美國臨時專利申請號62/809,329、2019年10月21日申請之美國臨時專利申請號62/923,812、2020年2月2日申請之美國臨時專利申請號62/969,108、2020年8月26日申請之美國臨時專利申請號63/070,639及2020年2月21日申請之國際專利申請號PCT/US20/19149，藉由引述而併入本文。儘管已參考特定具體實施例而描述本發明，應理解於不脫離本發明的精神下可進行修改。意圖使此種修改落入所附申請專利範圍的範疇內。

【符號說明】

無。

序列表

<110> 賓州大學委員會(The Trustees of the University of Pennsylvania)

<120> 用於治療GRN相關的成年發病神經退化之重組腺相關病毒

<130> 21-9658.PCT

<140> TW 110131628
<141> 2021-08-26

<150> US 63/070,639
<151> 2019-02-22

<160> 35

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 593
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15

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

Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45

Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60

Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80

Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
85 90 95

His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110

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

Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
130 135 140

```
Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145                 150                 155                 160

Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
                165                 170                 175

Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
            180                 185                 190

Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
        195                 200                 205

Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
    210                 215                 220

Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225                 230                 235                 240

Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
                245                 250                 255

Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
            260                 265                 270

Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
        275                 280                 285

Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
    290                 295                 300

Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305                 310                 315                 320

Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
                325                 330                 335

Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
            340                 345                 350

Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
        355                 360                 365
```

Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380

Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400

Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415

Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445

Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460

Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480

Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495

Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510

His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525

Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
530 535 540

Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560

Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

Leu

<210> 2
<211> 1782
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
atgtggaccc tggtgagctg ggtggcctta acagcagggc tggtggctgg aacgcggtgc 60

ccagatggtc agttctgccc tgtggcctgc tgcctggacc ccggaggagc cagctacagc 120

tgctgccgtc cccttctgga caaatggccc acaacactga gcaggcatct gggtggcccc 180

tgccaggttg atgcccactg ctctgccggc cactcctgca tctttaccgt ctcagggact 240

tccagttgct gcccccttccc agaggccgtg gcatgcgggg atggccatca ctgctgccca 300

cggggcttcc actgcagtgc agacgggcga tcctgcttcc aaagatcagg taacaactcc 360

gtgggtgcca tccagtgccc tgatagtcag ttcgaatgcc cggacttctc cacgtgctgt 420

gttatggtcg atggctcctg ggggtgctgc cccatgcccc aggcttcctg ctgtgaagac 480

agggtgcact gctgtccgca cggtgccttc tgcgacctgg ttcacacccg ctgcatcaca 540

cccacgggca cccaccccct ggcaaagaag ctccctgccc agaggactaa cagggcagtg 600

gccttgtcca gctcggtcat gtgtccggac gcacggtccc ggtgccctga tggttctacc 660

tgctgtgagc tgcccagtgg gaagtatggc tgctgcccaa tgcccaacgc cacctgctgc 720

tccgatcacc tgcactgctg cccccaagac actgtgtgtg acctgatcca gagtaagtgc 780

ctctccaagg agaacgctac cacggacctc ctcactaagc tgcctgcgca cacagtgggg 840

gatgtgaaat gtgacatgga ggtgagctgc ccagatggct atacctgctg ccgtctacag 900

tcgggggcct ggggctgctg ccctttttacc caggctgtgt gctgtgagga ccacatacac 960

tgctgtcccg cggggtttac gtgtgacacg cagaagggta cctgtgaaca ggggccccac 1020

caggtgccct ggatggagaa ggccccagct cacctcagcc tgccagaccc acaagccttg 1080

aagagagatg tcccctgtga taatgtcagc agctgtccct cctccgatac ctgctgccaa 1140

ctcacgtctg gggagtgggg ctgctgtcca atcccagagg ctgtctgctg ctcggaccac 1200

cagcactgct gcccccaggg ctacacgtgt gtagctgagg ggcagtgtca gcgaggaagc 1260

gagatcgtgg ctggactgga gaagatgcct gcccgccggg cttccttatc ccaccccaga 1320

gacatcggct gtgaccagca caccagctgc ccggtggggc agacctgctg cccgagcctg 1380

ggtgggagct gggcctgctg ccagttgccc catgctgtgt gctgcgagga tcgccagcac 1440

tgctgcccgg ctggctacac ctgcaacgtg aaggctcgat cctgcgagaa ggaagtggtc 1500

tctgcccagc ctgccacctt cctggcccgt agccctcacg tgggtgtgaa ggacgtggag 1560

tgtggggaag gacacttctg ccatgataac cagacctgct gccgagacaa ccgacagggc 1620

tgggcctgct gtccctaccg ccagggcgtc tgttgtgctg atcggcgcca ctgctgtcct 1680

gctggcttcc gctgcgcagc caggggtacc aagtgtttgc gcagggaggc cccgcgctgg 1740

gacgcccctt tgagggaccc agccttgaga cagctgctgt ga 1782

<210> 3
<211> 1785
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 工程化人類PRGN1編碼序列

<400> 3
atgtggaccc tggtgtcttg ggttgcactg acagctggac tggtggccgg cacaagatgt 60

cctgacggcc agttttgccc cgtggcctgc tgtcttgatc ctggcggagc cagctacagc 120

tgctgcagac ctctgctgga taagtggccc accacactga gcagacacct cggaggacct 180

tgtcaggtgg acgcccactg ttctgccgga cacagctgca tctttaccgt gtctggcacc 240

tccagctgct gtccatttcc tgaggctgtg gcctgcggag acggccacca ctgttgtcct 300

agaggcttcc actgtagcgc cgacggcaga agctgctttc agagaagcgg caacaatagc 360

gtgggcgcca tccagtgtcc tgacagccag ttcgagtgcc ccgacttcag cacctgttgc 420

gtgatggtgg acggcagctg gggctgttgt ccaatgcctc aggctagctg ctgcgaggac 480

agagtgcact gttgccctca cggcgccttt tgcgatctgg tgcacacccg gtgcatcacc 540

ccaacaggca cacatcctct ggccaagaag ctgcctgctc agcggaccaa tagagccgtg 600

gctctgagca gcagcgtgat gtgccctgac gccagatcca ggtgtccaga cggctccaca 660

tgttgcgaac tgcccagcgg caaatacggc tgctgcccca tgcctaacgc cacatgctgt 720

agcgaccatc ttcactgctg cccacaagac accgtgtgcg acctgatcca gagcaagtgc 780

ctgagcaaag agaacgccac caccgacctg ctgaccaaac tgccagctca caccgtggga 840

gatgtgaagt gcgacatgga agtgtcttgc cccgacggct atacctgctg tagactgcaa 900

tctggcgcct ggggctgctg ccctttttaca caagctgtgt gttgcgagga ccacatccat 960

tgctgccctg ccggcttcac ctgtgacaca cagaaaggca cctgcgagca gggccctcat 1020

caggtgccat ggatggaaaa agcccctgct cacctgagcc tgcctgatcc tcaagctctg 1080

aagagggacg tgccctgcga caatgtgtct agctgcccta gcagcgacac ctgctgccag 1140

ctgacatctg gcgagtgggg ctgctgtcct ataccagagg ccgtgtgttg ttccgaccac 1200

cagcattgct gtccccaagg ctacacctgt gtggccgaag gccaatgtca acggggctct 1260

gaaattgtgg ccggcctgga aaagatgccc gccagaaggg cttctctgtc tcacccccgg 1320

gacatcggct gcgaccagca cacatcttgt cctgtgggcc agacctgttg tccctctctt 1380

ggtggatcct gggcttgctg tcagctgcct cacgccgtgt gctgcgaaga tagacaacac 1440

tgctgtcccg ccggatacac ctgtaacgtg aaggccagat cctgcgagaa agaagtggtg 1500

tctgcccagc ctgccacctt cctggctaga agtcctcacg tgggcgtgaa ggacgtggag 1560

tgtggcgagg gccacttctg ccacgacaat cagacatgct gcagagacaa ccggcaaggc 1620

tgggcttgtt gcccatatag acagggcgtg tgctgtgccg acagaaggca ctgttgtcca 1680

gccggcttta gatgtgccgc caggggcaca aagtgtctga gaagggaagc ccctaggtgg 1740

gacgcccctc tgagagatcc tgctctgaga cagctgctct gatga 1785

<210> 4
<211> 1779
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 工程化hPRGN2編碼序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1779)

<400> 4

```
atg tgg acc ctg gtt agc tgg gtg gcc ctg acc gcc ggc ctg gtg gcc        48
Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1               5                  10                  15

ggc acc agg tgc ccc gac ggc cag ttc tgc ccc gtg gcc tgc tgc ctg        96
Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
            20                  25                  30

gac ccc ggc ggc gcc agc tac agc tgc tgc aga ccc ctg ctg gac aag       144
Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
        35                  40                  45

tgg ccc acc acc ctg agc aga cac ctg ggc ggc ccc tgc cag gtg gac       192
Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
    50                  55                  60
```

```
gcc cac tgc agc gcc ggc cac agc tgc atc ttc acc gtg agc ggc acc        240
Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65                  70                  75                  80

agc agc tgc tgc ccc ttc ccc gag gcc gtg gcc tgc ggc gac ggc cac        288
Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
                85                  90                  95

cac tgc tgc ccc aga ggc ttc cac tgc agc gcc gac ggc aga agc tgc        336
His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
            100                 105                 110

ttc cag aga agc ggc aac aac agc gtg ggc gcc atc cag tgc ccc gac        384
Phe Gln Arg Ser Gly Asn Asn Ser Val Gly Ala Ile Gln Cys Pro Asp
        115                 120                 125

agc cag ttc gag tgc ccc gac ttc agc acc tgc tgc gtg atg gtg gac        432
Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
    130                 135                 140

ggc agc tgg ggc tgc tgc ccc atg ccc cag gcc agc tgc tgc gag gac        480
Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145                 150                 155                 160

aga gtg cac tgc tgc ccc cac ggc gcc ttc tgc gac ctg gtg cac acc        528
Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
                165                 170                 175

agg tgc atc acc ccc acc ggc acc cac ccc ctg gcc aag aag ctg ccc        576
Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
            180                 185                 190

gcc cag aga acc aac aga gcc gtg gcc ctg agc agc agc gtg atg tgc        624
Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
        195                 200                 205

ccc gac gcc aga agc agg tgc ccc gac ggc agc acc tgc tgc gag ctg        672
Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
    210                 215                 220

ccc agc ggc aag tac ggc tgc tgc ccc atg ccc aac gcc acc tgc tgc        720
Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225                 230                 235                 240

agc gac cac ctg cac tgc tgc ccc caa gac acc gtg tgc gac ctg atc        768
Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
                245                 250                 255

cag agc aag tgc ctg agc aag gag aac gcc acc acc gac ctg ctg acc        816
Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
            260                 265                 270

aag ctg ccc gcc cac acc gtg ggc gac gtg aag tgc gac atg gag gtt        864
Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
        275                 280                 285

agc tgt ccc gac ggc tac acc tgc tgc aga ctg cag agc ggc gcc tgg        912
```

```
Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
    290                 295                 300

ggc tgc tgc ccc ttc acc caa gcc gtg tgc tgc gag gac cac atc cac        960
Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305                 310                 315                 320

tgc tgc ccc gcc ggc ttc acc tgc gac acc cag aag ggc acc tgc gag       1008
Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu
                325                 330                 335

cag ggc ccc cac cag gtg ccc tgg atg gag aag gcc ccc gcc cac ctg       1056
Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
            340                 345                 350

agc ctg ccc gac ccc cag gcc ctg aag aga gac gtg ccc tgc gac aac       1104
Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
        355                 360                 365

gtt agc agc tgc ccc agc agc gac acc tgc tgc cag ctg acc agc ggc       1152
Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
    370                 375                 380

gag tgg ggc tgc tgc ccc atc ccc gag gcc gtg tgc tgc agc gac cac       1200
Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385                 390                 395                 400

cag cac tgc tgc ccc caa ggc tac acc tgc gtg gcc gag ggc cag tgc       1248
Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
                405                 410                 415

cag aga ggc agc gag atc gtg gcc ggc ctg gag aag atg ccc gcc aga       1296
Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
            420                 425                 430

aga gcc agc ctg agc cac ccc aga gac atc ggc tgc gac cag cac acc       1344
Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
        435                 440                 445

agc tgc ccc gtg ggc cag acc tgc tgc ccc agc ctg ggc ggc agc tgg       1392
Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
    450                 455                 460

gcc tgc tgc cag ctg ccc cac gcc gtg tgc tgc gag gac aga cag cac       1440
Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465                 470                 475                 480

tgc tgc ccc gcc ggc tac acc tgc aac gtg aag gcc aga agc tgc gag       1488
Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
                485                 490                 495

aag gag gtg gtg agc gcc cag ccc gcc acc ttc ctg gcc aga agc ccc       1536
Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
            500                 505                 510

cac gtg ggc gtg aag gac gtg gag tgc ggc gag ggc cac ttc tgc cac       1584
His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
```

```
        515                 520                 525

gac aac cag acc tgc tgc aga gac aac aga cag ggc tgg gcc tgc tgc       1632
Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
    530                 535                 540

ccc tac aga cag ggc gtg tgc tgc gcc gac aga aga cac tgc tgc ccc       1680
Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545                 550                 555                 560

gcc gga ttt agg tgc gcc gcc aga ggc acc aag tgc ctg aga aga gag       1728
Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
                565                 570                 575

gcc ccc agg tgg gac gcc ccc ctg aga gac ccc gcc ctg aga cag ctg       1776
Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
            580                 585                 590

ctg                                                                  1779
Leu
```

<210> 5
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5

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

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

Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
        35                  40                  45

Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
    50                  55                  60

Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65                  70                  75                  80

Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His
                85                  90                  95
```

His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys
100 105 110

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

Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp
130 135 140

Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp
145 150 155 160

Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr
165 170 175

Arg Cys Ile Thr Pro Thr Gly Thr His Pro Leu Ala Lys Lys Leu Pro
180 185 190

Ala Gln Arg Thr Asn Arg Ala Val Ala Leu Ser Ser Ser Val Met Cys
195 200 205

Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys Cys Glu Leu
210 215 220

Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Thr Cys Cys
225 230 235 240

Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile
245 250 255

Gln Ser Lys Cys Leu Ser Lys Glu Asn Ala Thr Thr Asp Leu Leu Thr
260 265 270

Lys Leu Pro Ala His Thr Val Gly Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val
275 280 285

Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp
290 295 300

Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His
305 310 315 320

Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu

325 330 335

Gln Gly Pro His Gln Val Pro Trp Met Glu Lys Ala Pro Ala His Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Asp Pro Gln Ala Leu Lys Arg Asp Val Pro Cys Asp Asn
355 360 365

Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380

Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400

Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415

Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445

Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460

Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480

Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495

Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510

His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525

Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
530 535 540

Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560

Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

Leu

<210> 6
<211> 127
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 兔球蛋白polyA

<400> 6
gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agcccccttga gcatctgact 60

tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120

tcactcg 127

<210> 7
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3' AAV ITR

<400> 7
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag 130

<210> 8
<211> 130
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' AAV ITR

<400> 8
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 9
<211> 382
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類CMV IE啟動子

<400> 9
ctagtcgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc 60

atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac 120

cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa 180

tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag 240

tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc 300

ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct 360

acgtattagt catcgctatt ac 382

<210> 10
<211> 282
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CB啟動子

<400> 10
tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctccccat ctccccccccc tccccacccc 60

caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg gggggggggg 120

gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg aggcggagag 180

gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt tccttttatg gcgaggcggc 240

ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gg 282

<210> 11
<211> 973
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合內含子

<400> 11
gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg 60

cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc 120

gggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc 180

tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc 240

agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag 300

gggaacaaag gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg 360

tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag ttgctgagca cggcccggct 420

tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg 480

cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag 540

gggcgcggcg gcccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg cggcgagccg cagccattgc 600

cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt tgtcccaaat ctgtgcggag 660

ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgggc gcggggcgaa gcggtgcggc 720

gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt 780

ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc 840

agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta gagcctctgc taaccatgtt 900

catgccttct tctttttcct acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat 960

cattttggca aag 973

<210> 12
<211> 1227
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> UbC啟動子

<400> 12
ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg 60

ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc 120

ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg 180

acgggacttg ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa caggcgagga 240

aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg aacgccgatg 300

attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc 360

gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttggtg agtagcgggc tgctgggctg 420

gccggggctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgtgg agagaccgcc 480

aagggctgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg gggggagcgc 540

agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc gggctgtgag 600

gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatggtgg gcggcaagaa cccaaggtct tgaggccttc 660

gctaatgcgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct ggggaccctg 720

acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttgcggg ggcggcagtt 780

atgcggtgcc gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc gtcgtgtcgt 840

gacgtcaccc gttctgttgg cttataatgc agggtggggc cacctgccgg taggtgtgcg 900

gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc tcctgaatcg 960

acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc tttggtcggt 1020

tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc gctcggggtt 1080

ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat ttgggtcaat 1140

atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggcttt 1200

tttgttagac gaagctttat tgcggta 1227

<210> 13
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 内含子

<400> 13
gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60

cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120

tttctctcca cag 133

<210> 14
<211> 232
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> SV40晚期polyA

<400> 14
cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60

aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120

tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcaggggggag 180

atgtgggagg ttttttaaag caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat cg 232

<210> 15
<211> 858
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 安比西林抗性基因

<400> 15
atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct 60

gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 120

cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 180

gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 240

cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac actattctca gaatgacttg 300

gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 360

tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 420

ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 480

gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 540

cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 600

tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 660

tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 720

cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 780

acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 840

tcactgatta agcattgg 858

<210> 16
<211> 589
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> COL E1起始

<400> 16

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 60

agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 120

cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 180

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 240

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 300

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 360

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 420

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 480

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 540

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaa 589

<210> 17
<211> 1184
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EF-1a啟動子

<400> 17
cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60

tgggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120

aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180

gtgcagtagt cgccgtgaac gttcttttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240

gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300

gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360

ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420

cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480

ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttttt 540

tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600

gggccgcggg cggcgacggg gcccgtgcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660

tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720

tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780

caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840

ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900

ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960

tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttgggggggag gggttttatg 1020

cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080

tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140

agacagtggt tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1184

<210> 18
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> F1 ori

<400> 18
acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 60

ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 120

cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 180

gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc 240

catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga gtccacgttc tttaatagtg 300

gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat 360

aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 420

acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caattt 456

<210> 19
<211> 816
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 康黴素抗性基因

<400> 19
ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120

taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180

tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 240

tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca 300

gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg 360

cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420

atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 480

ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 540

atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600

tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660

caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 720

attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg 780

cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcat 816

<210> 20
<211> 131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> P5啟動子

<400> 20
gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat gtggtcacgc 60

tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga ggtttgaacg 120

cgcagccgcc a 131

<210> 21
<211> 295
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LacZ啟動子

<400> 21
gcggccgcca ccgcggtgga gctccagctt ttgttccctt tagtgagggt taattgcgcg 60

cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc 120

acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat gagtgagcta 180

actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca 240

gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg ggcgc 295

<210> 22
<211> 3852
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EF1a.hPGRN.SV40

<220>
<221> 重複區域
<222> (1)..(130)

<400> 22
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180

aggaagatcc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctaggctttt 240

gcaaaaagct ttgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 300

gaccttctag gtcttgaaag gagtgcctcg tgaggctccg gtgcccgtca gtgggcagag 360

cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc 420

tagagaaggt ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt 480

cccgagggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc 540

aacgggtttg ccgccagaac acaggtaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcctggcctc 600

tttacgggtt atggcccttg cgtgccttga attacttcca cctggctgca gtacgtgatt 660

cttgatcccg agcttcgggt tggaagtggg tgggagagtt cgaggccttg cgcttaagga 720

gccccttcgc ctcgtgcttg agttgaggcc tggcctgggc gctggggccg ccgcgtgcga 780

atctggtggc accttcgcgc ctgtctcgct gctttcgata agtctctagc catttaaaat 840

ttttgatgac ctgctgcgac gctttttttc tggcaagata gtcttgtaaa tgcgggccaa 900

gatctgcaca ctggtatttc ggtttttggg gccgcgggcg gcgacggggc ccgtgcgtcc 960

cagcgcacat gttcggcgag gcggggcctg cgagcgcggc caccgagaat cggacggggg 1020

tagtctcaag ctggccggcc tgctctggtg cctggcctcg cgccgccgtg tatcgccccg 1080

ccctgggcgg caaggctggc ccggtcggca ccagttgcgt gagcggaaag atggccgctt 1140

cccggccctg ctgcagggag ctcaaaatgg aggacgcggc gctcgggaga gcgggcgggt 1200

gagtcaccca cacaaaggaa aagggccttt ccgtcctcag ccgtcgcttc atgtgactcc 1260

acggagtacc gggcgccgtc caggcacctc gattagttct cgagcttttg gagtacgtcg 1320

tctttaggtt ggggggaggg gttttatgcg atggagtttc cccacactga gtgggtggag 1380

actgaagtta ggccagcttg gcacttgatg taattctcct tggaatttgc ccttttgag 1440

tttggatctt ggttcattct caagcctcag acagtggttc aaagtttttt tcttccattt 1500

caggtgtcgt gaggaattag cttggtacta atacgactca ctatagggag acccaagctg 1560

gctaggtaag cttggtaccg agctcggatc aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt 1620

gggttgcact gacagctgga ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc 1680

ccgtggcctg ctgtcttgat cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg 1740

ataagtggcc caccacactg agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact 1800

gttctgccgg acacagctgc atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc 1860

ctgaggctgt ggcctgcgga gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg 1920

ccgacggcag aagctgcttt cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc 1980

ctgacagcca gttcgagtgc cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct 2040

ggggctgttg tccaatgcct caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc 2100

acggcgcctt ttgcgatctg gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc 2160

tggccaagaa gctgcctgct cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga 2220

tgtgccctga cgccagatcc aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg 2280

gcaaatacgg ctgctgcccc atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct 2340

gcccacaaga caccgtgtgc gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca 2400

ccaccgacct gctgaccaaa ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg 2460

aagtgtcttg ccccgacggc tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct 2520

gccctttac acaagctgtg tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca 2580

cctgtgacac acagaaaggc acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa 2640

aagcccctgc tcacctgagc ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg 2700

acaatgtgtc tagctgccct agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg 2760

gctgctgtcc tataccagag gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag 2820

gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg 2880

aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc 2940

acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct 3000

gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca 3060

cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct 3120

tcctggctag aagtcctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct 3180

gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata 3240

gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg 3300

ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc 3360

ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg 3420

ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg 3480

cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 3540

ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 3600

ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat 3660

aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta 3720

caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga 3780

ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga 3840

gcgagcgcgc ag 3852

<210> 23
<211> 3972
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Ubc.PI.hPGRN.SV40

<400> 23
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180

aggaagatct ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg 240

gcgagcgctg ccacgtcaga cgaagggcgc aggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc 300

tcaggacagc ggcccgctgc tcataagact cggccttaga accccagtat cagcagaagg 360

acattttagg acgggacttg ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa 420

caggcgagga aaagtagtcc cttctcggcg attctgcgga gggatctccg tggggcggtg 480

aacgccgatg attatataag gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg 540

gatttgggtc gcggttcttg tttgtggatc gctgtgatcg tcacttggtg agtagcgggc 600

tgctgggctg gccggggctt tcgtggccgc cgggccgctc ggtgggacgg aagcgtgtgg 660

agagaccgcc aagggctgta gtctgggtcc gcgagcaagg ttgccctgaa ctgggggttg 720

gggggagcgc agcaaaatgg cggctgttcc cgagtcttga atggaagacg cttgtgaggc 780

gggctgtgag gtcgttgaaa caaggtgggg ggcatggtgg gcggcaagaa cccaaggtct 840

tgaggccttc gctaatgcgg gaaagctctt attcgggtga gatgggctgg ggcaccatct 900

ggggaccctg acgtgaagtt tgtcactgac tggagaactc ggtttgtcgt ctgttgcggg 960

ggcggcagtt atgcggtgcc gttgggcagt gcacccgtac ctttgggagc gcgcgccctc 1020

gtcgtgtcgt gacgtcaccc gttctgttgg cttataatgc agggtggggc cacctgccgg 1080

taggtgtgcg gtaggctttt ctccgtcgca ggacgcaggg ttcgggccta gggtaggctc 1140

tcctgaatcg acaggcgccg gacctctggt gaggggaggg ataagtgagg cgtcagtttc 1200

tttggtcggt tttatgtacc tatcttctta agtagctgaa gctccggttt tgaactatgc 1260

gctcggggtt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc acctttgaa atgtaatcat 1320

ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt 1380

ttttggcttt tttgttagac gaagctttat tgcggtagtt tatcacagtt aaattgctaa 1440

cgcagtcagt gcttctgaca caacagtctc gaacttaagc tgcagaagtt ggtcgtgagg 1500

cactgggcag gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg 1560

cttgtcgaga cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat 1620

ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ctcccagttc aattacagct cttaaggcta 1680

gagtacttaa tacgactcac tataggctag aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt 1740

gggttgcact gacagctgga ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc 1800

ccgtggcctg ctgtcttgat cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg 1860

ataagtggcc caccacactg agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact 1920

gttctgccgg acacagctgc atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc 1980

ctgaggctgt ggcctgcgga gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg 2040

ccgacggcag aagctgcttt cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc 2100

ctgacagcca gttcgagtgc cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct 2160

ggggctgttg tccaatgcct caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc 2220

acggcgcctt ttgcgatctg gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc 2280

tggccaagaa gctgcctgct cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga 2340

tgtgccctga cgccagatcc aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg 2400

gcaaatacgg ctgctgcccc atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct 2460

gcccacaaga caccgtgtgc gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca 2520

ccaccgacct gctgaccaaa ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg 2580

aagtgtcttg ccccgacggc tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct 2640

gccctttttac acaagctgtg tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca 2700

cctgtgacac acagaaaggc acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa 2760

aagcccctgc tcacctgagc ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg 2820

acaatgtgtc tagctgccct agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg 2880

gctgctgtcc tataccagag gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag 2940

gctacacctg tgtggccgaa ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg 3000

aaaagatgcc cgccagaagg gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc 3060

acacatcttg tcctgtgggc cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct 3120

gtcagctgcc tcacgccgtg tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca 3180

cctgtaacgt gaaggccaga tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct 3240

tcctggctag aagtcctcac gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct 3300

gccacgacaa tcagacatgc tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata 3360

gacagggcgt gtgctgtgcc gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg 3420

ccaggggcac aaagtgtctg agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc 3480

ctgctctgag acagctgctc tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg 3540

ccgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg 3600

cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt 3660

ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag 3720

ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatcgat 3780

aaggatcttc ctagagcatg gctacgtaga taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta 3840

caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga 3900

ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga 3960

gcgagcgcgc ag 3972

<210> 24
<211> 4131
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(130)
<223> 5' ITR

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)..(579)
<223> CMV IE強化子

<220>
<221> misc_feature
<222> (582)..(863)
<223> 雞β-肌動蛋白啟動子

<220>
<221> misc_feature
<222> (958)..(1930)
<223> 嵌合內含子

<220>
<221> misc_feature
<222> (1942)..(3726)
<223> hPGRN

<220>
<221> misc_feature
<222> (3787)..(3913)
<223> 兔β球蛋白poly A

<220>
<221> misc_feature
<222> (4002)..(4131)
<223> 3' ITR

<400> 24
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aacccccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattcgccac catgtggacc ctggtgtctt gggttgcact gacagctgga 1980

ctggtggccg gcacaagatg tcctgacggc cagttttgcc ccgtggcctg ctgtcttgat 2040

cctggcggag ccagctacag ctgctgcaga cctctgctgg ataagtggcc caccacactg 2100

agcagacacc tcggaggacc ttgtcaggtg gacgcccact gttctgccgg acacagctgc 2160

atctttaccg tgtctggcac ctccagctgc tgtccatttc ctgaggctgt ggcctgcgga 2220

gacggccacc actgttgtcc tagaggcttc cactgtagcg ccgacggcag aagctgcttt 2280

cagagaagcg gcaacaatag cgtgggcgcc atccagtgtc ctgacagcca gttcgagtgc 2340

cccgacttca gcacctgttg cgtgatggtg gacggcagct ggggctgttg tccaatgcct 2400

caggctagct gctgcgagga cagagtgcac tgttgccctc acggcgcctt ttgcgatctg 2460

gtgcacaccc ggtgcatcac cccaacaggc acacatcctc tggccaagaa gctgcctgct 2520

cagcggacca atagagccgt ggctctgagc agcagcgtga tgtgccctga cgccagatcc 2580

aggtgtccag acggctccac atgttgcgaa ctgcccagcg gcaaatacgg ctgctgcccc 2640

atgcctaacg ccacatgctg tagcgaccat cttcactgct gcccacaaga caccgtgtgc 2700

gacctgatcc agagcaagtg cctgagcaaa gagaacgcca ccaccgacct gctgaccaaa 2760

ctgccagctc acaccgtggg agatgtgaag tgcgacatgg aagtgtcttg ccccgacggc 2820

tatacctgct gtagactgca atctggcgcc tggggctgct gccctttac acaagctgtg 2880

tgttgcgagg accacatcca ttgctgccct gccggcttca cctgtgacac acagaaaggc 2940

acctgcgagc agggccctca tcaggtgcca tggatggaaa aagcccctgc tcacctgagc 3000

ctgcctgatc ctcaagctct gaagagggac gtgccctgcg acaatgtgtc tagctgccct 3060

agcagcgaca cctgctgcca gctgacatct ggcgagtggg gctgctgtcc tataccagag 3120

gccgtgtgtt gttccgacca ccagcattgc tgtccccaag gctacacctg tgtggccgaa 3180

ggccaatgtc aacggggctc tgaaattgtg gccggcctgg aaaagatgcc cgccagaagg 3240

gcttctctgt ctcacccccg ggacatcggc tgcgaccagc acacatcttg tcctgtgggc 3300

cagacctgtt gtccctctct tggtggatcc tgggcttgct gtcagctgcc tcacgccgtg 3360

tgctgcgaag atagacaaca ctgctgtccc gccggataca cctgtaacgt gaaggccaga 3420

tcctgcgaga aagaagtggt gtctgcccag cctgccacct tcctggctag aagtcctcac 3480

gtgggcgtga aggacgtgga gtgtggcgag ggccacttct gccacgacaa tcagacatgc 3540

tgcagagaca accggcaagg ctgggcttgt tgcccatata gacagggcgt gtgctgtgcc 3600

gacagaaggc actgttgtcc agccggcttt agatgtgccg ccaggggcac aaagtgtctg 3660

agaagggaag cccctaggtg ggacgcccct ctgagagatc ctgctctgag acagctgctc 3720

tgatgaggta cctctagagt cgacccgggc ggcctcgagg acggggtgaa ctacgcctga 3780

ggatccgatc tttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 3840

ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcattgcaa tagtgtgttg gaatttttg 3900

tgtctctcac tcggaagcaa ttcgttgatc tgaatttcga ccacccataa tacccattac 3960

cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 4020

gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggtcgc 4080

ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca g 4131

<210> 25
<211> 2208
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV1 VP1基因

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2208)

<400> 25
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc tct 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

gag ggc att cgc gag tgg tgg gac ttg aaa cct gga gcc ccg aag ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

aaa gcc aac cag caa aag cag gac gac ggc cgg ggt ctg gtg ctt cct 144
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

ggc tac aag tac ctc gga ccc ttc aac gga ctc gac aag ggg gag ccc 192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

gtc aac gcg gcg gac gca gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

cag cag ctc aaa gcg ggt gac aat ccg tac ctg cgg tat aac cac gcc 288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

gac gcc gag ttt cag gag cgt ctg caa gaa gat acg tct ttt ggg ggc 336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

```
                100                 105                 110

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aag aag cgg gtt ctc gaa cct        384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
        115                 120                 125

ctc ggt ctg gtt gag gaa ggc gct aag acg gct cct gga aag aaa cgt        432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

ccg gta gag cag tcg cca caa gag cca gac tcc tcc tcg ggc atc ggc        480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

aag aca ggc cag cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttt ggt cag act        528
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

ggc gac tca gag tca gtc ccc gat cca caa cct ctc gga gaa cct cca        576
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

gca acc ccc gct gct gtg gga cct act aca atg gct tca ggc ggt ggc        624
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

gca cca atg gca gac aat aac gaa ggc gcc gac gga gtg ggt aat gcc        672
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
    210                 215                 220

tca gga aat tgg cat tgc gat tcc aca tgg ctg ggc gac aga gtc atc        720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

acc acc agc acc cgc acc tgg gcc ttg ccc acc tac aat aac cac ctc        768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

tac aag caa atc tcc agt gct tca acg ggg gcc agc aac gac aac cac        816
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
            260                 265                 270

tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gat ttc aac aga ttc        864
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
        275                 280                 285

cac tgc cac ttt tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc aac aac aat        912
His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
    290                 295                 300

tgg gga ttc cgg ccc aag aga ctc aac ttc aaa ctc ttc aac atc caa        960
Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305                 310                 315                 320

gtc aag gag gtc acg acg aat gat ggc gtc aca acc atc gct aat aac       1008
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
                325                 330                 335
```

```
ctt acc agc acg gtt caa gtc ttc tcg gac tcg gag tac cag ctt ccg       1056
Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
            340                 345                 350

tac gtc ctc ggc tct gcg cac cag ggc tgc ctc cct ccg ttc ccg gcg       1104
Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
        355                 360                 365

gac gtg ttc atg att ccg caa tac ggc tac ctg acg ctc aac aat ggc       1152
Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
    370                 375                 380

agc caa gcc gtg gga cgt tca tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc cct       1200
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385                 390                 395                 400

tct cag atg ctg aga acg ggc aac aac ttt acc ttc agc tac acc ttt       1248
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
                405                 410                 415

gag gaa gtg cct ttc cac agc agc tac gcg cac agc cag agc ctg gac       1296
Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
            420                 425                 430

cgg ctg atg aat cct ctc atc gac caa tac ctg tat tac ctg aac aga       1344
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
        435                 440                 445

act caa aat cag tcc gga agt gcc caa aac aag gac ttg ctg ttt agc       1392
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
    450                 455                 460

cgt ggg tct cca gct ggc atg tct gtt cag ccc aaa aac tgg cta cct       1440
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465                 470                 475                 480

gga ccc tgt tat cgg cag cag cgc gtt tct aaa aca aaa aca gac aac       1488
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
                485                 490                 495

aac aac agc aat ttt acc tgg act ggt gct tca aaa tat aac ctc aat       1536
Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
            500                 505                 510

ggg cgt gaa tcc atc atc aac cct ggc act gct atg gcc tca cac aaa       1584
Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

gac gac gaa gac aag ttc ttt ccc atg agc ggt gtc atg att ttt gga       1632
Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
    530                 535                 540

aaa gag agc gcc gga gct tca aac act gca ttg gac aat gtc atg att       1680
Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545                 550                 555                 560
```

```
aca gac gaa gag gaa att aaa gcc act aac cct gtg gcc acc gaa aga       1728
Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
                565                 570                 575

ttt ggg acc gtg gca gtc aat ttc cag agc agc agc aca gac cct gcg       1776
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
            580                 585                 590

acc gga gat gtg cat gct atg gga gca tta cct ggc atg gtg tgg caa       1824
Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

gat aga gac gtg tac ctg cag ggt ccc att tgg gcc aaa att cct cac       1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620

aca gat gga cac ttt cac ccg tct cct ctt atg ggc ggc ttt gga ctc       1920
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625                 630                 635                 640

aag aac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac acg cct gtt cct gcg       1968
Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
                645                 650                 655

aat cct ccg gcg gag ttt tca gct aca aag ttt gct tca ttc atc acc       2016
Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
            660                 665                 670

caa tac tcc aca gga caa gtg agt gtg gaa att gaa tgg gag ctg cag       2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
        675                 680                 685

aaa gaa aac agc aag cgc tgg aat ccc gaa gtg cag tac aca tcc aat       2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
    690                 695                 700

tat gca aaa tct gcc aac gtt gat ttt act gtg gac aac aat gga ctt       2160
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705                 710                 715                 720

tat act gag cct cgc ccc att ggc acc cgt tac ctt acc cgt ccc ctg       2208
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
                725                 730                 735
```

<210> 26
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15
```

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

```
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
            260                 265                 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
        275                 280                 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
    290                 295                 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305                 310                 315                 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
            340                 345                 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
        355                 360                 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
    370                 375                 380

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385                 390                 395                 400

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

Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
            420                 425                 430

Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
        435                 440                 445

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
    450                 455                 460
```

```
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
                565                 570                 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
            580                 585                 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625                 630                 635                 640

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
                645                 650                 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
            660                 665                 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
        675                 680                 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
```

690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 27
<211> 1863
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV2 rep

<400> 27
atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60

ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120

tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga ccgtggccga gaagctgcag 180

cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggctct tttctttgtg 240

caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300

aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360

taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg tcacaaagac cagaaatggc 420

gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gctccccaaa 480

acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg 540

aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600

gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggtgatcag atcaaaaact 660

tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca aggggattac ctcggagaag 720

cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcgg 780

tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840

cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900

attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc 960

acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg ggcctgcaac taccgggaag 1020

accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080

aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140

aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200

gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga ctcccgtgat cgtcacctcc 1260

aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320

ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttgggaag 1380

gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440

gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgacgca 1500

gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560

gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620

aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga atcagaattc aaatatctgc 1680

ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg tgtcagaatc tcaacccgtt 1740

tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcatatcat gggaaaggtg 1800

ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt tggatgactg catctttgaa 1860

caa 1863

<210> 28
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV5殼體VP1基因

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2172)

