



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I879721 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：107137220

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl. : C12N15/11 (2006.01)

C12N15/861 (2006.01)

A61K31/7088(2006.01)

A61P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/10/20 美國

62/574,828

2018/05/25 美國

62/676,687

2018/10/04 美國

62/741,335

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

美國

(72)發明人：撒漢克 札瑞芙 SAHENK, ZARIFE (US)

(74)代理人：陳長文

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：9 共 141 頁

(54)名稱

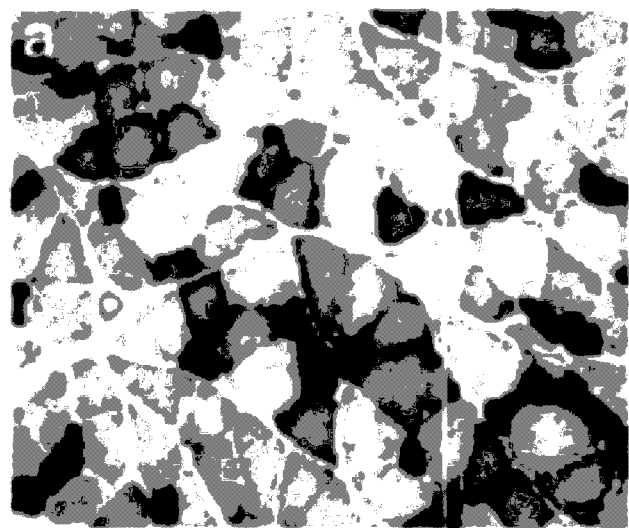
用於 NT-3 基因療法之方法及材料

(57)摘要

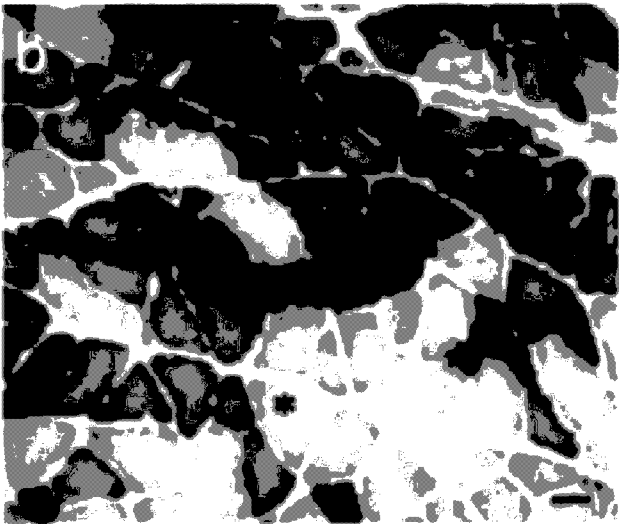
本發明係關於神經營養蛋白 3(NT-3)多核苷酸之重組腺相關病毒(rAAV)遞送。本發明提供 rAAV 及使用所述 rAAV 進行 NT-3 基因療法以改善肌肉力量、刺激肌肉生長及治療肌肉消耗病症之方法，所述肌肉消耗病症諸如肌肉萎縮症及夏馬杜三氏神經病變。

The present disclosure relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) delivery of a neurotrophin 3 (NT-3) polynucleotide. The disclosure provides rAAV and methods of using the rAAV for NT-3 gene therapy to improve muscle strength, stimulate muscle growth and to treat muscle wasting disorders, such as muscular dystrophy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy.

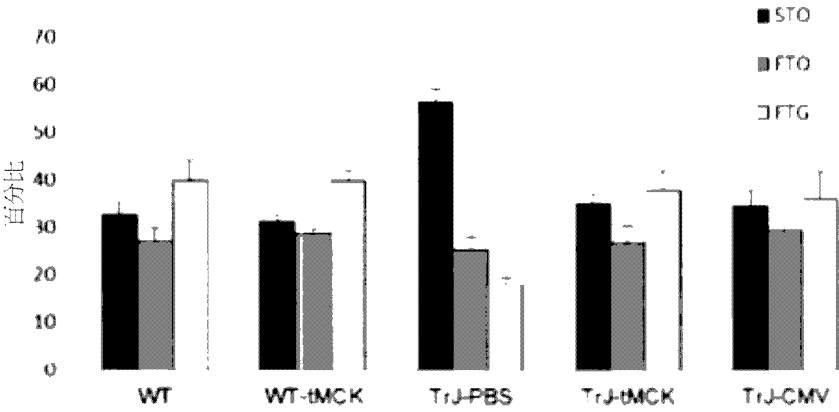
指定代表圖：



【圖1A】



【圖1B】



【圖1C】



I879721

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於NT-3基因療法之方法及材料

【英文發明名稱】

METHODS AND MATERIALS FOR NT-3 GENE THERAPY

【中文】

本發明係關於神經營養蛋白3(NT-3)多核苷酸之重組腺相關病毒(rAAV)遞送。本發明提供rAAV及使用所述rAAV進行NT-3基因療法以改善肌肉力量、刺激肌肉生長及治療肌肉消耗病症之方法，所述肌肉消耗病症諸如肌肉萎縮症及夏馬杜三氏神經病變。

【英文】

The present disclosure relates to recombinant adeno-associated virus (rAAV) delivery of a neurotrophin 3 (NT-3) polynucleotide. The disclosure provides rAAV and methods of using the rAAV for NT-3 gene therapy to improve muscle strength, stimulate muscle growth and to treat muscle wasting disorders, such as muscular dystrophy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy.

【指定代表圖】

圖1A-1C

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於NT-3基因療法之方法及材料

【英文發明名稱】

METHODS AND MATERIALS FOR NT-3 GENE THERAPY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於神經營養蛋白3(NT-3)多核苷酸之重組腺相關病毒(rAAV)遞送。本發明提供rAAV及使用rAAV進行NT-3基因療法以改善肌肉力量、刺激肌肉生長及治療神經病變及肌肉萎縮病症之方法，所述神經病變及肌肉消耗病症諸如夏馬杜三氏神經病變(Charcot-Marie-Tooth neuropathy)。

【先前技術】

【0002】 近期研究表明，神經營養蛋白3(NT-3)為具有此前未知或未被認識之特徵的多功能分子。除了對周邊神經再生及許旺細胞(SC)之公認影響外，NT-3亦具有抗炎及免疫調節作用。Yang等人，*Mol Titer*，22(2):440-450 (2014)。最近已證明，NT-3能夠在人體內發生之慢性炎性脫髓鞘周邊神經病症的啮齒動物模型中減輕自發性自身免疫性周邊多發性神經病變。Yalvac等人，《基因療法(Gene therapy)》，23(1):95-102 (2015)。

【0003】 夏馬杜三氏(CMT)神經病變係最常見之遺傳性神經病變。CMT1包含五種類型之CMT，其由四個突變基因引起。此群包含大多數CMT患者。此等基因與SC及軸突周圍之髓鞘相關，儘管其以不同方式相互作用，且因此係表型異質的。CMT 1A型係包含PMP22基因之染色體

17p11上之DNA複製的結果，PMP22基因引起典型CMT1表型之發展。患者在生命之前二十年中出現臨床症狀，導致需要走動輔助之顯著殘疾。在此等患者中，歸因於長期軸突切開術及作為慢性神經病變之一部分存在的去神經，周邊神經再生不完全。NT-3為由許旺細胞(SC)分泌之營養因子，其支持神經再生。失神經SC之存活能力對神經再生至關重要，因為SC提供生長因子及基板，促進軸突生長之支架。長期去神經引起與再生相關的SC分子(神經營養蛋白(NTF)及其受體)之表現減少相關的再生能力降低，導致去神經SC之萎縮、布格納氏帶(bands of Bungner)之分解及SC基底層支架之缺失。

【0004】 先前研究表明，在夏馬杜三氏(CMT)神經病變之TremblerJ(TrJ)小鼠模型中，NT-3基因療法不僅改善神經再生，伴隨SC數目、有髓鞘纖維密度及髓鞘厚度之增加，而且增加肌肉纖維直徑，如後肢之前部及後部肌肉中所展示。Sahenk等，《分子療法(Mol Ther)》，22(3):511-521 (2014)。先前研究表明，已知神經病理表型會在骨骼肌中產生多樣變化，包含自快II型轉變為慢I型纖維。在TrJ小鼠中，發現主要由快速型纖維構成的伸趾長肌(extensor digitalis longus)與野生型(WT)相比具有顯著更高之慢纖維百分比，且比目魚肌中I型纖維之百分比隨年齡增長顯著增加。Nicks等人，《神經病理學及實驗神經學雜誌(J Neuropathol Exp Neurol)》，72(10):942-954 (2013)。引起關注地，老化亦伴隨人類及其他哺乳動物中慢纖維比例之類似變化。Larsson L，Moss R，《生理學雜誌(J Physiol.)》，472:595-614 (1993)；Larsson等，《美國生理學雜誌(Am J Physiol.)》，272:C638-C649 (1997)。

【0005】 作為體染色體顯性病狀遺傳之CMT1A為最常見之CMT類

型。其最通常由17p11.2處之1.5 Mb複製引起，包含周邊髓鞘蛋白22(PMP22)基因，由同源染色體之不等交叉產生(1)。此係沒有已知治療之緩慢進行性疾病。症狀最通常發生在前二十年。弓形足(pes cavus)及錘狀趾(hammer toe)存在。需要諸如踝足矯形器之走動輔助設備。較不頻繁地，嚴重兒童期病例可能依賴輪椅或呼吸器。通常，90%之患者在尺骨神經中具有16 m/s至35 m/s或更低之運動神經傳導速度(NCV)(2)。儘管遺傳缺陷主要涉及許旺細胞(SC)，但臨床電生理學圖像為長度依賴性感覺運動脫髓鞘神經病變。臨床圖像受許旺細胞(SC)-軸突相互作用受損導致的軸突變性的顯著影響(3)。

【0006】 目前對此病狀無治療。高度稱讚抗壞血酸補充劑能夠幫助，但多項研究未展示益處。低劑量(1-2克/日)(4-6)及高劑量療法(3-4克/日)未被證明有益的(6,7)。最初，NT-3之人體試驗展示治療24週後之臨床功效，伴隨治療後腓腸神經活檢組織中有髓鞘神經纖維數量增加(8)。Tr^J小鼠皮下NT-3治療改善軸突再生且增強髓鞘形成。然而，NT-3之短血清半衰期被證明為持續皮下投與之主要障礙，並且此產品已中止。

【0007】 已證明多種肌肉骨骼疾病會導致肌肉力量下降。此等包含但不限於遺傳性或隱性肌病(諸如肌肉營養不良症)、肌肉消耗疾病(諸如惡病質，其可能為來自潛在疾病，如獲得性免疫缺乏病(AIDS)、類風濕性關節炎、癌症、慢性阻塞性肺病(COPD)及肝硬化之結果)、肌肉萎縮或衰減之病狀(諸如可能為衰老導致的肌肉減少症)、長期廢用(諸如癱瘓、昏迷、長期臥床休息及ICU停留)、由手術誘導(諸如關節置換手術)之無力、藥物誘導之肌病及橫紋肌溶解症。此等疾病及病狀之肌肉病變部分或全部藉由免疫、炎性及纖維化反應之組合介導。能夠阻斷此等反應及/或

刺激受損組織再生之藥劑能夠減緩或逆轉此等病症之疾病進程。

【0008】腺相關病毒(AAV)為複製缺乏細小病毒，其單股DNA基因組長度為約4.7 kb，包含145個核苷酸反向末端重複(ITR)。存在多種AAV之血清型。已知AAV血清型之基因組的核苷酸序列。舉例而言，AAV-1之完整基因組以GenBank寄存編號NC_002077提供；AAV-2之完整基因組以GenBank寄存編號NC_001401及Srivastava等人，《病毒學雜誌(J.Virol.)》，45: 555-564 {1983}提供；AAV-3之完整基因組以GenBank寄存編號NC_1829提供；AAV-4之完整基因組以GenBank寄存編號NC_001829提供；AAV-5基因組以GenBank寄存編號AF085716提供；AAV-6之完整基因組以GenBank寄存編號NC_001862提供；AAV-7及AAV-8基因組之至少部分分別以GenBank寄存編號AX753246及AX753249提供；AAV-9基因組在Gao等人，《病毒學雜誌》，78: 6381-6388 (2004)中所提供；AAV-10基因組在《分子療法》13(1): 67-76 (2006)中所提供；且AAV-11基因組在《病毒學(Virology)》，330(2): 375-383 (2004)中所提供。引導病毒DNA複製(rep)、衣殼化/包裝及宿主細胞染色體整合之順效應序列含於AAV ITR內。三種AAV啟動子(針對其相關映射位點命名為p5、p19及p40)驅動編碼兩個AAV內部開放閱讀框架之rep及cap基因的表現。與單個AAV內含子之差異性剪接偶合(在核苷酸2107及2227處)之兩種rep啟動子(p5及p19)引起由rep基因產生四種rep蛋白質(rep 78、rep 68、rep 52及rep 40)。rep蛋白質具有多個最終負責複製病毒基因組的酶促特性。cap基因自p40啟動子表現，且其編碼三種蛋白殼蛋白質VP1、VP2及VP3。替代性剪接及非共同轉譯啟動對產生三種相關蛋白殼蛋白質負責的位點。單個共同聚腺苷酸化位點位於AAV基因組之

映射位置95處。在Muzyczka,《微生物學及免疫學中之當前主題(Current Topics in Microbiology and Immunology)》, 158: 97-129 (1992)中綜述AAV之生命週期及遺傳。

【0009】 AAV具有獨特特徵, 使得其例如在基因療法中作為用於遞送外來DNA至細胞的載體具有吸引力。AAV在培養物中感染細胞為非細胞病變的, 且對人類及其他動物之天然感染為沉默及無症狀的。此外, AAV感染多種哺乳動物細胞允許活體內靶向多種不同組織的可能性。此外, AAV緩慢轉導分裂細胞及非分裂細胞, 且對於彼等細胞之生命週期可基本上保持為轉錄活性細胞核游離基因體(染色體外的元件)。AAV前病毒基因組作為質體中之純系化DNA具有感染性, 其使得構築重組基因組變得可行。此外, 由於引導AAV複製、基因組衣殼化及整合之信號含於AAV基因組之ITR內, 基因組(編碼複製及結構性蛋白殼蛋白質, rep-cap)之內部約4.3 kb中之一些或全部可經外來DNA置換。rep及cap蛋白質可反式提供。AAV之另一種顯著特徵在於其為極其穩定及充滿活力的病毒。其容易地承受用以滅活腺病毒的條件(56°C至65°C持續數小時), 使得AAV的低溫保藏不那麼重要。甚至可將AAV凍乾。最後, 經AAV感染之細胞對重複感染不具有抗性。

【0010】 需要開發用於CMT神經病變及其他肌肉消耗病症之療法。本發明提供遞送NT-3之基因療法方法, 其用於治療CMT神經病變及其他肌肉消耗病症。

【發明內容】

【0011】 本發明提供刺激個體內肌肉生長之方法。所述方法包括向有需要之個體投與治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有

效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸。本發明描述NT-3之新穎效果，其直接影響神經性肌肉中蛋白質合成及代謝重塑之能力。

【0012】 在本發明之各種實施例中，肌內投與NT-3、pro-NT-3或其有效片段，或編碼本發明之NT-3或其有效片段之核酸。

【0013】 在本發明之任何方法中，使用病毒載體投與編碼NT-3或其有效片段之核酸。在某些實施例中，病毒載體為腺相關病毒(AAV)載體。在相關實施例中，本發明之編碼NT-3或其有效片段之核酸以操作方式連接至肌肉特異性啟動子，諸如三肌特異性肌酸激酶啟動子。在各種實施例中，本發明之編碼NT-3或其有效片段之核酸包括SEQ ID NO: 1。

【0014】 本發明提供核酸，其以5'至3'之順序包括：(i)第一AAV2反向末端重複序列(ITR)；(ii)肌肉肌酸激酶啟動子/增強子序列，其在SEQ ID NO: 11之核苷酸147-860中列出；(iii)編碼人NT-3多肽之核苷酸序列；及(iv)第二AAV2 ITR序列；其中人NT-3多肽具有與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列，或由與SEQ ID NO: 11之核苷酸1077-1850 90%相同或與SEQ ID NO: 11之核苷酸1077-1850 100%相同之核苷酸序列編碼。

【0015】 在一些實施例中，本發明之核酸進一步包括3'至啟動子/增強子之嵌合內含子，其在SEQ ID NO: 11之核苷酸892-1024中列出。此外，本發明之核酸可進一步包括3'至編碼人NT-3多肽之所述核苷酸序列，SEQ ID NO: 11之核苷酸1860-2059中列出的SV40多腺苷酸化信號。

【0016】 本發明之核酸中之任一者可包括一或多個反向末端重複序列(ITR)。舉例而言，核酸可包括在SEQ ID NO: 11之核苷酸7-112中列出的第一ITR，及/或在SEQ ID NO: 11之核苷酸2121-2248中列出的第二

ITR。

【0017】 在一些實施例中，核酸包括scAAV1.tMCK.NTF3基因組，其與SEQ ID NO: 11中列出之核苷酸序列至少90%相同。

【0018】 本發明亦提供包括本發明之核酸中之任一者的重組腺相關病毒粒子(rAAV)，其中所述rAAV為感染性的。rAAV粒子可為任何rAAV血清型，諸如AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11或AAVrh.74。此外，在本發明之任何rAAV粒子中，rAAV基因組中之AAV DNA來自AAV-1。

【0019】 本發明亦提供包括本發明之rAAV及藥學上可接受之載劑的組合物。舉例而言，調配此等組合物以治療有需要之個體之肌肉消耗病症或神經病變，或調配此等組合物以刺激有需要之個體之肌肉生長。

【0020】 在一個實施例中，本發明提供治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與編碼NT-3多肽之核酸的步驟；其中a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同之核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列之核酸序列，d)編碼NT-3多肽之核酸為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV以引起低濃度NT-3多肽之持續表現的劑量投與，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌肉途徑，且rAAV之投與劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌肉注射途徑且rAAV之投與劑量為約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12}

vg/kg，h) 編碼 NT-3 多肽之核酸為重組腺相關病毒 (rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i) 編碼 NT-3 多肽之核酸為重組腺相關病毒 (rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j) 編碼 NT-3 多肽之核酸為重組腺相關病毒 (rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k) 編碼 NT-3 多肽之核酸為重組腺相關病毒 (rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0021】在另一實施例中，本發明提供在有需要之人類個體之中改善肌肉力量或刺激肌肉生長的方法，包括向人類個體投與編碼NT-3多肽之核酸的步驟；其中a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同的核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列的核酸序列，d)編碼NT-3的核酸多肽為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV以引起低濃度NT-3多肽之持續表現的劑量投與，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途

徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{12} vg/kg至 6×10^{12} vg/kg，h)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，投與途徑為肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0022】 在本發明之任一方法中，使用病毒載體(諸如腺相關病毒載體)投與核酸。本發明之任一方法可用以操作方式連接至肌肉特異性啟動子(諸如肌特異性肌酸激酶(MCK)啟動子)之核酸進行。此外，本發明之任一方法可用scAAV1.tMCK.NTF3進行，包括SEQ ID NO: 11中所列的NT-3基因卡匣。

【0023】 在一些實施例中，本發明提供使用scAAV1載體、自互補AAV1血清型，在肌肉特異性啟動子tMCK之控制下使用人神經營養蛋白-3基因(NTF3)之基因療法方法。特定言之，本發明提供治療被診斷患有肌肉消耗病症或神經病變之個體的方法，包括投與表現NT-3之AAV載體。特定言之，方法包括經由肌內(IM)注射在腓腸肌及脛骨前肌中投與構建體scAAV1.tMCK.NTF3。舉例而言，表現NT-3之AAV載體(例如

scAAV1.tMCK.NTF3)之肌內遞送啟動NT-3之局部產生且將其分泌至循環中，從而促進神經髓鞘形成及纖維再生，引起CMT疾病表型之穩定化。更具體而言，本發明提供以約 2×10^{12} vg/kg之劑量或以約 6×10^{12} vg/kg之劑量投與scAAV1.tMCK.NTF3之方法。scAAV1.tMCK.NTF3包括SEQ ID NO：11中列出的NT-3基因卡匣。

【0024】 本發明亦提供投與表現NT-3之AAV載體作為用於治療肌肉消耗病症或神經病變之替代基因療法的方法。NT-3具有短半衰期，且本發明之方法包括投與AAV載體以持續釋放NT-3蛋白，即使個體表現內源性NT-3蛋白。作為替代基因療法，AAV載體之投與藉由肌細胞之持續分泌提供NT-3蛋白的持續遞送。此連續持續低循環級別之NT-3蛋白提供治療效果，具有極小毒性風險。與重複注射純化NT-3肽相比，藉由基因療法系統性生產NT-3亦為較方便且具成本效益的療法選擇方案。

【0025】 本發明提供治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0026】 本發明亦提供在有需要之人類個體中刺激肌肉生長的方法，其包括向人類個體投與一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0027】 在一個實施例中，本發明提供治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌內途徑，且rAAV

之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg。

【0028】 在另一實施例中，

【0029】 本發明提供在治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌肉途徑，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg。

【0030】 在另一實施例中，本發明提供治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌肉注射，濃度為約 1×10^{13} vg/ml。舉例而言，每塊肌肉分別使用3至6次注射投與rAAV，例如每一注射體積將為0.5 ml至1 ml，其中向每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與總共5 mL至14 mL的載體。

【0031】 在一個例示性實施例中，本發明提供治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌肉注射，濃度為約 2×10^{13} vg / ml，每塊肌肉分別使用3至6次注射(每一注射體積將為0.5 ml至1 ml)。向每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與總共5 mL至14 mL的載體。

【0032】 在一個實施例中，提供在有需要之人類個體中改善肌肉力

量或刺激肌肉生長的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg。

【0033】 在另一實施例中，本發明提供在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌內途徑，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg。

【0034】 在一個例示性實施例中，本發明提供在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌內注射，濃度為約 1×10^{13} vg/ml。舉例而言，每塊肌肉分別使用3至6次注射投與rAAV，例如每一注射體積將為0.5 ml至1 ml，其中向每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與總共5 mL至14 mL的載體。

【0035】 在一個例示性實施例中，本發明提供在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長的方法，其包括向人類個體投與重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3之步驟，其中投與途徑為肌內注射，濃度為約 1×10^{13} vg/ml，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg)投與，每塊肌肉分別使用3至6次注射(每一注射體積將為0.5 ml至1 ml)。向每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與總共5

mL至14 mL的載體。

【0036】 在本發明之任一方法中，其中scAAV1.tMCK.NTF3之投與途徑為肌肉雙側注射至腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。此外，在本發明之任一方法中，scAAV1.tMCK.NTF3之投與使得個體之肌肉力量在上肢或下肢中得到改善，且例如肌肉力量之改善按CMT兒科量表(CMTPeds)綜合評分降低量測。此外，在本發明之任一方法中，scAAV1.tMCK.NTF3之投與使得歷經兩年時段疾病進展降低或停止。疾病進展由CMTPedS量測。

【0037】 肌肉力量亦使用肌電圖、手持肌力測定法、固定系統肌力測定法、手動肌肉測試及/或功能性/活動測試(如Jebsen測試)及\計時測試來量測，定時測試評估個體執行特定任務所需之時間，諸如6分鐘步行測試、定時自地面上升、10公尺步行/跑步、定時爬升4台階及定時下降4台階。

【0038】 在本發明之一個態樣中，在任一方法中，個體罹患遺傳性神經病變，諸如夏馬杜三氏(CMT)神經病變，例如CMT1A、CMT2K、CMT4A、CMTR1A，及由體染色體隱性遺傳變異體、或體染色體顯性遺傳變異體或X性聯遺傳變異體引起之軸突及脫髓鞘神經病變。遺傳性神經病變可由表1中所提供之任何遺傳變異體引起。此外，遺傳性神經病變可為甲狀腺素轉運蛋白澱粉樣蛋白神經病變，其由諸如以下遺傳變異體之甲狀腺素轉運蛋白(TTR)基因突變引起：Val30Met、Ile107Val及Ser77Tyr。

【0039】 在本發明之另一態樣中，在任一方法中，個體罹患具有軸突喪失及/或神經再生受損之獲得性神經病變。獲得性神經病變為由已知

會引起神經病變之任何病症或疾病引起的周邊神經病變。舉例而言，個體罹患由以下所引起之周邊神經病變：糖尿病、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、甲狀腺病症(如甲狀腺功能低下)、低血糖症、尿毒症、腎機能不全、肝功能障礙、肝衰竭、紅血球增多症、結締組織病症、癌症、萊姆病、乳糜瀉、麻風病、卟啉症、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、脊髓灰白質炎、肢端肥大症、脂質/醣脂代謝紊亂、西尼羅河症候群、澱粉樣變性、粒線體紊亂、異蛋白紊亂，如意義不明的單株丙種球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance；MGUS)或POEMS症候群。個體罹患營養/維生素缺乏症，如維生素B₁₂缺乏症、維生素E缺乏症或銅缺乏症。

【0040】 在本發明之一額外態樣中，在本文所描述之任一方法中，個體罹患自身免疫性周邊多發性神經病變、急性炎性脫髓鞘多發性神經根性神經病變(acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy；AIDP)、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經根性神經病變(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy；CIDP)、多發性血管炎性單神經炎、環境神經病變、特發性神經節炎、肌萎縮性側索硬化、多灶性運動傳導鎖定神經病變或下運動神經元症候群。

【0041】 獲得性神經病變可為一種中毒性神經病變。舉例而言，中毒性神經病變為以下之毒性作用的結果：處方藥物，諸如氯黴素、氯喹啉、秋水仙鹼、二硫龍、依那西普、乙胺丁醇、金、羥基氯喹、硝基呋喃妥因、甲硝唑、司他夫定、紮西他濱、英夫利昔單抗、來氟米特、沙利竇邁；或化學治療劑，諸如順鉑、阿糖胞苷、硼替佐米、多西他賽、來那度胺、米索硝唑(Misondiazole)、奧賽力鉑、紫杉醇、丙卡巴肼、蘇拉明、

沙利竇邁、長春鹼或長春新鹼；或抗酒精藥物，諸如二硫龍；或抗驚厥藥，諸如苯妥英或狄蘭汀；或心臟或血壓藥物，諸如斯他汀、胺碘酮、聯胺胍、普魯卡因胺、哌克昔林；或抗生素，諸如氟喹諾酮、異菸胍、西普樂、左氧氟沙星(Levaquin)、甲硝噻唑、或甲硝唑；或皮膚病狀治療劑，諸如二胺苯砒。中毒性神經病亦可由長期酗酒或維生素B₆毒性引起。

【0042】 在本發明之另一態樣中，在本文所描述之任一方法中，個體為罹患獲得性神經病變之癌症患者。舉例而言，癌症患者發展出與營養缺乏、化療副作用及/或副腫瘤症候群相關之神經病變。

【0043】 在本發明之另一態樣中，在任一方法中，個體為罹患獲得性神經病變之外科手術患者。舉例而言，外科手術患者在經受肥胖症治療手術、多次矯形外科手術或多次「陷入神經」之手術後出現神經病變。

【0044】 在本發明之另一態樣中，在任一方法中，個體罹患遺傳性肌病、神經肌肉疾病、肌肉萎縮、藥物誘導之肌病、肌肉減少症、惡病質、II型肌肉纖維萎縮、遺傳決定之肌肉萎縮症、年齡相關之肌肉萎縮或獲得性自身免疫性原發性肌肉病症。

【0045】 在本發明之另一態樣中，在任一方法中，個體罹患杜興氏肌肉萎縮症、貝克爾肌肉萎縮症、肌強直性肌肉萎縮症、肌聚糖病變(sarcoglycanopathies)、肌強直性營養障礙、艾-德二氏肌肉萎縮症(Emery-Dreifuss muscular dystrophy)、先天性肌肉萎縮症、分區蛋白缺乏先天性肌肉萎縮症、Bethlem肌病、渥里克氏先天性肌肉萎縮症(Ullrich congenital muscular dystrophy)、顏面-肩胛-肱骨肌肉萎縮症(fascioscapulohumeral muscular dystrophy)、脊髓性肌肉萎縮症、脊柱強直肌肉萎縮症、末端肌肉萎縮症、眼咽型肌肉萎縮症、先天性肌肉萎縮症

(MDC)1A、1B、1C及1D；肢帶肌肉萎縮症(LGMD)1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2O及2Q；肌肉眼腦疾病；福山-沃克-華堡症候群(Fukuyama Walker Warburg Syndrome)；肌無力症候群；先天性肌無力；包涵體肌病；包涵體肌炎；皮肌炎；中央核肌病；三好氏肌病(Myoshi Myopathy)；粒線體肌病；線樣肌病；野中肌病；重症肌無力；或多發性肌炎。

【0046】 在一個實施例中，本發明提供治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸的用途，用於製造用於刺激個體肌肉生長之藥物。舉例而言，調配藥物用於肌內投與。

【0047】 在一個例示性實施例中，藥物包括編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸，其中所述核酸在病毒載體中。在相關實施例中，病毒載體為腺相關病毒載體。在各種實施例中，核酸以操作方式連接至肌肉特異性啟動子，諸如三肌特異性肌酸激酶啟動子。在各種實施例中，核酸包括SEQ ID NO: 1。

【0048】 本發明亦提供編碼NT-3多肽之核酸在製造用於治療人類個體之肌肉消耗病症或神經病變之藥物中的用途，其中：a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同之核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列之核酸序列，d)編碼NT-3多肽之核酸為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV處於引起低濃度NT-3多肽之持續

表現的劑量，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg，h)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0049】本發明亦提供一定劑量之編碼NT-3多肽之核酸在製造用於在人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長之藥物中的用途，其中：a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同之核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列之核酸序列，d)編碼NT-3多肽之核酸為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV處於引起低濃度

NT-3多肽之持續表現的劑量，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg，h)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，藥物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0050】舉例而言，本發明之任一藥物可包括配製用於使用病毒載體(諸如腺相關病毒載體)投與之核酸。此外，本發明之任一藥物可包括以操作方式連接至肌肉特異性啟動子之核酸，諸如肌肉特異性啟動子為肌特異性肌酸激酶(MCK)啟動子。在另一實施例中，本發明之任一藥物中，scAAV1.tMCK.NTF3包括SEQ ID NO: 11中列出之NT-3基因卡匣。在一個實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於治療有需要之人類個體的肌肉消耗病症或神經病變之藥物中的用

途，其中所述藥物引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0051】在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於刺激有需要之人類個體的肌肉生長之藥物中的用途，其中所述劑量引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0052】在一個實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於治療有需要之人類個體的肌肉消耗病症或神經病變之藥物中的用途，其中所述藥物調配用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg之rAAV劑量。

【0053】在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於治療有需要之人類個體的肌肉消耗病症或神經病變之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg之rAAV劑量。

【0054】在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於治療有需要之人類個體的肌肉消耗病症或神經病變之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 2×10^{13} vg/ml之rAAV濃度。舉例而言，藥物藉由每塊肌肉分別進行3至6次注射投與(例如每個注射體積將為0.5 ml至1 ml)至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌，其中總共5 mL至14

mL之載體將投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0055】 在一個例示性實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於治療有需要之人類個體的肌肉萎縮症或神經病變之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 1×10^{13} vg/ml之rAAV劑量，使用每塊肌肉3至6次注射分別投與(每個注射體積將為0.5 ml至1 ml)。向每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與總共5 mL至14 mL之載體。

