



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202525312 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：114110012

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 07 日

(51)Int. Cl.：

*A61K35/76 (2015.01)**A61K47/02 (2006.01)**A61K47/10 (2006.01)**A61K47/26 (2006.01)**A61K9/19 (2006.01)**A61K9/08 (2006.01)**A61P21/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/10/07

美國

62/911,968

(71)申請人：美商銳進科斯生物股份有限公司 (美國) REGENXBIO INC. (US)

美國

(72)發明人：馬修 特瑞斯坦 MARSHALL, TRISTAN (US)；畢 賈德 BEE, JARED (US)；歐
貝瑞 奎斯汀 O'BERRY, KRISTIN (US)；張俞 ZHANG, YU (CN)；狄帕茲 羅伯
圖 DEPAZ, ROBERTO (US)

(74)代理人：陳長文；呂光；朱淑尹

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：54 共 382 頁

(54)名稱

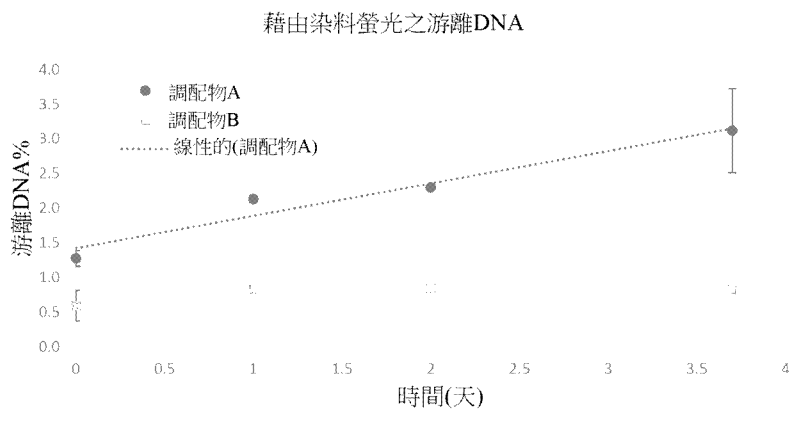
腺相關病毒載體醫藥組合物及方法

(57)摘要

本文提供醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、鹽賦形劑或緩衝劑、糖及界面活性劑。
本文亦提供藉由向有需要之個體投與治療有效量之該醫藥組合物來治療或預防個體之疾病的方法。

Provided herein are pharmaceutical compositions comprising a recombinant adeno-associated virus (AAV), salt excipient or buffer agent, sugar and surfactant. Also provided herein are methods for treating or preventing a disease in a subject by administering a therapeutically effective amount of the said pharmaceutical composition to the subject in need.

指定代表圖：



【圖16】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

腺相關病毒載體醫藥組合物及方法

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR PHARMACEUTICAL
COMPOSITION AND METHODS

【中文】

本文提供醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、鹽賦形劑或緩衝劑、糖及界面活性劑。本文亦提供藉由向有需要之個體投與治療有效量之該醫藥組合物來治療或預防個體之疾病的方法。

【英文】

Provided herein are pharmaceutical compositions comprising a recombinant adeno-associated virus (AAV), salt excipient or buffer agent, sugar and surfactant. Also provided herein are methods for treating or preventing a disease in a subject by administering a therapeutically effective amount of the said pharmaceutical composition to the subject in need.

【指定代表圖】

圖16

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

腺相關病毒載體醫藥組合物及方法

【英文發明名稱】

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR PHARMACEUTICAL
COMPOSITION AND METHODS

【技術領域】

【0001】

【先前技術】

【0002】 腺相關病毒(AAV) (細小病毒(*Parvoviridae*)家族之指示為依賴病毒(*Dependovirus*)之成員)為小的非包膜二十面體病毒，其具有大致4.7千鹼基(kb)至6 kb之單股線性DNA基因體。非病原性、感染性之寬泛宿主及細胞類型向性範圍(包括分裂細胞及非分裂細胞兩者)之特性及產生長期轉殖基因表現之能力，使得AAV為一種用於基因治療的誘人工具(例如Gonçalves, 2005, *Virology Journal*, 2:43)。

【0003】 AAV產品通常儲存於由用於使產品在製造、運送、儲存及投與期間穩定之各種賦形劑構成之緩衝液中。然而，為了針對降解及材料潛在解凍之消極影響之安全性，AAV生物治療劑分佈於-80℃中，即使運送至不能提供在此等溫度下之適當冷儲存的某些地域。將冰箱溫度維持在≤ -60℃為一種挑戰，且自物流觀點出發，提供在較高冷凍溫度(諸如高達-20℃)穩固且多次凍融漂移穩定的調配物為合乎需要的。並非全部臨床地點均具有-80℃冰箱，且此需求將消極地影響將產品分配至廣泛範圍的臨床地點的能力。因此，期望具有一種在冷藏條件下短(至多12個月)期限內

穩定以允許臨床地點解凍產品且將其保持於冷凍機中直至安排患者給藥的調配物。

【0004】 將各種緩衝液特性維持在目標規格範圍內以確保產品穩定性至關重要，但儲存在-80°C 影響供應鏈及分佈。在緩慢冷凍期間水之結晶可導致賦形劑濃縮，此可影響生物製劑之穩定性。相分離或pH偏移亦可發生，其可影響生物製劑之穩定性。對於任何醫藥產品之商業化，鑑別提供穩定性持續延長時間段之調配物應為有利的。另外應有利的是，鑑別在以下條件穩定的調配物：考慮冰箱溫度漂移、變異性或暫時性儲存(至多18個月)於-20°C 冰箱中在-20°C 的冷凍儲存下；允許在給藥之前在診所短期儲存(在2-8°C 至多12個月)的冷藏條件；在允許製造及標記的室溫下；或在允許解凍原料藥及藥物產品以進行填充及標記操作的多次凍融循環下。

【發明內容】

【0005】 本揭示案提供一種醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、緩衝劑、離子鹽、蔗糖及界面活性劑(諸如泊洛沙姆188(poloxamer 188))。提供在防止在冷凍及液體狀態期間組合物結晶且維持pH在6與9之間之濃度下的蔗糖。

【0006】 在一些實施例中，AAV包含來自一或多種選自由以下組成之群之腺相關病毒血清型之組分：AAV1、AAV2、AAV2tYF、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、及AAVrh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、rAAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、

AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16。在一些實施例中，rAAV包含AAV8或AAV9血清型之衣殼蛋白。

【0007】 在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含胺基酸。

【0008】 在一些實施例中，本揭示案提供一種醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、離子鹽賦形劑或緩衝劑、蔗糖及泊洛沙姆188。在一些實施例中，離子鹽賦形劑或緩衝劑可為來自由以下組成之群之一或多種組分：磷酸二氫鉀、磷酸鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸鈉六水合物、磷酸二氫鈉單水合物、緩血酸胺、三(羥甲基)胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)、胺基酸、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(組胺酸-HCl)、丁二酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、及(4-(2-羥乙基)-1-哌咍乙磺酸)(HEPES)、硫酸鈉、硫酸鎂、氯化鎂6-水合物、硫酸鈣、氯化鉀、氯化鈣、檸檬酸鈣。

【0009】 在一些實施例中，醫藥組合物具有不大於約150 mM、約145 mM、約140 mM、約135 mM、約130 mM、約125 mM、約120 mM、約115 mM或約110 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有不大於約150 mM、約145 mM、約140 mM、約135 mM、約130 mM、約125 mM、約120 mM、約115 mM或約110 mM之緩衝劑離子強度。

【0010】 在一些實施例中，醫藥組合物具有不大於150 mM、145 mM、140 mM、135 mM、130 mM、125 mM、120 mM、115 mM或110 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有不大於150 mM、145 mM、140 mM、135 mM、130 mM、125 mM、120 mM、115 mM或110

mM之緩衝劑離子強度。

【0011】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至115 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至100 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約60 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約65 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約70 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約75 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約80 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約85 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約90 mM之離子強度。

【0012】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約30 mM至100 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約30 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約35 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約40 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約45 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約50 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約55 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約60 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約65 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約70 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約75 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約80 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約85 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約90 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約95 mM之離子強度。在一具體實施例中，醫藥組合物具有約100 mM之離子強度。

【0013】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至115 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約65 mM至95 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約70 mM至90 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約75 mM至85 mM之離子強度。

【0014】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約30 mM至100 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約35 mM至95 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約40 mM至90 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約45 mM至85 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約50 mM至80 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約55 mM至75 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至70 mM之離子強度。

【0015】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.2 g/L之氯化鉀。

【0016】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀。

【0017】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在5.84 g/L之氯化鈉。

【0018】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉。

【0019】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L)至18% (重量/體積，180 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，30 g/L)至6% (重量/體積，180 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L)之

蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L) 之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，40 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在5% (重量/體積，50 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在6% (重量/體積，60 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在7% (重量/體積，70 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在8% (重量/體積，80 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在9% (重量/體積，90 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在10% (重量/體積，100 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在11% (重量/體積，110 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在12% (重量/體積，120 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在13% (重量/體積，130 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在14% (重量/體積，140 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在15% (重量/體積，150 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在16% (重量/體積，160 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在17% (重量/體積，170 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在18% (重量/體積，180 g/L)之蔗糖。

【0020】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之泊洛沙姆188。

【0021】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0001% (重量/體積，0.001 g/L)至0.01% (重量/體積，0.1 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中，醫藥組合

物包含濃度在0.0005% (重量/體積, 0.005 g/L)至0.001% (重量/體積, 0.01 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積, 0.01 g/L)至0.05% (重量/體積, 0.5 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積, 0.005 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.0006% (重量/體積, 0.006 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.0007% (重量/體積, 0.007 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.0008% (重量/體積, 0.008 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.0009% (重量/體積, 0.009 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積, 0.01 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.002% (重量/體積, 0.02 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.003% (重量/體積, 0.03 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.004% (重量/體積, 0.04 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.005% (重量/體積, 0.05 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.01% (重量/體積, 0.1 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中, 醫藥組合物包含濃度在0.05% (重量/體積, 0.5 g/L)之泊洛沙姆188。

【0022】 在一些實施例中, 本揭示案提供一種醫藥組合物, 其包含重組腺相關病毒(AAV)、離子鹽賦形劑或緩衝劑、蔗糖及界面活性劑。在一些實施例中, 離子鹽賦形劑或緩衝劑可為來自由以下組成之群之一或多種組分: 磷酸二氫鉀、磷酸鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸鈉六水合

物、磷酸二氫鈉單水合物、緩血酸胺、三(羥甲基)胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)、胺基酸、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(組胺酸-HCl)、丁二酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、及(4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸) (HEPES)、硫酸鈉、硫酸鎂、氯化鎂6-水合物、硫酸鈣、氯化鉀、氯化鈣、檸檬酸鈣。在一些實施例中，界面活性劑可為來自由泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80組成之群之一或多種組分。

【0023】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0001% (重量/體積，0.001 g/L)至0.01% (重量/體積，0.1 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0006% (重量/體積，0.006 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0007% (重量/體積，0.007 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0008% (重量/體積，0.008 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0009% (重量/體積，0.009 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.002% (重量/體積，0.02 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.003% (重量/體積，

0.03 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.004% (重量/體積，0.04 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.005% (重量/體積，0.05 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.01% (重量/體積，0.1 g/L)之聚山梨醇酯20。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯20。

【0024】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0001% (重量/體積，0.001 g/L)至0.01% (重量/體積，0.1 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0006% (重量/體積，0.006 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0007% (重量/體積，0.007 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0008% (重量/體積，0.008 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0009% (重量/體積，0.009 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.002% (重量/體積，0.02 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.003% (重量/體積，

0.03 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.004% (重量/體積，0.04 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.005% (重量/體積，0.05 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.01% (重量/體積，0.1 g/L)之聚山梨醇酯80。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯80。

【0025】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.4。

【0026】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.0至8.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.0至9.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.2。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.2。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.2。在某

些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約8.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約9.0。

【0027】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.4。

【0028】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.0至8.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.0至9.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.2。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.2。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.0。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.1。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.2。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.3。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.4。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為

8.5。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.6。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.7。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.8。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為8.9。在某些實施例中，醫藥組合物之pH為9.0。

【0029】如本文所用且除非另外規定，否則術語「約」意謂在既定值或範圍之 $\pm 10\%$ 內。

【0030】在某些實施例中，醫藥組合物在疏水塗佈的玻璃小瓶中。

【0031】在某些實施例中，醫藥組合物在環烯烴聚合物(Cyclo Olefin Polymer；COP)小瓶中。

【0032】在某些實施例中，醫藥組合物在Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

【0033】在某些實施例中，醫藥組合物在TopLyo塗佈的小瓶中。

【0034】在某些實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其由以下組成：(a)重組AAV，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4%重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188，及(h)水，且其中重組AAV為AAV8。

【0035】在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為 3×10^9 GC/mL、 1×10^{10} GC/mL、 1.2×10^{10} GC/mL、 1.6×10^{10} GC/mL、 4×10^{10} GC/mL、 6×10^{10} GC/mL、 2×10^{11} GC/mL、 2.4×10^{11} GC/mL、 2.5×10^{11} GC/mL、 3×10^{11} GC/mL、 3.2×10^{11} GC/mL、 6.2×10^{11} GC/mL、 6.5×10^{11} GC/mL、 1×10^{12} GC/mL、 3×10^{12} GC/mL、 2×10^{13} GC/mL或 3×10^{13} GC/mL。

【0036】 在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為 3×10^9 GC/mL、 4×10^9 GC/mL、 5×10^9 GC/mL、 6×10^9 GC/mL、 7×10^9 GC/mL、 8×10^9 GC/mL、 9×10^9 GC/mL、 1×10^{10} GC/mL、 2×10^{10} GC/mL、 3×10^{10} GC/mL、 4×10^{10} GC/mL、 5×10^{10} GC/mL、 6×10^{10} GC/mL、 7×10^{10} GC/mL、 8×10^{10} GC/mL、 9×10^{10} GC/mL、 1×10^{11} GC/mL、 2×10^{11} GC/mL、 3×10^{11} GC/mL、 4×10^{11} GC/mL、 5×10^{11} GC/mL、 6×10^{11} GC/mL、 7×10^{11} GC/mL、 8×10^{11} GC/mL、 9×10^{11} GC/mL、 1×10^{12} GC/mL、 2×10^{12} GC/mL、 3×10^{12} GC/mL、 4×10^{12} GC/mL、 5×10^{12} GC/mL、 6×10^{12} GC/mL、 7×10^{12} GC/mL、 8×10^{12} GC/mL、 9×10^{12} GC/mL、 1×10^{13} GC/mL、 1×10^{13} GC/mL、 2×10^{13} GC/mL或 3×10^{13} GC/mL。

【0037】 在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為約 3×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 1.2×10^{10} GC/mL、約 1.6×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 2.4×10^{11} GC/mL、約 2.5×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 3.2×10^{11} GC/mL、約 6.2×10^{11} GC/mL、約 6.5×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL或約 3×10^{13} GC/mL。

【0038】 在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為約 3×10^9 GC/mL、 4×10^9 GC/mL、 5×10^9 GC/mL、 6×10^9 GC/mL、 7×10^9 GC/mL、 8×10^9 GC/mL、 9×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 2×10^{10} GC/mL、約 3×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 5×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 7×10^{10} GC/mL、約 8×10^{10} GC/mL、約 9×10^{10} GC/mL、約 1×10^{11} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11}

GC/mL、約 4×10^{11} GC/mL、約 5×10^{11} GC/mL、約 6×10^{11} GC/mL、約 7×10^{11} GC/mL、約 8×10^{11} GC/mL、約 9×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 2×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 4×10^{12} GC/mL、約 5×10^{12} GC/mL、約 6×10^{12} GC/mL、約 7×10^{12} GC/mL、約 8×10^{12} GC/mL、約 9×10^{12} GC/mL、約 1×10^{13} GC/mL、約 1×10^{13} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL、約 3×10^{13} GC/mL。

【0039】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV對於冷凍/解凍循環比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0040】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV之感染性高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測感染性。

【0041】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測聚集。

【0042】 在某些實施例中，在一段時間內，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年、約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0043】 在某些實施例中，在一段時間內，至少例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年、約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0044】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效

能(IVRP)。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測活體外相對效能(IVRP)。

【0045】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測游離DNA。

【0046】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之大小在一段時間內，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測大小。

【0047】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之大小在一段時間內，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前

或之後，量測大小。

【0048】 在某些實施例中，當儲存在-20℃時，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0049】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0050】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分

析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0051】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0052】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0053】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫

藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0054】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0055】 在某些實施例中，當(i)儲存在-80℃第一時間段；(ii)隨後解凍；及(iii)在解凍之後，儲存在4℃第二時間段時，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。在某些實施例中，第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。在一些實施例中，第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4

週、約1個月、約2個月。

【0056】 在某些實施例中，當(i)儲存在 -80°C 第一時間段；(ii)隨後解凍；及(iii)在解凍之後儲存在 4°C 第二時間段時，重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些實施例中，第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。在一些實施例中，第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

【0057】 在一些實施例中，在儲存在 -80°C 一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在 -80°C 該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在 -20°C 一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在 -20°C 該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在 4°C 一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在 4°C 該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

【0058】 在某些實施例中，當儲存在 -20°C 一段時間時，例如1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相

同 重 組AAV高 至 少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0059】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0060】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0061】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少

約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0062】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0063】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、

30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0064】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0065】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0066】 在某些實施例中，當儲存在37℃時，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0067】 在某些實施例中，當儲存在37℃一段時間時，例如約1

週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0068】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0069】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0070】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0071】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0072】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、

約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。在一些實施例中，在儲存在-80℃一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-20℃一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80℃一段時間之後重組AAV之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-20℃一段時間之後重組AAV之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後重組AAV之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80℃一段時間之後重組

AAV之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，在儲存在-20℃一段時間之後重組AAV之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後重組AAV之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

【0073】 在某些實施例中，當儲存在37℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0074】 在某些實施例中，當儲存在37℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4

年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0075】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0076】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，至少例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0077】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0078】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0079】 在另一態樣中，本文提供一種治療經診斷患有nAMD（濕性AMD）、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(retinal vein occlusion；RVO)、糖尿病性黃斑水腫(diabetic macular edema；DME)或糖尿病性視網膜病變(diabetic retinopathy；DR)之個體之方法，該方法包含(i)製備本文所提供之醫藥組合物，將醫藥組合物儲存在-80°C第一時間段；(ii)解凍醫藥組合物；及(iii)在解凍之後，將醫藥組合物儲存在4°C第二時間段。在一些實施例中，第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。在一些實施例中，第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2

個月。

【0080】 在某些實施例中，本揭示案提供一種醫藥組合物或調配物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、磷酸二氫鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、蔗糖及泊洛沙姆188。在一些實施例中，AAV包含來自AAV8之組分。在一些實施例中，AAV為本文提供之AAV病毒載體，其按以下次序包含以下元件：a)組成性或低氧誘導性啟動子序列；及b)編碼轉殖基因(例如抗VEGF抗原結合片段部分)之序列。在一些實施例中，轉殖基因為針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之(HuPTM)抗體。抗體包括但不限於單株抗體、多株抗體、重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、一價抗體、全長抗體之抗原結合片段及上述之融合蛋白。此類抗原結合片段包括但不限於全長抗VEGF抗體(較佳地，全長抗VEGF單株抗體(mAb))之單域抗體(重鏈抗體(VHH)或奈米抗體之可變域)、Fab、F(ab')₂及scFv (單鏈可變片段) (在本文中被統稱為「抗原結合片段」)。在一較佳實施例中，針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之抗體為針對VEGF之單株抗體(mAb)的完全人類轉譯後修飾之抗原結合片段(「HuPTM FabVEGF_i」)。在另一較佳實施例中，HuPTM FabVEGF_i為抗VEGF mAb之完全人類糖基化之抗原結合片段(「HuGly FabVEGF_i」)。在一替代實施例中，可使用全長mAb。在一較佳實施例中，用於遞送轉殖基因之AAV應對人類視網膜細胞或感光細胞具有向性。此類AAV可包括非複製型重組腺相關病毒載體(「rAAV」)，尤其帶有AAV8衣殼之彼等AAV為較佳的。在一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他

DNA表現構築體為構築體I，其中構築體I包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV8反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞 β -肌動蛋白啟動子，b)雞 β -肌動蛋白內含子及c)兔 β -球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在另一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他DNA表現構築體為構築體II，其中構築體II包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞 β -肌動蛋白啟動子，b)雞 β -肌動蛋白內含子及c)兔 β -球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在一具體實施例中，本文中所描述之構築體繪示於圖4中。在一些實施例中，抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0081】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0082】 在一些實施例中，醫藥組合物為液體組合物。在一些實施

例中，醫藥組合物為冷凍組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為來自本文所揭示之液體組合物之凍乾組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為復原凍乾調配物。

【0083】 在一些實施例中，醫藥組合物為包含在約1%與約7%之間的殘餘水分含量的凍乾組合物。

【0084】 在某些態樣中，本文揭示一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含向個體投與醫藥組合物。

【0085】 在某些態樣中，本文揭示一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含藉由以下向個體投與醫藥組合物：靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0086】 在某些態樣中，醫藥組合物適合於投與眼睛。在某些態樣中，醫藥組合物適合於脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序。

【0087】 在某些實施例中，醫藥組合物適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導

管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0088】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需密度。

【0089】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需滲透壓。在具體實施例中，用於視網膜下投與之所需滲透壓為160-430 mOsm/kg H₂O。在其他具體實施例中，脈絡膜上投與之所需滲透壓小於600 mOsm/kg H₂O。

【0090】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，

諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序,該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管,在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置,其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需黏度。

【0091】 在某些實施例中,醫藥組合物具有200 mOsm/L至660 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中,醫藥組合物具有200 mOsm/L至660 mOsm/L之滲透壓範圍。在一些實施例中,滲透壓小於600 mOsm/kg H₂O。在某些實施例中,醫藥組合物具有約200 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約250 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約300 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約350 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約400 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約450 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約500 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約550 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約600 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約650 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中,醫藥組合物具有約660 mOsm/L之滲透壓。在某些態樣中,本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)或II型黏多醣病(MPS II)之個體之方法,其包含向個體投與醫藥組合物。

【0092】 在一些實施例中,在儲存在-80℃一段時間之後構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前構築體II之載體基因體濃

度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-20℃一段時間之後構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後構築體II之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

【0093】 在一些實施例中，在儲存在-80℃一段時間之後構築體II之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-20℃一段時間之後構築體II之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後構築體II之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

【0094】 在一些實施例中，在儲存在-80℃一段時間之後構築體II之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%與一致。在一些實施例中，

在儲存在-20℃一段時間之後構築體II之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%與一致。在一些實施例中，在儲存在4℃一段時間之後構築體II之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%與一致。在一些實施例中，該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月。在某些實施例中，醫藥組合物能夠在先前已儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

【0095】 在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)或II型黏多醣病(MPS II)之個體之方法，其包含藉由靜脈內投與、皮下投與或肌肉內注射而向個體投與治療有效量之醫藥組合物。

【0096】 在某些態樣中，本文揭示治療或預防個體之疾病之方法，其包含治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體，其包含向個體投與治療有效量之醫藥組合物。

【0097】 在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，其包含藉由以下向個體投與治療有效量之醫藥組合物：脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程

序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序,該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管,在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置,其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0098】 在某些態樣中,本文描述治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之人類個體之方法,其包含藉由向該人類個體之眼睛中之脈絡膜上腔、視網膜下腔或鞏膜外表面(例如藉由脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置,諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序,該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管,在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置,其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))投與醫藥組合物,將治療有效量之由人類視網膜細胞產生的抗hVEGF抗原結合片段遞送至該人類個體的視網膜。

【0099】 在某些態樣中,本文提供一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法,方法包含(i)製備本文所提供之醫藥組合物,將醫藥組合物儲存在-80℃第一時間段;(ii)解凍醫藥組合物;及(iii)在解凍之後,將醫藥組合物儲存在4℃第二時間段。在一些實施例中,第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個

月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。在一些實施例中，第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

【0100】 本文描述由人類視網膜細胞產生之抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體，例如抗hVEGF抗原結合片段。人類VEGF (hVEGF)為一種由*VEGF* (*VEGFA*、*VEGFB*、*VEGFC*或*VEGFD*)基因編碼之人類蛋白質。hVEGF之例示性胺基酸序列可在GenBank寄存編號AAA35789.1處找到。hVEGF之例示性核酸序列可在GenBank寄存編號M32977.1處找到。

【0101】 在本文所描述之方法之某些態樣中，抗原結合片段包含含有SEQ ID NO. 2或SEQ ID NO. 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO. 1或SEQ ID NO. 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0102】 在本文所描述之方法之某些態樣中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 17-19或SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3。

【0103】 在本文所描述之方法之一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16的輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21的重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3的第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中的一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中的一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu))，且輕鏈

CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0104】 在本文所描述之方法之一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1的最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中的一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADF KR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中

之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0105】 在本文所描述之方法之一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1的最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中的一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3的第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中的一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一

具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，

WINTYTGPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0106】 在某些態樣中，本文描述治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之人類個體之方法，其包含：向該人類個體之眼睛遞送治療有效量之針對hVEGF之mAb的抗原結合片段，該抗原結合片段含有 α 2,6-唾液酸化的聚糖。在一特定態樣中，本文描述治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之人類個體之方法，其包含：藉由向該人類個體之眼睛中之脈絡膜上腔、視網膜下腔或鞏膜外表面投與(例如藉由脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))包

含編碼針對hVEGF之mAb之抗原結合片段的表現載體的醫藥組合物，向該人類個體的眼睛遞送治療有效量的針對hVEGF的mAb的抗原結合片段，該抗原結合片段含有 α 2,6-唾液酸化的聚糖。

【0107】 在某些態樣中，本文描述治療經診斷患有nAMD（濕性AMD）、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之人類個體之方法，其包含：向該人類個體之眼睛遞送治療有效量之針對hVEGF之mAb的經糖基化抗原結合片段，其中該抗原結合片段不含有可偵測的NeuGc及/或 α -Gal抗原(亦即，如本文所用，「可偵測」意謂可藉由下文所描述之標準分析偵測的含量)。在一具體實施例中，本文描述治療經診斷患有nAMD（濕性AMD）、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之人類個體之方法，其包含：藉由向該人類個體之眼睛中之脈絡膜上腔、視網膜下腔或鞏膜外表面投與(例如藉由脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))包含編碼針對hVEGF之mAb之經糖基化抗原結合片段的表現載體的醫藥組合物(其中該抗原結合片段不含有可偵測的NeuGc及/或 α -Gal抗原)，向該人類個體的眼睛遞送治療有效量的針對hVEGF的mAb的經糖基化抗原結合片段。

【0108】 國際公開案第WO2019/067540號(以全文引用之方式併入

本文中)中提供關於針對hVEGF之mAb之抗hVEGF抗體或抗原結合片段的更多細節。

【0109】 在一具體態樣中，抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO. 2或SEQ ID NO. 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO. 1或SEQ ID NO. 3之胺基酸序列的輕鏈。在一具體態樣中，表現載體為AAV8載體。

【0110】 在本文所描述之方法之某些態樣中，抗原結合片段轉殖基因編碼前導肽。前導肽亦可在本文中被稱作信號肽或前導序列。

【0111】 在本文所描述之方法之某些態樣中，遞送至眼睛包含遞送至眼睛之視網膜、脈絡膜及/或玻璃體液。在本文所描述之方法之某些態樣中，抗原結合片段包含在C端處含一個、二個、三個或四個額外胺基酸之重鏈。

【0112】 在特定實施例中，方法涵蓋治療已經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)且鑑別為對用抗VEGF抗體治療有反應之患者。在更具體實施例中，患者對用抗VEGF抗原結合片段治療有反應。在某些實施例中，已顯示患者對在用基因療法治療之前用玻璃體內注射之抗VEGF抗原結合片段治療有反應。在具體實施例中，患者先前已用LUCENTIS® (蘭比珠單抗(ranibizumab))、EYLEA® (阿柏西普(aflibercept))及/或AVASTIN® (貝伐單抗(bevacizumab))治療，且已發現對該LUCENTIS® (蘭比珠單抗)、EYLEA® (阿柏西普)及/或AVASTIN® (貝伐單抗)中之一或多者有反應。

【0113】 將此類病毒載體或其他DNA表現構築體遞送至其中之個體應對由病毒載體或表現構築體中之轉殖基因編碼的抗hVEGF抗原結合片

段有反應。為了判定反應性，可諸如藉由玻璃體內注射直接向個體投與抗 VEGF 抗原結合片段轉殖基因產物(例如在細胞培養物、生物反應器等中產生)。

【0114】 在本文所描述之方法之某些態樣中，抗原結合片段包含在 C 端處不含額外胺基酸之重鏈。

【0115】 在本文所描述之方法之某些態樣中，產生抗原結合片段分子群體，其中抗原結合片段分子包含重鏈，且其中 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10% 或 20% 或更少之抗原結合片段分子群體在重鏈之 C 端處包含一個、二個、三個或四個額外胺基酸。在本文所描述之方法之某些態樣中，產生抗原結合片段分子群體，其中抗原結合片段分子包含重鏈，且其中 0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10% 或 20% 或更少但大於 0% 之抗原結合片段分子群體在重鏈之 C 端處包含一個、二個、三個或四個額外胺基酸。

【0116】 在本文所描述之方法之某些態樣中，產生抗原結合片段分子群體，其中抗原結合片段分子包含重鏈，且其中 0.5-1%、0.5%-2%、0.5%-3%、0.5%-4%、0.5%-5%、0.5%-10%、0.5%-20%、1%-2%、1%-3%、1%-4%、1%-5%、1%-10%、1%-20%、2%-3%、2%-4%、2%-5%、2%-10%、2%-20%、3%-4%、3%-5%、3%-10%、3%-20%、4%-5%、4%-10%、4%-20%、5%-10%、5%-20% 或 10%-20% 之抗原結合片段分子群體在重鏈之 C 端處包含一個、二個、三個或四個額外胺基酸。

【0117】 由轉殖基因編碼之 HuPTMFabVEGF_i，例如 HuGlyFabVEGF_i，可包括但不限於與 hVEGF 結合之抗體的抗原結合片段，諸如貝伐單抗；抗 hVEGF Fab 部分，諸如蘭比珠單抗；或經工程改造

以在Fab域上含有額外糖基化位點的此類貝伐單抗或蘭比珠單抗Fab部分(例如, 參見Courtois等人, 2016, mAbs 8: 99-112, 其關於在全長抗體之Fab域上經高糖基化之貝伐單抗衍生物的描述全部以引用的方式併入本文中)。

【0118】 用於遞送轉殖基因之重組型載體應對人類視網膜細胞或感光細胞具有向性。此類載體可包括非複製型重組腺相關病毒載體(「rAAV」), 尤其帶有AAV8衣殼之彼等載體為較佳的。然而, 可使用其他病毒載體, 包括但不限於慢病毒載體、痘瘡病毒載體或被稱作「裸DNA」構築體之非病毒表現載體。較佳地, HuPTM Fab VEGFi, 例如HuGly Fab VEGFi轉殖基因應受適當的表現控制元件控制, 例如CB7啟動子(雞 β -肌動蛋白啟動子及CMV增強子)、RPE65啟動子或視蛋白啟動子等, 且可包括增強由載體驅動之轉殖基因表現的其他表現控制元件(例如內含子, 諸如雞 β -肌動蛋白內含子、小鼠微小病毒(MVM)內含子、人類因子IX內含子(例如FIX截短之內含子1)、 β -球蛋白剪接受體/免疫球蛋白重鏈剪接受體內含子、腺病毒剪接受體/免疫球蛋白剪接受體內含子、SV40晚期剪接受體/剪接受體(19S/16S)內含子及雜交腺病毒剪接受體/IgG剪接受體內含子以及polyA信號, 諸如兔 β -球蛋白polyA信號、人類生長激素(hGH) polyA信號、SV40晚期polyA信號、合成polyA (SPA)信號及牛生長激素(bGH) polyA信號)。參見例如Powell及Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57。

【0119】 基因療法構築體經設計以使得重鏈及輕鏈均得以表現。更具體言之, 重鏈及輕鏈應以大約相等的量表現, 換言之, 重鏈及輕鏈以重鏈與輕鏈大致1:1之比率表現。重鏈及輕鏈之編碼序列可經工程改造在單

一構築體中，其中重鏈及輕鏈藉由可裂解連接子或IRES隔開，從而表現單獨重鏈及輕鏈多肽。關於可與本文提供之方法及組合物一起使用的特定前導序列參見例如章節5.2.4，及特定IRES、2A及其他連接子序列，參見例如章節5.2.5。

【0120】 在某些實施例中，基因療法構築體呈AAV載體活性成分於調配物緩衝液中之冷凍無菌、單次性使用溶液形式供應。在一具體實施例中，適合於視網膜下投與之醫藥組合物包含重組(例如rHuGlyFabVEGFi)載體於包含生理學上相容之水性緩衝液、界面活性劑及視情況存在之賦形劑之調配物緩衝液中之懸浮液。

【0121】 在某些實施例中，基因療法構築體呈AAV載體活性成分於調配物緩衝液中之冷凍無菌、單次性使用溶液形式供應。在一具體實施例中，適合於脈絡膜上、視網膜下、近鞏膜及/或視網膜內投與之醫藥組合物包含重組(例如rHuGlyFabVEGFi)載體於包含生理學上相容之水性緩衝液、界面活性劑及視情況存在之賦形劑之調配物緩衝液中之懸浮液。

【0122】 應以在 ≥ 0.1 mL至 ≤ 0.5 mL範圍內之體積，較佳地以0.1至0.30 mL (100-300 μ l)之體積，且最佳地以0.25 mL (250 μ l)之體積，視網膜下及/或視網膜內投與(例如藉由經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)或經由脈絡膜上腔之視網膜下投與)治療有效量之重組載體。可在同一就診期間以一或多個注射投與治療有效量之重組載體。

【0123】 應以100 μ l或更小之體積，例如以50-100 μ l之體積脈絡膜上投與(例如藉由脈絡膜上注射)治療有效劑量之重組載體。應以500 μ l或更小之體積，例如以10-20 μ l、20-50 μ l、50-100 μ l、100-200 μ l、200-300 μ l、300-400 μ l或400-500 μ l之體積，向鞏膜外表面投與(例如藉由後

近鞏膜貯存程序)治療有效量之重組載體。視網膜下注射為一種由經過訓練之視網膜醫師進行的手術程序，其涉及在局部麻醉下對個體進行玻璃體切除術，且將基因療法視網膜下注射至視網膜中(參見例如Campochiaro等人, 2017, Hum Gen Ther 28(1):99-111，其以全文引用之方式併入本文中)。在一具體實施例中，無視網膜下投與係使用將藥物注射至視網膜下腔中之脈絡膜上導管經由脈絡膜上腔來進行，諸如包含導管之視網膜下藥物遞送裝置，該導管可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極，在該後極處小針注入至視網膜下腔中(參見例如Baldassarre等人, 2017, Subretinal Delivery of Cells via the Suprachoroidal Space: Janssen Trial. 在Schwartz等人(編) Cellular Therapies for Retinal Disease, Springer, Cham 中；國際專利申請公開案第WO 2016/040635 A1號；其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。脈絡膜上投與程序涉及將藥物投與至眼睛之脈絡膜上腔，且通常使用脈絡膜上藥物遞送裝置來進行，諸如具有微針之微小注射器(參見例如Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23；Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87；其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。可根據本文中所描述之本發明用於將表現載體沈積於脈絡膜上腔中之脈絡膜上藥物遞送裝置包括但不限於由Clearside® Biomedical, Inc.製造之脈絡膜上藥物遞送裝置(參見例如Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23)及MedOne脈絡膜上導管。可根據本文中所描述之本發明用於經由脈絡膜上腔將表現載體沈積於視網膜下腔中之視網膜下藥物遞送裝置包括但不限於由Janssen Pharmaceuticals, Inc.製造之視網膜下藥物遞送裝置(參見例如國際專利申請公開案第WO 2016/040635 A1號)。在一具體實施例中，向鞏膜外表面投與係藉由近鞏膜藥物遞送裝置來進行，該裝置包

含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面之插管。關於不同投與模式之更多細節，參見章節5.3.2。脈絡膜上、視網膜下、近鞏膜及/或視網膜內投與應致使將可溶性轉殖基因產物遞送至視網膜、玻璃體液及/或水狀液。由視網膜細胞，例如視桿細胞、視錐細胞、視網膜色素上皮細胞、水平細胞、雙極細胞、無軸突神經細胞、神經節細胞及/或穆勒細胞(Müller cell)表現轉殖基因產物(例如所編碼之抗VEGF抗體)致使將轉殖基因產物遞送於視網膜、玻璃體液及/或水狀液中且維持於其中。在一具體實施例中，維持轉殖基因產物在玻璃體液中至少0.330 $\mu\text{g/mL}$ 或在水狀液(眼前房)中0.110 $\mu\text{g/mL}$ 之Cmin濃度持續三個月的劑量為所需的；其後，應維持轉殖基因產物之玻璃體Cmin濃度在1.70至6.60 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內，及/或水狀液Cmin濃度在0.567至2.20 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內。然而，因為轉殖基因產物持續產生，所以維持低濃度可為有效的。可在來自經治療之眼睛之前房的玻璃體液及/或水狀液的患者樣品中量測轉殖基因產物之濃度。替代地，可藉由量測患者之轉殖基因產物之血清濃度來估計及/或監測玻璃體液濃度——全身與玻璃體暴露於轉殖基因產物之比率為約1:90,000。(例如參見Xu L等人, 2013, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 1616-1624, 第1621頁及第1623頁之表5中報導之蘭比珠單抗的玻璃體液及血清濃度，其以全文引用之方式併入本文中)。

【0124】 在某些實施例中，藉由向患者眼睛投與(例如藉由脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)或經由脈絡膜上腔之視網膜下投與)之每毫升基因體複本或基因體複本數來量測劑量。在某些實施例中，投與每毫升 2.4×10^{11} 個基因體複本至每毫升 1×10^{13} 個基因體複本。在一

具體實施例中，投與每毫升 2.4×10^{11} 個基因體複本至每毫升 5×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 5×10^{11} 個基因體複本至每毫升 1×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 1×10^{12} 個基因體複本至每毫升 5×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 5×10^{12} 個基因體複本至每毫升 1×10^{13} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 2.4×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 5×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 1×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 5×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 1×10^{13} 個基因體複本。在某些實施例中，投與 1×10^9 至 1×10^{12} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 3×10^9 至 2.5×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 1×10^9 至 2.5×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 1×10^9 至 1×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 1×10^9 至 5×10^9 個基因體複本。在具體實施例中，投與 6×10^9 至 3×10^{10} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 4×10^{10} 至 1×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 2×10^{11} 至 1×10^{12} 個基因體複本。在一具體實施例中，投與約 3×10^9 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 1.2×10^{10} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1×10^{10} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 4×10^{10} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 6×10^{10} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 2.4×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.6×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.2×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.6×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.4×10^{11} 個基因體複

本)。在另一具體實施例中，投與約 1.55×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.2×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 2.5×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 1.0×10^{12} 個基因體複本)。

【0125】 如本文所用且除非另外規定，否則術語「約」意謂在既定值或範圍之 $\pm 10\%$ 內。

【0126】 本發明相對於標準護理治療具有若干優點，該等標準護理治療涉及反複眼部注射高劑量VEGF抑制劑大丸劑，其隨著時間推移消散，導致峰含量及谷含量。與反覆注射抗體相反，轉殖基因產物抗體之持續表現使作用部位處存在之抗體含量更一致，風險更低且對於患者而言更便利，因為需要進行的注射次數更少，使得醫生問診減少。一致的蛋白質產生可能會使得臨床結果更好，因為不大可能發生視網膜水腫反彈。此外，由於在轉譯期間及之後存在不同微環境，自轉殖基因表現之抗體係以不同於直接注射之抗體的方式經轉譯後修飾。在不受任何特定理論束縛的情況下，此導致抗體具有不同的擴散、生物活性、分佈、親和力、藥物動力學及免疫原性特性，使得與直接注射之抗體相比，遞送至作用部位之抗體為「生物改良劑(biobetter)」。

【0127】 另外，自轉殖基因活體內表現之抗體不太可能含有與由重組技術產生之抗體相關的降解產物，諸如蛋白質聚集及蛋白質氧化。由於高蛋白質濃度、與製造設備及容器之表面相互作用以及利用某些緩衝液系統之純化，聚集為與蛋白質產生及儲存相關之問題。在基因療法之轉殖基因表現中不存在此等促進聚集之條件。氧化，諸如甲硫胺酸、色胺酸及組胺酸氧化，亦與蛋白質產生及儲存相關，且由脅迫細胞培養條件、金屬及

空氣接觸以及緩衝劑及賦形劑中之雜質引起。自轉殖基因活體內表現之蛋白質亦可在脅迫條件下氧化。然而，人類及許多其他生物體均配備有抗氧化防禦系統，其不僅降低氧化脅迫，且有時亦修復及/或逆轉氧化。因此，活體內產生之蛋白質不太可能呈氧化形式。聚集及氧化均可能影響效能、藥物動力學(清除率)及免疫原性。

【0128】 在不受理論束縛之情況下，本文提供之方法及組合物部分地基於以下原理：

(i) 人類視網膜細胞為分泌細胞，具有對分泌蛋白進行轉譯後加工之細胞機制——包括糖基化及酪胺酸-O-硫酸化，其為視網膜細胞中之穩固過程。(參見例如Wang等人, 2013, *Analytical Biochem.* 427: 20-28及Adamis等人, 1993, *BBRC* 193: 631-638報告視網膜細胞產生糖蛋白；以及Kanan等人, 2009, *Exp. Eye Res.* 89: 559-567及Kanan & Al-Ubaidi, 2015, *Exp. Eye Res.* 133: 126-131報告視網膜細胞分泌之酪胺酸硫酸化糖蛋白的產生，其中之每一者關於人類視網膜細胞進行的轉譯後修飾全部以引用的方式併入本文中)。

(ii) 與目前先進技術理解相反，抗VEGF抗原結合片段，諸如蘭比珠單抗(及全長抗VEGF mAb之Fab域，諸如貝伐單抗)確實具有N-連接之糖基化位點。舉例而言，參見圖1，其標識蘭比珠單抗之C_H域(TVSWN¹⁶⁵SGAL)及C_L域(QSGN¹⁵⁸SQE)中之非共同天冬醯胺(「N」)糖基化位點，以及V_H域(Q¹¹⁵GT)及V_L域(TFQ¹⁰⁰GT)中作為糖基化位點的麩醯胺酸(「Q」)殘基(以及貝伐單抗之Fab中的對應位點)。(參見例如Valliere-Douglass等人, 2009, *J. Biol. Chem.* 284: 32493-32506及Valliere-Douglass等人, 2010, *J. Biol. Chem.* 285: 16012-16022，其中之每一者關

於抗體中N-連接之糖基化位點的鑑別之全文以引用的方式併入本文中)。

(iii) 儘管此類非典型位點通常導致抗體群體之糖基化量低(例如約1-5%)，但功能優勢在免疫赦免器官(諸如眼睛)中可為顯著的(參見例如van de Bovenkamp等人, 2016, J. Immunol. 196:1435-1441)。舉例而言，Fab糖基化可影響抗體之穩定性、半衰期及結合特徵。為了判定Fab糖基化對於抗體與其目標之親和力的效果，可使用熟習此項技術者已知的任何技術，例如酶聯免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay；ELISA)或表面電漿子共振(surface plasmon resonance；SPR)。為了判定Fab糖基化對於抗體之半衰期的效果，可使用熟習此項技術者已知的任何技術，例如藉由量測已投與放射性標記抗體之個體的血液或器官(例如眼睛)中之放射性量。為了判定Fab糖基化對於抗體穩定性(例如聚集或蛋白質去摺疊量)之效果，可使用熟習此項技術者已知的任何技術，例如差示掃描量熱法(differential scanning calorimetry；DSC)，高效液相層析(high performance liquid chromatography；HPLC)，例如尺寸排阻高效液相層析(size exclusion high performance liquid chromatography；SEC-HPLC)，毛細管電泳，質譜分析或濁度量測。本文提供之HuPTMFabVEGF_i，例如HuGlyFabVEGF_i轉殖基因導致產生在非典型位點處0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%或更多經糖基化之Fab。在某些實施例中，來自Fab群體之0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%或更多Fab在非典型位點處經糖基化。在某些實施例中，0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%或更多非典型位點經糖基化。在某些實施例中，Fab在此等非典型位點處之糖基化比HEK293細胞中產生之Fab中之此等非典型位

點之糖基化的量大25%、50%、100%、200%、300%、400%、500%或更多。

(iv) 除糖基化位點之外，抗VEGF Fab(諸如蘭比珠單抗)(及貝伐單抗之Fab)在CDR中或其附近含有酪胺酸(「Y」)硫酸化位點；參見圖1，其標識蘭比珠單抗之V_H (EDTAVY⁹⁴Y⁹⁵)及V_L (EDFATY⁸⁶)域中之酪胺酸-O-硫酸化位點(及貝伐單抗之Fab中的對應位點)。(參見例如Yang等人, 2015, *Molecules* 20:2138-2164, 尤其第2154頁，其關於進行蛋白質酪胺酸硫酸化之酪胺酸殘基周圍胺基酸的分析全部以引用的方式併入本文中。「規則」可概述如下：Y殘基在Y之+5至-5位置內具有E或D，且其中Y之-1位置為中性或酸性帶電荷胺基酸，而非消除硫酸化之鹼性胺基酸，例如R、K或H)。人類IgG抗體可表現出許多其他轉譯後修飾，諸如N端修飾、C端修飾、胺基酸殘基之降解或氧化、半胱胺酸相關變體及糖基化(參見例如Liu等人, 2014, *mAbs* 6(5):1145-1154)。

(v) 人類視網膜細胞對抗VEGF Fab (諸如蘭比珠單抗或貝伐單抗之Fab片段)的糖基化將引起聚糖之添加，此可改良轉殖基因產物之穩定性、半衰期及減少不希望的聚集及/或免疫原性。(關於Fab糖基化之新興重要性的綜述，參見例如Bovenkamp等人, 2016, *J. Immunol.* 196: 1435-1441)。重要的是，可添加至本文提供之HuPTMFabVEGF_i，例如HuGlyFabVEGF_i之聚糖為高度加工的複合型雙觸角N-聚糖，其含有2,6-唾液酸(例如參見圖2，其描繪可併入HuPTMFabVEGF_i，例如HuGlyFabVEGF_i中之聚糖)及二等分GlcNAc，但不含NGNA (N-羥乙醯基神經胺糖酸，Neu5Gc)。此類聚糖不存在於蘭比珠單抗(其在大腸桿菌(*E. coli*)中製成且根本未經糖基化)或貝伐單抗(其在CHO細胞中製成，而

CHO細胞不具有進行此轉譯後修飾所需的2,6-唾液酸基轉移酶，CHO細胞亦不產生二等分GlcNAc，儘管該等細胞確實添加Neu5Gc (NGNA)而非Neu5Ac (NANA)作為對人類不典型(且可能具有免疫原性)的唾液酸)。參見例如Dumont等人, 2015, Crit. Rev. Biotechnol. (早期在線，在線公開於2015年9月18日，第1-13頁，第5頁)。此外，CHO細胞亦可產生一種免疫原性聚糖(α -Gal抗原)，其與大多數個體中存在之抗 α -Gal抗體反應，且在高濃度下可觸發全身性過敏反應。參見例如Bosques, 2010, Nat Biotech 28: 1153-1156。本文提供之HuPTM FabVEGF_i，例如HuGly FabVEGF_i的人類糖基化型態應降低轉殖基因產物之免疫原性且提高功效。