<400> 28

```
atg tct ttt gtt gat cac cct cca gat tgg ttg gaa gaa gtt ggt gaa        48
Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1               5                  10                  15

ggt ctt cgc gag ttt ttg ggc ctt gaa gcg ggc cca ccg aaa cca aaa        96
Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
            20                  25                  30

ccc aat cag cag cat caa gat caa gcc cgt ggt ctt gtg ctg cct ggt       144
Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
        35                  40                  45

tat aac tat ctc gga ccc gga aac ggt ctc gat cga gga gag cct gtc       192
Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
    50                  55                  60
```

```
aac agg gca gac gag gtc gcg cga gag cac gac atc tcg tac aac gag        240
Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65                  70                  75                  80

cag ctt gag gcg gga gac aac ccc tac ctc aag tac aac cac gcg gac        288
Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
                85                  90                  95

gcc gag ttt cag gag aag ctc gcc gac gac aca tcc ttc ggg gga aac        336
Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
            100                 105                 110

ctc gga aag gca gtc ttt cag gcc aag aaa agg gtt ctc gaa cct ttt        384
Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe
        115                 120                 125

ggc ctg gtt gaa gag ggt gct aag acg gcc cct acc gga aag cgg ata        432
Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile
    130                 135                 140

gac gac cac ttt cca aaa aga aag aag gcc cgg acc gaa gag gac tcc        480
Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145                 150                 155                 160

aag cct tcc acc tcg tca gac gcc gaa gct gga ccc agc gga tcc cag        528
Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
                165                 170                 175

cag ctg caa atc cca gcc caa cca gcc tca agt ttg gga gct gat aca        576
Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
            180                 185                 190

atg tct gcg gga ggt ggc ggc cca ttg ggc gac aat aac caa ggt gcc        624
Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
        195                 200                 205

gat gga gtg ggc aat gcc tcg gga gat tgg cat tgc gat tcc acg tgg        672
Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
    210                 215                 220

atg ggg gac aga gtc gtc acc aag tcc acc cga acc tgg gtg ctg ccc        720
Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225                 230                 235                 240

agc tac aac aac cac cag tac cga gag atc aaa agc ggc tcc gtc gac        768
Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
                245                 250                 255

gga agc aac gcc aac gcc tac ttt gga tac agc acc ccc tgg ggg tac        816
Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
            260                 265                 270

ttt gac ttt aac cgc ttc cac agc cac tgg agc ccc cga gac tgg caa        864
Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
        275                 280                 285
```

```
aga ctc atc aac aac tac tgg ggc ttc aga ccc cgg tcc ctc aga gtc        912
Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
    290                 295                 300

aaa atc ttc aac att caa gtc aaa gag gtc acg gtg cag gac tcc acc        960
Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305                 310                 315                 320

acc acc atc gcc aac aac ctc acc tcc acc gtc caa gtg ttt acg gac       1008
Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
                325                 330                 335

gac gac tac cag ctg ccc tac gtc gtc ggc aac ggg acc gag gga tgc       1056
Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
            340                 345                 350

ctg ccg gcc ttc cct ccg cag gtc ttt acg ctg ccg cag tac ggt tac       1104
Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
        355                 360                 365

gcg acg ctg aac cgc gac aac aca gaa aat ccc acc gag agg agc agc       1152
Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
    370                 375                 380

ttc ttc tgc cta gag tac ttt ccc agc aag atg ctg aga acg ggc aac       1200
Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385                 390                 395                 400

aac ttt gag ttt acc tac aac ttt gag gag gtg ccc ttc cac tcc agc       1248
Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
                405                 410                 415

ttc gct ccc agt cag aac ctc ttc aag ctg gcc aac ccg ctg gtg gac       1296
Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
            420                 425                 430

cag tac ttg tac cgc ttc gtg agc aca aat aac act ggc gga gtc cag       1344
Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
        435                 440                 445

ttc aac aag aac ctg gcc ggg aga tac gcc aac acc tac aaa aac tgg       1392
Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
    450                 455                 460

ttc ccg ggg ccc atg ggc cga acc cag ggc tgg aac ctg ggc tcc ggg       1440
Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465                 470                 475                 480

gtc aac cgc gcc agt gtc agc gcc ttc gcc acg acc aat agg atg gag       1488
Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
                485                 490                 495

ctc gag ggc gcg agt tac cag gtg ccc ccg cag ccg aac ggc atg acc       1536
Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
            500                 505                 510

aac aac ctc cag ggc agc aac acc tat gcc ctg gag aac act atg atc       1584
```

```
Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
        515                 520                 525

ttc aac agc cag ccg gcg aac ccg ggc acc acc gcc acg tac ctc gag      1632
Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
    530                 535                 540

ggc aac atg ctc atc acc agc gag agc gag acg cag ccg gtg aac cgc      1680
Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545                 550                 555                 560

gtg gcg tac aac gtc ggc ggg cag atg gcc acc aac aac cag agc tcc      1728
Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
                565                 570                 575

acc act gcc ccc gcg acc ggc acg tac aac ctc cag gaa atc gtg ccc      1776
Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
            580                 585                 590

ggc agc gtg tgg atg gag agg gac gtg tac ctc caa gga ccc atc tgg      1824
Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
        595                 600                 605

gcc aag atc cca gag acg ggg gcg cac ttt cac ccc tct ccg gcc atg      1872
Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
    610                 615                 620

ggc gga ttc gga ctc aaa cac cca ccg ccc atg atg ctc atc aag aac      1920
Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625                 630                 635                 640

acg cct gtg ccc gga aat atc acc agc ttc tcg gac gtg ccc gtc agc      1968
Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
                645                 650                 655

agc ttc atc acc cag tac agc acc ggg cag gtc acc gtg gag atg gag      2016
Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
            660                 665                 670

tgg gag ctc aag aag gaa aac tcc aag agg tgg aac cca gag atc cag      2064
Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
        675                 680                 685

tac aca aac aac tac aac gac ccc cag ttt gtg gac ttt gcc ccg gac      2112
Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
    690                 695                 700

agc acc ggg gaa tac aga acc acc aga cct atc gga acc cga tac ctt      2160
Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705                 710                 715                 720

acc cga ccc ctt                                                     2172
Thr Arg Pro Leu
```

<210> 29

<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
35 40 45

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
85 90 95

Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
100 105 110

Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe
115 120 125

Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile
130 135 140

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
165 170 175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp

420 425 430

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465 470 475 480

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
485 490 495

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
500 505 510

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
515 520 525

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
530 535 540

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545 550 555 560

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
565 570 575

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
580 585 590

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 30
<211> 2211
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> AAVhu68 VP1殼體

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2211)

<400> 30
atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt 48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc 96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg 144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg 192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

gtc aac gaa gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc 288

```
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95

gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc        336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct        384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125

ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg        432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gtg ggt att ggc        480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act        528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

ggc gac aca gag tca gtc ccc gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc        576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc        624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc        672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220

tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc        720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc        768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255

tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac        816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga        864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac        912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att        960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
```

```
305                 310                 315                 320

cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat      1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc      1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca      1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat cta acg ctt aat gat      1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

gga agc caa gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc      1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag      1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tat gct cac agc caa agc ctg      1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

gac cga ctc atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca      1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt      1392
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct      1440
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac      1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat      1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa      1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc      1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540
```

```
aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata       1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

acc aac gaa gaa gaa att aaa act acc aac cca gta gca acg gag tcc       1728
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag       1776
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag       1824
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac       1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620

acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg       1920
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625                 630                 635                 640

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg       1968
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
                645                 650                 655

gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc       2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
            660                 665                 670

cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag       2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
        675                 680                 685

aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac       2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
    690                 695                 700

tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt       2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705                 710                 715                 720

tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg       2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
                725                 730                 735

taa                                                                  2211
```

<210> 31
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31

```
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1               5                  10                  15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
            20                  25                  30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
        35                  40                  45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205
```

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

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

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA標靶序列

<400> 32
agtgaattct accagtgcca ta 22

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA標靶序列

<400> 33
agcaaaaatg tgctagtgcc aaa 23

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA標靶序列

<400> 34
agtgtgagtt ctaccattgc caaa 24

<210> 35
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> miRNA標靶序列

<400> 35
agggattcct gggaaaactg gac 23

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種有用於治療人類患者的成年發病神經退化性疾病之治療方案，其中該方案包含投予具有AAV1 殼體及包裝於該殼體中之載體基因體的重組腺相關病毒(AAV)載體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體*(GRN)*編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，該投予包含單次劑量之腦大池內(ICM)注射，該單次劑量包含：

(i) 約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【請求項 2】如請求項 1 之方案，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【請求項 3】如請求項 1 或 2 之方案，其中該載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【請求項 4】如請求項 1 至 3 中任一項之方案，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【請求項 5】如請求項 1 至 4 中任一項之方案，其中該患者已被鑑定為患有 *GRN* 單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之方案，其中該患者年齡至少35歲。

【請求項7】如請求項1至6中任一項之方案，其中該患者的CSF中具有低濃度的顆粒蛋白前體。

【請求項8】如請求項7之方案，其中該患者的CSF中具有比正常水準之50%低的顆粒蛋白前體濃度。

【請求項9】如請求項7之方案，其中該患者的CSF中具有比正常水準之30%低的顆粒蛋白前體濃度。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之方案，其進一步包含檢測CSF、血清及/或血漿中的顆粒蛋白前體水準。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之方案，其進一步包含測量：

i) 神經纖維絲輕鏈(NfL)、總tau(T-tau)及磷酸化tau(P-tau)中之一種或多種的CSF水準；

ii) 評估視網膜脂褐質；

iii) 進行MRI以追蹤腦體積、白質完整性、以及中額葉皮質及頂葉區域的厚度中之一種或多種的變化；

iv) 進行FDG PET以評估額葉及/或顳葉中的低代謝；及/或

v) 測量EEG/誘發反應電位以評估疾病相關變化的減緩。

【請求項12】如請求項1至11中任一項之方案，其中該單次劑量足以在以下任何一種或多種組織類型中提供10^3 GC/μg DNA：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕

葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。

【請求項 13】如請求項 1 至 12 中任一項之方案，其中該單次劑量足以在以下任何一種或多種組織類型中提供 10^4 GC/μg DNA：額葉皮質、頂葉皮質、顳葉皮質、枕葉皮質、延髓、小腦、頸脊髓、胸脊髓、腰脊髓、頸背根神經節、胸背根神經節、腰背根神經節及三叉神經節。

【請求項 14】一種醫藥組成物，其包含含有 AAV1 殼體及包裝於該殼體中之載體基因體的重組 AAV 載體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列，其中該組成物被調配用於腦大池內(ICM)注射至有需要的人類患者以投予以下劑量：

(i) 約 3.3 x 10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

(ii) 約 1.1 x 10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2 x 10^{11} GC/每克腦質量；或

(iv) 約 3.3 x 10^{11} GC/每克腦質量。

【請求項 15】如請求項 14 之醫藥組成物，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【請求項 16】如請求項 14 或 15 之醫藥組成物，其中該載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【請求項 17】如請求項 14 至 16 中任一項之醫藥組成物，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【請求項 18】一種單位劑型的醫藥組成物，其包含：

含約 1.44×10^{13} 至約 4.33×10^{14} GC 的重組 AAV 載體之緩衝液，

其中該重組 AAV 包含 AAV1 殼體及包裝於該殼體中之載體基因體，該載體基因體包含 AAV 反向末端重複(ITR)、顆粒蛋白前體編碼序列及引導顆粒蛋白前體在目標細胞中表現的調節序列。

【請求項 19】如請求項 18 之醫藥組成物，其中該顆粒蛋白前體編碼序列為 SEQ ID NO：3 或與 SEQ ID NO：3 共有至少 95%同一性的序列，該序列編碼 SEQ ID NO：1 中所列之胺基酸序列。

【請求項 20】如請求項 18 或 19 之醫藥組成物，其中該載體基因體進一步包含 CB7 啟動子、嵌合內含子及兔 β 球蛋白 poly A。

【請求項 21】如請求項 18 至 20 中任一項之醫藥組成物，其中該載體基因體包含 SEQ ID NO：24。

【請求項 22】如請求項 18 至 21 中任一項之醫藥組成物，其中該組成物被調配用於 ICM 注射。

【請求項 23】如請求項 18 至 22 中任一項之醫藥組成物，其中該緩衝液包含磷酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、氯化鎂及泊洛沙姆 188(poloxamer 188)。

【請求項 24】如請求項 18 至 23 中任一項之醫藥組成物，其中該緩衝液包含 1 mM 磷酸鈉、150 mM 氯化鈉、

3 mM 氯化鉀、1.4 mM 氯化鈣、0.8 mM 氯化鎂及 0.001% 泊洛沙姆 188。

【請求項 25】如請求項 18 至 24 中任一項之醫藥組成物，其具有約 3.0 mL、約 4.0mL 或約 5.0 mL 的體積。

【請求項 26】如請求項 18 至 25 中任一項之醫藥組成物，其用於治療患有成年發病神經退化性疾病的人類患者。

【請求項 27】如請求項 26 之醫藥組成物，其中該患者已被鑑定為患有 *GRN* 單套缺失及/或額顳葉失智症(FTD)。

【請求項 28】如請求項 26 或 27 之醫藥組成物，其中該組成物被調配以投予以下劑量：

(i) 約 3.3×10^{10} 基因體拷貝數(GC)/每克腦質量；

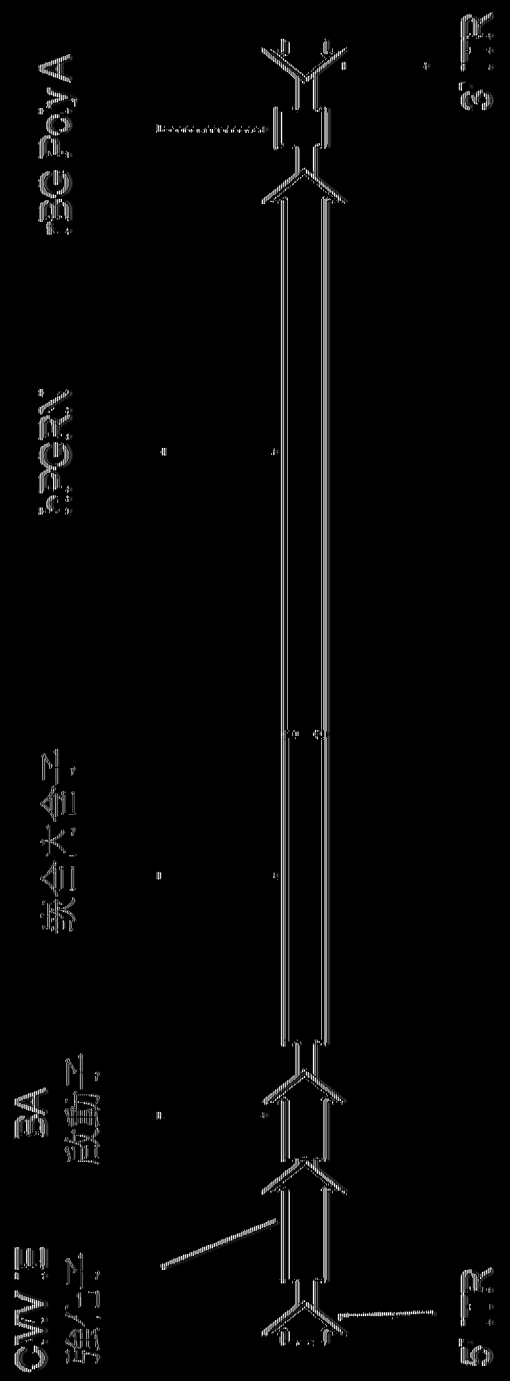
(ii) 約 1.1×10^{11} GC/每克腦質量；

(iii) 約 2.2×10^{11} GC/每克腦質量；或

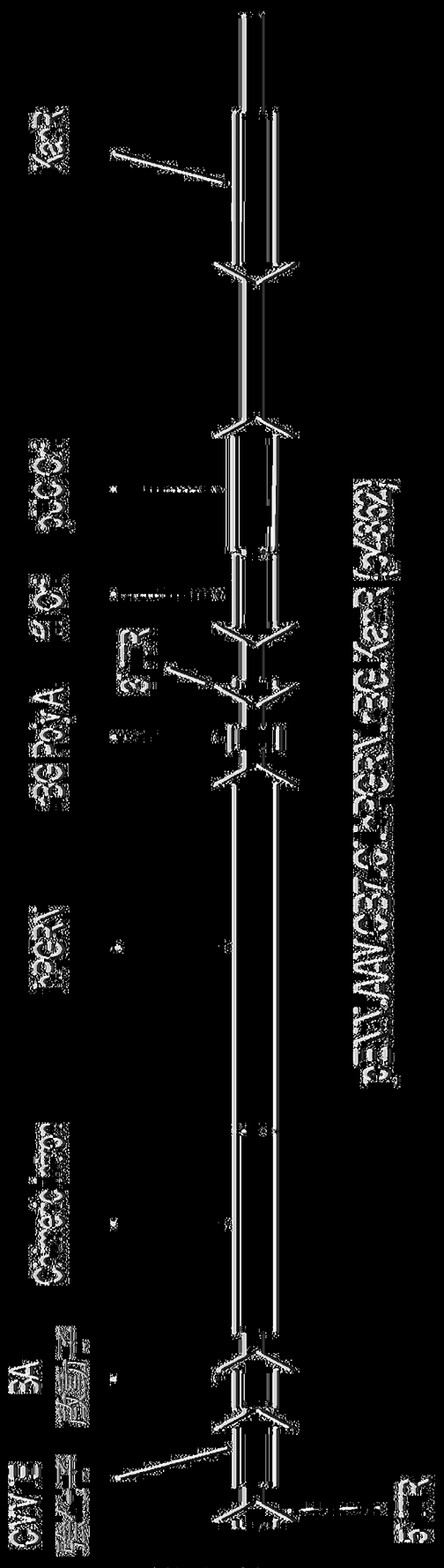
(iv) 約 3.3×10^{11} GC/每克腦質量。

【請求項 29】一種如請求項 14 至 25 中任一項之醫藥組成物用於製備治療成年發病神經退化性疾病之醫藥品的用途。

【(発明図式)】



【(図 1)】


CMV IE
EA
Kozak
Signal peptide
Connector
PCSK
3C protease
3C
3C cleavage site
3C protease
Linker
Kozak
Signal peptide
PCSK
Connector
EA
CMV IE

(圖 2)