【0056】 在一個實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg之rAAV劑量。

【0057】 在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途徑，且其中所述藥物包括約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg之rAAV劑量。

【0058】 在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長之藥物中的用途，其中所述藥物配製用於肌內投與途

徑，且其中藥物包括約 2×10^{13} vg/ml之濃度的rAAV，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg)的投與。在一些實施例中，分別使用每塊肌肉3至6次注射，例如每個注射體積為0.5 ml至1 ml向每條腿中之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與藥物。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0059】 在一個例示性實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在製備用於在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長之藥物中的用途，其中所述藥物用於肌肉內投與途徑，且其中藥物包括約 2×10^{13} vg/ml之rAAV濃度，使用每塊肌肉分別3至6次注射(每個注射體積為0.5 ml至1 ml)，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg)投與。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0060】 在本發明之任一用途中，藥物調配用於肌肉內雙側注射至腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。此外，在本發明的任何用途中，藥物使得個體之肌肉力量在上肢或下肢中得到改善，且例如肌肉力量之改善按CMT兒科量表(CMTPeds)綜合評分降低量測。此外，在本發明之任一用途中，藥物使得歷經兩年時段疾病進展降低或停止。疾病進展由CMTPedS量測。

【0061】 在本發明之一個態樣中，在本發明之任一用途中，個體罹患遺傳性神經病變，諸如夏馬杜三氏(CMT)神經病變，例如CMT1A、CMT2K、CMT4A、CMTR1A，及由體染色體隱性遺傳變異體、或體染色體顯性遺傳變異體或X性聯遺傳變異體引起之軸突及脫髓鞘神經病變。遺傳性神經病變可由表1中所提供之任何遺傳變異體引起。此外，遺傳性神

經病變可為甲狀腺素轉運蛋白澱粉樣蛋白神經病變，其由諸如以下遺傳變異體之甲狀腺素轉運蛋白(TTR)基因突變引起：Val30Met、Ile107Val及Ser77Tyr。

【0062】 在本發明之另一態樣中，在本發明之任一方法中，個體罹患具有軸突喪失及/或神經再生受損之獲得性神經病變。獲得性神經病變為引起神經病變之任何病症或疾病引起的周邊神經病變。舉例而言，個體罹患由以下所引起之周邊神經病變：糖尿病、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、甲狀腺病症(如甲狀腺功能低下)、低血糖症、尿毒症、腎機能不全、肝功能障礙、肝衰竭、紅血球增多症、結締組織病症、癌症、萊姆病、乳糜瀉、麻風病、卟啉症、休格倫氏症候群、脊髓灰白質炎、肢端肥大症、脂質/醣脂代謝紊亂、西尼羅河症候群、澱粉樣變性、粒線體紊亂、異蛋白紊亂，如意義不明的單株丙種球蛋白病(MGUS)或POEMS症候群。個體可罹患營養/維生素缺乏症，如維生素B₁₂缺乏症、維生素E缺乏症或銅缺乏症。

【0063】 此外，在本發明之任一用途中，個體罹患自身免疫性周邊多發性神經病變、急性炎性脫髓鞘多發性神經根性神經病變(AIDP)、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經根性神經病變(CIDP)、多發性血管炎性單神經炎、環境神經病變、特發性神經節炎、肌萎縮性側索硬化、多灶性運動傳導鎖定神經病變或下運動神經元症候群。

【0064】 獲得性神經病變為一種中毒性神經病變。舉例而言，中毒性神經病變為以下之毒性作用的結果：處方藥物，諸如氯黴素、氯喹啉、秋水仙鹼、二硫龍、依那西普、乙胺丁醇、金、羥基氯喹、硝基呋喃妥因、甲硝唑、司他夫定、紮西他濱、英夫利昔單抗、來氟米特、沙利竇

邁；或化學治療劑，諸如順鉑、阿糖胞苷、硼替佐米、多西他賽、來那度胺、米索硝唑、奧賽力鉑、紫杉醇、丙卡巴肼、蘇拉明、沙利竇邁、長春鹼或長春新鹼；或抗酒精藥物，諸如二硫龍；或抗驚厥藥，諸如苯妥英或狄蘭汀；或心臟或血壓藥物，諸如斯他汀、胺碘酮、聯胺肼、普魯卡因胺、哌克昔林；或抗生素，諸如氟喹諾酮、異菸肼、西普樂、左氧氟沙星、甲硝噻唑、或甲硝唑；或皮膚病狀治療劑，諸如二胺苯砒。中毒性神經病變可由長期酗酒或維生素B₆毒性引起。

【0065】 在另一態樣中，在本發明之任一用途中，個體為罹患獲得性神經病變之癌症患者。舉例而言，癌症患者發展出與營養缺乏、化療副作用及/或副腫瘤症候群相關之神經病變。

【0066】 在又一態樣中，在本發明之任一用途中，個體為罹患獲得性神經病變之外科手術患者。舉例而言，外科手術患者在經受肥胖症治療手術、多次矯形外科手術或多次「陷入神經」之手術後出現神經病變。

【0067】 在另一態樣中，在本發明之任一用途中，個體罹患遺傳性肌病、神經肌肉疾病、肌肉萎縮、藥物誘導之肌病、肌肉減少症、惡病質、II型肌肉纖維萎縮、遺傳決定之肌肉萎縮症、年齡相關之肌肉萎縮或獲得性自身免疫性原發性肌肉病症。

【0068】 在另一態樣中，在本發明之任一用途中，個體罹患杜興氏肌肉萎縮症、貝克爾肌肉萎縮症、肌強直性肌肉萎縮症、肌聚糖病變、肌強直性營養障礙、艾-德二氏肌肉萎縮症、先天性肌肉萎縮症、分區蛋白缺乏先天性肌肉萎縮症、Bethlem肌病、渥里克氏先天性肌肉萎縮症、顏面-肩胛-肱骨肌肉萎縮症、脊髓性肌肉萎縮症、脊柱強直肌肉萎縮症、末端肌肉萎縮症、眼咽型肌肉萎縮症、先天性肌肉萎縮症(MDC)1A、1B、

1C及1D；肢帶肌肉萎縮症(LGMD)1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2O及2Q；肌肉眼腦疾病；福山-沃克-華堡症候群；肌無力症候群；先天性肌無力；包涵體肌病；包涵體肌炎；皮肌炎；中央核肌病；三好氏肌病；粒線體肌病；線樣肌病；野中肌病；重症肌無力；或多發性肌炎。

【0069】 在一個實施例中，本發明提供組合物，其包括治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸的用途，用於刺激個體肌肉生長。舉例而言，調配本發明之組合物用於肌內投與。

【0070】 在例示性實施例中，組合物包括編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸。在相關實施例中，核酸在病毒載體中，病毒載體諸如腺相關病毒載體。在各種實施例中，核酸以操作方式連接至肌肉特異性啟動子，諸如三肌特異性肌酸激酶啟動子。在各種實施例中，組合物包括含有SEQ ID NO: 1之核苷酸序列的核酸。

【0071】 本發明亦提供包括編碼NT-3多肽之核酸的組合物，其用於治療人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其中：a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同之核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列之核酸序列，d)編碼NT-3多肽之核酸為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV以引起低濃度NT-3多肽之持續表現的劑量投與，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之

劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg，h)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0072】 在另一實施例中，本發明提供包括編碼NT-3多肽之核酸的組合物，其用於在人類個體中改善肌肉強度或刺激肌肉生長，其中a)核酸包括與SEQ ID NO: 1之核苷酸序列90%相同之核苷酸序列，b)核酸包括SEQ ID NO: 1之核苷酸序列；c)核酸包括編碼與SEQ ID NO: 2至少90%相同或與SEQ ID NO: 2 100%相同之胺基酸序列之核酸序列，d)編碼NT-3多肽之核酸為本發明之核酸中之任一者，e)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，且rAAV處於引起低濃度NT-3多肽之持續表現的劑量，f)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之

劑量為約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg，g)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg，h)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 2×10^{12} vg/kg，i)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 4×10^{12} vg/kg，j)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內投與途徑，且rAAV之劑量為約 6×10^{12} vg/kg，k)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用每塊肌肉3至6次約0.5 ml至1 ml之注射投與，或l)編碼NT-3多肽之核酸為重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3，組合物調配用於肌內注射，濃度為約 2×10^{13} vg/ml，使用總體積為約5 ml至14 ml之多次注射投與。

【0073】舉例而言，本發明之任一組合物可包括配製用於使用病毒載體(諸如腺相關病毒載體)投與之核酸。此外，本發明的任何組合物可包括以操作方式連接至肌肉特異性啟動子之核酸，諸如肌肉特異性啟動子為肌特異性肌酸激酶(MCK)啟動子。在另一實施例中，在任何組合物或本發明中，scAAV1.tMCK.NTF3包括SEQ ID NO: 11中列出之NT-3基因卡匣。

【0074】在一個實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0075】 在另一實施例中，本發明提供重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3在有需要之人類個體中刺激肌肉生長的用途，其引起低濃度之NT-3蛋白的持續表現。

【0076】 在一個實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其中組合物調配用於肌肉投與，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg。

【0077】 在另一實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其中組合物調配用於肌肉投與，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg。

【0078】 在另一實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其中組合物調配用於肌肉投與，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{13} vg/ml，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg)投與。在一些實施例中，分別使用每塊肌肉3至6次注射(每一注射體積為0.5 ml至1 ml)向每條腿中之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與組合物。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0079】 在一個例示性實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於治療有需要之人類個體之肌肉消耗病症或神經病變，其中組合物調配用於肌肉內投與，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{13} vg/ml，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg，使用3至6次注射，每次注射體積將為0.5 ml至1 ml)投與。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0080】 在一個實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於改善人類個體之肌肉強度，其中所述組合物調配用於肌肉內投與，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg至約 7×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg至約 6.5×10^{12} vg/kg或約 2×10^{12} vg/kg至約 6×10^{12} vg/kg。

【0081】 在另一實施例中，本發明提供包含一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於改善人類個體之肌肉力量，其中所述組合物調配用於肌肉內投與，且rAAV之投與劑量為約 1.0×10^{12} vg/kg、或約 1.5×10^{12} vg/kg、或約 2×10^{12} vg/kg、或約 3×10^{12} vg/kg、或約 4×10^{12} vg/kg、或約 5×10^{12} vg/kg、或約 6×10^{12} vg/kg、或約 7×10^{12} vg/kg、或約 8×10^{12} vg/kg、或約 9×10^{12} vg/kg或約 1×10^{13} vg/kg。

【0082】 在另一實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長，其中所述組合物調配用於肌肉內投與，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{13} vg/ml以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg)投與。在一些實施例中，分別使用每塊肌肉3至6

次注射(每次注射體積將為0.5至1ml)向每條腿中之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌投與組合物。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0083】 在一個例示性實施例中，本發明提供包括一定劑量之重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1.tMCK.NTF3的組合物，其用於在有需要之人類個體中改善肌肉力量或刺激肌肉生長，其中所述組合物調配用於肌肉內投與，且rAAV之投與劑量為約 2×10^{13} vg / ml，以低劑量(每患者 2×10^{12} vg/kg)及高劑量(每患者 6×10^{12} vg/kg，使用每塊肌肉分別3至6次注射，每次注射體積將為0.5 ml至1 ml)投與。將總共5 mL至14 mL之載體投與至每條腿之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。

【0084】 在本發明之任一組合物中，scAAV1.tMCK.NTF3之投與途徑為肌肉內雙側注射至腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前肌。此外，在本發明之任一組合物中，scAAV1.tMCK.NTF3之投與使得個體之肌肉力量在上肢或下肢中得到改善，且例如肌肉力量之改善按CMT兒科量表(CMTPedS)綜合評分降低量測。此外，本發明之任一組合物，組合物之投與使得歷經兩年時段疾病進展降低或停止。疾病進展由CMTPedS量測。CMTPedS為11項量表，包括功能靈活性測試、九孔釘測試(Nine-Hole Peg Test；9HPT)、手握、足蹠屈及使用手持式測力之足背屈強度、針刺及振動感覺、Bruininks Oseretsky測試-平衡評估、步態評估、跳遠及六分鐘步行測試(6MWT)。功效定義為基因轉移後2年停止藉由此量表量測之能力下降。

【0085】 在本發明之態樣中，在本發明之任一組合物中，個體罹患遺傳性神經病變，諸如夏馬杜三氏(CMT)神經病變，例如CMT1A、

CMT2K、CMT4A、CMTRIA，及由體染色體隱性遺傳變異體、或體染色體顯性遺傳變異體或X性聯遺傳變異體引起之軸突及脫髓鞘神經病變。遺傳性神經病變可由表1中所提供之任何遺傳變異體引起。此外，遺傳性神經病變可為甲狀腺素轉運蛋白澱粉樣蛋白神經病變，其由諸如以下遺傳變異體之甲狀腺素轉運蛋白(TTR)基因突變引起：Val30Met、Ile107Val及Ser77Tyr。

【0086】 在本發明之另一態樣中，在任一組合物中，個體罹患具有軸突喪失及/或神經再生受損之獲得性神經病變。獲得性神經病變為引起神經病變之任何病症或疾病引起的周邊神經病變。舉例而言，個體罹患由以下所引起之周邊神經病變：糖尿病、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、甲狀腺病症(如甲狀腺功能低下)、低血糖症、尿毒症、腎機能不全、肝功能障礙、肝衰竭、紅血球增多症、結締組織病症、癌症、萊姆病、乳糜瀉、麻風病、卟啉症、休格倫氏症候群、脊髓灰白質炎、肢端肥大症、脂質/醣脂代謝紊亂、西尼羅河症候群、澱粉樣變性、粒線體紊亂、異蛋白紊亂，如意義不明的單株丙種球蛋白病(MGUS)或POEMS症候群。個體罹患營養/維生素缺乏症，如維生素B₁₂缺乏症、維生素E缺乏症或銅缺乏症。

【0087】 此外，在本發明之任一組合物中，個體罹患自身免疫性周邊多發性神經病變、急性炎性脫髓鞘多發性神經根性神經病變(AIDP)、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經根性神經病變(CIDP)、多發性血管炎性單神經炎、環境神經病變、特發性神經節炎、肌萎縮性側索硬化、多灶性運動傳導鎖定神經病變或下運動神經元症候群。

【0088】 在本發明的任一組合物中，獲得性神經病變為中毒性神經

病變。舉例而言，中毒性神經病變為以下之毒性作用的結果：處方藥物，諸如氯黴素、氯喹啉、秋水仙鹼、二硫龍、依那西普、乙胺丁醇、金、羥基氯喹、硝基呋喃妥因、甲硝唑、司他夫定、紮西他濱、英夫利昔單抗、來氟米特、沙利竇邁；或化學治療劑，諸如順鉑、阿糖胞苷、硼替佐米、多西他賽、來那度胺、米索硝唑、奧賽力鉑、紫杉醇、丙卡巴肼、蘇拉明、沙利竇邁、長春鹼或長春新鹼；或抗酒精藥物，諸如二硫龍；或抗驚厥藥，諸如苯妥英或狄蘭汀；或心臟或血壓藥物，諸如斯他汀、胺碘酮、聯胺肼、普魯卡因胺、哌克昔林；或抗生素，諸如氟喹諾酮、異菸肼、西普樂、左氧氟沙星、甲硝噻唑、或甲硝唑；及皮膚病狀治療劑，諸如二胺苯酚。中毒性神經病變亦由長期酗酒或維生素B₆毒性引起。

【0089】 在另一態樣中，在本發明之任一組合物中，個體為罹患獲得性神經病變之癌症患者。舉例而言，癌症患者發展出與營養缺乏、化療副作用及/或副腫瘤症候群相關之神經病變。

【0090】 在又一態樣中，在本發明之任一組合物中，個體為罹患獲得性神經病變之外科手術患者。舉例而言，外科手術患者在經受肥胖症治療手術、多次矯形外科手術或多次「陷入神經」之手術後出現神經病變。

【0091】 在另一態樣中，在任一者中，個體罹患遺傳性肌病、神經肌肉疾病、肌肉萎縮、藥物誘導之肌病、肌肉減少症、惡病質、II型肌肉纖維萎縮、遺傳決定之肌肉萎縮症、年齡相關之肌肉萎縮或獲得性自身免疫性原發性肌肉病症。

【0092】 在另一態樣中，在本發明之任一組合物中，個體罹患杜興氏肌肉萎縮症、貝克爾肌肉萎縮症、肌強直性肌肉萎縮症、肌聚糖病變、肌強直性營養障礙、艾-德二氏肌肉萎縮症、先天性肌肉萎縮症、分區蛋

白缺乏先天性肌肉萎縮症、Bethlem肌病、渥里克氏先天性肌肉萎縮症、顏面-肩胛-肱骨肌肉萎縮症、脊髓性肌肉萎縮症、脊柱強直肌肉萎縮症、末端肌肉萎縮症、眼咽型肌肉萎縮症、先天性肌肉萎縮症(MDC)1A、1B、1C及1D；肢帶肌肉萎縮症(LGMD)1A、1B、1C、1D、1E、1F、1G、1H、2A、2B、2C、2D、2E、2F、2G、2H、2I、2J、2K、2L、2M、2N、2O及2Q；肌肉眼腦疾病；福山-沃克-華堡症候群；肌無力症候群；先天性肌無力；包涵體肌病；包涵體肌炎；皮肌炎；中央核肌病；三好氏肌病；粒線體肌病；線樣肌病；野中肌病；重症肌無力；或多發性肌炎。

【0093】 在本發明之另一態樣中，在任一組合物中，個體罹患創傷性神經損傷，諸如由壓迫、二次擠壓或橫切引起之神經損傷。

【圖式簡單說明】

【0094】 藉由參考以下圖式可更容易地理解本發明，其中：

【0095】 圖1A至圖1C提供展示在TrJ肌肉中AAV1.NT-3誘導之纖維類型重塑之圖及圖像。在注射後16週，經AAV1.tMCK.NT-3治療之Trembler J(TrJ)(圖1A)及未治療(TrJ-PBS)腓腸肌(圖1B)之SDH染色組織切片的代表性圖像。展示慢收縮氧化(STO，箭頭)、快收縮氧化(FTO，箭頭)及快收縮糖酵解(FTG，星號)(圖1B)。氧化性纖維在a中減少。在TrJ-PBS肌肉(圖1B)中，存在數量增加之所有纖維類型之小STO纖維及角纖維以及與神經原性變化相容之小型分組。對於a、b，比例尺= 30公克。使用NT-3基因療法將TrJ肌肉中之纖維類型自STO轉換為FTO/FTG纖維(圖1C)。兩個治療組中STO之平均百分比(來源於每組中n = 3-5隻小鼠)與野生型(WT)肌肉沒有顯著差異，表明在TrJ神經源性肌肉中NT-3之纖維類型

分佈向正常化之變化。

【0096】 圖2A至圖2C提供展示AAV1 .NT3治療對mTOR信號傳導及代謝標誌物之影響的圖及圖像。代表性西方墨點法圖像及注射後16週對TrJ(圖2A)及野生型(WT)(圖2B)腓腸肌中之mTOR靶標、二氧磷基(P)-4EBP1(Thr37/46)及P-S6(Ser235/236)之分析。圖展示標準化為GAPDH之蛋白質的磷酸化形式之表現量。考馬斯藍染色膜代表相等之凝膠負載。誤差條為 $\pm$ SEM；各組中n=5-6，*P <0.05，非配對t檢驗。(圖2C)qPCR對糖酵解(1-1K1及PK1)及氧化調節子(PGC1 α)之相對表現；GAPDH用作管家基因。誤差條為 $\pm$ SEM；各組n=5-6，*P <0.05，單向Anova，然後進行Tukey多重比較檢驗。

【0097】 圖3A至圖3D提供展示NT-3對肌管之直接作用的圖及圖像。(圖3A)代表性西方墨點法圖像及在與重組人NT-3(100 ng/ml)或PBS(對照)一起培育30分鐘之肌管中對Akt/mTOR途徑、二氧磷基(P)-Akt(Ser473)、P-4EBP1(Thr37/46)及P-S6(Ser235/236)的分析。將磷酸化蛋白質帶之密度值標準化為GAPDH，且顯示為對照組之百分比。考馬斯藍染色膜代表相等之凝膠負載。將肌管與NT-3(100 ng/ml)一起培育48小時，然後藉由qPCR檢測代謝標誌物(PGC1 α 、HK1、PK1)之相對mRNA表現(圖3B)，且細胞培養基中之葡萄糖消耗與乳酸產生之比較藉由ELISA檢測(圖3C)。(圖3D)在NT-3(100 ng/ml)治療48小時後成肌細胞與肌管中成肌素及NT-3受體、P75NTR及TrkC的相對表現量。GAPDH在分析中作為管家基因。展示之結果為來自至少三次獨立實驗，*P <0.05，Student配對t-檢驗之平均值 $\pm$ SEM。

【0098】 圖4提供展示經治療及未經治療之小鼠中NT-3之血清含量

的圖。在終點時，自每隻小鼠收集血清，且藉由ELISA檢測循環NT-3含量。

【0099】圖5展示TrJ及WT腓腸肌中P75^{NTR}及TrkC之相對mRNA表現。GAPDH在分析中作為管家基因。展示之結果為來自至少三次獨立實驗，*P < 0.05，Student t檢驗之平均值±SEM。

【0100】圖6提供構建體AAV.tMCK.NTF3(SEQ ID NO: 11)之示意圖。載體含有肌肉特異性tMCK啟動子(SEQ ID NO: 3)、嵌合內含子(SEQ ID NO: 5)、共有Kozak序列(SEQ ID NO: 6)、NTF3 cDNA(SEQ ID No: 1)及多腺苷酸化信號(SEQ ID NO: 7)。

【0101】圖7提供限制圖及ORF分析pAAV.tMCK.NTF3。

【0102】圖8A至圖8B表示在人類個體中IM注射AAV.tMCK.NTF3之位置。

【0103】圖9提供AAV.tMCK.NTF3之核苷酸序列(SEQ ID NO: 11)。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0104】本申請案主張2017年10月20日申請之美國臨時專利申請第62/574828號、2018年5月25日申請之美國臨時專利申請第62/676687號及2018年10月4日申請之美國臨時專利申請第62/741,335號之優先權，所述申請之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

美國政府利益聲明

【0105】本發明係根據美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)授予之授權號NS105986及U01-NS066914，在政府支持下產生。

在本發明中政府具有某些權利。

序列表以引用之方式併入

【0106】 本申請案含有電腦可讀形式之序列表(檔案名：53122A_Seqlisting.txt；17,133位元組-ASCII正文檔案；創建於2018年10月18日)作為揭示內容之獨立部分，其以全文引用之方式併入本文中。

【0107】 研究AAV.NT-3治療誘導之TrJ肌肉纖維尺寸增加，以便確定此增加是否僅僅為神經再支配之結果，或NT-3是否對獨立於神經再生之肌肉蛋白質合成具有直接影響，且因此能夠增加肌肉纖維尺寸。

【0108】 本文揭示NT-3之新穎作用；其直接影響神經源性肌肉中蛋白質合成及代謝重塑之能力。

【0109】 本文中所描述之研究首先評估基因注射後16週AAV.NT-3基因療法對TrJ肌肉氧化狀態之影響，且發現肌肉纖維尺寸增加與肌肉纖維之氧化狀態朝WT中所見之纖維類型比率之標準化的變化有關。治療導致慢收縮氧化(STO)纖維之百分比降低，而快收縮氧化及糖酵解(FTO及FTG)纖維群增加，反映未經治療之TrJ肌肉中發現之模式的逆轉。對於FTG纖維群，NT-3誘導之纖維尺寸增加最為顯著。然後研究哺乳動物雷帕黴素靶蛋白複合物1(mTORC1)是否在NT-3誘導之肌肉蛋白質合成中起作用，尤其強調糖酵解纖維之優先輻向生長。mTORC1經由轉譯調節因子的真核轉譯起始因子4E結合蛋白1(4E-BP1)及S6激酶1(S6K1)之磷酸化來調節轉譯及核糖體生物發生。Laplane M, Sabatini D., 《細胞(Cell)》, 149(2):274-293 (2012)。此外，mTORC1與細胞糖酵解之激活有關，其涉及糖酵解酶或其轉錄調節子的翻譯增加。Duvel等人, 《分子細胞(Molecular cell)》, 39(2):171-183 (2010)。發現TrJ肌肉中之組織化學變

化伴有作為mTORC1激活證據之4E-BP1及S6蛋白(S6P)的磷酸化水平增加。同時，粒線體生物發生調節劑(過氧化物酶體增殖物激活受體 γ 共激活子1 α ，PGC1 α)之表現量及糖酵解之標誌物(己糖激酶-1，HK1及丙酮酸激酶1，PK1)在TrJ肌肉中增加。此等變化在經AAV.NT-3治療之WT肌肉中不顯著。此外，活體外研究表明，重組NT-3可在表現肌管之TrkC中直接誘導Akt/mTOR路徑激活，但在成肌細胞中不能。此外，成肌素表現量在肌管中顯著高，而p75NTR表現與成肌細胞相比下調，表明NT-3誘導之成肌細胞分化與mTORC1活化相關。

【0110】 本文中所描述之研究結果對NT-3之潛在用途具有多種影響，不僅用於在對神經及肌肉都有益處之情況下治療神經病變，亦用於治療肌肉消耗病狀，包含衰老、癌症惡病質或II型肌肉纖維萎縮以及與再生的輻向生長受損階段相關之遺傳或獲得性自身免疫性原發性肌肉病症，其中可能涉及mTORC1信號傳導之干擾及缺陷的粒線體生物發生。

【0111】 本發明涉及刺激個體之肌肉生長的方法。方法包含向有需要之個體投與治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸。需要刺激肌肉生長之個體包含具有肌肉萎縮症或肌肉萎縮之個體。

【0112】 本發明提供抑制肌肉消耗的方法，包括投與AAV載體以遞送編碼神經營養蛋白-3(NT-3)之 $NTF3$ 基因。在一個實施例中，本發明提供治療夏馬杜三氏1A型(CMT1A)之基因療法方法，其中在肌肉特異性tMCK啟動子控制下使用自互補腺相關病毒(scAAV)1型將編碼NT-3之 $NTF3$ 基因遞送至個體。在另一實施例中，本發明提供增加有需要之個體(例如診斷有或患有肌肉消耗病症，如CMT之個體)之肌肉力量的基因療法

方法。

【0113】 臨床前研究表明，將構建體 AAV1.tMCK.NTF3 遞送至 trembler J 小鼠⁹(Tr^J)(一種天然存在之 CMT1 小鼠模型)之腓腸肌，改善神經再生、髓鞘形成、有髓鞘纖維密度、坐骨神經複合肌動作電位幅度及轉桿測試之功能性能及後肢握力(參見實例3)。

【0114】 如本文中所使用，術語「治療 (treatment)」、「治療 (treating)」及其類似術語係指獲得所需的藥理學或生理學效果。就部分或完全治癒疾病或可歸因於疾病之副作用而言，效果可為治療性的。如本文中所使用，「治療」涵蓋哺乳動物，尤其人之疾病的任何治療，且可包含抑制疾病或病狀，亦即，阻止其發展；且緩解疾病，亦即，使疾病消退。

【0115】 如本文中所使用，預防係指為罹患諸如神經病變、脫髓鞘多發性神經病變、肌肉消耗病症或萎縮之病狀或疾病風險之個體提供益處的任何行為。

【0116】 如本文中所使用，「醫藥學上可接受」意謂在考慮疾病之嚴重程度及治療之必要性，沒有過度有害之副作用的情況下化合物或組合物適於向個體投與用於本文中所描述之方法。

【0117】 術語「治療學上有效」及「藥理學上有效」意欲限定將實現在疾病嚴重性及發病頻率中之改善目標之藥劑的量。治療之有效性可藉由評估個體回應於 NT-3 之投與的症狀減輕量測。

【0118】 術語「有效片段」係指編碼 NT-3 多肽之功能片段之多核苷酸序列的一部分。術語「有效片段」亦指保留 NT-3 生長因子活性之 NT-3 多肽胺基酸序列的一部分。例示性 NT-3 生長因子活動包含支持現有神經

元之存活及分化，且誘導及支持新神經元及突觸之生長及分化。此外，NT-3活動包含刺激肌肉生長及肌肉功能。

【0119】 如本文中所使用，術語「診斷」可涵蓋確定個體將罹患疾病之或然性，或個體內疾病之存在或性質。如本文中所使用，術語診斷亦涵蓋確定疾病或疾病發作之嚴重性及可能結果或恢復之前景，其一般被稱為預後。「診斷」亦可涵蓋在合理療法之背景下的診斷，其中所述診斷指導療法，包括療法之初始選擇、療法之改變(例如劑量或給藥方案之調節)及類似者。

【0120】 如本文中所使用，「個體」可為任何動物，且亦可稱為患者。較佳個體為脊椎動物，且更佳個體為哺乳動物，諸如馴養之農場動物(例如牛、馬、豬)或寵物(例如狗、貓)。在一些實施例中，個體為人類。

【0121】 術語「多核苷酸」或「核酸分子」係指長度為至少10個鹼基之聚合形式的核苷酸。所述術語包含DNA分子(例如eDNA或基因組或合成DNA)及RNA分子(例如mRNA或合成RNA)，以及含有非天然核苷酸類似物、非天然核苷間鍵或兩者之DNA或RNA的類似物。核酸可處於任何拓撲構形。舉例而言，核酸可為單股、雙股、三股、四股、部分雙股、分支、髮夾狀、環狀或呈掛鎖構形。

【0122】 如本文中所使用之術語「基因」係指可指導酶或其他多肽分子之合成的核苷酸序列(例如可包括編碼序列，例如編碼多肽之連續開放閱讀框(ORF))或可本身在生物體中起作用。如本文所定義，生物體中之基因可聚集在操縱子內，其中操縱子藉由基因間DNA與其他基因及/或操縱子分開。含於操縱子內之個別基因可在無個別基因之間的基因間DNA之情況下重疊。

【0123】如本文中所使用，術語「AAV」為腺相關病毒之標準縮寫。腺相關病毒為僅在某些功能由共感染輔助病毒提供之細胞中生長之單股DNA小病毒。當前存在十三種已表徵之AAV之血清型。AAV之總體資訊及綜述可發現於例如Carter，1989，《小病毒手冊(Handbook of Parvoviruses)》，第1卷，第169-228頁，及Berns，1990，《病毒學(Virology)》，第1743-1764頁，Raven Press，(紐約)中。然而，完全預期此等相同原理將適用於其他AAV血清型，因為熟知各種血清型在結構上及功能上相當緊密相關，甚至在基因層面上亦如此。(參見例如Blacklowe，1988，第165-174頁《細小病毒及人類疾病(Parvoviruses and Human Disease)》，J.R.Pattison編；及Rose，《綜合病毒學(Comprehensive Virology)》3:1-61 (1974))。舉例而言，所有AAV血清型表觀上展現極類似之由同源rep基因介導之複製特性；並且所有皆帶有三種相關蛋白殼蛋白質，諸如AAV2中表現之彼等者。相關性程度藉由沿基因組長度在血清型之間展現廣泛交叉雜交之異雙螺旋分析；及對應於「反向末端重複序列(ITR)」之末端處之類似自結合片段之存在進一步表明。類似感染性模式亦表明各血清型中之複製功能受到類似調節控制。

【0124】術語「載體」或「表現載體」係指包括編碼能夠轉錄之RNA之核酸的任何類型之基因構築體。表現載體可含有各種控制序列，結構基因(例如所關注的基因)，及亦提供其他功能之核酸序列。