(vi) 抗VEGF Fab，諸如蘭比珠單抗或貝伐單抗之Fab片段的酪胺酸硫酸化(人類視網膜細胞中穩固的轉譯後過程)可使得轉殖基因產物對VEGF之親合力增加。實際上，已證明針對其他目標之治療性抗體之Fab的酪胺酸硫酸化顯著增加對抗原之親和性及活性。(參見例如Loos等人, 2015, PNAS 112: 12675-12680及Choe等人, 2003, Cell 114: 161-170)。此類轉譯後修飾不存在於蘭比珠單抗(其在大腸桿菌中製成，大腸桿菌為不具有酪胺酸硫酸化所需之酶的宿主)上，且最多在貝伐單抗(CHO細胞產物)中體現不足。與人類視網膜細胞不同，CHO細胞並非分泌細胞，且轉譯後酪胺酸硫酸化之能力有限。(參見例如Mikkelsen及Ezban, 1991, Biochemistry 30: 1533-1537，尤其第1537頁之論述)。

【0129】由於前述原因，HuPTM FabVEGF_i (例如HuGly FabVEGF_i)之產生應得到經由基因療法實現之用於治療以下的「生物較佳」分子：nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)，例如藉由

向經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者(人類個體之眼睛中之脈絡膜上腔、視網膜下腔或鞏膜外表面投與編碼HuPTMFabVEGF_i (例如HuGlyFabVEGF_i)之病毒載體或其他DNA表現構築體(例如藉由脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序)，以在眼睛中產生持續供應由經轉導之視網膜細胞產生的完全人類轉譯後修飾的例如人類糖基化的硫酸化轉殖基因產物的永久性貯存。FabVEGF_i之cDNA構築體應包括信號肽，以確保由經轉導之視網膜細胞進行適當的輔助及轉譯後加工(糖基化及蛋白質硫酸化)。由視網膜細胞使用之此類信號序列可包括但不限於：

- MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA (VEGF-A信號肽)
(SEQ ID NO: 5)
- MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA (Fibulin-1信號肽)
(SEQ ID NO: 6)
- MAPLRPLLIL ALLAWVALA (玻連蛋白信號肽) (SEQ ID NO: 7)
- MRLLAKIICLMLWAICVA (補體因子H信號肽) (SEQ ID NO: 8)
- MRLLAFLSLL ALVLQETGT (視力蛋白信號肽) (SEQ ID NO: 9)
- MKWVTFISLLFLFSSAYS(白蛋白信號肽) (SEQ ID NO: 22)
- MAFLWLLSCWALLGTTFG (胰凝乳蛋白酶原信號肽) (SEQ ID NO: 23)
- MYRMQLLSCIALILALVTNS (介白素-2信號肽) (SEQ ID NO: 24)

- MNLLLILTFVAAAVA (胰蛋白酶原-2信號肽) (SEQ ID NO: 25)
- MYRMQLLLIALSLALVTNS (突變型介白素-2信號肽) (SEQ ID NO: 52)。
- 參見例如Stern等人, 2007, Trends Cell. Mol. Biol., 2:1-17及Dalton & Barton, 2014, Protein Sci, 23: 517-525，其中之每一者關於可使用的信號肽全部以引用的方式併入本文中。

【0130】 作為替代方案或基因療法之額外治療，HuPTM Fab VEGFi 產物，例如HuGly Fab VEGFi糖蛋白，可藉由重組DNA技術在人類細胞株中產生，且藉由玻璃體內或視網膜下注射向經診斷患有nAMD（濕性AMD）、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者投與。HuPTM Fab VEGFi產物，例如糖蛋白，亦可向患有nAMD（濕性AMD）、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者投與。可用於此類重組糖蛋白產生之人類細胞株包括但不限於人類胚胎腎293細胞(HEK293)、纖維肉瘤HT-1080、HKB-11、CAP、HuH-7及視網膜細胞株PER.C6或RPE等(例如，參見Dumont等人, 2015, Crit. Rev. Biotechnol. (早期在線，在線公開於2015年9月18日，第1-13頁)「Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives」，其關於可用於重組生產HuPTM Fab VEGFi產物，例如HuGly Fab VEGFi糖蛋白之人類細胞株的綜述全部以引用的方式併入本文中)。為了確保完全糖基化，尤其唾液酸化及酪胺酸硫酸化，可藉由工程改造宿主細胞以共表現 α -2,6-唾液酸基轉移酶(或 α -2,3-及 α -2,6-唾液酸轉移酶兩者)及/或負責視網膜細胞中酪胺酸-O-硫酸化之TPST-1及TPST-2酶

來增強用於生產之細胞株。

【0131】本文提供之方法涵蓋將HuPTMFabVEGF_i，例如HuGlyFabVEGF_i遞送至眼睛/視網膜伴隨遞送其他可用治療之組合。可在基因療法治療之前、同時或之後投與額外治療。可與本文提供之基因療法組合之針對nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之可用治療包括但不限于雷射光凝、用維替泊芬(verteporfin)之光動力療法及玻璃體內(IVT)注射抗VEGF劑，該等抗VEGF劑包括但不限于派加替尼(pegaptanib)、蘭比珠單抗、阿柏西普(aflibercept)或貝伐單抗。用抗VEGF劑(諸如生物製劑)進行之額外治療可被稱作「救援」療法。

【0132】與小分子藥物不同，生物製劑通常包含許多具有不同修飾或形式之變體的混合物，該等變體具有不同的效能、藥物動力學及安全概況。在基因療法或蛋白質療法中產生之每個分子不必完全經糖基化及硫酸化。相反，所產生之糖蛋白群體應具有足夠糖基化(約1%至約10%之群體)，包括2,6-唾液酸化及硫酸化以呈現功效。本文提供之基因療法治療之目標為藉由最少的干預/侵入性程序來減緩或遏制視網膜變性之進展，且減緩或防止視力喪失。可藉由量測BCVA (最佳矯正視力)、眼內壓、裂隙燈活組織檢視法、間接檢眼鏡檢查法、SD-OCT (SD-光同調斷層掃描)、視網膜電圖描記(ERG)來監測功效。亦可監測視力喪失、感染、炎症及其他安全事件(包括視網膜脫落)之跡象。可監測視網膜厚度以判定本文提供之治療的功效。在不受任何特定理論束縛的情況下，可將視網膜厚度用作臨床讀數，其中視網膜厚度之減小愈大或視網膜增厚之前的時間愈長，則治療愈有效。視網膜厚度可例如藉由SD-OCT來測定。SD-OCT為一種三

維成像技術，其使用低同調干涉術來測定回波時間延遲及自所關注物體反射之反向散射光的量值。OCT可用於以3至15 μm 軸向解析度掃描組織樣品(例如視網膜)之層，且SD-OCT與以前的技術形式相比提高軸向解析度及掃描速度(Schuman, 2008, Trans. Am. Opthamol. Soc. 106:426-458)。視網膜功能可例如藉由ERG來測定。ERG為經FDA批准用於人類之視網膜功能的非侵入性電生理測試，其檢查眼睛之感光細胞(視桿及視錐)及其連接之神經節細胞，特定言之其對閃光刺激之反應。

【0133】在較佳實施例中，抗原結合片段不含有可偵測之NeuGc及/或 α -Gal。本文所用之片語「可偵測之NeuGc及/或 α -Gal」意謂可藉由此項技術中已知之標準分析方法偵測之NeuGc及/或 α -Gal部分。舉例而言，根據Hara等人, 1989, 「Highly Sensitive Determination of N-Acetyl-and N-Glycolylneuraminic Acids in Human Serum and Urine and Rat Serum by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Fluorescence Detection」 J. Chromatogr., B: Biomed. 377: 111-119 (其關於偵測NeuGc之方法以引用之方式併入本文中)，NeuGc可藉由HPLC來偵測。替代地，NeuGc可藉由質譜分析來偵測。 α -Gal可使用ELISA偵測，參見例如Galili等人, 1998, 「A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody」 Transplantation. 65(8):1129-32，或藉由質譜分析偵測，參見例如Ayoub等人, 2013, 「Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques」 Landes Bioscience. 5(5): 699-710。亦參見Platts-Mills等人, 2015, 「Anaphylaxis

to the Carbohydrate Side-Chain Alpha-gal」 Immunol Allergy Clin North Am. 35(2): 247-260中所引用之參考文獻。

【0134】 在某些態樣中，本文亦提供抗VEGF抗原結合片段(亦即，與VEGF免疫特異性結合之抗原結合片段)，其包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3的第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu))，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段可用於

本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0135】 在某些態樣中，本文亦提供包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3的抗VEGF抗原結合片段，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化

(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段可用於本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0136】在某些態樣中，本文亦提供包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3的抗VEGF抗原結合片段，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸

殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段可用於本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0137】 另一考慮的投與途徑為經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，其使用具有插入且遂穿脈絡膜上腔以朝後極噴射至視網膜下腔中的視網膜下藥物遞送裝置，在該後極處小針注入至視網膜下腔中。此投與途徑允許玻璃體保持完整，且因此存在較小的併發症風險(基因療法外溢及諸如視網膜脫落及黃斑裂孔之併發症的風險較小)，且無需玻璃體切除術，所產生的泡可更加擴散，從而使更多的視網膜表面區域以較小的體積轉導。此程序後誘發白內障的風險降至最低，其為較年輕的患者所期望的。此外，此程序與標準經玻璃體途徑相比可更安全地在中央凹下遞送泡，其為患有遺傳性視網膜疾病且影響中心視覺之患者所期望的，其中用於轉導之目標細胞在黃斑中。此程序亦對具有對於全身循環中存在之AAV之中和抗體(Nab)之患者為有利的，該等中和抗體可影響其他遞送途徑。另外，與標準經玻璃體途徑相比，此方法已顯示產生泡，較少自視網膜切開術部位溢出。

【0138】 近鞏膜投與提供一種避免眼內感染及視網膜脫落(通常與將治療劑直接注射至眼睛中相關之副作用)之風險之額外投與途徑。

【0139】 在某些實施例中，本文描述一種套組，其包含一或多個容器及使用說明書，其中該一或多個容器包含醫藥組合物。在某些實施例中，該一或多個容器中之至少一者係由疏水塗佈的玻璃小瓶製成。在某些實施例中，該一或多個容器中之至少一者係由Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶製成。在某些實施例中，該一或多個容器中之至少一者係由TopLyo塗佈的小瓶製成。在某些實施例中，該一或多個容器中之至少一者係由環烯烴聚合物(COP)製成。

【0140】 在另一態樣中，本文提供單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11}

GC/mL、 6.5×10^{11} GC/mL、 2.5×10^{12} GC/mL、 3×10^{13} GC/mL構築體 II；0.2 g/L氯化鉀；0.2 g/L磷酸二氫鉀；8.01 g/L氯化鈉；1.15 g/L無水磷酸氫二鈉；pH 7.4及0.001% P188以體積至少約0.5mL、至少約0.8 mL、約0.6 mL、約0.95 mL於環烯烴聚合物(COP)小瓶中。在一些實施例中，單一單位劑型能夠儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。在一些實施例中，單一單位劑型能夠儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月。在一些實施例中，單一單位劑型能夠在先前已儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。在一些實施例中，在儲存在-80℃、-20℃或4℃一段時間之後構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-80℃、-20℃或4℃該時間段之前構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80℃、-20℃或4℃一段時間之後構築體II之活體外效能為在儲存在-80℃、-20℃或4℃該時間段之前構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80℃、-20℃或4℃一段時間之後構築體II之粒度分佈與在儲存在-80℃、-20℃或4℃該時間段之前構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%與一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

【0141】 在另一態樣中，本文提供單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11} GC/mL、 6.5×10^{11} GC/mL、 2.5×10^{12} GC/mL、 3×10^{13} GC/mL構築體II；0.2 g/L氯化鉀；0.2 g/L磷酸二氫鉀；8.01 g/L氯化鈉；1.15 g/L無水磷酸氫二鈉；pH 7.4；4%蔗糖；及0.001% P188以體積至少約0.5 mL、至少約0.8 mL、約0.6 mL、約0.95 mL在COP小瓶中。在一些實施例中，單一單位劑型能夠儲存在4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。在一些實施例中，單一單位劑型能夠儲存在-80°C約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月。在一些實施例中，單一單位劑型能夠在先前已儲存在-80°C約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。在一些實施例中，在儲存在-80°C、-20°C或4°C一段時間之後構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-80°C、-20°C或4°C該時間段之前構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80°C、-20°C或4°C一段時間之後構築體II之活體外效能為在儲存在-80°C、-20°C或4°C該時間段之前構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，在儲存在-80°C、-20°C或4°C一段時間之後構築體II之粒度分佈與在儲存在-80°C、-20°C或4°C該時間段之前構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%與一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24

個月。

【0142】 在另一態樣中，本文提供一種預填充注射器，其含有本文提供之單一單位劑型。在另一態樣中，本文提供一種套組，其包含含有本文提供之單一單位劑型之預填充注射器。

2.1 說明性實施例

1. 一種醫藥組合物，其包含：

(a) 重組腺相關病毒(AAV)，

(b) 氯化鉀，

(c) 磷酸二氫鉀，

(d) 氯化鈉，

(e) 無水磷酸氫二鈉，

(f) 蔗糖，及

(e) 泊洛沙姆188 (poloxamer 188)、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯

80。

2. 如段落1之醫藥組合物，其中該重組AAV包含來自一或多種選自由以下組成之群之腺相關病毒血清型之組分：AAV1、AAV2、AAV2tYF、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、rAAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、

AAV.HSC15及AAV.HSC16。

3.如段落1至2中任一項之醫藥組合物，其中該重組AAV為AAV8。

4.如段落1至2中任一項之醫藥組合物，其中該重組AAV為AAV9。

5.如段落1至4中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物進一步包含一或多個胺基酸。

6.如段落1至5中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之離子強度在約60 mM至約115 mM範圍內。

7.如段落4之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之離子強度在約30 mM至約100 mM範圍內

8.如段落1至3中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含

(a) 濃度在0.2 g/L之氯化鉀，

(b) 濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，

(c) 濃度在5.84 g/L之氯化鈉，及

(d) 濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉。

9.如段落1至8中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L)至18% (重量/體積，180 g/L)範圍內之蔗糖。

10. 如段落1至8中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，40 g/L)之蔗糖。

11. 如段落1至10中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)範圍內。

12. 如段落1至10中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含

泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80，；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度為0.001% (重量/體積，0.01 g/L)。

13. 如段落1至12中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH在約6.0至約9.0範圍內。

14. 如段落1至12中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH為約7.4。

15. 如段落1至14中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之滲透壓在約200 mOsm/L至約660 mOsm/L範圍內。

16. 如段落1至15中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在疏水塗佈的玻璃小瓶中。

17. 如段落1至15中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在環烯烴聚合物(Cyclo Olefin Polymer；COP)小瓶中。

18. 如段落1至15中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

19. 如段落1至15中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在TopLyo塗佈的小瓶中。

20. 如段落1至19中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物由以下組成：

- (a) 重組AAV，
- (b) 濃度在0.2 g/L之氯化鉀，
- (c) 濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，
- (d) 濃度在5.84 g/L之氯化鈉，

(e) 濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，

(f) 濃度在4%重量/體積(40 g/L)之蔗糖，

(g) 濃度在0.001% 重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80，及

(h) 水，及

其中該重組AAV為AAV8。

21. 如段落1至20中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之載體基因體濃度(vector genome concentration；VGC)為約 3×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 1.2×10^{10} GC/mL、約 1.6×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 2.4×10^{11} GC/mL、約 2.5×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 3.2×10^{11} GC/mL、約 6.2×10^{11} GC/mL、約 6.5×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL或約 3×10^{13} GC/mL。

22. 如段落1至21中任一項之醫藥組合物，其中該重組AAV對於冷凍/解凍循環比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

23. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在-20°C一段時間時，該重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10

個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

24. 如段落1至23中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在-80℃一段時間時，該重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

25. 如段落1至24中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在室溫下一段時間時，該重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

26. 如段落1至25中任一項之醫藥組合物，其中當(i)儲存在-80℃第一時間段；(ii)隨後解凍；及(iii)在解凍之後儲存在4℃第二時間段時，該重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

27. 如段落26之醫藥組合物，其中該第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

28. 如段落26之醫藥組合物，其中該第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

29. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

30. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

31. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

32. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

33. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

34. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時

間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

35. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

36. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

37. 如段落1至22中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前該重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

38. 如段落29至37中任一項之醫藥組合物，其中該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

39. 如段落1至21中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV之感染性來測定重組AAV之穩定性。

40. 如段落1至21中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV之聚集量來測定重組AAV之穩定性。

41. 如段落1至21中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV粒子

所釋放之游離DNA之量來測定重組AAV的穩定性。

42. 如段落1至41中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為液體組合物。

43. 如段落1至41中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為冷凍組合物。

44. 如段落1至41中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為凍乾組合物或復原凍乾組合物。

45. 如段落1至44中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，或後近鞏膜貯存程序的性質。

46. 如段落1至44中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，或後近鞏膜貯存程序所需密度。

47. 如段落1至44中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，或後近鞏膜貯存程序所需滲透壓。

48. 如段落47之醫藥組合物，其中該滲透壓為160-230 mOsm/kg H₂O。

49. 如段落47之醫藥組合物，其中該滲透壓小於600 mOsm/kg H₂O。

50. 如段落1至44中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，或後近鞏膜貯存程序所需黏度。

51. 如段落1至44中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物適合於投與眼睛。

52. 如段落45之醫藥組合物，該醫藥組合物適合於脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與，或後近鞏膜貯存程序。

53. 如段落1至52中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物能在先前已儲存在 -80°C 約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在 4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

54. 一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含向該個體投與如段落1至52中任一項之醫藥組合物。

55. 一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(retinal vein occlusion ; RVO)、糖尿病性黃斑水腫(diabetic macular edema ; DME)或糖尿病性視網膜病變(diabetic retinopathy ; DR)之個體之方法，其包含向該個體投與如段落1至53中任一項之醫藥組合物。

56. 一種治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)、II型黏多醣病(MPS II)、家族性高膽固醇血症(familial hypercholesterolemia ; FH)、同型接合家族性高膽固醇血症(HoFH)、冠

狀動脈疾病、腦血管疾病、杜興氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy)、肢帶肌肉失養症、貝克氏肌肉失養症及偶發性包涵體肌炎或激肽釋放素相關疾病之個體之方法，其包含向該個體投與如段落1至53中任一項之醫藥組合物。

57. 如段落54至56中任一項之醫藥組合物，其中藉由靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序投與該醫藥組合物。

58. 如段落54至57中任一項之方法，其中該個體為人類個體。

59. 一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，該方法包含(i)製備如段落1至53中任一項之醫藥組合物，將該醫藥組合物儲存在-80℃第一時間段；(ii)解凍該醫藥組合物；及(iii)在解凍之後，將該醫藥組合物儲存在4℃第二時間段。

60. 如段落59之方法，其中該第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

61. 如段落59之方法，其中該第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

62. 一種套組，其包含一或多個容器及使用說明書，其中該一或多個容器包含如段落1至53中任一項之醫藥組合物。

63. 如段落62之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由疏水塗佈的玻璃小瓶製成。

64. 如段落62之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由

Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶製成。

65. 如段落62之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由TopLyo塗佈的小瓶製成。

66. 如段落62之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由環烯烴聚合物(COP)製成。

67. 一種醫藥組合物，其包含：

- (a) 編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，
- (b) 氯化鉀，
- (c) 磷酸二氫鉀，
- (d) 氯化鈉，
- (e) 無水磷酸氫二鈉，
- (f) 蔗糖，及
- (e) 泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80，及

其中該抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

68. 如段落67之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之離子強度在約60 mM至約100 mM範圍內。

69. 如段落67至68中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含：

- (a) 濃度在0.2 g/L之氯化鉀，
- (b) 濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，
- (c) 濃度在5.84 g/L之氯化鈉，及

(d) 濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉。

70. 如段落67至69中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L)至18% (重量/體積，180 g/L)範圍內之蔗糖。

71. 如段落67至69中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，40 g/L)之蔗糖。

72. 如段落67至71中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)範圍內。

73. 如段落67至71中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

74. 如段落67至73中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH在約6.0至約9.0範圍內。

75. 如段落67至73中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH為約7.4。

76. 如段落67至75中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之滲透壓在約200 mOsm/L至約660 mOsm/L範圍內。

77. 如段落67至76中任一項之醫藥組合物，其中該構築體II包含來自AAV8之衣殼。

78. 如段落67至76中任一項之醫藥組合物，其中該構築體II對於冷凍/解凍循環比參考醫藥組合物中之相同構築體II更穩定至少2%、5%、

7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

78. 如段落67至77中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在-20℃一段時間時，該構築體II比參考醫藥組合物中之相同構築體II更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

79. 如段落67至77中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在-80℃一段時間時，該構築體II比參考醫藥組合物中之相同構築體II更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

80. 如段落67至77中任一項之醫藥組合物，其中當儲存在室溫下一段時間時，該構築體II比參考醫藥組合物中之相同構築體II更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍，其中該時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

81. 如段落67至77中任一項之醫藥組合物，其中當(i)儲存在-80℃第一時間段；(ii)隨後解凍；及(iii)在解凍之後，儲存在4℃第二時間段時，該重組AAV比參考醫藥組合物中之相同構築體II更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

82. 如段落81之醫藥組合物，其中該第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

83. 如段落81之醫藥組合物，其中該第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

84. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

85. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

86. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

87. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一

段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

88. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

89. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

90. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

91. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

92. 如段落67至79中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

93. 如段落84至92中任一項之醫藥組合物，其中該時間段為約1個

月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

94. 如段落77至83中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV之感染性來測定該構築體II之穩定性。

95. 如段落77至83中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV之聚集量來測定該構築體II之穩定性。

96. 如段落77至83中任一項之醫藥組合物，其中藉由重組AAV粒子所釋放之游離DNA之量來測定該構築體II的穩定性。

97. 如段落67至96中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在疏水塗佈的玻璃小瓶中。

98. 如段落67至96中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在環烯烴聚合物(COP)小瓶中。

99. 如段落67至96中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

100. 如段落67至96中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在TopLyo塗佈的小瓶中。

101. 如段落67至100中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物由以下組成：

- (a) 編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之該構築體II，
- (b) 濃度在0.2 g/L之氯化鉀，
- (c) 濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，
- (d) 濃度在5.84 g/L之氯化鈉，

(e) 濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，

(f) 濃度在4%重量/體積(40 g/L)之蔗糖，

(g) 濃度在0.001% 重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80，及

(h) 水，及

其中該抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

102. 如段落101之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為約 3×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 1.2×10^{10} GC/mL、約 1.6×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 2.4×10^{11} GC/mL、約 2.5×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 3.2×10^{11} GC/mL、約 6.2×10^{11} GC/mL、約 6.5×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL或約 3×10^{13} GC/mL。

103. 如段落67至102中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序的性質。

104. 如段落67至102中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序所需密度。

105. 如段落67至102中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序所需滲透壓。

106. 如段落105之醫藥組合物，其中該滲透壓為160-230 mOsm/kg H₂O。

107. 如段落105之醫藥組合物，其中該滲透壓小於600 mOsm/kg H₂O。

108. 如段落67至102中任一項之醫藥組合物，該醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序所需黏度。

109. 如段落67至108中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為液體組合物。

110. 如段落67至108中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為冷凍組合物。

111. 如段落67至108中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為凍乾組合物或復原凍乾組合物。

112. 如段落67至111中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物能夠在先前已儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

113. 一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜

靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，其包含向該個體投與如段落67至111中任一項之醫藥組合物。

114. 如段落113之方法，其中藉由脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與或後近鞏膜貯存程序投與該醫藥組合物。

115. 如段落113或114之方法，其中該個體為人類個體。

116. 一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，該方法包含(i)製備如段落67至108中任一項之醫藥組合物，將該醫藥組合物儲存在-80℃第一時間段；(ii)解凍該醫藥組合物；及(iii)在解凍之後，將該醫藥組合物儲存在4℃第二時間段。

117. 如段落119之方法，其中該第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

118. 如段落119之方法，其中該第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

119. 一種套組，其包含一或多個容器及使用說明書，其中該一或多個容器包含如段落67至102中任一項之醫藥組合物。

120. 如段落119之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由環烯烴聚合物(COP)製成。

121. 一種穩定液體醫藥組合物，其包含

(a) 重組腺相關病毒(rAAV)，

(b) 包含離子鹽且具有60 mM與150 mM之間的離子強度之緩衝劑，

(d) 蔗糖，及

(e) 界面活性劑。

122. 如段落121之組合物，其中該rAAV包含AAV1、AAV2、AAV2tYF、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAVrh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、rAAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15或AAV.HSC16。

123. 如段落121或122之組合物，其中該組合物包含3-16%蔗糖。

124. 如段落121至123中任一項之組合物，其中該緩衝劑在-20℃至室溫之溫度範圍內維持pH在約pH 6至約pH 9之間。

125. 如段落121至124中任一項之組合物，其中該組合物包含4-6%蔗糖。

126. 如段落121至125中任一項之組合物，其中該緩衝劑具有不大於約150 mM、約145 mM、約140 mM、約135 mM、約130 mM、約125 mM、約120 mM、約115 mM或約110 mM之離子強度。

127. 如段落121至126中任一項之組合物，其中該緩衝劑具有約60 mM與約115 mM之間的離子強度。

128. 如段落121至127中任一項之組合物，其中該緩衝劑具有約60 mM與約110 mM之間的離子強度。

129. 如段落121至128中任一項之組合物，其中該組合物包含60 mM與100 mM之間的NaCl。

130. 如段落121至129中任一項之組合物，其中該組合物包含4-6%蔗糖。

131. 如段落121至130中任一項之組合物，其中將該組合物冷凍至約-20°C之溫度。

132. 如段落121至131中任一項之組合物，其中該冷凍組合物維持pH在約pH 6至約pH 9之間。

133. 如段落121至132中任一項之組合物，其中該緩衝劑包含一或多種選自由以下組成之群之組分：磷酸二氫鉀、磷酸鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸鈉六水合物、磷酸二氫鈉單水合物、緩血酸胺、三(羥甲基)胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)、胺基酸、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(組胺酸-HCl)、丁二酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、及(4-(2-羥乙基)-1-哌咍乙磺酸)(HEPES)、硫酸鈉、硫酸鎂、氯化鎂6-水合物、硫酸鈣、氯化鉀、氯化鈣及檸檬酸鈣。

134. 如段落121至132中任一項之組合物，其中該緩衝劑包含氯化鉀、磷酸二氫鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉。

135. 如段落121至132中任一項之組合物，其中該緩衝劑包含氯化鈉及Tris鹽酸鹽。

136. 如段落121至133中任一項之組合物，其中該界面活性劑為泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

137. 如段落121至133中任一項之組合物，其中該界面活性劑為泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L) 至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)範圍內。

138. 如段落121至133中任一項之組合物，其中該界面活性劑為泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80，；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度為0.001% (重量/體積，0.01 g/L)。

139. 如段落121至138中任一項之組合物，其中進一步凍乾該液體醫藥組合物。

140. 如段落121至138中任一項之組合物，其中該液體醫藥組合物為復原凍乾粉。

141. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

142. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

143. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前該重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、

95%、98%或99%。

144. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

145. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

146. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該重組AAV之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前該重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

147. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-80℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前該重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

148. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在-20℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前該重組AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

149. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中在儲存在4℃一段時間之後該重組AAV之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前該重組

AAV之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

150. 如段落141至149中任一項之醫藥組合物，其中該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

151. 如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物能夠在先前已儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

152. 一種治療所關注疾病之方法，其包含向該個體投與如段落121至140中任一項之醫藥組合物，其中該rAAV編碼治療或改善、預防或減緩該所關注疾病之進展之轉殖基因。

153. 一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，該方法包含(i)製備如段落121至140中任一項之醫藥組合物，將該醫藥組合物儲存在-80℃第一時間段；(ii)解凍該醫藥組合物；及(iii)在解凍之後，將該醫藥組合物儲存在4℃第二時間段。

154. 如段落153之方法，其中該第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

155. 如段落153之方法，其中該第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

156. 一種套組，其包含一或多個容器及使用說明書，其中該一或多個容器包含如段落121至140中任一項之醫藥組合物。

157. 一種穩定的液體調配物，其包含如段落1至53、67至111及121至140中任一項之醫藥組合物。

158. 一種單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.95 mL於環烯烴聚合物(COP)小瓶中。

159. 一種單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.8 mL在COP小瓶中。

160. 一種單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.95 mL在COP小瓶中。

161. 一種單一單位劑型，其包含 3.2×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.8 mL在COP小瓶中。

162. 一種單一單位劑型，其包含 6.5×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.95 mL在COP小瓶中。

163. 一種單一單位劑型，其包含 6.5×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.8 mL在COP小瓶中。

164. 一種單一單位劑型，其包含 6.5×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.95 mL在COP小瓶中。

165. 一種單一單位劑型，其包含 6.5×10^{11} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.8 mL在COP小瓶中。

166. 一種單一單位劑型，其包含 2.5×10^{12} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.6 mL在COP小瓶中。

167. 一種單一單位劑型，其包含 2.5×10^{12} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.5 mL在COP小瓶中。

168. 一種單一單位劑型，其包含 3×10^{13} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.6 mL在COP小瓶中。

169. 一種單一單位劑型，其包含 3×10^{13} GC/mL構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.5 mL在COP小瓶中。

170. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其能夠儲存在4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

171. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其能夠儲存在-80°C約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月。

172. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其能夠在先前已儲存在-80℃約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在4℃ 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

173. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-80℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

174. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

175. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之載體基因體濃度為在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

176. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-80℃一段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

177. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、

98%或99%。

178. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之活體外效能為在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

179. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-80℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在-80℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

180. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在-20℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在-20℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

181. 如段落158至169中任一項之單一單位劑型，其中在儲存在4℃一段時間之後該構築體II之粒度分佈與在儲存在4℃該時間段之前該構築體II之粒度分佈至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。

182. 如段落173至181中任一項之單一單位劑型，其中該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

183. 一種預填充注射器，其含有如段落158至182中任一項之單一單位劑型。

184. 一種套組，其包含如段落183之預填充注射器。

2.2 慣例及縮寫

縮寫	慣例
AAV	腺相關病毒
DLS	動態光散射
SEC	尺寸排阻層析
FDP	最終藥物產品
BDS	原料藥物質
VEGF	血管內皮生長因子
ddPCR	數位液滴PCR
AUC	分析性超速離心
USP	《美國藥典》(United States Pharmacopeia)
IVRP	活體外相對效能
VGC	載體基因體濃度
HRP	辣根過氧化酶
DSC	差示掃描熱量法
dPBS	杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(Dulbecco's phosphate buffered saline)
ELISA	酶聯免疫吸附分析
SF	緩慢冷凍
ST	緩慢解凍
FT	快速解凍
FF	快速冷凍
Tg'	玻璃轉化溫度

【圖式簡單說明】

【0143】 圖1. 蘭比珠單抗(上)之胺基酸序列顯示貝伐單抗Fab (下)中之5個不同殘基。藉由箭頭(→)指示可變及恆定重鏈(V_H及C_H)與輕鏈(V_L及C_L)之起始，且對CDR加底線。指示非共同糖基化位點(「Gsite」)及酪胺酸-O-硫酸化位點(「Ysite」)。

【0144】 圖2. 可與HuGlyFabVEGF_i連接之聚醣。(自Bondt等人, 2014, Mol & Cell Proteomics 13.1: 3029-3039改編)。

【0145】 圖3. 蘭比珠單抗(上)及貝伐單抗Fab (下)之經高糖基化變體之胺基酸序列。藉由箭頭(→)指示可變及恆定重鏈(V_H及C_H)與輕鏈(V_L及C_L)之起始，且對CDR加底線。指示非共同糖基化位點(「Gsite」)及酪胺酸

酸-O-硫酸化位點(「Ysite」)。用星號(*)指示四個經高糖基化變體。

【0146】 圖4. AAV8-抗VEGFfab基因體之示意圖。

【0147】 圖5. 由Clearside® Biomedical, Inc.製造之脈絡膜上藥物遞送裝置。

【0148】 圖6. 由Janssen Pharmaceuticals, Inc.製造之包含導管之視網膜下藥物遞送裝置，該導管可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極，在該後極處小針注入至視網膜下腔中。

【0149】 圖7A至圖7D. 後近鞏膜(posterior juxtasceral)貯存(depot)程序之圖解。

【0150】 圖8. AAV衣殼1-9 (SEQ ID NO: 41-51)之Clustal多序列比對。可自其他比對之AAV衣殼之對應位置「募集」胺基酸殘基來對AAV9及AAV8衣殼進行胺基酸取代(在底部列中以粗體顯示)。由「HVR」標示之序列區=高變區。

【0151】 圖9. 快速冷凍/緩慢解凍(FF/ST)溫度概況。

【0152】 圖10. 於DPBS調配物A中之構築體II之SEC結果概況的放大圖。前峰為游離DNA及聚集物。後峰含有緩衝液及賦形劑物種。

【0153】 圖11. 於調配物B中之構築體II之SEC結果概況之放大圖。後峰含有緩衝液及賦形劑物種。由於蔗糖所致之後峰在調配物B中較大。

【0154】 圖12. 於調配物A (深灰色)及調配物B (淺灰色)對照中且在暴露於五個快速及緩慢冷凍/解凍循環排列之後之構築體II的動態光散射累積量結果。

【0155】 圖13. 構築體II DPBS調配物A緩衝液之低溫DSC熱分析圖。

【0156】 圖14. 於『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之經改良DPBS，pH 7.4』調配物B緩衝液中之構築體II之低溫DSC熱分析圖。

【0157】 圖15. 在37℃，在 1.0×10^{12} GC/mL下於調配物A (深灰色圓形)及調配物B (淺灰色方形)中之構築體II效能的穩定性趨勢。

【0158】 圖16. 在37℃，在 1.0×10^{12} GC/mL下於調配物A (深灰色圓形)及調配物B (淺灰色方形)中之構築體II游離DNA (藉由染料螢光)的穩定性趨勢。

【0159】 圖17. 在-80℃及-20℃，在 1.0×10^{12} GC/mL下於調配物B中之構築體II效能的穩定性趨勢。

【0160】 圖18. 在-80℃及-20℃，在 2.1×10^{11} GC/mL下於調配物B中之構築體II效能的穩定性趨勢。

【0161】 圖19A. 針對在Nalgene HDPE BDS瓶子中2種不同填充體積所量測之溫度概況。

【0162】 圖19B. 在-80℃與室溫或-20℃之間循環之2 mL冷凍小瓶，針對0.6 mL填充所記錄之溫度概況。

【0163】 圖20A. 快速冷凍/快速解凍(FF/FT)溫度概況。

【0164】 圖20B. 擱板(Shelf)及探針之快速冷凍/快速解凍(FF/FT)溫度概況(左軸)及速率(右軸)。

【0165】 圖21. 快速冷凍/緩慢解凍(FF/ST)溫度概況。

【0166】 圖22. 緩慢冷凍/快速解凍(SF/FT)溫度概況。

【0167】 圖23. 緩慢冷凍/緩慢解凍(SF/ST)溫度概況。

【0168】 圖24. 擱板及探針之緩慢冷凍/緩慢解凍(SF/ST)溫度概況(左軸)及速率(右軸)。

【0169】 圖25. 對照調配物緩衝液之SEC結果概況之放大圖。

【0170】 圖26. 於dPBS調配物緩衝液中之構築體II之SEC結果概況的放大圖。

【0171】 圖27. 於具有蔗糖之改良dPBS緩衝液中之構築體II之SEC結果概況的放大圖。

【0172】 圖28. 於dPBS凍融樣品中之構築體II之DLS直徑結果。

【0173】 圖29. 於具有蔗糖之改良dPBS凍融樣品中之構築體II之DLS直徑結果

【0174】 圖30. 與在具有蔗糖之改良dPBS凍融樣品中相比，於dPBS中之構築體II之DLS累積量直徑結果的比較。

【0175】 圖31. 與在具有蔗糖之改良dPBS凍融樣品中相比，於dPBS中之構築體II之DLS正則化直徑結果的比較。

【0176】 圖32. 構築體II dPBS調配物緩衝液之低溫DSC熱分析圖。

【0177】 圖33. 構築體II『具有蔗糖之改良dPBS』調配物緩衝液之低溫DSC熱分析圖。

【0178】 圖34. 調配物B含有抑制結晶/共晶轉化之非晶形賦形劑，從而改良對於冷凍/解凍脅迫之穩定性。

【0179】 圖35. 針對調配物A，游離DNA隨著各冷凍/解凍循環而增加。

【0180】 圖36. 調配物a之效能可在 $>5\times$ 冷凍/解凍循環之情況下降低，且調配物b中之效能維持 $30\times$ 冷凍/解凍循環。在30個凍融循環之後，『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物B（深灰色條柱）維持效能。相比之下，在15至30個凍融循環之後，參考調配物(dPBS，淺灰色條柱)效能降低至66%-

72%。實例為對於具有綠色螢光蛋白之基因之AAV8進行該實例。針對調配物最佳化工作，凍融循環用於模擬輸送及儲存物流溫度變化，且亦用作『加速』脅迫以迫使AAV降解。

【0181】 圖37. 吸附損失發生在玻璃小瓶中但在cop小瓶中並未偵測到。

【0182】 圖38. 調配物A及B在-80℃具有類似長期冷凍穩定性；調配物B在-20℃亦為穩定的。『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物在-20℃(圓形)及-80℃(方形)下維持效能12個月。顯示參考調配物(dPBS)之-80℃儲存，作為比較物。

【0183】 圖39. 即時監測-20 AD冰箱中之調配物2號(具有4%蔗糖之改良dPBS)之pH及溫度，顯示在冷凍調配物後大致3 pH單位酸化(上部跡線，左側軸)。溫度跡線(下部跡線，右側軸)顯示在冰箱之自動除霜循環發生時溫度之波動。當冷凍時，直接用冷凍pH電極量測之冷凍溶液之pH顯示與冷凍調配物之溫度相關之在約4.3與5.5之間的波動。

【0184】 圖40. 在藉由多次除霜循環進行脅迫之後，不同緩衝液之pH之比較。當冷凍時，DPBS調配物自7.4偏移至約4.3。具有蔗糖之調配物在冷凍後具有較小的pH偏移(自7.4偏移至約6.2)。當冷凍時，TRIS調配物最初相對於室溫偏移，隨後穩定。

【0185】 圖41. 當溫度自0℃降至-20℃時，緩衝液pH之比較。基於磷酸鹽之調配物1號對於冷凍具有較大pH偏移。調配物2-7顯示對於冷凍低許多的酸性偏移，此對於產物穩定性為較佳的。調配物8略微向更鹼性偏移且對於調配穩定性在可接受極限內。

【0186】 圖42. 不同緩衝液pH之量值在穩定化之後偏移。

【0187】 圖43. 調配物1號(dPBS調配物緩衝液)之低溫DSC熱分析圖。

【0188】 圖44. 調配物2號(具有4%蔗糖之改良dPBS調配物緩衝液)之低溫DSC熱分析圖。

【0189】 圖45. 不同調配物之相變行為之低溫DSC熱分析圖比較。調配物1 (dPBS)不顯示玻璃轉化(跡線用文字指示)。調配物2 (調配物B)及變體(調配物3-7號)以及TRIS緩衝液(調配物8)顯示與調配物2號類似的相變行為，其中在-40與-45℃之間玻璃轉化。

【0190】 圖46. 病毒粒子聚集受離子強度影響。

【0191】 圖47. 用於防止聚集之最小離子強度。在不同NaCl濃度下製備之在 1.8×10^{13} GC/mL下之AAV8粒子的有效直徑。呈現需要離子強度 ≥ 90 mM來防止粒子聚集，如由粒子之直徑指示。

【0192】 圖48. 最小離子強度為血清型依賴性的。在不同NaCl濃度下製備之AAV8 (空心方形)及AAV9 (空心三角形)之有效直徑。載體之濃度為 6×10^{11} GC/mL。

【0193】 圖49. 調配物C為具有60 mM NaCl及6%蔗糖之『具有蔗糖之改良dPBS』的變體(淺灰色三角形)，且在-20℃穩定2年。顯示參考調配物(dPBS)之-20℃儲存作為比較物(深灰色方形)，且在-20℃不穩定。調配物B及C顯示在-20℃具有相當且優良的長期穩定性。

【0194】 圖50. 在2-8℃，於調配物B中之構築體II之效能趨勢。

【0195】 圖51. 在控制室溫下，構築體II FDP批次200320-314-DL7在 3.0×10^{13} GC/mL下的效能趨勢。

【0196】 圖52. 在-80℃及-20℃，在 1.0×10^{12} GC/mL下於調配物B中

之構築體II效能的穩定性趨勢。

【0197】 圖53. 在-80℃及-20℃，在 2.1×10^{11} GC/mL下於調配物B中之構築體II效能的穩定性趨勢。

【0198】 圖54. 調配物A及B在-80℃具有類似的長期冷凍穩定性；調配物B在-20℃亦為穩定的。『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物在-20℃(圓形)及-80℃(方形)下維持效能12個月。顯示參考調配物(dPBS)之-80℃儲存，作為比較物。

【實施方式】

【0199】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2019年10月7日申請之美國臨時申請案第62/911,968號之權益，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0200】 本文提供醫藥組合物、與醫藥組合物相關之治療方法及與醫藥組合物相關之套組。在一些實施例中，調配章節4.1中提供之組合物，使得其具有章節4.2中所描述之一或多個功能特性。在某些實施例中，本文提供之醫藥組合物具有各種優點，例如在冷凍/解凍循環後之改良的穩定性及在各種條件下之改良的長期穩定性。本文亦提供可在相關研究(章節4.5)中使用之分析。

4.1 醫藥組合物之調配

【0201】 本揭示案提供一種醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、磷酸二氫鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、蔗糖及界面活性劑。

【0202】 在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含胺基酸。

【0203】 在一些實施例中，本揭示案提供一種醫藥組合物，其包含

重組腺相關病毒(AAV)、離子鹽賦形劑或緩衝劑、蔗糖及泊洛沙姆188。在一些實施例中，離子鹽賦形劑或緩衝劑可為來自由以下組成之群之一或多種組分：磷酸二氫鉀、磷酸鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸鈉六水合物、磷酸二氫鈉單水合物、緩血酸胺、三(羥甲基)胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)、胺基酸、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(組胺酸-HCl)、丁二酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、及(4-(2-羥乙基)-1-哌吡乙磺酸)(HEPES)、硫酸鈉、硫酸鎂、氯化鎂6-水合物、硫酸鈣、氯化鉀、氯化鈣、檸檬酸鈣。

【0204】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至115 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至100 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約65 mM至95 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約70 mM至90 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約75 mM至85 mM之離子強度。

【0205】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約30 mM至100 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約35 mM至95 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約40 mM至90 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約45 mM至85 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約50 mM至80 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約55 mM至75 mM之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有約60 mM至70 mM之離子強度。

【0206】 在某些實施例中，醫藥組合物具有在60 mM至115 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在60 mM至100 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在65 mM至95 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在70 mM至90 mM

範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在75 mM至85 mM範圍內之離子強度。

【0207】 在某些實施例中，醫藥組合物具有在30 mM至100 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在35 mM至95 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在40 mM至90 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在45 mM至85 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在50 mM至80 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在55 mM至75 mM範圍內之離子強度。在某些實施例中，醫藥組合物具有在60 mM至70 mM範圍內之離子強度。

【0208】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.2 g/L之氯化鉀。

【0209】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀。

【0210】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在5.84 g/L之氯化鈉。

【0211】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉。

【0212】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在3% (重量/體積，30 g/L)至18% (重量/體積，180 g/L)之蔗糖。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，40 g/L)之蔗糖。

【0213】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之泊洛沙姆188。

【0214】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之泊洛沙姆188。在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.001% (重量/體積，0.01 g/L)之泊洛沙姆188。

【0215】 在一些實施例中，本揭示案提供一種醫藥組合物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、離子鹽賦形劑或緩衝劑、蔗糖及界面活性劑。在一些實施例中，離子鹽賦形劑或緩衝劑可來自由以下組成之群之一或多種組分：磷酸二氫鉀、磷酸鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、磷酸鈉六水合物、磷酸二氫鈉單水合物、緩血酸胺、三(羥甲基)胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl)、胺基酸、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(組胺酸-HCl)、丁二酸鈉、檸檬酸鈉、乙酸鈉、及(4-(2-羥乙基)-1-哌咍乙磺酸) (HEPES)、硫酸鈉、硫酸鎂、氯化鎂6-水合物、硫酸鈣、氯化鉀、氯化鈣、檸檬酸鈣。在一些實施例中，界面活性劑可為來自由泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80組成之群之一或多種組分。

【0216】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.05 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯20。

【0217】 在某些實施例中，醫藥組合物包含濃度在0.0005% (重量/體積，0.05 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)之聚山梨醇酯80。

【0218】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約7.4。

【0219】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為約6.0至9.0。

【0220】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為7.4。

【0221】 在某些實施例中，醫藥組合物之pH為6.0至9.0。

【0222】 如本文所用且除非另外規定，否則術語「約」意謂在既定

值或範圍之 $\pm 10\%$ 內。

【0223】 在某些實施例中，醫藥組合物在疏水塗佈的玻璃小瓶中。

【0224】 在某些實施例中，醫藥組合物在環烯烴聚合物(COP)小瓶中。

【0225】 在某些實施例中，醫藥組合物在Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

【0226】 在某些實施例中，醫藥組合物在TopLyo塗佈的小瓶中。

【0227】 在某些實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其由以下組成：(a)重組AAV，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4%重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188，及(h)水，且其中重組AAV為AAV8。

【0228】 在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為 3×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 1.2×10^{10} GC/mL、約 1.6×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 2.4×10^{11} GC/mL、約 2.5×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 6.2×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL或約 3×10^{13} GC/mL。

【0229】 在某些實施例中，本揭示案提供一種醫藥組合物或調配物，其包含重組腺相關病毒(AAV)、磷酸二氫鉀、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉、蔗糖及泊洛沙姆188。在一些實施例中，AAV包含來自AAV8之組分。在一些實施例中，AAV為本文提供之AAV病毒載體，其按以下次序包含以下元件：a)組成性或低氧誘導性啟動子序列；及b)編碼轉殖基因

(例如抗VEGF抗原結合片段部分)之序列。在一些實施例中，轉殖基因為針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之(HuPTM)抗體。抗體包括但不限於單株抗體、多株抗體、重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、一價抗體、全長抗體之抗原結合片段及上述之融合蛋白。此類抗原結合片段包括但不限於全長抗VEGF抗體(較佳地，全長抗VEGF單株抗體(mAb))之單域抗體(重鏈抗體(VHH)或奈米抗體之可變域)、Fab、F(ab')₂及scFv (單鏈可變片段) (在本文中被統稱為「抗原結合片段」)。在一較佳實施例中，針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之抗體為針對VEGF之單株抗體(mAb)的完全人類轉譯後修飾之抗原結合片段(「HuPTM FabVEGF_i」)。在另一較佳實施例中，HuPTM FabVEGF_i為抗VEGF mAb之完全人類糖基化之抗原結合片段(「HuGly FabVEGF_i」)。在一替代實施例中，可使用全長mAb。在一較佳實施例中，用於遞送轉殖基因之AAV應對人類視網膜細胞或感光細胞具有向性。此類AAV可包括非複製型重組腺相關病毒載體(「rAAV」)，尤其帶有AAV8衣殼之彼等AAV為較佳的。在一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他DNA表現構築體為構築體I，其中構築體I包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV8反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞β-肌動蛋白啟動子，b)雞β-肌動蛋白內含子及c)兔β-球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在另一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他DNA表現