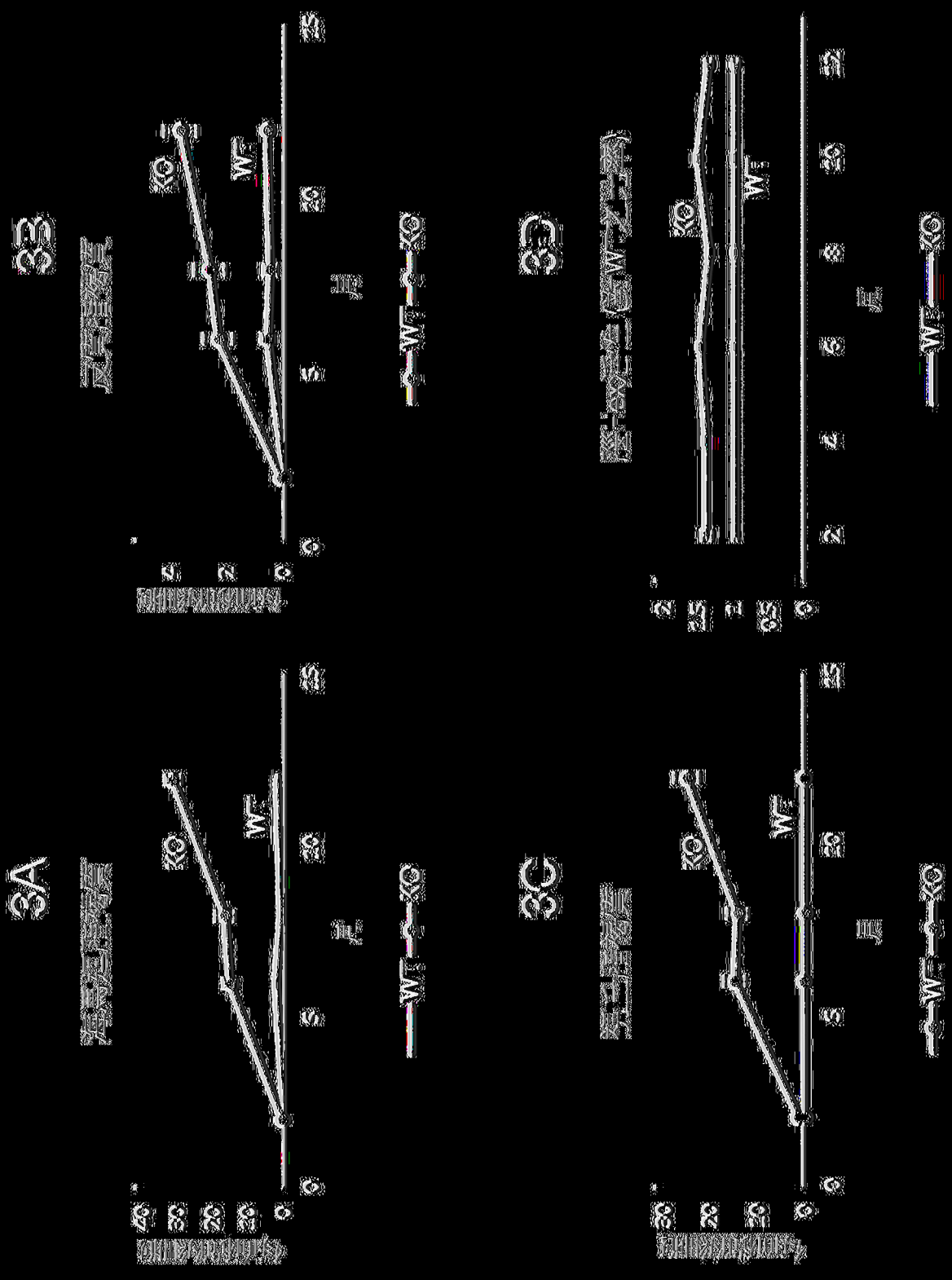
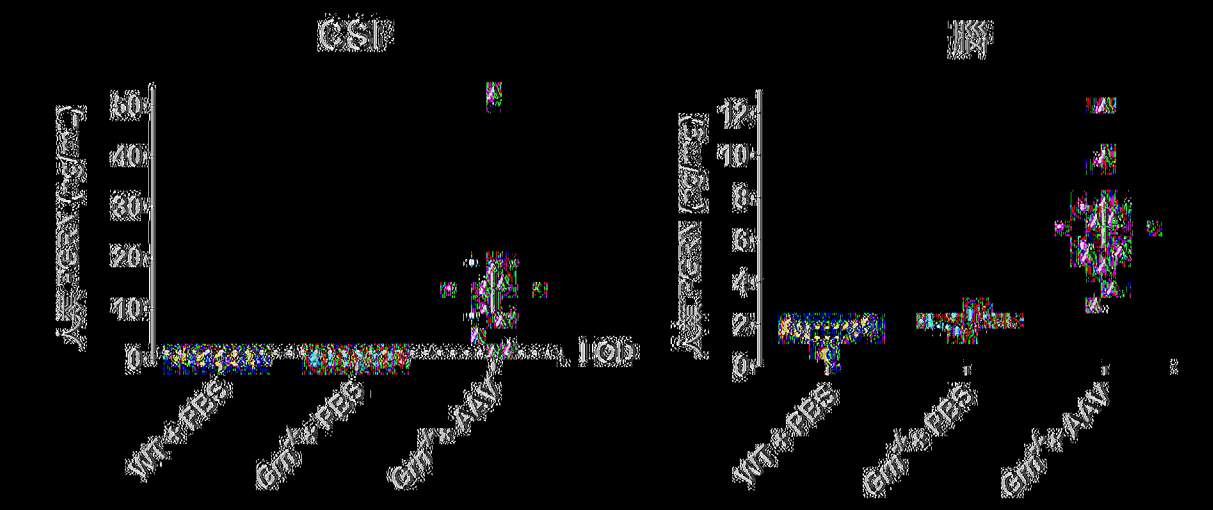
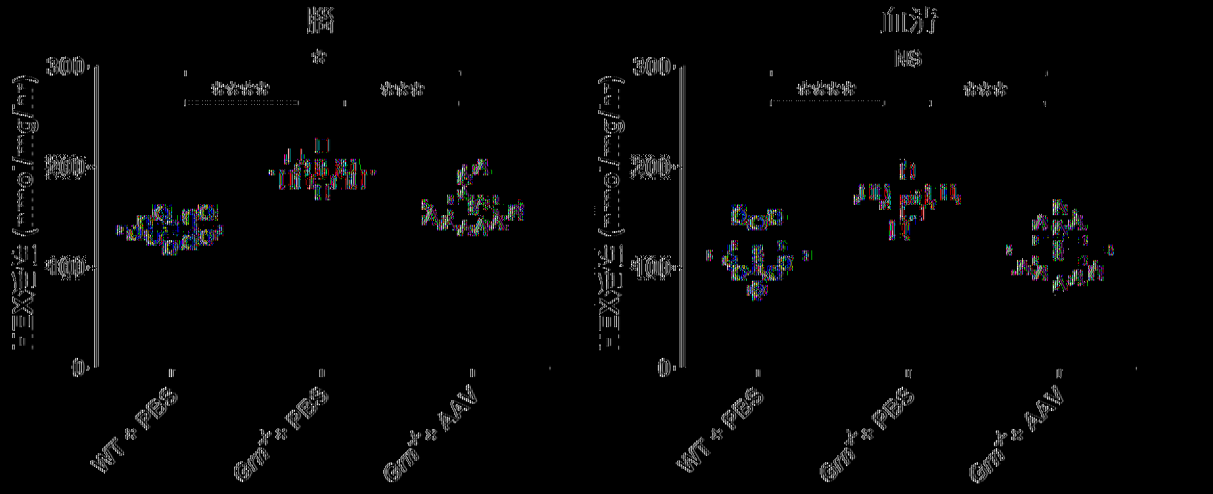


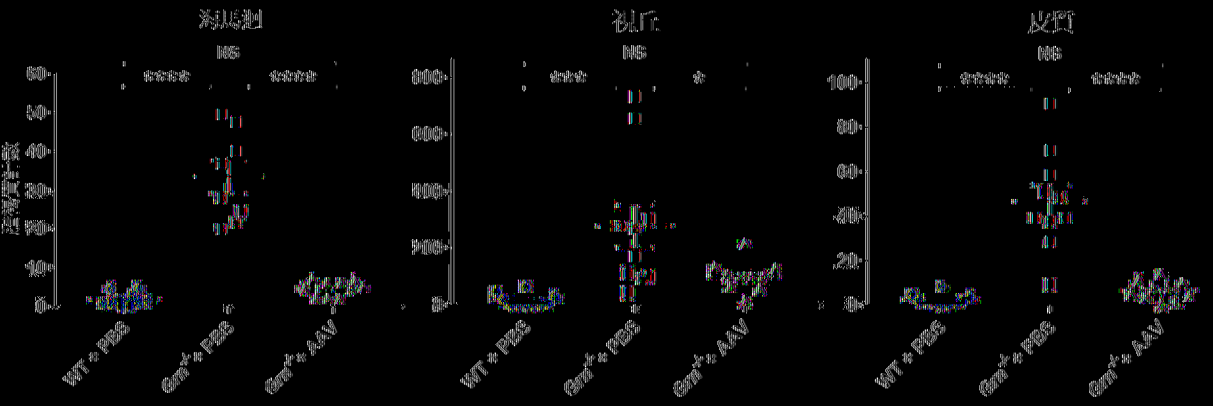
圖 3A 3D


CSF
肺
WT + PBS
Gnt⁻ + PBS
Gnt⁻ + AAV
WT + PBS
Gnt⁻ + PBS
Gnt⁻ + AAV

|(圖 4)|


腦
血清
NS
WT + PBS
Gnt⁻ + PBS
Gnt⁻ + AAV

|(圖 5)|


淋巴瘤
肝臟
皮質
NS
WT + PBS
Gnt⁻ + PBS
Gnt⁻ + AAV

|(圖 6)|

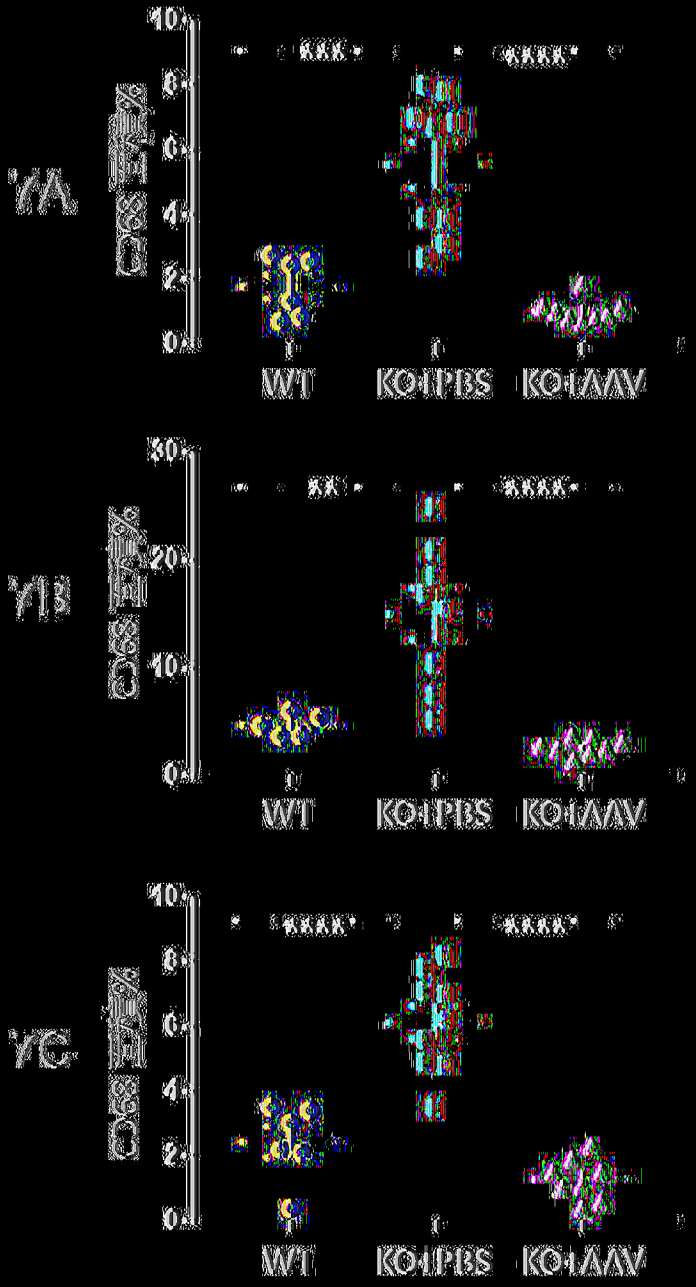
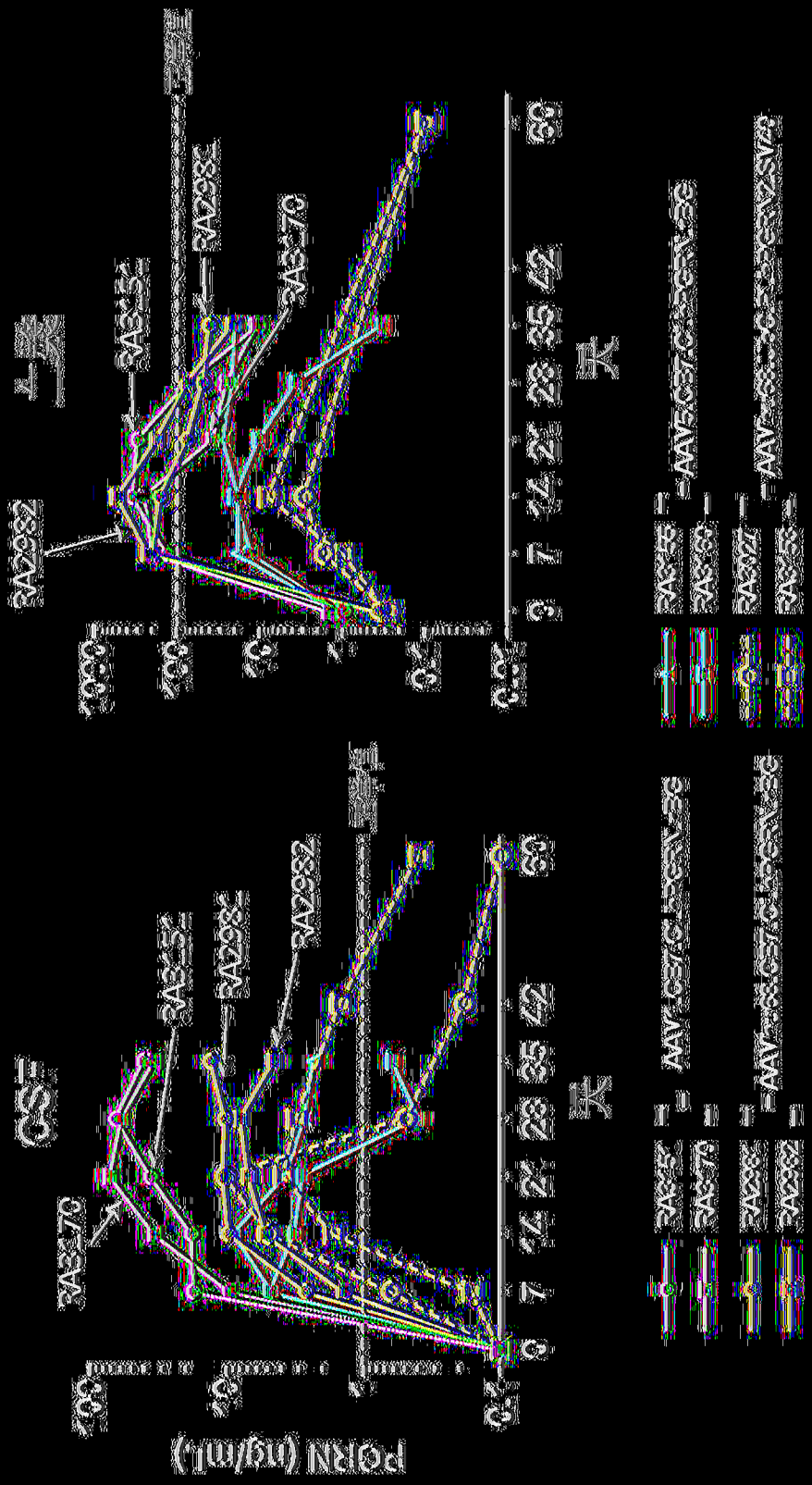
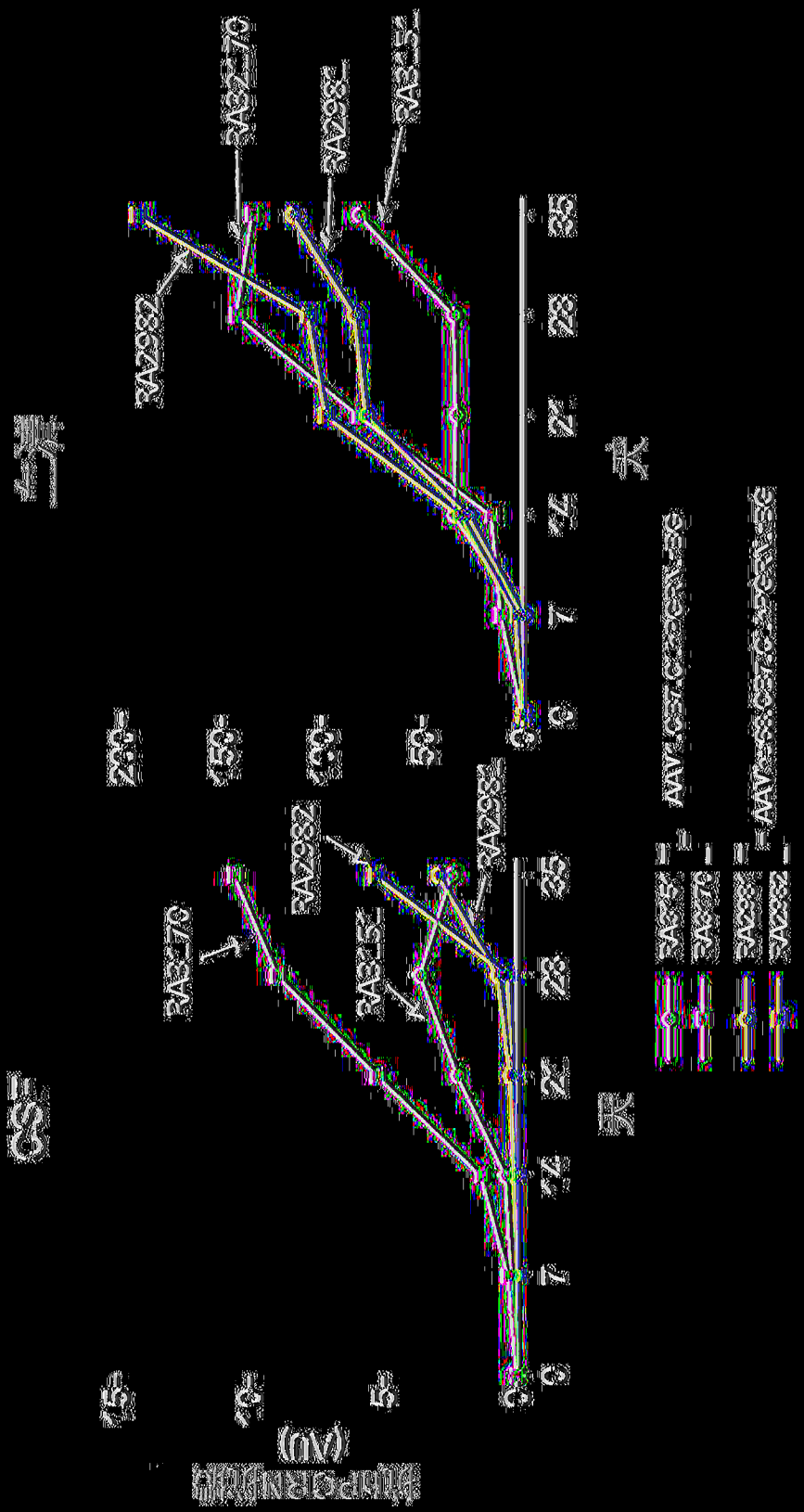

7A
10
8
6
4
2
0
WT
KO+PBS
KO+AAV
7B
30
20
10
0
WT
KO+PBS
KO+AAV
7C
10
8
6
4
2
0
WT
KO+PBS
KO+AAV

圖 7A-7C


POIRN (ng/mL)
AAV1.CB7.CI.P8RV.36
AAV5.CB7.CI.P8RV.36
AAV6.88.CB7.CI.P8RV.36
AAV.7m8.CB7.CI.P8RV.2SV#2.36
RA2.56
RA2.70
RA2.82
RA2.84
RA3.35
RA3.70
RA3.82
RA3.84
RA3.56
RA3.66
RA3.71
RA3.76
1
7
14
21
28
35
42
56
70
84
98
112
126
140
154
168

(圖 8)


SA3270
SA2983
SA3155
SA2982
35
28
27
24
7
0
SA2982
SA3270
SA3155
SA2983
35
28
27
24
7
0
SA2981
SA3279
SA2983
SA2982
(nv)

(圖 9)