【0125】「載體」意謂通常衍生自質體或噬菌體之DNA分子，其中可插入或選殖DNA片段。重組型載體將含有一或多個獨特限制位點，且可能能夠在所界之宿主或載體生物體中自主複製，使得選殖序列為可再現的。載體含有可操作地連接於基因或編碼區之啟動子，使得在轉染至受體

細胞中時表現RNA。

【0126】如本文所用之「AAV載體」係指包括一或多種所關注之聚核苷酸(或轉殖基因)之載體，所述聚核苷酸經由AAV末端重複序列(ITR)側接。此類AAV載體可複製及包裝至已經編碼及表現rep及cap基因產物之載體轉染的宿主細胞中之感染性病毒粒子(若存在)中。

【0127】「AAV病毒粒子(AAV virion/AAV viral particle)」或「AAV載體粒子」係指由至少一個AAV衣殼蛋白及衣殼化聚核苷酸AAV載體組成之病毒粒子。若粒子包含異源聚核苷酸(亦即除野生型AAV基因組，如待傳遞至哺乳動物細胞之轉殖基因以外的聚核苷酸)，則其通常稱為「AAV載體粒子」或簡稱為「AAV載體」。因此，AAV載體粒子之產生必定包含AAV載體之產生，因此載體含於AAV載體粒子內。

【0128】如本文中所使用，術語「約」係指與基本值之 $\pm 10\%$ 偏差。

【0129】除非另外規定，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之普通技術人員通常所理解的相同的含義。

周邊神經病變之基因療法

【0130】在一個態樣中，本發明提供使用基因療法治療患有肌肉萎縮之個體的方法。

【0131】可用於遞送治療性核酸之載體包含病毒及非病毒載體。可使用之適合載體包含腺病毒、腺相關病毒、反轉錄病毒、慢病毒、HSV(單純疱疹病毒)及質體。單純疱疹病毒載體之優點為其對感覺神經元之天然趨向性。然而，腺病毒相關病毒載體為最風行的，因為其具有低插入誘變及免疫原性之風險、其缺乏內源病毒基因及其在高效價下產生之能

力。Kantor等人評論各種基因轉移至中樞神經系統之方法，而Goins等人描述用於治療慢性周邊神經系統疼痛之基因療法的方法。參見Kantor等人，《遺傳學進展(Adv Genet.)》87，125-197 (2014)，及Goins等人，《神經生物學疾病(Neurobiol.Dis.)》48(2)，255-270 (2012)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。特定言之，已報導使用各種病毒載體成功地將基因遞送至許旺細胞(周邊神經之駐留神經膠質細胞)。Mason等人，《當前基因療法(Curr.Gene Ther.)》11，75-89 (2011)。若載體在病毒載體中且載體已被包裝，則病毒粒子可用於感染細胞。若使用裸DNA，則可使用適於特定宿主細胞之轉染或轉化程序。利用聚合物、脂質體或奈米球之裸DNA製劑可用於基因遞送。核酸可以提供足夠有效之遞送級別的任何所需之形式投與，包含以病毒粒子形式、以脂質體形式、以奈米顆粒形式及與聚合物複合。

【0132】編碼表現減少周邊神經病變之基因的核酸(例如cDNA或轉殖基因)可選殖至具有諸如啟動子(組成型或可調節的)之調節元件的表現卡匣中以驅動轉殖基因表現及核酸下游之多腺苷酸化序列。舉例而言，可使用1)特異於身體組織或區；2)組成型；及/或3)可誘導/可調節之調節元件。

【0133】在一些實施例中，使用肌肉特異性調節元件。肌肉特異性調節元件包含肌肉特異性啟動子，包含哺乳動物肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子、哺乳動物結蛋白啟動子、哺乳動物肌鈣蛋白I(TNNI2)啟動子或哺乳動物骨骼 α -肌動蛋白(ASKA)啟動子。適用於本發明之肌肉特異性增強子選自由以下組成之群：哺乳動物MCK增強子、哺乳動物DES增強子及脊椎動物肌鈣蛋白I IRE(TNI IRE，下文中稱為FIRE)增強子。此等肌肉特

異性增強子元件中之一或多種可與本發明之肌肉特異性啟動子組合使用，以提供組織特異性調節元件。

【0134】 用於藉由基因療法治療肌肉萎縮之較佳載體為AAV。AAV介導之基因遞送已成為神經病症之臨床前及臨床研究之有效且安全的工具。Ojala等人，《神經科學家(Neuroscientist)》，21(1):84-98 (2015)。目前，AAV為用於神經疾病臨床試驗之使用最廣泛的載體，且自臨床試驗中未報導與此載體之使用相關的副作用：腺相關病毒為來自細小病毒科之非致命性依賴病毒，需要來自其他病毒，諸如腺病毒或單純疱疹病毒之輔助功能，以實現其生命週期。野生型(WT)AAV之特徵在於單股DNA(ssDNA)基因組，在兩端具有約5kb由蛋白殼包圍之反向末端重複序列(ITR)。

【0135】 用於諸如活體內基因療法及活體外研究及/或轉殖基因產物之生產的應用，用於向細胞遞送轉殖基因之腺病毒載體通常藉由早期區1(E1)基因之缺失來源於腺病毒(Berkner, K.L., 《微生物學及免疫學當前主題(Curr.Top.Micro.Immunol.)》 158 L39-66 1992)。E1基因之缺失使得此類腺病毒載體複製缺乏且顯著降低載體內存在的其餘病毒基因之表現。重組腺病毒載體具有用作基因遞送載體之數個優點，包含對分裂細胞及非分裂細胞之趨向性、極小致病可能性、用於製備載體原種之複製至高效價的能力及攜帶大插入物之可能性。然而，咸信在腺病毒載體中存在其餘病毒基因可能有害。

【0136】 因此，在一些實施例中，腺病毒載體具有各種腺病毒基因序列之缺失。特定言之，假性腺病毒載體(PAV)，亦稱為「無腸腺病毒」或微型腺病毒載體，為衍生自腺病毒基因組的腺病毒載體，其含有載體基

因組複製及包裝所需之最小順式作用核苷酸序列，且其可含有一或多種轉殖基因(參見美國專利第5,882,877號，其涵蓋假性腺病毒載體(PAV)及用於產生PAV之方法，以引用之方式併入本文中)。此類可容納至多約36 kb之外源核酸的PAV為有利的，因為載體之攜帶能力得到優化，同時降低宿主對載體之免疫應答或產生有複製能力之病毒的可能性。PAV載體含有5'反向末端重複序列(ITR)及含有複製起點之3' ITR核苷酸序列，及包裝PAV基因組所需之順式作用核苷酸序列，且可容納一或多個具有適當調節元件(例如啟動子、增強子等)之轉殖基因。

AAV

【0137】 本發明之重組AAV基因組包括本發明之核酸分子及一或多個側接核酸分子之AAV ITR。rAAV基因組中之AAV DNA可來自可衍生之重組病毒的任何AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及AAV-13(參見例如Gao等人，PNAS，99:11854-11859((2002)；及《基因療法之病毒載體：方法及方案(Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols)》，Machida編，Humana Press，2003)。此外，假模式化AAV載體亦可用於本文中所描述之方法中。假模式化AAV載體為在第二AAV血清型之蛋白殼中含有一種AAV血清型之基因組的載體；舉例而言，含有AAV2蛋白殼及AAV1基因組之AAV載體或含有AAV5蛋白殼及AAV2基因組之AAV載體。(Auricchio等人，(2001)《人類分子遺傳學(Hum.Mol.genet.)》，10 (26):3075-81)。假模式化rAAV之生成揭示於例如WO 01/83692中。亦設想其他類型之rAAV變異體，例如具有蛋白殼突變之rAAV。參見例如Marsic等人，《分子療法》，22(11):

1900-1909 (2014)。如上文之先前技術部分中所述，各種AAV血清型之基因組之核苷酸序列在所屬領域中已知。為促進骨骼肌肉特異性表現，可使用AAV1、AAV6、AAV8或AAVrh.74。

【0138】 本發明之DNA質體包括本發明之rAAV基因組。將DNA質體轉移至容許經AAV之輔助病毒(例如腺病毒、E1缺失腺病毒或疱疹病毒)感染之細胞，用於rAAV基因組之總成進入感染性病毒粒子。產生rAAV粒子之技術在所屬領域中為標準的，其中待包裝之AAV基因組、rep及cap基因、及輔助病毒功能提供至細胞。rAAV之產生需要單個細胞(本文指示為包裝細胞)內存在以下組分：rAAV基因組、不同於rAAV基因組(亦即不在其中之)AAV rep及cap基因及輔助病毒功能。AAV rep及cap基因可來自能衍生出重組病毒之任何AAV血清型，且可來自與rAAV基因組ITR不同的AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAVrh.74、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAV-12及AAV-13。假模式化rAAV之生成揭示於例如WO 01/83692中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0139】 一種產生包裝細胞之方法為生成穩定表現AAV粒子產生所必需之所有組分的細胞株。舉例而言，將包括不含AAV rep及cap基因之rAAV基因組、不同於rAAV基因組之AAV rep及cap基因及可選標記(諸如新黴素抗性基因)之質體(或多個質體)整合於細胞基因組中。已藉由諸如GC拖尾之程序將AAV基因組引入細菌質體中(Samulski等人，1982，《美國國家科學院院刊(Proc.Natl. Acad.S6.)》USA，79:2077-2081)，添加含有限制性內切核酸酶裂解位點之合成連接子(Laughlin等人，1983，《基因(Gene)》，23:65-73)或藉由直接、平末端連接(Senapathy及Carter，

1984，《生物化學雜誌(J.Biol.Chem.)》，259:4661-4666)。包裝細胞株隨後經諸如腺病毒之輔助病毒感染。此方法之優勢為可選細胞且適用於大規模生產rAAV。適合之方法之其他實例採用腺病毒或桿狀病毒而非質體將rAAV基因組及/或rep及cap基因引入至包裝細胞中。

【0140】 rAAV產生之一般原理在例如Carter，1992，《生物技術中之當前觀點(Current Opinions in Biotechnology)》，1533-539；及Muzyczka，1992，《微生物學及免疫學當前主題(Curr.Topics in Microbial. and Immunol.)》，158:97-129)。在Ratschin等人，《分子細胞生物學(Mol.Cell.Biol.)》4:2072 (1984)；Hermonat等人，《美國國家科學院院刊》，81:6466 (1984)；Tratschin等人，《分子細胞生物學》5:3251 (1985)；McLaughlin等人，《病毒學雜誌(J.Virol)》，62:1963 (1988)；及Lebkowski等人，1988《分子細胞生物學》，7:349 (1988)。Samulski等人(1989，《病毒學雜誌》，63:3822-3828)；美國專利第5,173,414號；WO 95/13365 及相應美國專利第5,658,776號；WO 95/13392；WO 96/17947；PCT/US98/18600；WO 97/09441 (PCT/US96/14423)；WO 97/08298 (PCT/US96/13872)；WO 97/21825 (PCT/US96/20777)；WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)；WO 99/11764；Perrin等人(1995)《疫苗(Vaccine)》13:1244-1250；Paul等人(1993)《人類基因療法(Human Gene Therapy)》4:609-615；Clark等人(1996)《基因療法》3:1124-1132；美國專利第5,786,211號；美國專利第5,871,982號；及美國專利第6,258,595號。前述文獻在此以其全文引用之方式併入本文中，其中特定強調文獻中與rAAV生成相關之彼等部分。

【0141】 本發明因此提供產生感染性rAAV之包裝細胞。在一個實

施例中包裝細胞可為穩定轉型癌細胞，諸如HeLa氏細胞、293細胞及PerC.6細胞(同源293株)。在另一實施例中，包裝細胞係不為經轉型癌細胞的細胞，諸如低傳代293細胞(經腺病毒之E1轉型之人類胚胎腎細胞)、MRC-5細胞(人類胚胎纖維母細胞)、WI-38細胞(人類胚胎纖維母細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚胎肺細胞)。

【0142】 本發明之重組AAV(亦即感染性衣殼化rAAV粒子)包括rAAV基因組。在例示性實施例中，兩個rAAV之基因組均缺乏AAV rep及cap DNA，亦即在基因組之ITR之間不存在AAV rep或cap DNA。可經構築以包括本發明之核酸分子之rAAV之實例陳述於國際專利申請案第PCT/US2012/047999號(WO 2013/016352)中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0143】 rAAV可藉由所屬領域中之標準方法(諸如藉由管柱層析法或氯化鈉梯度)純化。用於自輔助病毒純化rAAV載體之方法在所屬領域中已知，且包含例如Clark等人，《人類基因療法(*Hum. Gene Ther.*)》，10(6): 1031-1039 (1999)；Schenpp及Clark，《分子醫學方法(*Methods Mol. Med.*)》，69 427-443 (2002)；美國專利第6,566,118號及WO 98/09657中所揭示之方法。

【0144】 在另一實施例中，本發明涵蓋包括本發明之rAAV之組合物。本發明之組合物包括rAAV及醫藥學上可接受之載劑。組合物亦可包括其他成分，諸如稀釋劑及佐劑。可接受載體、稀釋劑及佐劑對接受者無毒，且較佳在所採用之劑量及濃度下為惰性，且包含緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽或其他有機酸；抗氧化劑，諸如抗壞血酸；低分子量多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙

烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子表面活性劑，諸如吐溫(Tween)、普朗尼克(pluronic)或聚乙二醇(PEG)。

【0145】 本發明之方法中待投與之rAAV之效價將視例如特定rAAV、投與模式、治療目標、個體及所靶向之細胞類型而變化，且可藉由所屬領域中之標準方法測定。rAAV之效價可在約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1×10^{13} 至約 1×10^{14} 範圍內，或每ml更多耐脫氧核糖核酸酶粒子(DRP)。劑量亦可以病毒基因組之單位表示(vg)。

【0146】 本發明涵蓋用rAAV活體內或活體外轉導靶細胞之方法。活體內方法包括向有需要之動物(包含人類)投與有效劑量或有效多次劑量之包括本發明之rAAV的組合物的步驟。若劑量在罹患病症/疾病之前投與，則投與為預防性的。若劑量在罹患病症/疾病之後投與，則投與為治療性的。在本發明之實施例中，有效劑量為緩解(消除或減少)至少一種與所治療病症/疾病病況相關之症狀的劑量、減緩或預防病症/疾病病況進展的劑量、減輕疾病程度的劑量、引起疾病緩解(局部或總體)的劑量及/或延長存活期的劑量。

【0147】 特定言之，實際投與本發明之rAAV可藉由使用任何將使rAAV重組載體轉移至動物的目標組織中的物理方法實現。根據本發明之投與包含但不限於注射至肌肉中，注射至血流中及/或直接注射至肝中。已證明簡單地將rAAV再懸浮於磷酸鹽緩衝鹽水中足以提供適用於肌肉組

織表現之媒劑，且對於可與rAAV共投與之載劑或其他組分不存在已知限制(但在具有rAAV之正常方式中應避免降解DNA之組合物)。rAAV之蛋白殼蛋白質可經修飾，使得rAAV靶向所關注之特定目標組織，諸如肌肉。參見例如WO 02/053703，其揭示內容以引用之方式併入本文中。醫藥組合物可製備成可注射調配物或製備成待藉由經皮輸送遞送至肌肉中的局部調配物。先前已研發大量用於肌肉內注射及經皮輸送兩者之調配物，且可用於實踐本發明。出於投與及處置簡易性，rAAV可與任何醫藥學上可接受之載劑一起使用。

【0148】 轉導可藉由包括組織特異性控制元件之基因卡盒進行。舉例而言，本發明之一個實施例提供轉導由肌肉特異性控制元件指導之肌肉細胞及肌肉組織的方法，包含但不限於衍生自肌動蛋白及肌球蛋白基因家族之彼等，諸如來自myoD基因家族之彼等[參見Weintraub等人，《科學(Science)》，251: 761-766 (1991)]，肌細胞特異性增強子結合因子MEF-2 [Cserjesi及Olson，《分子細胞生物學》11: 4854-4862 (1991)]，衍生自人骨骼肌動蛋白基因之控制元件[Muscat等人，《分子細胞生物學》，7: 4089-4099 (1987)]，心肌肌動蛋白基因，肌肉肌酸激酶序列元件[參見Johnson等人，《分子細胞生物學》，9:3393-3399 (1989)]及鼠肌酸激酶增強子(mCK)元件，衍生自骨骼快收縮肌鈣蛋白C基因、慢收縮心肌肌鈣蛋白C基因及慢收縮肌鈣蛋白I基因之控制元件：低氧誘導之核因子(Semenza等人，《美國國家科學院院刊》，88: 5680-5684 (1991))，類固醇誘導性元件及啟動子，包含糖皮質激素反應元素(GRE)(見Mader及White，《美國國家科學院院刊》90: 5603-5607(1993))及其他控制元件。

【0149】 肌肉組織為活體內DNA遞送之誘人標靶，因為其不為生命

器官且容易獲取。本發明涵蓋自經轉導肌肉纖維持續表現miRNA。

【0150】 「肌肉細胞」或「肌肉組織」意謂來源於任何種類之肌肉(例如骨骼肌肉及平滑肌，例如來自消化道、膀胱、血管或心肌組織)之細胞或細胞群。此類肌肉細胞可為分化或未分化的，諸如成肌細胞、肌細胞、肌管、心肌細胞及成心肌細胞(cardiomyoblast)。

【0151】 術語「轉導」用以指代經由本發明之複製缺陷型rAAV將NT-3之編碼區投與/遞送至活體內或活體外之受體細胞，引起由受體細胞表現NT-3。

【0152】 在一個實施例中，基因療法為經由重組腺相關病毒(AAV)遞送之NT-3基因療法。諸位發明人開發一種攜帶人NT-3 cDNA編碼序列之AAV表現卡匣，其在CMV啟動子或三肌肉特異性肌酸激酶(tMCK)啟動子之控制下。諸位發明人先前已經表明，使用重組AAV1載體增tremble (Try)小鼠(其為夏馬杜三氏疾病變種CMT1A之模型)中神經營養蛋白-3表現，可實現運動功能、組織病理學及周邊神經之電生理學的改善。參見Sahenk等人，《分子療法》22(3):511-21 (2014)，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0153】 因此，本發明提供向有需要之患者投與有效劑量(或基本上同時投與之多次劑量，或在一定間隔下提供之多次劑量)之編碼NT-3的rAAV的方法。

劑量及投與途徑

【0154】 本發明提供有效劑量之rAAV及本發明組合物之局部投與及全身投與，包含本發明之組合療法。舉例而言，全身投與為投與至循環系統中，使得整個身體受影響。全身投與包含經腸投與，諸如經由胃腸道

吸收，及藉由注射、輸注或植入非經腸投與。

【0155】 因此，前述方法中涵蓋之rAAV的投與途徑包含但不限於腹膜內(IP)、肌內(IM)及血管內[包含例如動脈間肢體灌注(ILP)及靜脈內(IV)途徑。

【0156】 本文揭示之方法中待投與之rAAV之劑量將視例如特定rAAV、投與模式、治療目標、個體及所靶向之細胞類型而變化，且可藉由所屬領域中之標準方法測定。可投與多於一劑，例如一劑、兩劑、三劑或更多劑。劑量中rAAV之效價可為每毫升約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 1×10^{12} 、約 1.5×10^{12} 、約 1×10^{12} 、約 3×10^{12} 、約 4×10^{12} 、約 5×10^{12} 、約 6×10^{12} 、約 6.5×10^{12} 、約 7×10^{12} 、 1×10^{13} 、約 1×10^{14} 或約 1×10^{15} 或更多DNA酶抗性粒子(DRP)。劑量亦可以病毒基因組(vg)為單位表示(亦即，分別 1×10^7 vg、 1×10^8 vg， 1×10^9 vg、 1×10^{10} vg、 1×10^{11} vg、 1×10^{12} vg、約 1.5×10^{12} vg、約 1×10^{12} vg、約 3×10^{12} vg、約 4×10^{12} vg、約 5×10^{12} vg、約 6×10^{12} vg、約 6.5×10^{12} vg、約 7×10^{12} vg、 1×10^{13} vg、 1×10^{14} vg、 1×10^{15})。用於滴定AAV之方法描述於Clark等人，《人類基因療法》，10: 1031-1039 (1999)中。

【0157】 在前述方法之一些實施例中，其中投與途徑為IM途徑，所投與之rAAV的劑量為約 1.5×10^{12} 至至少約 6.5×10^{12} vg/kg。(本文中之所有範圍意欲表示範圍中之每一個別值，以及每一範圍之個別上限值及下限值。)在投與途徑為IM之前述方法之一些實施例中，所投與之rAAV的劑量為 2×10^{12} vg/kg。在投與途徑為IM之前述方法之一些實施例中，所投與之rAAV的劑量為 4×10^{12} vg/kg。在投與途徑為IM之前述方法之一些實施例中，所投與之rAAV的劑量為 6×10^{12} vg/kg。

【0158】 人類患者為本文中預期治療之個體。人類患者為本文中預期藉由IM遞送治療之個體。此類患者包含例如以下之彼等患者：i)診斷患有CMT1A之成人個體(>18歲)，ii)在包含周邊髓鞘蛋白22(PMP22)基因之17p11.2處展現1.5Mb重複，iii)任何種族或人種群體之男性及女性，iv)展現踝背屈肌肉無力(應具有對抗重力之完整ROM，但無法保持對抗重力之完全背屈或能夠站立3秒或更長時間(Northstar標準))，iv)異常神經傳導速度，v)合作進行臨床評估及重複神經傳導研究之能力，以及vi)性活躍個體在研究期間實施可靠避孕方法之意願。適合患者可能不包含例如具有以下之彼等：i)根據臨床觀察或血清學證據之HIV或A型、B型或C型肝炎感染之活性病毒感染，ii)進行之免疫抑制療法或在開始試驗後6個月內之免疫抑制療法(例如皮質類固醇、環孢菌素、他克莫司、甲胺蝶呤、環磷醯胺、靜脈內免疫球蛋白)，iii)持續性白血球減少症或白血球增多症($WBC \leq 3.5 \text{ K}/\mu\text{L}$ 或 $\geq 20.0 \text{ K}/\mu\text{L}$)或絕對嗜中性白血球計數 $< 1.5 \text{ K}/\mu\text{L}$ ，iv)如藉由ELISA免疫測定所測定之AAV1結合抗體效價 $\geq 1:50$ ，v)PI認為對基因轉移產生不必要風險之伴隨疾病或對慢性藥物治療之要求，vi)踝攣縮或妨礙適當肌肉力量測試之手術，vii)懷孕、母乳哺育或計劃懷孕，viii)神經病變之其他原因及/或ix)過去六個月中之肢體手術。在例示性臨床方案中，CMT1A患者接受總劑量之載體scAAV1.tMCK.NTF3，分為腿部之腓腸肌之內側頭與外側頭及脛骨前(TA)肌，其優先引起CMT中之踝無力及不穩定。個體獲得以下中之一個：i) $2 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ (總劑量)之低劑量載體或ii) $6 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ (總劑量)之高劑量載體。

【0159】 在一個實施例中，藉由不含稀釋劑之IM注射投與載體。在替代性實施例中，可使用用於肌肉注射之組合物，包含佐劑，諸如芝麻油

或花生油或丙二醇水溶液，以及無菌水溶液。要時，此類水溶液可經緩衝，且首先用生理鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑等張。可在水中適合地與諸如羥基丙基纖維素之界面活性劑混合製備作為游離酸(DNA含有酸性磷酸根基)或藥理學上可接受之鹽的rAAV的溶液。亦可在甘油、液態聚乙二醇及其於油中之混合物中製備rAAV之分散液。在普通的儲存及使用條件下，此等製劑含有防腐劑以防止微生物生長。與此相關，所採用無菌水性介質所有皆可容易地藉由本領域中熟習此項技術者熟知之標準技術獲得。

【0160】 適用於可注射使用之醫藥載劑、稀釋劑或賦形劑包含無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。在所有情況下，形式必須為無菌的且必須為流體，達到存在可容易注射性之程度。其在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液態聚乙二醇及其類似物)、其適合的混合物及植物油之溶劑或分散介質。恰當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。微生物作用之預防可藉由各種抗菌劑及抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及其類似物來實現。在多數情況下，其將較佳包含等張劑(例如糖或氯化鈉)。可注射組合物之延長吸收可藉由使用延緩吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)來實現。

【0161】 無菌可注射溶液藉由以下製備：將所需量之rAAV視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌。一般而言，藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在無菌粉末用於製備

無菌可注射溶液之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其自其預先無菌過濾溶液產生活性成分粉末加任何額外所需成分之粉末。

【0162】 用rAAV轉導亦可在活體外進行。在一個實施例中，所需目標肌肉細胞自個體移出，經rAAV轉導且再引入至個體中。替代地，可使用同基因型或異種肌肉細胞，其中彼等細胞在個體中將不會產生不當的免疫反應。

【0163】 在另一態樣中，本文提供rAAV基因組。所投與之rAAV的基因組包括處於轉錄控制序列控制下之NT-3多核苷酸。rAAV基因組缺乏AAV rep及cap DNA。rAAV基因組中之AAV DNA可來自能衍生出重組病毒之任何AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11及AAVrh.74。如上文之先前技術部分中所述，此等AAV血清型之基因組之核苷酸序列在所屬領域中已知。

【0164】 在一些實施例中，rAAV基因組之轉錄控制序列為肌肉特異性控制元件，包含但不限於衍生自肌動蛋白及肌球蛋白基因家族之彼等，諸如來自myoD基因家族[參見Weintraub等人，《科學(Science)》，251: 761-766 (1991)]，肌細胞特異性增強子結合因子MEF-2 [Cserjesi及Olson，《分子細胞生物學》，11: 4854-4862 (1991)]，源自人骨骼肌動蛋白基因之控制元件[Muscat等人，《分子細胞生物學》，7: 4089-4099 (1987)]，心肌肌動蛋白基因，肌肉肌酸激酶(MCK)啟動子[Johnson等人，《分子細胞生物學》，9:3393-3399 (1989)]及MCK增強子，MHCK7啟動子(併入來自肌球蛋白重鏈之增強子之MCK啟動子的修飾形式[Salva等人，《分子療法》，15: 320-329 (2007)])，結蛋白啟動子，衍生自骨骼快收

縮肌鈣蛋白C基因、慢收縮心肌肌鈣蛋白C基因及慢收縮肌鈣蛋白I基因之控制元件：低氧誘導之核因子(Semenza等人,《美國國家科學院院刊》, 88: 5680-5684 (1991)), 類固醇誘導性元件及啟動子, 包含糖皮質激素反應元素(GRE)(參見Mader及White,《美國國家科學院院刊》, 90: 5603-5607 (1993))及其他控制元件。在一些實施例中, 轉錄控制元件包含MCK啟動子。在一些實施例中, 轉錄控制元件包含MHCK7啟動子。

【0165】 在一些實施例中, rAAV基因組中之NT-3多核苷酸為SEQ ID NO: 1中列出之NT-3 cDNA(對應於SEQ ID NO: 11之核苷酸1077-1850)。在一些實施例中, 對rAAV基因組中之NT-3多核苷酸為Genbank寄存編號NM_001102654中列出之NT-3 cDNA或如SEQ ID NO: 1中列出之NT-3 cDNA序列, 或為具有與NT-3 cDNA 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之變異體多核苷酸。在一些實施例中, 變異體NT-3多核苷酸編碼與SEQ ID NO: 1之NT-3 cDNA編碼的多肽相同之NT-3多肽。由NT-3 cDNA編碼之NT-3多肽的胺基酸序列如SEQ ID NO: 1中列出或以Genbank寄存編號NM_001102654提供, 在SEQ ID NO: 2中列出。在一些實施例中, 變異體NT-3多核苷酸編碼變異體NT-3多肽, 其中至少一個胺基酸序列相比由在SEQ ID NO: 1中列出或以Genbank寄存編號# NM_001102654提供之NT-3 cDNA編碼之多肽的胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)改變。胺基酸序列改變可為例如一或多個胺基酸之取代、缺失或插入, 較佳保守取代。變異體NT-3多肽可具有保留多肽活性之胺基酸取代、缺失或插入的任何組合。在一個態樣中, 變異體NT-3多肽可具有數個胺基酸改變, 使得其胺基酸序列具有與由如SEQ ID NO:

1中列出或以Genbank寄存編號NM_001102654提供之NT-3 cDNA編碼之胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%之一致性。

【0166】 在一些實施例中，rAAV基因組為AAV.tMCK.NTF3基因組，其NT-3基因卡匣之序列在SEQ ID NO: 11中列出且在表4中標註(參見實例3)。

【0167】 在又一態樣中，提供包括SEQ ID NO: 11中所描繪之核苷酸序列的經分離核酸。在一些實施例中，經分離核酸由SEQ ID NO: 11中所描繪之核苷酸序列組成。

【0168】 亦提供經分離核酸，其以5'至3'之順序包括：(i)第一AAV2反向末端重複序列(ITR)(SEQ ID NO: 4)；(ii)肌肉肌酸激酶啟動子序列(SEQ ID NO: 3)；(iii)編碼人NT-3多肽之核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)；(iv)第二AAV2 ITR序列(SEQ ID NO: 8)，其中人NT-3多肽具有與SEQ ID NO: 2至少90%相同、與SEQ ID NO: 2 100%相同或由SEQ ID NO: 11之核苷酸1077-1850編碼之胺基酸序列。

【0169】 涵蓋包括前述核酸之重組AAV以及包括與SEQ ID NO: 1中列出之核苷酸序列至少90%相同之核苷酸序列的rAAV。

【0170】 提供包括本發明之rAAV基因組的DNA質體。DNA質體包括本文中所涵蓋之rAAV基因組。將DNA質體轉移至容許經AAV之輔助病毒(例如腺病毒、E1缺失腺病毒或疱疹病毒)感染之細胞，用於rAAV基因組之總成進入感染性病毒粒子。產生rAAV粒子之技術在所屬領域中為標準的，其中待包裝之AAV基因組、rep及cap基因、及輔助病毒功能提供至細胞。rAAV之產生需要單個細胞(本文指示為包裝細胞)內存在以下組

分：rAAV基因組、不同於rAAV基因組(亦即不在其中之)AAV rep及cap基因及輔助病毒功能。AAV rep及cap基因可來自能衍生出重組病毒之任何AAV血清型，且可來自與rAAV基因組ITR不同的AAV血清型，包含但不限於AAV血清型AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11及AAV rh74。假模式化rAAV之生成揭示於例如WO 01/83692中。亦設想其他類型之rAAV變異體，例如具有蛋白殼突變之rAAV。參見例如Marsic等人，《分子療法》，22(11): 1900-1909 (2014)。

【0171】一種產生包裝細胞之方法為生成穩定表現AAV粒子產生所必需之所有組分的細胞株。舉例而言，將包括不含AAV rep及cap基因之rAAV基因組、不同於rAAV基因組之AAV rep及cap基因及可選標記(諸如新黴素抗性基因)之質體(或多個質體)整合於細胞基因組中。已藉由諸如GC拖尾之程序將AAV基因組引入細菌質體中(Samulski等人，1982，《美國國家科學院院刊》，79:2077-2081)，添加含有限制性內切核酸酶裂解位點之合成連接子(Laughlin等人，1983，《基因》，23:65-73)或藉由直接、平末端連接(Senapathy及Carter，1984，《生物化學雜誌》，259:4661-4666)。包裝細胞株隨後經諸如腺病毒之輔助病毒感染。此方法之優勢為可選細胞且適用於大規模生產rAAV。適合之方法之其他實例採用腺病毒或桿狀病毒而非質體將rAAV基因組及/或rep及cap基因引入至包裝細胞中。產生具有自互補基因組之rAAV的方法亦為所屬領域中已知的。