構築體為構築體II，其中構築體II包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞 β -肌動蛋白啟動子，b)雞 β -肌動蛋白內含子及c)兔 β -球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在一些實施例中，抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0230】 在另一實施例中，適合於封裝在AAV衣殼中之病毒載體或其他表現構築體包含：(1)側接表現卡匣之AAV反向末端重複序列(ITR)；(2)調控控制元件，其基本上由一或多個增強子及/或啟動子、d) poly A信號及e)視情況存在之內含子組成；及(3)提供(例如編碼)一或多種所關注RNA或蛋白質產物之轉殖基因。

【0231】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0232】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)封裝編碼所關注轉殖基因之載體之AAV衣殼，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之

無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4%重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中所關注轉殖基因編碼所關注RNA或所關注之蛋白，例如抗體或酶。

【0233】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈，其中醫藥組合物具有適合於進行以下的所需黏度、密度及/或滲透壓：靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0234】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗

hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈，其中醫藥組合物具有約60 mM至100 mM的離子強度。

【0235】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈，其中醫藥組合物具有適合於進行以下的所需黏度、密度及/或滲透壓：靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0236】 在一些實施例中，醫藥組合物為液體組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為冷凍組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為來自本文所揭示之液體組合物之凍乾組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為復原凍乾調配物。

【0237】 在一些實施例中，醫藥組合物為包含在約1%與約7%之間

的殘餘水分含量的凍乾組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為包含在約2%與約6%之間的殘餘水分含量的凍乾組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為包含在約3%與約4%之間的殘餘水分含量的凍乾組合物。在一些實施例中，醫藥組合物為包含約5%之殘餘水分含量的凍乾組合物。

【0238】 在某些態樣中，本文揭示一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含向個體投與醫藥組合物。在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物適合於藉由一種、兩種或更多種投與途徑投與(例如適合於脈絡膜上及視網膜下投與)。

【0239】 所提供之方法適合於在生產包含編碼轉殖基因之重組AAV之醫藥組合物中使用。在一些實施例中，本文提供編碼抗VEGF Fab或抗VEGF抗體之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼抗VEGF Fab或抗VEGF抗體之基於rAAV8之病毒載體。在更多實施例中，本文提供編碼蘭比珠單抗(ranibizumab)之基於rAAV8之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼艾杜糖醛酸酶(IDUA)之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼IDUA之基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼艾杜糖醛酸2-硫酸酯酶(IDS)之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼IDS之基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼低密度脂蛋白受體(LDLR)之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼LDLR之基於rAAV8之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼三肽基肽酶1 (TPP1)蛋白之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼TPP1之基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼微小肌縮蛋白之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼微小肌縮蛋白之基於rAAV8之病毒載體。在一些實施例中，本文提供

編碼微小肌縮蛋白之基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼抗激肽釋放素(抗pKal)蛋白之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼那納德單抗(ianadelumab) Fab或全長抗體之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼人類 α 肌聚糖- γ 肌聚糖之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼huFollistatin344之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼人類 α 肌聚糖- γ 肌聚糖之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN2之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN3之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN6之rAAV病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼人類 α 肌聚糖- γ 肌聚糖之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼huFollistatin344之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼人類 α 肌聚糖- γ 肌聚糖之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN2之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN3之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。在一些實施例中，本文提供編碼CLN6之基於rAAV8或基於rAAV9之病毒載體。

【0240】 在某些態樣中，本文揭示一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含藉由以下向個體投與醫藥組合物：靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜

藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0241】 在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0242】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需黏度。

【0243】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例

如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需密度。

【0244】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需滲透壓。在具體實施例中，用於視網膜下投與之所需滲透壓為160-430 mOsm/kg H₂O。在其他具體實施例中，脈絡膜上投與之所需滲透壓小於600 mOsm/kg H₂O。

【0245】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約100至500 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約130至470 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約160至430 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約200至400 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約240至340 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約280至300 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約295至395 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有小於600 mOsm/kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有200 mOsm/L至660 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有約200 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約250 mOsm/L之滲透壓。在某些

實施例中，醫藥組合物具有約300 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約350 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約400 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約450 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約500 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約550 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約600 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約650 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約660 mOsm/L之滲透壓。在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)、II型黏多醣病(MPS II)、家族性高膽固醇血症(FH)、同型接合家族性高膽固醇血症(HoFH)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、杜興氏肌肉失養症、肢帶肌肉失養症、貝克氏肌肉失養症及偶發性包涵體肌炎或激肽釋放素相關疾病之個體之方法，其包含向該個體投與該醫藥組合物。

【0246】 在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)、II型黏多醣病(MPS II)、家族性高膽固醇血症(FH)、同型接合家族性高膽固醇血症(HoFH)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、杜興氏肌肉失養症、肢帶肌肉失養症、貝克氏肌肉失養症及偶發性包涵體肌炎或激肽釋放素相關疾病之個體之方法，其包含向該個體投與該醫藥組合物。

【0247】 在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)、II型黏多醣病(MPS II)、家族性高膽固醇血症(FH)、同型接合家族性高膽固醇血症(HoFH)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、杜興氏肌肉失養症、肢帶肌肉失養症、貝克氏肌肉失養症及

偶發性包涵體肌炎或激肽釋放素相關疾病之個體之方法，其包含藉由靜脈內投與、皮下投與或肌肉內注射向該個體投與治療有效量之醫藥組合物。

【0248】 在某些態樣中，本文揭示治療或預防個體之疾病之方法，其包含治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)、糖尿病性視網膜病變(DR)或巴登氏病(Batten disease)之個體，其包含向該個體投與治療有效量之醫藥組合物。

【0249】 在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)、糖尿病性視網膜病變(DR)或巴登氏病(Batten)之個體之方法，其包含藉由以下向個體投與治療有效量之醫藥組合物：脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0250】 在某些實施例中，描述用於將包含針對VEGF之完全人類轉譯後經修飾(HuPTM)抗體之醫藥組合物遞送至經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者(人類個體)之眼睛中的視網膜/玻璃體液的組合物及方法。抗體包括但不限於單株抗體、多株抗體、重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、

抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、一價抗體、及全長抗體之抗原結合片段以及上述之融合蛋白。此類抗原結合片段包括但不限於全長抗VEGF抗體(較佳地，全長抗VEGF單株抗體(mAb))之單域抗體(重鏈抗體(VHH)或奈米抗體之可變域)、Fab、F(ab')₂及scFv (單鏈可變片段) (在本文中被統稱為「抗原結合片段」)。在一較佳實施例中，針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之抗體為針對VEGF之單株抗體(mAb)的完全人類轉譯後修飾之抗原結合片段(「HuPTM FabVEGF_i」)。在另一較佳實施例中，HuPTM FabVEGF_i為抗VEGF mAb之完全人類糖基化之抗原結合片段(「HuGly FabVEGF_i」)。此外，參見國際專利申請公開案第WO/2017/180936號(國際專利申請案第PCT/US2017/027529號，2017年4月14日申請)、國際專利申請公開案第WO/2017/181021號(國際專利申請案第PCT/US2017/027650號，2017年4月14日申請)及國際專利申請公開案第WO2019/067540號(國際專利申請案第PCT/US2018/052855號，2018年9月26日申請)，其中之每一者關於可根據本文中所描述之本發明使用之組合物及方法的全部以引用的方式併入本文中。在一替代實施例中，可使用全長mAb。可經由基因療法實現遞送——例如，藉由向經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者(人類個體)之眼睛中之脈絡膜上腔、視網膜下腔(自經玻璃體途徑或用導管穿過脈絡膜上腔)、視網膜內空間及/或鞏膜外表面(亦即，近鞏膜投與)，投與編碼抗VEGF抗原結合片段或mAb (或經高糖基化衍生物)的病毒載體或其他DNA表現構築體，以在眼睛中產生持續供應人類PTM，例如人類糖基化的轉殖基因產物的永久性貯存。參見例如章節5.3.2中所描述之投與模式。

【0251】 在某些實施例中，已顯示患者對在用基因療法治療之前用玻璃體內注射之抗VEGF抗原結合片段治療有反應。在具體實施例中，患者先前已用LUCENTIS® (蘭比珠單抗)、EYLEA® (阿柏西普)及/或AVASTIN® (貝伐單抗)治療，且已發現對該LUCENTIS® (蘭比珠單抗)、EYLEA® (阿柏西普)及/或AVASTIN® (貝伐單抗)中之一或多者有反應。

【0252】 將此類病毒載體或其他DNA表現構築體遞送至其中之個體應對由病毒載體或表現構築體中之轉殖基因編碼的抗VEGF抗原結合片段有反應。為了判定反應性，可諸如藉由玻璃體內注射直接向個體投與抗hVEGF抗原結合片段轉殖基因產物(例如在細胞培養物、生物反應器等中產生)。

【0253】 由轉殖基因編碼之HuPTM FabVEGF_i，例如HuGly FabVEGF_i，可包括但不限於與hVEGF結合之抗體的抗原結合片段，諸如貝伐單抗；抗hVEGF Fab部分，諸如蘭比珠單抗；或經工程改造以在Fab域上含有額外糖基化位點的此類貝伐單抗或蘭比珠單抗Fab部分(例如，參見Courtois等人, 2016, mAbs 8: 99-112，其關於在全長抗體之Fab域上經高糖基化之貝伐單抗衍生物的描述全部以引用的方式併入本文中)。

【0254】 用於遞送轉殖基因之重組型載體應對人類視網膜細胞或感光細胞具有向性。此類載體可包括非複製型重組腺相關病毒載體(「rAAV」)，尤其帶有AAV8衣殼之彼等載體為較佳的。然而，可使用其他病毒載體，包括但不限於慢病毒載體、痘瘡病毒載體或被稱作「裸DNA」構築體之非病毒表現載體。較佳地，HuPTM FabVEGF_i，例如HuGly FabVEGF_i轉殖基因應受適當的表現控制元件控制，例如CB7啟動

子(雞 β -肌動蛋白啟動子及CMV增強子)、RPE65啟動子或視蛋白啟動子等，且可包括增強由載體驅動之轉殖基因表現的其他表現控制元件(例如內含子，諸如雞 β -肌動蛋白內含子、小鼠微小病毒(MVM)內含子、人類因子IX內含子(例如FIX截短之內含子1)、 β -球蛋白剪接供體/免疫球蛋白重鏈剪接受體內含子、腺病毒剪接供體/免疫球蛋白剪接受體內含子、SV40晚期剪接供體/剪接受體(19S/16S)內含子及雜交腺病毒剪接供體/IgG剪接受體內含子以及polyA信號，諸如兔 β -球蛋白polyA信號、人類生長激素(hGH) polyA信號、SV40晚期polyA信號、合成polyA (SPA)信號及牛生長激素(bGH) polyA信號)。參見例如Powell及Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102):49-57。

【0255】 在較佳實施例中，基因療法構築體經設計以使得重鏈及輕鏈均得以表現。更具體言之，重鏈及輕鏈應以大約相等的量表現，換言之，重鏈及輕鏈以重鏈與輕鏈大致1:1之比率表現。重鏈及輕鏈之編碼序列可經工程改造在單一構築體中，其中重鏈及輕鏈藉由可裂解連接子或IRES隔開，從而表現單獨重鏈及輕鏈多肽。關於可與本文提供之方法及組合物一起使用的特定前導序列參見例如章節5.2.4，及特定IRES、2A及其他連接子序列，參見例如章節5.2.5。

【0256】 在某些實施例中，基因療法構築體呈AAV載體活性成分於調配物緩衝液中之冷凍無菌、單次性使用溶液形式供應。在一具體實施例中，適合於視網膜下投與之醫藥組合物包含重組(例如rHuGlyFabVEGF_i)載體於包含生理學上相容之水性緩衝液、界面活性劑及視情況存在之賦形劑之調配物緩衝液中之懸浮液。在一具體實施例中，將構築體調配於杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水及0.001% 泊洛沙姆188，pH = 7.4中。

4.2 功能特性

【0257】 在某些實施例中，本文所描述之醫藥組合物適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。

【0258】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需密度。

【0259】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例

如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需滲透壓。

【0260】 在某些實施例中，醫藥組合物具有適合於靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))所需黏度。

【0261】 在某些實施例中，醫藥組合物具有約100至500 mOsm/kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約130至470 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約160至430 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約200至400 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約280至300 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約240至340 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約295至395 mOsm/ kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有小於600 mOsm/kg H₂O之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有200 mOsm/L至660 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有約200 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約250 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約300 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約350 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物

具有約400 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約450 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約500 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約550 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約600 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約650 mOsm/L之滲透壓。在某些實施例中，醫藥組合物具有約660 mOsm/L之滲透壓。在某些態樣中，本文揭示治療經診斷患有IVA型黏多醣病(MPS IVA)、I型黏多醣病(MPS I)、II型黏多醣病(MPS II)、家族性高膽固醇血症(FH)、同型接合家族性高膽固醇血症(HoFH)、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、杜興氏肌肉失養症、肢帶肌肉失養症、貝克氏肌肉失養症及偶發性包涵體肌炎或激肽釋放素相關疾病之個體之方法，其包含向該個體投與該醫藥組合物。

【0262】 在某些實施例中，醫藥組合物具有200 mOsm/L至660 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有250 mOsm/L至600 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有300 mOsm/L至550 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有350 mOsm/L至500 mOsm/L之滲透壓範圍。在某些實施例中，醫藥組合物具有400 mOsm/L至500 mOsm/L之滲透壓範圍。

【0263】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV對於冷凍/解凍循環比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0264】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參

考醫藥組合物中之相同重組AAV之感染性高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測感染性。

【0265】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測聚集。

【0266】 在某些實施例中，在一段時間內，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年、約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0267】 在某些實施例中，在一段時間內，至少例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、12個

月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年、約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0268】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測活體外相對效能(IVRP)。

【0269】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測游離DNA。

【0270】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之大小在一段時間內，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、

約3年及約4年，具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測大小。

【0271】 在某些實施例中，醫藥組合物中之重組AAV之大小在一段時間內，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。在某些實施例中，在冷凍/解凍循環之前或之後，量測大小。

【0272】 在某些實施例中，當儲存在-20℃時，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0273】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、

35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0274】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0275】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0276】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個

月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低 至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0277】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0278】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定 至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000

倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0279】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0280】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0281】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、

約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0282】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0283】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測

定重組AAV之游離DNA。

【0284】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0285】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0286】 在某些實施例中，當儲存在-20℃一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中

所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0287】 在某些實施例中，當儲存在37°C時，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之穩定性。

【0288】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0289】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之感染性比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分

析來測定重組AAV之病毒感染性。

【0290】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0291】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之聚集比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之聚集。

【0292】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫

藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0293】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV比參考醫藥組合物中之相同重組AAV更穩定至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析，來測定重組AAV在一段時間內之穩定性。

【0294】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0295】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之活體外相對效能(IVRP)比參考醫藥組合物中之相同重組AAV高至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之活體外相對效能(IVRP)。

【0296】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重組AAV低至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0297】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，至少例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之游離DNA比參考醫藥組合物中之相同重

組AAV低 至少2%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之游離DNA。

【0298】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0299】 在某些實施例中，當儲存在37°C一段時間時，例如至少約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約2年、約3年及約4年，醫藥組合物中之重組AAV之大小具有至多20%、15%、10%、8%、5%、4%、3%、2%或1%變化。在某些實施例中，藉由章節4.5及章節5中所揭示之一或多種分析來測定重組AAV之大小。

【0300】 在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠儲存1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月而不損失穩定性，如例如藉由章節4.5或5中所揭示之一或多種分析所測定。在

某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠儲存在4°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24個月而不損失穩定性。在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠儲存在≤60°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月而不損失穩定性。在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠儲存在-80°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月而不損失穩定性。在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠在已儲存在-20°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或12個月之後儲存在4°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24個月而不損失穩定性。

【0301】 在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠首先儲存在-80°C 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月，隨後解凍，且在解凍之後儲存在2-10°C、4-8°C、2、3、4、5、6、7、8或9°C 額外1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或12個月而不損失穩定性，如例如藉由章節4.5或5中所揭示之一或多種分析所測定。在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠首先儲存在-80°C 1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、
 23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、
 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月，隨後解凍，且在
 解凍之後儲存在約4°C 額外1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或12個月而
 不損失穩定性，如例如藉由章節4.5或5中所揭示之一或多種分析所測定。
 在某些實施例中，本文所提供之醫藥組合物能夠首先儲存在 $\leq 60^{\circ}\text{C}$ 1、2、
 3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、
 36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48個月，隨後解
 凍，且在解凍之後儲存在約4°C 額外1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或
 12個月而不損失穩定性，如例如藉由章節4.5或5中所揭示之一或多種分析
 所測定。

【0302】 在另一態樣中，本文提供單一單位劑型，其包含本文提供
 之重組AAV (例如構築體II)。如本文所用，術語「單一單位劑型」係指包
 含一次就診一名患者所需之重組AAV (例如構築體II)之量的劑型。在一些
 實施例中，可向患者之一隻眼睛投與重組AAV (例如構築體II)。在其他實
 施例中，可向患者之兩隻眼睛投與重組AAV (例如構築體II)。

【0303】 在一些實施例中，本文提供一種包含 3.2×10^{11} 基因體複本
 (GC)/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化
 鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.95 mL在
 小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 3.2×10^{11}
 GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化
 鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.8 mL

在小瓶中之單一單位劑型。

【0304】 在一些實施例中，本文提供一種包含 3.2×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.95 mL在小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 3.2×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.8 mL在小瓶中之單一單位劑型。

【0305】 在一些實施例中，本文提供一種包含 6.5×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.95 mL在小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 6.5×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.8 mL在小瓶中之單一單位劑型。

【0306】 在一些實施例中，本文提供一種包含 6.5×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.95 mL在小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 6.5×10^{11} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.8 mL在小瓶中之單一單位劑型。

【0307】 在一些實施例中，本文提供一種包含 2.5×10^{12} GC/mL之

構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積約0.6 mL在小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 2.5×10^{12} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4及0.001% P188以體積至少0.5 mL在小瓶中之單一單位劑型。

【0308】 在一些實施例中，本文提供包含 3×10^{13} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積約0.6 mL在小瓶中之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供一種包含 3×10^{13} GC/mL之構築體II、0.2 g/L氯化鉀、0.2 g/L磷酸二氫鉀、8.01 g/L氯化鈉、1.15 g/L無水磷酸氫二鈉、pH 7.4、4%蔗糖及0.001% P188以體積至少0.5 mL在小瓶中之單一單位劑型。

【0309】 在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型含於疏水塗佈的玻璃小瓶中。在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型含於環烯烴聚合物(COP)小瓶中。在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型含於Daikyo Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

【0310】 在一些實施例中，經由視網膜下投與，向個體投與本文提供之單一單位劑型。在一些實施例中，經由脈絡膜上投與，向個體投與本文提供之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型可適合於視網膜下及脈絡膜上投與。本文亦提供一種預填充注射器，其含有本文提供之單一單位劑型。在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型能夠儲存在4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。在一些實施

例中，本文提供之單一單位劑型能夠儲存在 -80°C 約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月。在一些實施例中，本文提供之單一單位劑型能夠在先前已儲存在 -80°C 約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月之後儲存在 4°C 1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月。

4.3 劑量及投與模式

【0311】 在某些態樣中，本文揭示一種治療或預防個體之疾病之方法，其包含藉由以下向個體投與醫藥組合物：靜脈內投與、皮下投與、肌肉內注射、脈絡膜上注射(例如經由脈絡膜上藥物遞送裝置，諸如具有微針之微小注射器)、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投與(例如經由視網膜下藥物遞送裝置之手術程序，該視網膜下藥物遞送裝置包含可插入且遂穿脈絡膜上腔至後極的導管，在該後極處小針注入至視網膜下腔中)及/或後近鞏膜貯存程序(例如經由近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面的插管))。在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為 3×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 1.2×10^{10} GC/mL、約 1.6×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 2.4×10^{11} GC/mL、約 2.5×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 6.2×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL或約 3×10^{13} GC/mL。

【0312】 在某些實施例中，醫藥組合物之載體基因體濃度(VGC)為約 3×10^9 GC/mL、 4×10^9 GC/mL、 5×10^9 GC/mL、 6×10^9 GC/mL、7

$\times 10^9$ GC/mL、 8×10^9 GC/mL、 9×10^9 GC/mL、約 1×10^{10} GC/mL、約 2×10^{10} GC/mL、約 3×10^{10} GC/mL、約 4×10^{10} GC/mL、約 5×10^{10} GC/mL、約 6×10^{10} GC/mL、約 7×10^{10} GC/mL、約 8×10^{10} GC/mL、約 9×10^{10} GC/mL、約 1×10^{11} GC/mL、約 2×10^{11} GC/mL、約 3×10^{11} GC/mL、約 4×10^{11} GC/mL、約 5×10^{11} GC/mL、約 6×10^{11} GC/mL、約 7×10^{11} GC/mL、約 8×10^{11} GC/mL、約 9×10^{11} GC/mL、約 1×10^{12} GC/mL、約 2×10^{12} GC/mL、約 3×10^{12} GC/mL、約 4×10^{12} GC/mL、約 5×10^{12} GC/mL、約 6×10^{12} GC/mL、約 7×10^{12} GC/mL、約 8×10^{12} GC/mL、約 9×10^{12} GC/mL、約 1×10^{13} GC/mL、約 1×10^{13} GC/mL、約 2×10^{13} GC/mL、約 3×10^{13} GC/mL。

【0313】 應以在 ≥ 0.1 mL至 ≤ 0.5 mL範圍內之體積，較佳地以0.1至0.30 mL (100-300 μ l)之體積，且最佳地以0.25 mL (250 μ l)之體積，視網膜下及/或視網膜內投與(例如藉由經玻璃體途徑(手術程序)或經由脈絡膜上腔之視網膜下注射)治療有效量之重組載體。可在同一就診期間以一或多個注射投與治療有效量之重組載體。應以100 μ l或更小之體積，例如以50-100 μ l之體積脈絡膜上投與(例如藉由脈絡膜上注射)治療有效劑量之重組載體。應以500 μ l或更小之體積，例如以10-20 μ l、20-50 μ l、50-100 μ l、100-200 μ l、200-300 μ l、300-400 μ l或400-500 μ l之體積，向鞏膜外表面投與治療有效量之重組載體。

【0314】 在某些實施例中，脈絡膜上投與(例如藉由脈絡膜上注射)重組載體。在一具體實施例中，使用脈絡膜上藥物遞送裝置進行脈絡膜上投與(例如注射至脈絡膜上腔中)。脈絡膜上藥物遞送裝置通常用於脈絡膜上投與程序，其涉及將藥物投與至眼睛之脈絡膜上腔(參見例如

Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23 ; Goldstein, 2014, Retina Today 9(5): 82-87 ; Baldassarre等人, 2017 ; 其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。可根據本文中所描述之本發明用於將表現載體沈積於脈絡膜上腔中之脈絡膜上藥物遞送裝置包括但不限於由Clearside® Biomedical, Inc.製造之脈絡膜上藥物遞送裝置(參見例如Hariprasad, 2016, Retinal Physician 13: 20-23)及MedOne脈絡膜上導管。

【0315】 在一具體實施例中，脈絡膜上藥物遞送裝置為具有1毫米30規格針之注射器(參見圖5)。在使用此裝置進行注射期間，針刺入鞏膜之基底且含有藥物之流體進入脈絡膜上腔，導致脈絡膜上腔膨脹。因此，在注射期間存在觸覺及視覺反饋。在注射後，流體向後部流動且主要在脈絡膜及視網膜中吸收。此導致自所有視網膜細胞層及脈絡膜細胞產生轉殖基因蛋白質。使用此類型之裝置及程序允許進行快速簡便的門診程序且降低併發症的風險。可將100 μ l之最大體積注射至脈絡膜上腔中。

【0316】 在某些實施例中，藉由使用視網膜下藥物遞送裝置，經由脈絡膜上腔視網膜下投與重組載體。在某些實施例中，視網膜下藥物遞送裝置為導管，該導管在手術程序期間插入且遂穿脈絡膜上腔大約至眼睛後部，以將藥物遞送至視網膜下腔(參見圖6)。此程序允許玻璃體保持完整，且因此存在較小的併發症風險(基因療法外溢及諸如視網膜脫落及黃斑裂孔之併發症的風險較小)，且無需玻璃體切除術，所產生的泡可更加擴散，從而使更多的視網膜表面區域以較小的體積轉導。此程序後誘發白內障的風險降至最低，其為較年輕的患者所期望的。此外，此程序與標準經玻璃體途徑相比可更安全地在中央凹下遞送泡，其為患有遺傳性視網膜疾病且影響中心視覺之患者所期望的，其中用於轉導之目標細胞在黃斑

中。此程序亦對具有對於全身循環中存在之AAV之中和抗體(Nab)之患者為有利的，該等中和抗體可影響其他遞送途徑(諸如脈絡膜上及玻璃體內遞送)。另外，與標準經玻璃體途徑相比，此方法已顯示產生泡，較少自視網膜切開術部位溢出。最初由Janssen Pharmaceuticals, Inc.製造，現在由Orbit Biomedical Inc.製造之視網膜下藥物遞送裝置(參見例如Subretinal Delivery of Cells via the Suprachoroidal Space: Janssen Trial. In: Schwartz等人 (編) Cellular Therapies for Retinal Disease, Springer, Cham；國際專利申請公開案第WO 2016/040635 A1號)可用於此類目的。

【0317】 在某些實施例中，將重組載體投與至鞏膜外表面(例如藉由使用近鞏膜藥物遞送裝置，其包含尖端可插入且保持直接並置於鞏膜表面之插管)。在一具體實施例中，投與至鞏膜外表面係使用後近鞏膜貯存程序來進行，其涉及將藥物吸入鈍頭彎曲的插管中且隨後與鞏膜外表面直接接觸進行遞送而不刺穿眼球。特定言之，在對裸露的鞏膜形成小切口之後，插入插管尖端(參見圖7A)。插入插管軸之彎曲部分，保持插管尖端直接並置於鞏膜表面(參見圖7B至圖7D)。完整插入插管後(圖7D)，緩慢地注射藥物，同時用無菌棉花拭子沿著插管軸的頂部及側面維持適度的壓力。此遞送方法避免眼內感染及視網膜脫落之風險，副作用通常與將治療劑直接注射至眼睛中相關。

【0318】 維持轉殖基因產物在玻璃體液中至少0.330 $\mu\text{g/mL}$ 或在水狀液(眼前房)中0.110 $\mu\text{g/mL}$ 之Cmin濃度持續三個月的劑量為所需的；其後，應維持轉殖基因產物之玻璃體Cmin濃度在1.70至6.60 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內，及/或水狀液Cmin濃度在0.567至2.20 $\mu\text{g/mL}$ 範圍內。然而，因為轉殖基因產物為連續產生的(在組成性啟動子的控制下或在使用低氧誘導性啟

動子時由低氧條件誘導)，所以維持較低的濃度可為有效的。玻璃體液濃度可直接在自玻璃體液或前房收集之患者流體樣品中量測，或藉由量測患者之轉殖基因產物血清濃度來估計及/或監測——全身與玻璃體暴露於轉殖基因產物之比率為約1:90,000。(例如參見Xu L等人, 2013, Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 54: 1616-1624, 第1621頁及第1623頁之表5中報導之蘭比珠單抗的玻璃體液及血清濃度，其以全文引用之方式併入本文中)。

【0319】 在某些實施例中，劑量係藉由每毫升之基因體複本或投與患者眼睛(例如脈絡膜上、視網膜下、近鞏膜及/或視網膜內(例如藉由脈絡膜上注射、經玻璃體途徑之視網膜下注射(手術程序)、經由脈絡膜上腔之視網膜下投藥或後近鞏膜貯存程序))之基因體複本數來兩側。在某些實施例中，投與每毫升 2.4×10^{11} 個基因體複本至每毫升 1×10^{13} 個基因體複本。在一具體實施例中，投與每毫升 2.4×10^{11} 個基因體複本至每毫升 5×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 5×10^{11} 個基因體複本至每毫升 1×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 1×10^{12} 個基因體複本至每毫升 5×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升 5×10^{12} 個基因體複本至每毫升 1×10^{13} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 2.4×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 5×10^{11} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 1×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 5×10^{12} 個基因體複本。在另一具體實施例中，投與每毫升約 1×10^{13} 個基因體複本。在某些實施例中，投與 1×10^9 至 1×10^{12} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 3×10^9 至 2.5×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 1×10^9 至 2.5×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 $1 \times$

10^9 至 1×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 1×10^9 至 5×10^9 個基因體複本。在具體實施例中，投與 6×10^9 至 3×10^{10} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 4×10^{10} 至 1×10^{11} 個基因體複本。在具體實施例中，投與 2×10^{11} 至 1×10^{12} 個基因體複本。在一具體實施例中，投與約 3×10^9 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 1.2×10^{10} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1×10^{10} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 4×10^{10} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 6×10^{10} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 2.4×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.6×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.2×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.55×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.2×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.6×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 6.4×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 2.5×10^{11} 個基因體複本(其對應於250 μ l體積中每毫升約 1.0×10^{12} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 6.4×10^{10} 個基因體複本(其對應於200 μ l體積中每毫升約 3.2×10^{11} 個基因體複本)。在另一具體實施例中，投與約 1.3×10^{11} 個基因體複本(其對應於200 μ l體積中每毫升約 6.5×10^{11} 個基因體複本)。

【0320】 如本文所用且除非另外規定，否則術語「約」意謂在既定值或範圍之 $\pm 10\%$ 內。

【0321】 在另一態樣中，本文提供一種治療經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之個體之方法，該方法包含製備本文所提供

之醫藥組合物，將醫藥組合物儲存在-80℃第一時間段，解凍醫藥組合物，及在解凍之後，將醫藥組合物儲存在4℃第二時間段。在一些實施例中，第一時間段為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月、約24個月、約25個月、約26個月、約27個月、約28個月、約28個月、約30個月、約31個月、約32個月、約33個月、約34個月、約35個月、約36個月、約37個月、約38個月、約39個月、約40個月、約41個月、約42個月、約43個月、約44個月、約45個月、約46個月、約47個月或約48個月。在一些實施例中，第二時間段為約1週、約2週、約3週、約4週、約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月或約6個月。

4.4 構築體I、構築體II及其他構築體

【0322】 在一些實施例中，AAV為本文提供之AAV病毒載體，其按以下次序包含以下元件：a)組成性或低氧誘導性啟動子序列；及b)編碼轉殖基因(例如抗VEGF抗原結合片段部分)之序列。在一些實施例中，轉殖基因為針對VEGF之完全人類轉譯後修飾之(HuPTM)抗體。抗體包括但不限於單株抗體、多株抗體、重組產生之抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、一價抗體、全長抗體之抗原結合片段及上述之融合蛋白。此類抗原結合片段包括但不限於全長抗VEGF抗體(較佳地，全長抗VEGF單株抗體(mAb))之單域抗體(重鏈抗體(VHH)或奈米抗體之可變域)、Fab、F(ab')₂及scFv (單鏈可變片段) (在本文中被統稱為「抗原結合片段」)。在一較佳實施例中，針對VEGF之完全人類轉譯後修

飾之抗體為針對VEGF之單株抗體(mAb)的完全人類轉譯後修飾之抗原結合片段(「HuPTM FabVEGFi」)。在另一較佳實施例中，HuPTM FabVEGFi為抗VEGF mAb之完全人類糖基化之抗原結合片段(「HuGly FabVEGFi」)。在一替代實施例中，可使用全長mAb。在一較佳實施例中，用於遞送轉殖基因之AAV應對人類視網膜細胞或感光細胞具有向性。此類AAV可包括非複製型重組腺相關病毒載體(「rAAV」)，尤其帶有AAV8衣殼之彼等AAV為較佳的。在一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他DNA表現構築體為構築體I，其中構築體I包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV8反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞 β -肌動蛋白啟動子，b)雞 β -肌動蛋白內含子及c)兔 β -球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在另一具體實施例中，本文中所描述之病毒載體或其他DNA表現構築體為構築體II，其中構築體II包含以下組分：(1)側接表現卡匣之AAV2反向末端重複序列；(2)控制元件，其包括a) CB7啟動子，包含CMV增強子/雞 β -肌動蛋白啟動子，b)雞 β -肌動蛋白內含子及c)兔 β -球蛋白poly A信號；及(3)編碼抗VEGF抗原結合片段之重鏈及輕鏈之核酸序列，其藉由自裂解furin (F)/F2A連接子隔開，確保表現等量的重鏈及輕鏈多肽。在一些實施例中，抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0323】 在一些實施例中，醫藥組合物由以下組成：(a)編碼抗人類血管內皮生長因子(hVEGF)抗體之構築體II，(b)濃度在0.2 g/L之氯化鉀，

(c)濃度在0.2 g/L之磷酸二氫鉀，(d)濃度在5.84 g/L之氯化鈉，(e)濃度在1.15 g/L之無水磷酸氫二鈉，(f)濃度在4% 重量/體積(40 g/L)之蔗糖，(g)濃度在0.001%重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188及(h)水，且其中抗hVEGF抗體包含含有SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的重鏈及含有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的輕鏈。

【0324】 在一些態樣中，本文提供編碼抗VEGF抗原結合片段或抗VEGF抗原結合片段之經高糖基化衍生物之AAV病毒載體。本文提供之病毒載體及其他DNA表現構築體包括用於將轉殖基因遞送至目標細胞(例如視網膜色素上皮細胞)之任何適合的方法。轉殖基因之遞送方式包括病毒載體、脂質體、其他含脂質複合物、其他大分子複合物、合成的經修飾mRNA、未經修飾之mRNA、小分子、非生物活性分子(例如金粒子)、聚合分子(例如樹枝狀聚合物)、裸DNA、質體、噬菌體、轉座子、黏質體或游離基因體。在一些實施例中，載體為靶向載體，例如靶向視網膜色素上皮細胞之載體。

【0325】 在一些態樣中，本揭示案提供使用的核酸，其中該核酸編碼HuPTM FabVEGF_i，例如HuGly FabVEGF_i，其與選自由以下組成之群的啟動子可操作地連接：CB7啟動子(雞β-肌動蛋白啟動子及CMV增強子)、巨細胞病毒(CMV)啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus；RSV)啟動子、MMT啟動子、EF-1α啟動子、UB6啟動子、雞β-肌動蛋白啟動子、CAG啟動子、RPE65啟動子及視蛋白啟動子。在一具體實施例中，HuPTM FabVEGF_i與CB7啟動子可操作地連接。

【0326】 在某些實施例中，本文提供包含一或多種核酸(例如多核苷酸)之重組載體。核酸可包含DNA、RNA或DNA及RNA之組合。在某些

實施例中，DNA包含選自由以下組成之群之序列中之一或多者：啟動子序列、所關注基因(轉殖基因，例如抗VEGF抗原結合片段)之序列、非轉譯區及終止序列。在某些實施例中，本文提供之病毒載體包含與所關注基因可操作地連接的啟動子。

【0327】 在某些實施例中，本文所揭示之核酸(例如多核苷酸)及核酸序列可例如經由熟習此項技術者已知的任何密碼子最佳化技術而經密碼子最佳化(參見例如Quax等人, 2015, Mol Cell 59:149-161之綜述)。

4.4.1 mRNA

【0328】 在某些實施例中，本文提供之載體為經修飾之mRNA，其編碼所關注基因(例如轉殖基因，例如抗VEGF抗原結合片段部分)。用於將轉殖基因遞送至視網膜色素上皮細胞之經修飾及未經修飾之mRNA的合成教示於例如Hansson等人, J. Biol. Chem., 2015, 290(9):5661-5672中，其以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，本文提供一種經修飾之mRNA，其編碼抗VEGF抗原結合片段部分。

4.4.2 病毒載體

【0329】 在某些實施例中，本文提供之病毒載體為基於AAV之病毒載體。在較佳實施例中，本文提供之病毒載體為基於AAV8之病毒載體。在某些實施例中，本文提供之基於AAV8之病毒載體保留視網膜細胞之向性。在某些實施例中，本文提供之基於AAV之載體編碼AAV rep基因(複製所需)及/或AAV cap基因(衣殼蛋白合成所需)。已鑑別多種AAV血清型。在某些實施例中，本文提供之基於AAV之載體包含來自一或多種AAV血清型之組分。在某些實施例中，本文提供之基於AAV之載體包含來自以下中之一或多者之衣殼組分：AAV1、AAV2、AAV2tYF、

AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、
 AAV11、AAVrh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-
 1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、rAAV.7m8、
 AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、
 AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、
 AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、
 AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、
 AAV.HSC15及AAV.HSC16。在較佳實施例中，本文提供之基於AAV之載
 體包含來自AAV8、AAV9、AAV10、AAV11或AAVrh10血清型中之一或
 多者的組分。

【0330】 在特定實施例中提供AAV8載體，其包含：病毒基因體其
 包含用於表現轉殖基因之表現卡匣，該轉殖基因在調控元件控制下且側接
 ITR；及病毒衣殼，其具有AAV8衣殼蛋白之胺基酸序列或與AAV8衣殼蛋
 白(SEQ ID NO: 48)之胺基酸序列至少95%、96%、97%、98%、99%或
 99.9%一致同時保留AAV8衣殼的生物功能。在某些實施例中，所編碼之
 AAV8衣殼具有SEQ ID NO: 48之序列，具有1、2、3、4、5、6、7、8、
 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、
 24、25、26、27、28、29或30個胺基酸取代且保留AAV8衣殼之生物功
 能。圖8基於標記有SUBS之列中的比較提供不同AAV血清型之衣殼蛋白
 之胺基酸序列與可在比對序列中某些位置處經取代之潛在胺基酸的比較性
 比對。因此，在具體實施例中，AAV載體包含AAV8衣殼變體，其具有在
 原生AAV衣殼序列中之彼位置處不存在之1、2、3、4、5、6、7、8、9、
 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、

25、26、27、28、29或30個在圖8之SUBS列中所鑑別的胺基酸取代。

【0331】 在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之AAV為Anc80或Anc80L65，如Zinn等人, 2015, Cell Rep. 12(6): 1056-1068中所描述，其以全文引用之方式併入。在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之AAV包含以下胺基酸插入中之一者：LGETTRP或LALGETTRP，如美國專利第9,193,956號、第9,458,517號及第9,587,282號以及美國專利申請公開案第2016/0376323號中所描述，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之AAV為AAV.7m8，如美國專利第9,193,956號；第9,458,517號；及第9,587,282號及美國專利申請公開案第2016/0376323號中所描述，其中之每一者以全文引用的方式併入本文中。在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之AAV為美國專利第9,585,971號中所揭示之任何AAV，諸如AAV.PHP.B。在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之AAV為以下專利及專利申請案中之任一者中所揭示的AAV，其中之每一者以全文引用的方式併入本文中：美國專利第7,906,111號；第8,524,446號；第8,999,678號；第8,628,966號；第8,927,514號；第8,734,809號；第US 9,284,357號；第9,409,953號；第9,169,299號；第9,193,956號；第9,458,517號；及第9,587,282號；美國專利申請公開案第2015/0374803號；第2015/0126588號；第2017/0067908號；第2013/0224836號；第2016/0215024號；第2017/0051257號；及國際專利申請案第PCT/US2015/034799號；第PCT/EP2015/053335號。

【0332】 基於AAV8之病毒載體用於某些本文所描述之方法中。基於AAV之病毒載體之核酸序列及製備重組AAV及AAV衣殼之方法教示於

例如美國專利第7,282,199 B2號、美國專利第7,790,449 B2號、美國專利第8,318,480 B2號、美國專利第8,962,332 B2號及國際專利申請案第PCT/EP2014/076466號中，其中之每一者以全文引用的方式併入本文中。在一個態樣中，本文提供編碼轉殖基因(例如抗VEGF抗原結合片段)之基於AAV (例如AAV8)之病毒載體。在具體實施例中，本文提供編碼抗VEGF抗原結合片段之基於AAV8之病毒載體。在更具體實施例中，本文提供編碼蘭比珠單抗之基於AAV8之病毒載體。

【0333】 在某些實施例中，上文可使用單股AAV (ssAAV)。在某些實施例中，可使用自身互補型載體，例如scAAV (參見例如Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18(2):171-82，McCarty等人, 2001, Gene Therapy, 第8卷, 第16期, 第1248-1254頁；及美國專利第6,596,535號；第7,125,717號；及第7,456,683號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。

【0334】 在某些實施例中，用於本文中所描述之方法中之病毒載體為基於腺病毒之病毒載體。重組腺病毒載體可用於轉移抗VEGF抗原結合片段。重組腺病毒可為第一代載體，其具有E1缺失、具有或不具有E3缺失及具有插入至任一缺失區中之表現卡匣。重組腺病毒可為第二代載體，其含有E2及E4區之全部或部分缺失。輔助依賴型腺病毒僅保留腺病毒反向末端重複序列及封裝信號(phi)。轉殖基因插入封裝信號與3' ITR之間，具有或不具有用以使基因體保持接近大致36 kb之野生型大小的填充序列。用於產生腺病毒載體之例示性方案可見於Alba等人, 2005, 「Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy,」 Gene Therapy 12:S18-S27中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0335】 在一具體實施例中，用於本文所描述之方法中之載體為編

碼抗VEGF抗原結合片段(例如蘭比珠單抗)之載體，使得在將該載體引入至相關細胞(例如活體內或活體外視網膜細胞)中後，由該細胞表現抗VEGF抗原結合片段之糖基化變體及/或酪胺酸硫酸化之變體。在一具體實施例中，所表現之抗VEGF抗原結合片段包含如上文章節4.1中所描述之糖基化及/或酪胺酸硫酸化模式。

4.4.3 基因表現之啟動子及修飾子

【0336】 在某些實施例中，本文提供之載體包含調節基因遞送或基因表現的組分(例如「表現控制元件」)。在某些實施例中，本文提供之載體包含調節基因表現之組分。在某些實施例中，本文所提供之載體包含影響對細胞之結合或靶向之組分。在某些實施例中，本文所提供之載體包含影響攝取後多核苷酸(例如轉殖基因)在細胞內之定位的組分。在某些實施例中，本文所提供之載體包含可用作例如用以偵測或選擇已攝取多核苷酸之細胞的可偵測或可選標記的組分。

【0337】 在某些實施例中，本文提供之病毒載體包含一或多個啟動子。在某些實施例中，啟動子為組成性啟動子。在某些實施例中，啟動子為誘導性啟動子。誘導性啟動子可為較佳的，使得可根據治療功效的需要打開及關閉轉殖基因表現。此類啟動子包括例如低氧誘導性啟動子及藥物誘導性啟動子，諸如由雷帕黴素(rapamycin)及相關藥劑誘導之啟動子。低氧誘導性啟動子包括具有HIF結合位點之啟動子，參見例如Schödel等人, 2011, Blood 117(23):e207-e217及Kenneth及Rocha, 2008, Biochem J. 414:19-29，其中之每一者將低氧誘導性啟動子之教示內容以引用的方式併入。另外，可用於構築體中之低氧誘導性啟動子包括紅血球生成素啟動子及N-WASP啟動子(參見Tsuchiya, 1993, J. Biochem. 113:395有關紅血

球生成素啟動子之揭示內容及Salvi, 2017, Biochemistry and Biophysics Reports 9:13-21有關N-WASP啟動子之揭示內容，其均將低氧誘導性啟動子之教示內容以引用的方式併入)。或者，構築體可含有藥物誘導性啟動子，例如藉由投與雷帕黴素及相關類似物誘導之啟動子(參見例如國際專利申請公開案第WO94/18317號、第WO 96/20951號、第WO 96/41865號、第WO 99/10508號、第WO 99/10510號、第WO 99/36553號及第WO 99/41258號，及美國專利第US 7,067,526號(揭示雷帕黴素類似物)，其關於藥物誘導性啟動子之揭示內容以引用的方式併入本文中)。在某些實施例中，啟動子為低氧誘導性啟動子。在某些實施例中，啟動子包含低氧誘導因子(HIF)結合位點。在某些實施例中，啟動子包含HIF-1 α 結合位點。在某些實施例中，啟動子包含HIF-2 α 結合位點。在某些實施例中，HIF結合位點包含RCGTG基序。關於HIF結合位點之位置及序列的詳情，參見例如Schödel等人, Blood, 2011, 117(23):e207-e217，其以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，啟動子包含除HIF轉錄因子以外之低氧誘導性轉錄因子的結合位點。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含一或多個在低氧時優先轉譯之IRES位點。對於有關低氧誘導性基因表現及其中所涉及之因素的教示內容，參見例如Kenneth及Rocha, Biochem J., 2008, 414:19-29，其以全文引用之方式併入本文中。

【0338】 在某些實施例中，啟動子為CB7啟動子(參見Dinculescu等人, 2005, Hum Gene Ther 16: 649-663，其以全文引用的方式併入本文中)。在一些實施例中，CB7啟動子包括增強由載體驅動之轉殖基因之表現的其他表現控制元件。在某些實施例中，其他表現控制元件包括雞 β -肌動蛋白內含子及/或兔 β -球蛋白poly A信號。在某些實施例中，啟動子包含

TATA盒。在某些實施例中，啟動子包含一或多個元件。在某些實施例中，一或多個啟動子元件可相對於彼此倒置或移動。在某些實施例中，啟動子之元件經定位以協同起作用。在某些實施例中，啟動子之元件經定位以獨立地起作用。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含一或多個選自由以下組成之群的啟動子：人類CMV即刻早期基因啟動子、SV40早期啟動子、勞氏肉瘤病毒(RS)長末端重複序列及大鼠胰島素啟動子。在某些實施例中，本文提供之載體包含一或多種選自由以下組成之群的長末端重複序列(LTR)啟動子：AAV、MLV、MMTV、SV40、RSV、HIV-1及HIV-2 LTR。在某些實施例中，本文提供之載體包含一或多種組織特異性啟動子(例如視網膜色素上皮細胞特異性啟動子)。在某些實施例中，本文提供之病毒載體包含RPE65啟動子。在某些實施例中，本文提供之載體包含VMD2啟動子。

【0339】 在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含一或多個除啟動子以外的調控元件。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含強化子。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含抑制子。在某些實施例中，本文提供之病毒載體包含內含子或嵌合內含子。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含聚腺苷酸化序列。

4.4.4 信號肽

【0340】 在某些實施例中，本文所提供之載體包含調節蛋白質遞送之組分。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含一或多個信號肽。信號肽在本文中亦可稱為「前導序列」或「前導肽」。在某些實施例中，信號肽允許轉殖基因產物(例如抗VEGF抗原結合片段部分)在細胞中達成適當封裝(例如糖基化)。在某些實施例中，信號肽允許轉殖基因產物(例

如抗VEGF抗原結合片段部分)在細胞中達成適當定位。在某些實施例中，信號肽允許轉殖基因產物(例如抗VEGF抗原結合片段部分)達成自細胞分泌。用於與本文提供之載體及轉殖基因連接之信號肽之實例可見於表1中。

表1：與本文提供之載體一起使用的信號肽。

SEQ ID NO.	信號肽	序列
5	VEGF-A信號肽	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA
6	Fibulin-1信號肽	MERAAPSRRV PLPLLLLGGL ALLAAGVDA
7	玻連蛋白信號肽	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
8	補體因子H信號肽	MRLAKIICLMLWAICVA
9	視力蛋白信號肽	MRLLAFLSLL ALVLQETGT
22	白蛋白信號肽	MKWVTFISLLFLFSSAYS
23	胰凝乳蛋白酶原信號肽	MAFLWLLSCWALLGTTFG
24	介白素-2信號肽	MYRMQLLSICIALALVTNS
25	胰蛋白酶原-2信號肽	MNLLLILTFVAAAVA
52	突變型介白素-2信號肽	MYRMQLLLIALSLALVTNS