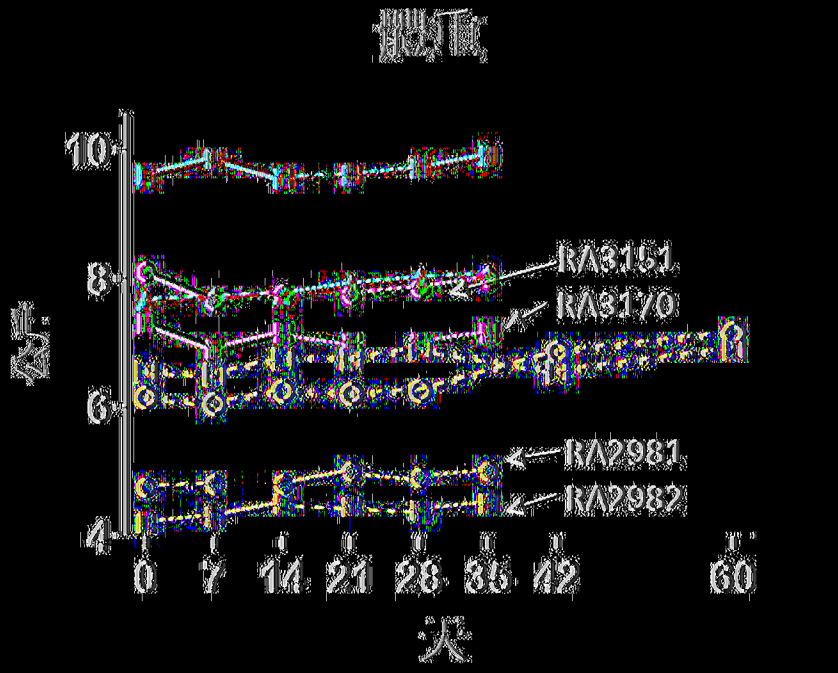
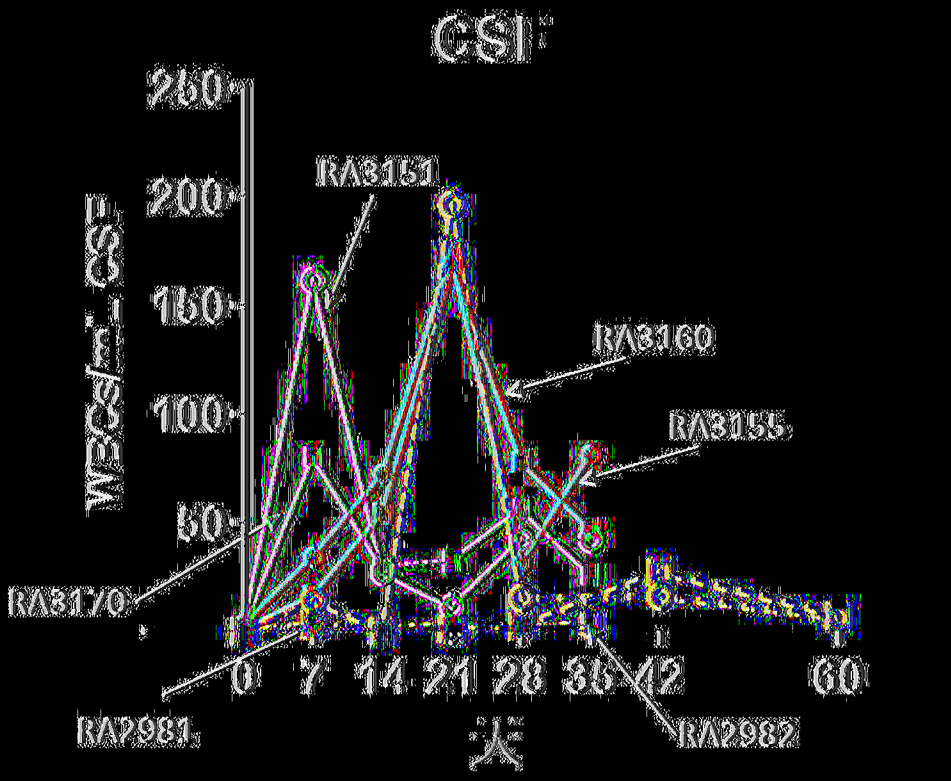
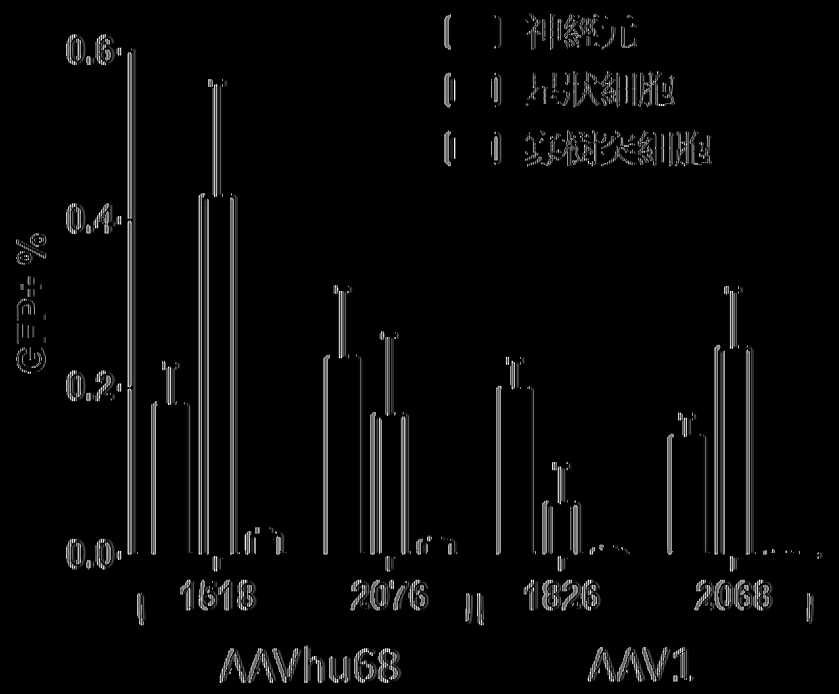

腫瘍
10
8
6
4
RA3151
RA3170
RA2981
RA2982
0
7
14
21
28
35
42
60
天
RA3161
RA3170
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA2981
RA2982
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA3027
RA3163
AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40
RA3155
RA3160
AAV5.CB7.CI.hPGRN.rBG

図 10


CSF
260
200
150
100
50
RA3151
RA3160
RA3155
RA3170
RA2981
RA2982
0
7
14
21
28
35
42
60
日
RA3151
RA3170
AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA2981
RA2982
AAVhu68.CB7.CI.hPGRN.rBG
RA3027
RA3168
AAVhu68.UbC.PI.hPGRN2.SV40
RA3155
RA3160
AAV6.CB7.CI.hPGRN.rBG

【図 11】



|(圖 12)|

細胞標記	動物ID	區域						平均
		1	2	3	4	5		
NeuN	1518	0.13	N/A	0.205	0.34	0.167	0.049	0.178
	2076	0.106	0.227	0.258	0.528	0.053	N/A	0.234
	1876	0.1	0.318	0.195	0.202	0.171	N/A	0.197
	2068	0.218	N/A	0.153	0.141	0.128	0.065	0.141
GFAP	1518	0.152	N/A	0.202	0.914	0.39	0.476	0.427
	2076	0.011	0.064	0.236	0.511	0.011	N/A	0.166
	1876	0.019	0.013	0.021	0.244	0.007	N/A	0.061
	2068	0.066	N/A	0.245	0.13	0.459	0.33	0.246
Olig2	1518	0.02	N/A	0.03	0.04	0.009	0.023	0.024
	2076	0.02	0.023	0.011	0.013	0.013	N/A	0.016
	1876	0	0.001	0.008	0.016	N/A	0.001	0.005
	2068	0.002	0	N/A	0.001	0.002	0.002	0.001

|(圖 13)|

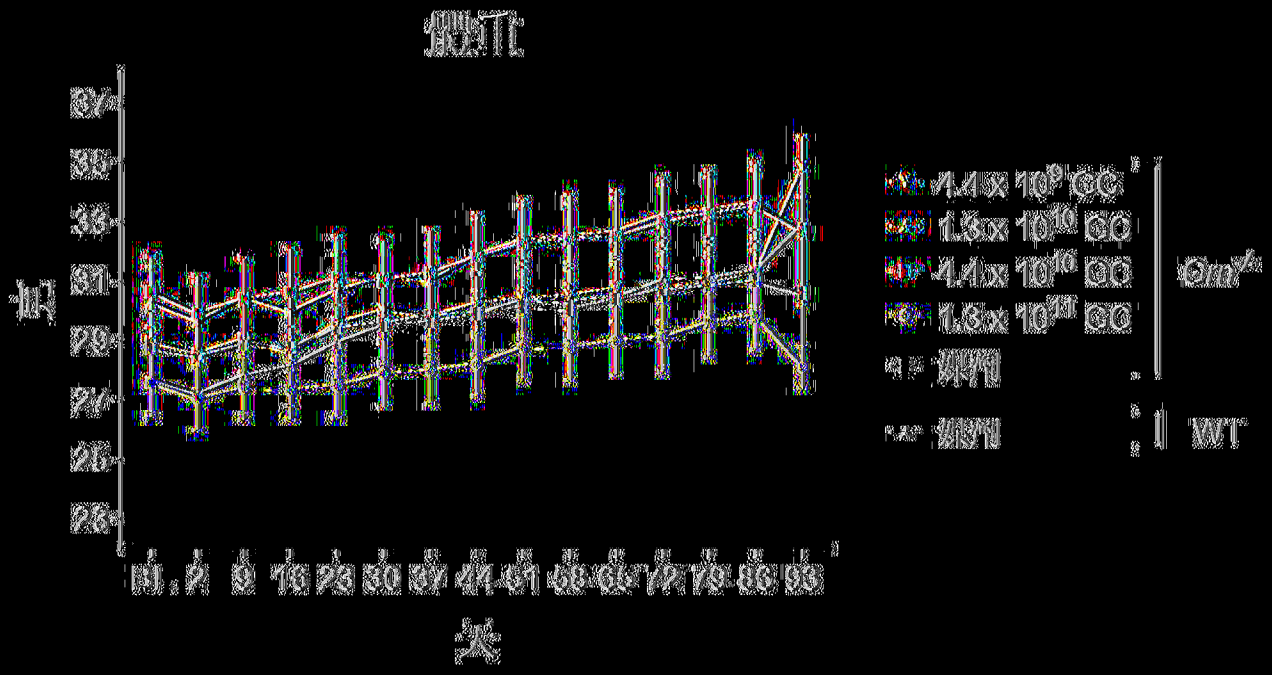
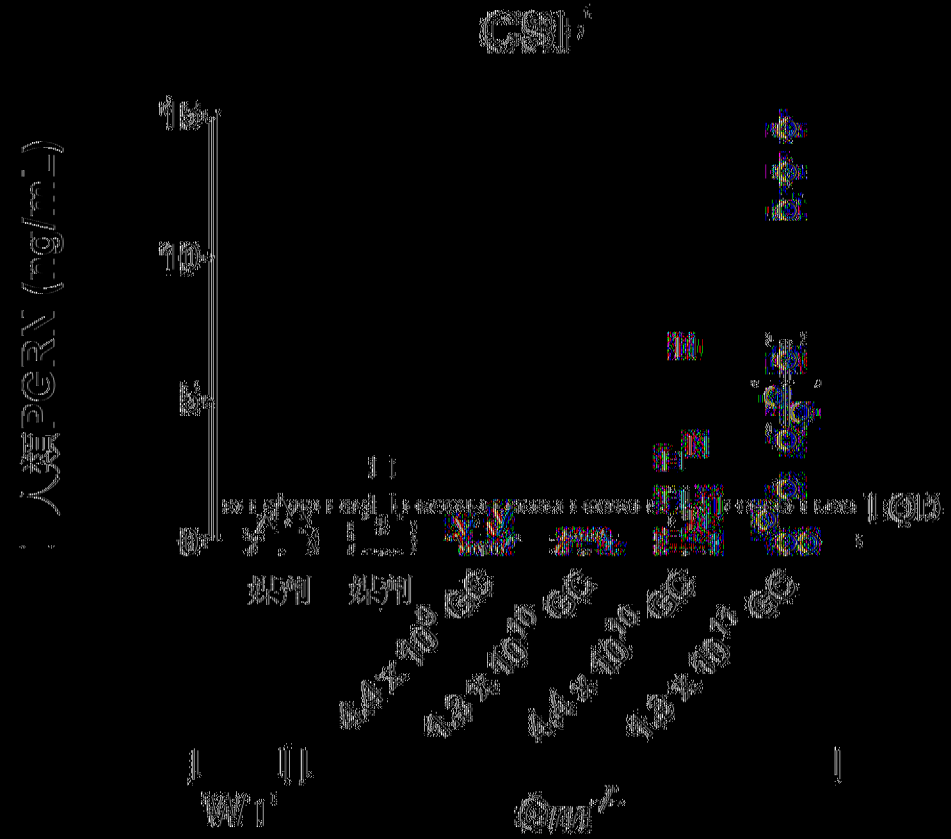
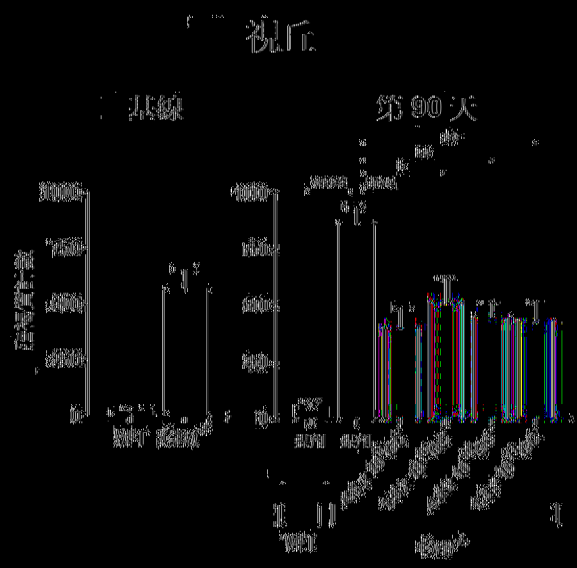
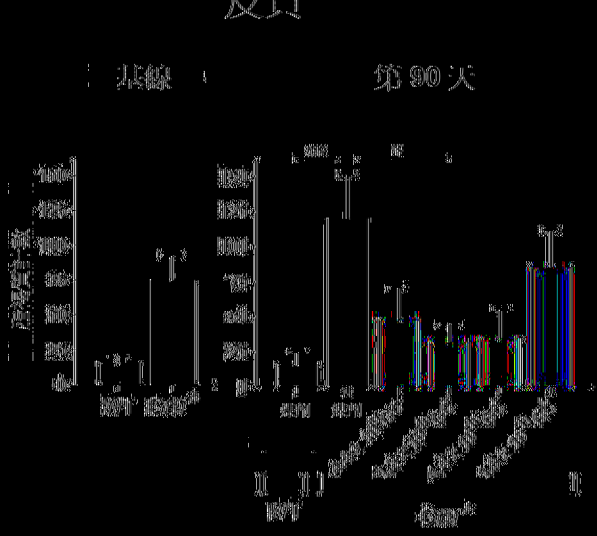


圖 14

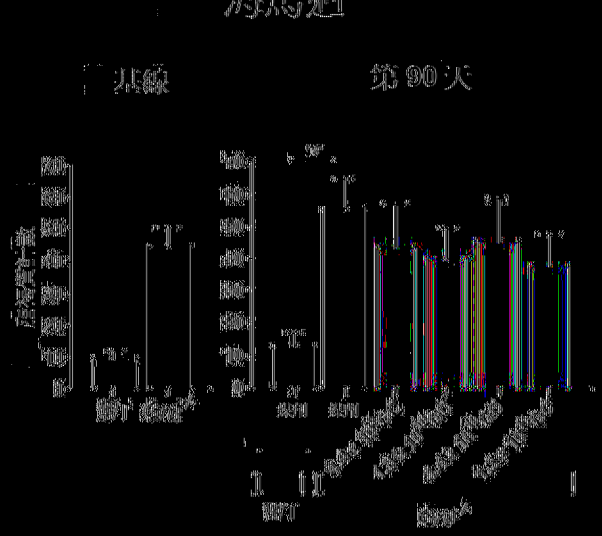

CSI
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.000001
0.0000001
0.00000001
0.000000001
0.0000000001
0.00000000001
0.000000000001
0.0000000000001
0.00000000000001
0.000000000000001
0.0000000000000001
0.00000000000000001
0.000000000000000001
0.0000000000000000001
0.00000000000000000001
0.000000000000000000001
0.0000000000000000000001
0.00000000000000000000001
0.000000000000000000000001
0.0000000000000000000000001
0.00000000000000000000000001
0.000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.0000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.00000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000000001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.0001
0.001
0.00000

16A





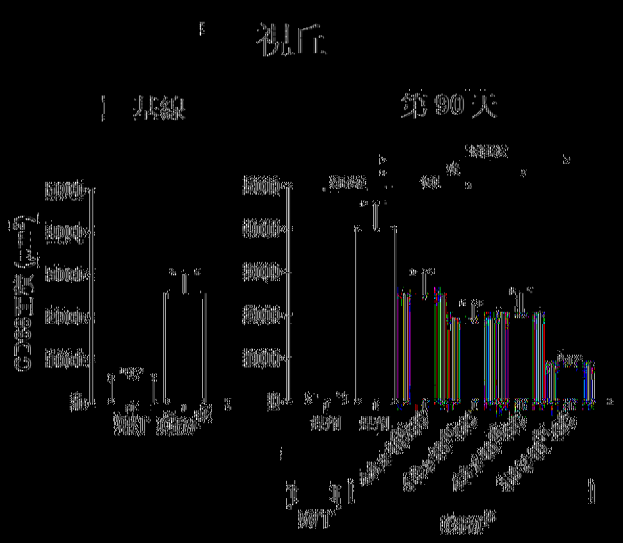
16B



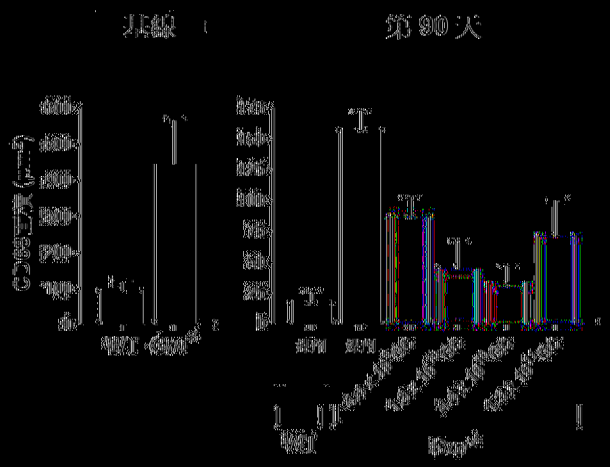
16C

|(圖 16A-16C)|

1/A

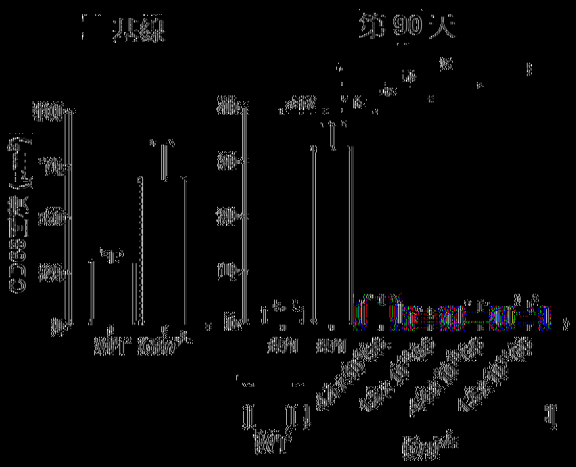


皮質



1/B

海馬迴



1/C

(圖 1/A-1/C)