【0172】rAAV產生之一般原理在例如Carter，1992，《生物技術中之當前觀點》，1533-539；及Muzyczka，1992，《微生物學及免疫學當前主題》，158:97-129)。在Ratschin等人，《分子細胞生物學》4:2072

(1984)；Hermonat等人，《美國國家科學院院刊》，81:6466 (1984)；Tratschin等人，《分子細胞生物學》5:3251 (1985)；McLaughlin等人，《病毒學雜誌》，62:1963 (1988)；及Lebkowski等人，1988 《分子細胞生物學》，7:349 (1988)。Samulski等人(1989，《病毒學雜誌》，63:3822-3828)；美國專利第5,173,414號；WO 95/13365及相應美國專利第5,658,776號；WO 95/13392；WO 96/17947；PCT/US98/18600；WO 97/09441 (PCT/US96/14423)；WO 97/08298 (PCT/US96/13872)；WO 97/21825 (PCT/US96/20777)；WO 97/06243 (PCT/FR96/01064)；WO 99/11764；Perrin等人(1995)《疫苗》13:1244-1250；Paul等人(1993)《人類基因療法》4:609-615；Clark等人(1996)《基因療法》3:1124-1132；美國專利第5,786,211號；美國專利第5,871,982號；及美國專利第6,258,595號。前述文獻在此以其全文引用之方式併入本文中，其中特定強調文獻中與rAAV生成相關之彼等部分。

【0173】在另一態樣中，本發明因此提供產生感染性rAAV之包裝細胞。在一個實施例中包裝細胞可為穩定轉型癌細胞，諸如HeLa氏細胞、293細胞及PerC.6細胞(同源293株)。在另一實施例中，包裝細胞係不為經轉型癌細胞的細胞，諸如低傳代293細胞(經腺病毒之E1轉型之人類胚胎腎細胞)、MRC-5細胞(人類胚胎纖維母細胞)、WI-38細胞(人類胚胎纖維母細胞)、Vero細胞(猴腎細胞)及FRhL-2細胞(恆河猴胚胎肺細胞)。

【0174】rAAV可藉由所屬領域中之標準方法(諸如藉由管柱層析法或氯化銫梯度)純化。用於自輔助病毒純化rAAV載體之方法在所屬領域中已知，且包含例如Clark等人，《人類基因療法》，10(6): 1031-1039 (1999)；Schenpp及Clark，《分子醫學方法》，69 427-443 (2002)；美國專

利第6,566,118號及WO 98/09657中所揭示之方法。

【0175】 因此，在另一態樣，本發明涵蓋包括NT-3多核苷酸之rAAV。在一些實施例中，rAAV包括AAV rh74蛋白殼及NT-3多核苷酸。在一些實施例中，rAAV之基因組缺乏AAV rep及cap DNA。在方法之一些實施例中，rAAV為rAAVrh7.4.tMCK.NTF3。在一些實施例中，rAAV為自互補基因組。

【0176】 在另一態樣中，本發明涵蓋包括本文中所描述之rAAV的組合物。本發明之組合物包括醫藥學上可接受之載劑中的rAAV。組合物亦可包括其他成分，諸如稀釋劑。可接受載體及稀釋劑對接受者無毒，且較佳在所採用之劑量及濃度下為惰性，且包含緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽或其他有機酸；抗氧化劑，諸如抗壞血酸；低分子量多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子表面活性劑，諸如吐溫、普朗尼克或聚乙二醇(PEG)。在一些實施例中，rAAV在Tris、MgCl₂、NaCl及普朗尼克F68中調配。在一些實施例中，rAAV在含有0.001%普朗尼克F68之20 mM Tris(pH 8.0)、1 mM MgCl₂及200 mM NaCl中調配。

【0177】 本文中亦涵蓋組合治療。本文中所使用之組合包含同時治療或依序治療。本發明之方法與標準醫學治療(例如皮質類固醇及/或免疫抑制藥物)的組合為特別考慮的，與新穎治療的組合亦如此。在各種實施例中，在根據本文中所涵蓋之方法治療受試者之前、期間或之後(或對三

種可能性中的兩種或更多種的組合的任何排列)，用皮質類固醇治療個體。舉例而言，組合包含在投與rAAV載體之前、期間及/或之後投與皮質類固醇，例如普賴蘇穩(prednisolone)。

【0178】 無菌可注射溶液藉由以下製備：將所需量之rAAV視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中，隨後過濾滅菌。一般而言，藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在無菌粉末用於製備無菌可注射溶液之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其自其預先無菌過濾溶液產生活性成分粉末加任何額外所需成分之粉末。

刺激肌肉生長

【0179】 本發明之一態樣提供刺激個體肌肉生長之方法，包括對有需要之個體投與治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸。

【0180】 在一些實施例中，本發明之方法可用於在個體中增加肌肉力量、肌肉質量或肌肉耐力且減少肌肉疲勞。

【0181】 肌肉可分為三種類型：骨骼肌、心肌及平滑肌。骨骼肌為能夠產生力且將所述力傳遞至骨骼的肌肉組織，使得能夠進行呼吸、運動及姿勢保持。心肌為心臟之肌肉。平滑肌為動脈及腸壁之肌肉組織。本發明之方法及組合物主要適用於骨骼肌，但亦可另外正面地影響平滑肌。

「骨骼肌(skeletal muscle)」及「骨骼肌(skeletal muscles)」被定義為與骨骼、肌腱及關節相互作用之肌肉。

【0182】 在一些實施例中，本發明提供治療導致肌肉力量降低(在本文中亦被稱作肌肉骨骼疾病，及肌肉功能障礙及肌肉消耗疾病)之疾病

(illness)、疾病(disease)、病症及病狀的方法。肌肉骨骼疾病之主要類別為肌營養不良及肌肉萎縮。

【0183】 在一些實施例中，本發明提供用於治療肌肉骨骼疾病之方法，肌肉骨骼疾病包含肌肉功能障礙及肌肉消耗疾病或病症，包含遺傳性肌病、神經肌肉疾病、肌肉萎縮、藥物誘導之肌病，或導致肌肉力量下降之疾病、疾病、病症或病狀。本發明亦提供用於治療神經病變之方法，神經病變諸如CMT-遺傳性及CMT1A，以及軸突及脫髓鞘多發性神經病變，諸如慢性炎性脫髓鞘多發性神經病變。治療方法包含向有需要之患者投與治療有效量之神經營養蛋白-3(NT-3)、pro-NT-3或其有效片段，或編碼NT-3、pro-NT-3或其有效片段之核酸。在一些實施例中，個體患有選自由以下組成之群的肌肉疾病：肌肉減少症、惡病質、II型肌肉纖維萎縮及與再生之輻向生長期減弱相關之獲得性自身免疫性原發性肌病。

【0184】 在一些實施例中，NT-3可用於治療肌肉萎縮。肌肉萎縮為泛稱，用於描述由各種疾病、病症、其他病狀或事件引起之消耗或損失肌肉組織所標記之病狀。肌肉萎縮可為(但不限於)以下之結果：由嚴重燒傷恢復、主要關節置換手術、神經性疼痛、周邊神經病變、壞死性血管炎、零重力環境(例如宇航員及太空人(cosmonaut))、長期住院、退行性疾病退化疾病(例如肌萎縮性側索硬化)及器官移植以及脊髓損傷、慢性血液透析及中風引起之長時間固定。

【0185】 在一些實施例中，NT-3可用於治療廢用性肌肉萎縮。廢用性肌肉萎縮為由長時間不活動引起之肌肉組織消耗或喪失所標記的病狀。廢用性肌肉萎縮可為(但不限於)以下之結果：由嚴重燒傷恢復、主要關節置換手術、神經性疼痛、零重力環境(例如宇航員及太空人)、長期住院、

厭食及器官移植以及脊髓損傷、慢性血液透析及中風引起之長時間固定。

【0186】 在一些實施例中，NT-3可用於治療與年齡相關之肌肉萎縮。與年齡相關之肌肉萎縮為一種病狀，其由肌肉組織之消耗或喪失及隨個體老化由纖維化組織替換肌肉組織標記。

【0187】 在一些實施例中，NT-3可用於治療肌肉減少症。肌肉減少症為一種病狀，其由肌肉組織之消耗或喪失及隨個體老化由纖維化組織替換肌肉組織標記。

【0188】 在一些實施例中，NT-3可用於治療惡病質中之肌肉消耗。惡病質為在未主動嘗試減肥，而是由於慢性疾病之人的體重減輕、肌肉萎縮、疲勞、虛弱及顯著食慾不振。惡病質之肌肉消耗成分可為(但不限於)以下之結果：癌症、多發性硬化症、肺結核、後天性免疫不全症候群、人類免疫不全病毒、營養不良、帕金森病、肺氣腫、心臟衰竭、運動神經元疾病、囊性纖維化、癡呆、肌肉減少症、慢性阻塞性肺病、腎病及腎衰竭。

【0189】 在一些實施例中，NT-3可用於治療由以下引起之肌肉消耗：病毒感染(例如HIV、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))、細菌感染(例如分枝桿菌及立克次體)、脊髓灰質炎後症候群及寄生蟲感染(例如錐蟲及血吸蟲)，其中個體具有罹患肌肉萎縮之風險。

神經營養蛋白-3

【0190】 在一些實施例中，向個體投與治療有效量之NT-3、pro-NT-3或NT-3類似物以刺激肌肉生長。神經營養蛋白3(NT-3)為神經營養蛋白之NGF(神經生長因子)家族中之神經營養因子。NT-3為蛋白質生長因子，對周邊及中樞神經系統之某些神經元具有活性；最為人所周知的為幫助

支持現有神經元之存活及分化，且促進新神經元及突觸之生長及分化。

【0191】 本發明包含阻斷肽，其基本上類似於Cx26之細胞外結構域之胺基酸序列的至少一部分。如本文中所使用，術語「部分」係指Cx26之細胞外結構域內的胺基酸序列，其包含至少4個胺基酸。在另外的實施例中，部分係指長度為至少6個胺基酸之胺基酸序列、長度為至少8個胺基酸之胺基酸序列或長度為至少10個胺基酸之胺基酸序列。因此，阻斷肽由至少4、6、8或10個胺基酸組成。同樣地，本文中所描述之阻斷肽可具有最大大小。阻斷肽之最大大小涉及肽之總體大小，且包含與肽連接之任何額外序列，諸如蛋白質轉導結構域。在一些實施例中，阻斷肽具有小於約200個胺基酸之最大大小，而在其他實施例中，阻斷肽具有小於約100個胺基酸之最大大小。在其他實施例中，阻斷肽之最大大小為75個胺基酸或更少、50個胺基酸或更少、40個胺基酸或更少、30個胺基酸或更少或20個胺基酸或更少。

【0192】 如本文中所使用，術語「多肽」係指寡肽、肽或蛋白質序列，或此等中之任一者的片段、部分或子單元，及天然存在之分子或合成分子。術語「多肽」亦包含藉由肽鍵或經修飾肽鍵彼此連接之胺基酸，亦即肽電子等排物，且可含有任何類型之經修飾胺基酸。術語「多肽」亦包含肽及多肽片段、基元及其類似物、糖基化多肽、所有「模擬物」及「肽模擬物」多肽形式，及反向倒置肽(亦稱為全D逆肽或mtro對映體肽)。

【0193】 「基本上相似」意謂給定胺基酸(或核酸)序列與參考序列具有至少85%、更佳至少90%、甚至更佳至少95%一致性。關於此類序列之一致性或同源性在本文中定義為在比對序列及引入缺口(必要時)以實現最大同源性百分比之後候選序列中與已知肽相同之胺基酸殘基的百分比，

且不考慮任何保守取代作為序列一致性的一部分。肽序列之N末端、C末端或內部延伸部分、缺失或插入不應理解為影響同源性。

【0194】基本上相似之肽包含因一個或多個胺基酸改變而不同之彼等，其中胺基酸殘基之改變(例如取代、添加或缺失)不會消除相關肽之性質，諸如它們與FAK或NANOG結合之能力。此外，僅描述或編碼在保守區中僅進行保守取代之蛋白質的序列總體上基本上相似。較佳基本上相似之序列亦保留了多肽之獨特活性。

【0195】保守取代之實例包含將諸如異白胺酸、白胺酸或甲硫胺酸之非極性(疏水性)殘基取代為另一種非極性殘基。同樣地，本發明涵蓋取代一個極性(親水性)殘基，諸如精胺酸與離胺酸之間、麩醯胺酸與天冬醯胺酸之間及甘胺酸與絲胺酸之間的殘基。另外，亦涵蓋用鹼性殘基，諸如離胺酸、精胺酸或組胺酸取代另一種或一種酸性殘基，諸如天冬胺酸或麩胺酸取代另一種。非保守性取代之實例包含將諸如異白胺酸、纈胺酸、白胺酸、丙胺酸或甲硫胺酸之非極性(疏水性)胺基酸殘基取代為諸如半胱胺酸、麩醯胺、麩胺酸或離胺酸之極性(親水性)殘基及/或將極性殘基取代為非極性殘基。

【0196】片語「保守取代」亦包括使用化學衍生之殘基代替非衍生殘基，只要肽保留與NT-3結合之必要能力即可。基本上相似之肽亦包含額外胺基酸之存在或一或多個胺基酸之缺失，其不影響與NT-3結合的必要能力，例如基本上相似之肽可含有N端或C端半胱胺酸，若需要，肽可藉由其共價附著於載體蛋白，例如白蛋白。此類附著可減少肽自血液中清除，且亦降低肽之蛋白水解速率。另外，出於本發明之目的，在本發明中，含有D-胺基酸而非L-胺基酸之肽亦包含於術語「保守取代」中。此

類D-異構體之存在可幫助將蛋白水解活性及肽清除減至最少。

【0197】 在一些實施例中，將前神經營養蛋白-3蛋白(pro-NT-3)向個體投與。神經營養蛋白-3之前體形式為約30 kDa的NT-3前體形式，其藉由酶促裂解及去除約15 kDa之N端前結構域轉化為成熟NT。參見Tauris等人，《歐洲神經科學雜誌(Eur. J Neurosci)》，33(4), 622-631 (2011)。

肌肉萎縮之治療

【0198】 本發明提供治療患有周邊肌肉萎縮之個體的方法。丙酮酸化合物可用於提供預防性及/或治療性治療。丙酮酸化合物可例如在周邊神經病變發生之前向個體投與。預防性(prophylactic)(亦即，預防性(preventive))投與可有效降低個體後續發生周邊神經病變之或然性，或降低後續發生之周邊神經病變之嚴重程度。可將預防性治療提供至罹患周邊神經病變風險較高之個體，諸如具有周邊神經病變家族病史之個體。髓鞘蛋白22(PMP22)之突變的表現代表所有夏馬杜三氏神經病變發生之70-80%，且因此其存在可作為選擇患者以接受使用本文所描述之丙酮酸鹽化合物之治療的標準。

【0199】 可替代地，本發明化合物可治療性地投與至已罹患周邊神經病變之個體。在治療性投與之一個實施例中，化合物之投與可有效消除周邊神經病變；在另一實施例中，丙酮酸鹽化合物之投與可有效降低周邊神經病變之嚴重程度或延長受折磨之個體的壽命。在一些實施例中，治療方法由在相當長的一段時間內向個體投與治療有效量之醫藥學上可接受之調配物中的丙酮酸鹽化合物組成。

CMT變異體

【0200】 夏馬杜三氏(CMT)遺傳性神經病變係指一組病症，其特徵

在於以慢性運動及感覺性多發性神經病變，亦稱為遺傳性運動及感覺神經病變。體染色體顯性遺傳CMT神經病變類型為：脫髓鞘(亦被稱為CMT1)、軸突非脫髓鞘(亦被稱為CMT2)及顯性中間CMT(DI-CMT)。等效於CMT之其他神經病變為遠端遺傳性運動神經病變9dHMN)及遠端脊髓性肌萎縮(DSMA)及代哲因－索他二氏症候群(Dejerine-Sottas syndrome；DSS)。CMT神經病變之描述及分類提供於Bird，《基因評論(GeneReviews)》，華盛頓州西雅圖(Seattle Washington)：華盛頓大學西雅圖分校(University of Washington Seattle)PIM 20301532，更新時間為2018年6月28日。

【0201】 目前，已知有超過70種已知CMT相關基因之遺傳變異體。在下表1中提供此等遺傳變異體，其使用 Magy 等人(《神經學(Neurology)》90:e870-6, 2018)的分類系統。各CMT相關遺傳變異體之固有模式為體染色體顯性(AD)、體染色體隱性(AR)或X性聯(XL)。各CMT相關遺傳變異體之神經病變為軸突(Ax)、脫髓鞘(De)及中間體(In)。表1中所提供之「其他名稱」為在其他分類系統中所使用之名稱，其含顯性中間CMT(DI-CMT)、遠端脊髓性肌肉萎縮症(DSMA)、遺傳性感覺及自主神經病變(HSAN)及遠端遺傳性運動神經病變(dHMN)。

表1

基因 ¹	MOI	神經病變類型			其他表型特徵/評論	其他名稱 ²
		Ax	De	In		
GAP1	AR	●			聲帶麻痹 ⁴	CMT2K
						CMT4A
	AR	●	●	●		CMT2H
						CMT2K
						CMTRIA

基因 ¹	MOI	神經病變類型			其他表型特徵/評論	其他名稱 ²
		Ax	De	In		
	AD, AR	●				
<i>GJB1</i>	XL	●			家族史可呈現 AD，因為女性可與男性一樣嚴重受影響。	CMTX1
<i>HINT1</i>	AR	●			神經肌強直	
<i>MFN2</i>	AD, AR	●			視神經萎縮	CMT2A2 CMT2I/2J
<i>MPZ</i>	AD	●	●	●		CMT1B CMT2I/J DI-CMTD
<i>PMP22</i>	AD		●			CMT1A CMT1E
<i>SH3TC2</i>	AR	●				CMT4C
<i>AARS</i>	AD	●				CMT2N
<i>ABHD12</i>	AR		●		耳聾、白內障、色素性視網膜炎	PHARC
<i>AIFM1</i>	XL	●			耳聾、智能障礙	CMTX4
<i>ARHGEF10</i>	AD		●			
<i>ATP1A1</i>	AD	●				
<i>ATP7A</i> ⁵	XL	●			遠端下肢	
<i>BAG3</i>	AD	●			肌原纖維肌病、心肌病	
<i>BSCL2</i>	AD	●			遠端下肢； UMN 受累可引起痙攣性截癱	dHMN5A
<i>CNTNAP1</i>	AR	●	●		關節彎曲、腦白質障礙	
<i>COA7</i>	AR	●				
<i>DCTN1</i>	AD				遠端下肢	dHMN7B
<i>DCTN2</i>	AD	●			聲帶麻痹 ⁴	

基因 ¹	MOI	神經病變類型			其他表型特徵/評論	其他名稱 ²
		Ax	De	In		
DGAT2	AD	●				
DHTKD1	AD	●				CMT2Q
DNAJB2	AR	●			遠端運動神經病變	DSMA5
DNMT1	AD	●			聽力損失、癡呆症	DMNT1
DNM2	AD			●		CMT2M DI-CMTB
DRP2	XL			●	自閉症	
DYNC1H1	AD	●			SMA	CMT2O
EGR2	AD		●			CMT1D
	AR		●			CMT4E
FGD4	AR		●			CMT4H
FIG4	AR		●			CMT4J
GARS	AD	●			在手中發作	CMT2D dHMN5A
GNB4	AD			●		DI-CMTF
HARS	AD	●	●			CMT2W
HSPB1	AD	●				CMT2F dHMN2B
HSPB3	AD					dHMN2C
HSPB8	AD	●			成年發病	CMT2L dHMN2A
IGHMBP2	AR	●				CMT2S DSMA1
INF2	AD			●	腎小球硬化	
KIF1B	AD	●				CMT2A1
KIF5A	AD	●			痙攣	
LITAF	AD		●			CMT1C

基因 ¹	MOI	神經病變類型			其他表型特徵/評論	其他名稱 ²
		Ax	De	In		
<i>LMNA</i>	AR	●				CMT2B1
<i>LRSAM1</i>	AD					CMT2G
	AR	●				CMT2P
<i>MARS</i>	AD	●				CMT2U
<i>MCM3AP</i>	AR	●	●		兒童其發病，嚴重	
<i>MED25</i>	AR	●				CMT2B2
<i>MME</i>	AR					
	AD	●				CMT2T
<i>MORC2</i>	AD	●				CMT2Z
<i>MPV17</i>	AR	●			納瓦荷神經肝病(Navaho neurohepatopathy)	
<i>MPZ</i>	AD	●	●	●		CMT1B
						CMT2I/J
						DI-CMTD
<i>MTMR2</i>	AR		●		聲帶麻痹 ⁴	CMT4B1
<i>NAGLU</i>	AD	●				CMT2V
<i>NDRG1</i>	AR		●			CMT4D
<i>NEFH</i>	AD	●				
<i>NEFL</i>	AD, AR	●	●			CMT1F/2E
<i>PDK3</i>	XL	●				CMTX6
<i>PLEKHG5</i>	AR			●	遠端占主導	DSMA4
<i>PRPS1</i>	XL				視網膜病變、耳聾	CMTX5
<i>PRX</i>	AR	●				CMT4F
<i>PTRH2</i>	AR				聽力損失	
<i>RAB7A</i>	AD	●			顯著感官損失	CMT2B
<i>SBF1</i>	AR	●				CMT4B3

基因 ¹	MOI	神經病變類型			其他表型特徵/評論	其他名稱 ²
		Ax	De	In		
<i>SBF2</i>	AR		●			CMT4B2
<i>SCO2</i>	AR	●			運動神經病變	
<i>SETX</i>	AD				遠端下肢	FALS
<i>SIGMAR1</i>	AR	●			運動神經病變	
<i>SGPL1</i>	AR	●			復發性單神經病變	
<i>SPG11</i>	AR	●			痙攣、認知減退	CMT2X ALS5
<i>SPTLC1</i>	AD	●				HSAN1A
<i>TRIM2</i>	AR	●			聲帶麻痹 ⁴	CMT2R
<i>TRPV4</i>	AD	●			聲帶麻痹 ⁴ 、骨胳發育不良	CMT2C
<i>VCP</i>	AD	●			包涵體肌病、癡呆症	CMT2Y
<i>WARS</i>	AD	●			運動神經病變	dHMN9
<i>YARS</i>	AD			●		DI-CMTC
未知 ⁶	XL		●		快速進展、嚴重手部無力	CMTX3

MOI = 繼承模式
AD = 體染色體顯性
AR = 體染色體隱性
XL = X 性聯
Ax = 軸突
De = 脫髓鞘
In = 中間
UMN = 上運動神經元
DI-CMT = 顯性中間 CMT
DSMA = 遠端脊髓性肌萎縮
ALS = 肌萎縮性側索硬化
HSAN = 遺傳性感覺及自主神經病變
dHMN = 遠端遺傳性運動神經病變

投與及調配

【0202】 與本發明之一些實施例一起使用之載體或肽可併入至適於

向個體投與的藥物組合物中。在一些具體實施例中，藥物組合物包括本發明之載體及醫藥學上可接受之載劑。如本文在所使用，「醫藥學上可接受之載劑」包含生理學上相容之任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之實例包含水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似者中之一或多者以及其組合。在諸多情況下，組成物中可較佳包含等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。醫藥學上可接受之載劑可進一步包括極少量之輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，其可增加向量或醫藥組合物之存放期或有效性。

【0203】 載體或肽可急性投與(亦即，在發作期間或在導致肌肉萎縮之事件之後不久)，或可預防性地投與(例如預定手術之前，或出現跡象或症狀之前)，或在肌肉萎縮之病程期間投與，以減少或改善否則將會發生之症狀的進展。投與之時序及間隔根據個體之症狀變化，且可在如所屬領域技術人員所確定之數小時、日、週或更長時程內以數小時至數日之間隔投與。

【0204】 一般靜脈內投與含有載體或肽之組合物。在靜脈內投與時，組合物可與其他成分組合，諸如載劑及/或佐劑。肽亦可共價附著於蛋白質載體，諸如白蛋白，以便將肽之清除減至最少。不存在對其他成分之性質的限制，除了此類成分必須為醫藥學上可接受的、對其預期投與有效且不會使組合物之活性成分的活性降低。

【0205】 適於注射之醫藥形式包含無菌水溶液或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。在所有情況下，最終溶液形式必須為無菌且流體的。典型載劑包含溶劑或分散介質，其含有例如水緩衝

水溶液溶液(亦即，生物相容性緩衝液)、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇)、其適合混合物、表面活性劑或植物油。滅菌可藉由任何所屬領域公認之技術實現，包含但不限於過濾或添加抗菌劑或抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸或硫柳汞。此外，可將等張劑(諸如糖或氯化鈉)併入本發明組合物中。

【0206】 藉由將此等化合物以所需的量併入具有以上所列舉之成分的適當溶劑中，隨後進行滅菌，較佳過濾滅菌實現含有本發明肽之無菌可注射溶液之產生。為獲得無菌散劑，視需要將以上溶液進行真空乾燥或冷凍乾燥。

【0207】 當經口投與本發明之肽時，其含有有效劑量之肽的醫藥組合物亦可含有惰性稀釋劑，作為可吸收可食用載劑及其類似物，在硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓縮成錠劑，或可呈酏劑、懸浮液、糖漿及其類似物形式。因此，本發明肽經調配以按醫藥學有效量與呈治療有效量之適合醫藥學上可接受之載劑進行方便且有效的投與。

【0208】 如本文中所使用，表述「有效量」或「治療有效量」係指足以刺激肌肉生長或減少或預防肌肉萎縮之藥劑的量。所需準確量隨各個體而變化，取決於個體之物種、年齡及一般狀況、特定治療劑、其模式及/或投與途徑及類似者。然而，應瞭解，本發明之化合物及組合物之每日總用量將由主治醫師在合理醫學判斷範疇內決定。對於任何特定個體或生物體之特定有效劑量水準將視多種因素而定，所述因素包含經治療之病症及所述病症之嚴重度；所採用之特定化合物之活性；所採用之特定組合物；個體之年齡、體重、總體健康狀況、性別及飲食；投與時間、投與途徑及所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組

合物組合使用或同時使用之藥物；及醫療領域中熟知之類似因素。

【0209】載體或肽可以與劑型相容之方式及亦為治療學上有效之量投與。全身劑量取決於患者之年齡、體重及狀況以投與途徑。舉例而言，用於成年人投與之肽的適合劑量在每公斤體重約 0.001 mg 至約 20.0 mg 範圍內。肽應較佳以每劑至少約 50 mg 之量、更佳以至多至每劑約 500 mg 至約 1 公克投與。由於本發明之肽組合物最終將自血流中清除，指示且較佳重新投與組合物。

實例

【0210】因此，由以下實例說明本發明之態樣及實施例。然而，在本發明之範圍內存在廣泛多種其他實施例，其不應限於本文所提供之特定實例。

實例 1

AAV1.NT-3 基因療法經由 CMT 小鼠模型中之 mTOR 激活路徑及代謝重塑增加肌肉纖維直徑

【0211】NT-3 對周邊神經及許旺細胞具有公認效果，促進軸突再生及相關髓鞘形成。評估 AAV.NT-3 基因療法對基因注射後 16 週 Trembled(TrJ)小鼠神經源性肌肉氧化狀態的影響，且發現肌肉纖維尺寸增加與朝向野生型中所見之纖維類型比率之標準化肌肉纖維的氧化狀態中之變化有關。NT-3 誘導之纖維尺寸增加對於快收縮糖酵解纖維群體而言最顯著。TrJ 肌肉中之此等變化伴有 4E-BP1 及 S6 蛋白之磷酸化含量增加，作為 mTORC1 激活之證據。同時，粒線體生物發生調節子 PGC1 α 之表現量及糖酵解之標誌物(HK1 及 PK1)在 TrJ 肌肉中增加。活體外研究表明，重組 NT-3 可直接誘導表現肌管之 TrkC 中的 Akt/mTOR 路徑激活，

但不能在成肌細胞中直接誘導。同時，成肌素表現量在肌管中顯著高，而 p75NTR 表現與成肌細胞相比下調，表明 NT-3 誘導之成肌細胞分化與 mTORC1 激活相關。此等研究首次表明 NT-3 經由直接激活 mTOR 路徑增加神經源性肌肉中之肌肉纖維直徑，且對於快收縮纖維，纖維尺寸增加較顯著。

方法

【0212】動物、治療方案及組織病理學：TrJ 小鼠(B6.D2-Pmp22Tr-J/J)及 C57BL/6 野生型獲自傑克遜實驗室(Jackson Laboratory)(緬因州巴港(Bar Harbor, ME))。將九至 12 週齡 TrJ 小鼠用 PBS(n=6)或 3×10^{10} vg 自補(sc)AAV1.tMCK.NT-3 載體(n=6)注射至左腓腸肌中。另一組 TrJ 小鼠注射 1×10^{11} vg 單股 AAV1.CMV.NT-3 以誘導高 NT-3 表現量用於比較(n=6)。WT 小鼠接受 PBS(n=6)或 3×10^{10} vg 之 scAAV1.tMCK.NT-3 載體(n=4)。使小鼠之組安樂死且在基因注射後 16 週收集其肌肉且將肌肉處理用於低溫恆溫切片。使用內部建立之標準方案，使用琥珀酸脫氫酶(SDH)酶組織化學評估代謝纖維類型分化。自 12[錫濃 SHH 染色橫切片獲得]肌肉纖維類型比直徑量測值。使用奧林巴斯(Olympus)BX41 顯微鏡及 SPOT 照相機在 $\times 20$ 放大率下沿中軸線(每個動物每個區域每個部分)拍攝三個圖像，每個圖像代表腓腸肌之三個不同區域(主要由 STO 構成之深區域、展示 STO 及 FTO 或 FTG 之棋盤形外觀之中間區域及主要由 FTG 纖維構成之表面區域)。選擇此方法以捕獲回應於治療之代謝變化的每一區域中纖維之氧化狀態的改變。藉由使用蔡司(Zeiss)Axiovision LE4 軟體量測穿過肌肉纖維之最短距離來確定暗(STO)、中間(FTO)及淺(FTG)纖維之直徑，且表示為總數之百分比。平均

纖維直徑(平均值 $\pm$ SEM)來源於將每一組中所有 3 種纖維類型組合。每組量測平均 1250 根纖維(在 960 至 1486 之間)。

【0213】 AAV.NT-3 載體之產生及效力：先前描述在 tMCK 或 CMV 啟動子下具有含有 NT-3 之血清型 1 的自互補 AAV 病毒載體之設計，其在哥倫布全國兒童醫院(Nationwide Children's Hospital, Columbus)之病毒載體核心中產生。Sahenk 等人，《分子療法》，22(3):511-521 (2014)。將等分病毒保持在-80℃直至使用。在注射後 6 週及 16 週藉由麻醉下之眼出血自經治療及未經治療的小鼠收集血液樣品，且使用捕獲 ELISA 測定血清之 NT-3 含量。