4.4.5 多順反子訊息——IRES及F2A連接子

【0341】 內部核糖體進入位點。單一構築體可經工程改造以編碼重鏈及輕鏈兩者，該等重鏈及輕鏈由可裂解連接子或IRES隔開以使得單獨重鏈及輕鏈多肽由經轉導細胞表現。在某些實施例中，本文所提供之病毒載體提供多順反子(例如雙順反子)訊息。舉例而言，病毒構築體可編碼由內部核糖體進入位點(IRES)元件隔開的重鏈及輕鏈(例如使用IRES元件產生雙順反子載體，參見例如Gurtu等人, 1996, Biochem. Biophys. Res. Comm. 229(1):295-8，其以全文引用之方式併入本文中)。IRES元件繞過核糖體掃描模型且在內部位點開始轉譯。IRES在AAV中之用途描述於例如Furling等人, 2001, Gene Ther 8(11): 854-73中，其以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，雙順反子訊息含於病毒載體內，該病毒載體對其中多核苷酸之大小有限制。在某些實施例中，雙順反子訊息包含在基

於AAV病毒之載體(例如基於AAV8之載體)內。

【0342】 Furin-F2A連接子。在其他實施例中，本文提供之病毒載體編碼由可裂解連接子(諸如自裂解furin/F2A (F/F2A)連接子)隔開之重鏈及輕鏈(Fang等人, 2005, Nature Biotechnology 23: 584-590，及Fang, 2007, Mol Ther 15: 1153-9，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。

【0343】 舉例而言，furin-F2A連接子可併入表現卡匣中以將重鏈及輕鏈編碼序列隔開，從而產生具有以下結構之構築體：

前導序列-重鏈-Furin位點-F2A位點-前導序列-輕鏈-polyA。

【0344】 具有胺基酸序列LLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 26)之F2A位點為自加工的，導致最終G及P胺基酸殘基之間的「裂解」。可使用之其他連接子包括但不限於：

- T2A：(GSG) E G R G S L T C G D V E N P **G P** (SEQ ID NO: 27)；

- P2A：(GSG) A T N F S L K Q A G D V E E N P **G P** (SEQ ID NO: 28)；

- E2A：(GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P **G P** (SEQ ID NO: 29)；

- F2A：(GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P **G P** (SEQ ID NO: 30)。

【0345】 當核糖體在開放閱讀框架中遇到F2A序列時，跳過肽鍵，從而導致轉譯終止；或繼續轉譯下游序列(輕鏈)。此自加工序列在重鏈之C端產生一串額外胺基酸。然而，此類額外胺基酸隨後在furin位點由宿主

細胞Furin裂解，該等furin位點緊接在F2A位點之前且在重鏈序列之後，且由羧基肽酶進一步裂解。視所用Furin連接子之序列及活體內裂解連接子之羧基肽酶而定，所得重鏈可在C端具有一個、兩個、三個或更多個額外胺基酸，或其可不具有此類額外胺基酸(參見例如Fang等人, 2005年4月17日, Nature Biotechnol. Advance Online Publication ; Fang等人, 2007, Molecular Therapy 15(6):1153-1159 ; Luke, 2012, Innovations in Biotechnology, Ch. 8, 161-186)。可使用之furin連接子包含一系列四個鹼性胺基酸，例如RKRR、RRRR、RRKR或RKKR。一旦此連接子由羧基肽酶裂解，則可保留額外胺基酸，以使得額外的零個、一個、兩個、三個或四個胺基酸可保留在重鏈之C端上，例如R、RR、RK、RKR、RRR、RRK、RKK、RKRR、RRRR、RRKR或RKKR。在某些實施例中，一旦連接子由羧基肽酶裂解，則不保留額外胺基酸。在某些實施例中，0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%或20%或更小但大於0%之由用於本文所描述之方法中之構築體產生的抗體(例如抗原結合片段)群體，在裂解之後具有一個、兩個、三個或四個胺基酸保留在重鏈的C端上。在某些實施例中，0.5-1%、0.5%-2%、0.5%-3%、0.5%-4%、0.5%-5%、0.5%-10%、0.5%-20%、1%-2%、1%-3%、1%-4%、1%-5%、1%-10%、1%-20%、2%-3%、2%-4%、2%-5%、2%-10%、2%-20%、3%-4%、3%-5%、3%-10%、3%-20%、4%-5%、4%-10%、4%-20%、5%-10%、5%-20%或10%-20%之由用於本文所描述之方法中之構築體產生的抗體(例如抗原結合片段)群體，在裂解之後具有一個、兩個、三個或四個胺基酸保留在重鏈的C端上。在某些實施例中，furin連接子具有序列R-X-K/R-R，使得重鏈之C端上的額外胺基酸為R、RX、RXK、RXR、RXKR或

RXRR，其中X為任何胺基酸，例如丙胺酸(A)。在某些實施例中，額外胺基酸可不保留在重鏈之C端上。

【0346】 在某些實施例中，本文中所描述之表現卡匣含於病毒載體內，其中對於其中之多核苷酸之大小有限制。在某些實施例中，表現卡匣含於基於AAV病毒之載體(例如基於AAV8之載體)內。

4.4.6 非轉譯區

【0347】 在某些實施例中，本文所提供之病毒載體包含一或多個非轉譯區(UTR)，例如3'及/或5' UTR。在某些實施例中，UTR針對所需蛋白質表現量而經最佳化。在某些實施例中，UTR針對轉殖基因之mRNA半衰期而經最佳化。在某些實施例中，UTR針對轉殖基因之mRNA的穩定性而經最佳化。在某些實施例中，UTR針對轉殖基因之mRNA的二級結構而經最佳化。

4.4.7 反向末端重複序列

【0348】 在某些實施例中，本文提供之病毒載體包含一或多個反向末端重複(ITR)序列。ITR序列可用於將重組基因表現卡匣封裝至病毒載體之病毒粒子中。在某些實施例中，ITR係來自AAV，例如AAV8或AAV2(參見例如Yan等人, 2005, J. Virol., 79(1):364-379；美國專利第7,282,199 B2號、美國專利第7,790,449 B2號、美國專利第8,318,480 B2號、美國專利第8,962,332 B2號及國際專利申請案第PCT/EP2014/076466號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。

4.4.8 轉殖基因

【0349】 由轉殖基因編碼之HuPTM FabVEGF_i，例如HuGly FabVEGF_i，可包括但不限於與VEGF結合之抗體之抗原結合片

段，諸如貝伐單抗；抗VEGF Fab部分，諸如蘭比珠單抗；或經工程改造以在Fab域上含有額外糖基化位點的此類貝伐單抗或蘭比珠單抗Fab部分(例如，參見Courtois等人, 2016, mAbs 8: 99-112，其關於在全長抗體之Fab域上經高糖基化之貝伐單抗衍生物的描述全部以引用的方式併入本文中)。

【0350】 在某些實施例中，本文提供之載體編碼抗VEGF抗原結合片段轉殖基因。在具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因受適當的表現控制元件控制以在視網膜細胞中表現。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因包含輕鏈及重鏈cDNA序列(分別為SEQ ID NO. 10及11)之貝伐單抗Fab部分。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因包含蘭比珠單抗輕鏈及重鏈cDNA序列(分別為SEQ ID NO. 12及13)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼貝伐單抗Fab，其包含分別為SEQ ID NO: 3及4之輕鏈及重鏈。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈之抗原結合片段，該輕鏈包含與SEQ ID NO: 3中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈之抗原結合片段，該重鏈包含與SEQ ID NO: 4中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈及重鏈之抗原結合片段，該輕鏈包含與SEQ ID NO: 3中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺

基酸序列，該重鏈包含與SEQ ID NO: 4中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼經高糖基化之蘭比珠單抗，其包含分別為SEQ ID NO: 1及2之輕鏈及重鏈。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈之抗原結合片段，該輕鏈包含與SEQ ID NO: 1中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈之抗原結合片段，該重鏈包含與SEQ ID NO: 2中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈及重鏈之抗原結合片段，該輕鏈包含與SEQ ID NO: 1中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列，該重鏈包含與SEQ ID NO: 2中所闡述之序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的胺基酸序列。

【0351】 在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼經高糖基化之貝伐單抗Fab，其包含SEQ ID NO: 3及4之輕鏈及重鏈，具有以下突變中之一或多者：L118N (重鏈)、E195N (輕鏈)或Q160N或Q160S (輕鏈)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼經高糖基化之蘭比珠單抗，其包含SEQ ID NO: 1及2之輕鏈及重鏈，具有以下突變中之一或多者：L118N (重鏈)、E195N (輕鏈)或Q160N或Q160S (輕鏈)。

抗原結合片段轉殖基因cDNA之序列可見於例如表2中。在某些實施例中，抗原結合片段轉殖基因cDNA之序列係藉由用表1中所列出之一或多種信號序列置換SEQ ID NO: 10及11或SEQ ID NO: 12及13之信號序列獲得。

【0352】 在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼抗原結合片段且包含六個貝伐單抗CDR之核苷酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼抗原結合片段且包含六個蘭比珠單抗CDR之核苷酸序列。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含蘭比珠單抗之重鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 20、18及21)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含蘭比珠單抗之輕鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 14-16)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含貝伐單抗之重鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 17-19)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含貝伐單抗之輕鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 14-16)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區及輕鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含蘭比珠單抗之重鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 20、18及21)，該輕鏈可變區包含蘭比珠單抗之輕鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 14-16)。在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區及輕鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含貝伐單抗之重鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 17-19)，該輕鏈可變區包含貝伐單抗之輕鏈CDR 1-3 (SEQ ID NO: 14-16)。

【0353】 在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0354】 在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一特定實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含重鏈可變區之抗原結合片段，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，

WINTYTGEPITYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0355】 在某些實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區及重鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區及重鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPITYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯

胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗VEGF抗原結合片段轉殖基因編碼包含輕鏈可變區及重鏈可變區之抗原結合片段，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3，該重鏈可變區包含SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化，且其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO. 20之重鏈CDR1，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化

學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0356】 在某些態樣中，本文亦提供包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3的抗VEGF抗原結合片段，及編碼此類抗原VEGF抗原結合片段之轉殖基因，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu))，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段及轉殖基因可用於本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例

中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0357】 在某些態樣中，本文亦提供包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3的抗VEGF抗原結合片段，及編碼此類抗原VEGF抗原結合片段之轉殖基因，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三

胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段及轉殖基因可用於本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例中，本文中所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

【0358】 在某些態樣中，本文亦提供包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3的抗VEGF抗原結合片段，及編碼此類抗原VEGF抗原結合片段之轉殖基因，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯

胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)不攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。在一具體實施例中，抗原結合片段包含SEQ ID NO: 14-16之輕鏈CDR 1-3及SEQ ID NO: 20、18及21之重鏈CDR 1-3，其中：(1)重鏈CDR1之第九胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之M)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，重鏈CDR2之第三胺基酸殘基(亦即，WINTYTGEPTYAADFQR (SEQ ID NO. 18)中之N)攜帶以下化學修飾中之一或多者：乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且重鏈CDR1之最後一個胺基酸殘基(亦即，GYDFTHYGMN (SEQ ID NO. 20)中之N)未乙醯化；及(2)輕鏈CDR1之第八及第十一胺基酸殘基(亦即，SASQDISNYLN (SEQ ID NO. 14)中之兩個N)各自攜帶以下化學修飾中之一或多者：氧化、乙醯化、脫醯胺化及焦麩胺酸化(pyro Glu)，且輕鏈CDR3之第二胺基酸殘基(亦即，QQYSTVPWTF (SEQ ID NO. 16)中之第二Q)未乙醯化。本文提供之抗VEGF抗原結合片段及轉殖基因可用於本文中所描述之根據本發明之任何方法中。在一較佳實施例中，本文中

所描述之化學修飾或沒有化學修飾(視具體情況而定)係藉由質譜分析來判定。

表2：例示性轉殖基因序列

VEGF抗原結合片斷(SEQ ID NO.)	序列
貝伐單抗cDNA (輕鏈) (10)	gtatgcgcca ccatgggctg gtctgcac atctgttcc tggggccac cggaccggc gtgactccg acatccagat gaccagtc cctctctcc tgcgcctc cgtggggcag cgggtgacca tcaactgctc cgctcccag gacatctca actacctgaa ctggtaccag cagaagcccc gcaaggcccc caaggtgctg atctactca cctctcct gactccggc gtgcctccc ggttctcgg ctccggctcc ggcaccgact taccctgac catctctcc ctgcagccc aggacttgc cactactac tgcagcagt actccaccgt gcctggacc ttggccagg gcaccaagt ggagatcaag cggaccgtg cgcctccc cgtgttcat tccccccc ccgacgaca gtgaagtcc ggcaccgct cgtgggtg cctgtgaac aacttctac cccgggagc caaggtgac tggaggtgg acaacgccc gactccggc aactcccagg agtccgtgac cgagcaggac tcaaggact ccactactc cctgtctcc accctgacc tgcacaagg cgactacgag aagcacaagg ttagcctg cgagtgacc caccaggccc tctctccc cgtgaccaag tcttcaacc gggcgagtg ctgagcgcc gcctcgag
貝伐單抗cDNA (重鏈) (11)	gtatgcgcca ccatgggctg gtctgcac atctgttcc tggggccac cggaccggc gtgactccg aggtgcagc ggtggagtc ggcggcgccc tggcgacc cggcggtcc ctgcggctg cctgcggcc ctccggctac accttcacca actacggcat gaactgggtg cggcaggccc cggcaaggg cctggagtgg gtgggtgga tcaacacca caccggcgag cccactacg ccgcgactt caagcggcgg ttaccttct cctggacac ctcaaagtc accgcctacc tgcagatgaa ctccctgcgg gccgaggaca ccgcgtgta ctactgcgc aagtacccc actactacg ctctccca tggacttgc agtgtgggg ccaggggacc ctgtgaccg tctctccg ctccacca ggcctccc tgttcccc ggcctccc tcaagtcca cctccggcg caccgcgc ctgggtgccc tggtagga ctactccc gagccctga cctgtctg gaactccgc gcctgacct cggcggtg cacttccc gcctgtgc agtctccg cctgtactc ctgtctcc tggtagcgt cctctccc tccctggga cccagacca catctgcaac gtgaaccaca agcctcca cacaaggtg gacaagaagg tggagccaa gtctgcgc aagaccaca cctgcccc ctgcccc ccgagctgc tggcgggccc ctccgtgtc ctgtcccc ccaagccaa ggacacctg atgactccc ggaccccc gaagtacctg gtgggtgg acgtgcca cgaggaccc gagtgagt tcaactgta cgtggacggc gtggagtg acaacgcca gaccaagccc cgggaggagc agtacaact cactaccg gtgtgtcc tctgacct gctgaccag gactggctga acgcaagga gtacaagt aaggttcca acaaggcct gcccgcctc atcgagaaga cacttcca ggcaagggc cagccccgg agccccagt gtacacctg cccccccc gggaggagat gaccaaga caggtgtccc tgacctgct ggtgaaggc ttctacct cagacatgc cgtggagtgg gactcaac gccagccga gaacaact aagaccacc ccccctgt ggactcgc gctcctct tctgtact caagtgacc gtggacaagt cccgtggga gcagggaac gtgttctc gctcgtgt gacagggc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg tctgtccc cggcaagt agcgccgc
貝伐單抗Fab胺基 酸序列(輕鏈) (3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT E QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
貝伐單抗Fab胺基 酸序列(重鏈) (4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN TYT GEPTYAADFKRRFTFSLDSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHW YF DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW N SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
蘭比珠單抗cDNA (包含信號序列之 輕鏈) (12)	gagtcacat gagtttttca aaaagacggc actgcccga ctggttatgg gttttagtgg tgcagcattg gccgatacc agctgaccca gaccccgagc agcctgagcg caagcgttgg tgategtgtt accattacct gtacgcgaag ccaggatatt agcaattatc tgaattgta tcagcagaaa cggggtaaag caccgaaagt tctgatttat ttaccagca gctgcatag cgtgttccg agccgttita gcgtagcgg tagtggcacc gattttacc tgaccattag cagcctgag ccggaagatt ttgcaaccta ttattgtag cagtatagca cgttccgtg gaccttggc cagggacca aagttgaat taaactgacc gttgcagcac cgagcgtttt ttttttccg cctagtgtat aacagctgaa aagcggcacc gcaagcgtt

VEGF抗原結合片斷(SEQ ID NO.)	序列
	tttgtctgct gaataatttt tatccgcgtg aagcaaaagt gcagtggaaa gttgataatg cactgcagag cggtaatagc caagaaagcg ttaccgaaca ggatagcaaa gatagcacct atagcctgag cagcacccctg accctgagca aagcagatta tgaaaaacac aaagtgtatg cctgcgaagt taccatcag ggctctgagca gtccgggttac caaaagtttt aatcgtggcg aatgctaata gaagcttggt acc
蘭比珠單抗cDNA (包含信號序列之重鏈) (13)	gagctcatat gaaataacctg ctgccgaccg ctgctgtctgg tctgctgctc ctgctgccc agccggcgat ggccgaagtt cagctgggtg aaagcgggtg tggctcgtt cagcctgggt gtagcctgctg tctgagctgt gcagcaagcg gttatgatt taccattat ggtatgaatt gggttcgtca ggcaccgggt aaaggtctgg aatgggttgg ttggattaat acctataccg gtgaaccgac ctatctgagca gattttaaac gtcgttttac ctttagcctg gataccagca aaagcaccgc atatctgcag atgaatagcc tgcgtgcaga agataccgca gtttattatt gtgccaaata tccgtattac tatggcacca gccactggta ttctgatgt tggggtcagg gcacctggt taccgttagc agcgcaagca ccaaaggtcc gagcgttttt ccgctggcac cgagcagcaa aagtaccagc ggtggcacag cagcactggg ttgtctggtt aaagattatt ttccggaacc ggttaccgtg agctggaata gcggtgcact gaccagcgtt gttcatacct ttccggcagt tctgcagagc agcggctgt atagcctgag cagcgttgtt accgttccga gcagcagcct gggcaccag acctatattt gtaatgtaa tcataaacg agcaatacca aatgggataa aaaagttgag ccgaaaagct gcgataaac ccattgttaa taggtacc
蘭比珠單抗Fab胺 基酸序列(輕鏈) (1)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT E QDSKDSTYSLSSLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
蘭比珠單抗Fab胺 基酸序列(重鏈) (2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN TYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTS HWF DVGWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW N SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTL
貝伐單抗輕鏈 CDR (14、15及16)	SASQDISNYLN FTSSLHS QQYSTVPWT
貝伐單抗重鏈 CDR (17、18及19)	GYTFTNYGMN WINTYTGEPTYAADFKR YPHYYGSSHWYFDV
蘭比珠單抗輕鏈 CDR (14、15及16)	SASQDISNYLN FTSSLHS QQYSTVPWT
蘭比珠單抗重鏈 CDR (20、18及21)	GYDFTHYGMN WINTYTGEPTYAADFKR YPYYYGTSHWYFDV

4.4.9 載體之製造及測試

【0359】 本文所提供之病毒載體可使用宿主細胞製造。本文所提供之病毒載體可使用哺乳動物宿主細胞製造，例如A549、WEHI、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC 1、BSC 40、BMT 10、VERO、W138、HeLa、293、Saos、C2C12、L、HT1080、HepG2、初

級纖維母細胞、肝細胞及肌母細胞。本文所提供之病毒載體可使用來自人類、猴、小鼠、大鼠、兔或倉鼠之宿主細胞來製造。

【0360】 宿主細胞藉由編碼轉殖基因及相關元件(亦即，載體基因體)之序列及在宿主細胞中產生病毒之方式，例如複製及衣殼基因(例如AAV之rep及cap基因)穩定地轉化。關於產生具有AAV8衣殼之重組AAV載體的方法，參見美國專利第7,282,199 B2號之具體實施方式的章節IV，其以全文引用之方式併入本文中。該等載體之基因體複本效價可例如藉由TAQMAN®分析來測定。病毒粒子可例如藉由CsCl₂沈降來回收。

【0361】 活體外分析(例如細胞培養分析法)可用於量測本文所描述之載體之轉殖基因表現，因此指示例如載體之效能。舉例而言，PER.C6®細胞株(Lonza)，一種來源於人類胚胎視網膜細胞或視網膜色素上皮細胞之細胞株，例如視網膜色素上皮細胞株hTERT RPE-1 (可獲自ATCC®)，可用於評定轉殖基因表現。一旦表現，即可判定所表現產物(亦即HuGlyFabVEGF_i)之特徵，包括判定與HuGlyFabVEGF_i相關之糖基化及酪胺酸硫酸化模式。糖基化模式及判定其之方法論述於章節5.1.1中，而酪胺酸硫酸化模式及判定其之方法論述於章節5.1.2中。另外，由細胞表現之HuGlyFabVEGF_i之糖基化/硫酸化所產生之益處可使用此項技術中已知之分析，例如章節5.1.1及5.1.2中所描述之方法來判定。

4.4.10 目標患者群體

【0362】 根據本文所描述之方法治療之個體可為任何哺乳動物，諸如啮齒動物；家畜，諸如狗或貓；或靈長類，例如非人類靈長類動物。在一較佳實施例中，個體為人類。在某些實施例中，本文提供之方法係用於向經診斷患有眼部疾病之患者投與，特定而言由新血管生成增加引起之眼

部疾病。在某些實施例中，本文所提供之方法係用於向經診斷患有nAMD (濕性AMD)、乾性AMD、視網膜靜脈阻塞(RVO)、糖尿病性黃斑水腫(DME)或糖尿病性視網膜病變(DR)之患者投與。

4.4.11 取樣及監測功效

【0363】 本文提供之方法對視覺缺損之效果可藉由BCVA (最佳矯正視力)、眼內壓、裂隙燈活組織檢視法及/或間接檢眼鏡檢查法來量測。可使用早期治療糖尿病性視網膜病變研究(Early Treatment Diabetic Retinopathy Study ; ETDRS)評分來監測BCVA。

【0364】 本文提供之治療方法對眼睛/視網膜之物理變化的效果可藉由SD-OCT (SD-光同調斷層掃描)來量測。

【0365】 可如藉由視網膜電圖描記(ERG)量測來監測功效。

【0366】 本文提供之治療方法之效果可藉由量測視力喪失、感染、炎症及其他安全事件(視網膜脫落)之跡象來監測。

【0367】 可監測視網膜厚度(例如中心視網膜厚度)或視窩厚度以測定本文提供之治療之功效。在不受任何特定理論束縛的情況下，可將視網膜厚度用作臨床讀數，其中視網膜厚度之減小愈大或視網膜增厚之前的時間愈長，則治療愈有效。視網膜功能可例如藉由ERG來測定。ERG為經FDA批准用於人類之視網膜功能的非侵入性電生理測試，其檢查眼睛之感光細胞(視桿及視錐)及其連接之神經節細胞，特定言之其對閃光刺激之反應。視網膜厚度及/或視窩厚度可例如藉由SD-OCT來測定。SD-OCT為一種三維成像技術，其使用低同調干涉術來測定回波時間延遲及自所關注物體反射之反向散射光的量值。OCT可用於以3至15 μm 軸向解析度掃描組織樣品(例如視網膜)之層，且SD-OCT與以前的技術形式相比提高軸向解析

度及掃描速度(Schuman, 2008, Trans. Am. Opthamol. Soc. 106:426-458)。

【0368】可藉由此項技術中已知之任何適合的方法，例如藉由ELISA或西方墨點，來量測水狀液中之轉殖基因產物濃度。

【0369】可藉由此項技術中已知之任何適合的方法，來評估載體轉殖基因自脫落(釋放並不感染目標細胞且經由糞便或體液自體內清除之載體)、行動(轉殖基因複製且轉移至目標細胞外)或生殖細胞系傳遞(經由精液遺傳傳遞至後代)而擴散至非預期接受者的可能。舉例而言，可藉由量測載體DNA之定量聚合酶鏈反應，來分析生物流體(例如尿液、淚液或血清)中之載體脫落。在一些實施例中，在投與載體之後任何時間點在生物流體(例如尿液、淚液或血清)中未偵測到載體基因複本。在一些實施例中，在投與載體之後14週，在血清中可偵測到小於210個基因複本/5 μ L。

【0370】可監測抗VEGF注射(例如蘭比珠單抗注射或阿柏西普注射)之數目以測定本文提供之治療之功效及持續時間。在一些實施例中，與標準護理相比，在一定時間量(例如一個月)內根據本文中所描述之方法治療個體所需之抗VEGF注射之量降低10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%或大於90%。在一些實施例中，與在根據本文中所描述之方法開始治療之前個體所需之抗VEGF注射之量相比，在一定時間量(例如一個月)內根據本文中所描述之方法治療同一個體所需之抗VEGF注射之量降低10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%、80-90%或大於90%。可監測新的視網膜色素沉著之發生率及新的地圖狀萎縮之發生率來評定本文中所描述之治療的安全性。

表3：序列表

SEQ ID NO:	描述	序列
1	蘭比珠單抗 Fab 胺基酸序列(輕鏈)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
2	蘭比珠單抗 Fab 胺基酸序列(重鏈)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYG TSHWYF DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
3	貝伐單抗 Fab 胺基酸序列 (輕鏈)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4	貝伐單抗 Fab 胺基酸序列 (重鏈)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYG SSHWYF DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHL
5	VEGF-A 信號肽	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA
6	Fibulin-1 信號肽	MERAAPSRRV PLPLLLGGL ALLAAGVDA
7	玻連蛋白 信號肽	MAPLRPLLIL ALLAWVALA
8	補體因子 H 信號肽	MRLLAKIICMLWAICVA
9	視力蛋白 信號肽	MRLLAFLSLL ALVLQETGT
10	貝伐單抗 cDNA (輕鏈)	gtatgcgccca ccatgggctg gtctgcac atctgttcc tggtgccac cgcaccggc gtgcactccg acatccagat gaccagtc cctctctcc tgcgcctc cgtggcgac cgggtgacca tcactgtc cgctccag gacatctca actactgaa ctggtaccag cagaagccc gcaaggccc caagtgctg atctactca cctctcct gactccgg gtgcctccc ggttctcgg ctccgctcc ggcaccgact tcacctgac catctctc ctgcagccc aggactcgc cactactac tgcagcagt actccactg gcctggacc ttcggcagg gcaccaaggt ggagatcaag cggaccgtg cgcgccctc cgtgtcatc ttccccct cgcagagca gctgaagtc ggcaccgct cgtggtgtg cctgtgaac aactctacc ccggggaggc caaggtgcag tgaaggtgg acaacgccct gcagtcggc aactcccagg agtcctgac cgagcaggac tcaaggact caactactc ctgtctcc accctgacc tgcgaagg cgactacgag aagcacaagg tgtacgctg cgagtgacc caccagggcc tgcctcccc cgtgaccaag tcttcaacc ggggcgagtg ctgagcgcc gcctcgag
11	貝伐單抗	gtatgcgccca ccatgggctg gtctgcac atctgttcc tggtgccac cgcaccggc gtgcactccg aggtgcagct ggtggagtc ggcggcgcc tggtcagcc cggcggtcc ctgcgctgt cctgcgccg

SEQ ID NO:	描述	序列
	cDNA (重鏈)	ctceggctac accttcacca actacggcat gaactgggtg cggcaggccc ccggcaaggg cctggagtgg gtgggctgga tcaacaceta caccggcgag cccacctacg ccgccgactt caagcggcgg ttcaccttct ccctggacac ctccaagtc accgcctacc tgcagatgaa ctccctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgc aagtaccccc actactacgg ctctcccaac tggctactcg acgtgtgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtctccgc ctccaccaag ggccccctcg tgttccccct ggccccctcc tccaagtcca cctccggcgg caccgcgcgc ctgggctgcc tggngaagga ctacttccc gagcccgta ccgtgtctg gaactccggc gccctgacct ccggcgtgca cacctcccc gccgtgtgc agtctccgg cctgtactcc ctgtctccg tggtgaccgt gccctctctc tcctgggca ccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccccaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gtcctgcgac aagaccacaca cctgcccccc ctgccccgc ccgagctgc tgggcggccc ctccgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgactccc ggacccccga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgaagt tcaactgta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc cgggaggagc agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tctgacctg cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtgtcca acaaggccct gccgcccc atcgagaaga ccattccaa ggccaagggc cagccccggg agccccaggt gtacacctg cccccctcc gggaggagat gaccaagaac caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctaccct ccgacatgc cgtggagtgg gagtccaac gccagcccc gaacaactac aagaccacc cccccgtgt ggactccgac ggtccttct tctgtactc caagctgacc gtggacaagt cccggtggca gcagggaac gtgttctct gctcgtgat gcacgagggc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg tcctgtccc ccggcaagtg agcggccgcc
12	蘭比珠單抗 cDNA (包含信號序列之輕鏈)	gagctccatg gagttttca aaaagacggc acttgcgcga ctggttatgg gtttagtgg tgcagattg gccgatatcc agctgaccca gagccccgagc agcctgagcg caagcgttgg tgatcgtgtt accattacct gtagcgcaag ccaggatatt agcaattatc tgaattgta tcagcagaaa ccgggtaaag caccgaaagt tctgatttat ttaccagca gccctgcatag cgggtgtccg agccgtttta gcggtagcgg tagtggcacc gattttaccc tgaccattag cagcctgcag ccggaagatt ttgcaaccta ttattgtcag cagtatagca ccgttccgtg gacctttggt cagggcacca aagttgaaat taaacgtacc gttgcagcac cgagcgtttt tattttccg cctagtatg aacagctgaa aagcggcacc gcaagcgttg tttgtctgt gaataatit tatccgctg aagcaaaagt gcagtggaaa gttgataatg cactgcagag ccgtaatagc caagaagcg ttaccgaaca ggatagcaaa gatagcacct atagcctgag cagcacctg accctgagca aagcagatta tgaaaaacac aaagtgtatg cctgcgaagt taccatcag ggtctgagca gtccgggtac caaaagtitt aatcgtggcg aatgctaata gaagcttggg acc
13	蘭比珠單抗 cDNA (包含信號序列之重鏈)	gagctcatat gaaatactg ctgccgaccg ctgctgctgg tctgtgtctc ctgctgccc agccggcgat ggccgaagtt cagctggtg aaagcgggtg tggctgtgtt cagcctggtg gtacgctgcg tctgagctgt gcagcaagcg gttatgattt taccattat ggtatgaatt gggttcgtca ggcaccgggt aaaggctcgg aatgggttgg ttggattaat acctataccg gtgaaccgac ctatgcagca gattttaaac gtcgttttac cttagcctg gataccagca aaagcacgcg atatctgcag atgaatagcc tgcgtgcaga agataccgca gtttattatt gtgccaataa tccgtattac tatggacca gccactggtg ttctgatgtt tgggtcagg gcacctggt taccgttagc agcgcaagca ccaaaggtec gagcgtttt ccgctggcac cgagcagcaa aagtaccagc ggtggcacag cagcactggg ttgtctggtt aaagattatt ttccggaacc ggttaccgtg agctggaata gcggtgcact gaccagcggg gtacatacct ttccggcagt tctgcagagc agcggctctg atagcctgag cagcgttgtt accgttccga gcagcagcct gggcaccag acctatatt gtaattgtaa tcataaacg agcaatacca aagtggataa aaaagttgag ccgaaaagct gcgataaac ccactgttaa taggtacc
14	貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR1	SASQDISNYLN
15	貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR2	FTSSLHS
16	貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR3	QQYSTVPWT
17	貝伐單抗重鏈CDR1	GYTFTNYGMN
18	貝伐單抗及	WINTYTGEPTYAADFKR

SEQ ID NO:	描述	序列
	蘭比珠單抗重鏈CDR2	
19	貝伐單抗重鏈CDR3	YPHYYGSSHWYFDV
20	蘭比珠單抗重鏈CDR1	GYDFTHYGMN
21	蘭比珠單抗重鏈CDR3	YPYYYGTSHWYFDV
22	白蛋白信號肽	MKWVTFISLLFLFSSAYS
23	胰凝乳蛋白酶原信號肽	MAFLWLLSCWALLGTTFG
24	介白素-2信號肽	MYRMQLLSICIALILALVTNS
25	胰蛋白酶原-2信號肽	MNLLLILTFVAAAVA
26	F2A位點	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
27	T2A位點	(GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP
28	P2A位點	(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP
29	E2A位點	(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP
30	F2A位點	(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
31	Furin連接子	RKRR
32	Furin連接子	RRRR
33	Furin連接子	RRKR
34	Furin連接子	RKKR
35	Furin連接子	R-X-K/R-R
36	Furin連接子	RXKR
37	Furin連接子	RXRR
38	蘭比珠單抗Fab胺基酸序列(輕鏈)	MDIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
39	蘭比珠單抗Fab胺基酸序列(重鏈)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHLRKRR
40	蘭比珠單抗Fab胺基酸序列(重鏈)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
41	AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNH ADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATP AAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDVRVITT

SEQ ID NO:	描述	序列
		STRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHF SPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQ VFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSS FYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYL YYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDEDKFFPMSGVM IFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPA TGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGL KNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
42	AAV2	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLP YKYLGPFGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHAD AEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEPVKTA PGKKRVE HSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSG LGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTR TWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRD WQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL EYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLS RTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNN NSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQ GSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADV NTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPP QILIKNTPVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN PEIQYTSNYNKS VNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
43	AAV3-3	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREW WALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLP GYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNH ADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGA VDQSPQEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAAPT SLGSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGD RVITTST RTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPR DWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVRGVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFT DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFY CLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLY YLNRTQGTTS GTTNQSRLLFSQAGPQSM SLQARNWLPGPCYRQQRLSKT ANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPMHGN LIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTTPVATEQYGTVANNLQSSNTAP TTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGL KHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
44	AAV4-4	MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLP GYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNH ADAEFQQLRQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEAQAGETAPGKKR PLIESPQQPDSSSTGIGKKGKQPAKKLVFEDETGA GDGPPEGSTSGAMSDD SEMRAAAGGA AVEGGQGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTW VLPTYNNHLYKRLGESLQSN TYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLI NNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSSYEL PYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRNAFYCLE YFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHSMY AHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQ STTTGTTLNAGTATTNFTKL RPTNFSNFKKNWLPGPSIKQQGF SKTANQN YKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKFSNSQLIFA GPKQNGNTATVPGTLIFTSEEEL AATNATDTDMWGNLPGGDQSNSNLPTV DRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLIGGFGLKHP PPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQERSKRW NPEVQFTSNY GQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL
45	AAV5	MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLP GYNYLGPFGNGLDRGEPVNRAD E VAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADA E FQEKLADDT SFGGNL GKAVFQAKKRVLLEPFG LVEEGAKTAPTGKRIDDH F PKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGG

SEQ ID NO:	描述	序列
		GPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSSYNNH QYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNY WGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDDYQLPYV VGNNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKM LRTGNNFEFTYNFEEVPHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGG VQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSATATTNR MELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYL EGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIIVPG SVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTP VPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTN YNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL
46	AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNH ADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPATP AAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTT STRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHF SPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIANNLTSTVQ VFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSS FYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYL YYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSAPGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDKFFPMMSGVM IFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPA TGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGL KHPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
47	AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNDRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNH ADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKR PVEPSQSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAA PSSVSGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVTT STRTWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHF SPRDWQRLINNNWGRPKLRFLFKLFNIQVKEVTNTDGVTTIANNLTSTIQV FSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQSVGRSSFY CLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYL LARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNWLPGPCFRQQRVSKTL DQNNNSNFAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDERFFPSSGVLI FGKTGATNKTTLNVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGIVSSNLQAANTAAQT QVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLK HPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS RWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL
48	AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLP GYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNH ADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKR PVEPSQSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAA PSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVTT STRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHC HFSPRDWQRLINNNWGRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTI QVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQY LYYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVST TTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDERFFPSNGI LIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTA PQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFG LKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN SKRWNPEIQYTSNYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
49	hu31	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLP YKYLGPNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRP

SEQ ID NO:	描述	序列
		VEQSPQEPDSSAGIGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPS GVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTST RTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQ VFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGGQAVGRSS FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYL YYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVT QNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFG KQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQQVATNHQSAQAQAQT GWVQNNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMK HPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS RWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVSTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
50	hu32	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP YKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHA DAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR VEQSPQEPDSSAGIGKSGSQPAKKKLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPS GVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTST RTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQ VFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSAVGRSS FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYL YYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVT QNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFG KQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQQVATNHQSAQAQAQT GWVQNNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMK HPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS RWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTGEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
51	AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLP GYKYLPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNH ADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKR PVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPS GVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTST RTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQ VFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSAVGRSS FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYL YYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVT QNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFG KQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQQVATNHQSAQAQAQT GWVQNNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMK HPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS RWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTGEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
52	突變型介白素-2信號肽	MYRMQLLLLIALLALVTNS

4.5 分析

【0371】 熟練人員可使用如本文所描述之分析及/或此項技術中已知之技術來研究本文所描述之組合物及方法，例如用於測試本文提供之調配物。章節5中提供之實例亦更詳細地說明可如何使用此類分析來測試本文提供之調配物。

【0372】 如Li等人, 2019 Cell & Gene Therapy Insights, 5(4):537-

547 (其以全文引用之方式併入本文中)所描述，例示性分析包括但不限於以下：(1)數位液滴PCR (ddPCR)，其用於基因體複本測定；(2)藉由分光光度法進行對AAV之基因體含量及滿衣殼%分析；(3)尺寸排阻層析，用以測定DNA分佈及衣殼純度；(4)使用毛細電泳法評定衣殼病毒蛋白質純度；(5)活體外效能方法——相對感染性，作為用於量化活體外AAV載體之感染性之差異的可靠方法；及(6)分析性超速離心(AUC)，用以測定衣殼空/滿比率及大小分佈。

【0373】 另外，相關習知方法包括2019年公開之美國藥典(USP)及其前述版本(以全文引用之方式併入本文中)中提供之方法，例如 USP<791>用於pH量測，USP<785>用於滲透壓量測，USP<787>用於特定物質(雜質)量測，及USP<785>用於內毒素(安全性)量測，以及 USP<71>用於無菌性量測。

【0374】 如章節5中所詳述，本文亦提供以下分析。

4.5.1 冷凍/解凍循環分析

【0375】 可根據表12在凍乾器中運行受控冷凍/解凍循環。小瓶可在擱板上充分間隔開且可熱偶合4小瓶緩衝液。

4.5.2 溫度脅迫分析

【0376】 可在 1.0×10^{12} GC/mL下於37°C 進行溫度脅迫發展穩定性研究4天，以評估本文提供之調配物之相對穩定性。

【0377】 可用於評定穩定性之分析包括但不限於活體外相對效能(IVRP)、載體基因體濃度(VGC，藉由ddPCR)、游離DNA(藉由染料螢光)、動態光散射、外觀及pH。

4.5.3 長期穩定性分析

【0378】可進行長期發展穩定性研究12個月以顯示在-80℃($\leq$ -60℃)及-20℃(-25℃至-15℃)下在本文提供之調配物中活體外相對效能及其他品質的維持。

4.5.4 活體外相對效能(IVRP)分析

【0379】在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉此分析所測定之活體外相對效能。

【0380】為了使ddPCR GC效價與基因表現相關，可藉由轉導HEK293細胞及分析細胞培養物上清液之抗VEGF Fab蛋白質含量，來進行活體外生物分析。將HEK293細胞塗鋪至三個聚D-離胺酸塗覆之96孔組織培養盤上隔夜。隨後，細胞用野生型人類Ad5病毒預感染，之後用三個獨立製備的構築體II參考標準物及測試物之連續稀釋液來轉導，其中各製劑塗鋪在單獨培養盤不同位置。在轉導後第三天，自培養盤收集細胞培養基，且經由ELISA量測其VEGF結合Fab蛋白質含量。對於ELISA而言，塗覆有VEGF之96孔ELISA盤經阻斷，且隨後與所收集之細胞培養基一起培育，以捕獲HEK293細胞產生之抗VEGF Fab。使用Fab特異性抗人類IgG抗體來偵測捕獲VEGF之Fab蛋白質。在洗滌之後，添加辣根過氧化酶(HRP)受質溶液，使其發展，用終止緩衝液終止，且在讀盤器中閱讀培養盤。HRP產物之吸光度或OD相對於對數稀釋繪圖，且計算各測試物品相對於同一培養盤上之參考標準物之相對效能，用在經過平行度相似性測試後之四參數邏輯回歸模型擬合，使用式： $EC_{50} \text{ 參考物} \div EC_{50} \text{ 測試物品}$ 。報導測試物品之效能為參考標準物效能之百分比，由三個培養盤之加權平均計算。

【0381】 為了使ddPCR GC效價與功能性基因表現相關，可藉由轉導HEK293細胞及分析轉殖基因(例如酶)活性來進行活體外生物分析。將HEK293細胞塗鋪至三個96孔組織培養盤上隔夜。隨後，細胞用野生型人類腺病毒血清型5病毒預感染，隨後用三個獨立製備之酶參考標準物及測試物品之連續稀釋液轉導，各製劑塗鋪至各別培養盤上之不同位置。在轉導後第二天，將細胞溶解，用低pH處理以使酶活化，且使用在轉殖基因(酶)裂解時產生增加螢光信號的肽受質來分析酶活性。螢光或RFU相對於對數稀釋繪圖，且計算各測試物品相對於同一培養盤上之參考標準物之相對效能，用經過平行度相似性測試後之四參數邏輯回歸模型擬合，使用式： $EC50_{\text{參考物}} \div EC50_{\text{測試物品}}$ 。報導測試物品之效能為參考標準物效能之百分比，由三個培養盤之加權平均計算。

【0382】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)一段時間之後本文提供之重組AAV之活體外效能為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)該時間段之前重組AAV之活體外效能的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.5 載體基因體濃度分析

【0383】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指藉由此分析所測定之載體基因體濃度。亦可使用ddPCR來評估載體基因體濃度

GC。在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)一段時間之後本文提供之重組AAV之載體基因體濃度為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)該時間段之前重組AAV之載體基因體濃度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，該時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.6 使用染料螢光分析進行之游離DNA分析

【0384】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之游離DNA之量。

【0385】 可藉由與DNA結合之SYBR® Gold核酸凝膠染色劑 (『SYBR金染料』)之螢光來測定游離DNA。螢光可使用微量盤讀取器來量測且用DNA標準物進行定量。結果可以 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 為單位報導。

【0386】 可使用兩種方法來估計總DNA，以便將以 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 為單位之所量測之游離DNA轉化為游離DNA之百分比。在第一種方法中，藉由UV可見光光譜分析測定之GC/mL (OD)用於估計樣品中之總DNA，其中M為DNA之分子量且 1×10^6 為單位換算因子：

【0387】 所估計之總DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) = $1 \times 10^6 \times \text{GC/mL (OD)} \times M$ (g/mol)/ 6.02×10^{23}

【0388】 在第二種方法中，可將樣品與0.05%泊洛沙姆188一起加熱至 85°C 持續20 min，且藉由SYBR金染料分析量測之加熱樣品中之所量測

實際DNA可用作總DNA。因此，此具有假設，回收所有DNA且進行定量。舉例而言，藉由SYBR金染料(相對於UV讀數)測定之總DNA可為131% (對於構築體II dPBS調配物)及152% (對於具有蔗糖之構築體II改良dPBS調配物) (ng/ μ L轉化為游離DNA之百分比之此變化可捕獲為所報導結果中的一範圍)。對於趨勢而言，可使用原始ng/ μ L或可使用藉由一貫方法所測定之百分比。

【0389】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後本文提供之組合物中之游離DNA之量，與在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前該組合物中之游離DNA之量至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.7 尺寸排阻層析(SEC)

【0390】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之粒度分佈。

【0391】 SEC可使用具有25 mm路徑長度流槽之Waters Acquity Arc Equipment ID 0447 (C3PO)上之Sepax SRT SEC-1000 Peek管柱(PN 215950P-4630，SN：8A11982，LN：BT090，5 μm 1000A，4.6 $\times$ 300mm)來進行。移動相可例如為20 mM磷酸鈉、300 mM NaCl、0.005%泊洛沙姆188，pH 6.5，其中0.35毫升/分鐘之流速持續20分鐘，其

中管柱在環境溫度下。可用2點/秒取樣速率進行資料收集，且25點之1.2 nm解析度意謂在214、260及280 nm下平滑。理想目標負載可為1.5¹¹ GC。可注射50 μL樣品，約1/3之理想目標或注射5 μL樣品。

【0392】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後本文提供之重組AAV之粒度分佈(如藉由SEC所測定)，與在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之粒度分佈(如藉由SEC所測定)至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.8 動態光散射(DLS)分析

【0393】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之粒度分佈。

【0394】 可在Wyatt DynaProIII上，使用Corning 3540 384孔盤來進行動態光散射(DLS)，其中樣品體積為30 μL。可每重複各自收集十個採集持續10 s，且對每樣品進行三個重複量測。可根據樣品中使用之溶劑設定溶劑，例如對於含構築體II之dPBS為『PBS』，及對於含構築體II之具有蔗糖樣品之改良dPBS為『4%蔗糖』。可『標記』不滿足資料質量標準(基線、SOS、雜訊、擬合)之結果且排除在分析外。對於具有蔗糖樣品之改良dPBS，低延遲時間截留可自1.4 μs改變為10 μs，以消除在約1 nm處

之蔗糖賦形劑峰對於引起人工低累積量分析直徑結果之影響。

【0395】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後本文提供之重組AAV之粒度分佈(如藉由DLS所測定)，與在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之粒度分佈(如藉由DLS所測定)至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.9 差示掃描熱量法

【0396】 可使用TA Instruments DSC250運行低溫差示掃描熱量法(低溫DSC)。可將約20 μL 樣品負載至Tzero盤中且用Tzero密封蓋旋緊。可將樣品在 25°C 平衡2 min，隨後以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 冷卻至 -60°C ，平衡2 min，隨後以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 加熱至 25°C 。可以習知模式收集熱流資料。

4.5.10 即時緩衝液pH追蹤

【0397】 用可偵測低至 -30°C 之pH之INLAB COOL PRO-ISM低溫pH探針，監測不同調配物緩衝液之pH。將一毫升緩衝液置於15 mL Falcon管中，且隨後將pH探針浸沒於緩衝液中。使用一片封口膜來密封Falcon管與pH探針之間的間隙以避免污染及蒸發。將探針以及Falcon管置於 -20°C AD冰箱中。每2.5 min記錄緩衝液之pH及溫度，持續約20小時或直至pH與溫度行為達成重複模式為止。由自動除霜過程引起之溫度變化為緩衝液pH穩定性創造脅迫條件。

4.5.11 滲透壓

【0398】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之滲透壓。

【0399】 滲透計使用冰點降低之技術來量測滲透壓。可使用50 mOsm/kg、850 mOsm/kg及2000 mOsm/kg NIST可追蹤的標準物來進行儀器校準。290 mOsm/kg之參考溶液可用於測定滲透計之系統適用性。

【0400】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後重組AAV之滲透壓，為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之滲透壓的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.12 密度量測

【0401】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之密度。

【0402】 可用Anton Paar DMA500密度計，使用水作為參考物來量測密度。密度計可用水洗滌且隨後用甲醇洗滌，隨後在樣品間風乾。

【0403】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後重組

AAV之密度，為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之密度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.13 黏度量測

【0404】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之黏度。

【0405】 可使用此項技術中已知之方法，例如2019年公開之《美國藥典》(USP)及其先前版本(以全文引用之方式併入本文中)中提供之方法，來量測黏度。

【0406】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後重組AAV之黏度，為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之黏度的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.14 病毒感染性分析

【0407】 在各種實施例中，本文所提供之組合物比參考醫藥組合物

更穩定，如藉由以下分析所測定。穩定性之百分比或倍數差異係指如藉由此分析所測定之病毒感染性。

【0408】可使用如François等人 Molecular Therapy Methods & Clinical Development (2018) 第10卷, 第223-236頁(以全文引用之方式併入本文中)中所描述之TCID₅₀感染性效價分析。可使用如2018年10月15日申請之臨時申請案62/745859中所描述之相對感染性分析。

【0409】在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之後重組AAV之病毒感染性，為在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之病毒感染性的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

4.5.15 結晶及玻璃化轉變溫度

【0410】例示性方法描述於Croyle等人, 2001, Gene Ther. 8(17):1281-90 (以全文引用之方式併入本文中)中。

4.5.16 參考組合物

【0411】可藉由將組合物與參考醫藥組合物進行比較來評估本文所提供之組合物之穩定性。在一些實施例中，參考醫藥組合物為包含濃度與在磷酸鹽緩衝鹽水中評估之組合物相同之相同重組AAV的醫藥組合物。在一些實施例中，參考醫藥組合物為包含濃度與所評估之組合物相同之相同重組AAV的醫藥組合物，但不包含蔗糖。在一些實施例中，參考醫藥組合

物為與在組合物已儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下6-12個月之前所評估之組合物相同的組合物。在一些實施例中，參考醫藥組合物為與在組合物已儲存在 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下1-6個月之前所評估之組合物相同的組合物。在一些實施例中，參考醫藥組合物為與在組合物已儲存在約 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下6-12個月且隨後儲存在 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下1-6個月之前所評估之組合物相同的組合物。

【0412】 在一些實施例中，在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下一段時間之重組AAV之既定特性(例如藉由在此章節，亦即章節4.5中所描述之分析來測定之特性)，與在儲存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (例如約 -80°C)下、 -30°C 至 -15°C (例如約 -20°C)下或 2°C 至 10°C (例如約 4°C)下該時間段之前重組AAV之特性(如藉由相同分析測定)至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致。在一些實施例中，時間段為約1個月、約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

5. 實例

【0413】 此章節(亦即章節5)中之實例作為說明而非作為限制提供。

5.1 實例1：調配物A及調配物B中之組分

【0414】 此實例顯示儲存在 -60°C 之調配物A (具有0.001%泊洛沙姆188之杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水，pH 7.4)及儲存在 -15°C 與 -25°C 之間的調配物B (『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水，pH7.4』)中的組分。兩種調配物之比較及影響分析提供於表4中。調配物B具有改良的儲存可行性，而對於在儲存1年之後迄今為止所

觀測到之AAV產物無影響。

表4：調配物A及B.