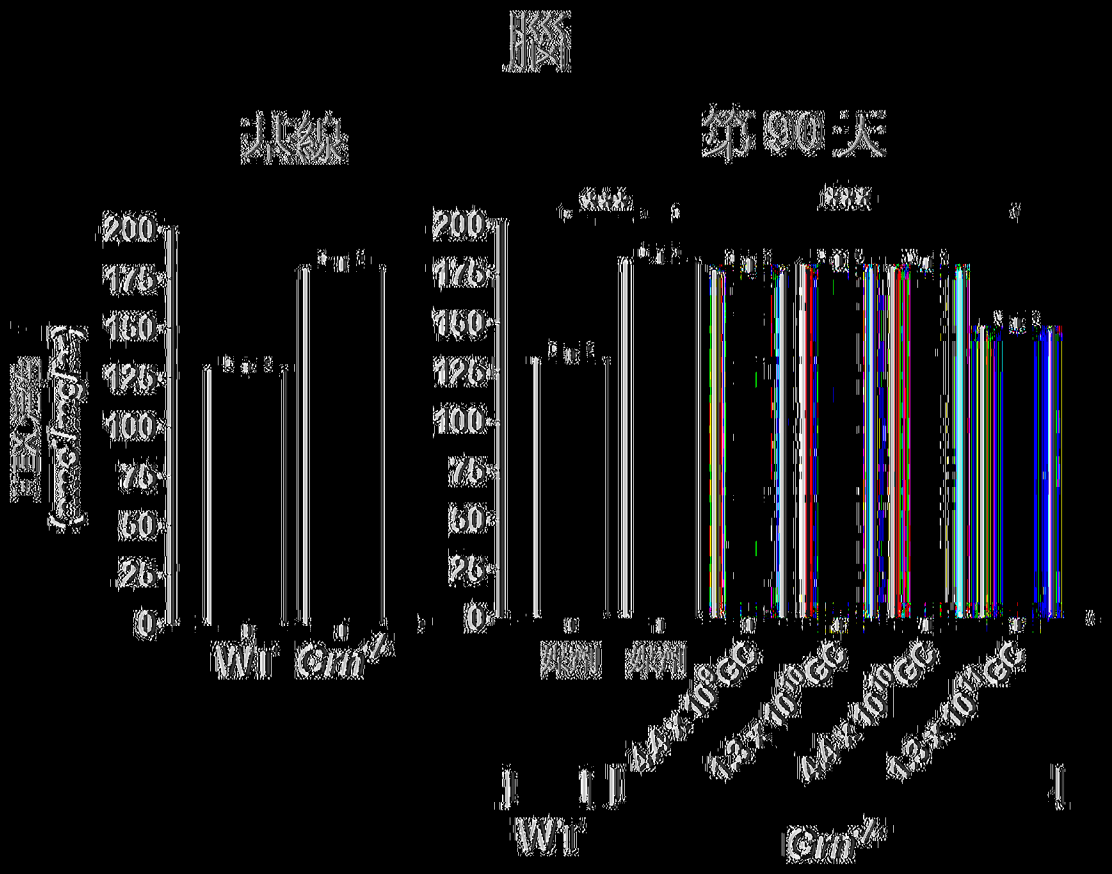
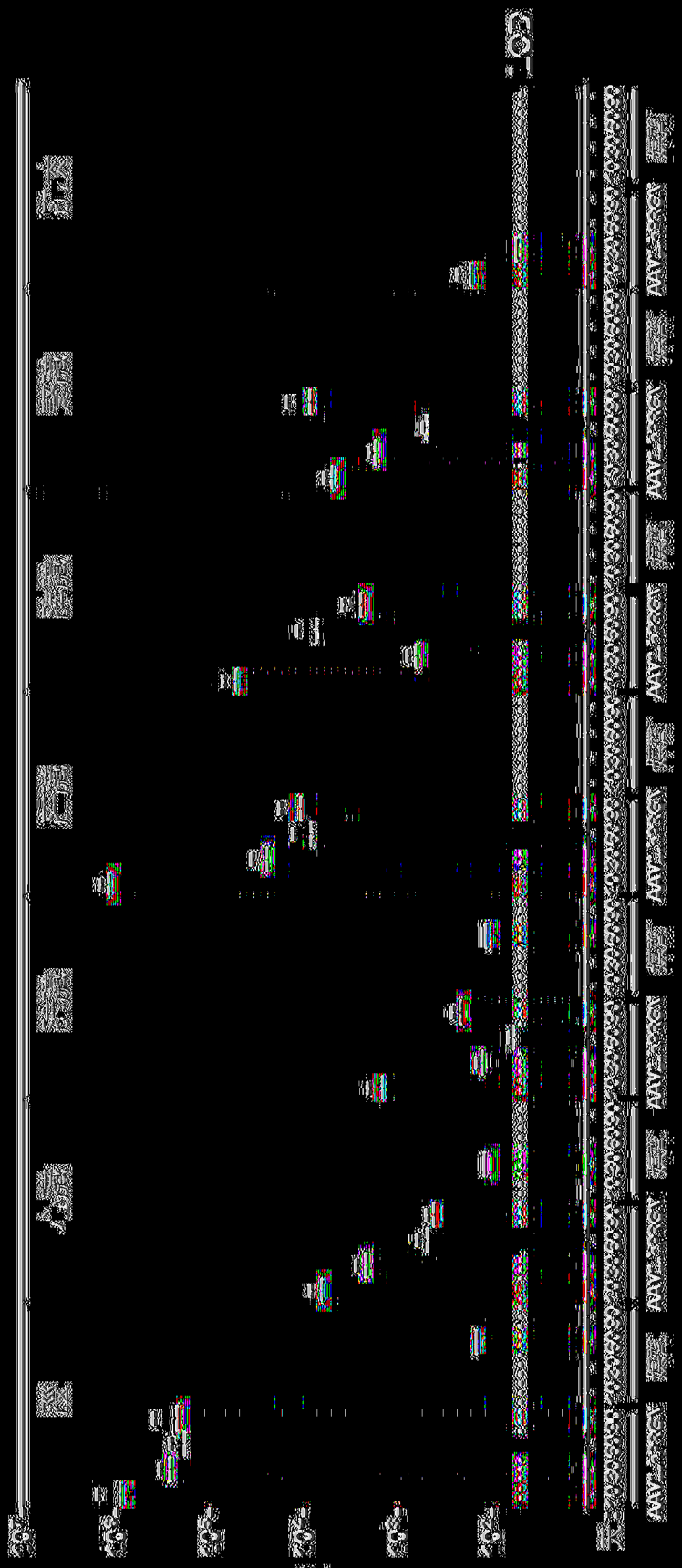
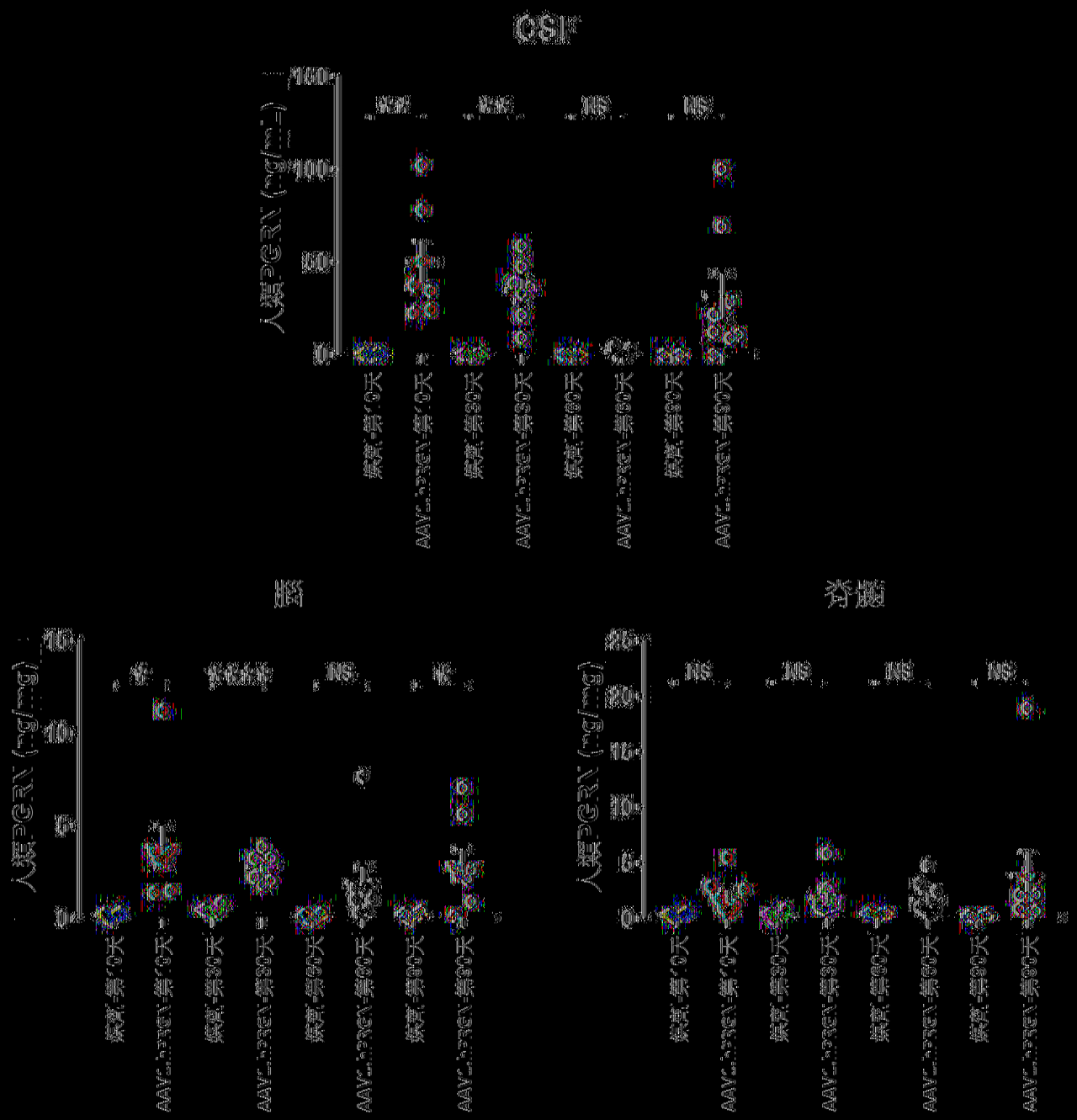

腦
非線
第90天
200
175
150
125
100
75
50
25
0
WT
Crtc1
對照
模型
4.4×10⁶cfu
8.8×10⁶cfu
1.4×10⁷cfu
2.8×10⁷cfu
WT
Crtc1

圖 18

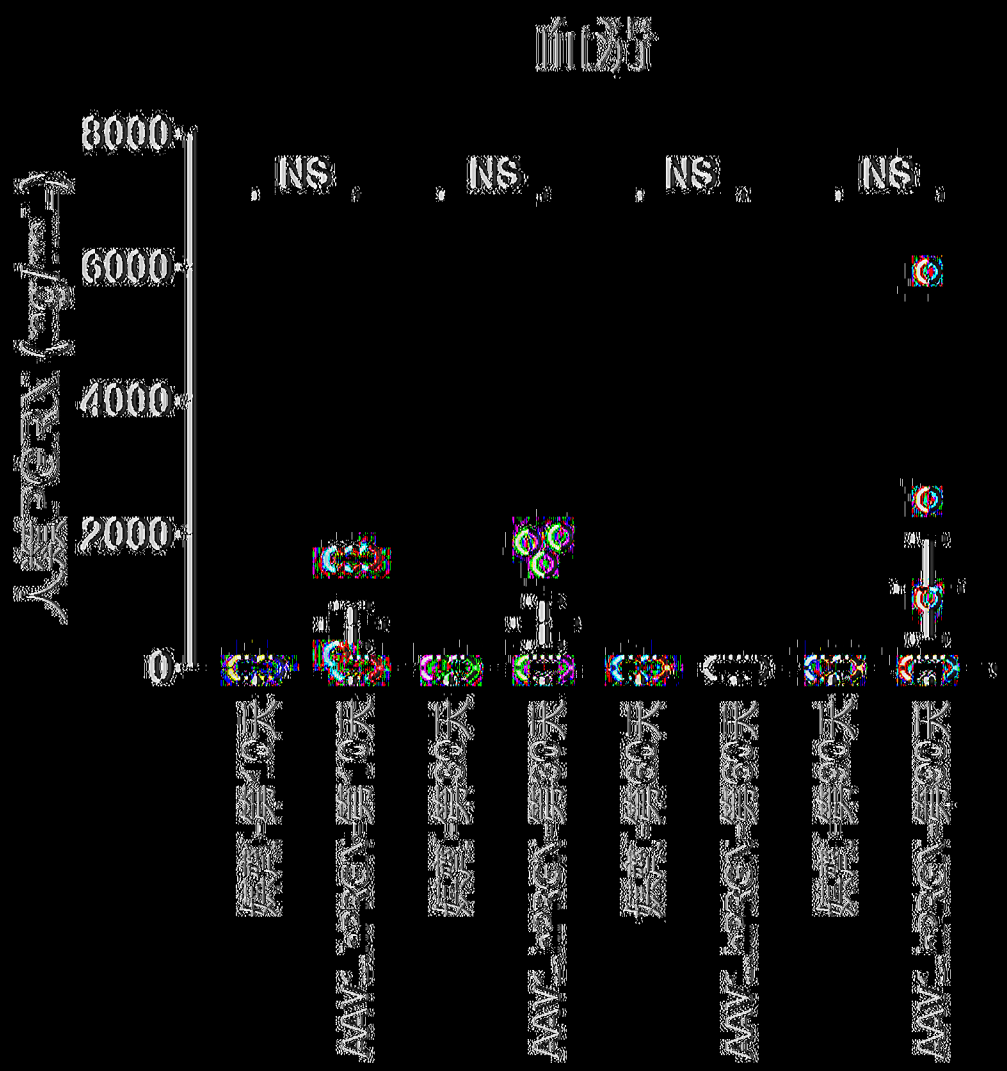


[(図 19)]


AAV2-ITR
AAV2-ITR
AAV2-ITR


OSF
人源化C3N (ng/mL)
160
100
60
0
NS
NS
NS
NS
媒體 第0天
AAV-hC3N 第0天
媒體 第30天
AAV-hC3N 第30天
媒體 第60天
AAV-hC3N 第60天
媒體 第90天
AAV-hC3N 第90天
腦
人源化C3N (ng/mg)
10
5
0
NS
NS
NS
脊髓
人源化C3N (ng/mg)
25
20
15
10
5
0
NS
NS
NS
NS

[圖 21]


血液
8000
6000
4000
2000
0
NS
NS
NS
NS
KG-1細胞
KG-1/AAV-LacZ
KG-1/AAV-hFGF21
KG-1/AAV-mFGF21
KG-1細胞
KG-1/AAV-LacZ
KG-1/AAV-hFGF21
KG-1/AAV-mFGF21

[圖 22]

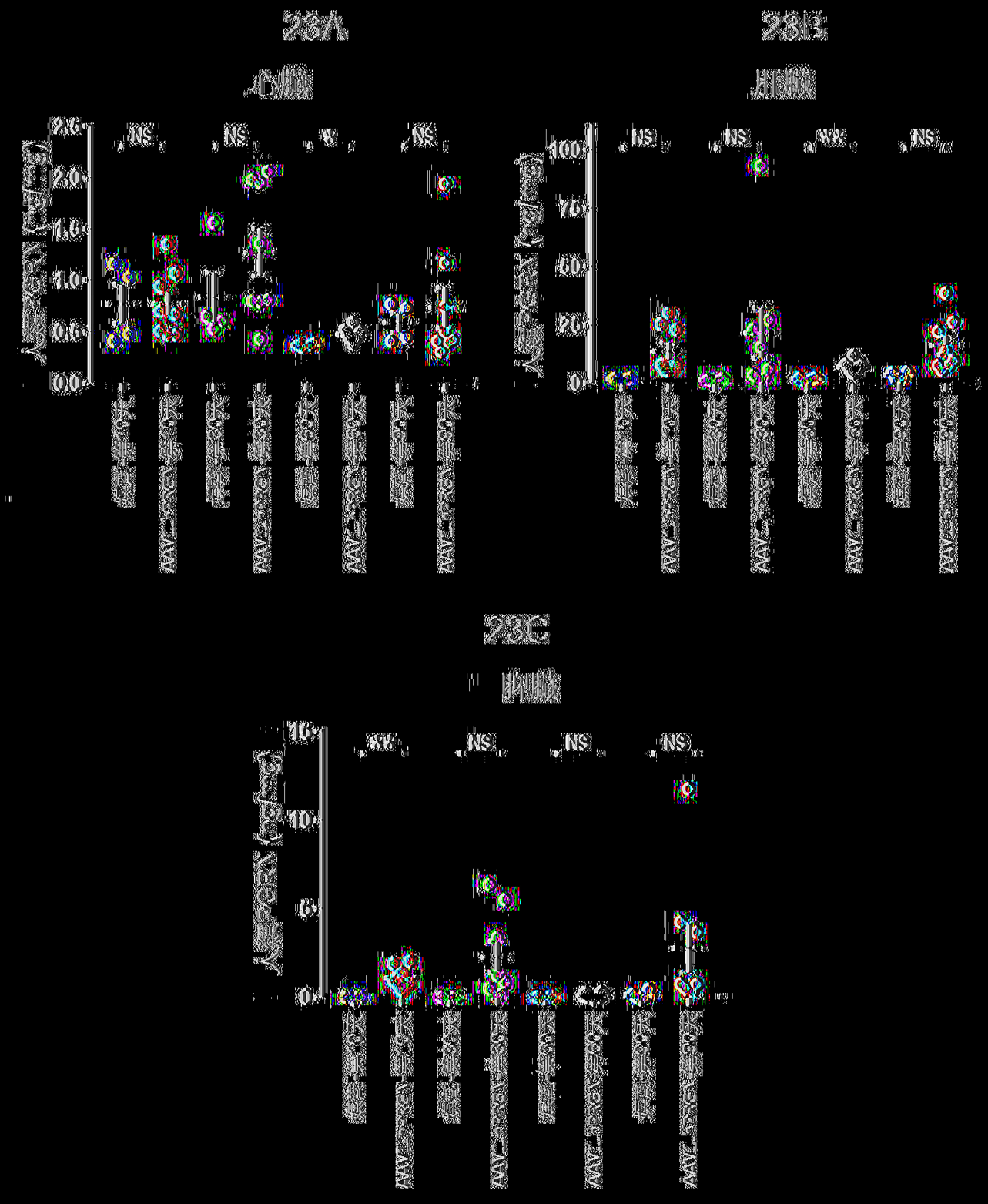
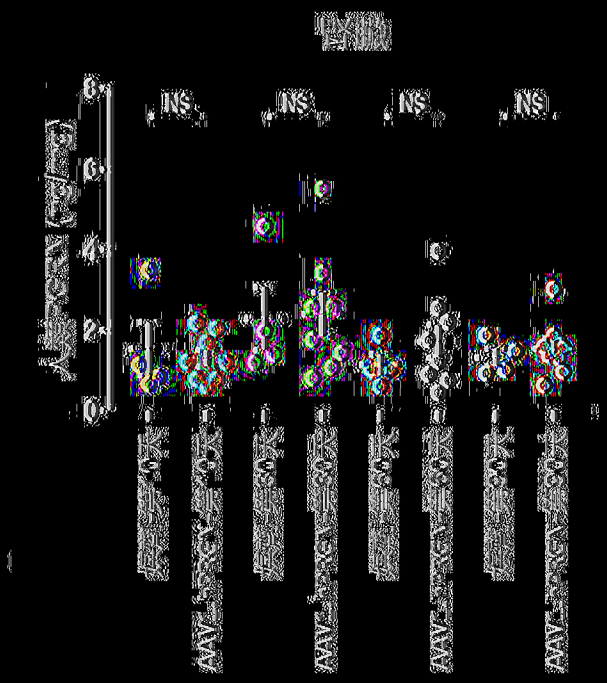
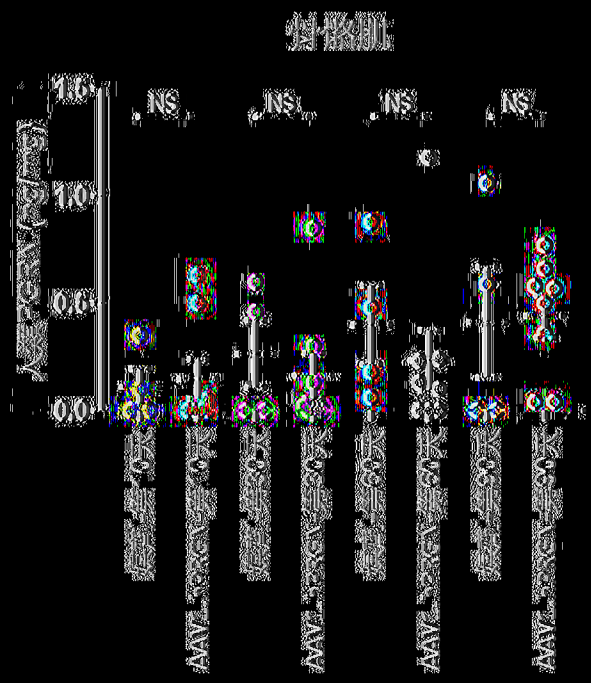