【0214】 C2C12 成肌細胞培養及肌管形成：C2C12 成肌細胞在 37℃及 5% CO₂ 下在加濕室中在補充有 10% FBS(加利福尼亞州卡爾斯巴德(Carlsbad, CA)Fisher Scientific, #26-140-079)及 1%青黴素/鏈黴素溶液(加利福尼亞州卡爾斯巴德 Gibco-Invitrogen, #15640055)之 DMEM 培養基(加利福尼亞州卡爾斯巴德 Gibco-Invitrogen, #10569010)組成之生長培養基(GM)中培養。藉由將 GM 轉換為分化培養基[DMEM(加利福尼亞州卡爾斯巴德 Gibco-Invitrogen, #11965092)，補充有 5%馬血清(加利福尼亞州卡爾斯巴德 Gibco-Invitrogen, #26050088)及 1%青黴素/鏈黴素溶液(加利福尼亞州卡爾斯巴德 Invitrogen, #15640055)]，在匯合經培養細胞上誘導肌管形成。在誘導肌管形成後 3 天用包含 QPCR、西方墨點法及 ELISA 之開始用肌管進行所有後續測定。將成肌細胞及肌管均暴露於 6 孔培養盤中濃度為 100 ng/ml 之重組人 NT-3(新澤西州羅基希爾(Rocky Hill, NJ)Pepprotech)。根據製造商的說明，藉由使用葡萄糖及乳酸測定試劑盒(加利福尼亞州聖地牙哥(San Diego, CA)Eton Bioscience)收集培養

基用於檢測葡萄糖消耗及乳酸形成。

【0215】 QPCR 實驗：在終點處自經 NT-3 治療及未經治療之對照小鼠之腓腸肌分離總 RNA。在 NT-3 治療之前及 48 小時之後自成肌細胞及肌管分離總 RNA。使用 mirVana RNA 分離試劑盒(美國得克薩斯州(TX, USA)Life Technologies, # AM1560)，隨後藉由按照製造商之說明書，使用 Trascriptor First Strand cDNA 合成試劑盒(美國羅氏(Roche, USA) # 04379012001 羅氏)合成 cDNA。藉由使用 iTaqTm 通用 SYBR® Green 超混合液(美國加利福尼亞州赫拉克勒斯(Hercules, CA, USA)Biorad, #1725122)進行其他 qPCR 實驗。PGC 1 α (Cunningham 等人，《自然(Nature)》，450(7170):736-740 (2007))及 GAPDH(Toscano 等人，《分子療法》，18(5):1035-1045 (2010))之引物序列(管家基因)見於文獻中。其他引物序列自 Primer Band 發現。Wang 等人，《核酸研究(Nucleic acids research)》，40(資料庫期刊(Database issue)):D1144-1149 (2012)。藉由使用 ABI 7500 實時 PCR 儀進行所有 qPCR 實驗，且使用資料輔助軟體(ABI)分析結果。

【0216】 蛋白質提取及西方墨點法實驗：將冷凍之腓腸肌塊切成 20 μ l 厚度，放入小的 2 ml 塑膠管中(每塊 15-20 個切片)且使用自動丸粒混合器及一次性研杵以 20 秒週期持續三次在裂解緩衝液中均質化[RIPA 裂解緩衝液(美國賽默飛世爾(Thermo Fisher), #89900)，藉由 1x Halt 蛋白酶抑制劑(美國賽默飛世爾, #78429)及 1x 磷酸酶抑制劑(美國 Sigma, #P0044)]。對於活體外信號轉導測定，在與 NT-3(100 ng/ml)培育 30 分鐘後，將成肌細胞及肌管收集在小的 2 ml 管中，且以與如上所述之相同方式裂解。將裂解物在 4°C 下以 13,000 rpm 離心 10 分鐘且小心收集上清

液。藉由使用 BCA 蛋白質測定試劑盒(美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆(Waltham, MA, USA)賽默飛世爾, #23252)量測蛋白質濃度。蛋白質樣品(10-40 μ g)在 4-12% Bolt® Bis-Tris Plus 預製 10 或 15 孔聚丙烯醯胺凝膠(賽默飛世爾, #NW04120BOX)中運行且轉移至 PDVF 膜(美國匹茲堡(Pittsburgh, USA)GE Healthcare, #10600021)。將膜在室溫下用 5%牛血清白蛋白(美國馬薩諸塞州貝德福(Bedford, MA, USA)BSA)在含有 0.05% Tween-20 之 TBS 緩衝液(美國俄亥俄州(OH, USA)Amresco, TBS-T)中阻斷 2 小時, 且與適當一次抗體培養箱在含有 5% BSA 之 TBS-T 緩衝液中一起培育在 4°C 冷室中過夜。此研究中所使用之一次抗體如下: 抗磷酸化 S6 蛋白 Ser235/236 (#4858)、抗 S6 蛋白(#2217)、抗磷酸化 Akt Ser473 (#4060)、抗 Akt (#9272)、抗磷酸化 4E-BP1 thr37/46 (#2855)、抗 4E-BP1 (#9644)、抗 GAPDH(聖克魯斯(Santa cruz), #sc365062)。在具有 TBS-T 之定軌振盪器上洗滌 5 分鐘 5 次後, 將膜與來自美國明尼蘇達州明尼阿波利斯(Minneapolis, MN, USA)R & D Systems 之二次抗體[HRP 結合抗兔(#HAF008)、HRP 結合抗小鼠(HAF007)]在 TBS-T 緩衝液中之 5%乾奶中一起培育 1 小時。以與以上相同之方式用 TBS-T 再次洗滌膜, 且隨後與 ECL Prime western 檢測試劑(美國新澤西州(NJ, USA)Amersham, #RPN2232)一起培育 1 至 3 分鐘, 隨後使用多次曝光時間曝露於 X 射線膠片(美國馬薩諸塞州(MA, USA)Denville, #E3018)。使用照相機(日本索尼(Sony)A600)拍攝膜上之蛋白質帶, 且使用(Quantity-One 軟體, BioRad, v.4.6.9)對帶強度進行定量。藉由將帶強度標準化至相同樣品中 GAPDH 之含量來確定每一樣品中所分析之蛋白質的相對含量。將膜用 0.1%考馬斯亮藍 R 染色(美國賽默飛世爾)染色, 漂

洗且拍照以確認每一道中之蛋白質裝載量相等。

【0217】統計：對於經治療組與未經治療組之間的肌肉纖維尺寸比較，使用單因素方差分析(變異數分析)在 Graph pad Prism 6 軟體中進行統計分析。當適用於其他統計分析時，進行 Student t 檢驗或單因子變異數分析。顯著性水準設定為 $P < 0.05$ 。在所有實驗中，結果以平均值 $\pm$ SEM 形式給出。

結果

AAV1.NT-3 誘導之 TrJ 肌肉纖維類型重塑

【0218】此前在 TrJ 肌肉中，觀測自快型纖維至慢型纖維之轉換作為神經性表型的一部分。Nicks 等人，《神經病理學及實驗神經學雜誌》，72(10):942-954 (2013)。在此研究中，SDH 染色用於藉由自如所描述之肌肉之深區域、中間區域及表面區域取樣評估 TrJ 之腓腸肌及年齡匹配之 WT 中之代謝纖維類型分化。在基因注射後 16 週時，與未經治療(PBS)組相比，存在 STO 纖維顯著減少以及纖維尺寸增加，尤其 FTO 及 FTG 類型，未經治療組展示神經原性變化、小角纖維及類型分組。(圖 1A 及圖 1B)。定量研究表明，在 TrJ-PBS 肌肉中，每單位面積之數目以及 STO 纖維之百分比均顯著高於 WT 肌肉，與先前研究一致。在治療組中， 1×10^{11} vg 劑量之 AAV1.NT-3 與兩種啟動子產生低(tMCK)或高(CMV)NT-3 表現(圖 4)，展示自 STO 至 FTO/FTG 纖維之纖維類型轉換。兩個治療組中 STO 之平均密度或百分比(來源於各組中 $n=3-5$ 隻小鼠)與 WT 肌肉無顯著差異，表明在 NT-3 之情況下纖維類型分佈朝正常化之變化(圖 1C)。此外，經 AAV1.NT-3 治療之 WT 肌肉未顯示纖維類型分佈概況中之顯著變化。

【0219】 TrJ 小鼠中之 NT-3 治療展示對肌肉纖維尺寸增加之差異性影響(表 2)。當 NT-3 在 tMCK 啟動子之控制下表現時，僅在 FTG 纖維中觀測到顯著直徑增加。在用 CMV 啟動子獲得高 NT-3 表現之第二治療組中，在所有纖維類型中存在顯著直徑增加。引起關注地，此劑量依賴性 NT-3 效果僅見於神經源性 TrJ 肌肉；在基因注射後 16 週，在相同時間點在採用 NT-3 基因療法之 WT 肌肉中之任一纖維類型中未發現顯著直徑變化。

【0220】 表 2 展示在 NT-3 基因療法後神經源性 TrJ 肌肉的纖維尺寸增加對於快收縮纖維較顯著。

【0221】 平均纖維直徑

	WT (n=3)		WT +NT3 (n=4)		TrJ-PBS (n=3)		TrJ-tMCK (n=4)		TrJ-CMV (n=5)	
	數目	直徑 (μm)	數目	直徑 (μm)	數目	直徑 (μm)	數目	直徑 (μm)	數目	直徑 (μm)
STO	315	31.4 ± 0.35	413	31.25 ± 0.32	605	28.52 ± 0.29*	524	29.41 ± 0.23	436	33.46 ± 0.4*
FTO	262	38.09 ± 0.5	378	37.35 ± 0.39	273	34.32 ± 0.65*	457	35.33 ± 0.47	374	39.15 ± 0.6*
FTG	383	46.02 ± 0.45	525	45.76 ± 0.4	194	39.79 ± 0.74 [†] *	505	43.77 ± 0.41*	458	44.35 ± 0.52*
全纖維	960	39.06 ± 0.32	1316	38.79 ± 0.28	1072	32.04 ± 0.3*	1486	36.11 ± 0.27*	1268	39.07 ± 0.32*

*, p < 0.001

TrJ 肌肉中之經 AAV-NT-3 改善之 mTOR 傳信及代謝標誌物

【0222】 以上展示之在響應 AAV1.NT-3 治療之 TrJ 肌肉中的組織學發現促使研究 mTORC1 活化是否在 NT-3 誘導之肌肉纖維輻向生長中起作用。藉由來自組之肌肉樣品中其下游底物 4EBP-1 及核糖體 S6P 之磷酸化含量評估 mTORC1 之活性。在經 AAV1.NT-3 治療之 TrJ 肌肉中，與

自 TrJ-PBS 對照物獲得之未經治療對應物相比，磷酸化 4EBP-1 及 S6P 之含量顯著增加(圖 2A)。對比而言，發現 NT-3 治療不顯著影響 WT 肌肉中 4EBP-1 及 S6P 之磷酸化含量(圖 2B)。

【0223】經由 4E-BP，mTORC1 調節核編碼之粒線體蛋白的合成，控制粒線體活性及生物發生，因此協調能量消耗及生產[17]。因此，粒線體生物發生之主調節子 PGC1 α 在經 NT-3 治療之 TrJ 肌肉中上調，表明 NT-3 能夠逆轉在神經源性肌肉中所發現之缺乏的 PGC1 α 表現量(圖 2C)。與缺少 mTORC1 活化一致，在用 NT-3 治療之 WT 肌肉中未發現 PGC1 α 表現量之變化(圖 2C)。採用 NT-3 基因療法之 TrJ 肌肉纖維尺寸增加主要發生在 FTO 及 FTG 纖維中，其具有比慢纖維更大之糖酵解活性[18]。一致地，亦發現糖酵解之限速酶 HK1 及 PK1 在經治療 TrJ 肌肉中的表現上調，表明糖酵解通量增加。此等變化在經 AAV.NT-3 治療之 WT 肌肉中不顯著。

NT-3 經由 C2C12 肌管中之 TrkC 受體激活 Akt/mTORC1 路徑

【0224】本文中所描述之活體內研究展示 AAV1.NT-3 治療誘導之 TrJ 肌肉中的纖維尺寸增加及纖維類型重塑與 mTORC1 激活相關。然而，需要回答此變化是否僅為神經再支配之結果，或 NT-3 獨立於神經再生可直接改變肌肉蛋白質合成及細胞代謝之問題。作為下一步驟，研究活體外系統中 NT-3 對 mTOR 路徑之直接影響，藉由將 C2C12 成肌細胞及肌管暴露於重組 NT-3 而不受神經影響。結果表明 NT-3 可誘導肌管中之 Akt/mTOR 路徑激活(圖 3A)，但在成肌細胞中不能。與對照組相比，用 100 ng 重組 NT-3 治療肌管 30 分鐘產生顯著較高之 Akt、4EBP1 及 S6P 的磷酸化(圖 3A)。在另一組實驗中，發現 NT-3 在 48 小時培育後顯著增

強粒線體生物發生標記物 PGC1 α 之表現及肌管中之糖酵解標記物 PK1(圖 3B)。因此，此時對上清液之分析顯示，與對照相比，經 NT-3 治療之肌管中葡萄糖消耗及乳酸產生增加(圖 3C)。在進行此等實驗之條件下，未觀測到 NT-3 對 HK1 表現量之影響。

【0225】 分析 p75NTR 及 TrkC 受體及成肌素之表現，成肌素為成肌細胞進入成肌細胞及肌管培養物中之分化路徑的標誌物。NT-3 經由其較佳受體 TrkC 或與低親和力神經營養蛋白受體 p75NTR 的結合發揮其生物作用。Schechterson LC, Bothwell M, 《神經元(Neuron)》, 9(3):449-463 (1992)。p75NTR 在 C2C12 成肌細胞中表現且在肌原性分化期間下調。Seidl 等人, 《細胞生理學雜誌(Journal of cellular physiology)》, 176(1):10-21 (1998)。已表明神經營養因子 NGF 經由 p75NTR 影響肌原性分化及細胞生長，且認為 p75NTR 之下調為肌原性分化所必需的。與 NGF 效果類似，發現 NT-3 亦增強肌管中成肌素之表現，且如所預期，與肌管相比，此與成肌細胞中 p75NTR 之驚人地較高表現相關，而 TrkC 表現量在兩組中沒有差異。(圖 3D)。NT-3 對成肌細胞或肌管中此等受體之表現量未發揮差異性影響。

討論

【0226】 本文中提供 NT-3 可具有對神經源性肌肉代謝直接影響，經由激活 mTORC1 引起纖維尺寸增加及將纖維類型向正常化重塑的證據。對於 II 型纖維，尤其對於 FTO 亞型，纖維尺寸增加最顯著。此外，展示 NT-3 可在肌管中誘導 Akt/mTOR 路徑激活作為其在神經源性肌肉中活體內影響之重要貢獻因素，但不能在成肌細胞中直接誘導。引起關注地，在相同劑量下在 WT 肌肉中之 NT-3 基因療法不影響此等特性，儘管

未研究 NT-3 對使用基因療法範例之去神經支配之 WT 肌肉的影響。NT-3 對 II 型肌肉纖維亞型之差異性影響先前在具有或不具有局部遞送 NT-3 至神經擠壓部位之神經修復後 8 個月在大鼠腓腸肌中展示，且發現 Iib 型纖維之比例及尺寸返回至正常。Sterne 等人，《細胞生物學雜誌(J Cell Biol)》，139(3):709-715 (1997)。然而此影響被解釋為 NT-3 增強之軸突再生具有對運動靶器官有益的結果，以及 NT-3 之可能性可特別影響確定 Iib 型肌肉纖維表型之運動神經元的子集。可以認為，來自吾人之活體內研究可代表 NT-3 對神經及肌肉之組合作用。然而，吾人之活體外資料強調經由 Akt/mTORC1 之激活 NT-3 對肌肉代謝具有直接影響之證據，且此直接影響可能在神經源性肌肉中很重要，引起 FTG(亦即，Erb 型纖維)之優先尺寸增加。

【0227】在表現組成型活性形式之 Akt 之條件性基因轉殖小鼠中引起歸因於 III 型肌肉纖維之生長的肌肉肥大。Izumiya 等人，《細胞代謝(Cell metabolism)》，7(2):159-172 (2008)。此與糖酵解中涉及之轉錄物的上調、葡萄糖消耗及乳酸產生增加有關，其與胰島素含量降低、血液中之升糖素含量增加及對高脂飲食誘導之肥胖的抗性相關聯。相反，mTOR 失活與糖酵解酶 PK1 及 HK1 之減少有關。Risson 等人，《細胞生物學雜誌》，187(6):859-874 (2009)。在吾人之研究中，TrJ 肌肉之 AAV.NT-3 治療增加 FTG 纖維之尺寸及糖酵解酶 PK-1 及 HK-1 之表現。此外，活體外研究表明，NT-3 增加肌管中之葡萄糖攝取及乳酸形成以及 PK-1 之上調。雖然此等結果表明 NT-3 可藉由調節快/糖酵解纖維參與控制全身代謝，需要進一步研究來將其作用詳細特徵化。此外，AAV.NT-3 治療能夠逆轉 TrJ 神經源性肌肉中所發現之缺乏的 PGC1 α 表現量，以及增加活化 4E-

BP1 之含量。此前提出在骨骼肌中，mTOR 經由 4E-BP1/PGC1 α 調節粒線體生物發生及代謝。Tsai 等人，《臨床研究雜誌(J Clin Invest)》，125(8):2952-2964 (2015)。NT-3 亦可經由激活 4EBP1 及 PGC1 α 在肌肉中起到促進氧化磷酸化之作用。

【0228】發現 NT-3 首先在胎兒發育期間在中樞神經系統(CNS)中具有高含量且在成人大腦中減少，表明其在早期神經元發育期間具有中心作用[28, 29]。NT-3 在周邊神經中亦重要，且在神經肌肉發育之多個階段中具有積極影響。在非洲爪蟾神經肌肉共培養肌源性 NT-3 顯著增強神經肌肉接合處突觸傳遞之成熟[30-33]。此外，NT-3 增加神經肌肉系統之關鍵元件 SC 的存活率[34]。以 SC 表示之 NT-3 促進神經再生，且為自分泌存活循環之重要組成部分，確保成人神經中 SC 存活及分化[35-39]。在 CMT1A 小鼠模型之研究中，觀測到數個 NT-3 之重要生物效應，(i)SC 數目之增加，(ii)有髓鞘纖維數目之增加，及(iii)軸突神經絲細胞骨架之正常化[5, 40]。此處另一備受關注之 NT-3 效應為髓鞘厚度的增加，其被認為係 NT-3 可影響髓鞘蛋白產生之形態學證據。

【0229】早期研究表明，mTORC1 具有調節 CNS 中髓鞘形成之作用。組成型活性 Akt 激酶之轉殖基因過度表現足以經由 mTOR 發信增強 CNS 髓鞘膜生長[41, 42]且在寡樹突細胞先驅細胞中 IGF-1 刺激之蛋白質合成需要 PI3K/Akt 及 MER/ERK 路徑[43]。NT-3 針對轉譯機制的之能力刺激髓鞘蛋白合成首先在寡樹突細胞原代培養中所展示[44]。發現 NT-3 經由 PI3K/mTOR 路徑上調寡樹突細胞中之 4EBP1 磷酸化。使用基因失活方法，特別地消除 SC 中 mTOR 功能通常影響其髓鞘形成能力[45]。事實上，在突變體中，發現髓鞘薄、節間長度短且軸突之輻向生長受損。同

時，mTOR 下游靶標 S6 及 4E-BP1 之磷酸化程度較低[45]。

【0230】根據此等先前研究，NT-3 可能藉由相同機制，經由激活 mTORC1 直接影響對肌肉纖維直徑增加產生影響。值得注意的是，在 TrJ 中所使用之相同劑量之 WT 肌肉中的 NT-3 基因療法不誘導纖維類型尺寸或類型分佈之顯著變化。WT 肌肉中之此等觀測結果表明 NT-3 影響不針對分化良好或功能正常之細胞，而是在可由病理過程引起之重塑細胞代謝時起作用。一個支持證據為 NT-3 不改變 WT 動物擠壓損傷後之功能性恢復，使得軸突僅比對照或經 NGF 治療之動物略多[46]。吾人之評估 scAAV1.tMCK.NT-3 的毒理學研究與此等觀測結果一致，未展示與治療相關之毒性或 C57BL/6 或 TrJ 小鼠中器官組織的組織病理學異常，TrJ 小鼠以 1×10^{13} vg/kg 給藥，其比建議用於治療 CMT1A 之人體試驗的最高劑量高 10 倍。

【0231】在肌肉發育期間，p75NTR 在將形成肌管/肌肉纖維之成肌細胞上瞬時表現或分化為衛星細胞[23]。受體之時間表現模式指示 p75NTR 在分化前介導成肌細胞之存活，且此受體在肌生成期間之活性對於發育肌肉很重要[23]。類似於 NGF 效應[21]，發現 NT-3 增強肌管中成肌素之表現，且如所預期，此與成肌細胞中 p75NTR 之驚人地較高表現有關，其在肌管中顯著下調。檢查 TrJ 及 WT 肌肉樣品中之 p75NTR 及 TrkC 表現，且發現與 WT 相比，神經源性 TrJ 肌肉中兩者顯著高的表現量，且含量回應於 NT-3 下降(圖 5)。雖然引起關注，但此觀測結果並未能得出關於哪些細胞類型表現此等受體，或其是否在全部肌肉纖維中或僅一種肌肉纖維之亞型中，在衛星細胞或 SC 中表現的任何結論。有關 NT-3 及其他神經營養蛋白之表現及其在人類肌肉疾病中之受體的可用資料有

限。然而，迄今為止之近期研究將肌肉活檢之組織學研究與對原代肌肉前體細胞之分子及細胞分析結合，表明 p75^{NTR} 在活體內由大部分衛星細胞表現，且為發炎及營養不良肌肉中纖維再生之標誌物[47, 48]。吾人在神經源性肌肉中之發現尤其受關注，且需要更全面研究不同疾病過程中之機制。

【0232】作為保守的 Ser/Thr 激酶，mTOR 藉由整合來自營養素、生長因子、能量狀態及環境壓力之信號，為細胞生長之主要調節劑。mTOR 在細胞生物學及病理學中，尤其在具有顯著代謝及形態適應能力之肌肉中至關重要的作用目前引起極大關注。mTOR 與猛禽結合形成 mTORC1，且展示猛禽之肌肉特異性滅活導致肌肉萎縮、氧化能力受損及肝糖儲備增加，導致在氧化肌肉中最為突出之營養不良的特徵[49]。另一方面，mTOR 活性喪失加劇慢氧化及快速糖酵解肌肉之肌病特徵，且顯示類似於在缺乏猛禽之肌肉中觀測到的代謝變化，包含氧化代謝受損、粒線體調節改變及肝糖積累[26]。在使用心臟毒素誘導之肌肉壞死/再生週期之範例的研究中，諸位發明人最近展示 2A 型肢帶肌肉萎縮症之小鼠模型中的再生受損，且展示與 mTORC1 傳信中之擾動及缺乏的粒線體生物發生有關的鈣蛋白酶 3 無效肌肉(綜述)。綜合而言，本文中所描述之發現對 NT-3 之潛在用途具有多種影響，不僅用於在對神經及肌肉都有益之情況下治療神經病變，且亦用於肌肉消耗病狀，包含老化、癌症惡病質或 II 型肌肉纖維萎縮以及與再生之輻向生長期受損相關的遺傳性或獲得性自身免疫原發性肌肉病症[50-52]。瞭解在此等病症中擾動在 mTOR 傳信中之作用應允許開發新穎組合治療策略，其中 NT-3 可具有重要作用。

實例 2

使用 scAAV1.tMCK.NTF3 載體之 NT-3 遞送

【0233】投與之組合物為稱為 scAAV1.tMCK.NTF3 之非複製重組腺相關病毒，其如圖 3 中所展示。載體含有處於 tMCK 肌肉特異性啟動子之控制下的人 NT-3 基因。活體內生物效能將在將載體(1×10^{11} vg)肌肉注射至 C57B16 小鼠之腓腸肌後測試，隨後將血清中循環 NT-3 在基因注射後 4 至 6 週藉由 ELISA 進行定量。

【0234】首先證明遞送至腓腸肌之 ssAAV1.CMV.NTF3 產生延長及治療性之 NT-3 血液含量，所述血液含量足以提供 TrJ 神經中之功能性、電生理及組織病理學改善。隨後研究是否可藉由 scAAV1 包裝表現卡匣產生所需的載體劑量且實現相同表現量。對 C57BL/6 小鼠進行劑量-反應研究，比較肌肉注射 3 個劑量(3×10^9 vg、 1×10^{10} vg 及 3×10^{10} vg)之 scAAV1.tMCK.NTF3 及 scAAV1.CMV.NTF3 後的血清 NT-3 ELISA 資料。以 1×10^{11} vg 投與 sc.rAAV1.CMV.NTF3 載體產生與相同劑量之單股載體相比顯著較高之 NT-3 含量，與使用自互補載體之較大效力一致。在半對數較少之劑量(3×10^{10} vg)下，CMV 及 tMCK 載體均產生與自接收產生生物反應之 1×10^{11} vg 劑量之 ss.AAV1.CMV.NTF3 小鼠獲得 NT-3 血清含量相當的血清含量。NT-3 含量(平均值 $\pm$ SEM)來自注射後 24 週之 TrJ 小鼠。在所有 7 組中 NT-3 水平存在顯著差異，p 值 <0.0001 。對於啟動子及對照之最高及中等劑量的載體，觀測到 NT-3 含量之顯著差異。然而，分析未能發現兩種載體之較低劑量的顯著差異。克拉斯卡-瓦立斯檢定(Kruskal-Wallis test)用於比較所有組中之血清 NT-3(PBS、CMV 3×10^9 / 1×10^{10} / 3×10^{10} 及 tMCK 3×10^9 / 1×10^{10} / 3×10^{10})。曼-惠特尼 U 檢定(Mann-Whitney U test)用於比較各組與 PBS(對照)組之間的 NT-3，且

龐費洛尼校正(Bonferroni correction)用於調節多重比較。參見 Sahenk 等人,《分子療法》22(3): 511-521, 2014, 其以全文引用之方式併入本文中。

【0235】 肌肉直徑在治療後 40 週增加: NT-3 基因療法之效果在一子集之注射相較於 PBS 之 ssAAV1.CMV.NTF3(1×10^{11} vg)的動物中, 在注射後 40 週根據肌肉纖維尺寸在 TrJ 小鼠中評定。以萎縮性角纖維及組萎縮為特徵之神經源性變化在未經治療的小鼠之肌肉中明顯, 而纖維類型分組及整體纖維尺寸增加之神經再支配的證據可識別為治療效果。由左下肢之對側前部及後部肌肉(脛骨前肌及腓腸肌)產生之肌肉纖維尺寸直方圖展示纖維直徑增加。

【0236】 吾人之實驗室的其他研究表明 NT-3 刺激 SC 細胞中之 Akt/mTOR 路徑, 引起神經中改善之髓鞘形成及軸突之輻向生長, 且 NT-3 亦經由 Trk-C 受體對肌管產生直接刺激效應, 表明其在 TrJ 小鼠肌肉纖維直徑增加中之作用。圖 3A 展示 NT-3 增加在 SC 及肌管培養物中 Akt(P-Akt)及 mTOR 靶標 4EBP-1(P-4EBP1)及 PS6K(P-S6K)之磷酸化。此等研究提供證明吾人在此臨床試驗中選擇小腿前部及後部肌肉用於載體遞送之證據。

【0237】 自互補(sc)AAV1 之研究及肌肉特異性截短肌酸激酶(tMCK)啟動子之使用

【0238】 scAAV 允許增加安全性之較低劑量, 及將符合生產標準之劑量含量。使用 tMCK 啟動子為有價值之目標, 藉由避免脫靶效應同樣提供較高安全性。在以下一組實驗中, 將均以三種劑量在半對數範圍內(3×10^9 vg、 1×10^{10} vg 及 3×10^{10} vg)給予之在 CMV 啟動子控制下之

scAAV1.NTF3 的功效與肌肉特異性 tMCK 啟動子進行比較。在基因轉移後 24 週藉由電生理學(表 3)及形態學研究對 TrJ 小鼠周邊神經中 AJ1.NTF3 基因轉移功效進行評定。藉由使用 ELISA 量測血清 NT-3 含量評定轉殖基因表現之證據。

【0239】 表 3.TrJ 坐骨神經中之 CMAP 及傳導速度

治療組(數目)		潛時(ms)	歷時(ms)	CMAP (mV)	面積(mVms)	傳導速度(m/s)
PBS	29	2.36 ±0.08	7.00 ± 0.42	0.42 ± 0.03*	0.70 ± 0.09	8.24 ± 0.43
AAV1.NTF3.CMV-HD	23	2.43 ±0.10	6.58 ± 0.50	0.57 ± 0.04*	0.84 ± 0.09	10.30 ±0.65
AAV1.NTF3.tMCK-HD	27	2.52 ± 0.07	5.64 ± 0.49	0.54 ± 0.03**	0.64 ± 0.04	8.90 ± 0.56
AAV1.NTF3.CMV-ID	21	2.08 ± 0.09	5.20 ± 0.38	0.46 ± 0.04	0.61 ± 0.07	9.00 ± 0.63
AAV1.NTF3.tMCK-ID	26	2.20 ± 0.08	5.85 ± 0.42	0.45 ±0.03	0.61 ±0.06	9.01 ±0.40
AAV1.NTF3.CMV-LD	22	2.23 ±0.10	6.38 ± 0.53	0.48 ± 0.04	0.68 ± 0.07	8.95 ± 0.74
AAV1.NTF3.tMCK-LD	23	2.18 ±0.06	7.29 ± 0.60	0.43 ± 0.03	0.80 ±0.08	8.40 ± 0.59

*p=0.0017; **p=0.0051; 值為平均值± SEM; HD=高劑量; ID=中等劑量; LD=低劑量

【0240】 電診斷研究期間的檢查者對治療組不知情。在 CMAP 上 AAV1.NTF3.CMV(高劑量，HD)與 AAV1.NTF3.tMCK(高劑量，HD)之間不存在統計學差異，且較佳使用肌肉特異性 tMCK 啟動子。此由在 ELISA 檢驗中之 NT-3 含量進一步支持，其中對於啟動子及對照之最高及中等劑量的載體觀測到 NT-3 含量之顯著差異。

【0241】 本文所列舉之所有專利、專利申請及出版物以及電子方式獲得之材料的完整揭示內容以引用之方式併入本文中。僅出於清楚理解之目的，給出前述實施方式及實例。不應理解其存在不必要的限制。本發明不限於所展示及所描述之確切細節，對於所屬領域技術人員顯而易見之變化將包含在由申請專利範圍界定之本發明內。

實例 3

表現 AAV 構建體之 NT-3 的構建

【0242】 此前在 Sahenk 等人，《分子療法》，22(3):511-521 (2014) 中描述在 tMCK 或 CMV 啟動子下具有含有 NT-3 cDNA 之血清型 1 的自互補 AAV 病毒載體的設計，其以全文引用之方式併入本文中。將等分病毒保持在-80℃直至使用。在注射後 6 週及 16 週藉由麻醉下之眼出血自經治療及未經治療的小鼠收集血液樣品，且使用捕獲 ELISA 測定血清之 NT-3 含量。構建體在本文中稱為 scAAV1.tMCK.NTF3。

【0243】 tMCK 啟動子/增強子序列用於驅動肌肉特異性基因表現，且由肌肉肌酸激酶啟動子及與其融合之添加的增強子元件(enh358MCK，584-bp)構成。將三重串聯之 MCK 增強子(206-bp)連接至 tMCK 啟動子/增強子中之 87-bp 基本啟動子。