處理位置/階段	調配物A	調配物B
調配物緩衝液	具有0.001%泊洛沙姆188之DPBS，pH 7.4. 組成： 0.2 mg/mL氯化鉀，0.2 mg/mL磷酸二氫鉀，8.1 mg/mL氯化鈉，1.15 mg/mL無水磷酸氫二鈉，0.001% (0.01 mg/mL)泊洛沙姆188，pH 7.4	『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4.』 『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4.』調配物具有4% w/v之蔗糖及更低氯化鈉量(自137 mM降低至100 mM)以補償滲性。其他調配物賦形劑及含量一致。 組成：0.2 mg/mL氯化鉀，0.2 mg/mL磷酸二氫鉀，5.84 mg/mL氯化鈉，1.15 mg/mL無水磷酸氫二鈉，40.0 mg/mL (4% w/v)蔗糖，0.001% (0.01 mg/mL)泊洛沙姆188，pH 7.4
FDP儲存溫度	≤ -60℃	-15℃至- 25℃

【0415】 調配物B (具有蔗糖之改良DPBS)包括0.2 mg/mL氯化鉀、0.2 mg/mL磷酸二氫鉀、5.84 mg/mL氯化鈉、1.15 mg/mL無水磷酸氫二鈉、40.0 mg/mL (4% w/v)蔗糖、0.001% (0.01 mg/mL)泊洛沙姆188，pH 7.4 (表5)。以莫耳為單位，調配物B包括2.70 mM氯化鉀、1.47 mM磷酸二氫鉀、100 mM氯化鈉、8.1 mM無水磷酸氫二鈉、117 mM蔗糖、0.001% (0.01 mg/mL)泊洛沙姆188，pH 7.4。調配物B之密度可為1.0188 g/mL；調配物B之滲透壓可大致為345 (331-354)。

表5：作為活性醫藥成分(ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT；API)之具有構築體II之調配物B

成分	功能	品質標準	濃度 (mg/mL)	濃度 (mM或)	質量分 率(g/kg) ^b	供應商及 料號	化學式	分子量 (g/mol)
構築 體II	API	內部	基於劑量 水準而變 化	-	-	-	-	-
氯化 鈉	緩衝劑	USP, Ph.Eur, BP, JPE	5.84	100 mM	5.736	Avantor , 3627	NaCl	58.440
氯化 鉀		USP, BP, Ph.Eur, JPE	0.201	2.70 mM	0.198	Avantor , 3045	KCl	74.5513
無水 磷酸 氫二 鈉		USP, Ph.Eur, JPE	1.15	8.10 mM	1.129	Avantor , 3804	Na ₂ HPO ₄	141.960
磷酸 二氫 鉀		NF, BP, Ph.Eur	0.200	1.47 mM	0.196	Avantor , 3248	KH ₂ PO ₄	136.086
蔗糖	低溫保 護劑	USP, NF, Ph.Eur, BP, JPE	40.0	117 mM	39.26	Pfanstiehl , S-124-2- MC	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3
泊洛 沙姆 188	界面 活性 劑 ^a	NF, Ph.Eur, JPE	0.010	0.001%	0.1 mL/kg之 10%儲備 液	BASF , 50424596	HO(C ₃ H ₆ O) _a (C ₂ H ₄ O) _b (C ₃ H ₆ O) _a H	7680至 9510
水	水性 媒劑	WFI	大致971 mg/mL	大致 54 M	QS至1 kg (需要 大致953 g/kg)	變化	H ₂ O	18.0153

a. 添加0.1 mL/L = 0.1 mL/kg之10%儲備液P188。可使用來自Spectrum之NF級Pluronic® F-68 (泊洛沙姆188)及來自BASF之Kolliphor® P188 BIO。

b. 1 kg溶液之體積大致為982 mL (1 kg/1.0188 kg/L = 982 mL)

5.2 實例2：調配物A及調配物B在合格特徵方面之比較

【0416】 此實例顯示調配物A及調配物B在合格特徵方面之比較。

5.2.1 合格及表徵分析方法及規格

【0417】 此章節顯示一批含最終藥物產品(FDP)之調配物A及一批含FDP之新『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』(調

配物B)之分析憑證之批次合格結果的比較。除合格測試之外，可比較動態光散射(DLS)之常規特徵測試結果。支援可比較性之所提議測試之組及支援可比較性之接受標準顯示於表6中。

表6：可用於進行FDP之分析比較之合格接受標準及表徵方法

測試	分析方法	接受標準
外觀	視覺檢查	無色透明至乳白色溶液，不含外來顆粒
pH	USP<791>	6.9 - 7.9
滲透壓	USP<785>	滿足批次合格規格。 ¹
載體基因體濃度(內容物)	轉殖基因ddPCR	滿足批次合格規格。 ²
載體基因體濃度(屬性)	轉殖基因ddPCR	確認為構築體II基因體
衣殼屬性(屬性)	ELISA	確認為AAV8血清型
活體外效能(效能)	HEK293轉導/抗VEGF ELISA	50-200%相對效能
病毒衣殼純度(純度)	SDS-CGE	≥90%純度(純度%：VP1、VP2及VP3之總和)
顆粒物質(雜質)	USP<787> HIAC	≤ 50個顆粒/毫升 (大小≥ 10 μm) ≤ 5個顆粒/毫升 (大小≥ 25 μm) ≤ 2個顆粒/毫升 (大小≥ 50 μm)
內毒素(安全性)	USP<85>	≤ 0.1 EU/mL (作用限制) ≤ 0.2 EU/mL
無菌性(安全性)	USP<71>	不生長
粒度分佈(純度)	動態光散射	主峰直徑與完整AAV相符

5.2.2 FDP調配物變化之背景

【0418】 開發『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』(調配物B)以改良長期冷凍儲存穩定性及FDP穩定性對於冷凍/解凍循環的穩固性。調配物變化涉及添加4% w/v之低溫保護賦形劑蔗糖及氯化鈉含量自137 mM降低至100 mM以維持適當滲性。其他調配物賦形劑及含量一致。藉由向含BDS之DPBS (調配物A)中添加更濃蔗糖摻入(spike)溶液以調整最終組合物之組成，來生成含FDP之『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』FDP調配物。

5.2.3 FDP調配方法變化之評定

【0419】對於兩種方法，摻入、混合及過濾步驟涉及類似方法步驟、處理及接觸表面。摻入方法引起稀釋1.37倍。隨後，接著稀釋至目標濃度。

5.2.4 FDP調配物變化對於臨床安全性及功效之影響之評定

【0420】當與DPBS調配物A相比時，FDP調配物B在安全性或功效方面可能無差異。產品品質概況及合格規格相同，除了一般屬性滲透壓以外。

【0421】對於DPBS調配物A，滲透壓為240-340 mOsm/kg；對於調配物B，滲透壓為295-395 mOsm/kg。此等係由於調整調配物B中之蔗糖及氯化鈉含量所致。基於文獻(參見例如Negi及Marmour, 1984 Invest Ophthalmol Vis Sci. 25(5):616-20)，此等略微較高滲透壓值對於泡之再吸收時間可能無影響。

5.2.5 自調配物A改變為調配物B對於分析合格方法之影響之評定

【0422】分析方法之評定指示，其符合目的。其程序之輕微改變可提供新FDP (表7)。

表7：新FDP組成對於分析合格方法之影響之評定

測試	分析方法	FDP變化之影響之評定
外觀	視覺檢查	無影響。預期新FDP調配物(調配物B)為無色透明至乳白色溶液，不含外來顆粒。
pH	USP<791>	無影響。新FDP調配物具有相同緩衝物種及含量。
滲透壓	USP<785>	無影響。對於新FDP，冰點降低方法得到預期結果。
載體基因體濃度(內容物)	轉殖基因ddPCR	無影響。對於新FDP，發展樣品達到目的且滿足分析適用性標準。
載體基因體濃度(屬性)	轉殖基因ddPCR	無影響。
衣殼屬性(屬性)	ELISA	預期無影響。
活體外效能(效)	HEK293轉導/抗VEGF ELISA	無影響。對於新FDP，發展樣品達到目的且滿足

測試	分析方法	FDP變化之影響之評定
能)		分析適用性標準。
病毒衣殼純度(純度)	SDS-CGE	預期無影響。
顆粒物質(雜質)	USP<787> HIAC	預期無影響。不透光度(Light obscuration)視溶液之透明度而定，新FDP類似。
內毒素(安全性)	USP<85>	無影響。對於新FDP，所測試樣品滿足分析適用性標準。
無菌性(安全性)	USP<71>	無影響。顯示新FDP緩衝液不抑制生長。
粒度分佈(純度)	動態光散射 (資料來自在合格或T0穩定性下進行之常規表徵測試)	在方法環境中，可調整溶液黏度之變化。發展資料顯示表觀大小略微增加(1至3 nm)，與蔗糖對於水合作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響相關。

5.3 實例3：調配物A及調配物B在穩定性方面之比較

【0423】 此實例顯示調配物A及調配物B在其穩定性方面之比較。

【0424】 新調配物B防止在冷凍/解凍循環及溫度脅迫後破壞衣殼及釋放少量游離DNA。目前12個月長期穩定性研究表明，在FDP調配物B中，在-80℃(≤ -60℃)及-20℃(-25℃至-15℃)下，維持活體外相對效能及其他品質屬性。

【0425】 可獲得的冷凍/解凍資料、溫度脅迫資料及長期穩定性資料指示在新調配物中之類似或改良穩定性。

【0426】 於新FDP調配物B中之FDP批次在-80℃(≤ -60℃)及-20℃(-25℃至-15℃)下之長期穩定性可能下降(set down)，且可作為穩定性程式之一部分監測穩定性趨勢資料以確保新FDP之過期日期順應規定。

5.3.1 含構築體II之DPBS及含構築體II之新FDP調配物B之冷凍/解凍研究

【0427】 進行研究以評定冷凍/解凍循環對於含構築體II之DPBS及含構築體II之新FDP調配物B的影響。選擇冷凍/解凍速率以使得在可在製造BDS瓶子期間或在DP小瓶之供應鏈或診所中發生之預期速率的範圍內(bracket)。施加多個循環以脅迫樣品超出在診所中可能發生的範圍。

【0428】 研究之結果表明，當暴露於至多五個冷凍/解凍循環，在緩慢($0.12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或在約11小時內)及/或快速($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或在約1小時內)之情況下自 $< -60^{\circ}\text{C}$ 至 25°C 時，調配物B比調配物A更穩固。分別對於冷凍及解凍，評定緩慢及快速速率之所有排列(亦即，FF/FT =快速冷凍/快速解凍；FF/ST =快速冷凍/緩慢解凍；SF/FT =緩慢冷凍/快速解凍；SF/ST =緩慢冷凍/緩慢解凍)。

【0429】 冷凍及解凍速率可影響生物製劑之穩定性(Cao等人, 2003, *Biotechnol. Bioeng.* 82(6):684-90))。在冷凍期間水之結晶可導致賦形劑濃縮，此可影響生物製劑之穩定性。相分離或pH偏移亦可發生，其影響生物製劑之穩定性。快速冷凍可引起較小冰晶體及較大冰-水界面區域，此可賦予界面應力。快速冷凍亦可捕獲冰中之氣泡，從而導致在解凍期間空氣-水界面應力。緩慢解凍可導致冰之再結晶，其可影響溶液中之生物製劑之穩定性，此係由於界面應力。

【0430】 在此研究中，藉由活體外相對效能、尺寸排阻層析純度(SEC)、游離DNA含量(藉由螢光染料)及粒度分佈(藉由動態光散射)分析樣品。藉由量熱法評定在冷凍及解凍後調配物之相變化。

【0431】 在此研究中，對於不同的快速及緩慢冷凍及解凍速率之速率，結果存在極小差異。凍融研究結果之總體概述提供於表8中。在此研究中施加之溫度概況(快速冷凍/緩慢解凍)之代表性實例顯示於圖9中(其他概況排列未顯示)。對於快速及緩慢冷凍及解凍速率之所有排列，效能結果與對照類似。在調配物A或調配物B之冷凍/解凍循環後，在方法變異性內粒度分佈無變化(參見圖12)。調配物B中之累積DLS直徑(約28 nm)略微高於DPBS調配物A (27 nm)中。此表觀大小之極略微增加與蔗糖對於水合

作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響有關。對於含構築體II之DPBS調配物A，在所有凍融脅迫條件下，游離DNA (藉由染料螢光)增加(自1.7%升至6.9%)。藉由SEC定量之游離DNA大體上與染料螢光相符。藉由SEC，第一個前峰含有游離DNA，第二個小的前峰含有聚集物，且後峰含有緩衝液物種(參見圖10及圖11)。藉由SEC之略微較低游離DNA可能係由於與主峰共溶離或與緩衝液共溶離或不進入柱之極小或極大DNA片段所致。對於快速或極緩慢凍融速率之不同排列，增加具有類似量值，且無明顯區別。對於調配物B，未觀測到游離DNA或聚集物增加。

【0432】 在約-41℃，在調配物A中觀測到小放熱，此係由於在冷卻期間未完全結晶之非晶形氯化鈉結晶所致(圖13)。亦觀測到具有未解析的低溫肩峰之共晶熔融，其中對於調配物A在-22.1℃處具有峰。氯化鈉之相同共晶及再結晶事件已在文獻中報導(Milton等人, 2007, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(7))。調配物B缺乏共晶熔融(圖14)與結晶之抑制相符。在調配物B中藉由低溫保護蔗糖賦形劑維持非晶形黏稠狀態可提供在冷凍/解凍循環後保護以免於衣殼破壞及釋放游離DNA。因此，改變為調配物B引起與調配物A相比類似或改良的穩定性。

表8：凍融速率對於含構築體II之DPBS及含構築體II之新FDP調配物B之影響

冷凍及解凍速率 ^c	含構築體II之具有0.001%泊洛沙姆188之DPBS，pH 7.4 (調配物A)				含構築體II之『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』 (調配物B)			
	游離DNA (%) ^a	SE-HPLC ^b 前峰(%)	DLS累積直徑(nm)	活體外相對效能(%)	游離DNA (%) ¹	SE-HPLC ^b 前峰(%)	DLS累積直徑(nm)	活體外相對效能(%)
對照	1.7	2.1	26.8	88	2.5	2.3	28.0	87
5×FF/FT	6.9	4.5	28.4	88	2.7	1.6	28.5	89
5×FF/ST	5.9	4.5	26.7	87	2.5	1.2	27.9	88
5×SF/FT	6.6	3.6	26.7	88	2.6	1.1	27.7	92

5×SF/ST	6.8	3.4	26.9	86	2.7	1.5	28.1	88
---------	-----	-----	------	----	-----	-----	------	----

- a. 百分比游離DNA係基於與根據GC/mL (OD 260 nm)計算之總DNA相比之所量測量。
- b. SEC結果係基於260 nm波長通道計算。
- c. 實際產物溫度『快速』速率為約一小時(對於冷凍)及1.5小時(對於解凍)。對於冷凍及解凍兩者而言，『緩慢』速率均為約11小時。

5.3.2 含構築體II之調配物A及含構築體II之新FDP調配物B之溫度脅迫穩定性

【0433】 在37°C，以 1.0×10^{12} GC/mL進行4天之溫度脅迫發展穩定性研究用於評估調配物A及調配物B之相對穩定性。用於評定穩定性之分析包括於以下中：活體外相對效能(IVRP)、載體基因體濃度(VGC，藉由ddPCR)、游離DNA(藉由染料螢光)、動態光散射、外觀及pH。調配物A中之結果顯示於表9中，且調配物B之結果顯示於表10中。對於兩種調配物，在分析變異性內觀測到相當的效能降低，每天約14至16% (參見圖15)。載體基因體複本亦小幅降低，調配物A及調配物B兩者相當。調配物B中之累積DLS直徑(約29-34 nm)略微高於DPBS調配物A (28-30 nm)中。此表觀大小之極略微增加(1至3 nm)與蔗糖對於水合作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響有關。對於調配物A或調配物B而言，在脅迫研究期間，在方法變異性內DLS直徑方面無此趨勢。調配物B關於衣殼破壞而言略微更穩定，且具有更低的游離DNA含量。對於調配物A，游離DNA增加約1至3%，且對於調配物B，增加仍低於1% (參見圖16)。總體而言，調配物A及調配物B之溫度脅迫穩定性類似，其中調配物B關於衣殼破壞及游離DNA之釋放而言略微更穩定。因此，改變為調配物B可引起與調配物A相比類似或改良的穩定性。

表9：保持在37℃，含構築體II之調配物A 1.0×10^{12} GC/ML之溫度脅迫穩定性

測試/時間點	0天	1天	2天	4天
IVRP (%)	128	111	96	75
VGC (GC/mL)	1×10^{12}	9.70×10^{11}	9.50×10^{11}	8.60×10^{11}
游離DNA (%)	1.27	2.13	2.30	3.12
DLS直徑(nm)	28.3	28.7	28.4	30.2
pH	7.4	7.4	7.4	7.6
外觀	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色， 無粒子

表10：保持在37℃，含構築體II之調配物B 1.0×10^{12} GC/ML之溫度脅迫穩定性

測試/時間點	0天	1天	2天	4天
IVRP (%)	143	121	101	83
VGC (GC/mL)	11×10^{12}	1×10^{12}	9.20×10^{11}	8.80×10^{11}
游離DNA(%)	0.59	0.83	0.84	0.83
DLS直徑(nm)	28.7	34.2	32.8	29.5
pH	7.2	7.4	7.3	7.3
外觀	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色， 無粒子

5.3.3 含構築體II之新FDP調配物B之長期穩定性

【0434】 在12個月之長期發展穩定性表明，在FDP調配物B中，在-80℃($\leq -60^\circ\text{C}$)及-20℃(-25℃至-15℃)下，維持活體外相對效能及其他品質屬性。在 1.0×10^{12} GC/mL下及在 2.1×10^{11} GC/mL下進行研究。用於評定穩定性之分析包括於以下中：活體外相對效能(IVRP)、載體基因體濃度(VGC，藉由ddPCR)、游離DNA (藉由染料螢光) (相對於-80℃，直至9個月之時間點，及在12個月絕對百分比)、尺寸排阻層析(SEC) (僅 1.0×10^{12} GC/mL)、動態光散射(DLS)、pH及外觀。

【0435】 在12個月內，對於兩個濃度而言，在-80℃及-20℃之穩定性方面的所有結果無趨勢。對於-80℃及-20℃，在方法變異性內，所有結果類似且類似於初始時間點結果。保持在-80℃(表11)及-20℃(表12)下之

1.0×10¹² GC/mL及保持在-80℃(表 13)及-20℃(表 14)下之2.1 × 10¹¹ GC/mL的長期穩定性資料表明，構築體II在調配物B中穩定至少12個月。IVRP效能趨勢圖顯示於圖17及圖18中。IVRP效能顯示與方法變異性相比在12個月內長期穩定性資料無一致趨勢。

表11：在-80℃在1.0×10¹² GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月
IVRP (%)	82%	91%	90%	112%	110%
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	9.4×10 ¹¹	9.6×10 ¹¹	9.80×10 ¹¹	9.7×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照)	1.00	1.00	1.00	NA	1.00 (1.1%絕對值)
SEC (純度%)	99.1	98.9	99.1	未測試	待定(pending)
DLS直徑(nm)	NA	28.4	28.1	27.9	28.7
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.3
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

表12：在-20℃在1.0×10¹² GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月
IVRP (%)	82%	98%	90%	115%	85%
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	9×10 ¹¹	9.6×10 ¹¹	9.9×10 ¹¹	9.5×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照)	1.00	0.96	0.97	未測試	1.37 (1.5%絕對值)
SEC (純度%)	99.1	98.8	99.3	未測試	待定
DLS直徑(nm)	NA	29.8	28.2	28	29.1
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.3
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

表13：在-80℃在2.1×10¹¹ GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月
IVRP (%)	113%	107%	120%	104%	97%
VGC (GC/mL)	2.1×10 ¹¹	2.1×10 ¹¹	2.2×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照)	1.00	1.00	1.00	未測試	1.00 (1.4%絕對值)
DLS直徑(nm)	NA	25.3	26.0	28.9	28.1
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.2
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

表14：在-20℃在2.1×10¹¹ GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月
--------	-----	-----	-----	-----	------

IVRP (%)	113%	104%	115%	109%	86%
VGC (GC/mL)	2.1×10 ¹¹	2.1×10 ¹¹	2.1×10 ¹¹	2.2×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照)	1.00	0.99	1.10	未測試	1.22 (1.8%絕對值)
DLS直徑(nm)	NA	26.1	25.8	28.9	30.3
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.4
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

5.4 實例4：調配物A及調配物B對於冷凍及解凍循環之穩定性之比較

5.4.1 前言

【0436】 冷凍及解凍速率可影響生物製劑之穩定性(Cao等人, 2003, Biotechnol. Bioeng. 82(6):684-90)。在緩慢冷凍期間水之結晶可導致賦形劑濃縮，此可影響生物製劑之穩定性。相分離或pH偏移亦可發生，其影響生物製劑之穩定性。快速冷凍可引起較小冰晶體及較大冰-水界面區域，此可賦予界面應力。快速冷凍亦可捕獲冰中之氣泡，從而導致在解凍期間空氣-水界面應力。緩慢解凍可導致冰之再結晶，其可影響溶液中之生物製劑之穩定性，此係由於界面應力。

【0437】 凍融脅迫可潛在地破壞AAV衣殼，從而導致釋放少量游離DNA。在臨床試驗期間，FDP可在多個供應商之間運送以用於完成填充、儲存、臨床封裝及標記，且可最終遞送至臨床地點。在運送或產物處理期間遭遇非計劃溫度漂移可導致產物升溫或甚至解凍及再冷凍。冷凍及解凍之速率之相對影響可用以評定漂移以及在CMO及在診所指導冷凍及解凍說明。冷凍及解凍之影響亦可取決於AAV類型及其調配物。在此實例中評定此等因素。

【0438】 發現較大體積(60-110 mL)於BDS瓶子中分別以約0.5℃/min (對於60 mL水)及0.3℃/min (對於110 mL水)之總體平均速率冷凍。較小0.6 mL填充於CZ小瓶中花費約30-40分鐘自室溫或-20℃ 冷凍(約2.0℃

/min之速率)，而解凍花費30分鐘(自室溫)及10分鐘(自-20°C) (速率分別為約2.4°C/min及4.5°C/min)。在先前研究中，顯示，填充有60及110 mL水之250 mL Nalgene HDPE (BDS)瓶子分別花費163及266分鐘冷凍至低於-65°C。此等體積之對應冷凍速率分別為0.53°C/min (對於60 mL水)及0.33°C/min (對於110 mL水)。在解凍期間，觀測到溫度快速上升直至達到熔點——此時溫度朝著室溫緩慢增加。解凍分別花費273 (對於60 mL瓶子)及337分鐘(對於110 mL瓶子) (等效於0.32°C至0.25°C/min之總體對平均化速率)。瓶子中之冷凍及解凍之溫度概況顯示於圖19A中。

【0439】 在單獨先前研究中，研究0.6 mL水填充至2 mL Nalgene冷凍小瓶中之冷凍/解凍溫度概況。溫度循環發生在-80°C冰箱與-20°C冰箱或實驗台(室溫)之間。資料顯示於圖19B中。平均而言，自室溫冷凍至-60°C花費約40分鐘，而自-20°C冷凍至-60°C花費約30分鐘。對於兩個研究，此對應於約2.0°C/min之速率。自-60°C解凍至-20°C相對快速發生且花費約10分鐘，而解凍至室溫花費約30分鐘。對於-20°C研究，此對應於約4.5°C/min之速率；及對於室溫研究，此對應於2.4°C/min之速率。

【0440】 在此實例中，評估在緩慢及快速冷凍與解凍速率下多個冷凍/解凍循環之影響。評定約0.13°C/min (11小時冷凍或解凍)及1.5°C/min (1小時冷凍或解凍)之冷凍/解凍速率對於代表性AAV8 (構築體II)之產品品質的影響。進行此以進一步表徵現實溫度漂移對於AAV8品質之變異性的可能。選擇比BDS緩慢冷凍及解凍預期速率更慢的緩慢速率。對於快速速率，研究約1°C/min (約比緩慢速率快10×)之最大可達率作為快速解凍及冷凍之代表。施加多個循環以脅迫樣品超出在診所中可能發生的範圍。藉由活體外相對效能、尺寸排阻層析純度、游離DNA含量(使用基於新

SYBR金染料之分析，發現該分析對凍融脅迫敏感)及粒度分佈(藉由動態光散射)分析樣品。

5.4.2 凍融研究結果之概述

【0441】 總體而言，資料顯示，以在慢至0.12°C/min (或在約11小時內)至快至1°C/min (或在約1小時內)範圍內之速率，五個冷凍/解凍循環對於含構築體II之dPBS及含構築體II之『具有蔗糖之改良dPBS』之品質屬性存在極小影響。

【0442】 選擇冷凍/解凍速率以使得在BDS瓶子或DP小瓶可在診所中發生之預期速率的範圍內。施加多個循環以脅迫樣品超出在診所中可能發生的範圍。

【0443】 凍融研究結果之總體概述提供於表15中。

表15：結果概述

冷凍及解凍速率 ^c	含構築體II之dPBS				含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物			
	游離DNA(%) ^a	SE-HPLC ^b 前峰(%)	DLS累積直徑(nm)	活體外相對效能(%)	游離DNA(%) ^a	SE-HPLC ^b 前峰(%)	DLS累積直徑(nm)	活體外相對效能(%)
對照	1.7	2.1	26.8	88	2.5	2.3	28.0	87
5×FF/FT	6.9	4.5	28.4	88	2.7	1.6	28.5	89
5×FF/ST	5.9	4.5	26.7	87	2.5	1.2	27.9	88
5×SF/FT	6.6	3.6	26.7	88	2.6	1.1	27.7	92
5×SF/ST	6.8	3.4	26.9	86	2.7	1.5	28.1	88

- a. 百分比游離DNA係基於與根據GC/mL (OD 260 nm)計算之總DNA相比之所量測量。關於ng/μL含量及在藉由加熱進行衣殼破壞之後與總結果之比較的更多細節參見結果章節。
- b. SEC結果係基於260 nm波長通道計算。
- c. 實際產物溫度『快速』速率為約一小時(對於冷凍)及1.5小時(對於解凍)。對於冷凍及解凍兩者而言，『緩慢』速率均為約11小時。

5.4.3 材料

【0444】 小瓶：CZ 2 mL小瓶，13 mm，19550057 (West, Daikyo)

【0445】 塞子：13 mm血清NovaPure RP S2-F451 4432/50灰(West)

【0446】 構築體II：以約 1×10^{12} GC/mL調配於具有0.001%泊洛沙姆188之杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(dPBS)緩衝液(0.2 g/L氯化鉀，0.2 g/L磷酸二氫鉀，8.01 g/L氯化鈉，1.15 g/L無水磷酸氫二鈉，pH 7.4)中，且以0.5 mL裝瓶於CZ小瓶中(在此實例中，當提及dPBS時，此隱含地描述亦含有0.001%泊洛沙姆188之dPBS緩衝液)。

【0447】 構築體II：以約 1×10^{12} GC/mL調配於『具有蔗糖之改良dPBS』(0.2 g/L氯化鉀，0.2 g/L磷酸二氫鉀，5.84 g/L氯化鈉，1.15 g/L無水磷酸氫二鈉，4%蔗糖，0.001%泊洛沙姆188，pH 7.4)中，且以0.5 mL裝瓶於CZ小瓶中。

5.4.4 設備

【0448】 具有溫度探針熱電偶之Genesis 25EL凍乾器(SP Scientific)資產標籤0941 (FFF)。

【0449】 Cytation 5讀盤器(BioTek, Winooski, VT)，資產標籤0867 (FFF instrument)

【0450】 Cary 60 UV-可見光譜光度計(Agilent, Santa Clara, CA)，資產標籤0999 (FFF)

【0451】 熱混合器/加熱塊(Thermo Scientific)，S/N：01014318110768

【0452】 Waters Acquity Arc設備ID 0447 (C3PO)及Sepax SRT SEC-1000 Peek管柱(PN 215950P-4630，SN：8A11982，LN：BT090，5 μ m 1000A，4.6 $\times$ 300mm)

【0453】 TA instruments差示掃描量熱計，DSC250/RCS90，序號DSC2A-00980，資產標籤0866。

5.4.5 方法

(a) 在凍乾器中之受控凍融循環

【0454】 根據表16在凍乾器中運行受控冷凍/解凍循環。小瓶在擱板上充分間隔開且熱偶合4小瓶緩衝液。

表16：受控冷凍及解凍速率設定

條件 ^{a, b}	冷凍速率	解凍速率
冷凍對照	NA	NA
5×快速冷凍/快速解凍 (FF/FT)	25°C至-60°C，1.5°C/min (1小時)	-60°C至25°C，以1.5°C/min (1小時)
5×快速冷凍/緩慢解凍 (FF/ST)	25°C至-60°C，1.5°C/min ^c (1小時)	-60°C至25°C，以0.13°C/min (11小時)
5×緩慢冷凍/快速解凍 (SF/FT)	25°C至-60°C，以0.13°C/min (11.3小時)	-60°C至25°C，以1.5°C/min (1小時)
5×緩慢冷凍/緩慢解凍 (SF/ST)	25°C至-60°C，以0.13°C/min (11小時)	-60°C至25°C，以0.13°C/min (11小時)

a. 擱板經程式化以保持在冷凍與解凍循環之間在-60°C及25°C至少1小時(出於實驗室時程目的，一些輪次保持較長冷凍)。

b. 在分析之前，在研究結束時，所有樣品及冷凍對照在冰箱中經受不受控制的冷凍至-80°C且在實驗台上在室溫下解凍。

c. 自25°C至-55°C運行FF/ST之第一循環，以試圖降低冷凝器上之負載。後續4個循環設定為-60°C。

(b) 活體外相對效能

【0455】 進行構築體II之IVRP：

【0456】 為了使ddPCR GC效價與基因表現相關，藉由轉導HEK293細胞及分析細胞培養物上清液之抗VEGF Fab蛋白質含量，來進行活體外生物分析。將HEK293細胞塗鋪至三個聚D-離胺酸塗佈之96孔組織培養盤

上隔夜。隨後，將細胞用野生型人類Ad5病毒預感染，之後用三個獨立製備的構築體II參考標準物及測試物之連續稀釋液轉導，其中各製劑塗鋪在單獨培養盤上不同位置。在轉導後第三天，自培養盤收集細胞培養基，且經由ELISA量測其VEGF結合Fab蛋白質含量。對於ELISA而言，塗佈有VEGF之96孔ELISA盤經阻斷，且隨後與所收集之細胞培養基一起培育，以捕獲HEK293細胞產生之抗VEGF Fab。使用Fab特異性抗人類IgG抗體來偵測捕獲VEGF之Fab蛋白質。在洗滌之後，添加辣根過氧化酶(HRP)受質溶液，允許發展，用終止緩衝液終止，且在讀盤器中閱讀培養盤。HRP產物之吸光度或OD相對於對數稀釋之繪圖，且計算各測試物相對於同一培養盤上之參考標準物之相對效能，用在經過平行度相似性測試後之四參數邏輯回歸模型擬合，使用式： $EC50_{\text{參考物}} \div EC50_{\text{測試物}}$ 。報導測試物之效能為參考標準物效能之百分比，由三個培養盤之加權平均計算。

(c) 游離DNA分析

【0457】藉由與DNA結合之SYBR®金核酸凝膠染色劑(『SYBR金染料』)之螢光來測定游離DNA。螢光使用微量盤讀取器來量測且用DNA標準物進行定量。結果以ng/μL為單位報導。

【0458】使用兩種方法來估計總DNA，以便將以ng/μL為單位之所量測之游離DNA轉化為游離DNA之百分比。在第一種方法中，藉由UV可見光光譜分析測定之GC/mL (OD)用於估計樣本中之總DNA，其中M為DNA之分子量且1E6為單位轉化因子：

【0459】所估計之總DNA (ng/μL) = $1E6 \times GC/mL (OD) \times M$
(g/mol)/ 6.02×10^{23}

【0460】在第二種方法中，將樣品與0.05%泊洛沙姆188一起加熱至

85°C 持續20 min，且藉由SYBR金染料分析量測之加熱樣本中之所量測實際DNA用作總DNA。因此，此具有假設，回收所有DNA且進行定量。對於構築體II dPBS調配物，發現藉由SYBR金染料(相對於UV讀數)測定之總DNA為131%；且對於構築體II具有蔗糖之改良dPBS調配物，總DNA更高(152%)。將游離DNA之ng/ μ L轉化為游離DNA之百分比之此變化捕獲為報導結果中之範圍。對於趨勢而言，可使用原始ng/ μ L或可使用藉由一貫方法所測定之百分比。

(d) 尺寸排阻HPLC分析

【0461】 SEC使用具有25 mm路徑長度流槽之Waters Acquity Arc Equipment ID 0447 (C3PO)上之Sepax SRT SEC-1000 Peek管柱(PN 215950P-4630，SN：8A11982，LN：BT090，5 μ m 1000A，4.6 $\times$ 300mm)來進行。移動相為(20 mM磷酸鈉、300 mM NaCl、0.005% 泊洛沙姆188，pH 6.5 - VA 15Apr19)，其中0.35毫升/分鐘之流速持續20分鐘，其中管柱在環境溫度下。用2點/秒取樣速率進行資料收集，且25點之1.2 nm解析度意調在214、260及280 nm下平滑。理想目標負載為 1.5×10^{11} GC。注射50 μ L構築體II樣品，約1/3之理想目標及注射5 μ L構築體II。

(e) 動態光散射

【0462】 在Wyatt DynaProIII上，使用Corning 3540 384孔盤來進行動態光散射(DLS)，其中樣本體積為30 μ L。每重複各自收集十個採集持續10 s，且對每樣品進行三個重複量測。溶劑設定為含『PBS』構築體II之dPBS，且對於含構築體II之具有蔗糖樣品之改良dPBS，設定為『4%蔗糖』。『標記』不滿足資料質量標準(基線、SOS、雜訊、擬合)之結果且排

除在分析外。對於具有蔗糖樣品之改良dPBS，低延遲時間截留自1.4 μ s改為10 μ s，以消除在約1 nm處之蔗糖賦形劑峰對於引起人工低累積量分析直徑結果之影響。

(f) 差示掃描熱量法

【0463】 使用TA Instruments DSC250運行低溫差示掃描熱量法(低溫DSC)。將約20 μ L樣品負載至Tzero盤中且用Tzero密封蓋旋緊。將樣品在25°C平衡2 min，隨後以5°C/min冷卻至-60°C，平衡2 min，隨後以5°C/min加熱至25°C。以習知模式收集熱流資料。

5.4.6 結果

(a) 凍融研究溫度概況

【0464】 產物溫度並不精確地匹配擱板，此係由於熱傳遞限制及在冷凍及熔融期間緩衝液之相變。使用在當產物在25°C與-60°C附近持續代表部分之循環時之間的持續時間計算總體平均速率所測定之平均速率概述於表17中。

【0465】 如所預期，存在一個特徵性溫度上升尖峰，其中在大約-10°C產物之溫度略微比擱板溫度高，此係由於在冷凍期間釋放能量。類似地，在約0°C，在冰熔融期間產物之溫度相對於擱板略低。下文章節顯示探針溫度資料。另外，顯示針對FT/FT及SF/SF，擱板及探針之速率(亦即，溫度及時間之5點傾斜)，作為緩慢及快速速率所達成之實際速率的代表。

【0466】 快速冷凍平均速率限於約1°C/min，且快速解凍平均速率限於約0.8至1°C/min。

【0467】 實際產物溫度『快速』速率為約一小時(對於冷凍)及1.5小

時(對於解凍)。對於冷凍及解凍兩者而言，『緩慢』速率均為約0.12℃/min，花費約11小時。

表17：在冷凍及解凍循環期間之實際產物溫度及速率

條件 ^{1,2}	冷凍速率	解凍速率
5×快速冷凍/快速解凍 (FF/FT)	目標：25℃至-60℃，1.5℃/min (1小時) 實際：20℃至-53℃，1℃/min (~1小時)	目標：-60℃至25℃，以1.5℃/min (1小時) 實際：-53℃至20℃，以1℃/min (~1.5小時)
5×快速冷凍/緩慢解凍 (FF/ST)	目標：25℃至-60℃，1.5℃/min (1小時) 實際：23℃至-55℃，以1.2℃/min (~1小時)	目標：-60℃至25℃，以0.13℃/min (11小時) 實際：-55℃至23℃，以0.12℃/min (~11小時)
5×緩慢冷凍/快速解凍 (SF/FT)	目標：25℃至-60℃，以0.13℃/min (11.3小時) 實際：23℃至-55℃，以0.12℃/min (~11小時)	目標：-60℃至25℃，以1.5℃/min (1小時) 實際：-55℃至23℃，以0.8℃/min (~1.5小時)
5×緩慢冷凍/緩慢解凍 (SF/ST)	目標：25℃至-60℃，以0.13℃/min (11小時) 實際：24℃至-56℃，以0.12℃/min (~11小時)	目標：-60℃至25℃，以0.13℃/min (11小時) 實際：-56℃至24℃，以0.12℃/min (~11小時)

(b) 快速冷凍/快速解凍(FF/FT)

【0468】 圖20A顯示FF/FT之擱板及探針溫度概況。出於實驗室時程目的，一些循環保持較長冷凍。

【0469】 快速冷凍平均速率限於約1℃/min，且快速解凍平均速率限於約0.8至1℃/min。

【0470】 在第一循環之冷凍部分期間之溫度尖峰似乎為儀器尖峰。在第三循環上室溫附近之尖峰係由於手動重設定系統繼續循環及擱板溫度環境之相關暫時性(幾分鐘)降低至更接近於10℃的預設值。

【0471】 圖20B顯示擱板及產物溫度之放大以及其速率(平均在25 min內)。實際速率顯示，平均產物及擱板溫度受極快速冷凍及熔融以及在此等過程期間以經程式化之快速速率熱傳遞的相關限制影響。產物之熔融

自攔板吸取熱量且引起在熔融溫度範圍期間攔板溫度速率降低。

(c) 快速冷凍/緩慢解凍(FF/ST)

【0472】 圖21顯示FF/ST之攔板及探針溫度概況。自25°C至-55°C且返回25°C 運行FF/ST之第一循環，以試圖降低冷凝器上之負載。後續4個循環設定為-60°C。冷凍及解凍之時間未更新，其使目標速率增加至1.6°C/min (自1.5°C/min)及至0.13°C/min (自0.125°C/min)。在自初始目標速率小於10%下，此差異為可忽略的。在第三循環上室溫附近之尖峰係由於手動重設定系統繼續循環及攔板溫度環境之相關暫時性(幾分鐘)降低至更接近於10°C的預設值。

(d) 緩慢冷凍/快速解凍(SF/FT)

【0473】 圖22顯示SF/FT之攔板及探針溫度概況。出於實驗室時程目的，最後一個循環保持較長冷凍。

(e) 緩慢冷凍/緩慢解凍(SF/ST)

【0474】 圖23顯示FF/FT之攔板及探針溫度概況。出於實驗室時程目的，第三循環保持較長冷凍。在第三循環上室溫附近之尖峰係由於手動重設定系統繼續循環及攔板溫度環境之相關暫時性(幾分鐘)降低至更接近於10°C的預設值。

【0475】 圖24顯示攔板及產物溫度之放大以及其速率(平均在25 min內)。速率顯示，平均產物溫度受冷凍及熔融過程影響，但攔板溫度速率在此等較慢速率下仍穩定(與FT/FT相比)。

5.4.7 活體外相對效能

【0476】 對於含構築體II之dPBS及含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物之快速及緩慢速率之冷凍及解凍的所有排列，活體外相對效

能(IVRP)結果類似於對照且在方法變異性內(表18)。

表18：IVRP結果

冷凍及解凍速率	活體外相對效能(%)		
	對照調配物	含構築體II之dPBS	含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物
對照	93	88	87
5×FF/FT	87	88	89
5×FF/ST	90	87	88
5×SF/FT	97	88	92
5×SF/ST	94	86	88

5.4.8 藉由SYBR染料結合及SEC之游離DNA結果

【0477】 游離DNA之總體結果概述提供於表19中。提供藉由SYBR金結合之游離DNA之範圍，其表示基於100%之GC/mL (OD)值的百分比或100%基礎之熱脅迫結果的百分比。

表19：藉由SYBR金之游離DNA及藉由SEC結果之前峰

冷凍及解凍速率	含構築體II之dPBS		含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物	
	游離DNA ^a	SE-HPLC ^b 前峰(%)	游離DNA ^a	SE-HPLC ^b 前峰(%)
冷凍對照	0.046 ng/μL 1.4%至1.7% 相對值1.0	2.1% 相對值1.0	0.056 ng/μL 1.7%至2.5% 相對值1.0	2.3% 相對值1.0
5×FF/FT	0.181 ng/μL 5.4%至6.9% 相對值3.9	4.5% 相對值2.2	0.057 ng/μL 1.8%至2.7% 相對值1.0	1.6% 相對值0.7
5×FF/ST	0.156 ng/μL 4.7%至5.9% 相對值3.4	4.5% 相對值2.2	0.057 ng/μL 1.7%至2.5% 相對值1.0	1.2% 相對值0.5
5×SF/FT	0.173 ng/μL 5.2%至6.6% 相對值3.7	3.6% 相對值1.7	0.058 ng/μL 1.7%至2.6% 相對值1.0	1.1% 相對值0.5
5×SF/ST	0.178 ng/μL 5.3%至6.8% 相對值3.9	3.4% 相對值1.7	0.060 ng/μL 1.8%至2.7% 相對值1.1	1.5% 相對值0.6

a. 百分比游離DNA範圍計算為在85°C 20 min熱脅迫樣品中偵測到之總量之百分比及根據GC/mL (OD 260 nm)計算之百分比。『相對值』為使用GC/mL (OD)值凍融樣品中之游離DNA與冷凍對照相比之比率。

b. SEC結果係基於260 nm波長通道計算。

【0478】 SEC結果概況之放大圖顯示於圖25、圖26及圖27中。260 nm UV通道用於測定表示游離DNA (較早峰)及一些蛋白質(封閉前峰)之前峰百分比。峰之光譜分析及其溶離位置指示，前峰主要為游離DNA。在主峰之後之峰與賦形劑相關。

5.4.9 動態光散射結果

【0479】 含構築體II之dPBS之DLS結果顯示於圖28中，且含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS的DLS結果顯示於圖29中。累積量擬合之直徑結果及藉由正則化擬合之主峰之直徑結果顯示於表20中。

【0480】 累積直徑介於27.1至27.5 nm (對照= 27.5)，且正則化擬合結果介於28.2至28.7 nm (對照= 28.4)。累積資料中之範圍為0.4 nm，且正則化資料中之範圍為0.5 nm。對於累積擬合而言，重複量測之平均直徑之標準差為約0.2；及對於正則化擬合而言，該標準差高達0.8 nm。

【0481】 在任何凍融條件之後，在方法變異性內，含構築體II之dPBS之粒度分佈無變化。累積直徑介於26.7至28.4 nm (對照= 26.8)，及正則化直徑介於26.2至27.6 nm (對照= 27.1)。累積資料中之範圍為1.7 nm，且正則化資料中之範圍為1.4 nm。對於累積擬合而言，重複量測之平均直徑之標準差為約0.1；及對於正則化擬合而言，該標準差高達0.4 nm。

【0482】 在任何凍融條件之後，在方法變異性內，含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS之粒度分佈無變化。累積直徑介於27.7至28.5 nm (對照= 28.0)，及正則化直徑介於28.2至31.3 nm (對照= 30.3)。累積資料中之範圍為0.8 nm，且正則化資料中之範圍為3.1 nm。在具有蔗糖之改良

dPBS中，對於累積擬合而言，重複量測之平均直徑之標準差為約0.2 nm；及對於正則化擬合而言，該標準差高達1.3 nm。

【0483】蔗糖中之累積直徑(約28 nm)略微高於dPBS (27 nm)中(圖30)。正則化擬合直徑(30 nm)亦略微高於dPBS (約27 nm)中，如顯示於圖31中。此表觀大小之極略微增加與蔗糖對於水合作用且因此衣殼之流體動力學行為之影響有關。

表20：DLS直徑結果

冷凍及解凍速率	含構築體II之dPBS		含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物	
	累積	正則化峰	累積	正則化峰
對照	26.8	27.1	28.0	30.3
5×FF/FT	28.4	26.2	28.5	28.2 ^a
5×FF/ST	26.7	27.4	27.9	31.3
5×SF/FT	26.7	27.2	27.7	30.2 ^b
5×SF/ST	26.9	27.6	28.1	30.4
資料中之範圍(nm)	1.7	1.4	0.8	3.1