圖 23A-23C

23D



23F



23I

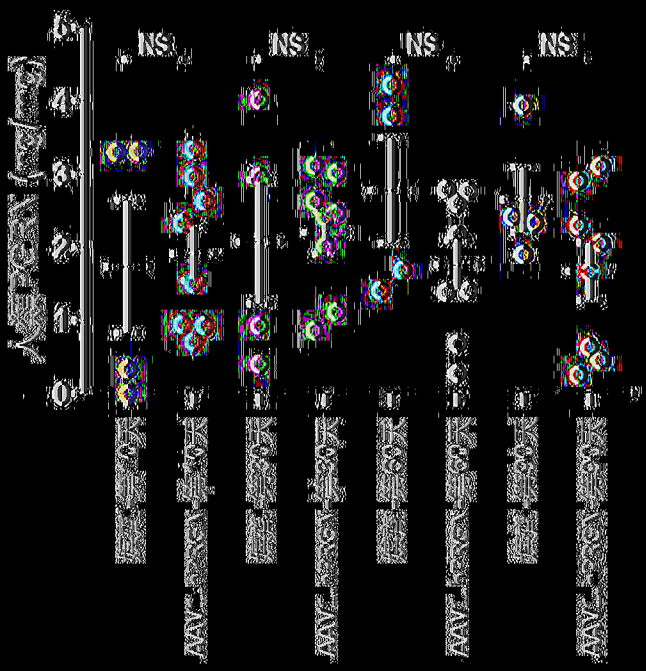
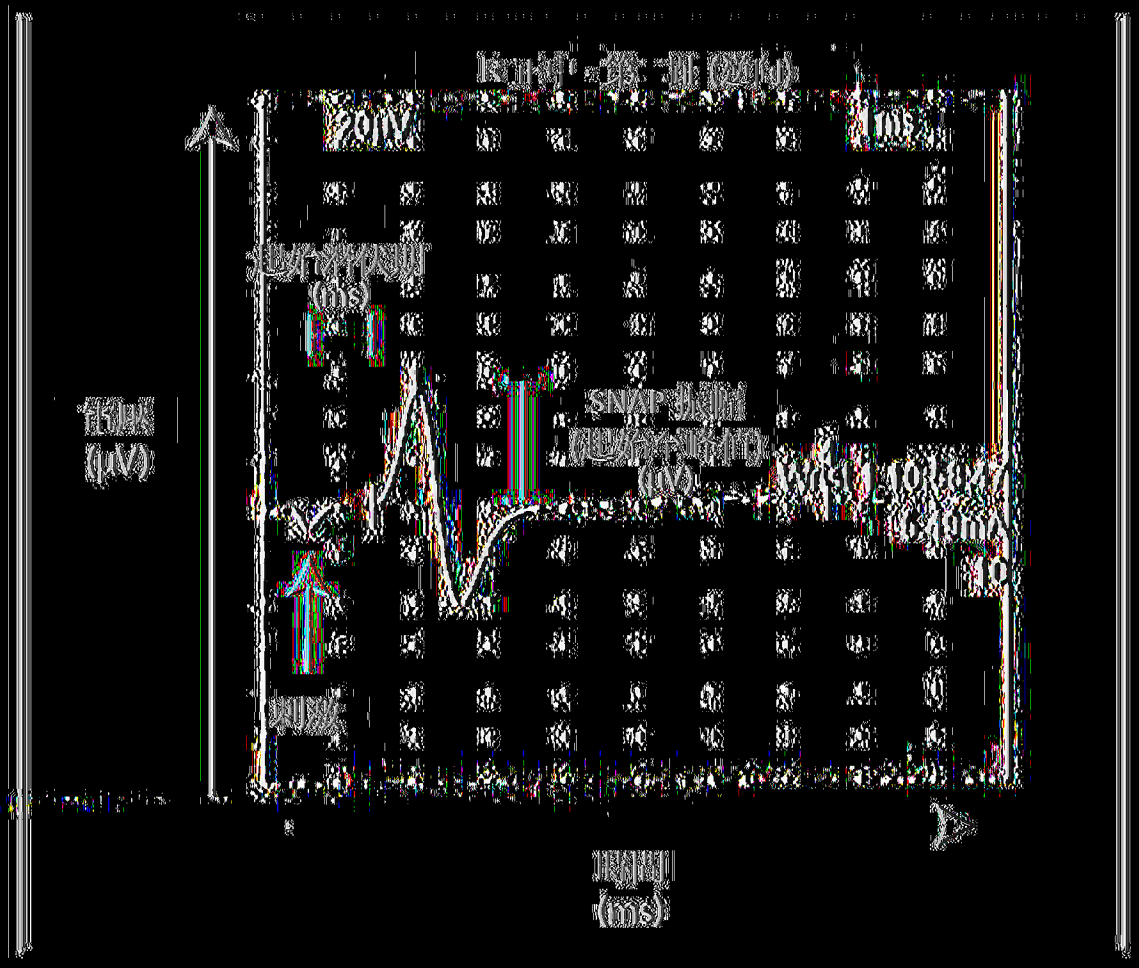


圖 23D-23F



[図 24]

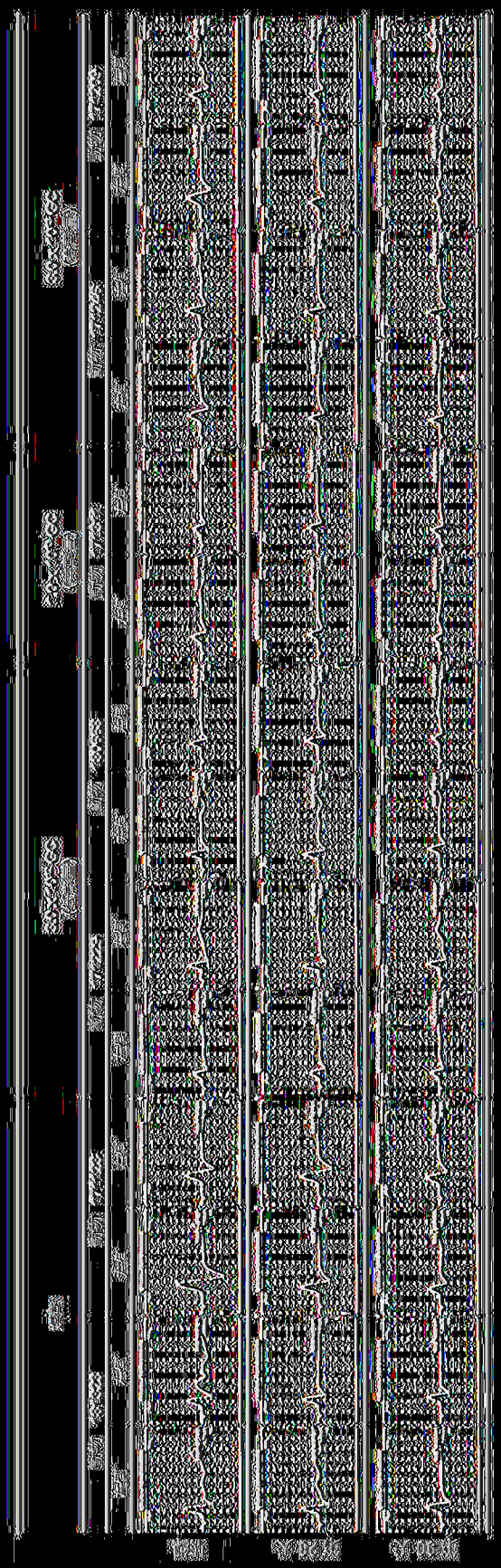
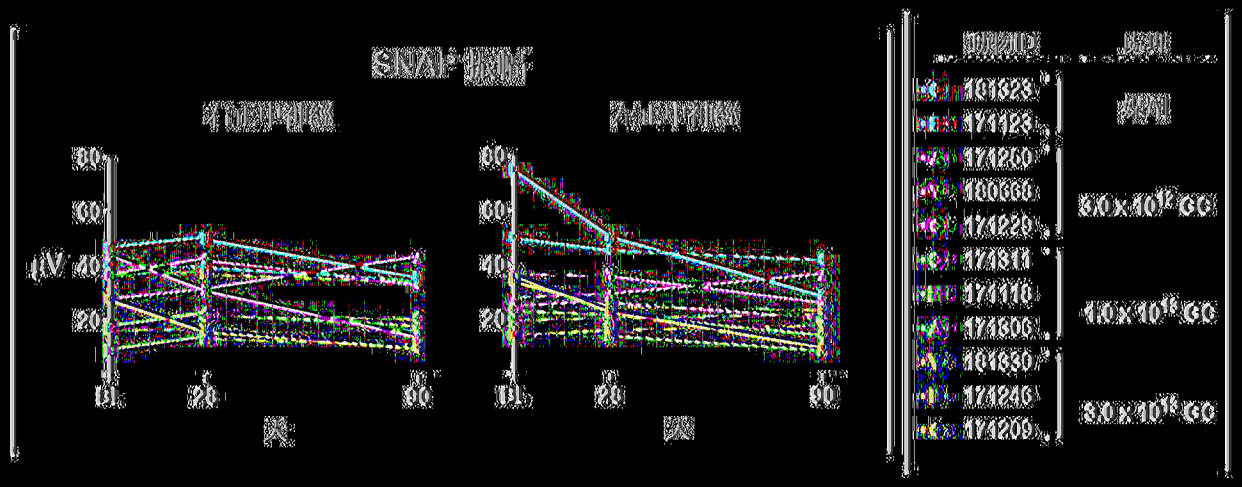
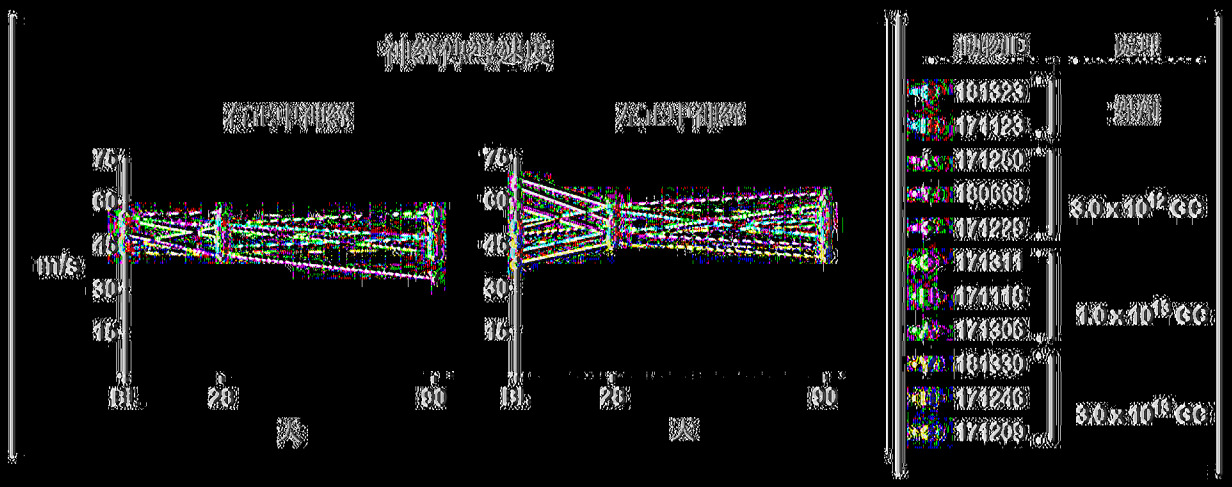


圖 25


SNAP 波形
病例 1
病例 2
μV
80
60
40
20
10
20
90
秒
病例ID
劑量
101323
171123
171220
180668
171811
171110
171806
101830
171240
171209
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC

[圖 26A]


神經傳導速度
病例 1
病例 2
m/s
70
60
50
40
30
10
20
90
秒
病例ID
劑量
101323
171123
171220
180668
171811
171110
171806
101830
171240
171209
3.0 x 10^12 GC
1.0 x 10^13 GC
3.0 x 10^13 GC

[圖 26B]

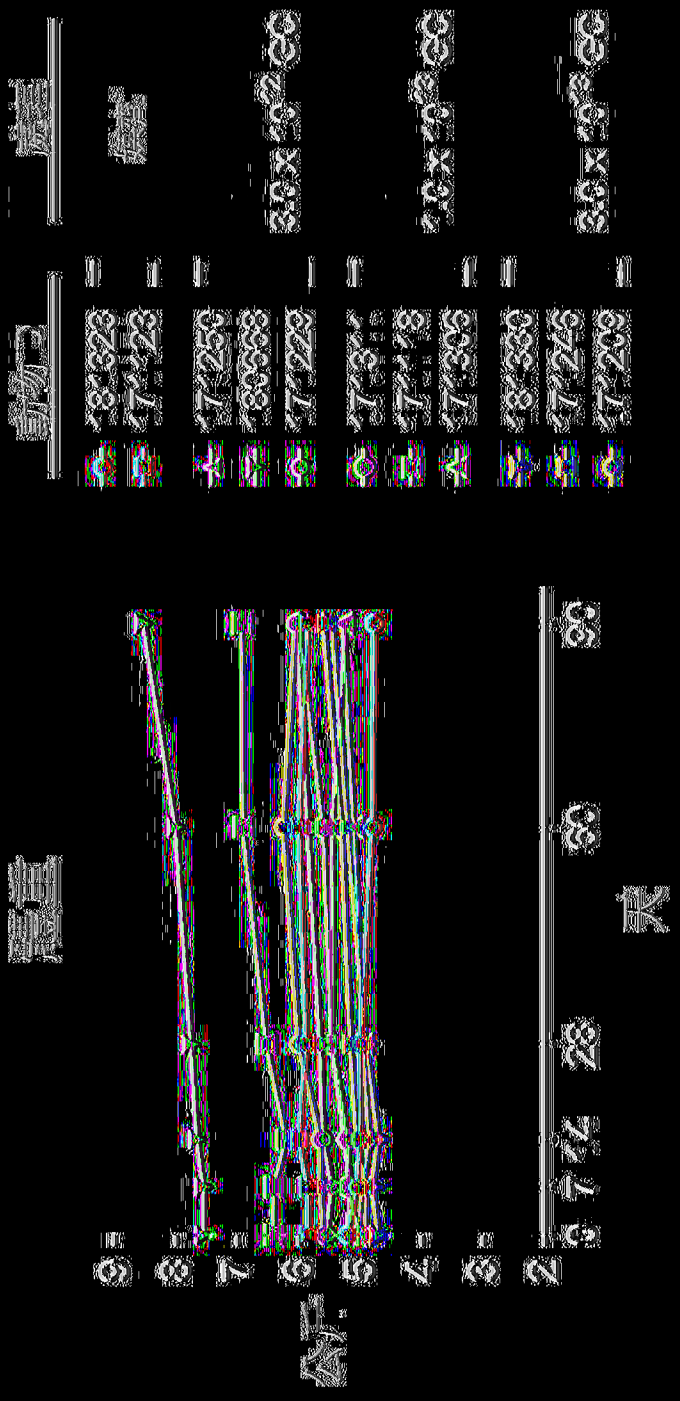
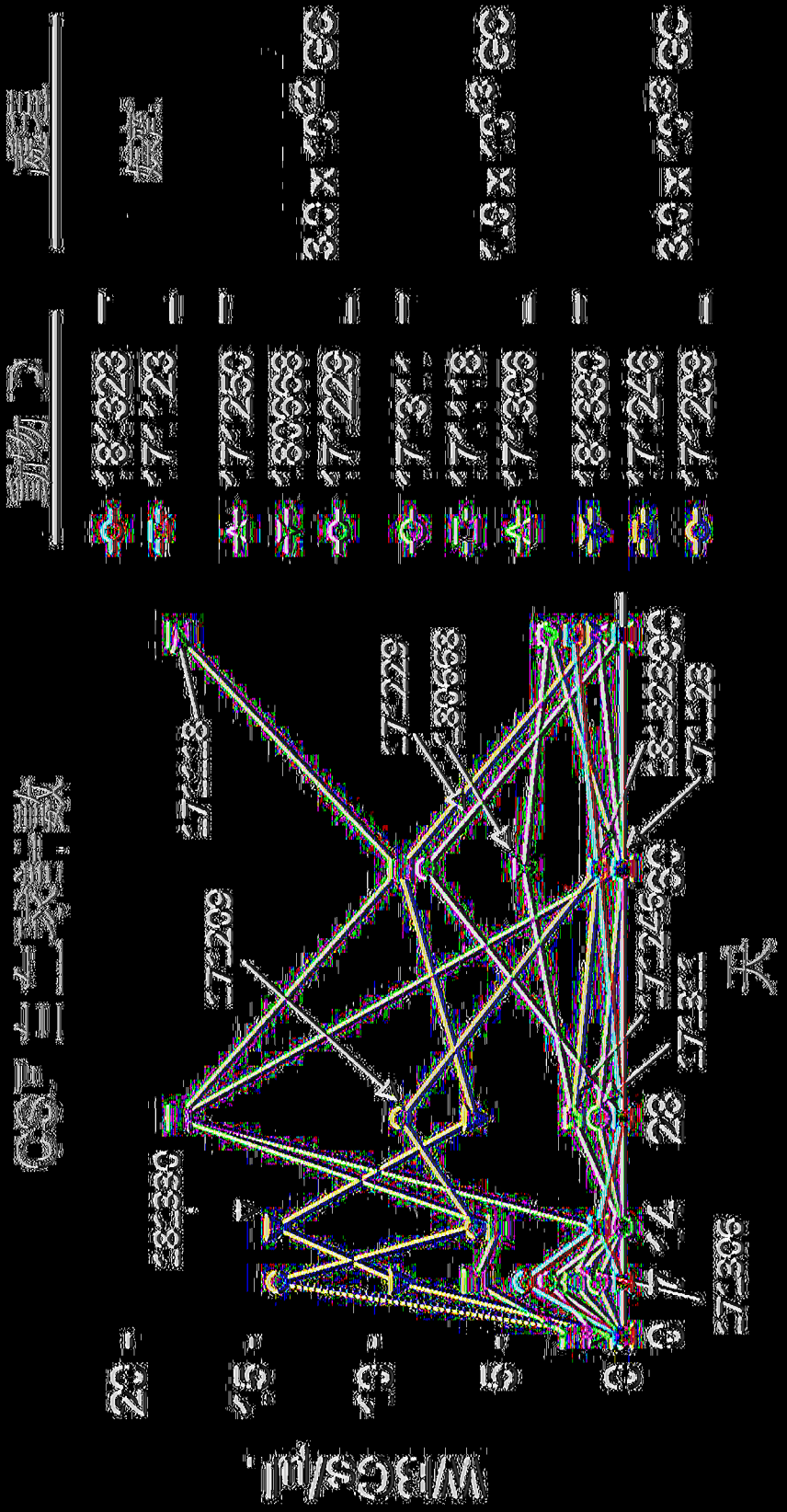