【0244】 scAAV1.tMCK.NTF3 藥品藉由人 HEK293 主細胞庫細胞之 3 質體 DNA 用以下轉染生產：(i)pAAV.tMCK.NTF3-載體質體(參見圖 7)，(ii)AAV1 輔助質體稱為 R88/C1，其含有 AAV rep2 及 Cap1 野生型基因及(iii)輔助腺病毒質體。

【0245】 具有分子特徵及開放閱讀框之質體的示意圖在 7 中所展示。衍生自 pAAV.tMCK.NTF3 質體之 AAV 載體基因組為自互補 DNA 基因組，其含有由 AAV2 反向末端重複序列(ITR)側接之人 NTF3 cDNA 表現卡匣。此序列囊封至 AAV1 病毒粒子中。藉由將驅動 NTF3 基因序列之 tMCK 表現卡匣插入至 AAV 選殖載體 psub201 中構建質體 pAAV.tMCK.NTF3。人 NTF3 基因由小鼠三重串聯 MCK 啟動子表現，所述啟動子為先前所描述之 CK6 啟動子的修飾，且含有三重 E 盒序列。SV40 多腺苷酸化信號用於有效轉錄終止。盒亦含有嵌合內含子，用於增加基因表現，且由來自人 β 球蛋白基因之第一內含子的 5'供體位點及來自

內含子之分支點及 3'剪接受體位點構成，所述內含子在免疫球蛋白基因重鏈可變區之前導子與主體之間。NTF3 表現卡匣在 ATG 啟動正前方具有共同 Kozak，及 200bp SV40 polyA 信號用於有效 mRNA 終止。包含整個 NTF3 cDNA(NCBI 參考序列：NM_001102654)。此載體中包含之唯一病毒序列為 AAV2 之反向末端重複，其為病毒 DNA 複製及包裝所需的。AAV ITR 為兩端幾乎相同但相反取向之序列。「左」(突變)ITR 缺失末端解析位點以允許基因組之髮夾形成。藉由質體源原種上之 DNA 質體定序確認所有 DNA 質體元件之身分標識。

【0246】 表 4 中展示 SEQ ID NO: 11 之 AAV 載體 DNA 質體內相關分子特徵的鹼基對位置。

表 4.質體 sc pAAV.tMCK.NTF3 之分子特徵				
類型	開始	結束	名稱	描述
區	7	112	5' ITR	具有末端解析位點缺失之 AAV2 反向終端重複
區	147	860	tMCK 啟動子/增強子	小鼠肌肉肌酸激酶啟動子/增強子
區	892	1024	嵌合內含子	來自人 β 球蛋白之 5'供體位點及來自 IgG HC 可變區之分支點及 3'剪接受體位點。
基因	1077	1850	人 NTF3 基因	人 NTF3 基因
區	1860	2059	SV40 pA	SV40 多腺苷酸化信號
區	2121	2248	3' ITR	野生型 AAV2 反向末端重複
基因	4032	4892	AmpP ^r	AmpP ^r 抗性基因
區	5040	5707	ori	質體複製起點

實例

4 I 期肌內研究

【0247】 對於初始 I 期肌內(IM)安全性研究，持續 NT-3 轉殖基因表現為此第一階段中所提出的結果量測，其重要性有數個原因。毒性之真

實評定取決於證明基因表現。若肌肉未經轉導，則毒性(不良效應)測試將較難以解釋(轉導失敗與基因表現喪失)。研究提供建立明確識別轉殖基因表現且將其與內源性基因表現區分開之方法的機會。

【0248】 此臨床試驗為開放標記的一次性注射遞增劑量研究，其中 scAAV1.tMCK.NTF3 藉由肌肉注射投與至具有 PMP22 基因重複之 CMT1A 個體的兩條腿的腓腸肌及脛骨前肌中。九位成年 CMT1A 患者，18 歲及更年長者入選至在此試驗中之兩組之一。前三個個體參加組 1 中兩肢之間雙側分配之低最低有效劑量(2.0×10^{12} vg/kg)。在組 2 中徵選額外六個個體，其中 3 倍劑量遞增(6.0×10^{12} vg/kg)。基因轉移後監測包含第 7、14、30、60、90、120 日及延伸 2 年之試驗之其餘部分的 3 個月間隔之隨訪。安全性為此臨床基因轉移試驗之主要終點。停止標準基於不可接受之毒性的發展，其定義為在兩週後未解決之任何 II 級眼部或全身毒性或任何 III 級或更高級別之毒性的出現。次要終點為功效，其定義為基因轉移後 2 年藉由 CMT 兒科量表(CMTPedS)量測之能力減退的停止。CMTPedS 為 11 項量表，包括功能靈活性測試、九孔釘測試(9HPT)、手握、足蹠屈及使用手持式測力之足背屈強度、針刺及振動感覺、Bruininks Oseretsky 測試-平衡評估、步態評估、跳遠及六分鐘步行測試(6MWT)。探測性結果量測將包含 100 公尺定時測試(100M)、腓骨及尺骨 CMAP 幅度及感官及運動傳導速度、增加對針刺之敏感性的經修訂感官測試、觸摸測試及振動評估、疼痛及疲勞之視覺模擬量表、作為生活品質量度之簡式健康調查(SF-36)及循環 NT-3 含量。

【0249】 參加試驗之患者包含任何人種、種族或性別背景。已定義了此疾病之標準，且將遵循先前由 Shy 等人(Neurology 64: 1209-1214,

2001 及 Neurology 70:378-383, 2008)所建立之準則。

【0250】 研究之納入標準如下：

- 診斷患有 CMT1A 之成人個體(>18 歲)
- 必須展現 17p11.2 處 1.5Mb 重複，包含周邊髓鞘蛋白 22(PMP22)

基因

- 任何種族或人種群體之男性及女性
- 必須展現踝背屈肌肉無力(應有對抗重力之完整 ROM，但無法對抗重力保持完全背屈或能夠站立 3 秒或更長時間(Northstar 標準)]

- 神經傳導速度異常
- 能夠合作進行臨床評估及重複神經傳導研究
- 在研究期間，性活躍個體願意採用可靠避孕方法

研究之排除標準如下：

- 基於臨床觀測或血清學證據之或 HIV 或 A 型、B 型或 C 型肝炎感染之活性病毒感染

- 進行之免疫抑制療法或在開始試驗後 6 個月內之免疫抑制療法(例如皮質類固醇、環孢菌素、他克莫司、甲胺蝶呤、環磷醯胺、靜脈內免疫球蛋白)

- 持續性白血球減少症或白血球增多症($WBC \leq 3.5 \text{ K}/\mu\text{L}$ 或 $\geq 20.0 \text{ K}/\mu\text{L}$)或絕對嗜中性白血球計數 $< 1.5 \text{ K}/\mu\text{L}$

- 具有如藉由 ELISA 免疫測定所測定之 AAV1 結合抗體效價 $\geq 1:50$ 的個體

- PI 認為對基因轉移產生不必要風險之伴隨疾病或對慢性藥物治療之要求

- 踝攣縮或妨礙適當肌肉力量測試之手術
- 懷孕、母乳哺育或計劃懷孕
- 神經病變之其他原因
- 過去六個月中之肢體手術

表 5 研究設計

組	劑量 (vg/kg)	*患者重量 (kg)	*濃度 (vg/mL)	體積/70 kg 患者(mL)	體積/腿 (mL)	注射/腿 (#)
1.低劑量雙側 (n=3)	2×10 ¹²	70	1.5×10 ¹³	9.33	4.67	5
2.高劑量雙側 (n=6)	6×10 ¹²	70	1.5×10 ¹³	28.00	14	14

*表 5 提供作為實例之基於 70 Kg 之患者體重之給藥計劃的概述。給藥體積基於約 1.5×10¹³ vg/ml 之目標產物濃度。

注射前之基線量測(第-30 日至第-1 日)

【0251】 在獲得書面知情同意書且完成醫院註冊程序後，將執行以下基線醫療程序及量測。

- 病史
- 伴隨藥物治療之攝取
- 體檢
- 胸部 X 光檢查
- 心動回聲圖
- EKG
- 血液學血液實驗室(CBC)
- 凝血參數：血小板、PT/INR、PTT
- 臨床化學血液實驗室：膽紅素、血尿素氮(BUN)、GGT、
- 鹼性磷酸酶、甲型胎蛋白(AFP)、肌酸酐、澱粉酶、血清蛋白電

泳、電解質、葡萄糖、肌酸激酶

- 尿分析
- 病毒篩查(肝炎及 HIV)
- 妊娠試驗(僅育齡女性)
- 血液免疫學：中和抗體(AAV1)及 ELISpot
- (NT-3 及 AAV1)
- 用於 ELISA 之血清(循環 NT-3)
- 功效量測
- 探測性量測
- 注射部位之像片

注射前普賴蘇濃劑量

【0252】 在基因轉移之前，每位患者將接受經口普賴松 1 毫克/公斤/日之劑量，最大劑量為 60 毫克/日，隨後在基因轉移當日接受第二劑量。個體將在基因轉移後 24 及 48 小時接受普賴松總共 4 劑。

基因轉移方案

【0253】 攜載在 tMCK 啟動子控制下之人 NTF3 基因的自互補 AAV1(scAAV1.tMCK.NTF3)以一次雙側肌內注射投與至腓腸肌內側頭與外側頭及脛骨前(TA)肌。

基因轉移程序

【0254】 基因轉移程序如下：

- 基因轉移輸注程序在無菌條件下進行。
- 載體在無稀釋劑之情況下遞送，每位患者總共約 10 mL 至 28 mL(每肢體 5 mL 至 14 mL，所述肢體分成 3 塊肌肉)。

- 將載體在預先標記之注射器中遞送至手術室，所述注射器密封在雙重防漏袋中，在指定之經標記冷卻器中攜載。

- 向腓腸肌之每一頭及外側頭及 TA 肌投與總共 5 mL 至 14 mL 的載體，每塊肌肉總共 3 至 6 次注射(每一注射體積為 0.5 ml 至 1.0 ml)。參見圖 8A 及圖 8B 中之注射部位的示意圖。

- 注射在筋膜下方至少 0.25 cm 處，其中注射遵循由超音波引導之的肌肉的縱向軸線。

- 每一注射間隔約 1.5 cm。

住院監測

【0255】 在基因轉移注射後，個體返回至指定的住院病床，密切監測生命體徵及呼吸功能。在最初的 4 小時內，約每小時監測生命體徵，隨後每 4 小時監測一次，直至出院。藉由身體檢查及實驗室評估評定安全性。給予個體經口普賴松之第三劑量(第 1 日)，且在第二日(注射後 48 小時，第 2 日)給予第四及最終劑量之普賴松。患者將在基因轉移後約 48 小時出院(若未觀測到副作用)。

門診監測

【0256】 出院後，患者在基因轉移後第 7、14、30、60、90、120 日及延伸 2 年之試驗之其餘部分的 3 個月間隔後返回以進行隨訪。如在血清 ELISA 中用抗 NT-3 抗體所顯示，評定在所有訪視時所獲得之血液樣品的 NT-3 蛋白表現。此外，患者將在第 7、9、11、13 及 14 次訪視時進行功效及探測性量測。血清 ELISA 為功能性基因表現之直接量測，其中次要結果量測證明循環轉殖基因之功效。

主要終點：

【0257】 安全性為此臨床基因轉移試驗之主要終點。此基於不可接受之毒性的發展評估，其被定義為出現任何一種 III 級或更高的非預期治療相關毒性。

安全性量測

【0258】 每項研究均會量測安全性，伴隨一系列身高及體重、生命體徵、身體檢查及系統檢查，及一連串血液實驗室工作。實驗室工作將包含 CBC、血小板、血尿素氮(BUN)、GGT、膽紅素、鹼性磷酸酶、甲型胎蛋白、肌酸酐、澱粉酶、血清蛋白電泳、電解質、葡萄糖、PT/INR 及 PTT、CK、尿分析。免疫學由以下組成：針對 AAV1 之中和抗體及用於檢測針對 NT-3 之抗體的 ELISA，用於檢測針對 AAV1 及 NT-3 之 T 細胞應答的 ELISpot。將記錄所有不良事件且評定基因轉移之相關性。

次要終點

【0259】 臨床基因轉移試驗之次要終點為功效，其定義為在基因轉移後 2 年藉由 CMT 兒科量表(CMTPedS)量測之能力減退的停止。

【0260】 對於上肢端(手握)及腿(足背屈)之遠端運動，使用手持式測力計進行上肢及下肢肌肉力量測試。用於測試之肢端被固定用於測試，其顯著提高足等長收縮量測之可靠性(29)。藉由 9 孔釘測試(9HPT)量測上肢功能。用定時 10 公尺跑步/步行(T10MW)測試量測下肢功能。

探索測性結果量測

【0261】 探測性結果包含 100 公尺定時測試(100M)、腓骨及尺骨 CMAP 幅度及感官及運動傳導速度、增加對針刺之敏感性的經修訂感官測試、觸摸測試及振動評估、疼痛及疲勞之視覺模擬量表、作為生活品質量度之簡式健康調查(SF-36)及循環 NT-3 含量。

【0262】 電生理學測試包含量測尺骨感覺神經幅度及尺骨神經(自外展肌小指肌記錄)及腓骨神經(自脛骨前肌記錄)之複合肌動作電位(CMAP)幅度及感覺及運動傳導速度。來自脛骨前肌之腓骨 CMAP 振幅已被證明為 CMT1A 患者臨床試驗之有用結果量度(30)；且對於上肢運動症狀，尺骨 CMAP 振幅已被證明為最具資訊性之參數(31)。在此等測試程序期間，足及手之溫度將保持在 32°C 至 34°C 下。視覺模擬量表將用於量測疼痛及疲勞(32)。簡式健康調查(SF-36)用作品質生活文件以監測及比較治療前與治療後之疾病負擔。

【0263】 為患者提供經濟激勵以進行視情況選用之束狀腓腸神經活檢。若選擇，則在治療開始前(自左側腓腸肌)及研究結束時(自右側腓腸肌)獲得活組織檢查。在局部麻醉下進行活組織檢查作為門診訪視。將對組織進行處理且檢查以評定 NT-3 對有髓鞘纖維再生之影響。為使治療前及治療後材料之水準與整個神經之長度相匹配，使切口(長 2.5 cm)之近側末端精確位於跟腱上方 10 cm 處(8)。

統計分析

【0264】 安全性為此臨床基因轉移試驗之主要終點。此將基於不可接受之毒性的發展來評估，其被定義為出現任何一種 III 級或更高的非預期治療相關毒性。每項研究均會量測安全性，伴隨一系列身高及體重、生命體徵、身體檢查及系統檢查，及一連串血液實驗室工作。實驗室工作將包含 CBC、血小板、血尿素氮(BUN)、GGT、膽紅素、鹼性磷酸酶、甲型胎蛋白、肌酸酐、澱粉酶、血清蛋白電泳、電解質、B12、葡萄糖、PT/INR 及 PTT、CK、尿分析。免疫學將由以下組成：針對 AAV1 之中抗體及用於檢測針對 NT-3 之抗體的 ELISA，用於檢測針對 AAV1 及

NT-3 之 T 細胞應答的 ELISpot。將記錄所有不良事件且評定基因轉移之相關性。

【0265】主要次要結果量度定義為 CMT 疾病兒科量表評分 (CMTPedS) 之疾病嚴重程度未減退。CMTPedS 之電腦化評分系統使用來自標準化樣本之 z 分數基於患者表現不同於健康群體之標準偏差的數目來測定個體評分。對於整個研究中之所有患者，CMTPedS 評分以 20 歲之固定年齡進行，其出於兩個原因為必要的。第一個原因為原始 CMTPedS 量表在計算最終評分時依賴於個別量表項之標準化值，但對於 20 歲以上之個體不存在標準化值。第二個原因為，儘管將兒童與健康同齡人進行比較之評分對仍在發育之兒童至關重要，但是當孩子再過生日時，其具有強加功能性減退之侷限性。即使在測試中兒童之原始評分未改變，評分標準亦設計成隨年齡增長而變得更嚴格，反映健康兒童通常發現之預期運動技能提高。然而，在退化疾病之臨床試驗中，停止實際進展將構成成功試驗。在整個研究中保持參考對照資料之年齡一致允許使用內置於 CMTPedS 中之經驗證的評分系統。其亦允許觀測評定之實際變化，以便偵測到進展停止。

【0266】使用二項式檢驗在兩年時段內 CMTPedS 評分提高或保持不變之患者比例以 95% 置信區間估計。作為一個探測性目標，CMTPedS 之 11 項中每一項不下降的患者的比例分別估計，以及 100 公尺定時測試 (100M)、CMAP 幅度、疼痛強度之視覺模擬量表 (VAS)、簡式健康調查 (SF-36) 得分及循環 NT-3 含量。此外，在每一量測點使用皮爾森 (Pearson) 或斯皮爾曼 (Spearman) 或相關係數評定循環 NT-3 含量與每一結果量測之間的關聯。由於此研究處於初步階段，因此不會調整多重比較之

p 值。然而，基於龐費洛尼-霍姆(Bonferroni-Holm)步降程序，進行靈敏度分析且指出調節後哪些關聯具有在統計學上顯著。

【0267】 根據縱向自然歷史資料(31,32)，成功次要結果量測被定義為手握及踝背屈強度、完成 9 孔釘測試之時間及步行/跑 10 公尺之時間之標準化綜合評分之惡化速率的停止。

實例 5

毒理學研究

【0268】 此研究之目的為評定在腓腸肌中單次肌肉注射後，野生型(C57BL/6)及 Trembler(Tr^J)小鼠中在肌肉特異性 tMCK 啟動子控制下表現人神經營養蛋白因子 3(NTF3)cDNA 之自互補腺相關病毒(scAAV)載體(scAAV1.tMCK.NTF3)的安全性。此報告之結果表明，在注射後 48 週內，在野生型及 trembler 小鼠中單次肌肉注射為安全且具有良好耐受性的。

測試動物

【0269】 野生型 C57BL/6(陰性對照)及 Tr^J (試驗品)小鼠以 50 μ l 總體積肌肉注射媒劑(0.9% 無菌鹽水)或 1×10^{13} vg/kg scAAV1.tMCK.NTF3。此載體小鼠品系可自傑克遜實驗室(原料 # 000664)或查爾斯河(Charles River)(原料 # 027)購得。 Tr^J 小鼠可自傑克遜實驗室(原料 # 002504)購得。

【0270】 Trembler 小鼠在注射時為 8 至 10 週齡。歸因於動物之可獲得性及動物品系之已知育種問題，在 12 週齡時治療一子集之動物。

【0271】 研究共包含 88 隻(44 隻雄性/44 隻雌性)動物。用鹽水對照治療 44 隻動物(22 隻 C57BL/6，22 隻 Tr^J)，用 scAAV1.tMCK.NTF3 試

驗品治療 44 隻動物(22 隻 C57BL/6，22 隻 TrJ)。在此等數字中，對來自每一組之一半動物在治療後 24 週實施安樂死，且在治療後 48 週對其餘動物實施安樂死。藉由耳標唯一標識動物。

研究設計

【0272】為評定 scAAV1.tMCK.NTF3 試驗品之安全性，將 4 至 6 週齡野生型 C57BL/6 及 8 至 12 週齡 Tr^J 小鼠以 50 μ l/kg 之總體積藉由單次 IM 注射在左腓腸肌中注射媒劑(0.9% 無菌鹽水)或 1×10^{13} vg scAAV1.tMCK.NTF3。在整個研究過程中每日觀測動物之一般健康狀況及發病率。每日進行兩次對死亡率之檢查。每 2 週量測一次身體質量。每 8 週進行一次超敏反應之功能性測試(熱板及聲學驚嚇測試)。每 2 週進行一次行為測試(旋轉及線懸掛)。

【0273】在注射前兩週開始測試熱敏感性，隨後在第 0 日及每 8 週使用啮齒動物熱板測試進行測試。為了進行測試，將動物放置在一直維持在 55°C 之溫度下的板表面上，且使用圍繞板表面之 15 cm 高塑膠玻璃壁將運動約束至 100 cm² 面積。在將動物置放於經加熱之表面上的同時啟動計時器，且藉由馬錶將響應時間之潛時記錄為 0.1 秒。以下活動視為對熱刺激之反應：後爪舔舐或輕彈/顫動，試圖藉由跳躍逃脫亦為可接受之反應。當觀測到此反應時立即取出小鼠。

【0274】在注射前兩週測試聲學敏感性，隨後在第 0 天(基線)，在血清 NT-3 含量之峰值(8 至 12 週)及之後每 8 週使用聲學驚嚇測試(AST)測試所有動物之聽覺超敏。使用單個驚嚇室(加利福尼亞州聖地牙哥 San Diego Instruments 的 SR-Lab)量測驚恐反應性，如先前在 Beigneux 等人，《行為大腦研究(Behavioral Brain Res.)》171:295-302, 2006 中所描

述。

【0275】室由擱置在通風室內平台上之透明非限制性塑膠玻璃圓筒組成。室內之高頻揚聲器產生 65 dB 之連續背景噪音及各種聲學刺激。由動物之全身驚嚇反應引起塑膠玻璃圓筒的振動藉由連接至平台之壓電單元轉換成模擬信號。隨後將信號數位化且由電腦存儲。自刺激開始以 1 ms 之間隔進行六十五次讀數，且使用平均振幅($V_{\text{平均}}$)以確定聲學驚嚇反應。在 5 分鐘環境適應時段內呈現 65 dB 背景噪音級且在整個測試期間持續。所有預脈衝抑制(PPI)測試期由驚嚇試驗(單獨脈衝)、前脈衝試驗(前脈衝+脈衝)及無刺激試驗(無刺激)組成。單獨的脈衝試驗由 40 ms 120 dB 寬頻噪音脈衝。PPI 藉由前脈衝+脈衝試驗量測，其由 20 ms 噪音前脈衝、100 ms 延遲及隨後 40 ms 120 dB 驚嚇脈衝組成。聲學前脈衝強度為 69、73 及 81 dB。無刺激試驗僅由背景噪音組成。測試期以呈現五次單獨脈衝試驗開始及結束了；在兩者之間，每一試驗類型以偽隨機順序呈現 10 次。試驗之間平均為 15 s(12 s 至 30 s 範圍內)。

【0276】對於旋轉分析，需要至少一週之培訓以確保所有個體都已以相同程度得知任務。在加速旋轉方案中，將動物置於桿上，其桿加速至 5 rpm 且以 5 rpm/sec 增加 7 動物每期進行三次試驗，三次試驗取平均值。

【0277】對於線懸掛分析，將動物之四隻腳掌置放在為 2 mm 直徑線上，金屬線水平保持在厚的軟墊層上方 35 cm 處。記錄直至小鼠自線上落下的時間長度，且在每次落下後給予小鼠 1 分鐘之恢復期。每一測試期由三個試驗組成，其中得分取平均值。

【0278】在注射後 22 週及 46 週(安樂死前 2 週)，自後眼眶竇收集

血液用於血液學研究(紅血球計數、血容比、血紅素、白血球計數總數及差異，平均紅血球血紅素、平均紅血球血紅素濃度、紅血球平均體積、血小板平均體積、血小板計數、網狀紅血球計數)。分析臨床化學之以下參數：丙胺酸轉胺酶、鹼性磷酸酶、天冬胺酸轉胺酶、膽紅素(總數及直接)、血尿素氮、肌酸酐、肌酸激酶、葡萄糖、總蛋白。

【0279】 在注射後 24 週及 48 週，藉由心內穿刺收集具有用於免疫研究之血清的血液。收集血清樣品用於每一組中所有動物(與治療或性別無關)之抗 AAV1 及抗 NT-3 抗體滴定。血清樣品另外用於循環 NT-3 含量之 ELISA 測定。

【0280】 在注射後 24 週及 48 週，收集來自 Tr^J 動物之以下組織用於組織病理學分析：性腺、大腦、脾、腎、空腸、結腸、胰腺、心臟、肺、胃、肝、腹股溝淋巴結、脊髓、腓腸肌(右側及左側)及剖檢病變(若存在)。將組織固定在 10%中性緩衝福馬林中，切片且用蘇木精及曙紅染色。組織學分析藉由 SNBL USA 進行。

【0281】 在注射後 24 週及 48 週，除了 Tr^J 對照組(n=5, 3M, 2F)之外，每組(3M, 3F)收集 6 隻動物之內部組織病理學組織。處死小鼠且用 4%多聚甲醛之磷酸鹽緩衝液(0.1M, pH 7.4)經賁門灌注。剝離腰脊髓、背根神經節(DRG)及整個坐骨神經節段(坐骨切痕至臍窩)。將原位長度之坐骨神經段之近端半部及一個腰 DRG 轉移至戊二醛固定劑，經處理用於塑膠包埋及 1 μ m 厚切片。其餘的坐骨神經組織及腰 DRG 在 30%蔗糖中冷凍保護，在經液氮冷卻之異戊烷中凍結，切成 12 μ m 切片用於免疫組織化學，以檢測 DRG 神經元及軸突中之 CGRP 陽性(來自 Tr^J 小鼠的脊髓及大腦置於 10%中性緩衝福馬林中。

表 6：研究設計

組 號	品系	研究劑	劑量 (vg/kg)	治療 第 0 日	犧牲終點		
					第 24 週	第 48 週	額外
6 高劑量	C57BL/6	scAAV1.tMCK.NTF3	1×10 ¹³	單次 IM 注 射至單 腿之腓 腸肌中	n = 10 (5M/5F)	n = 10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
7 高劑量	Tr ^J	scAAV1.tMCK.NTF3	1×10 ¹³		n = 10 (5M/5F)	n = 10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
8 對照	C57BL/6	媒劑 (0.9%無菌鹽水)	0		n = 10 (5M/5F)	n = 10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
0 對照	Tr ^J	媒劑 (0.9%無菌鹽水)	0		n = 10 (5M/5F)	n = 10 (5M/5F)	+2 (1M/1F)
小鼠總數					N = 88 (44M/44F)		

動物給藥，觀測及分析

【0282】 指定動物在第 0 日用 50 μL 體積藉由單次 IM 注射至左腓腸肌給藥一次。為進行準確給藥，用異氟醚吸入麻醉動物至少 15 分鐘。藉由直接注射至左腓腸肌投與劑量。注意準確沈積整個載體劑量至肌肉中。在進行給藥後，觀測動物直至可走動且返回至籠。在整個研究持續時間中每日進行各動物之觀測。每 2 週量測一次身體質量。每日進行兩次死亡率檢查。

【0283】 在適當年齡下，向小鼠過量給予氯胺酮/甲苯噻嗪混合物 (200mg/kg/20mg/kg)。藉由心臟穿刺收集血液。隨後收集組織且送去分析。

【0284】 對於每組，對每一時間點繪製體重、小鼠血液學及臨床化學。對所有終點進行抗 AAV1 循環抗體、抗 NT-3 循環抗體及循環 NT-3 含量之 ELISA 測定。對於所有動物，每 8 週使用嚙齒動物熱板及聲學驚嚇裝置進行超敏功能性測試。對於所有動物，每兩週進行行為測試以進行

旋桿及線懸掛測試。對所有動物進行器官的正式組織病理學檢查。除包含 5 隻動物(3M, 2F)之 Tr^J 組外，對每組 6 隻小鼠(3M, 3F)進行腰脊髓及 DRG 之內部組織病理學。組織病理學評估包含 CGRP 陽性之免疫細胞化學分佈(在腰 DRG 神經元及脊髓中)及坐骨神經及 DRG 神經元之塑膠包埋以用於分析病理學變化。

結果

發病率及死亡率

【0285】 所有小鼠在注射程序中存活且在沒有任何痛苦跡象之情況下度過初始觀察期。歸因於水輸送系統故障，四隻 Tr^J 動物死亡。不存在與試驗品相關之死亡。

體重

【0286】 在整個研究過程中每兩週量測個各組中所有小鼠之體重。在整個研究中，所有治療組均以穩定方式保持體重增加。

【0287】 在 C57BL/6 雄性動物中，注射試驗品之動物與對照之間不存在顯著差異。在雌性動物中，與注射試驗品之動物相比，對照動物之重量略高。在 Tr^J 雄性動物中，經鹽水治療之組顯著比經 NT-3 治療之組重。對於雌性 Tr^J 小鼠，不存在體重之顯著差異。

血液學及臨床化學

【0288】 22 週及 46 週時的血液學參數或 24 週及 48 週時間點之血清化學中不存在與試驗品相關之變化。

ELISA 測定

【0289】 用 24 週及 48 週屍體剖檢期間收集之血清樣品進行抗 AAV1 抗體、抗 NT-3 抗體及循環 NT-3 之 ELISA 測定。

【0290】 為量測循環抗 AAV1 抗體，在載體投與後 24 週及 48 週收集血清樣品，且藉由結合酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA)測定抗體效價，參見下表 7。用 scAAV1.tMCK.NTF3 治療之動物具有較高 AAV1 蛋白殼之循環抗體。在兩個時間點，雄性及雌性之抗體效價相似。在鹽水對照治療之動物中未偵測到陽性效價(>1:50)。

表 7.來自 用 scAAV1.tMCK.NT-3 治療之小鼠之 AAV1 蛋白殼的循環血清抗體效價中值				
載體投與後之時間	治療組			
	第 1 組：鹽水對照(0)			
	中值		範圍	
	雄性	雌性	雄性	雌性
24 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
	第 2 組：scAAV1.tMCK.NT-3 載體(2.0×10^{11})			
	中值		範圍	
	雄性	雌性	雄性	雌性
24 週	1:25600	1:25600	1:25600 - 1:25600	1:25600 - 1:25600
48 週	1:3200	1:12800	1:3200 - 1:25600	1:12800 - 1:25600

【0291】 為量測抗 NT-3 循環抗體，在載體投與後 24 週及 48 週收集血清樣品，且藉由結合酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA)測定 NT-3 之抗體效價。在載體投與後 24 週及 48 週，所有小鼠具有<1:50(視為陰性)之抗體效價。參見表 8。

表 8.來自 用 scAAV1.tMCK.NT-3 治療之小鼠之 NT-3 肽的循環血清抗體效價中值				
載體投與後之時間	劑量含量(vg)			
	第 1 組：鹽水對照(0)			
	中值		範圍	
	雄性	雌性	雄性	雌性

24 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
	第 2 組：scAAV1.tMCK.NT-3 載體(2.0×10^{11})			
	中位數		範圍	
	雄性	雌性	雄性	雌性
24 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
48 週	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50

【0292】 在載體投與後 24 週及 48 週藉由標準結合 ELISA 測定在所收集之 Tr^J 小鼠之血清樣品中測定循環 NT-3 含量。在載體投與後 24 週及 48 週，肌內注射 scAAV1.tMCK.NTF3 載體引起 Tr^J 小鼠之 NT-3 的穩健表現及分泌。表 9 展示來自鹽水及載體注射組之 Tr^J 注射 24 及 48 後血清 NT-3 含量之平均值及標準偏差。性別對循環 NT-3 含量無影響。

表 9.循環 NT-3 血清含量(ng/mL)						
組	劑量(vg/kg)	性別	24 週		48 週	
			平均值	SD	平均值	SD
鹽水	0	M	0.000	0.000	0.019	0.038
		F	0.003	0.004	0.000	0.000
scAAV1.tMCK.NT-3	1.0×10^{13}	M	10.808	6.705	7.616	4.572
		F	10.410	3.729	9.312	4.809

超敏測試

【0293】 在基線(用對照鹽水之試驗品治療之前)及直至 C57BL/6 及 TrJ 小鼠中注射 48 週後之每 8 週進行熱敏感性測試。在 C57BL/6 及 TrJ 組中，對照與載體注射之小鼠之間不存在差異。在每組中，雄性及雌性小鼠之戒斷潛伏期中亦不存在顯著差異。