- a. 偵測到在1.2 nm處之蔗糖賦形劑峰，表示2.4%強度。
- b. 在1個重複中偵測到直徑為101 nm之第二峰，其強度為2%。

5.4.10 調配物之熱性質

【0484】顯示於圖32中之dPBS調配物緩衝液之低溫DSC熱分析圖在約-41℃具有小放熱，此係由於在冷卻期間未完全結晶之非晶形氯化鈉結晶所致。賦形劑之再結晶牽涉到玻璃小瓶破裂。預期此對於CZ小瓶(COP材料)而言不是問題。另外，關於此情形之文獻參考指示，即使對於玻璃小瓶，小瓶破裂可能不是問題(Milton等人, 2007, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(7))。觀測到具有未解析低溫肩峰之共晶熔融，其中峰在-22.1℃處，繼之由於冰之熔融出現大的吸熱峰。共晶熔融與氯化鈉及水共晶相符。氯化鈉之相同共晶及再結晶事件已在文獻中報導

(Milton等人, 2007, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(7))。

【0485】圖33顯示之『具有蔗糖之改良dPBS』緩衝液之低溫DSC熱分析圖具有在-45.1°C之玻璃轉化，隨後由於冰之熔融出現大的吸熱峰。未觀測到其他轉化。玻璃轉化與玻璃形成賦形劑蔗糖之存在相符。缺乏共晶熔融與藉由蔗糖賦形劑抑制結晶及維持非晶形黏稠狀態相符。此等結果與針對較低(3%)蔗糖與較高(0.25 M)氯化鈉含量所報導之結晶抑制及共晶熔融缺乏相符(Milton等人, 2007, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(7))。

5.4.11 結論

【0486】此研究之此等結果表明，對於含構築體II之dPBS及含構築體II之『具有蔗糖之改良dPBS』調配物，以緩慢(0.12°C/min或在約11小時內)及/或快速(1°C/min或在約1小時內)速率，至多五個冷凍/解凍循環為可接受的可允許漂移。

【0487】選擇冷凍/解凍速率以使得在BDS瓶子或DP小瓶可發生之預期速率的範圍內。施加多個循環以脅迫樣品超出在診所中可能發生的範圍以支援多次漂移。

【0488】對於含構築體II之dPBS及含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物之快速及緩慢速率之冷凍及解凍的所有排列，效能結果類似於對照且在方法變異性內。

【0489】在任何凍融條件之後，在方法變異性內，含構築體II之dPBS或含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS調配物之粒度分佈無變化。

【0490】凍融脅迫顯示破壞構築體II (AAV8)之少數衣殼，從而導致當不用低溫保護賦形劑調配時釋放少量游離DNA。

【0491】 對於含構築體II之dPBS調配物，在所有凍融脅迫條件下，游離DNA增加(自1.7%升至6.9%)。對於快速或極緩慢凍融速率之不同排列，增加具有類似量值，且無明顯區別。

【0492】 大部分穩定調配物為具有蔗糖之改良dPBS調配物，其中未觀測到游離DNA增加。此調配物缺乏共晶熔融與藉由低溫保護蔗糖賦形劑抑制結晶及維持非晶形黏稠狀態相符。

5.5 實例5：調配物A及調配物B在掃描量熱法概況方面之比較

【0493】 此實例顯示調配物A及調配物B在量熱法概況方面之比較。

【0494】 藉由與章節4.5.9、章節5.4.5(f)及/或本文提供之其他相關章節中顯示之方法相同或類似之程序，進行研究。如圖34中所示，調配物B含有抑制結晶/共晶轉化，從而改良對於冷凍/解凍脅迫之穩固性的非晶形賦形劑。

5.6 實例6：針對調配物A，游離DNA隨著各冷凍/解凍循環而增加

【0495】 此實例顯示，針對調配物A，游離DNA隨著各冷凍/解凍循環而增加。

【0496】 藉由與章節4.5.1、章節5.4.5(c)及/或本文提供之其他相關章節中顯示之方法相同或類似之程序，進行研究。如圖35中所示，針對調配物A，對各冷凍/解凍循環偵測到游離DNA小且一貫的增加。

5.7 實例7：在30次冷凍及解凍循環之後，調配物A及調配物B在效能方面之比較

【0497】 此實例顯示在30次冷凍及解凍循環之後，調配物A及調配物B在效能方面之比較。

【0498】 藉由與章節4.5.1、章節5.4.5(c)及/或本文提供之其他相關

章節中顯示之程序類似之程序，進行研究。

【0499】對於具有綠色螢光蛋白之基因之AAV8進行該實例。針對調配物最佳化工作，凍融循環用於模擬輸送及儲存物流溫度變化，且亦用作『加速』脅迫以迫使AAV降解。如圖36中所示，在30個凍融循環之後，『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物B (深灰色條柱)維持效能。相比之下，在15至30個凍融循環之後，參考調配物(dPBS，淺灰色條柱)效能降低至66%-72%。

【0500】對於參考DPBS調配物，導致化學及物理降解、鹽結晶(暴露於表面，導致效能損失)及較低黏度(較低黏度導致較高分子行動性及反應速率)之偏移至酸性pH，可導致效能損失。此等降解路徑在『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物中可減輕。

5.8 實例8：調配物A及調配物B在吸附損失方面之比較

【0501】此實例顯示將調配物A及調配物B在吸附損失方面進行比較之方法。

【0502】在AAV藥物產品設計中及對於投與組分必須考慮接觸材料。如圖37中所示，調配物B中之非晶形賦形劑並不改變AAV對於玻璃小瓶之吸附特性。吸附損失發生在玻璃小瓶中但在COP小瓶中並未偵測到。

5.9 實例9：調配物A及調配物B在長期穩定性方面之比較

【0503】此實例顯示調配物A及調配物B在長期穩定性方面之比較。

【0504】藉由與章節4.5.3及/或本文提供之其他相關章節中顯示之程序相同或類似之程序，進行研究。如圖38及圖54中所示，調配物A及B在-80℃具有類似長期冷凍穩定性，且調配物B在-20℃亦為穩定的。『具有4%蔗糖之改良dPBS』調配物B在-20℃及-80℃維持效能12個月。顯示參

考調配物A (dPBS)之-80℃儲存，作為比較物。

5.10 實例10：調配物在物理化學特性方面之比較

【0505】此實例顯示不同構築體II調配物緩衝液候選物之物理化學特性之表徵，該等物理化學特性包括pH、玻璃轉化溫度(Tg')、滲透壓及密度。構築體II目前設計成儲存於冷凍調配物中。在-20℃自動除霜(-20℃AD)冰箱中，藉由低溫pH探針即時追蹤pH及溫度，研究冷凍及冰箱溫度變動對於緩衝液pH之影響。藉由量熱法評定在冷凍及解凍後調配物之相變化。此研究之結果顯示，取決於調配物緩衝液組成，發生不同pH偏移量值，鑒於穩定pH對於藥物產品長期儲存之關鍵性，該調配物緩衝液組成為考慮的關鍵因素。另外，不同調配物緩衝液之玻璃轉化溫度亦取決於調配物緩衝液組成而變化。較低Tg'需要較低儲存溫度以將溶液完全固化以使針對潛在物理及/或化學降解之分子行動性降至最低。所有緩衝液之滲透壓及密度均在構築體II指示之可接受範圍內。此表徵研究提供關於基於物理化學特性進行構築體II調配物緩衝液篩選之資訊。

5.10.1 前言

【0506】生物製劑通常儲存於由使藥物產品在儲存期間穩定之各種賦形劑構成之緩衝液中。將緩衝液pH及滲透壓維持在目標規格範圍內以確保產物穩定性至關重要。構築體II藥物產品之目標係以冷凍狀態儲存在-80與-20℃之間。在緩慢冷凍期間水之結晶可導致賦形劑濃縮，此可影響生物製劑之穩定性。相分離或pH偏移亦可發生，其可影響生物製劑之穩定性。

【0507】在此研究中，研究冷凍及溫度漂移對於調配物緩衝液pH穩定性之影響。構築體II目前儲存於dPBS及『具有蔗糖之改良dPBS調配物』中。說明緩衝組分及濃度對於使pH穩定以抵抗冷凍脅迫之影響。另

外，亦評估基於Tris緩衝鹽水(TBS)之調配物，作為AAV之潛在替代性調配物。

5.10.2 凍融研究結果之概述

【0508】 總體而言，資料顯示，基於PBS之調配物緩衝液顯示回應於冷凍及溫度變動可接受的pH偏移。針對離子強度為至多150 mM之基於PBS之緩衝液，添加4%及6%蔗糖可減輕pH偏移量值。基於Tris之調配物緩衝液顯示在冷凍後偏移一個pH單位。研究緩衝組分及濃度對於使pH穩定以抵抗冷凍脅迫之影響。測試之所有調配物均列舉於表21中。

表21：不同調配物緩衝液組成之概述

調配物編號		1	2	3	4	5	6	7	8
亦被稱作	賦形劑功能	dPBS	具有4%蔗糖之改良dPBS	具有6%蔗糖之改良dPBS	1/2及1/2具有4%蔗糖	1/2及1/2具有6%蔗糖之	1/2及1/2具有6%蔗糖與80 mM NaCl	1/4及1/4具有4%蔗糖	具有4%蔗糖與100 mM NaCl之5 mM Tris
氯化鈉 (mM)	緩衝劑	137	100	100	100	100	80	100	100
氯化鉀 (mM)		3	3	3	3	3	3	3	無
緩血酸胺(mM)		無	無	無	無	無	無	無	0.9
TRIS鹽酸鹽 (mM)		無	無	無	無	無	無	無	4.1
無水磷酸氫二鈉(mM)		8.1	8.1	8.1	4.05	4.05	4.05	2.03	無
磷酸二氫鉀 (mM)		1.5	1.5	1.5	0.74	0.74	0.74	0.37	無
蔗糖 (w/w%)	低溫保護劑	無	4	6	4	6	6	4	4
泊洛沙姆188 (%)	界面活性劑 ¹	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
水	水性媒劑	QS至1 kg							

添加0.1 mL/L = 0.1 mL/kg之10%儲備液P188。先前使用來自Spectrum之NF級Pluronic® F-68 (泊洛沙姆188)。亦可使用Kolliphor® P188 BIO (BASF)。

5.10.3 定義及縮寫

【0509】 dPBS：杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(比常規PBS具有略微更低的磷酸鹽含量)。注意，在提及dPBS之此報導中，此隱含地描述亦含有0.001%泊洛沙姆188之dPBS緩衝液。

【0510】 玻璃轉化溫度(Tg')

【0511】 -20℃自動除霜冰箱：-20℃ AD。藉由將溫度自-20升至-6℃且隨後每4小時降回-20，冰箱防止發生結霜。一個除霜循環(-20℃→-6℃→-20℃)花費約一小時。

5.10.4 材料

表22：賦形劑資訊之概述

化學名稱	供應商及料號	化學式	分子量(g/mol)
氯化鈉	Avantor，3627	NaCl	58.44
氯化鉀	Avantor，3045	KCl	74.5513
緩血酸胺	Avantor，4102	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.14
TRIS鹽酸鹽	Avantor，4106	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl	157.6
無水磷酸氫二鈉	Avantor，3804	Na ₂ HPO ₄	141.96
磷酸二氫鉀	Avantor，3248	KH ₂ PO ₄	136.086
蔗糖	Pfanstiehl，S-124-2-MC	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.3
泊洛沙姆188	BASF，50424596	HO(C ₃ H ₆ O) _a (C ₂ H ₄ O) _b (C ₃ H ₆ O) _a H	7680至9510
水	RMBIO，WFI-SUP-1X6	H ₂ O	18.0153

5.10.5 設備

【0512】 pH測定計：Mettler Toledo SevenExcellence，資產標籤1000

【0513】 低溫pH探針：INLAB COOL PRO-ISM。此pH探針可在低

至-30°C 偵測pH。

【0514】 天平：Mettler Toledo，XSR4002S，資產標籤0971（對於稱重較大質量）

【0515】 天平：Mettler Toledo，XSR105，資產標籤1020（對於稱重較小質量）

【0516】 -20°C AD冰箱：VWR 10819-664，資產標籤1213

【0517】 TA instruments差示掃描量熱計，DSC250/RCS90，序號DSC2A-00980，資產標籤0866。

【0518】 密度計：Anton Paar DMA500密度計，資產標籤1087

【0519】 滲透計：Advanced Instruments，資產標籤0472

5.10.6 方法

(a) 即時緩衝液pH追蹤

【0520】 用可偵測低至-30°C 之pH之INLAB COOL PRO-ISM低溫pH探針，監測不同調配物緩衝液之pH。將一毫升緩衝液置於15 mL Falcon管中，且隨後將pH探針浸沒於緩衝液中。使用一片封口膜來密封Falcon管與pH探針之間的間隙以避免污染及蒸發。將探針以及Falcon管置於-20 AD冰箱中。每2.5 min記錄緩衝液之pH及溫度，持續約20小時或直至pH與溫度行為達成重複模式為止。由自動除霜過程引起之溫度變化為緩衝液pH穩定性創造脅迫條件。

(b) 差示掃描熱量法

【0521】 使用TA Instruments DSC250運行低溫差示掃描熱量法(低溫DSC)。將約20 μ L樣品負載至Tzero盤中且用Tzero密封蓋旋緊。將樣品在25°C平衡2 min，隨後以5°C/min冷卻至-60°C，平衡2 min，隨後以5°C/min加熱至25°C。以習知模式收集熱流資料。

(c) 滲透壓

【0522】 滲透計使用冰點降低之技術來量測滲透壓。使用50 mOsm/kg、850 mOsm/kg及2000 mOsm/kg NIST可追蹤的標準物來進行儀器校準。290 mOsm/kg之參考溶液用於測定滲透計之系統適用性。

(d) 密度

【0523】 用Anton Paar DMA500密度計，使用水作為參考物來量測密度。密度計用水洗滌且隨後用甲醇洗滌，隨後在樣品之間風乾。

5.10.7 結果

(a) 即時緩衝液pH追蹤

【0524】 調配物緩衝液之pH在長期儲存期間維持生物藥物產品穩定性方面至關重要。當溫度降低至低於共熔點時，一些賦形劑組分可沈澱，引起緩衝液pH偏移且潛在地影響藥物產品穩定性。使用低溫pH探針，監測八種調配物緩衝液之pH變化以及溫度。監測2號調配物具有4%蔗糖之改良dPBS之pH及溫度之實例顯示於圖39中。在達到穩定之後所有調配物之pH在圖40中。

【0525】 1-7號基於PBS之調配物顯示隨著溫度自0降低至-18℃，pH降低之趨勢(圖41)。1號調配物(dPBS)顯示pH自7.4至4.2降低三個單位，為1-7號基於PBS之調配物間最大的pH偏移量值(圖42)。含磷酸氫二鈉之基於磷酸鹽之調配物在溶液冷凍後沈澱，且三個pH單位變化與前述報導相符(Zbacnik, 2017, Journal of Pharmaceutical Sciences, 106(3):713 - 733)。然而，當向溶液中添加4%至6%蔗糖時，2-7號調配物之pH僅降低一個pH單位。前述研究已顯示，海藻糖及甘露醇可藉由在某些條件下抑制緩衝鹽結晶，使冷凍溶液呈非晶態及抑制共晶熔融而減少pH偏移之量

值(Thorat及Suryanarayanan, 2019, *Pharmaceutical Research* 26(7):98)。
為了說明蔗糖減少基於PBS之調配物之pH偏移之機制，藉由DSC表徵所有調配物的相變行為。

【0526】 8號基於Tris之調配物之pH自7.6增加至8.7，其與回應於溫度降低Tris變化之pKa(-0.03/°C)相符(Zbacnik, 2017, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(3):713 - 733)。蔗糖在此調配物中用作低溫保護劑，此係由於Tris鹽在溶液冷凍時不結晶。

(b) 熱分析

【0527】 顯示於圖43中之1號調配物(dPBS)之低溫DSC熱分析圖具有共晶熔融，其中在-22.1°C處具有峰，繼之由於冰之熔融出現大的吸熱峰。未觀測到其他轉化。共晶熔融與氯化鈉及水共晶相符。顯示於圖43中之1號調配物之低溫DSC熱分析圖在約-43°C具有小放熱，此係由於在冷卻期間未完全結晶之非晶形氯化鈉結晶所致。

【0528】 顯示於圖44中之2號調配物(具有蔗糖之改良dPBS)之低溫DSC熱分析圖在-44.83°C具有玻璃轉化，繼之由於冰之熔融出現大的吸熱峰。未觀測到其他轉化。玻璃轉化與玻璃形成賦形劑蔗糖之存在相符。缺乏共晶熔融與藉由蔗糖賦形劑抑制結晶及維持非晶形黏稠狀態相符。此等結果與針對較低(3%)蔗糖與較高(0.25 M)氯化鈉含量所報導之結晶抑制及共晶熔融缺乏相符(Milton等人, 2007, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(7))。

【0529】 2-7號調配物具有相同組分，但無水磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀或蔗糖具有不同濃度。因此，3-7號調配物顯示與2號調配物類似的相變行為，在-40與-45°C之間具有玻璃轉化，繼之由於冰之熔融所致出現大

的吸熱峰(圖45)。所有8種調配物之相變溫度列舉於表21中。在含有6%蔗糖之調配物中，觀測到在-41至-42℃處之較高玻璃轉化溫度，進一步證明蔗糖對於抑制緩衝鹽結晶之效果。

(c) 滲透壓及密度

【0530】 滲透壓為在注射後決定調配物耐受性之一個關鍵因素。高滲透壓可導致局部不適、刺激及感覺發熱及疼痛等。建議對於意欲用於肌肉內或皮下注射之藥品，上限滲透壓應一般控制在600 mOsm/kg下(Wang, 2015, *Int J Pharm*, 490(1-2):308-15)。表23中之8種調配物之滲透壓在276至404 mOsm/kg範圍內，全部均在肌肉內或皮下注射之安全界限內。人類淚液之滲透壓約為318 mOsm/Kg (Hill等人, 1983, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 第24卷:1624-1626) 『Compounding Guide for Ophthalmic Preparations』報導，大部分患者可耐受滲透壓範圍在200至600 mOsm/L之溶液(McElhiney, 2013, *Compounding Guide for Ophthalmic Preparations*, 第1版)。所有8種調配物之密度在表23中。即使1號調配物之密度與2-8號調配物相比可能不呈現彼此顯著不同，但密度對於蔗糖製劑之計算可能有影響。

表23：熱分析及生理化學參數之概述

調配物編號	亦被稱作	滲透壓(mOsm/kg)	密度(g/mL)	Tg' (°C)	結晶(°C)
1	dPBS	276	1.0049	未偵測到	-42.75
2	具有4%蔗糖之改良dPBS	341	1.0188	-44.83	未偵測到
3	具有6%蔗糖之改良dPBS	402	1.0257	-41.59	
4	1/2及1/2具有4%蔗糖	328	1.0181	-44.84	
5	1/2及1/2具有6%蔗糖	404	1.0264	-42.15	
6	1/2及1/2具有6%蔗糖與80 mM NaCl	364	1.0255	-40.76	
7	1/4及1/4具有4%蔗糖	328	1.0182	-45.03	
8	具有4%蔗糖與100 mM NaCl之5 mM Tris	327	1.018	-45.25	

5.10.8 結論

【0531】 此研究之此等結果表明，在冷凍溶液中，dPBS調配物經受三個pH單位偏移。『具有4至6%蔗糖之改良dPBS調配物』可藉由低溫保護蔗糖賦形劑抑制結晶及維持非晶形黏稠狀態而將pH偏移減少至僅一個pH單位，如藉由用DSC進行之熱分析所表明。此表明，『具有蔗糖之改良dPBS調配物』在維持冷凍調配物中之溶液pH方面優於dPBS調配物。基於TBS之調配物表明在冷凍後極大的pH穩定性，且可值得進一步研究以作用於AAV冷凍調配物之替代性調配物緩衝液。所有8種調配物之滲透壓均在眼科及/或非經腸用途之可接受範圍內。

5.11 實例11：AAV之聚集為一種調配物挑戰

【0532】 已描述AAV粒子聚集，其中據報導需要至少200 mM之溶液離子強度來防止此聚集。美國專利9,051,542。然而，為了防止結晶，不建議較高離子強度(例如Bhatangar等人, 2007, Blood, 110(9):3233-44)。

【0533】 需要最小離子強度來防止聚集或AAV粒子之自結合。(圖46)。發現，防止粒子聚集或自結合所需之最小離子強度為AAV血清型依賴性的。可在低於200 mM之離子強度下防止AAV8聚集(圖47)，且與AAV8相比，AAV9所需之離子強度更小(圖48)。用較少鹽調配之能力對於冷凍及乾燥調配物而言為有利的。然而，粒子聚集方面之血清型特異性差異指示，不同血清型需要不同調配物，至少關於離子強度水準而言。

5.12 實例12：調配物A及調配物C活體外效能之比較

【0534】 此實例顯示調配物A及調配物C在長期穩定性方面之比較。

【0535】藉由章節4.5.3及/或本文提供之其他相關章節中顯示之相同或類似程序，進行研究。調配物C為具有60 mM NaCl及6%蔗糖『具有蔗糖之改良dPBS』之變體。調配物C包括0.2 mg/mL氯化鉀、0.2 mg/mL磷酸二氫鉀、3.50 mg/mL氯化鈉、1.15 mg/mL無水磷酸氫二鈉、60.0 mg/mL (6% w/v)蔗糖、0.001% (0.01 mg/mL)泊洛沙姆188，pH 7.4。

【0536】如圖49中所示，調配物C在-20°C穩定持續2年。顯示參考調配物A (dPBS)之-20°C儲存作為比較物，且其在-20°C不穩定。調配物B及C在-20°C可具有相當且優良的長期穩定性。

5.13 實例13：構築體II之治療用途

【0537】此實例顯示構築體II之治療用途。

5.13.1 非臨床研究

【0538】支援含構築體II之調配物A之治療用途之藥理學及毒理學研究之表列概述提供於表24中。

表24:非臨床研究.

研究之類型	物種	投與途徑	劑量(GC/眼睛)	持續時間	每組性別及數目	值得注意的發現
活體外結合親和力	NA	活體外	NA	NA	NA	在哺乳動物細胞(Expi293)中產生轉殖基因產物(抗VEGF Fab)，分離且測定結合親和力。構築體II轉殖基因產物與重組人類VEGF結合之平衡結合親和力常數為333 pM。
活體內藥理學	轉殖基因 Rho/VEGF小鼠	視網膜下	3×10^6 至 1×10^{10}	7天	(n=10-17隻/組)	此研究之目的係為了測定單一劑量之構築體II在幼年期轉殖基因Rho/VEGF小鼠(一種人類VEGF過度表現之模型)中之活體內功效。在構築體II處理之眼睛中，視網膜新血管生成之總面積顯著降低。判定 1×10^7 GC構築體II/眼睛之劑量為MED。
活體內藥理學	轉殖基因 Tet/opsin/VEGF小鼠	視網膜下	1×10^8 至 1×10^{10}	14天	(n=10隻/組)	此研究之目的係為了測定新血管生成之鼠類模型中之MED。視網膜脫落之發生率及程度劑量依賴性降低。判定在此極高VEGF表現模型中， 3×10^8 GC構築體II/眼睛之劑量為MED。在以 $\geq 3 \times 10^9$ GC/眼睛注射之所有眼睛中及在以更低劑量注射之群組中的一些眼睛中，偵測到抗VEGF Fab表現。此等結果將抗VEGF Fab表現與Tet/opsin/VEGF小鼠中之視網膜脫落預防相關。
活體內藥物動力學	石蟹獼猴 (Cynomolgus monkey)	視網膜下	1.00×10^{12}	7天	2M/2F	此研究之目的係為了評定轉殖基因產物表現及構築體II之生物分佈。另外，此研究中包括毒性之有限試驗指標

研究之類型	物種	投與途徑	劑量(GC/眼睛)	持續時間	每組性別及數目	值得注意的發現
						(endpoint)。轉殖基因產物在所有構築體II注射眼睛中表現，但未在血液中偵測到。未觀測到與構築體II或構築體II轉殖基因產物相關之不良發現。由於短的研究持續時間，不能進行生物分佈評定。
活體內藥物動力學	石蟹獼猴	視網膜下	1.00×10^{11}	10個月 (研究進行中)	2M/2F	此研究之目的係為了選擇用於研發之AAV8載體，且包括有限數目個用於評定轉殖基因產物及毒性之試驗指標。構築體II處理之動物在前房流體中快速表現轉殖基因產物。在所有眼睛中，轉殖基因產物之表現快速起動，首先在第15天偵測到。 10個月：在1/4動物中觀測到ONL變薄，無微觀相關性。在10個月之後，在2個安樂死動物中，在一個動物(1/4眼睛)中觀測到呈區域性且涉及外核層及視桿/視錐層之輕微視網膜萎縮。
活體內藥物動力學	石蟹獼猴	視網膜下	1.00×10^{12}	7天 10個月	1M/2F	研究之目的係為了評估在整個眼睛中AAV8載體mRNA之視網膜分佈及抗VEGF Fab之分佈。藉由RT-qPCR及藉由ISH，評定不同視網膜部分中之mRNA之含量。藉由酶聯免疫吸附分析，測定視網膜部分、前房流體及玻璃狀液中之抗VEGF Fab之濃度。抗VEGF Fab轉殖基因mRNA在整個視網膜中表現，在注射位點附近含量最高。抗VEGF Fab分佈在視網膜之所有

研究之類型	物種	投與途徑	劑量(GC/眼睛)	持續時間	每組性別及數目	值得注意的發現
						區域以及玻璃體及前房中。
活體內生物分佈	石蟹獼猴	視網膜下	1.00×10^{11}	14天 3個月	1M/2F (14天) 3M (90天)	此研究之目的係為了評估構築體II之生物分佈。大部分構築體II DNA大體上約束在注射位點中及其附近之視網膜部分內。在注射位點遠端之視網膜部分中、在晶狀體及角膜中及在一個動物之右視神經中偵測到較低量。在研究第14天，在構築體II處理之右眼之前房及玻璃體腔室液體中短暫偵測到構築體II載體DNA。背景上之構築體II DNA為不可偵測的。在非眼部組織中，在一個研究第90天動物之一個淚液腺及一個頷下淋巴結樣品中，略微偵測到背景之構築體II DNA。
活體外組織交叉反應	人類組織	活體外	NA	NA	NA	在任一個所檢查組織中，構築體II轉殖基因產物-生物素或蘭比珠單抗-生物素中未觀測到特異性陽性染色。所有其他觀測到之染色不同且被視為非特異性的。在此研究之條件下，在陽性對照材料(人類神經膠母細胞瘤及VEGF蛋白質斑點)中證實構築體II轉殖基因產物-生物素及蘭比珠單抗-生物素之抗原特異性結合。
活體內毒理學	石蟹獼猴	視網膜下	0、 1.00×10^{10} 或 1.00×10^{12} (右眼)	7天， 3個月 12個月	1M/2F或2F/1M/組 /時間點	在所有經處理動物中之前房流體中偵測到構築體II轉殖基因產物。在自投與構築體II之動物收集之大部分樣品中，構築體II DNA為容易偵測的。構築體II DNA之存在為劑量依賴性、暫時

研究之類型	物種	投與途徑	劑量(GC/眼睛)	持續時間	每組性別及數目	值得注意的發現
						的，且隨著時間推移降低。關鍵發現： 1.00 × 10 ¹² GC/眼睛：所表現之蛋白質含量時間依賴性降低。對於血清(1/6動物)及前房流體(3/6動物)中之構築體II轉殖基因產物持續IgG反應。對於AAV8衣殼之較高NAb反應。在3/6動物中，對於構築體II AAV8衣殼之持續T淋巴球反應。視網膜效果描述為ONL，及總視網膜自3個月開始變薄(SD-OCT)，在3、6、9及12個月(ERG)之後感光功能及受體後功能降低，及微觀變化描述為炎症、萎縮(視網膜及視神經)，以及自3個月開始視網膜脫落。 1.00 × 10 ¹⁰ GC/眼睛：NOAEL

NA：不適用；GLP：良好實驗室實踐；GC：基因體複本；VEGF：血管內皮生長因子；Fab：抗原結合片段；MED：極小有效劑量；M：雄性；F：雌性；GLP：良好實驗室實踐；GC：基因體複本；VEGF：血管內皮生長因子；Fab：抗原結合片段；ONL：外核層；INL：內核層；RT-qPCR：定量反轉錄-聚合酶鏈式反應；ISH：原位雜交

【0539】 可在食蟹獼猴中之3個月毒性研究中，評估使用新穎製造方法製備之構築體II之藥效學(抗VEGF Fab)、免疫原性、生物分佈及毒性。起始此GLP研究以支援潛在的替代投與途徑(脈絡膜上)且包括一組藉由視網膜下注射投與構築體II。研究可包括4組在每個眼睛中給予用改良BDS製造方法製造之測試物之動物及一組在每個眼睛中給予媒劑對照之動物(總共9個雄性及7個雌性)。研究可評估在每個眼睛中經由兩個50 μ L脈絡膜上注射投與之3個劑量的測試物[3×10^{10} GC/眼睛(3×10^{11} GC/mL)； 3×10^{11} GC/眼睛(3×10^{12} GC/mL)； 3×10^{12} GC/眼睛(3×10^{13} GC/mL)]及在每個眼睛中經由單一100 μ L視網膜下遞送投與之1個劑量的測試物[3×10^{11} GC/眼睛(3×10^{12} GC/mL)]。在給藥後3個月，可將動物安樂死以進行完全終末評估。

【0540】 此研究可用眼科檢查、眼內壓量測、光學相干斷層掃描技術、眼底攝影及全場視網膜電圖描記評定眼部毒性。該研究亦可評估眼房液及血清中之轉殖基因產物濃度、生物分佈、免疫原性、臨床病理學、器官重量及病理組織學。結果可經由評估安全性及轉殖基因產物表現來支援用改良BDS製造方法製造之FDP的臨床用途。

5.13.2 臨床研究

【0541】 目前在1/2a期首次用於人體之開放標記單次遞增劑量研究中評估含構築體II之調配物A，該研究具有在2年內評定患有nAMD之成人個體的五個劑量組。主要目標係為了評估在單一劑量投與之後經過24週，構築體II在所處理個體中之安全性及耐受性。

【0542】 在每組具有6 (組1-3)或12 (組4及5)個個體之五個劑量組中處理個體： 3×10^9 GC/眼睛(組1)、 1×10^{10} GC/眼睛(組2)、 6×10^{10} GC/

眼睛(組3)、 1.6×10^{11} GC/眼睛(組4)及 2.5×10^{11} GC/眼睛(組5)。

【0543】對於在構築體II投與之後初始24週(初始研究時段)，安全性為主焦點。可經由評定眼部及非眼部AE及嚴重不良事件(SAE)、臨床實驗室試驗(化學性質、血液學、凝血、尿分析)、免疫原性、眼部檢查及成像(BCVA、IOP、裂隙燈活組織檢視法、間接檢眼鏡檢查法、SD-OCT、螢光素血管造影、眼底自發螢光檢查及彩色眼底攝影)及生命跡象，來監測構築體II之安全性及耐受性以及臨床效果。

【0544】在完成初始研究時段之後，個體可繼續評定安全性直至在用構築體II處理後104週(第106週)。在研究結束時，可邀請個體參與長期追蹤(LTFU)研究以進行在投與構築體II後1/2a期研究加LTFU研究中進行五年累積持續時間之安全性追蹤。

【0545】四十二名個體在nAMD 1/2a期試驗中暴露於構築體II，且評估中期資料(自組5中最後一名參與個體投與構築體II後經過至少4週安全性追蹤)。構築體II視網膜下投與在所測試之所有劑量水準下均呈現具有良好耐受性，未報導有無構築體II相關AE或SAE。未觀測到視網膜變薄，亦無諸如以下之任何眼部臨床表現跡象：周邊視力喪失、視力下降或光幻視，該等臨床表現視為構築體II相關AE。

【0546】為了支援用改良BDS製造方法製造之FDP之可比較性，在評估分析比較及非臨床耐受性之後，可將新程序材料(例如調配物B)引入至進行中的1/2a期研究中之額外單獨組中。該組可包含給予最高測試劑量之單一視網膜下投與之6名個體，其中可接受的安全程度如藉由最小暴露3個月所測定(目前預期為組5 (2.5×10^{11} GC/眼睛； 1×10^{12} GC/mL)。可如對於前述1/2a期各組所描述，評估新穎製造方法材料之安全性、耐受性及

臨床效果，且若益處:風險概況與前述臨床材料相當，則可考慮新穎FDP材料用於確認3期研究。

5.14 實例14：冷藏短期穩定性

【0547】輸送冷凍藥物產品至臨床地點之物流及暫時儲存在診所直至安排患者接受其劑量，對於當地診所(非醫院診所)可能為挑戰。許多臨床地點不具有用於暫時儲存藥物產品之 -80°C ($\leq -60^{\circ}\text{C}$)冰箱。一些臨床地點可能具有 -20°C 冰箱，且前述實例(例如實例1、3及9)顯示，基於即時穩定性資料調配物B在 -20°C 穩定18個月及當外推時穩定30個月。其他診所不具有可靠的冰箱但可能具有 $2-8^{\circ}\text{C}$ 冷藏機。因此，邏輯上需要允許藥物產品在冷藏機中解凍隨後短期(至多在9與12個月之間)儲存在冷藏機中。

【0548】在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 於具有蔗糖之改良DPBS中之冷藏短期發展穩定性資料顯示，基於在 3.0×10^{13} GC/mL、 1.0×10^{12} GC/mL及 2.1×10^{11} GC/mL下之研究，活體外效能及其他品質屬性維持至少9個月。資料顯示於表25、表26及表27中。

【0549】在 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，載體基因體濃度、外觀、純度(藉由SDS-CGE)、粒度分佈(藉由DLS)、亞可見粒子(藉由HIAC)、游離DNA (藉由SYBR金)、pH或滲透壓方面無趨勢。在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 在延長時間之後，效能方面有降低趨勢。在Prism 8軟體(GraphPad LLC, San Diego, CA)中使用簡單線性回歸進行趨勢分析。效能資料趨勢顯示於圖50中。黑色實線顯示資料之回歸擬合： 3.0×10^{13} GC/mL (圓形)、 1.0×10^{12} GC/mL (方形)及 2.1×10^{11} GC/mL (三角形)。

【0550】對於濃度覆蓋兩個數量級之三個研究，在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 之效能損失之速率類似。分析指示，斜率上之差異不顯著，且資料可用每月之約-

2.0%之合併斜率擬合。資料指示，在2-8℃在9個月與12個月之間，效能將保留在可接受範圍(>75%)內。

表25：在 3.0×10^{13} GC/ML下含構築體II FDP之具有蔗糖之改良DPBS (倒置小瓶)在2-8℃的短期穩定性

測試	時間點(天)				
	0	15	32	63	96
活體外效能(%)	113	111	108	110	98
載體基因體濃度(藉由ddPCR) (GC/mL)	3.09×10^{13}	3.32×10^{13}	3.10×10^{13}	3.26×10^{13}	3.31×10^{13}
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子
病毒衣殼純度(藉由SDS-CGE) (%)	100	100	100	100	100
粒度分佈(藉由DLS直徑) (nm)	第1峰： 29.6	第1峰： 29.7	第1峰： 30.3	第1峰： 29.2	第1峰： 29.0
PD%	14.1	12.8	15.1	15.1	12.6
質量%	100	100	100	100	100
強度%	100	100	100	100	100
亞可見粒子(藉由HIAC)	$\geq 2\mu\text{m} = 22$ $\geq 10\mu\text{m} = 2$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$	未測試	$\geq 2\mu\text{m} = 50$ $\geq 10\mu\text{m} = 2$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$	未測試	$\geq 2\mu\text{m} = 128$ $\geq 10\mu\text{m} = 3$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$
游離DNA (%) (藉由SYBR金)	1.0	1.1	1.2	0.7	0.8
pH	7.5	NT	7.3	7.5	7.4
滲透壓(mOsm/kg)	347	NT	347	343	345

NT=未測試

表26：在 1.0×10^{12} GC/ML下含構築體II FDP之具有蔗糖之改良DPBS在2-8℃的短期穩定性

測試	時間點(月)					
	0	3	6	9	12	18
活體外效能(%)	82	87	84	86	70	67
載體基因體濃度(藉由ddPCR) (GC/mL)	1.0×10^{12}	9.2×10^{11}	8.9×10^{11}	9.8×10^{11}	1.0×10^{12}	1.1×10^{12}
游離(%) (藉由SYB金) ^a	NT	定性	定性	NT	1.7	2.0
粒度分佈(單位為nm之DLS累積直徑)	26.1	28.5	28.2	27.9	28.5	28.3
pH	7.3	NT	NT	NT	7.3	NT

測試	時間點(月)					
	0	3	6	9	12	18
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

NT=未測試

^a 游離DNA方法最初建立為半定量比較法，且結果相對於至多9個月之時間點之≤ -60℃穩定性樣品而報導。更新方法以提供在9個月後之時間點之絕對值游離DNA%。

表27：在 2.1×10^{11} GC/ML下含構築體II FDP之具有蔗糖之改良DPBS在2-8℃的短期穩定性

測試	時間點(月)							
	0	1	2	3	6	9	12	18
活體外效能(%)	113	115	100	100	77	90	64	68
載體基因體濃度(藉由ddPCR)(GC/mL)	2.1×10^{11}	2.2×10^{11}	2.2×10^{11}	2.1×10^{11}	2.0×10^{11}	2.1×10^{11}	2.2×10^{11}	2.4×10^{11}
游離DNA (%) (藉由SYBR金) ^a	NT	定性	定性	定性	定性	NT	1.6	2.3
粒度分佈(單位為nm之DLS累積直徑)	21.62 ^b	26.9	27.5	27.0	26.6	28.8	28.7	28.6
pH	7.3	NT	NT	NT	7.4	NT	7.2	NT
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

NT=未測試

^a 游離DNA方法最初建立為半定量比較法，且結果相對於至多9個月之時間點之≤ -60℃穩定性樣品而報導。更新方法以提供在9個月後之時間點之絕對值游離DNA%。

^b 在初始時間點，在較低濃度下之DLS原始資料收集顯示蔗糖賦形劑將表觀大小偏向下限值之基質干擾貢獻。

5.15 實例15：室溫短期穩定性

【0551】 在製造、標記、劑量製備及遞送期間，藥物產品可能暴露於室溫短時段。

【0552】 在 3.0×10^{13} GC/mL下含構築體II之具有蔗糖之改良dPBS在約22°C (20.7-23.7°C)下之受控室溫短期發展穩定性資料顯示於表28中。載體基因體濃度、外觀、純度(藉由SDS-CGE)、粒度分佈(藉由DLS)、亞可見粒子(藉由HIAC)、游離DNA (藉由SYBR金)、pH或滲透壓方面無趨勢。在受控室溫下效能方面有降低趨勢。在Prism 8軟體(GraphPad LLC, San Diego, CA)中使用非線性回歸功能進行統計分析。效能資料最佳擬合於線性回歸模型。最好擬合斜率在受控室溫下為每天-0.8958%。在室溫下之效能趨勢顯示於圖51中。黑色實線顯示資料之回歸擬合且虛線顯示95% CI。通常，製造及遞送藥物產品需要至多3天總累積暴露。此暴露對應於效能方面預期平均2.7%降低，其自產物穩定性觀點而言為可接受的。

表28：在 3.0×10^{13} GC/ML下含構築體II FDP批次200320-314-DL7之具有蔗糖之改良DPBS在受控室溫下的短期穩定性

測試	時間點(天)							
	0	1	3	7	10	15	24	32
活體外效能(%)	113	107	103	102	92	86	90	80
載體基因體濃度(藉由ddPCR)(GC/mL)	3.09×10^{13}	3.18×10^{13}	3.70×10^{13}	3.26×10^{13}	3.20×10^{13}	3.25×10^{13}	3.49×10^{13}	2.85×10^{13}
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子
病毒衣殼純度(藉由SDS-CGE)(%)	100	NT	NT	NT	100	100	NT	100
粒度分佈(藉由DLS直徑)(nm)	第1峰：29.6	第1峰：29.8	第1峰：30.5	第1峰：29.6	第1峰：30.0	第1峰：29.3	第1峰：30.0	第1峰：29.6
PD%	14.1	15.3	18.8	15.4	16.4	10.8	14.0	12.0
質量%	100	100	100	100	100	100	100	100
強度%	100	100	100	100	100	100	100	100

測試	時間點(天)							
	0	1	3	7	10	15	24	32
亞可見粒子(藉由HIAC)	$\geq 2\mu\text{m} = 22$ $\geq 10\mu\text{m} = 2$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$	NT	NT	$\geq 2\mu\text{m} = 22$ $\geq 10\mu\text{m} = 3$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$	NT	$\geq 2\mu\text{m} = 17$ $\geq 10\mu\text{m} = 0$ $\geq 25\mu\text{m} = 0$ $\geq 50\mu\text{m} = 0$	NT	NT
游離DNA (%) (藉由SYBR金)	1.0	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.0	0.7
pH	7.5	NT	NT	NT	NT	7.5	NT	7.5
滲透壓 (mOsm/kg)	347	NT	NT	NT	NT	347	NT	346

NT=未測試

5.16 實例16：在加速高冷凍溫度漂移條件(-15℃、-7℃及-20℃『自動除霜』冰箱)下評估調配物組合物穩固性

【0553】 研究若干調配物變體之效能以測定當保持在高於 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 之預期儲存溫度偏移範圍之溫度下時其相對於調配物B的相對穩定性。

【0554】 表29中之第一列顯示調配物B之結果，作為對照。結果顯示在 -15°C 、 -7°C 及 -20°C 『自動除霜』冰箱(每4小時自 -20°C 升至約 -6°C 變化) 6個月之漂移。在6個月之後，對於所有條件，效能均維持在可接受的量，表明調配物B具有穩固穩定性。

【0555】 調配物D為具有顯著較高蔗糖及較低鹽之調配物B之變化形式。調配物E為具有中等較高蔗糖及較低鹽之調配物B之變化形式。此等調配物兩者在 -15°C 6個月之後均具有與調配物B類似的效能，表明調配物B具有穩固穩定性設計空間。相對於已在調配物B中之更高蔗糖及更低鹽並不改良調配物B之穩定性，指示在此廣範圍內之組成對於穩定性而言為可接受的。

【0556】 調配物F為添加5 mM TRIS緩衝液以試圖將pH波動降至最

低或抵消pH波動之改良調配物B。基於假設，由於磷酸鹽之pH在冷凍時降低及TRIS之pH增加，所以兩者之組合可能更穩定，來研究此調配物。在-15℃ 6個月之後，此調配物亦具有與調配物B類似的效能。

【0557】 調配物G為一種具有TRIS緩衝液而非磷酸鹽緩衝液、在較低含量下之硫酸鈉替代NaCl、較高含量之蔗糖及較高泊洛沙姆188的新穎調配物。在-7℃ 6個月之後，此調配物具有與調配物B類似的效能。

【0558】 此等資料表明，調配物B中添加之蔗糖之含量(≥4%)為關鍵的低溫保護賦形劑。此含量之蔗糖足以減輕pH偏移及鹽結晶以使效能損失降至最低。蔗糖與基於氯化鈉或硫酸鈉之鹽調配物一起具有低溫保護形，且任一種鹽適合於調配物。具有較低鹽藉由硫酸鈉替代氯化鈉之調配物並不具有改良穩定性。具有較低鹽或具有較高蔗糖未觀測到其他穩定性改良，表明4%為蔗糖與100 mM氯化鈉一起提供低溫保護特性之穩固含量。磷酸鹽用TRIS緩衝液替代並不改良穩定性，且任一種緩衝液可用於穩定的蔗糖及基於鹽之調配物中。較高含量之泊洛沙姆188亦並不改良穩定性。

實例29：在加速高冷凍溫度漂移條件(-15℃、-7℃及-20℃『自動除霜』冰箱)下評估調配物組合物穩固性

調配物	活體外效能(%)			
	初始時間0	在-15℃ 6個月	在-7℃ 6個月	在-20℃『自動除霜』中6個月
調配物B——用於比較具有4%蔗糖、0.001% P188、pH 7.4之改良dPBS之對照	136	93	93	86
調配物D (改良dPBS，14%蔗糖，60 mM NaCl，0.001% P188，pH 7.4)	163	95	未測試	未測試
調配物E 改良dPBS，6%蔗糖，80 mM	138	92	未測試	未測試

調配物	活體外效能(%)			
	初始時間0	在-15℃ 6個月	在-7℃ 6個月	在-20℃『自動除霜』中6個月
NaCl，0.001% P188，pH 7.4				
調配物F 改良dPBS，5 mM Tris，6%蔗糖，80 mM NaCl，0.001% P188，pH 7.4	143	84	未測試	未測試
調配物G 5 mM TRIS，30 mM Na ₂ SO ₄ ，9%蔗糖，0.005% P188，pH 7.0	143	未測試	93	未測試

5.17 實例17：調配物A及調配物B在合格特徵方面之比較

【0559】 此實例為上文實例2之更新型式。

【0560】 此實例顯示調配物A及調配物B在合格特徵方面之比較。

5.17.1 合格及表徵分析方法及規格

【0561】 此章節顯示一批含最終藥物產品(FDP)之調配物A及一批含FDP之新『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』(調配物B)之分析憑證之批次合格結果的比較。除合格測試之外，可比較動態光散射(DLS)之常規特徵測試結果。支援可比較性之所提議測試之組及支援可比較性之接受標準顯示於表30中。

表30：可用於進行FDP之分析比較之合格接受標準及表徵方法

測試	分析方法	接受標準
外觀	視覺檢查	無色透明至乳白色溶液，不含外來顆粒
pH	USP<791>	6.9 - 7.9
滲透壓	USP<785>	滿足批次合格規格。 ¹
載體基因體濃度(內容物)	轉殖基因ddPCR	滿足批次合格規格。 ²
載體基因體濃度(屬性)	轉殖基因ddPCR	確認為構築體II基因體
衣殼屬性(屬性)	ELISA	確認為AAV8血清型
活體外效能(效能)	HEK293轉導/抗VEGF ELISA	50 - 200%相對效能
病毒衣殼純度(純度)	SDS-CGE	≥90%純度(純度%：VP1、VP2及VP3之總和)
顆粒物質(雜質)	USP<787> HIAC	≤ 50個顆粒/毫升 (大小≥ 10 μm)

測試	分析方法	接受標準
		≤ 5個顆粒/毫升 (大小≥ 25 μm) ≤ 2個顆粒/毫升 (大小≥ 50 μm)
內毒素(安全性)	USP<85>	≤ 0.5 EU/mL
無菌性(安全性)	USP<71>	不生長
粒度分佈(純度)	動態光散射	主峰直徑與完整AAV相符

5.17.2 FDP調配物變化之背景

【0562】 開發『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』(調配物B)以改良長期冷凍儲存穩定性及FDP穩定性對於冷凍/解凍循環的穩固性。調配物變化涉及添加4% w/v之低溫保護賦形劑蔗糖及氯化鈉含量自137 mM降低至100 mM以維持適當滲性。其他調配物賦形劑及含量一致。藉由向含BDS之DPBS (調配物A)中添加更濃蔗糖摻入溶液以調整最終組合物之組成，來生成含FDP之『具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS，pH 7.4』FDP調配物。組合物亦可使用切向流過濾緩衝液交換來獲得。