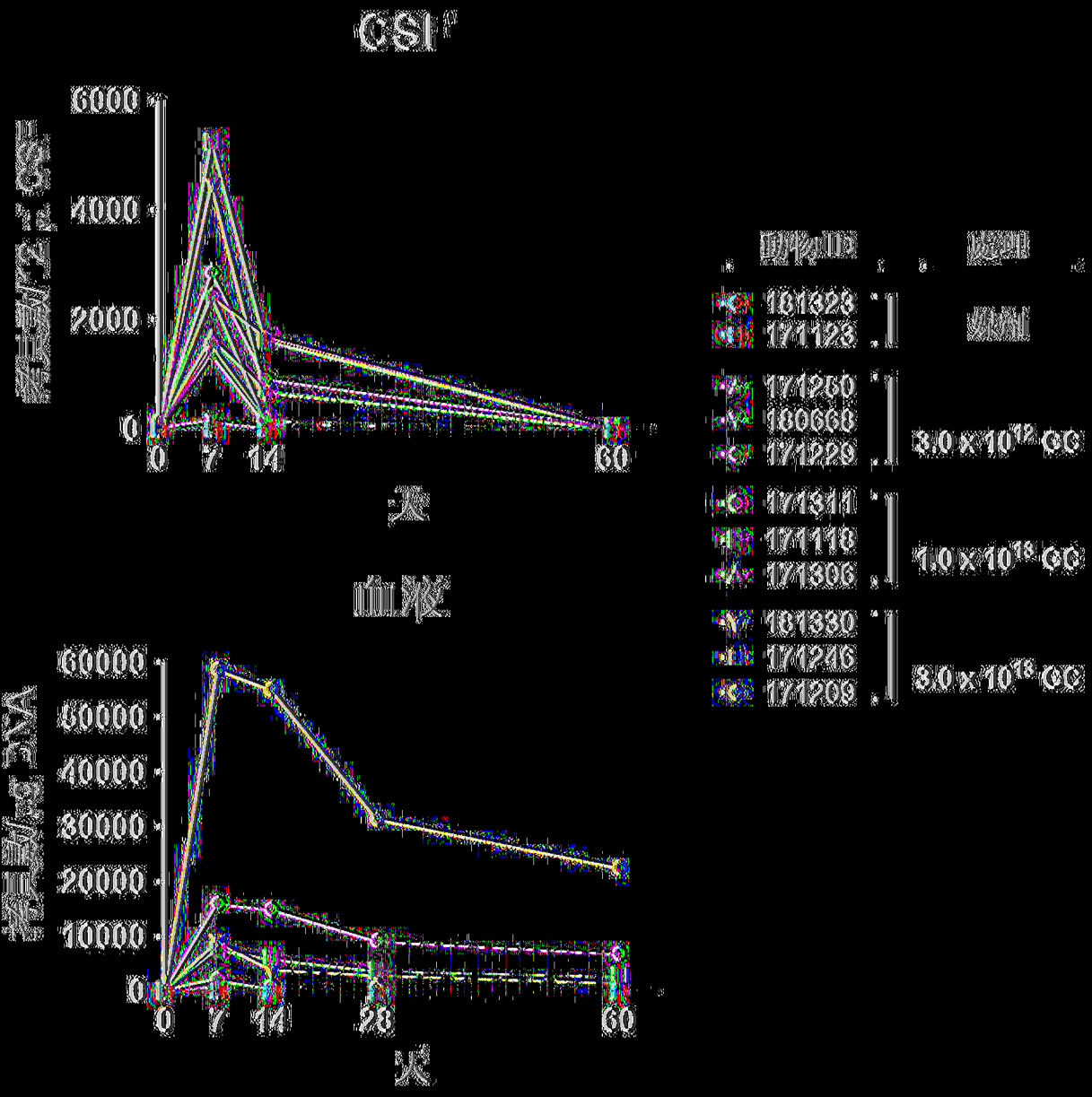
圖 27



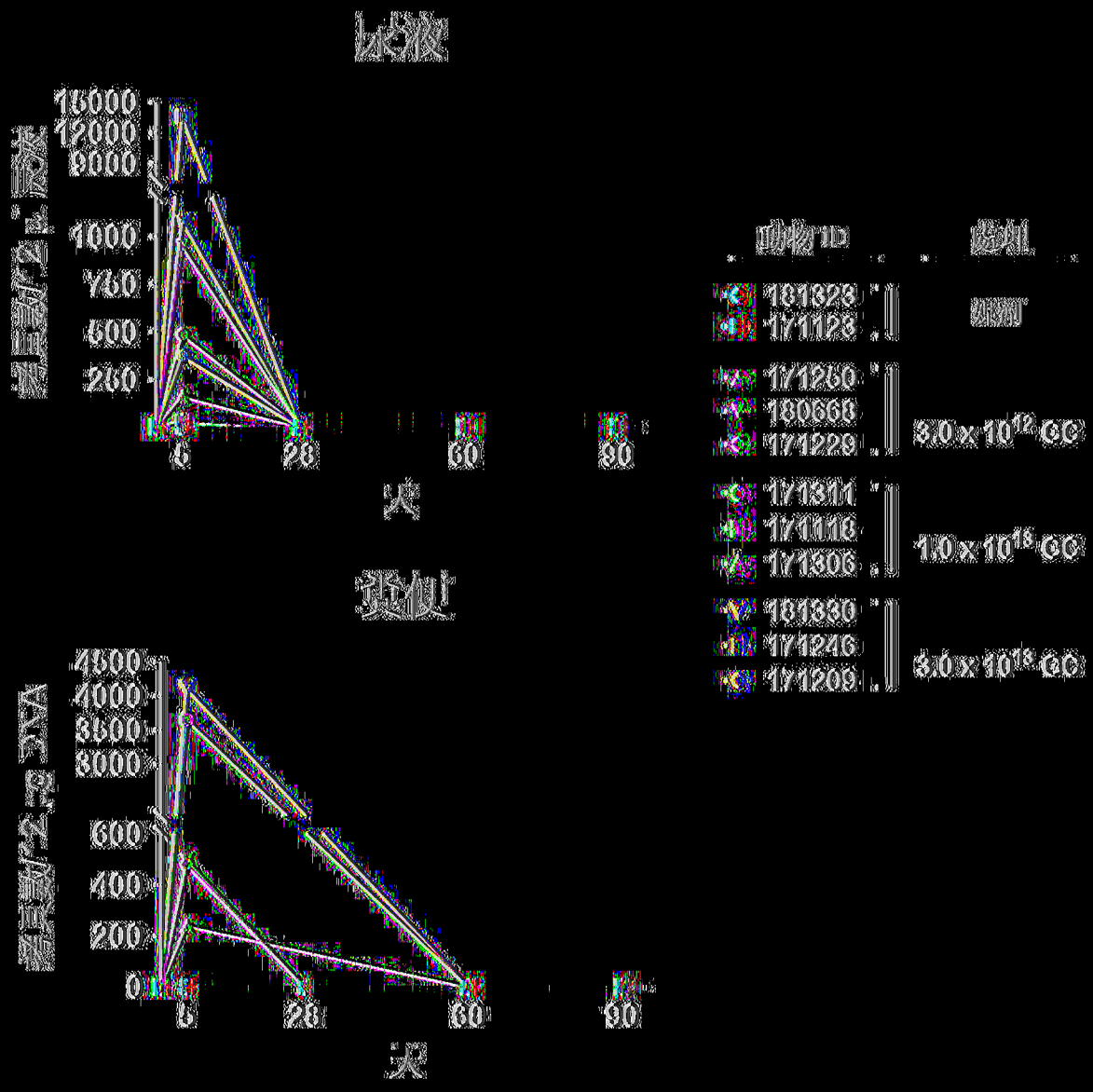
[圖 28]

組別	動物數	劑量 (mg/kg)	劑量體積	給藥途徑	給藥頻率	給藥週期	第1天	第8天	第15天	第22天	第29天	第36天	第43天	第50天	第57天	第64天	第71天	第78天	第85天	第92天	第99天	第106天	第113天	第120天
1	雄性	VA	5mL/kg	IV	QW	3W	X	X	X															
2	AAV-hXXXX	2.0×10^13	5mL/kg	IV	QW	3W	X	X	X															
3	AAV-hXXXX	6.0×10^13	5mL/kg	IV	QW	3W	X	X	X															
4	AAV-hXXXX	2.0×10^14	5mL/kg	IV	QW	3W	X	X	X															
5	AAV-hXXXX	6.0×10^14	5mL/kg	IV	QW	3W	X	X	X															

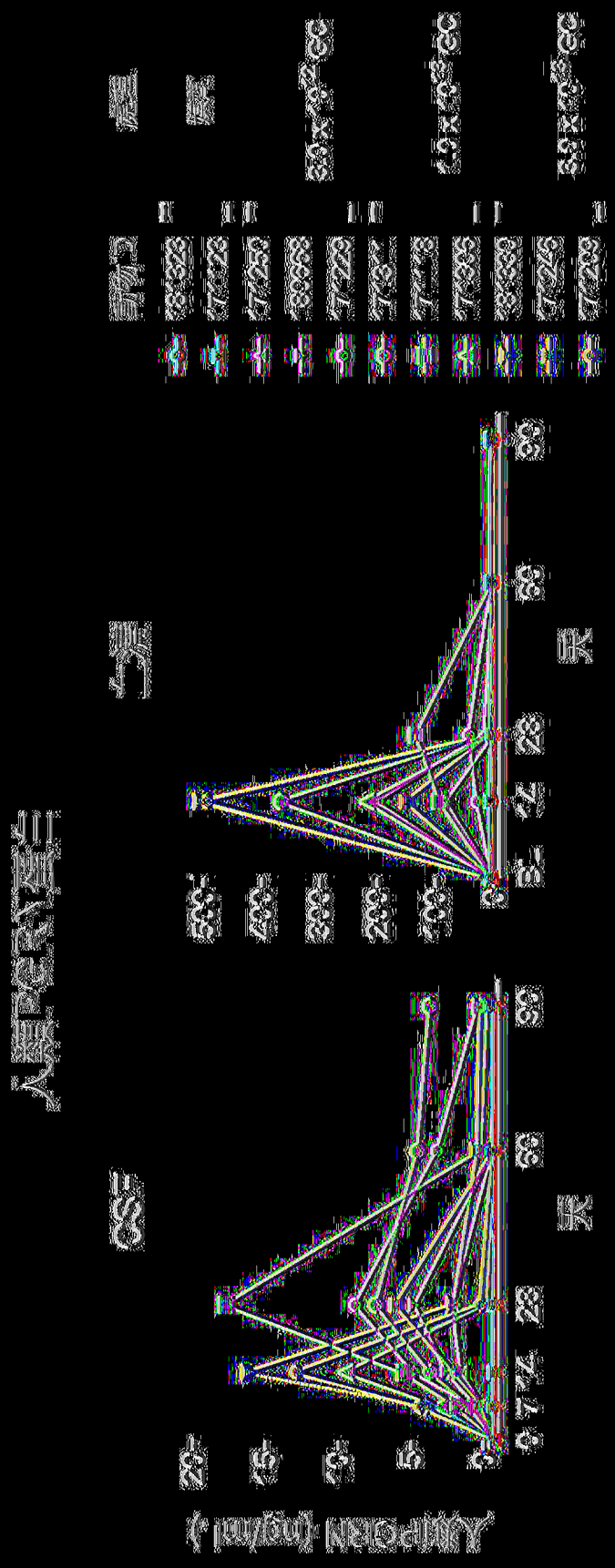
備註：AAV：腺相關病毒載體；IV：靜脈注射；QW：每週一次；3W：連續3週；CO：基因拷貝數；Cyno：食蟹猴；VA：媒介物對照組；hXXXX：人源化XXXX；5mL/kg：給藥體積為5毫升/公斤體重；


CSF
6000
4000
2000
0
0
7
14
60
天
血漿
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
7
14
28
60
天
動物ID
投與
181323
171123
雄劑
171250
180668
171229
3.0 x 10^12 GC
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 GC
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 GC

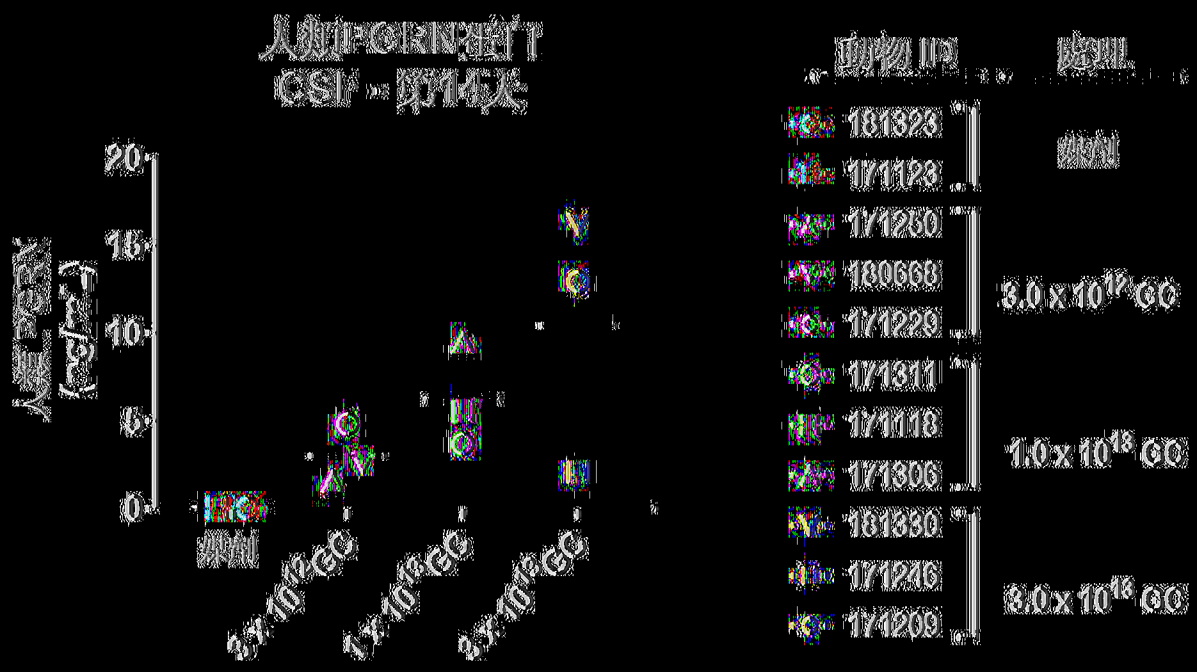
|(圖 30)|


比較例
15000
12000
9000
1000
750
500
250
6
28
60
90
日
実施例
4500
4000
3500
3000
600
400
200
0
6
28
60
90
日
試料ID
実施例
181323
171123
171260
180668
171229
3.0 x 10^12 cc
171311
171118
171306
1.0 x 10^13 cc
181330
171246
171209
3.0 x 10^13 cc

[図31]



[圖 32]


人側PGRN発現
CSF－膵がん
20
15
10
5
0
健常
2.1×10¹²GC
1.7×10¹³GC
0.5×10¹³GC
動物No.
投与
181323
1/1123
1/1230
180668
1/1220
1/1311
1/1118
1/1306
181330
1/1246
1/1209
3.0×10¹²GC
1.0×10¹³GC
3.0×10¹³GC

[図33]



[図 34]

AAV2-3YF4CV
3.0×10^10
1.0×10^10
3.0×10^9
Vehicle
Day 0
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28
Day 35
Day 42
Day 49
Day 56
Day 63
Day 70
Day 77
Day 84
Day 91
Day 98
Day 105
Day 112
Day 119
Day 126
Day 133
Day

組別	給藥	給藥後觀察天數																								
組別	第-35天至第-1天	第0天(給藥)	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	第9天	第10天	第11天	第12天	第13天	第14天	第15天	第16天	第17天	第18天	第19天	第20天	第21天	第22天	第23天	第24天
尿液採集	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
尿液天數尿量	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
一般症狀及體型																										
死亡與否	X																									
疾狀	X																									
體重測量	X	X	X			X			X			X			X			X			X			X		
A部位	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
觸診腫瘤	X																									
安全性、毒理與一般臨床觀察																										
組織病理								X																		
血液學	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
血液生化																										
尿液分析	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抗AAV9 NAB	X																									
抗AAV9 ELISA				X																						
抗AAV9 BOX結合				X																						
抗AAV9 BOX抑制				X																						
抗AAV9 細胞抑制				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抗AAV9 細胞結合																										
抗AAV9 細胞內化								X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抗AAV9 細胞DNA釋放																										
抗AAV9 AAV:NAb				X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

(圖 36A)

組別	數量	給藥途徑與劑次	檢測項目	檢測時間點															
				第-35天 篩選-1天	第1天 給藥後	第3天 給藥後	第5天 給藥後	第7天 給藥後	第14天 給藥後	第21天 給藥後	第28天 給藥後	第35天 給藥後	第42天 給藥後	第49天 給藥後	第56天 給藥後	第63天 給藥後	第70天 給藥後	第77天 給藥後	第84天 給藥後
玩家對照組三	5	4																	
玩家試驗組三	5	4																	
特定試劑三劑量	5	4	第-35天篩選期第-1天(給藥前)	X															
			第1天給藥後		X														
			第3天給藥後		X	X													
			第5天給藥後		X	X	X												
			第7天給藥後		X	X	X	X											
			第14天給藥後		X	X	X	X	X										
			第21天給藥後		X	X	X	X	X	X									
			第28天給藥後		X	X	X	X	X	X	X								
			第35天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X							
			第42天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X						
			第49天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
			第56天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
			第63天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
			第70天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
			第77天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
			第84天給藥後		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

(圖 36B)

組別	組別	給藥及觀察天數																			
每組動物數目		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13							
每天觀察數目	第-3天 至第-1天	第0天 至第0天 (給藥前)	第0天 IOV	第0天 觀察	第1天*	第7天	14 天	30 天	3/5/7 天	6/8/10 天	12/14/16 天	18/20/22 天	24/26/28 天	32/34/36 天	38/40/42 天	60/62/64 天					
給予TBT-29 (C-等5)																					
給予TBT-01			X																		
血液及其他生物樣品採集																					
體液樣品 VOL	X								X		X		X		X						
IOC-22	X								X		X		X		X						
臨床觀察與記錄	X								X		X		X		X						
22/23C	X								X		X		X		X						

X：表示有執行

*第1天的觀察以4小時為間隔，在注射後4小時內觀察。

#注射後的觀察以給予大鼠IOST中的IOV當日，為期兩週的觀察，如有必要可延長觀察時間。

%給予動物後的第2天IOST中的IOV當日，為期兩週的觀察，如有必要可延長觀察時間。

以尿液採集觀察的目的為觀察尿毛，給藥後二次收集。

%給予動物後的第2天IOST中的IOV當日，為期兩週的觀察，如有必要可延長觀察時間。

以尿液採集觀察的目的為觀察尿毛，給藥後二次收集。

%給予動物後的第2天IOST中的IOV當日，為期兩週的觀察，如有必要可延長觀察時間。

以尿液採集觀察的目的為觀察尿毛，給藥後二次收集。

%給予動物後的第2天IOST中的IOV當日，為期兩週的觀察，如有必要可延長觀察時間。

縮寫：AAV：腺相關病毒二型載體；AB：大鼠事件；CDR：[illegible]；IOV：[illegible]；IOST：[illegible]；CSS：[illegible]；IOC：[illegible]；22C：[illegible]；IOV：[illegible]；IOV：[illegible]；IOV