【0294】 在聲學驚嚇測試中進行之聽覺靈敏度量測之結果表明，在所有強度(69、73 及 81 dB)下，預脈衝明顯抑制 AST，且抑制水平取決

於預脈衝在野生型及 TrJ 小鼠中之強度。用試驗品治療不改變 C57BL/6 野生型小鼠之 PPI 反應。在經對照品治療之 TrJ 動物中 PPI%可偵測地較低，其在經試驗品(NT-3)治療之 TrJ 動物中朝向標準化改善。經 NT-3 治療之 TrJ 動物之此改善主要見於雄性動物。

行為測試

【0295】 對於旋桿評估，與治療無關，C57BL/6 組中之動物在旋桿功能性測試中未顯示差異。與治療後 16 週開始之對照 TrJ 動物相比，TrJ NT-3 治療組中之動物顯示在旋桿表現中之顯著改善，其持續至終點。

【0296】 對於線懸掛評估，與治療無關，C57BL/6 組中之動物在線懸掛功能性測試中未顯示任何差異。與治療後 28 週開始之對照 TrJ 動物相比，TrJ NT-3 治療組中之動物顯示線懸掛能力之顯著提高，其持續至終點。

組織病理學

【0297】 進行正式組織病理學。所分析之器官及組織的列表在下表 10 中展示。

表 10.組織學檢查之器官清單	
器官/組織	組織病理學
性腺	X
大腦	X
脾	X
腎	X
空腸	X
結腸	X
胰腺	X
心臟	X
肺	X

表 10.組織學檢查之器官清單	
器官/組織	組織病理學
胃	X
肝	X
腹股溝淋巴結	X
脊髓	X
腓腸肌*	X
剖檢病變(若存在)	X
*右腓腸肌及左腓腸肌	

【0298】 在安樂死之後，移除腰脊髓、背根神經節(DRG)及整個坐骨神經(自坐骨神經切痕至膕窩)且經處理用於組織病理學評估。表 11 中展示包含用於內部組織病理學之個別動物的清單。

表 11.在將 scAAV1.tMCK.NTF3 經由肌內注射投與至 Tr ^J 及 C57BL/6 小鼠之腓腸肌之後的內部組織病理學概述							
品系	標識號	性別	注入物	品系	標識號	性別	注入物
終點：24 週				終點：48 週			
Tr ^J	3935	F	0.9%無菌鹽水	Tr ^J	3901	M	0.9%無菌鹽水
	3936	F			3902	M	
	3937	F			3903	M	
	3915	M			3928	F	
	3913	M			3943	F	
	3914	M					
Tr ^J	3940	F	scAAV1.tMCK. NTF3	Tr ^J	3904	M	scAAV1.tMCK. NTF3
	3941	F			3905	M	
	3942	F			3906	M	
	3924	M			3930	F	
	3922	M			3931	F	
	3923	M			3932	F	
C57BL/6	931	F	0.9%無菌鹽水	C57BL/6	926	F	0.9%無菌鹽水
	931	F			927	F	
	933	F			928	F	

表 11.在將 scAAV1.tMCK.NTF3 經由肌內注射投與至 Tr ^J 及 C57BL/6 小鼠之腓腸肌之後的内部組織病理學概述							
	942	M			937	M	
	943	M			939	M	
	946	M			940	M	
C57BL/6	956	F	scAAV1.tMCK. NTF3	C57BL/6	951	F	scAAV1.tMCK. NTF3
	957	F			952	F	
	958	F			953	F	
	964	M			959	M	
	965	M			960	M	
	966	M			963	M	

CGRP 分佈之免疫細胞化學分析

【0299】 對於 CGRP 分佈的免疫細胞化學分析，在注射後 24 週及 48 週檢查來自腰脊髓節段之橫切片。此分析顯示，與治療品無關，Tr^J 及 C57BL/6 動物中 CGRP 與 NT-3 之反應性均未增加。

【0300】 分析塑膠嵌入切片之病理變化。在 C57BL/6 動物中，在注射後 24 週及 48 週檢查之塑膠包埋的左側坐骨神經及左腰 DRG 神經元未展示病理學變化。在治療後 48 週，在 C57BL/6 動物之兩個治療組中均觀察到年齡相關之變化，諸如髓鞘皺縮/內折及外折，表明軸突萎縮。在用鹽水治療之 Tr^J 動物中，有髓鞘纖維及大量髓鞘形成或裸露軸突中存在明顯下降。用測試物品治療之 Tr^J 動物展示小的有髓鞘纖維、髓鞘厚度之可見增加將裸軸突減少。在 TrJ 小鼠中不存在 NT-3 治療之任何不良影響，其可由 DRG 內缺乏軸突發芽證明。

【0301】 總體而言，在整個研究在中 C57BL/6 及 Tr^J 動物中不存在與治療相關之不良發現表明治療在注射後 48 週內耐受良好。

討論

【0302】 為評定經由單次肌肉注射遞送之 scAAV1.tMCK.NTF3 的安全性，設計毒理學研究，包含總共 88 隻(44 隻雄性/44 隻雌性)動物。用 0.9%無菌鹽水對照治療 44 隻動物(22 隻 C57BL/6，22 隻 TrJ)，用濃度為 1×10^{13} vg/kg 之 scAAV1.tMCK.NTF3 試驗品治療 44 隻動物(22 隻 C57BL/6，22 隻 TrJ)。在此等動物中，對來自各組之一半動物在治療後 24 週實施安樂死，且在治療後 48 週對其餘動物實施安樂死。

【0303】 此報告中之資料表明，用比所提出之臨床劑量高 10 倍的劑量治療動物不會導致試驗品相關之不良安全性影響的表現。在整個研究中，每日觀測動物之一般健康狀況及發病率，每日進行兩次死亡率檢查。每 2 週量測一次動物之身體質量。每 8 週進行一次對超敏(熱及聲)之功能性測試。每 2 週進行一次行為測試。所有動物在注射程序及初始觀察期內存活，沒有任何痛苦之跡象。歸因於水輸送系統之故障，在 TrJ 動物中存在 4 例死亡，其與測試品之投與無關。在此研究中未記錄其他死亡。

【0304】 在屍體剖檢後，量測血液血液學及臨床化學，且未顯示任何測試品相關差異。進行抗 AAV1 血清 ELISA，且顯示用試驗品治療之動物中的循環抗體預期增加，其為非性別特異性的。對所有動物進行抗 NT-3 血清 ELISA，顯示對所有時間點顯示陰性抗體效價。亦量測所有治療組之循環 NT-3 含量，且僅在經試驗品治療之動物中升高。對循環 NT-3 含量不存在性別特異性影響。熱超敏測試顯示 C57BL/6 或 Tr^J 動物無治療或性別特異性改變。聽覺靈敏度量測顯示在 C57BL/6 動物中無試驗品相關變化，但顯示在經對照物治療之 Tr^J 動物缺乏在經試驗品治療之 Tr^J 動物中朝向正常化之改善。此改善主要見於雄性 Tr^J 動物。C57BL/6 動物中運動控制之旋桿評估未顯示與用試驗品之治療相關之差異。與對照 Tr^J 動

物相比，經試驗品治療之 TrJ 動物在治療後 16 週開始顯示出顯著改善。類似地，在 C57BL/6 組中，線懸掛評估未顯示與試驗品相關之差異。用試驗品治療之 Tr^J 動物在治療後 28 週開始顯示出線懸掛時間之顯著改善，其持續至終點。

【0305】 評估在治療後 24 週及 48 週自所有組收集之組織及器官。總之，在來自 24 週屍檢之 3/4 第 1 組雄性及 4/5 第 1 組雌性中，在注射試驗品之左腓腸肌中觀測到極少單核細胞浸潤。然而，在其餘的第 1 組雌性(動物 3942)之未經注射的腓腸肌中亦觀測到類似浸潤。在來自 24 週屍檢之任何第 2 組(對照)動物中，在注射鹽水之左腓腸肌或未注射之右腓腸肌中未觀測到此變化。在 48 週屍檢動物中，在 2/5 第 1 組雄性及 1/6 第 1 組雌性之注射試驗品之腓腸肌中再次觀測到極少單核細胞浸潤。所有其他顯微結果隨機分佈於對照及經治療動物中，為物種之背景發現，或視為伴隨試驗品投與。

【0306】 對一子集之動物(3M，每組 3F)之腰脊髓切片、背根神經節及坐骨神經進行內部組織學。檢查腰脊髓節段的橫切片顯示，與治療無關，動物中 NT-3 之 CGRP 活性未增加。塑膠包埋之坐骨神經及腰 DRG 神經元之病理學評估未展示 C57BL/6 動物中超出年齡相關差異之變化。在 Tr^J 動物中，用試驗品治療引起改善之病理學，如藉由小的有髓鞘纖維增加、髓鞘厚度增加及裸軸突減少所證明。DRG 中缺乏軸突發芽進一步支持試驗品之安全性。

【0307】 總體而言，在此研究中所展示之收集資料表明，在雄性及雌性 C57BL/6 野生型及 Tr^J 小鼠中直至注射後 48 週，藉由單次肌內注射以 1×10^{13} vg/kg 之劑量直接注射至腓腸肌中的試驗品

scAAV1.tMCK.NTF3 耐受良好，如以上所展示之多個量測證明。

參考文獻

1. Lupski JR, de Oca-Luna RM, Slaugenhaupt S 等人《與 1A 型夏馬杜三氏疾病相關之 DNA 複製 (DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.)》.《細胞(Cell)》1991;66:219-232.
2. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME.《夏馬杜三氏疾病亞型及基因測試策略(Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies)》.《神經病學年鑒(Ann Neurol)》2011;69:22-33.
3. Sahenk Z.《CMT 神經病變中異常許旺細胞-軸突相互作用 (Abnormal Schwann cell-axon interactions in CMT neuropathies)》.《突變許旺細胞對軸突細胞骨架及再生相關髓鞘形成之影響(The effects of mutant Schwann cells on the axonal cytoskeleton and regeneration-associated myelination.)》.《紐約科學院年報(Ann N Y Acad Sci)》1999;883:415-426.
4. Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, van Schaik IN.《年輕 CMT1A 患者經口高劑量抗壞血酸治療一年：隨機、雙盲、安慰劑對照 II 期試驗(Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial)》.《BMC 醫學(BMC medicine)》2009;7:70.
5. Micallef J, Attarian S, Dubourg O 等人《抗壞血酸對 1A 型夏馬

杜三氏疾病患者之影響：多中心、隨機、雙盲、安慰劑對照試驗(Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial)》.《柳葉刀·神經病學(Lancet Neurol)》2009;8:1103-1110.

6. Pareyson D, Reilly MM, Schenone A 等人《1A 型夏馬杜三氏疾病(CMT-TRIAAL 及 CMT-TRAUK)中之抗壞血酸：雙盲隨機試驗(Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial)》.《柳葉刀·神經病學》2011;10:320-328.

7. Lewis RA, McDermott MP, Herrmann DN 等人《在 1A 型夏馬杜三氏疾病中之高劑量抗壞血酸治療：隨機、雙盲、對照試驗的結果(High-dosage ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: results of a randomized, double-masked, controlled trial)》.《美國醫學會雜誌·神經病學(JAMA neurology)》2013;70:981-987.

8. Sahenk Z, Nagaraja HN, McCracken BS 等人《NT-3 促進 CMT1A 小鼠模型及患者之神經再生及感覺改善(NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients)》.《神經病學(Neurology)》2005;65:681-689.

9. de Waegh SM, Brady ST.《許旺細胞對軸突特性之局部控制：同源及異源神經移植物中的神經絲及軸突傳輸(Local control of axonal properties by Schwann cells: neurofilaments and axonal transport in homologous and heterologous nerve grafts)》.《神經科學研究雜誌(J Neurosci Res)》1991;30:201-212.

10. Yin X, Crawford TO, Griffin JW 等人《髓鞘相關糖蛋白為調節有髓鞘軸突之口徑的髓鞘信號(Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons)》.《神經科學雜誌(J Neurosci)》1998;18:1953-1962.

11. de Waegh S, Brady ST.《在髓鞘缺陷之突變小鼠中改變緩慢軸突傳輸及再生：作為許旺細胞-軸突相互作用之活體內模型的顫抖者(Altered slow axonal transport and regeneration in a myelin-deficient mutant mouse: the trembler as an in vivo model for Schwann cell-axon interactions)》.《神經科學雜誌》1990;10:1855-1865.

12. de Waegh SM, Lee VM, Brady ST.《藉由髓鞘形成許旺細胞局部調節神經絲磷酸化、軸突口徑及慢軸突傳輸(Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells)》.《細胞》1992;68:451-463.

13. Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U.《缺乏 Pmp22 之小鼠的超髓鞘形成及脫髓鞘周邊神經病變(Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice)》.《自然-遺傳學(Nat Genet)》1995;11:274-280.

14. Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV, Suter U.《缺乏異型接合周邊髓鞘蛋白 22 之小鼠受進行性脫髓鞘香腸神經病變的影響(Heterozygous peripheral myelin protein 22-deficient mice are affected by a progressive demyelinating tomaculous neuropathy)》.《神經科學雜誌》1997;17:4662-4671.

15. Anzini P, Neuberg DH, Schachner M 等人《缺乏間隙連接蛋白

接合素 32 之小鼠中周邊神經髓鞘的結構性異常及缺乏維護(Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32)》.《神經科學雜誌》1997;17:4545-4551.

16. Bosio A, Bussow H, Adam J, Stoffel W.《中樞神經系統髓鞘中之半乳糖神經鞘脂及軸突-神經膠質相互作用(Galactosphingolipids and axono-glial interaction in myelin of the central nervous system)》.《細胞組織研究(Cell Tissue Res)》1998;292:199-210.

17. Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M.《缺乏蛋白質零(P0)之小鼠展示遺傳性人類神經病變特徵的周邊神經中之髓鞘退化(Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies)》.《自然-遺傳學》1995;11:281-286.

18. Sahenk Z, Chen L.《神經異種移植物中接合素 32 突變誘導之軸突細胞骨架異常(Abnormalities in the axonal cytoskeleton induced by a connexin32 mutation in nerve xenografts)》.《神經科學研究雜誌》1998;51:174-184.

19. Sahenk Z, Chen L, Freimer M.《引起 HNPP 表型之新穎 PMP22 點突變：關於神經異種移植物之研究(A novel PMP22 point mutation causing HNPP phenotype: studies on nerve xenografts)》.《神經病學》1998;51:702-707.

20. Sahenk Z, Chen L, Mendell JR.《PMP22 重複及缺失對軸突細胞骨架之影響(Effects of PMP22 duplication and deletions on the axonal

cytoskeleton)》.《神經病學年鑒》1999;45:16-24.

21. Sanchez I, Hassinger L, Paskevich PA, Shine HD, Nixon RA.《寡樹突細胞在發育期間獨立於髓鞘形成調節軸突口徑之局部擴張及神經絲之局部積累(Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation)》.《神經科學雜誌》1996;16:5095-5105.

22. Sahenk Z, Serrano-Munuera C, Chen L, Kakabadze I, Najagara HN.《PMP22 重複中軸突再生受損之證據：神經異種移植物的研究(Evidence for impaired axonal regeneration in PMP22 duplication: studies in nerve xenografts)》.《周邊神經系統雜誌(J Peripher Nerv Syst)》2003;8:116-127.

23. Ramer MS, Bishop T, Dockery P 等人《背根神經切斷術後神經營養蛋白 3 介導之再生及本體感覺恢復(Neurotrophin-3-mediated regeneration and recovery of proprioception following dorsal rhizotomy)》.《分子及細胞神經科學(Molecular and cellular neurosciences)》2002;19:239-249.

24. Helgren ME, Cliffer KD, Torrento K 等人《神經營養蛋白 3 投與減弱吡哆醇誘導之大纖維感覺神經病變之缺陷(Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy)》.《神經科學雜誌》1997;17:372-382.

25. Mizisin AP, Calcutt NA, Tomlinson DR, Gallagher A, Fernyhough P.《神經營養蛋白 3 逆轉鏈脛佐菌素-糖尿病大鼠之神經傳導

速度缺陷(Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats)》.《周邊神經系統雜誌》1999;4:211-221.

26. Mizisin AP, Kalichman MW, Bache M, Dines KC, DiStefano PS.《NT-3 減弱半乳糖餵養之大鼠感覺神經之功能性及結構性障礙(NT-3 attenuates functional and structural disorders in sensory nerves of galactose-fed rats)》.《神經病理學及實驗神經學雜誌(J Neuropathol Exp Neurol)》1998;57:803-813.

27. Shy ME, Blake J, Krajewski K 等人《CMT 神經病變評分作為殘疾之量度的可靠性及有效性(Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability)》.《神經病學》2005;64:1209-1214.

28. Shy ME, Chen L, Swan ER 等人《1A 型夏馬杜三氏疾病之神經病變進展(Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A)》.《神經病學》2008;70:378-383.

29. Solari A, Laura M, Salsano E, Radice D, Pareyson D.《夏馬杜三氏疾病臨床結果量測之可靠性(Reliability of clinical outcome measures in Charcot-Marie-Tooth disease)》.《神經肌肉病症(Neuromuscul Disord)》2008;18:19-26.

30. Komyathy K, Neal S, Feely S 等人《脛骨前肌 CMAP 幅度與 CMT1A 損傷之相關性(Anterior tibialis CMAP amplitude correlations with impairment in CMT1A)》.《肌肉及神經(Muscle & nerve)》2013;47:493-496.

31. Mannil M, Solari A, Leha A 等人《來自夏馬杜三氏(CMT)神經

病變評分及次要臨床結果量測之選定項目充當 CMT1A 患者之疾病嚴重性的敏感臨床標誌物(Selected items from the Charcot-Marie-Tooth (CMT) Neuropathy Score and secondary clinical outcome measures serve as sensitive clinical markers of disease severity in CMT1A patients))》.《神經肌肉病症》2014;24:1003-1017.

32. Pareyson D, Schenone A, Fabrizi GM 等人《1A 型夏馬杜三氏疾病(CMT-TRIAAL)之長期抗壞血酸治療的多中心、隨機、雙盲、安慰劑對照試驗：研究方案(A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of long-term ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL): the study protocol)》[EudraCT 第 2006-000032-27 號].《藥理學研究(Pharmacological research)》2006;54:436-441.

33. Piscoquito G, Reilly MM, Schenone A 等人《夏馬杜三氏疾病臨床結果量測之反應(Responsiveness of clinical outcome measures in Charcot-Marie-Tooth disease)》.《歐洲神經病學雜誌：歐洲神經學學會聯合會 2015 年官方期刊(European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies 2015)》; 22:1556-1563.

【0308】 儘管本發明已根據具體實施例形式進行描述，但應理解本領域中熟習此項技術者將進行變化及修改。因此，本發明應僅受如申請專利範圍中所呈現之此類限制的限定。

<110> 美國全美兒童醫院之研究學會(The Research Institute at Nationwide Children's Hospital)
<120> 用於NT-3基因療法之方法及材料
<130> 28335/53122A

<140> TW 107137220
<141> 2018-10-22

<150> US 62/574,828
<151> 2017-10-20

<150> US 62/676,687
<151> 2018-05-25

<150> US 62/741,335
<151> 2018-10-04

<160> 11
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 774
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<223> hNT3

<400> 1
atgtccatct tgttttatgt gatatttctc gcttatctcc gtggcatcca aggtaacaac 60
atggatcaaa ggagtttgcc agaagactcg ctcaattccc tcattattaa gctgatccag 120
gcagatattt tgaaaaacaa gctctccaag cagatggtgg acgttaagga aaattaccag 180
agcacccctgc ccaaagctga ggctccccga gagccggagc ggggagggcc cgccaagtca 240
gcattccagc cgggtgattgc aatggacacc gaactgctgc gacaacagag acgctacaac 300
tcaccgcggg tcttgctgag cgacagcacc cccttgagc ccccgccctt gtatctcatg 360
gaggattacg tgggcagccc cgtggtggcg aacagaacat cacggcggaa acggtacgcg 420
gagcataaga gtcaccgagg ggagtactcg giatgigaca gtgagagtct gtgggtgacc 480
gacaagtcac cggccatcga cattcgggga caccaggica cggtgctggg ggagatcaaa 540
acgggcaact ctcccgctcaa acaatatttt tatgaaacgc gatgtaagga agccaggccg 600
gtcaaaaacg gttgcagggg tattgatgat aaacactgga actctcagtg caaaacatcc 660
caaacctacg tccgagcact gacttcagag aacaataaac tcgtgggctg gcggtggata 720
cggatagaca cgtccttgtgt gtgtgccttg tcgagaaaaa tcggaagaac atga 774

<210> 2
<211> 270
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> NT-3胺基酸序列

<400> 2

Met Val Thr Phe Ala Thr Ile Leu Gln Val Asn Lys Val Met Ser Ile
1 5 10 15

Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile Gln Gly Asn
20 25 30

Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn Ser Leu Ile
35 40 45

Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu Ser Lys Gln
50 55 60

Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro Lys Ala Glu
65 70 75 80

Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro Ala Lys Ser Ala Phe Gln
85 90 95

Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln Arg Arg Tyr
100 105 110

Asn Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu Glu Pro Pro
115 120 125

Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val Val Ala Asn
130 135 140

Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly
145 150 155 160

Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser
165 170 175

Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile

180

185

190

Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys
195200205

Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys
210215220

His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu
225230235240

Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp
245250255

Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
260265270

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

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> tMCK啟動子

<400> 3

ccactacggg tctaggctgc ccatgtaagg aggcaaggcc tggggacacc cgagatgcct 60

ggttataatt aacccaaca cctgctgccc ccccccccc aacacctgct gcctgagcct 120

gagcggttac cccaccccg tgccctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 180

cgctctaaaa ataacctgt ccctgggtgga tccactacgg gtctatgctg cccatgtaag 240

gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc tggttataat taacccaac acctgctgcc 300

cccccccccc caacacctgc tgccctgagcc tgagcgggta cccaccccg gtgccctgggt 360

cttaggctct gtacaccatg gaggagaagc tcgctctaaa aataacctg tccctgggtg 420

accactacgg gtctaggctg cccatgtaag gaggcaaggc ctggggacac ccgagatgcc 480

tggttataat taacccaac acctgctgcc ccccccccc aacacctgct gcctgagcct 540

gagcggttac cccaccccg tgccctgggtc ttaggctctg tacaccatgg aggagaagct 600

cgctctaaaa ataacctgt ccctgggtcct ccctggggac agccctcct ggctagtcac 660

accctgtagg ctctctctata taaccacaggg gcacaggggc tgcccccggg tcac 714

<210> 4
<211> 106
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 5`ITR

<400> 4
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtgg 106

<210> 5
<211> 133
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 嵌合内含子

<400> 5
gtaagtatca aggttacaag acaggttttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60
cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc 120
tttctctcca cag 133

<210> 6
<211> 5
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> Kozak 序列：

<400> 6

ccacc 5

<210> 7
<211> 200
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 聚A序列

<400> 7
ggggatccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 60
tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 120
agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca gggtcagggg 180
gaggtgtggg aggttttttc 200

<210> 8
<211> 128
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> 3' ITR

<400> 8
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgc 128

<210> 9
<211> 861
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature

<223> AMP R序列

<400> 9
atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttccct 60
gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 120
cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 180
gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctgc tatgtggcgc ggtattatcc 240
cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca gaatgacttg 300
gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 360
tgcagtgtctg ccataacat gagtgataac actgcggccca acttacttct gacaacgatac 420
ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 480
gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccnaacg acgagcgtga caccacgatg 540
cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 600
tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 660
tcggcccttc cggctggctg gtttatitgt gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 720
cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 780
acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc 840
tcactgatta agcatitggt a 861

- <210> 10
- <211> 668
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

- <220>
- <221> misc_feature
- <223> pBR322 Ori

<400> 10
gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgccgtaat ctgctgcttg 60
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 120
ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 180
tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgctctg 240
ctaatacctgt taccagtggc tgcigccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 300

tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 360
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 420
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcgacaggt atccggtaag cggcagggtc 480
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 540
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcg 600
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 660
tttgctca 668

<210> 11
<211> 5884
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<223> sc pAAV.tMCK.NT3 載體全序列

<400> 11
cagcagctgc gcgctcgtc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg 60
acctttggtc gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggggttaacc 120
aattggcggc cgcaaacttg catgccccac tacgggteta ggctgcccac gtaaggaggc 180
aaggcctggg gacaccgag atgcctgggt ataattaac ccaacacctg ctgccccccc 240
cccccaaca cctgctgcct gagcctgagc ggttacccca ccccggtgcc tgggtcttag 300
gctctgtaca ccatggagga gaagctcgt ctaaaaataa ccctgtccct ggtggatcca 360
ctacgggtct atgctgcca tgtaaggagg caaggcctgg ggacaccga gatgcctggt 420
tataattaac cccaacacct gctgcccccc ccccccaac acctgctgcc tgagcctgag 480
cggttacccc accccgggtg ctgggtctta ggctctgtac accatggagg agaagctcgc 540
tctaaaaata accctgtccc tgggtggacca ctacgggtct aggctgcca tgtaaggagg 600
caaggcctgg ggacaccga gatgcctggt tataattaac cccaacacct gctgcccccc 660
cccccaaca cctgctgcct gagcctgagc ggttacccca ccccggtgcc tgggtcttag 720
gctctgtaca ccatggagga gaagctcgt ctaaaaataa ccctgtccct ggtccctccct 780
ggggacagcc cctcctgggt agtcacacc tgtaggctcc tctatataac ccaggggcac 840
aggggctgcc cccgggtcac ctgcagaagt tggctgtgag gcactgggca ggtaagtaic 900

aaggttacaa gacaggttta agggagaccaa tagaaactgg gcttgtcgag acagagaaga	960
ctcttgcgtt tctgataggc acctatttgt cttactgaca tccactttgc ctttctctcc	1020
acagggtgtcc actcccagtt caattacagc gcgtgggtacc tgcagggata tccacatgt	1080
ccatcttgtt ttatgtgata tttctcgctt atctccgtgg catccaaggt aacaacatgg	1140
atcaaaggag tttgccagaa gactcgctca attccctcat tattaagctg atccaggcag	1200
atattttgaa aaacaagctc tccaagcaga tgggtggacgt taaggaaaat taccagagca	1260
ccctgcccaa agctgaggct ccccgagagc cggagcgggg agggcccgcc aagtcagcat	1320
tccagccggt gattgcaatg gacaccgaac tgctgcgaca acagagacgc tacaactcac	1380
cgcggttcct gctgagcgac agcaccctt tggagcccc gcccttgtat ctcatggagg	1440
attacgtggg cagccccgtg gtggcgaaca gaacatcacg gcggaaacgg tacgcggagc	1500
ataagagtca ccgaggggag tactcggtat gtgacagtga gagtctgtgg gtgaccgaca	1560
agtcacggc catcgacatt cggggacacc aggtcacggt gctgggggag atcaaaacgg	1620
gcaactctcc cgtcaaaca tatttttatg aaacgcgatg taaggaagcc aggccggtca	1680
aaaacggttg caggggtatt gatgataaac actggaactc tcagtgc aaa acatcccaaa	1740
cctacgtccg agcactgact tcagagaaca ataaactcgt gggctggcgg tggatacggg	1800
tagacacgtc ctgtgtgtgt gccttgtcga gaaaaatcgg aagaacatga ggcggccgcg	1860
gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgagca aaccacaact agaatgcagt	1920
gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgt atgctattgc tttatttgta accattataa	1980
gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcatat tatgtttcag gttcaggggg	2040
aggtgtggga ggttttttcg gcgcgcctct agagcatggc tacgtagata agtagcatgg	2100
cgggttaatc attaaactaca aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg	2160
cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtegcc cgacgcccgg gctttgcccg	2220
ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgccaccg	2280
atcgcccttc ccaacagtig cgcagcctga atggcgaatg gaattccaga cgattgagcg	2340
tcaaaatgta ggtatttcca tgagcgtttt tccgtgtgca atggctggcg gtaatatgt	2400
tctggatatt accagcaagg ccgatagttt gagttcttct actcaggcaa gtgatgttat	2460
tactaatcaa agaagtattg cgacaacggt taatttgcgt gatggacaga ctcttttact	2520
cgggtggcctc actgattata aaaacacttc tcaggattct ggcgtaaccgt tccgtgtctaa	2580
aatcccttta atcgccctcc tgtttagctc ccgctctgat tctaacgagg aaagcacgtt	2640

atacgtgctc gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcat	2700
gtgtgggtgtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt	2760
tgcgttttctt cccctccttt ctgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc	2820
gggggctccc tttaggggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg	2880
attagggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga	2940
cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttggtcca aactggaaca acactcaacc	3000
ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tatttggttaa	3060
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgtttacaa	3120
tttaaatatt tgcattataca atcttcctgt ttttggggct ttcttgatta tcaaccgggg	3180
tacatatgat tgacatgcta gttttacgat taccgttcat cgattctctt gtttgctcca	3240
gactctcagg caatgacctg atagcccttg tagagacctc tcaaaaatag ctaccctctc	3300
cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt gatgggtgatt tgactgtctc	3360
cggcctttct caccgcttg aatctttacc tacacattac tcaggcattg catttaaaat	3420
atatgagggt tctaaaaatt ttatccttg cgttgaaata aaggcttctc ccgcaaaagt	3480
attacagggt cataatgttt ttgttacaac cgatttagct ttatgctctg aggctttatt	3540
gcttaatttt gctaattctt tgccttgccg gtatgattta ttggatgttg gaattcctga	3600
tgcggtatctt tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcataatgg tgcactctca	3660
gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccc acaccgcca acaccgctg	3720
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct	3780
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg	3840
gcctcgtgat acgcctatct ttatagggtt atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt	3900
cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac	3960
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	4020
aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tatteccttt ttgcggcct	4080
tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctgggtgaa agtaaaagat gctgaagatc	4140
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtgaa atccttgaga	4200
gttttcgccc cgaagaacgt ttccaatga tgagcacttt taaagtctct ctatgtggcg	4260
cggatattat ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc	4320
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag	4380

taagagaatt atgcagtgc t gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc	4440
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg	4500
taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg	4560
acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac	4620
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac	4680
cacttctgcg ctccggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg	4740
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatatc	4800
tagttatcta caccgacggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtc	4860
agataggtgc ctactgatt aagcattggg aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac	4920
tttagattga tttaaaactt catTTTTaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg	4980
ataatctcat gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg	5040
tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc	5100
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc	5160
tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt	5220
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc	5280
taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact	5340
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac	5400
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag	5460
aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg	5520
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg	5580
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga	5640
gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt	5700
ttgctcacat gtcttttct gcgttatccc ctgattcgtt ggataaccgt attaccgcct	5760
ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg	5820
aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgccctccc gcgcggttg ccgattcatt	5880
aatg	5884

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種核酸，其包括SEQ ID NO: 11之核苷酸7至2248。

【請求項2】

一種重組腺相關病毒(rAAV)粒子，其包括如請求項1的核酸，其中所述rAAV為感染性的。

【請求項3】

如請求項2的rAAV粒子，其中所述rAAV為選自以下之血清型：AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、AAVrh.74或其變異體。

【請求項4】

如請求項3的rAAV粒子，其中所述rAAV包括AAV-1衣殼。

【請求項5】

一種組合物，其包括如請求項2至4中任一項的rAAV粒子及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項6】