5.17.3 FDP調配方法變化之評定

【0563】 對於兩種方法，摻入、混合及過濾步驟涉及類似方法步驟、處理及接觸表面。摻入方法引起稀釋1.37倍。隨後，接著稀釋至目標濃度。

5.17.4 FDP調配物變化對於臨床安全性及功效之影響之評定

【0564】 當與DPBS調配物A相比時，FDP調配物B在安全性或功效方面可能無差異。產品品質概況及合格規格相同，除了一般屬性滲透壓以外。

【0565】 對於DPBS調配物A，滲透壓為240-340 mOsm/kg；對於調配物B，滲透壓為295-395 mOsm/kg。此等係由於調整調配物B中之蔗糖

及氯化鈉含量所致。基於文獻(參見例如Negi and Marmour, 1984 Invest Ophthalmol Vis Sci. 25(5):616-20)，此等略微較高滲透壓值對於泡之再吸收時間可能無影響。

5.17.5 自調配物A改變為調配物B對於分析合格方法之影響之評定

【0566】 分析方法之評定指示，其符合目的。其程序之輕微改變可提供新FDP (表31)。

表31：新FDP組成對於分析合格方法之影響之評定

測試	分析方法	FDP變化之影響之評定
外觀	視覺檢查	無影響。預期新FDP調配物(調配物B)為無色透明至乳白色溶液，不含外來顆粒。
pH	USP<791>	無影響。新FDP調配物具有相同緩衝物種及含量。
滲透壓	USP<785>	無影響。對於新FDP，冰點降低方法得到預期結果。
載體基因體濃度(內容物)	轉殖基因ddPCR	無影響。對於新FDP，發展樣品達到目的且滿足分析適用性標準。
載體基因體濃度(屬性)	轉殖基因ddPCR	無影響。
衣殼屬性(屬性)	ELISA	無影響。
活體外效能(效能)	HEK293轉導/抗VEGF ELISA	無影響。對於新FDP，發展樣品達到目的且滿足分析適用性標準。
病毒衣殼純度(純度)	SDS-CGE	無影響。
顆粒物質(雜質)	USP<787> HIAC	無影響。不透光度視溶液之透明度而定，新FDP類似。
內毒素(安全性)	USP<85>	無影響。對於新FDP，所測試樣品滿足分析適用性標準。
無菌性(安全性)	USP<71>	無影響。顯示新FDP緩衝液不抑制生長。
粒度分佈(純度)	動態光散射(資料來自在合格或T0穩定性下進行之常規表徵測試)	在方法環境中，可調整溶液黏度之變化。發展資料顯示表觀大小略微增加(1至3 nm)，與蔗糖對於水合作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響相關。

5.18 實例18：調配物A及調配物B在穩定性方面之比較

【0567】 此實例顯示調配物A及調配物B在其穩定性方面之比較。此實例為上文實例3之更新型式。

【0568】 新調配物B防止在冷凍/解凍循環及溫度脅迫後破壞衣殼及釋放少量游離DNA。目前24個月長期穩定性研究表明，在FDP調配物B中，在 -80°C ($\leq -60^{\circ}\text{C}$)及 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ，維持活體外相對效能及其他品質屬性。

【0569】 可獲得的冷凍/解凍資料、溫度脅迫資料及長期穩定性資料指示在新調配物中之類似或改良穩定性。

【0570】 於新FDP調配物B中之FDP批次在 -80°C ($\leq -60^{\circ}\text{C}$)及 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 之長期穩定性可能下降，且可作為穩定性程式之一部分監測穩定性趨勢資料以確保新FDP之過期日期順應規定。

5.18.1 含構築體II之DPBS及含築體II之新FDP調配物B之冷凍/解凍研究

【0571】 進行研究以評定冷凍/解凍循環對於含構築體II之DPBS及含築體II之新FDP調配物B的影響。選擇冷凍/解凍速率以使得在可在製造BDS瓶子期間或在DP小瓶之供應鏈或診所中發生之預期速率的範圍內。施加多個循環以脅迫樣品超出在診所中可能發生的範圍。

【0572】 研究之結果表明，當暴露於至多五個冷凍/解凍循環，在緩慢($0.12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或在約11小時內)及/或快速($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 或在約1小時內)之情況下自 $< -60^{\circ}\text{C}$ 至 25°C 時，調配物B比調配物A更穩固。分別對於冷凍及解凍，評定緩慢及快速速率之所有排列(亦即，FF/FT =快速冷凍/快速解凍；FF/ST =快速冷凍/緩慢解凍；SF/FT =緩慢冷凍/快速解凍；SF/ST =緩慢冷凍/緩慢解凍)。

【0573】 冷凍及解凍速率可影響生物製劑之穩定性(Cao等人, 2003, Biotechnol. Bioeng. 82(6):684-90))。在冷凍期間水之結晶可導致賦形劑濃縮，此可影響生物製劑之穩定性。相分離或pH偏移亦可發生，其影響生物製劑之穩定性。快速冷凍可引起較小冰晶體及較大冰-水界面區域，

此可賦予界面應力。快速冷凍亦可捕獲冰中之氣泡，從而導致在解凍期間空氣-水界面應力。緩慢解凍可導致冰之再結晶，其可影響溶液中之生物製劑之穩定性，此係由於界面應力。

【0574】 在此研究中，藉由活體外相對效能、尺寸排阻層析純度 (SEC)、游離DNA含量(藉由螢光染料)及粒度分佈(藉由動態光散射)分析樣品。藉由量熱法評定在冷凍及解凍後調配物之相變化。

【0575】 在此研究中，對於不同的快速及緩慢冷凍及解凍速率之速率，結果存在極小差異。凍融研究結果之總體概述提供於表32中。在此研究中施加之溫度概況(快速冷凍/緩慢解凍)之代表性實例顯示於圖9中(其他概況排列未顯示)。對於快速及緩慢冷凍及解凍速率之所有排列，效能結果與對照類似。在調配物A或調配物B之冷凍/解凍循環後，在方法變異性內粒度分佈無變化(參見圖12)。調配物B中之累積DLS直徑(約28 nm)略微高於DPBS調配物A (27 nm)中。此表觀大小之極略微增加與蔗糖對於水合作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響有關。對於含構築體II之DPBS調配物A，在所有凍融脅迫條件下，游離DNA (藉由染料螢光)增加(自1.7%升至6.9%)。藉由SEC定量之游離DNA大體上與染料螢光相符。藉由SEC，第一個前峰含有游離DNA，第二個小的前峰含有聚集物，且後峰含有緩衝液物種(參見圖10及圖11)。藉由SEC之略微較低游離DNA可能係由於與主峰共溶離或與緩衝液共溶離或不進入柱之極小或極大DNA片段所致。對於快速或極緩慢凍融速率之不同排列，增加具有類似量值，且無明顯區別。對於調配物B，未觀測到游離DNA或聚集物增加。

【0576】 在約-41℃，在調配物A中觀測到小放熱，此係由於在冷卻期間未完全結晶之非晶形氯化鈉結晶所致(圖13)。亦觀測到具有未解析的

低溫肩峰之共晶熔融，其中對於調配物A在-22.1℃處具有峰。氯化鈉之相同共晶及再結晶事件已在文獻中報導(Milton等人, 2007, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(7))。調配物B缺乏共晶熔融(圖14)與結晶之抑制相符。在調配物B中藉由低溫保護蔗糖賦形劑維持非晶形黏稠狀態可提供在冷凍/解凍循環後保護以免於衣殼破壞及釋放游離DNA。因此，改變為調配物B引起與調配物A相比類似或改良的穩定性。

表32：凍融速率對於含構築體II之DPBS及含構築體II之新FDP調配物B之影響

冷 凍 及 解 凍 速 率 ^c	含構築體II之具有0.001%泊洛沙姆188 之DPBS，pH 7.4 (調配物A)				含 構 築 體II之『具有4%蔗糖及 0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS， pH 7.4』 (調配物B)			
	游 離 DNA(%) ^a	SE- HPLC ^b 前 峰 (%)	DLS累積 直 徑 (nm)	活體外 相對效 能(%)	游 離 DNA(%) ¹	SE- HPLC ^b 前 峰 (%)	DLS累積 直 徑 (nm)	活 體 外 相 對 效 能(%)
對照	1.7	2.1	26.8	88	2.5	2.3	28.0	87
5×FF/FT	6.9	4.5	28.4	88	2.7	1.6	28.5	89
5×FF/ST	5.9	4.5	26.7	87	2.5	1.2	27.9	88
5×SF/FT	6.6	3.6	26.7	88	2.6	1.1	27.7	92
5×SF/ST	6.8	3.4	26.9	86	2.7	1.5	28.1	88

d. 百分比游離DNA係基於與根據GC/mL (OD 260 nm)計算之總DNA相比之所量測量。

e. SEC結果係基於260 nm波長通道計算。

f. 實際產物溫度『快速』速率為約一小時(對於冷凍)及1.5小時(對於解凍)。對於冷凍及解凍兩者而言，『緩慢』速率均為約11小時。

5.18.2 含構築體II之調配物A及含構築體II之新FDP調配物B之溫度脅迫穩定性

【0577】 在37℃，以1.0×10¹² GC/mL進行4天之溫度脅迫發展穩定性研究用於評估調配物A及調配物B之相對穩定性。用於評定穩定性之分

析包括於以下中：活體外相對效能(IVRP)、載體基因體濃度(VGC，藉由ddPCR)、游離DNA(藉由染料螢光)、動態光散射、外觀及pH。調配物A中之結果顯示於表33中，且調配物B之結果顯示於表34中。對於兩種調配物，在分析變異性內觀測到相當的效能降低，每天約14至16% (參見圖15)。載體基因體複本亦小幅降低，調配物A及調配物B兩者相當。調配物B中之累積DLS直徑(約29-34 nm)略微高於DPBS調配物A (28-30 nm)中。此表觀大小之極略微增加(1至3 nm)與蔗糖對於水合作用且因此AAV衣殼之流體動力學行為之影響有關。對於調配物A或調配物B而言，在脅迫研究期間，在方法變異性內DLS直徑方面無此趨勢。調配物B關於衣殼破壞而言略微更穩定，且具有更低的游離DNA含量。對於調配物A，游離DNA增加約1至3%，且對於調配物B，增加仍低於1% (參見圖16)。總體而言，調配物A及調配物B之溫度脅迫穩定性類似，其中調配物B關於衣殼破壞及游離DNA之釋放而言略微更穩定。因此，改變為調配物B可引起與調配物A相比類似或改良的穩定性。

表33：保持在37°C，含構築體II之調配物A 1.0×10¹² GC/ML之溫度脅迫穩定性

測試/時間點	0天	1天	2天	4天
IVRP (%)	128	111	96	75
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	9.7×10 ¹¹	9.5×10 ¹¹	8.6×10 ¹¹
游離DNA(%)	1.27	2.13	2.30	3.12
DLS直徑(nm)	28.3	28.7	28.4	30.2
pH	7.4	7.4	7.4	7.6
外觀	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色， 無粒子

表34：保持在37°C，含構築體II之調配物B 1.0×10¹² GC/ML之溫度脅迫穩定性

測試/時間點	0天	1天	2天	4天
IVRP (%)	143	121	101	83
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	1×10 ¹²	9.2×10 ¹¹	8.8×10 ¹¹

測試/時間點	0天	1天	2天	4天
游離DNA(%)	0.59	0.83	0.84	0.83
DLS直徑(nm)	28.7	34.2	32.8	29.5
pH	7.2	7.4	7.3	7.3
外觀	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色，無 粒子	透明無色， 無粒子

5.18.3 含構築體II之新FDP調配物B之長期穩定性

【0578】 長期發展穩定性表明，在FDP調配物B中，在-80℃(≤ -60℃)下24個月及在-20℃ 18個月，維持活體外相對效能及其他品質屬性。在-20℃之研究在18個月時終止，因為此表示在此溫度下之實質性持續時間且足以表明在此較高(較暖)冷凍穩定性溫度下調配物B之長期穩定性的穩固性。基於ICH Q1E指南、穩定性資料之評估(Evaluation of Stability Data)中概述之原理，資料之外推指示，12個月外推為正當的，及調配物在-80℃ (≤ -60℃)下將穩定至少36個月且對於-20℃之較高儲存溫度穩定30個月。在 1.0×10^{12} GC/mL下及在 2.1×10^{11} GC/mL下進行研究。用於評定穩定性之分析包括活體外相對效能(IVRP)、載體基因體濃度(VGC，藉由ddPCR)、游離DNA (藉由染料螢光) (相對於-80℃，直至9個月之時間點，及在12個月絕對百分比)、尺寸排阻層析(SEC) (僅 1.0×10^{12} GC/mL)、動態光散射(DLS)、pH及外觀。

【0579】 在-80℃持續24個月之穩定性方面的所有結果無趨勢，及在-20℃持續18個月之穩定性方面的所有結果無趨勢。對於-80℃及-20℃，在方法變異性內，所有結果類似且類似於初始時間點結果。保持在-80℃ (表35)及-20℃ (表36)下之 1.0×10^{12} GC/mL及保持在-80℃ (表37)及-20℃ (表38)下之 2.1×10^{11} GC/mL之長期穩定性資料表明，基於即時資料構築體II在調配物B中穩定至少24個月，且外推預期穩定至少36個月。IVRP效能趨勢圖顯示於圖52及圖53中。IVRP效能顯示與方法變異性相比

在24個月內長期穩定性資料無一致趨勢。

表35：在-80℃在1.0×10¹² GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月	18個月	24個月
IVRP (%)	82%	91%	90%	112%	110%	101%	102%
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	9.4×10 ¹¹	9.6×10 ¹¹	9.8×10 ¹¹	9.7×10 ¹¹	1.2×10 ¹¹	9.62×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照，或%)	1.00	1.00	1.00	NA	1.1%絕對值)	1.4%	1.7%
SEC (純度%)	99.1	98.9	99.1	未測試	99.16	98.09	待定
DLS直徑 (nm)	NA	28.4	28.1	27.9	28.7	28.2	27.8
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.3	未測試	未測試
外觀	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子

表36：在-20℃在1.0×10¹² GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月	18個月
IVRP (%)	82%	98%	90%	115%	85%	91%
VGC (GC/mL)	1×10 ¹²	9×10 ¹¹	9.6×10 ¹¹	9.9×10 ¹¹	9.5×10 ¹¹	1.1×10 ¹²
游離DNA (相對於-80℃對照，或%)	1.00	0.96	0.97	未測試	1.5%	1.5%
SEC (純度%)	99.1	98.8	99.3	未測試	99.20	99.11
DLS直徑(nm)	NA	29.8	28.2	28	29.1	28.5
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.3	未測試
外觀	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子	透 明 無色，無粒子

表37：在-80℃在2.1×10¹¹ GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月	18個月	24個月
IVRP (%)	113%	107%	120%	104%	97%	111%	115%
VGC (GC/mL)	2.1×10 ¹¹	2.1×10 ¹¹	2.2×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹	2.3×10 ¹¹	2.7×10 ¹¹	2.14×10 ¹¹
游離DNA (相對於-80℃對照，或%)	1.00	1.00	1.00	未測試	1.4%	1.4	1.6

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月	18個月	24個月
DLS直徑 (nm)	NA	25.3	26.0	28.9	28.1	29.1	28.8
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.2	未測試	未測試
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

表38：在-20℃在 2.1×10^{11} GC/ML下含構築體II之調配物B之長期穩定性

測試/時間點	0個月	3個月	6個月	9個月	12個月	18個月
IVRP (%)	113%	104%	115%	109%	86%	91%
VGC (GC/mL)	2.1×10^{11}	2.1×10^{11}	2.1×10^{11}	2.2×10^{11}	2.3×10^{11}	2.4×10^{11}
游離DNA (相對於-80℃對照)	1.00	0.99	1.10	未測試	1.8%	1.9%
DLS直徑(nm)	NA	26.1	25.8	28.9	30.3	29.5
pH	7.3	未測試	未測試	未測試	7.4	未測試
外觀	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子	透明無色，無粒子

5.19 實例19：構築體II之非人類靈長類研究

【0580】 將活體內評估調配物1及調配物2（非人類靈長類研究）。將含構築體II之調配物I或含構築體II之調配物II視網膜下或脈絡膜上投與至非人類靈長類之眼睛，且將在投與後在變化時間點測定非人類靈長類動物之眼睛中之構築體II的蛋白質含量。

5.20 實例20：探究在患有新生血管性老年性黃斑變性之參與者中經由視網膜下遞送投與兩個劑量之於兩個調配物中之構築體II基因療法之藥效學的2期開放標記研究

【0581】 在此2期開放標記多小組研究中，大致60名滿足納入/排除標準之參與者(每組15名)將入選4個依序劑量組。劑量組將包含含有2個劑量中之1者之構築體II之2個中之1個調配物，以便基於水狀液TP濃度探究構築體II之藥效學。試驗指標闡述於下表39中。

表39：目標及試驗指標

量測	目標	試驗指標
主要		
藥效學	● 評定在第24週水狀液中之構築體II TP濃度	● 在第24週水狀液中之構築體II TP濃度
次要		
藥效學	● 評定在第12週水狀液中之構築體II TP濃度	● 在第12週水狀液中之構築體II TP濃度
安全性	● 評估構築體II至第24週之安全性及耐受性	● 眼部AE之發生率及嚴重程度 ● 非眼部AE之發生率及嚴重程度
功效	● 評估構築體II對BCVA之影響 ● 評估構築體II對CRT之影響，如藉由SD-OCT所量測 ● 評估構築體II對CFT之影響，如藉由SD-OCT所量測 ● 評定在24週內對補充抗VEGF療法之需求	● 基於ETDRS評分，至第24週，BCVA自基線之平均變化 ● 至第24週，CRT自基線之平均變化，如藉由SD-OCT所量測 ● 至第24週，CFT自基線之平均變化，如藉由SD-OCT所量測 ● 至第24週，補充抗VEGF注射之平均數目 ● 注射構築體II前後補充抗VEGF之年速率之變化百分比 ● 在注射之後第4週至第24週，接受補充抗VEGF之參與者之比例
探究性		
安全性	● 評估新萎縮區域之發生率及隨著時間推移之變化 ● 評估新視網膜著色區域之發生率及隨著時間推移之變化	● 新地圖狀萎縮之發生率 ● 在24週內地圖狀萎縮之進展 ● 新視網膜著色之發生率 ● 在24週內視網膜著色之進展
功效	● 第一次補充抗VEGF之時間	● 第一次補充抗VEGF注射之時間
免疫原性	● 評估構築體II之免疫原性 ● 測定淚液樣品中之載體脫落	● 免疫原性量測(血清AAV8：NAb及TAb) ● 藉由PCR偵測淚液中之AAV8
生物標記	● 評定水狀液VEGF-A濃度	● 在第12週及第24週之VEGF-A濃度(水狀液)

AAV8 =腺相關病毒血清型8；AE =不良事件；BCVA =最佳矯正視力；CFT =中心視窩厚度；CRT =中心視網膜厚度；ETDRS =早期治療糖尿病性視網膜病變研究；NAb =中和抗體；PCR =聚合酶鏈式反應；SD-OCT =頻譜域-光學相干斷層掃描技術；TAb =總結合抗體；TP =轉殖基因產物；VEGF =血管內皮生長因子

5.20.1 納入標準

【0582】 參與者僅在符合以下所有標準時才有資格被納入研究：

1. 年齡 ≥ 50 歲且 ≤ 89 歲之男性或女性。
2. 在第1次篩選問診時研究眼睛之ETDRS BCVA-字母評分在 ≤ 78 與 ≥ 40 之間。

若雙眼均符合條件，則研究眼睛必須為研究者在隨機分組之前判定的參與者之視力較差的眼睛。

3. 在第1次篩選問診時，必須具有研究眼睛繼發於老年性黃斑變性(AMD)之中央凹下CNV的診斷以及視網膜側(parafovea) (3 mm黃斑中心，基於ETDRS網格)內的流體，如藉由CRC所評定。

CNV病變特徵：病變大小需小於10個視盤面積(典型的視盤面積= 2.54 mm^2)。

4. 研究眼睛必須為人工晶狀體(白內障手術後至少12週)。
5. 必須願意且能夠遵守所有的研究程序，且在研究期間有空。
6. 女性必須為絕經後(定義為至少連續12個月無月經)或手術絕育(亦即進行過雙側輸卵管結紮/雙側輸卵管卵巢切除術、雙側輸卵管閉塞術、子宮切除術或雙側卵巢切除術)。否則，女性必須在第1次篩選問診時尿液及血清妊娠測試結果呈陰性，且願意在研究期間進行額外的妊娠測試。
7. 育齡婦女(WOCBP) (及其男性伴侶)必須願意使用高效避孕方法，且與WOCBP發生性關係之男性參與者必須願意自第1次篩選問診時開始使用保險套，直至構築體II投與後24週。
8. 必須願意且能夠提供書面、簽署的知情同意書。
9. 基於篩選問診2 SD-OCT，參與者必須具有 $> 50 \text{ }\mu\text{m}$ 或 $> 50\%$ 之流體

改善(參見下文反應標準)及具有 $<400\ \mu\text{m}$ 之CRT，如藉由CRC所測定。應注意，若參與者患有除流體促進CRT增加之外之疾病(亦即，色素上皮脫離[PED]或視網膜下高反射材料[SHRM])，則參與者在其具有 $< 50\ \mu\text{m}$ 流體(視網膜內或視網膜下) (如藉由CRC所測定)時將入選。

反應標準：相對於第1次篩選問診，參與者之視網膜內(視網膜側3 mm)流體必須具有 $> 50\ \mu\text{m}$ 或50%之改善。

5.20.2 排除標準

【0583】 若參與者符合以下任何標準，則排除在研究之外：

10. 研究眼睛之CNV或黃斑水腫繼發於除AMD以外的任何原因。
11. 如藉由CRC所判定之中央凹下纖維化或萎縮。
12. 在第1次篩選問診之前的12個月需要 > 9 次抗VEGF注射之參與者。
13. 任何研究者認為可能限制研究眼睛之VA改善的狀況。
14. 研究眼睛之視網膜脫落或視網膜裂孔活躍或有病史。
15. 研究眼睛之晚期青光眼，定義為IOP $> 23\ \text{mmHg}$ ，不受2種降低IOP之藥物或任何治療青光眼之侵入性程序(例如分流、管或最小侵入性青光眼手術[MIGS]裝置；允許進行選擇性雷射小樑切除術、氬雷射小樑成形術及MIGS裝置)控制。
16. 在第1次篩選問診之前 > 4 年診斷患有nAMD之任何參與者。
17. 任何研究者認為可能會增加參與者之風險，需要在研究過程中進行醫療或手術干預以防止或治療視力喪失，或干擾研究程序或評定的研究眼睛之狀況。
18. 在第1次篩選問診之前12週內研究眼睛有眼內手術史。若在第1

次篩選問診之前> 10週進行鈹鋁石榴石(YAG)囊切開術，則允許。

19. 在第1次篩選問診之前6個月內，研究眼睛有玻璃體內治療史，諸如玻璃體內類固醇注射或研究產品，但抗VEGF療法除外。

20. 在第1次篩選問診時研究眼睛中存在任何植入物(排除人工晶狀體或MIGS裝置)。

21. 在第1次篩選問診之前5年內有可能損害免疫系統之惡性腫瘤或惡性血液病史，需要進行化療及/或放療。允許局部基底細胞癌。

22. 在登記後30天內或在研究產品之5個半衰期內接受任何研究產品，以時間長者為準。

23. 接受過基因療法。

24. 由療法引起之視網膜毒性史，或使用任何可能影響VA或具有已知視網膜毒性之藥物(例如氯喹或羥氯喹)之伴隨療法。

25. 可能干擾外科手術之研究眼睛之眼部或眼周感染。

26. 過去6個月內有心肌梗塞、腦血管意外或短暫性缺血發作。

27. 儘管經過最大限度的醫療治療，但高血壓仍未得到控制(收縮血壓[BP] > 180 mmHg，舒張BP > 100 mmHg)。

28. 在第1次篩選問診時具有以下實驗室值之任何參與者將退出研究：

- 天冬胺酸轉胺酶(AST)/丙胺酸轉胺酶(ALT) > 2.5 × 正常之上限(ULN)。

- 總膽紅素> 1.5 × ULN，除非參與者之前有已知的吉伯特氏症候群(Gilbert's syndrome)病史，且分離膽紅素顯示結合膽紅素<總膽紅素之35%。

- 凝血酶原時間 $> 1.5 \times \text{ULN}$ ，除非參與者處於抗凝狀態。
- 抗凝之參與者將由當地實驗室進行監測，且按照當地的慣例進行管理，以保持或彌合研究過程中的抗凝療法；亦需要與醫療監護人協商。
- 男性參與者之血紅蛋白 $< 10 \text{ g/dL}$ ，女性參與者 $< 9 \text{ g/dL}$ 。
- 血小板 $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 。
- 估計腎小球濾過率 $< 30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 。
- 目前正在接受胰島素以治療糖尿病。

29. 目前正在接受抗凝療法，而治療研究者(亦即視網膜外科醫生)以及為參與者開具抗凝處方之醫師認為，保持抗凝療法之構築體II投與抗凝療法未經指定或被認為不安全

30. 任何研究者認為可能干擾眼外科手術或癒合過程的伴隨治療。

31. 已知對蘭比珠單抗或其任何組分超敏。

32. 患有研究者或主辦方認為可能會損害參與者之安全性、結果解釋或完成研究中所有評定及追蹤之能力的嚴重、慢性或不穩定的醫療或心理病狀。

5.20.3 所投與之研究干預

符合條件的參與者將按組分配至如下表40中所闡述之構築體II之2個劑量中之1者及2種調配物中之1者中。參與者將在第1天在操作室中經由視網膜下遞送給予構築體II。在研究期間，參與者將在第1次篩選問診、第2週時且隨後在第4週開始每~28天(視需要)接受藉由玻璃體內注射投與之0.5 mg蘭比珠單抗。

表40：所投與之研究干預

隊組名稱	構築體II 劑量1	構築體II 劑量2	蘭比珠單抗(雷珠單抗)
類型	基因療法(構築體II)		藥物(磨合/補充治療)
劑量調配物	溶液		溶液
單位劑量強度	3.2×10^{11} GC/mL (標稱濃度)	6.5×10^{11} GC/mL (標稱濃度)	10 mg/mL
劑量水準	200 μ L (6.4×10^{10} GC/眼睛，一次劑量)	200 μ L (1.3×10^{11} GC/眼睛，一次劑量)	在第1次篩選問診時(磨合)一次、在第2週一次及每再治療標準投與構築體II後在4週開始每~28天(視需要) 0.5 mg (0.05 mL之10 mg/mL溶液)。
調配物	調配物1：具有0.001%泊洛沙姆188之杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS) 調配物2：具有4%蔗糖及0.001%泊洛沙姆188之改良DPBS		不適用
投與途徑	視網膜下遞送		在研究眼睛中進行玻璃體內注射

等效物

【0584】 儘管本發明參考其特定實施例詳細描述，應瞭解功能上等效之變化在本發明之範疇內。當然，除本文中所現實及描述之彼等外，對熟習此項技術者而言，本發明之各種修改將自先前描述及隨附圖式而變得顯而易見。此類修改意欲落入所附申請專利範圍之範疇內。熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗判定本文所描述之本發明具體實施例的許多等效物。此類等效物意欲由以下申請專利範圍所涵蓋。

【0585】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案在本文中以引用之方式併入本說明書中，程度如同各個別公開案、專利或專利申請案專門且個別地指示為以全文引用之方式併入本文中一般。

【序列表】

<110> 美商銳進科斯生物股份有限公司(REGENXBIO Inc.)

<120> 腺相關病毒載體醫藥組合物及方法

<130> TW 109134835

<150> US 62/911,968

<151> 2019-10-07

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蘭比珠單抗Fab胺基酸序列-輕鏈

<400> 1

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗Fab胺基酸序列-重鏈

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
225 230

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 貝伐單抗Fab胺基酸序列-輕鏈

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 231
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 貝伐單抗Fab胺基酸序列-重鏈

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
225 230

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGF-A信號肽

<400> 5

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala
20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Fibulin-1信號肽

<400> 6

Met Glu Arg Ala Ala Pro Ser Arg Arg Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala
20 25

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 玻連蛋白信號肽

<400> 7

Met Ala Pro Leu Arg Pro Leu Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Trp Val
1 5 10 15

Ala Leu Ala

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 補體因子H信號肽

<400> 8

Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys
1 5 10 15

Val Ala

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 視力蛋白信號肽

<400> 9

Met Arg Leu Leu Ala Phe Leu Ser Leu Leu Ala Leu Val Leu Gln Glu
1 5 10 15

Thr Gly Thr

<210> 10
<211> 728
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 貝伐單抗cDNA-輕鏈

<400> 10	
gctagcgcca ccatgggctg gtcctgcata atcctgttcc tggtagccac cgccaccggc	60
gtgcactcgc acatccagat gacccagtc cctcctccc tgtccgcctc cgtgggcgac	120
cgggtgacca tcacctgctc cgcctcccag gacatctcca actacctgaa ctggtaccag	180
cagaagcccc gcaaggcccc caagggtctg atctactica cctcctccct gcactccggc	240
gtgccctccc ggttctccgg ctccggctcc ggcaccgact tcacctgac catctcctcc	300
ctgcagcccc aggacttcgc cacctactac tgccagcagt actccaccgt gccctggacc	360
ttcggccagg gcaccaaggt ggagatcaag cggaccgtgg ccgccccctc cgtgttcata	420

ttccccccct ccgacgagca gctgaagtc ggcaccgcct ccgtgggtgtg cctgctgaac 480

aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag tggagggtgg acaacgccct gcagtcggc 540

aactcccagg agtccgtgac cgagcaggac tccaaggact ccacctactc cctgtcctcc 600

accctgacct tgtccaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc 660

caccagggcc tgtctctccc cgtgaccaag tccttcaacc ggggcgagtg ctgagcggcc 720

gcctcgag 728

<210> 11

<211> 1440

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 貝伐單抗cDNA-重鏈

<400> 11

gctagcgcca ccatgggctg gtcctgcata atcctgttcc tggtagccac cgccaccggc 60

gtgcactccg aggtgcagct ggtggagtc ggcggcggcc tggtagacc cggcggtcc 120

ctgcggctgt cctgcgccgc ctccggtac accttacca actacggcat gaactgggtg 180

cggcaggccc ccggcaaggg cctggagtgg tgggctgga tcaacacct caccggcgag 240

cccacctacg ccgccgactt caagcggcgg ttacattct ccctggacac ctccaagtc 300

accgcctacc tgcagatgaa ctccctgcgg gccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgc 360

aagtacccc actactacgg ctctcccaac tggfacttcg acgtgtgggg ccagggcacc 420

ctggtgaccg tgtctccgc ctccaccaag gcccctccg tgttccccct ggccccctcc 480

tccaagtcca ctccggcgg caccgccgc ctgggctgcc tggtagagga ctacttccc 540

gagcccgtga ccgtgtctg gaactccggc gccctgacct ccggcgtgca caccttccc 600

gccgtgctgc agtctccgg cctgtactcc ctgtctccg tggtagcgt gccctctcc 660

tccttgggca ccagacct cacttgcaac gtgaaccaca agccctcaa caccaaggtg 720

gacaagaagg tggagccaa gtctgcgac aagaccaca cctgcccccc ctgccccgc 780

cccgagctgc tgggcggccc ctccgtgtt ctgttcccc ccaagccaa ggacacctg 840

atgatctccc ggacccccga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc 900

gaggatgaagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc acaacgccaa gaccaagccc 960

cgggaggagc agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag 1020

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aagggtgtcca acaaggccct gcccgcctcc 1080

atcgagaaga ccatctccaa ggccaagggc cagccccggg agccccaggt gtacacctg 1140

ccccctccc gggaggagat gaccaagaac cagggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc 1200

ttctaccctt ccgacatcgc cgtggagtgg gagtccaacg gccagcccg gaacaactac 1260

aagaccacc ccccgctgct ggactccgac ggctccttct tctgtactc caagctgacc 1320

gtggacaagt cccggtggca gcagggaac gtgtttctct gctccgtgat gcacgaggcc 1380

ctgcacaacc actacacca gaagtcctg tcctgtccc ccggcaagtg agcggccgcc 1440

<210> 12

<211> 733

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 蘭比珠單抗cDNA (包含信號肽之輕鏈)

<400> 12

gagctccatg gagtttttca aaaagacggc acttgccgca ctggttatgg gtttttagtgg 60

tgcagcattg gccgatatcc agctgaccca gagcccgagc agcctgagcg caagcgttgg 120

tgatcgtgtt accattacct gtagcgcaag ccaggatatt agcaattatc tgaattggta 180

tcagcagaaa ccgggtaaag caccgaaagt tctgatttat tttaccagca gcctgcatag 240

cgggtttccg agccgtttta gcggtagcgg tagtggcacc gattttaccc tgaccattag 300

cagcctgcag ccggaagatt ttgcaacctt ttattgtcag caglatagca ccgttccgtg 360

gacctttggt cagggcacca aagttgaaat taaacgtacc gttgcagcac cgagcgtttt 420

tatttttccg cctagtgatg aacagctgaa aagcggcacc gcaagcgttg tttgtctgct 480

gaataatfff tatccgcgtg aagcaaaagt gcagtggaaa gttgataatg cactgcagag 540

cggtaatagc caagaaagcg ttaccgaaca ggatagcaaa gatagcacct atagcctgag 600

cagcacctg accctgagca aagcagatta tgaaaaacac aaagtgtatg cctgcgaagt 660

tacccatcag ggtctgagca gtccggttac caaaagtttt aatcgtggcg aatgctaata 720

gaagcttggg acc 733

<210> 13

<211> 779

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 蘭比珠單抗cDNA (包含信號肽之重鏈)

<400> 13

gagctcatat gaaataacctg ctgccgaccg ctgctgctgg tctgctgctc ctcgctgccc 60

agccggcgat ggccgaagtt cagctggttg aaagcggctgg tggctctggtt cagcctgggtg 120

gtagcctgcg tctgagctgt gcagcaagcg gttatgattt taccattat ggtatgaatt 180

gggttcgtca ggcaccgggt aaaggctctgg aatgggttgg ttggattaat acctataccg 240

gtgaaccgac ctatgcagca gattttaaac gtcgttttac ctttagcctg gataccagca 300

aaagcaccgc atatctgcag atgaatagcc tgcgtgcaga agataccgca gtttattatt 360

gtgccaaata tccgtattac tatggcacca gccactggta tticgatgtt tggggtcagg 420

gcaccctggt taccgttagc agcgcaagca ccaaaggctc gagcgttttt ccgctggcac 480

cgagcagcaa aagtaccagc ggtggcacag cagcactggg ttgtctggtt aaagattatt 540

ttccggaacc ggttaccgtg agctggaata gcggtgcact gaccagcggg gttcatacct 600

ttccggcagt tctgcagagc agcggctctgt atagcctgag cagcgttggt accgttccga 660

gcagcagcct gggcaccag acctatattt gtaatgttaa tcataaaccg agcaatacca 720

aagtgataa aaaagttgag ccgaaaagct gcgataaaac ccatctgtaa tagggtacc 779

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR1

<400> 14

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR2

<400> 15

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 貝伐單抗及蘭比珠單抗輕鏈CDR3

<400> 16

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 貝伐單抗重鏈CDR1

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 貝伐單抗重鏈CDR2

<400> 18

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 貝伐單抗重鏈CDR3

<400> 19

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗重鏈CDR1

<400> 20

Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗重鏈CDR3

<400> 21

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 白蛋白信號肽

<400> 22

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

Tyr Ser

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰凝乳蛋白酶原信號肽

<400> 23

Met Ala Phe Leu Trp Leu Leu Ser Cys Trp Ala Leu Leu Gly Thr Thr
1 5 10 15

Phe Gly

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 介白素-2信號肽

<400> 24

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ile Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser
20

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胰蛋白酶原-2信號肽

<400> 25

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

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F2A位點

<400> 26

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子T2A

<400> 27

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子P2A

<400> 28

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子E2A

<400> 29

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 30
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子F2A

<400> 30

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<400> 31

Arg Lys Arg Arg
1

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<400> 32

Arg Arg Arg Arg
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<400> 33

Arg Arg Lys Arg
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<400> 34

Arg Lys Lys Arg
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X =任意胺基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X = Lys或Arg

<400> 35

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 36
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X =任意胺基酸

<400> 36

Arg Xaa Lys Arg
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Furin連接子

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X =任意胺基酸

<400> 37

Arg Xaa Arg Arg
1

<210> 38
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗Fab胺基酸序列-輕鏈

<400> 38

Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn
20				25				30							
Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu
35				40				45							
Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
50				55				60							
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65				70				75				80			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Thr	Val	Pro
85				90				95							
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
100				105				110							
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
115				120				125							
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
130				135				140							
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145				150				155				160			
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
165				170				175							
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
180				185				190							
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
195				200				205							
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
210				215											

<210> 39
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗Fab胺基酸序列-重鏈

<400> 39

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His
20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp
50 55 60

Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu Arg Lys Arg Arg
225 230 235

<210> 40
<211> 232
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 蘭比珠單抗Fab胺基酸序列-重鏈

<400> 40

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His
20 25 30

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp
50 55 60

Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Leu
225 230

<210> 41
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV1

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 42
<211> 735
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV2

<400> 42

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

Glu	Gly	Ile	Arg	Gln	Trp	Trp	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro
20				25				30							
Lys	Pro	Ala	Glu	Arg	His	Lys	Asp	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
35				40				45							
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
50				55				60							
Val	Asn	Glu	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65				70				75				80			
Arg	Gln	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
85				90				95							
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
100				105				110							
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
115				120				125							
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Val	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
130				135				140							
Pro	Val	Glu	His	Ser	Pro	Val	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly
145				150				155				160			
Lys	Ala	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
165				170				175							
Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Gln	Pro	Pro
180				185				190							
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Asn	Thr	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly
195				200				205							
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ser
210				215				220							

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480

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

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

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
515 520 525

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

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

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

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 43
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV3-3

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
450 455 460

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

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

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

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
530 535 540

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

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

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
580 585 590

Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 44
<211> 734
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV4-4

<400> 44

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

Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

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

Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	Gln
65					70					75					80
Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala	Asp
			85						90					95	
Ala	Glu	Phe	Gln	Gln	Arg	Leu	Gln	Gly	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn
			100					105						110	
Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	Leu
		115					120					125			
Gly	Leu	Val	Glu	Gln	Ala	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	Pro
	130					135					140				
Leu	Ile	Glu	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	Gly	Lys
145					150					155					160
Lys	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Lys	Leu	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Thr
			165						170					175	
Gly	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Pro	Glu	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ala	Met	Ser
		180						185					190		
Asp	Asp	Ser	Glu	Met	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Val	Glu	Gly
		195					200					205			
Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Asp	Trp	His	Cys
	210					215					220				
Asp	Ser	Thr	Trp	Ser	Glu	Gly	His	Val	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr
225					230					235					240
Trp	Val	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	Tyr	Lys	Arg	Leu	Gly	Glu
		245						250					255		
Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Thr	Tyr	Asn	Gly	Phe	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr
		260						265					270		

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu
305 310 315 320

Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp
325 330 335

Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser
340 345 350

Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn
370 375 380

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

Asn Asn Phe Glu Ile Thr Tyr Ser Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser
405 410 415

Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
420 425 430

Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu
435 440 445

Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn
450 455 460

Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln
465 470 475 480

Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr
485 490 495

Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly
500 505 510

Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro
515 520 525

Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys
530 535 540

Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser
545 550 555 560

Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly
565 570 575

Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp
580 585 590

Arg Leu Thr Ala Leu Gly Ala Val Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg
595 600 605

Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
610 615 620

Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His
625 630 635 640

Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro
645 650 655

Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr
660 665 670

Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu
675 680 685

Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly
690 695 700

Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr
705 710 715 720

Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu
725 730

<210> 45
<211> 724
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV5

<400> 45

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
65 70 75 80

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

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

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

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

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
165 170 175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
420 425 430

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
465 470 475 480

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
485 490 495

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
500 505 510

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
515 520 525

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
530 535 540

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
545 550 555 560

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
565 570 575

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
580 585 590

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 46
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV6

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
115					120					125					
Phe	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
130					135					140					
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly
145					150					155					160
Lys	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
165					170					175					
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro
180					185					190					
Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
195					200					205					
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala
210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225					230					235					240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
245					250					255					
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His
260					265					270					
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe
275					280					285					
His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn
290					295					300					
Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln
305					310					315					320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590

Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 47
<211> 737
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV7

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln
450 455 460

Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp
485 490 495

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

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu
545 550 555 560

Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
565 570 575

Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala
580 585 590

Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
595 600 605

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
610 615 620

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
625 630 635 640

Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro
645 650 655

Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile
660 665 670

Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu
675 680 685

Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser
690 695 700

Asn Phe Glu Lys Gln Thr Gly Val Asp Phe Ala Val Asp Ser Gln Gly
705 710 715 720

Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn
725 730 735

Leu

<210> 48
<211> 738
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV8

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	
145					150					155					160	
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	
				165					170					175		
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	
			180					185						190		
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	
			195					200				205				
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	
			210			215					220					
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	
225				230						235					240	
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	
				245					250					255		
Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Asn	Asp	
			260					265						270		
Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	
			275				280					285				
Arg	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	
			290			295				300						
Asn	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	
305				310						315					320	
Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	
				325					330					335		
Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	
			340					345						350		

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
450 455 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
485 490 495

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

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
580 585 590

Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 49
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hu31

<400> 49

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

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

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

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Ser Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

- <210> 50
- <211> 736
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> hu32

<400> 50

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

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
180					185					190					
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
195					200					205					
Ala	Pro	Val	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Ser
210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225					230					235					240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
245					250					255					
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asp	Asn
260					265					270					
Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg
275					280					285					
Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn
290					295					300					
Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile
305					310					315					320
Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn
325					330					335					
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu
340					345					350					
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro
355					360					365					
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp
370					375					380					

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

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

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

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

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 51
<211> 736
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AAV9

<400> 51

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1			5					10					15		
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro
		20					25					30			
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40				45				
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
	50					55					60				
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65				70						75				80	
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
			85					90					95		
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
		100						105					110		
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Pro
	115						120				125				
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
	130					135					140				
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly
145				150					155					160	
Lys	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
			165					170					175		
Gly	Asp	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	Pro
		180					185					190			
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
		195					200					205			

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

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

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變型介白素-2信號肽

<400> 52

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser
20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種醫藥組合物，其包含：

- (a) 重組腺相關病毒8(rAAV8)病毒載體，其編碼微小肌縮蛋白 (microdystrophin)，
- (b) 氯化鉀，
- (c) 磷酸二氫鉀，
- (d) 氯化鈉，
- (e) 磷酸氫二鈉，
- (f) 蔗糖，及
- (g) 泊洛沙姆188 (poloxamer 188)、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

【請求項2】

如請求項1之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之離子強度在60 mM至115 mM範圍內。

【請求項3】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含：

- (a) 濃度在約2.70 mmol/L之氯化鉀，
- (b) 濃度在約1.47 mmol/L之磷酸二氫鉀，
- (c) 濃度在約100 mmol/L之氯化鈉，及
- (d) 濃度在約8.10 mmol/L之磷酸氫二鈉。

【請求項4】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在3% (重

量/體積，30 g/L)至18% (重量/體積，180 g/L)範圍內之蔗糖。

【請求項5】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含濃度在4% (重量/體積，40 g/L或約117 mmol/L)之蔗糖。

【請求項6】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含：

(a) 泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度在0.0005% (重量/體積，0.005 g/L)至0.05% (重量/體積，0.5 g/L)範圍內；或

(b) 泊洛沙姆188、聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80；且其中該泊洛沙姆188、該聚山梨醇酯20或該聚山梨醇酯80之濃度為0.001% (重量/體積，0.01 g/L)。

【請求項7】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH在6.9至7.9範圍內。

【請求項8】

如請求項7之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之pH為約7.4。

【請求項9】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之滲透壓 (osmolality)在295 mOsm/kg H₂O至395 mOsm/kg H₂O範圍內。

【請求項10】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在

(a) 疏水塗佈的玻璃小瓶中；

(b) Crystal Zenith® (CZ)小瓶中；或

(c) 環烯烴聚合物(Cyclo Olefin Polymer；COP)小瓶中。

【請求項11】

如請求項10之醫藥組合物，其中該醫藥組合物在Crystal Zenith® (CZ)小瓶中。

【請求項12】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含：

- (a) 編碼微小肌縮蛋白之該rAAV8病毒載體，
- (b) 濃度在約2.70 mmol/L之氯化鉀，
- (c) 濃度在約1.47 mmol/L之磷酸二氫鉀，
- (d) 濃度在約100 mmol/L之氯化鈉，
- (e) 濃度在約8.10 mmol/L之磷酸氫二鈉，
- (f) 濃度在約117 mmol/L之蔗糖，
- (g) 濃度在0.001% 重量/體積(0.01 g/L)之泊洛沙姆188，及
- (h) 水。

【請求項13】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該重組AAV之穩定性係藉由以下來測定：

- (a) 重組AAV之感染性；
- (b) 重組AAV之聚集量；或
- (c) 重組AAV粒子所釋放之游離DNA之量。

【請求項 14】

如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物為：

- (a) 液體組合物；
- (b) 冷凍組合物；或
- (c) 凍乾組合物或復原凍乾組合物。

【請求項15】

一種如請求項1至14中任一項之醫藥組合物之用途，其係用於製備治療有需要之個體之杜興氏肌肉失養症(Duchenne muscular dystrophy)之藥劑。

【請求項16】

如請求項15之用途，其中該醫藥組合物適用於靜脈內注射。

【請求項17】

如請求項16之用途，其中該個體為人類個體。

【請求項18】

如請求項15至17中任一項之用途，其中該治療包含：

- (i) 製備該醫藥組合物，將該醫藥組合物儲存於-60°C或-60°C以下第一時間段；及
- (ii) 解凍該醫藥組合物；

其中該第一時間段至多為約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約15個月、約18個月或約24個月。

【請求項19】

一種套組，其包含一或多個容器及說明書，其中該一或多個容器包含如請求項1至14中任一項之醫藥組合物。

【請求項20】

如請求項19之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由以下製成：

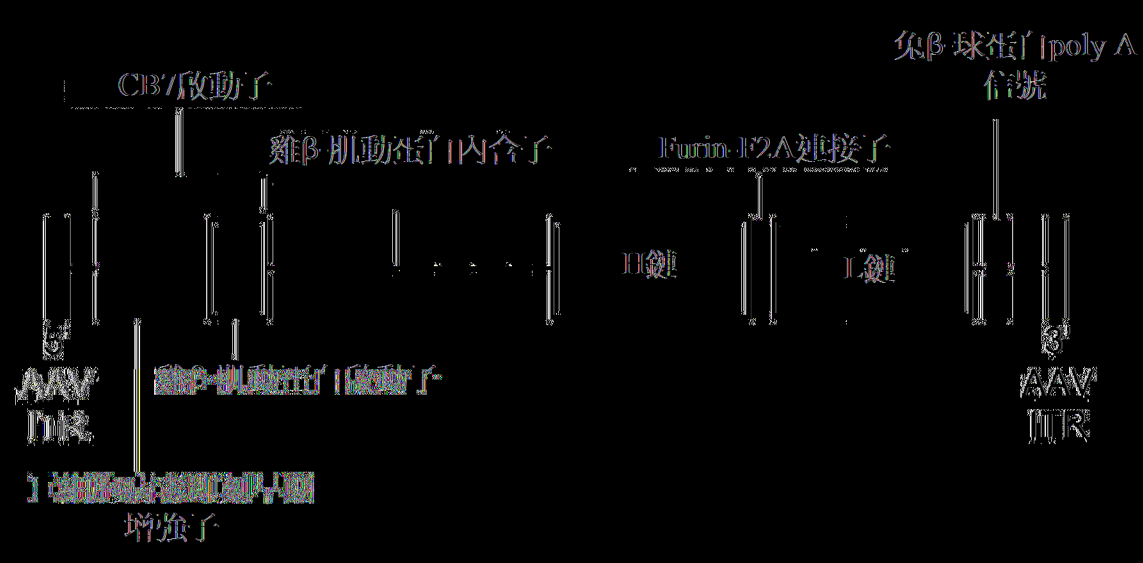
- (a) 疏水塗佈的玻璃小瓶；
- (b) Crystal Zenith® (CZ)小瓶；或
- (c) 環烯烴聚合物(COP)。