如請求項5的組合物，其中所述組合物經調配以治療有需要之個體之肌肉消耗病症或神經病變，或經調配以刺激有需要之個體之肌肉生長。

【請求項7】

一種編碼NT-3多肽之核酸之用途，其用於製造用於治療人類個體之肌肉消耗病症或神經病變或改善人類個體之肌肉力量或刺激人類個體之肌肉生長之藥物，其中所述核酸包括SEQ ID NO: 11之核苷酸序列。

【請求項8】

一種編碼NT-3多肽之核酸之用途，其用於製造用於治療人類個體之肌肉消耗病症或神經病變或改善人類個體之肌肉力量或刺激人類個體之肌肉生長之藥物，其中：

- a)所述核酸包括如請求項1之核苷酸序列，
- b)所述核酸係由包含如請求項1之核酸的rAAV衣殼化，或
- c)所述核酸係由包含如請求項1之核苷酸序列的重組腺相關病毒(rAAV)scAAV1表現，且所述rAAV為引起NT-3多肽持續表現之劑量。

【請求項9】

如請求項7或8的用途，其中所述藥物經調配用於肌肉或靜脈內注射。

【請求項10】

如請求項7或8的用途，其中所述肌肉力量之改善按CMT兒科量表(CMTPeds)綜合評分降低或歷經兩年時段疾病進展降低量測。

【請求項11】

如請求項7或8的用途，其中所述個體罹患夏馬杜三氏(Charcot-Marie-Tooth；CMT)神經病變。

【請求項12】

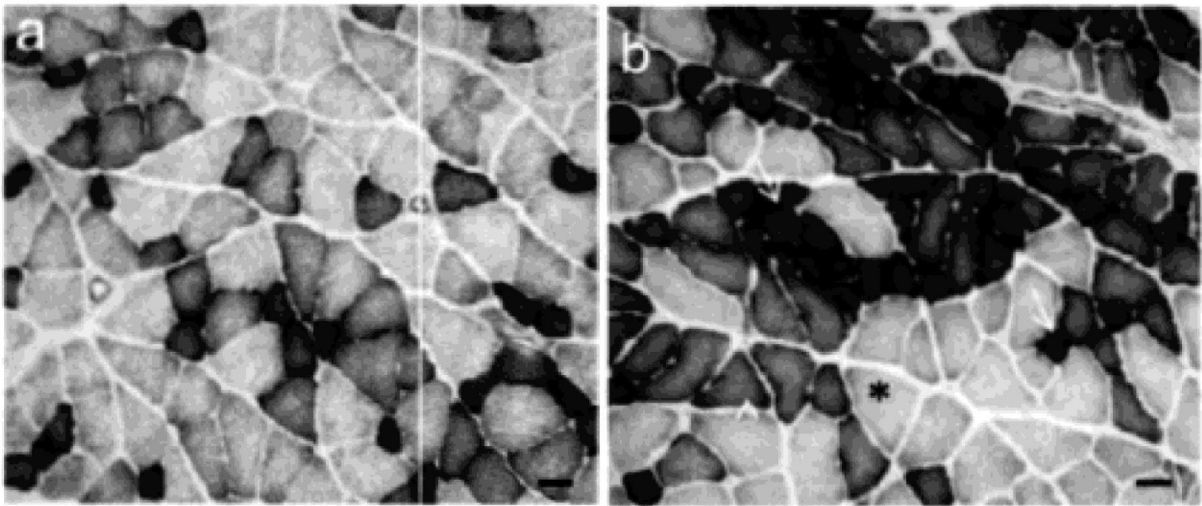
如請求項11的用途，其中所述個體具有Val30Met遺傳變異體、Ile107Val遺傳變異體或Ser77Tyr遺傳變異體。

【請求項13】

如請求項7或8的用途，其中所述個體患有甲狀腺素轉運蛋白澱粉樣蛋白神經病變、由以下所引起之獲得性神經病變：癌症、糖尿病、人類免

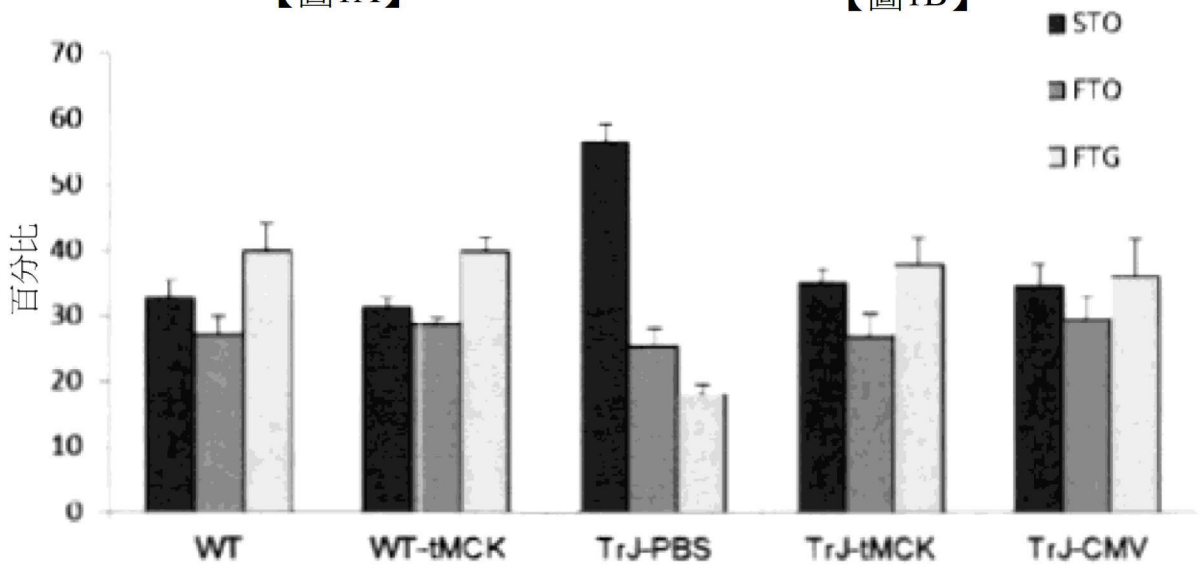
疫缺乏病毒(HIV)感染、甲狀腺病症、甲狀腺功能低下、低血糖症、尿毒症、腎機能不全、肝功能障礙、肝衰竭、紅血球增多症、結締組織病症、萊姆病、乳糜瀉、麻風病、卟啉症、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、脊髓灰白質炎、肢端肥大症、脂質/醣脂代謝紊亂、西尼羅河症候群、澱粉樣變性、粒線體紊亂、異蛋白紊亂、意義不明的單株丙種球蛋白病(monoclonal gammopathy of undetermined significance ; MGUS)、POEMS症候群、營養/維生素缺乏症、維生素B₁₂缺乏症、維生素E缺乏症或銅缺乏症、遺傳性肌病、周邊神經病變、中毒性神經病、自身免疫性周邊多發性神經病變、急性炎性脫髓鞘多發性神經根性神經病變(acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy ; AIDP)、慢性炎性脫髓鞘性多發性神經根性神經病變(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy ; CIDP)、多發性血管炎性單神經炎、環境神經病變、特發性神經節炎、肌萎縮性側索硬化、多灶性運動傳導鎖定神經病變或下運動神經元症候群、神經肌肉疾病、肌肉萎縮、藥物誘導之肌病、肌肉減少症、惡病質、II型肌肉纖維萎縮、年齡相關之肌肉萎縮或獲得性自身免疫性原發性肌肉病症。

【發明圖式】

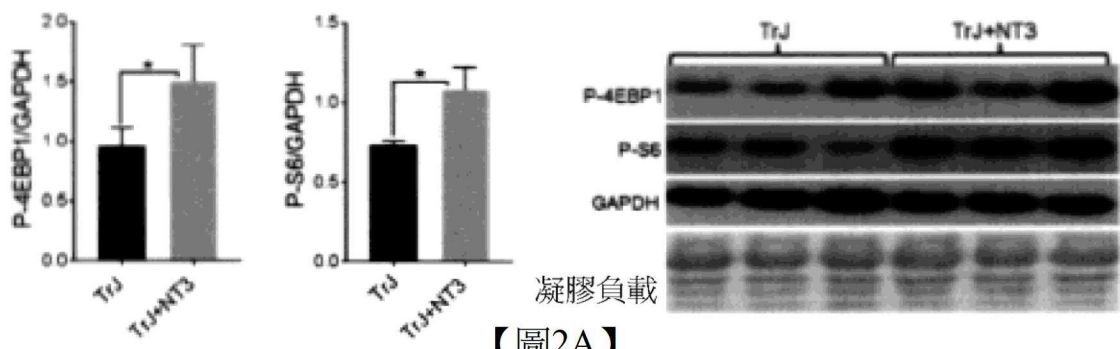


【圖1A】

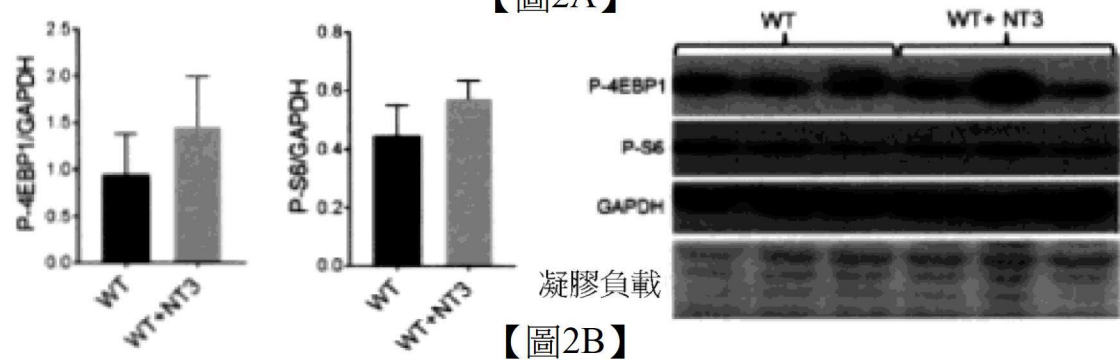
【圖1B】



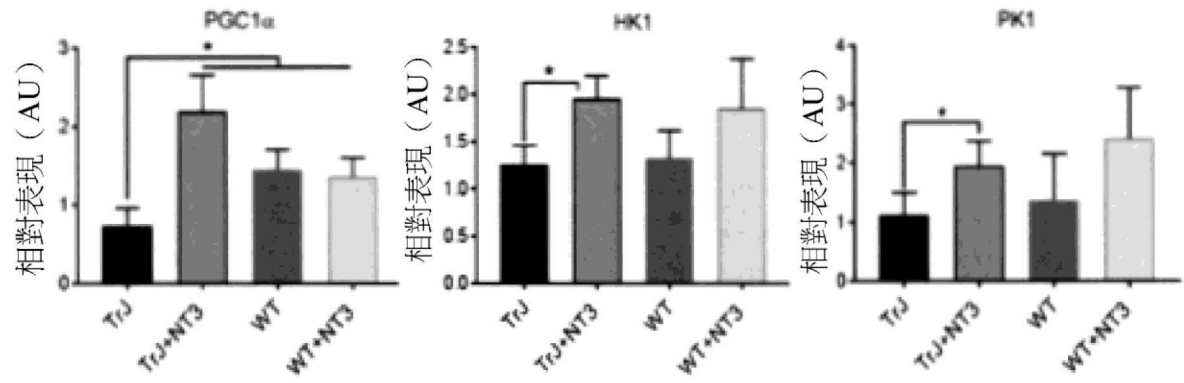
【圖1C】



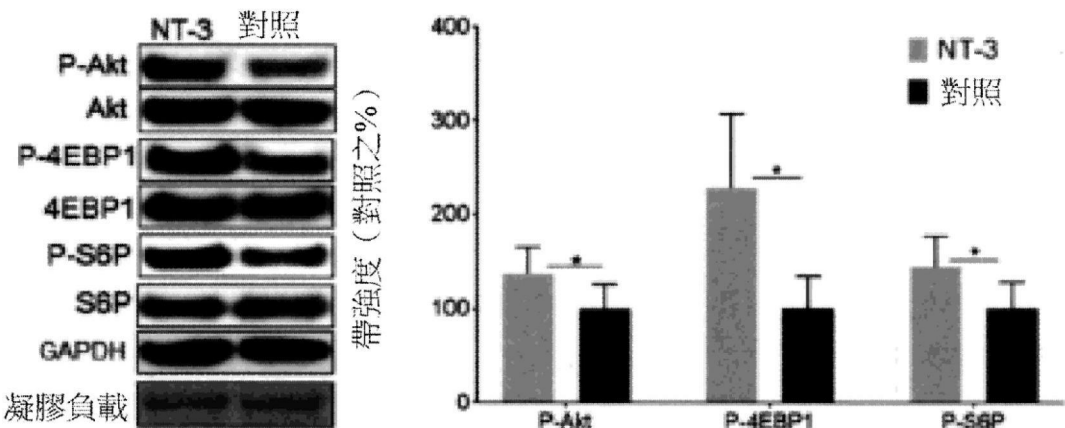
【圖2A】



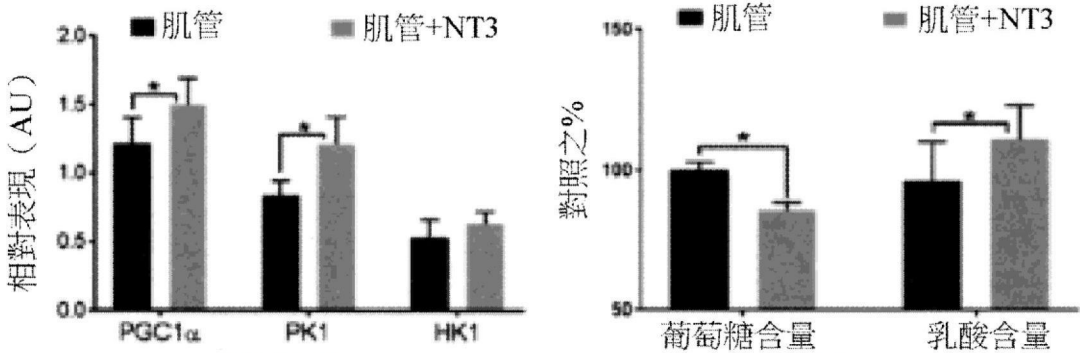
【圖2B】



【圖2C】

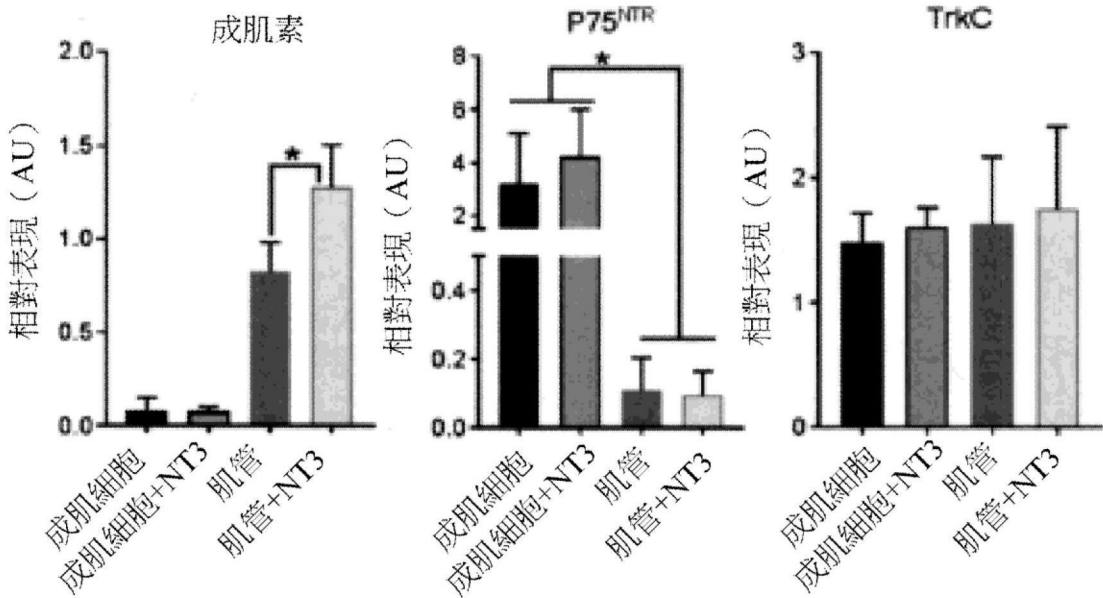


【圖3A】

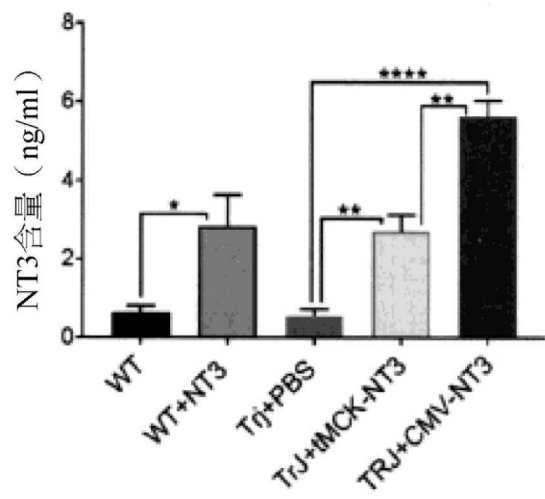


【圖3B】

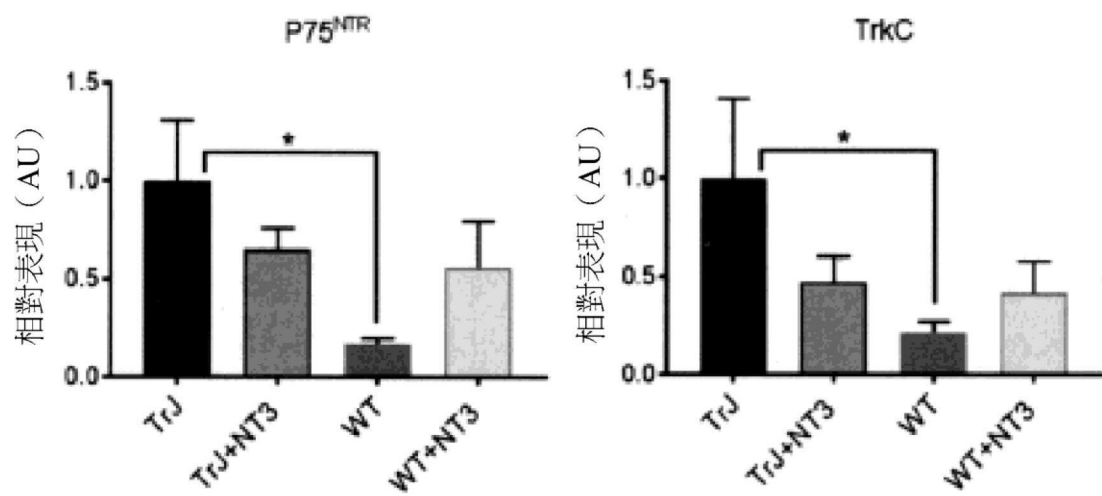
【圖3C】



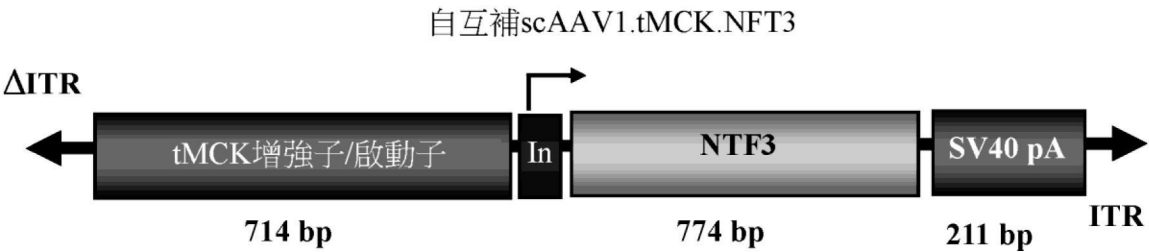
【圖3D】



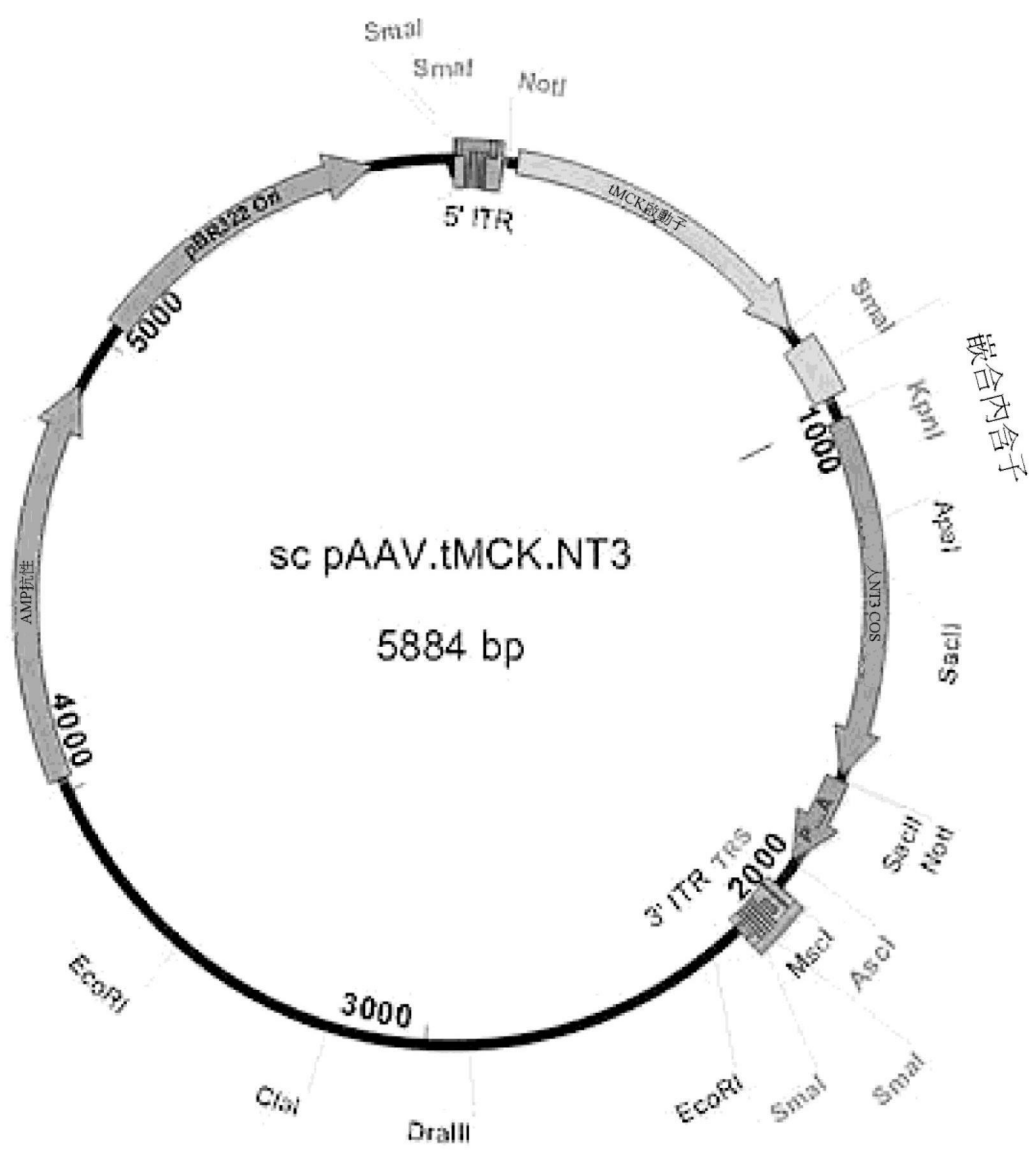
【圖4】



【圖5】

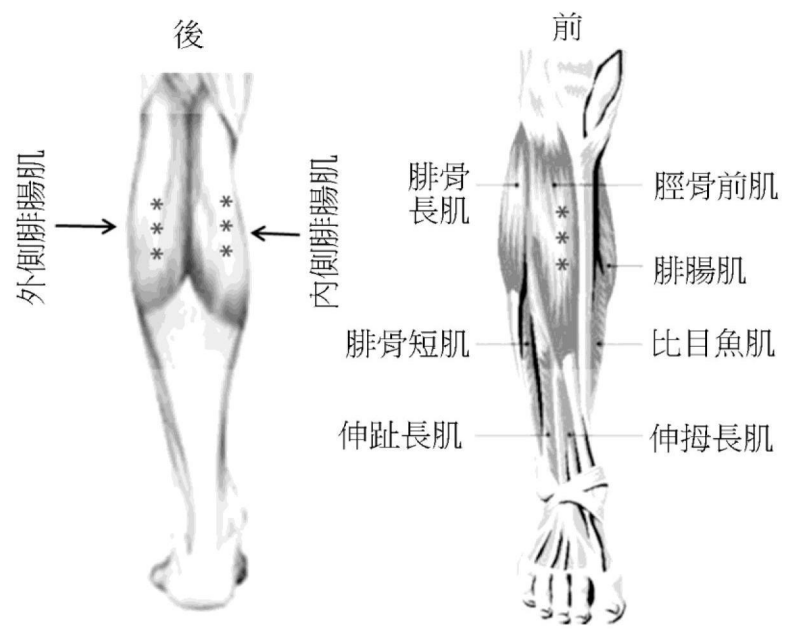


【圖6】



【圖7】

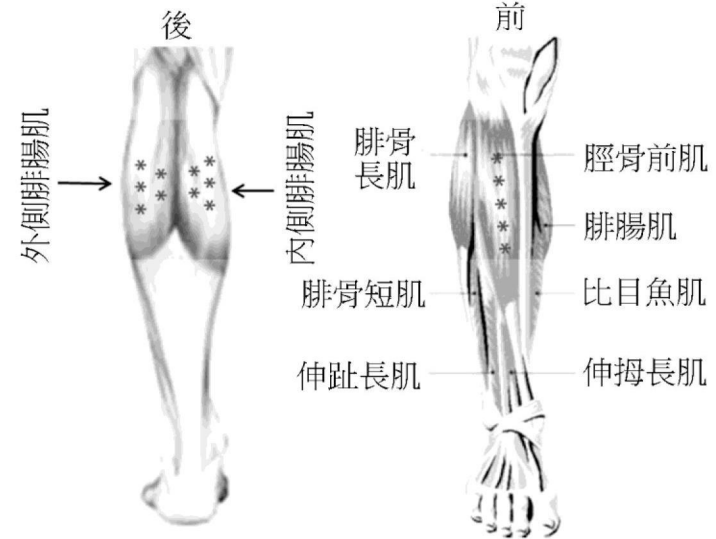
組1之注射部位的示意圖



組	每次注射之體積	每塊肌肉之注射數	單側/雙側
1	0.5 mL	3-4	雙側

【圖8A】

組3之注射部位的示意圖



組	每次注射之體積	每塊肌肉之注射數	單側/雙側
2	1.0 mL	~5	雙側

【圖8B】

sc pAAV.tMCK.NT3載體全序列（5884bp）SEQ ID NO: 11

CAGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
GCCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGggttaaccaattggcgggccgcaaacttg
catgccccactacgggtctaggctgcccattgtaaggagggaaggcctggggacacccgagatgcctggtt
ataattaaccccaacacctgctgcccccccccccccaacacctgctgcctgagcctgagcggttacccca
ccccggtgcctgggtcttaggctctgtacaccatggaggagaagctcgctctaaaaataaacctgtccct
ggtggatccactacgggtctatgctgcccattgtaaggagggaaggcctggggacacccgagatgcctggt
tataattaaccccaacacctgctgcccccccccccccaacacctgctgcctgagcctgagcggttacccc
accccggtgcctgggtcttaggctctgtacaccatggaggagaagctcgctctaaaaataaacctgtccc
tggtggaccactacgggtctaggctgcccattgtaaggagggaaggcctggggacacccgagatgcctggt
tataattaaccccaacacctgctgcccccccccccccaacacctgctgcctgagcctgagcggttacccca
ccccggtgcctgggtcttaggctctgtacaccatggaggagaagctcgctctaaaaataaacctgtccct
ggtcctccctggggacagccctcctggctagtcacacccctgtaggctcctctatataaacccagggggcac
aggggctgccccgggtcacctgcagaagtgggtcgtgaggcactgggcaggtaagtatcaagggtacaa
gacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcttgcgagacagagaagactcttgcggttctgataggc
acctattggtccttactgacatccactttgcctttctctccacaggtgtccactcccagttcaattacagc
gcggtgtacctgcagggatataccaccATGTCCATCTTGTTTTATGTGATATTTCTCGCTTATCTCCGTGG
CATCCAAGGTAACAACATGGATCAAAGGAGTTTGCCAGAAGACTCGCTCAATTCCTCATATTAAAGCTG
ATCCAGGCAGATATTTTGAAAAACAAGCTCTCCAAGCAGATGGTGGACGTTAAGGAAAATTACCAGAGCA
CCCTGCCCAAAGCTGAGGCTCCCCGAGAGCCGGAGCGGGGAGGGCCCCGCCAAGTCAGCATTCAGCCGGT
GATTGCAATGGACACCGAACTGCTGCGACAACAGAGACGCTACAACTCACCGCGGGTCTGTGCTGAGCGAC
AGCACCCCTTGAGACCCCGCCCTTGTTATCTCATGGAGGATTACGTGGGCAGCCCCGTGGTGGCGAACA
GAACATCACGGCGGAAACGGTACGCGGAGCATAAGAGTCACCGAGGGGAGTACTCGGTATGTGACAGTGA
GAGTCTGTGGGTGACCGACAAGTCATCGGCCATCGACATTCGGGGACACCAGGTCACGGTGTGGGGGAG
ATCAAAACGGGCAACTCTCCCGTCAAACAATATTTTATGAAACGCGATGTAAGGAAGCCAGGCCGGTCA
AAAACGGTTGCAGGGGTATTGATGATAAACACTGGAACCTCAGTGCAAAACATCCCAAACCTACGTCCG
AGCACTGACTTCAGAGAACAATAAATCTCgtgggctggcggtggatacggatagacacgtcctgtgtgtgt
gccttgtcgagaaaaatcggaagaacatgaGGCGGCCCGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATG
AGTTTGGACAAACCACAACACTAGAAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGC
TTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCAATTTTATGTTTCAG
GTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTCggcgcgccctCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGG
CGGGTTAATCATTAACATAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG
CTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGC
GAGCGCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA
ATGGCGAATGGAATTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTGTGCA
ATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTCTTCTACTCAGGCAA
GTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACT
CGGTGGCCTCACTGATTATAAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAAATCCCTTTA
ATCGGCCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAA
CCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTT
TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCC
AAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGA
CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGT
CTATCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
AAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTGCTTATACAATCTTCCTGT
TTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTTACGATTACCGTTCAT
CGATTCTCTTGTGTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAG
CTACCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTC
CGGCCCTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAATATATGAGGGT

【圖9】

TCTAAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTT
TTGGTACAACCGATTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCCTTGCCCTGCCT
GTATGATTTATTGGATGTTGGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACA
CCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCA
ACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCT
CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
ACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA
AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCT
TATTCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGAT
GCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATC
CCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAC
GACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACCTGGCGAACTAC
TTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCG
CTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAA
CTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGA
CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAG
ATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACT
CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC
GTGTCTTACCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGT
TCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAG
AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGA
GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGA
CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCT
TTTTACGTTTCTGCGCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGT
GGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATT
AATG

【圖9】(續)