【請求項21】

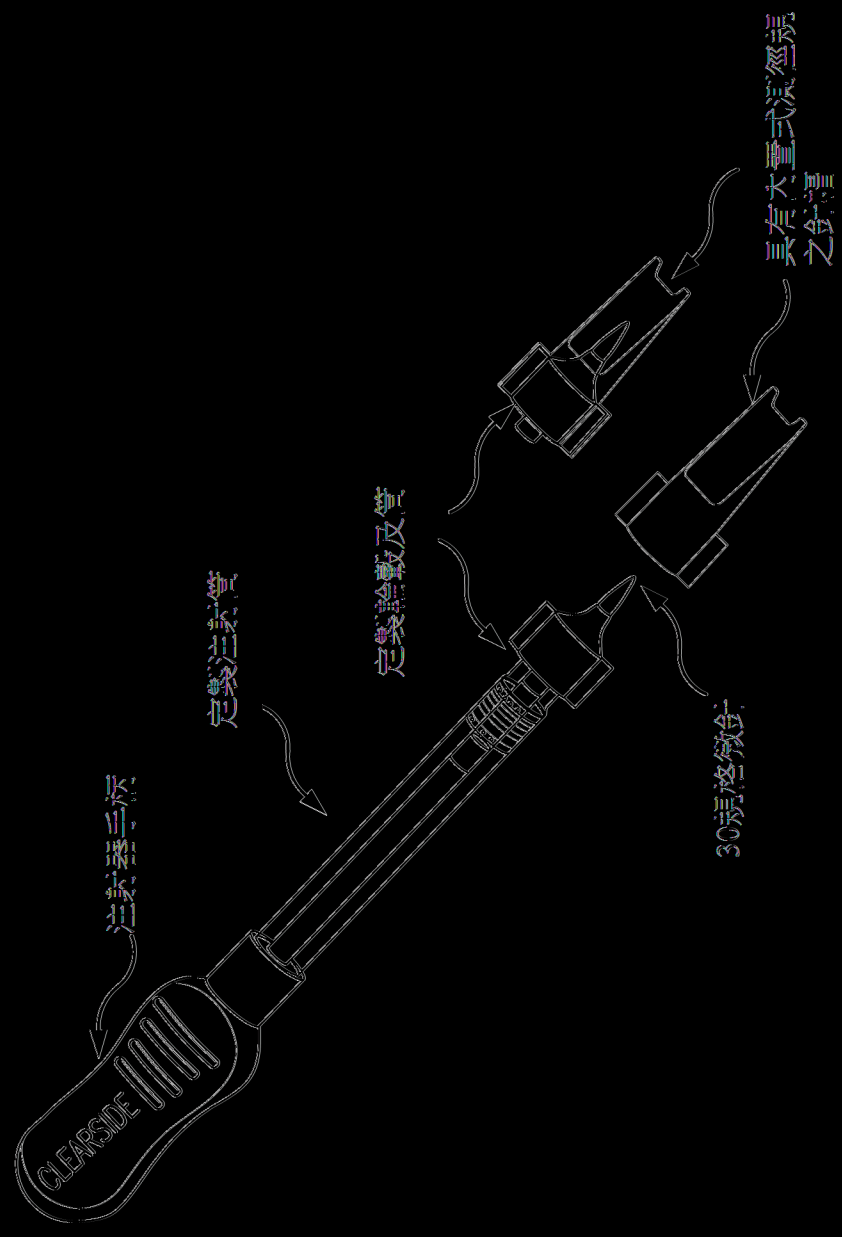
如請求項20之套組，其中該一或多個容器中之至少一者係由Crystal Zenith® (CZ)小瓶製成。

【請求項22】

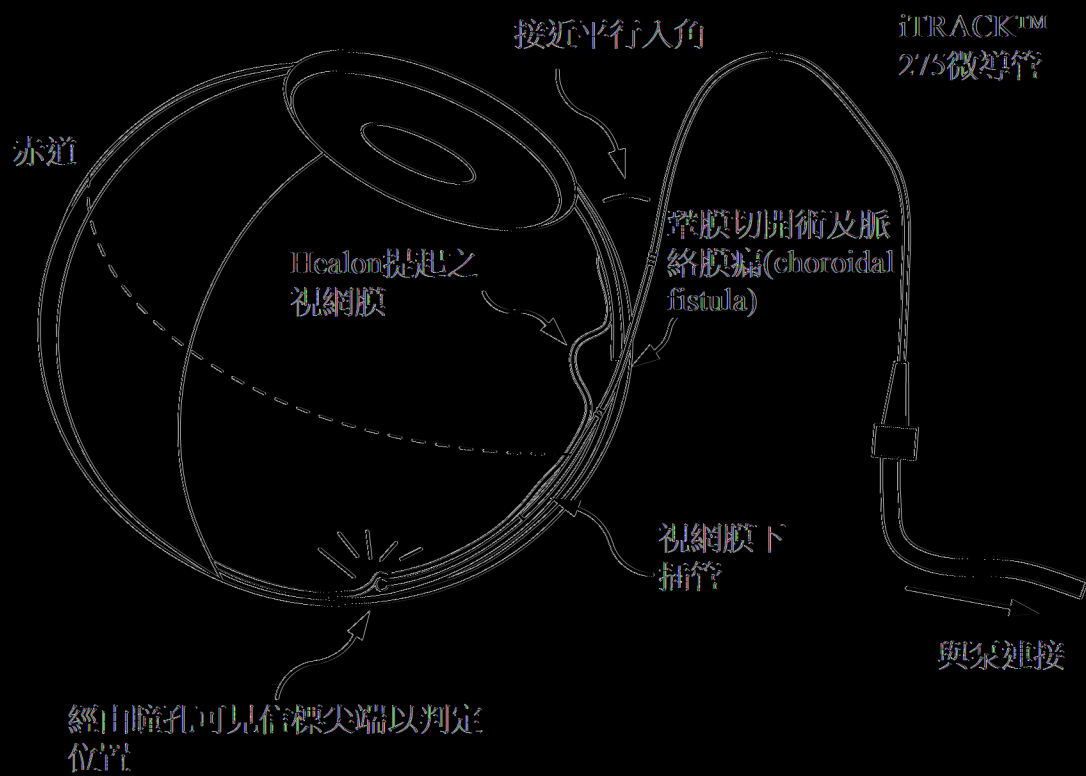
一種穩定的液體調配物，其包含如請求項1至14中任一項之醫藥組合物。



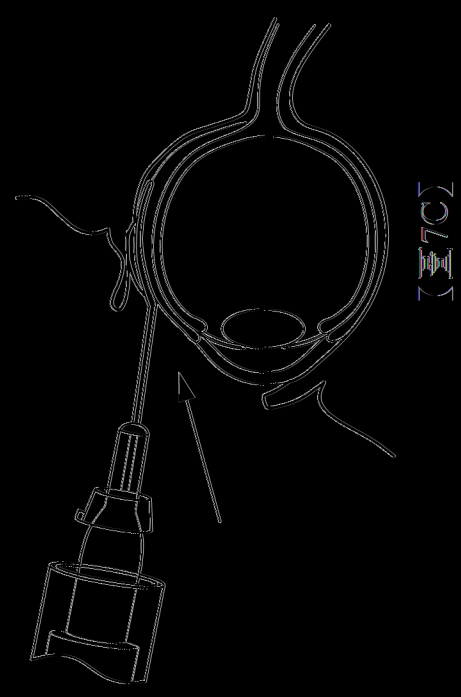
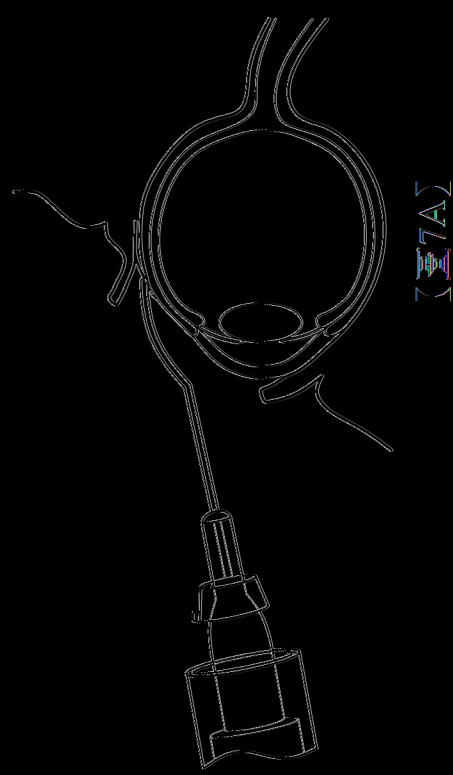
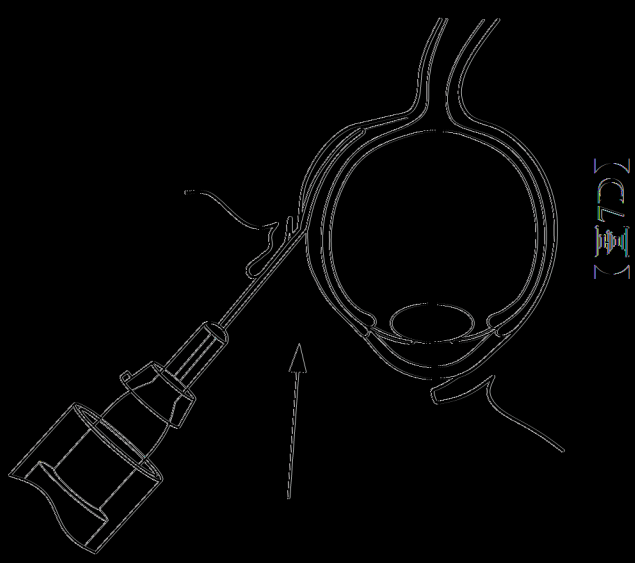
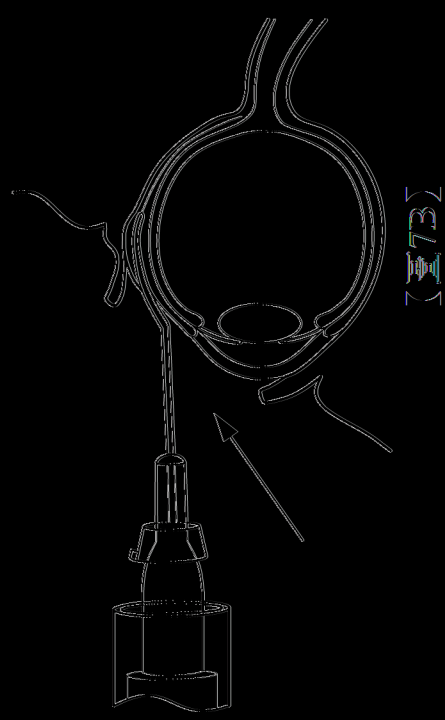
[(圖4)]



[圖5]



|(圖6)|



VP1₁₋₇₃₆ >
AAV1 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWDTKPGALPKPKANQQQKQDDCGRTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV2 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRQWWTKKPGPPPKPAFRIKKDDSRGTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV3-3 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWATKPGVPPQPKANQQHQDDNARGTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV4-4 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGVRFWWATQPGALPKPKANQQHQDDNARGTVTPGYKYTGPFNGTID 59
AV5 MSFVDDPPPDWTFEFVGEGRFETTGTFACGPPKPKPNQQHQDDQARGTVTPGYNYTGPFNGTID 59
AAV6 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWDTKPGALPKPKANQQQKQDDCGRTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV7 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWDTKPGALPKPKANQQQKQDDNCGRTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV8 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWATKPGALPKPKANQQQKQDDCGRTVTPGYKYTGPFNGTID 60
hu31 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRQWWTKKPGPPPKPAFRIKKDDSRGTVTPGYKYTGPFNGTID 60
hu32 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRQWWTKKPGPPPKPAFRIKKDDSRGTVTPGYKYTGPFNGTID 60
AAV9 MAADGYTIPDWTFEDNTSEGITRFWWATKPGAPQPKANQQHQDDNARGTVTPGYKYTGPFNGTID 60
SUS S FVDDPPPDWTFEFVGEGRFETTGTFACGPPKPKPNQQHQDDQARGTVTPGYNYTGPFNGTID 59

MSFVDDPPPDWTFEFVGEGRFETTGTFACGPPKPKPNQQHQDDQARGTVTPGYNYTGPFNGTID 59
I D E V P QS
G Q R

AAV1 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV2 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIDSGDNIPYIKYNHADAATQQRITKEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV3-3 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV4-4 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 119
AV5 KGEIPVNRADFAAREHDSYNFQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITADDTSEGGNTGRAVTFQ 119
AAV6 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV7 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV8 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIQAGDNIPYIKYNHADAATQQRITQEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
hu31 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITKEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
hu32 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITKEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
AAV9 KGEIPVNAADAAAATFHDKAYDQQIKAGDNIPYIKYNHADAATQQRITKEDTSEGGNTGRAVTFQ 120
SUS R F FV R TS NF DS R QK QD K

R R H AG
Q

VP2₁₃₈ > [- EVR1 -]

AAV1 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
AAV2 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDA 179
AAV3-3 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
AAV4-4 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDA 178
AV5 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 168
AAV6 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
AAV7 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 180
AAV8 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 180
hu31 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
hu32 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
AAV9 AKKRVTJFPLGTVFEGAKTAPGKKRPVFEQSPQEPDSSSGTGKKGQOPAKKRINFGQTGDS 179
SUS V F QGGH TG GIDDD V S S T KKQARTREKSVFEDHGA

I PV A AHP Q T V T K H D K SSS S
H A S
R A

[(H8)]

	IIVR2	VP3203	
AAV1	ESVPID PQPIGHPPAIPAAVCPPIIMASGGGAPMAADNNI:GADGVGNASGNWICDSTWIGDR	238	
AAV2	DSVPID PQPIGQPPAAPSGI:GPIIMASGGGAPMAADNNI:GADGVGNSSGNWICDSTWIGDR	238	
AAV3-3	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSTIGSNIIMASGGGAPMAADNNI:GADGVGNSSGNWICDSQWIGDR	238	
AAV4-4	GDCIP --- PHGSI:SGAMS -- DDSEIMRAAAGGAAMHGGQGADGVGNASGNWICDSTWIS:GHI	232	
AV5	FAEIPSGSQQTQIPAPQPASSI:GADITMSAGGGGPI:GDNNQGADGVGNASGNWICDSTWIGDR	228	
AAV6	ESVPID PQPIGHPPAIPAAVCPPIIMASGGGAPMAADNNI:GADGVGNASGNWICDSTWIGDR	238	
AAV7	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSSVSGSI:VAAGGCAIPMAADNNI:GADGVGNASGNWICDSTWIGDR	239	
AAV8	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSGVGI:PIIMAAAGGCAIPMAADNNI:GADGVGSSSGNWICDSTWIGDR	239	
hu31	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSGVGSIIIMASGGGAPVADNNI:GADGVGSSSGNWICDSQWIGDR	238	
hu32	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSGVGSIIIMASGGGAPVADNNI:GADGVGSSSGNWICDSQWIGDR	238	
AAV9	ESVPID PQPIGHPPAIPAAIPSGVGSIIIMASGGGAPVADNNI:GADGVGSSSGNWICDSQWIGDR	238	
SURS	GDC S S QIQQISGIMASIDPNEIVRAAA GAWG:GGQ ----- NA - D ----- T M:GHI		
	HA H S AQPAIA AG ST S IV S		
	I --- DT A		
	TD		
	S		

	IIVR3	
AAV1	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQIS - SASIGASNDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	297
AAV2	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQIS - SQSGASNDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	296
AAV3-3	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQIS - SQSGASNDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	296
AAV4-4	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKRI:G ----- ESTIQSNITYNGETSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	287
AV5	VWIKSTRITWATIPSYNNH:QYR:IKS - GSVDSGNANAYFGYSTIPWGYFDENRITISHS:SPRIW	287
AAV6	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISSAST - GASNDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	297
AAV7	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISS - H:AGSINDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	298
AAV8	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISNGITSGGAI:NDNNEYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	299
hu31	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	298
hu32	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	298
AAV9	VITITSTRITWATIPITYNNH:YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTIPWGYFDENRITICH:SPRIW	298
SURS	--- K --- V - S --- Q RRI:GSGS:QSDATQA T ----- S W -----	
	V H K AATIT:G: S H	
	G V	
	H A	

AAV1	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITINDGVIT:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	357
AAV2	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITINDGVIT:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	356
AAV3-3	QRI:INNWWGIRPKRI:SI:KI:NI QVIRGVITQNDGVIT:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	356
AAV4-4	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITISNGIT:IVANNTITSTVQVI:PADSSY:PI:PYVMDA	347
AV5	QRI:INNYWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITVQDSIT:IANNTITSTVQVI:TDSDYQI:PYVVG	347
AAV6	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITINDGVIT:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	357
AAV7	QRI:INNWWGIRPKRI:RI:KI:NI QVKI:VITINDGVIT:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	358
AAV8	QRI:INNWWGIRPKRI:SI:KI:NI QVKI:VITQNGIT:KI:IANNTITSTVQVI:SDSEYQI:PYVI:GS	359
hu31	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITDNGGVKIT:IANNTITSTVQVI:TDSDYQI:PYVI:GS	358
hu32	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITDNGGVKIT:IANNTITSTVQVI:TDSDYQI:PYVI:GS	358
AAV9	QRI:INNWWGIRPKRI:NI:KI:NI QVKI:VITDNGGVKIT:IANNTITSTVQVI:TDSDYQI:PYVI:GS	358
SURS	----- M - RAMRV: QI ----- VQDSIT ----- QI: QI: S DE H ----- MDA	
	K S QSE H A S	
	S	

[(圖8)] (接續)

IIVR4

AAV1	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	414
AAV2	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	413
AAV3-3	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	413
AAV4-4	GHFGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINRD NTFNPFHRSSEFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	407
AV5	GHFGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINRD NTFNPFHRSSEFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	406
AAV6	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	414
AAV7	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQSVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	415
AAV8	AAHQGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINNG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	416
hu31	AHFEGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINDG --- QAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	415
hu32	AHFEGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINDG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	415
AAV9	AHFEGCIIPPIPADVIMIPQYGYITINDG --- SQAVGRSSIFYCIJFYFPSQMIARTIGNNIFHSY	415
SURS	GGQ S A PQ T CG VND GND NA F	
	T N V A T Q Q H	
	R H S	

IIVR5

AAV1	HTFHVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYINRIQ NQSGSAQNKDITJFSRGSIPAGMSV	473
AAV2	HTFDVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYISRIIN HPSGHTHQSRIQSQAGASDIDRD	472
AAV3-3	HTFDVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYINRIQCHPSGHTNQSRITJFSQAGIPQMSI	473
AAV4-4	STFKVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYICIQSITHTGHTNAGETATNPTKIRIPINFSN	467
AV5	NHTFHVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYIRFVSIN ----- NTCGVQINKNAGERYAN	459
AAV6	HTFDVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYINRIQ NQSGSAQNKDITJFSRGSIPAGMSV	473
AAV7	STFDVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYIARTQSNDGCTAGNRITQFYQGGPSTMAH	475
AAV8	HTFDVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYISRIQH TGGTANHTQITGFSQGGPNTMAN	475
hu31	HTFNVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYISKITINGSG - QNQQTIKFSVAGIPSNMAV	473
hu32	HTFNVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYISKITINGSG - QNQQTIKFSVAGIPSNMAV	473
AAV9	HTFNVPIHSSYAHSSQSIIDRIIMNPITDQYIYYISKITINGSG - QNQQTIKFSVAGIPSNMAV	473
SURS	T D M F A V WGNR QNTS AGTKRIQ HQGSAATFSN	
	S H QS NSTPT HQNSDVN NKN QGYRD	
	N K V TG Q T AE I YRIR TRL T	
	A RG G GS H	
		ND

IIVR6 IIVR7 IIVR8

AAV1	QPKNWLPGLPCYRQQRVSKITIDN ---- NNSNFWTFCASKYDINGRSTINDPGAMASIK	528
AAV2	QSRNWLPGLPCYRQQRVSKITSADN ---- NNSNFWTFCASKYDINGRSTINDPGAMASIK	527
AAV3-3	QARNWLPGPCYRQQRVSKITADN ---- NNSNFWTFCASKYDINGRSTINDPGAMASIK	528
AAV4-4	PKKNWLPGPSIRKQQCFSKITANQNYKITPATGESDSTIKYFHSSTIDGRWSATTPGPPMAYAG	527
AV5	HYKNWLPGIMGRITQGMNDGSGVN ---- RASVSAFATNDRMCTFCASYQVTPQDNGMIDNN	514
AAV6	QPKNWLPGLPCYRQQRVSKITIDN ---- NNSNFWTFCASKYDINGRSTINDPGAMASIK	528
AAV7	QAKNWLPGLPCYRQQRVSKITIDQN ---- NNSNFAWTFCASKYDINGRSTINDPGVAMATIK	530
AAV8	QAKNWLPGLPCYRQQRVSTITVIGN ---- NNSNFAWTFCASKYDINGRSTINDPGAMATIK	530
hu31	QGRNYLPGLSYRQQRVSTITVIGN ---- NNSNFAWPCASSWATNGRSTINDPGAMASIK	528
hu32	QGRNYLPGLSYRQQRVSTITVIGN ---- NNSNFAWPCASSWATNGRSTINDPGAMASIK	528
AAV9	QGRNYLPGLSYRQQRVSTITVIGN ---- NNSNFAWPCASSWATNGRSTINDPGAMASIK	528
SURS	FAK WL CIRT GWNLCGV TG DSTIKYFHSST D ASYQVP QHFGMTAG	
	TP F MG F K AND RA NYTPATTNME H D ATT VN NN	
	K F L KA V P TAG KYN W H I	
	Y TD S H H A	
	S T	

[(同8)] (接續)

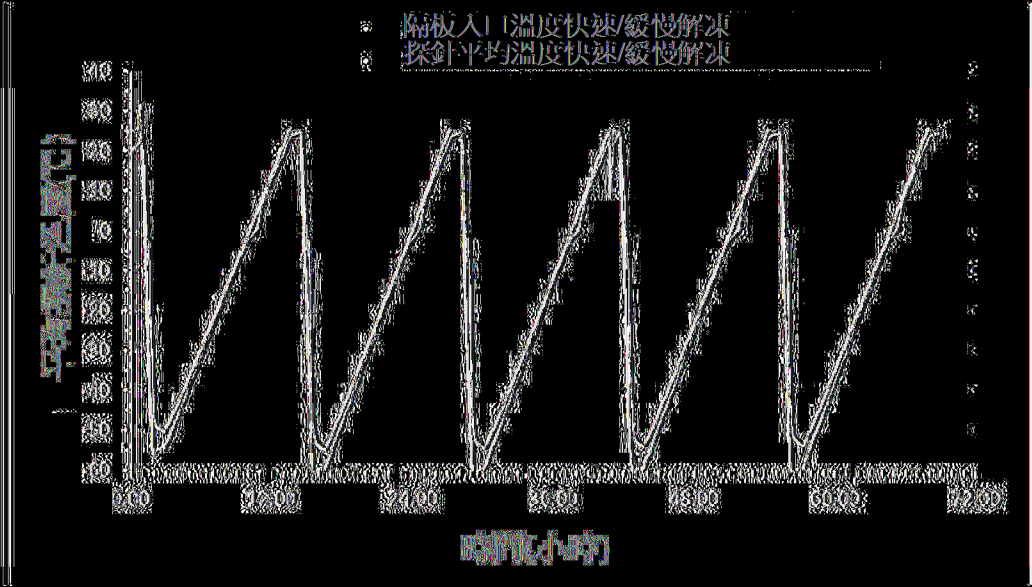
	1	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700	720	740	760	780	800	820	840	860	880	900	920	940	960	980	1000
AAV1	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
AAV2	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
AAV3-8	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
AAV4-4	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
AV5	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
AAV6	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
AAV7	DDDKLTPMSCVMDLGRGA	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	586																																														
AAV8	DDDKLTPMSEGLIDGRQA	--	ARDVADYS	DVMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	587																																														
hu31	DDDKLTPMSEGLIDGRQET	--	GRDNDVAD	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
hu32	DDDKLTPMSEGLIDGRQET	--	GRDNDVAD	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
AAV9	DDDKLTPMSEGLIDGRQET	--	GRDNDVAD	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
SUN8	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--	GNVAVVIG	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	583																																														
	DQESNVATLNTMIDNSGRNPETVAVYH	GNMIDTSKSKYQPNVAVAVGSGQVAVNLQ	574																																																
	DDDKLTPMSCVMDLGRSA	--	CAENVAID	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMSCVMDLGRGS	--	IKKNNVHIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	584																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRGH	--	YASNAVIL	RYMLTMDLQKSTPVAITKSGVAVNLQ	585																																														
	DDDKLTPMCHGNLIDGRQ	--</																																																	

AAV1	SSSNPATERVWVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
AAV2	KENHQATYABWVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	647
AAV3-5	SSNPATPTCTWVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
AAV4-4	ENSNPPTWQDPTATGAPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	643
AV5	ESLQAGQCTGVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	634
AAV6	SSSNPPTATGVWVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
AAV7	ANNNHQTPGVWVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	646
AAV8	QQVIAFGQCTVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	647
hu31	SLQAGQCTGVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
hu32	SLQAGQCTGVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
AAV9	SLQAGQCTGVWQGLPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	645
SD:5	ENSNPPTWQDPTATGAPGVWQNRDQVYLQGFIAWKIPITTCGNHPSPIMGCEGCKKHHP	

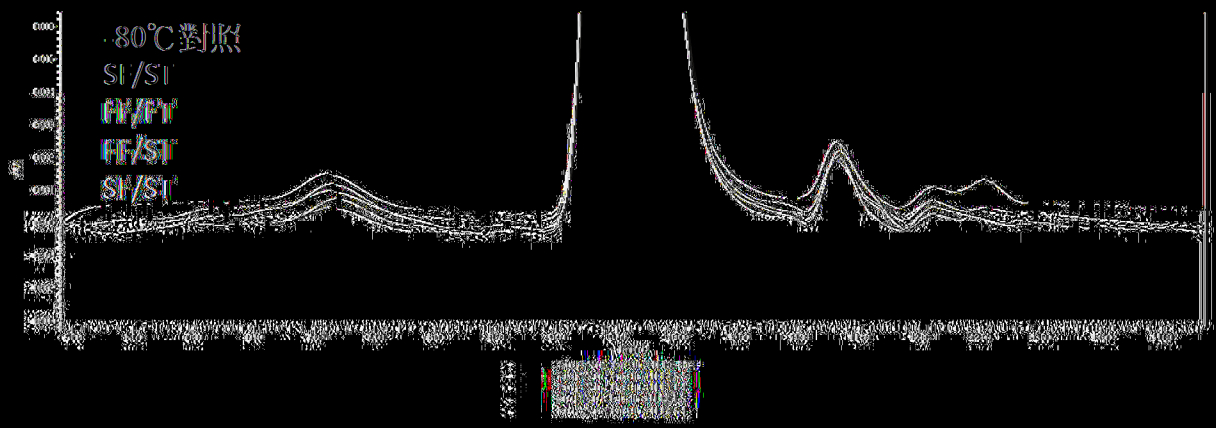
(附錄) (接續)

	[SEQ ID NO. 41]		
AAV1	AKSANVDIEFVDNNGIYHFPPTIGTRYTIRNI	736	(SEQ ID NO. 41)
AAV2	NKSVNVDIEFVDINGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	735	(SEQ ID NO. 42)
AAV3-3	NKSVNVDIEFVDINGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	736	(SEQ ID NO. 43)
AAV4-4	GQQNSTIHWPDAAAGKYHFPPTIGTRYTIRNI	734	(SEQ ID NO. 44)
AV5	NDPQIEVDIEAPDSTIGFYRTHRPPTIGTRYTIRPI	724	(SEQ ID NO. 45)
AAV6	AKSANVDIEFVDNNGIYHFPPTIGTRYTIRPI	736	(SEQ ID NO. 46)
AAV7	FKQIEGVDIEAVDSQGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	737	(SEQ ID NO. 47)
AAV8	YKSTISVDIEAVNIEGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	738	(SEQ ID NO. 48)
hu31	YKSNNVIEFVNSTIEGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	736	(SEQ ID NO. 49)
hu32	YKSNNVIEFVNSTIEGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	736	(SEQ ID NO. 50)
AAV9	YKSNNVIEFVNSTIEGVYSEPRPTIGTRYTIRNI	736	(SEQ ID NO. 51)
SURS	GQQVSTIHWPDAAAKRHTIEA-----DDP NDPQIEVDSSNIEH AIEGNI EAET		

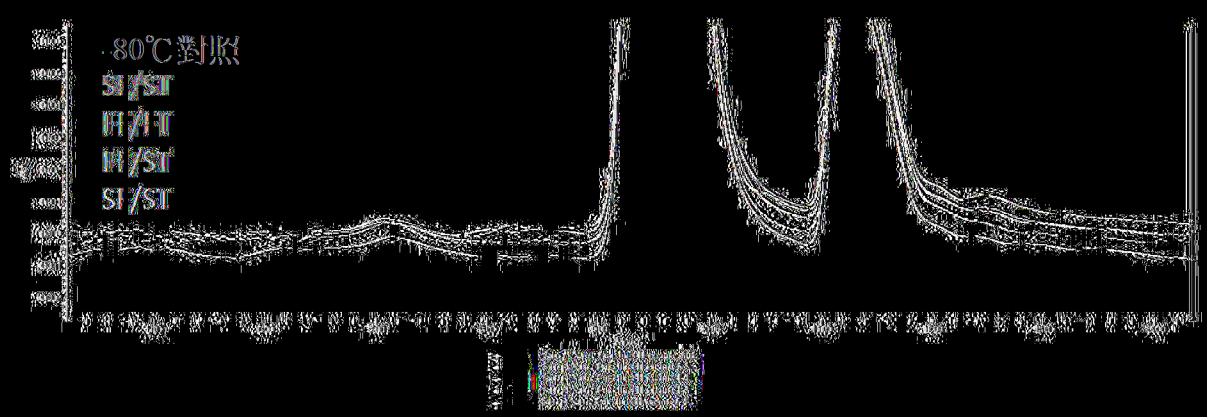
[(F4)8] (接續)



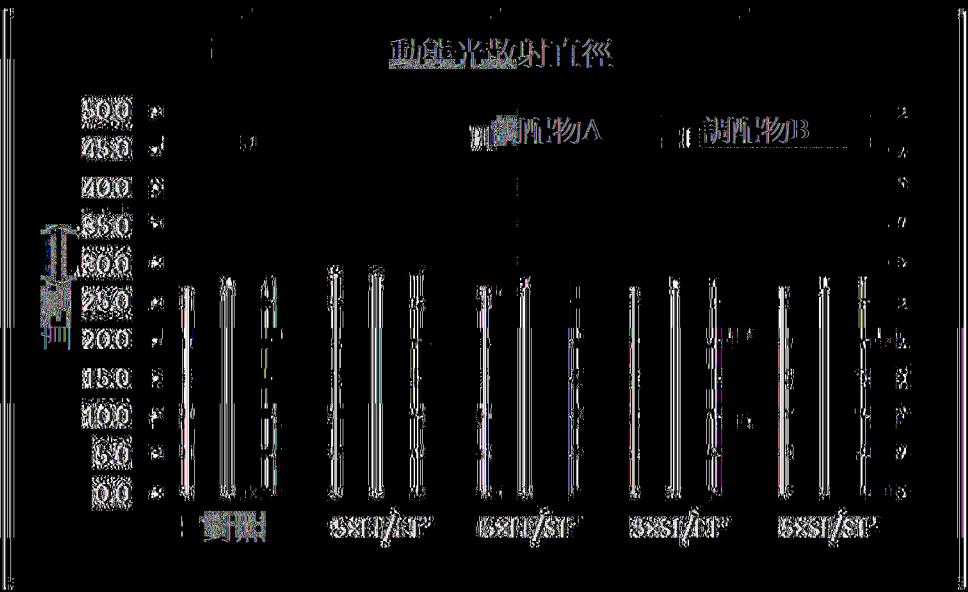
(10)



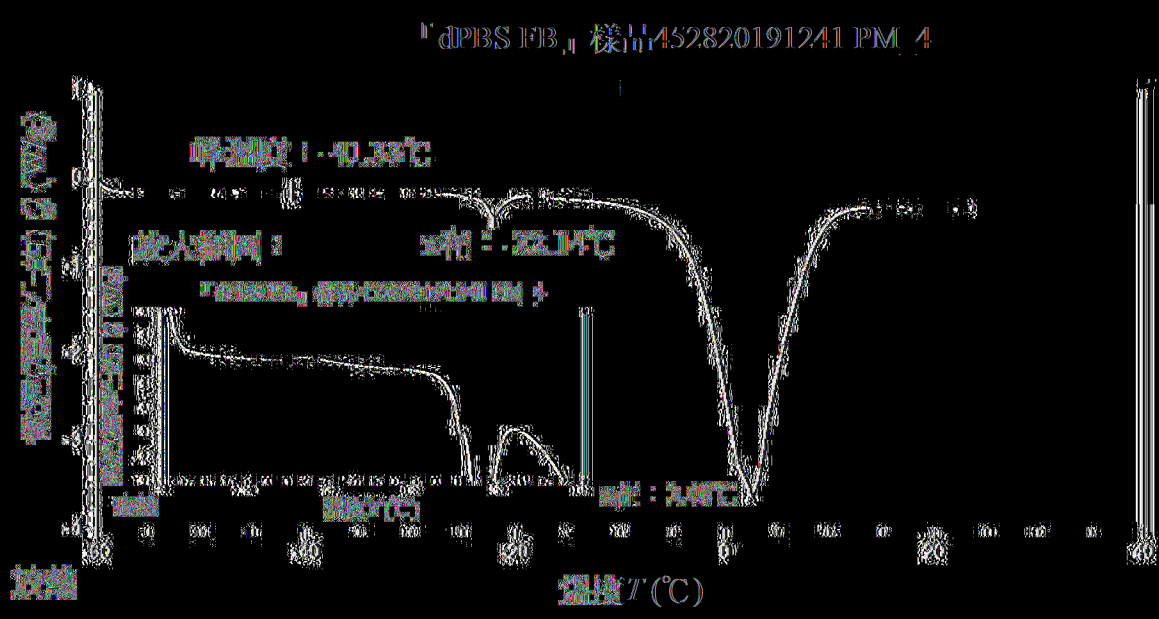
(b)10



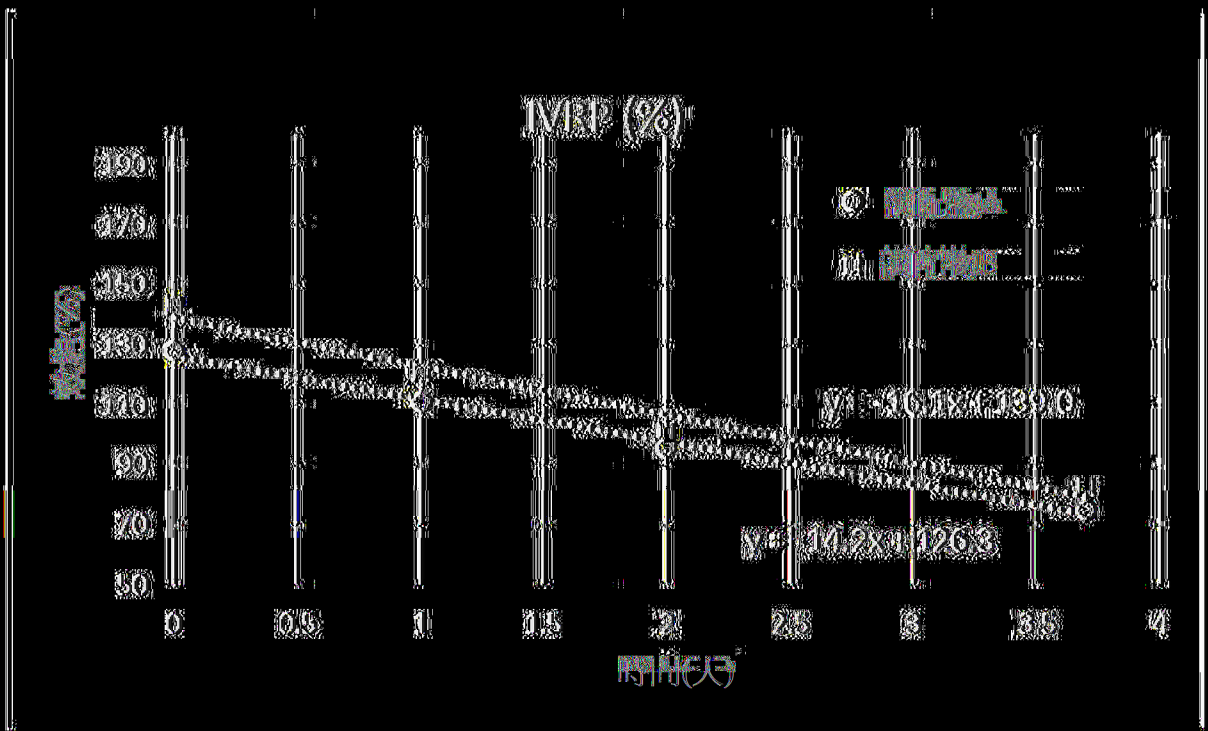
|(11)|



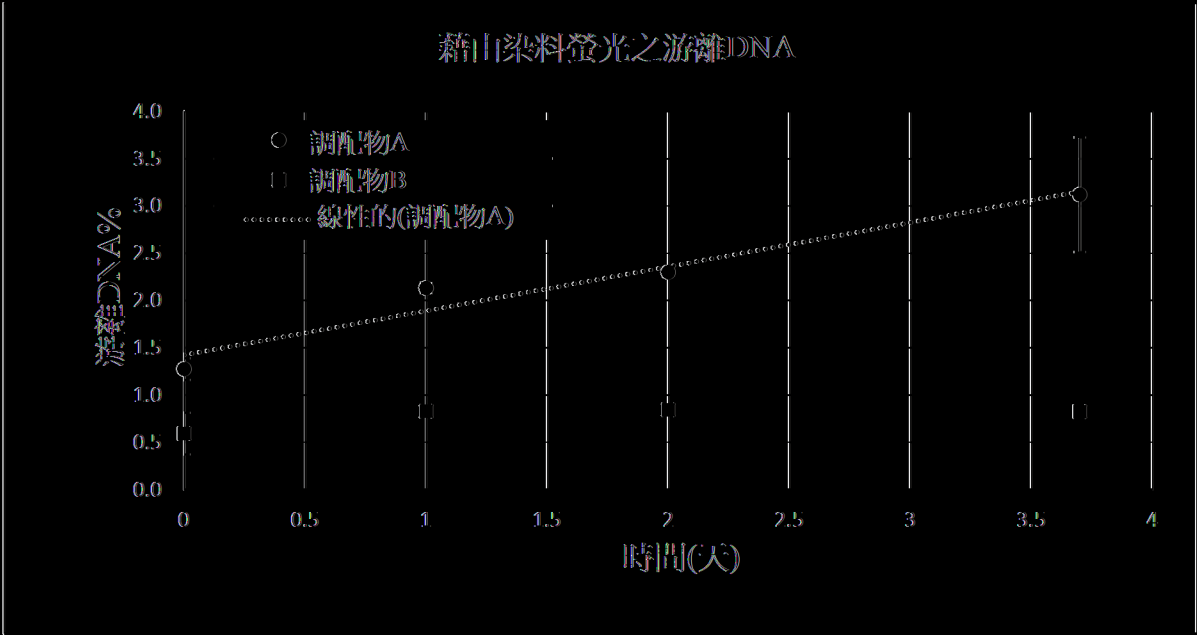
〔図12〕



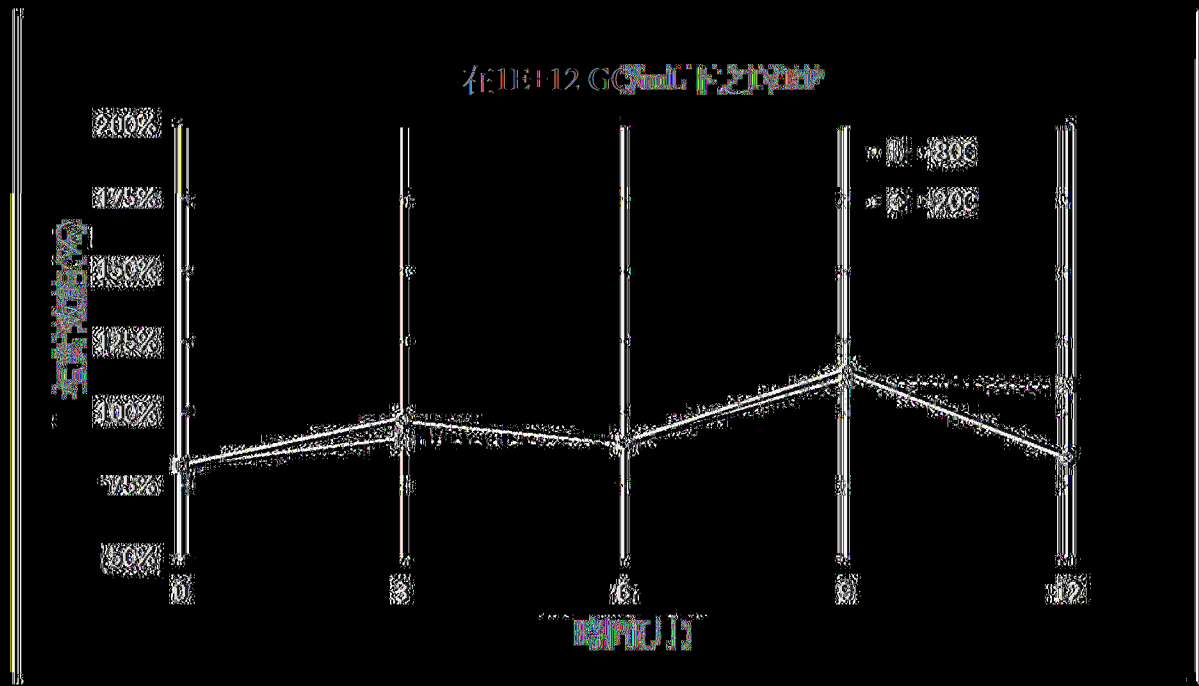
[(圖13)]



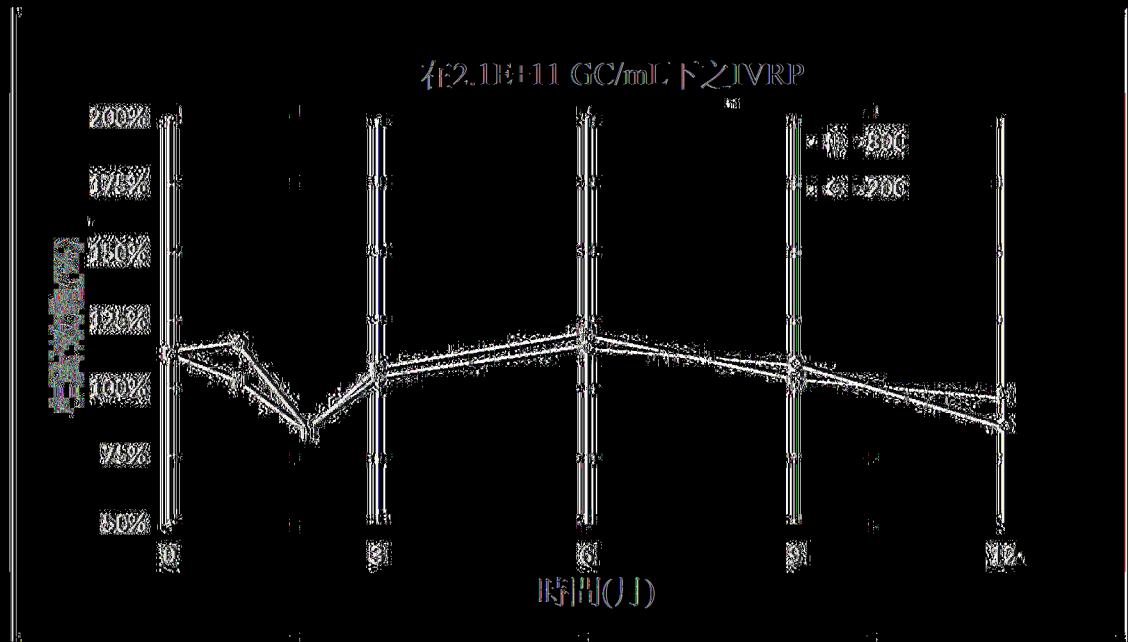
[(15)]



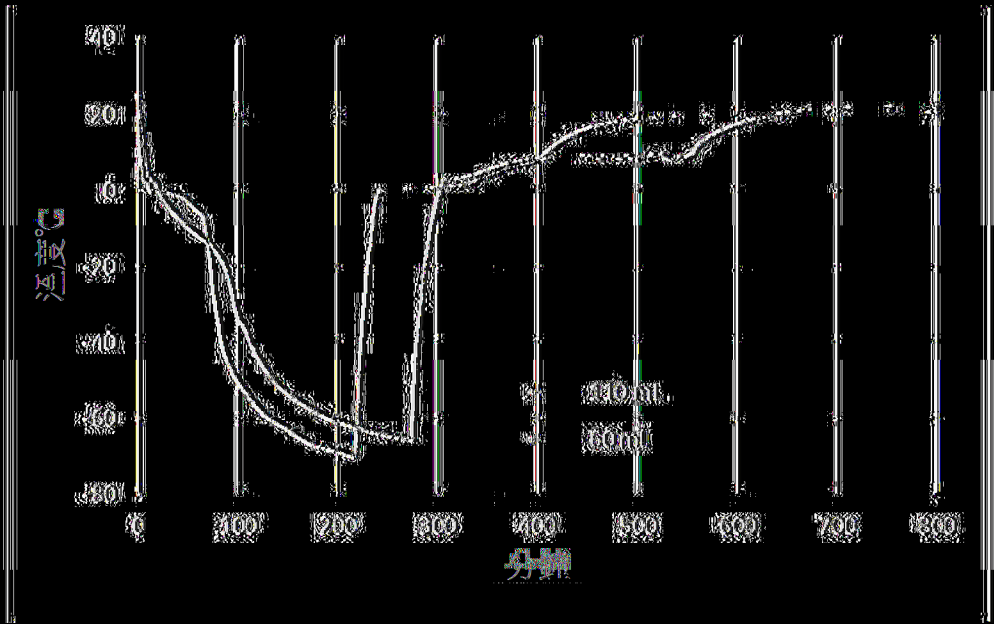
[(圖16)]



(圖17)



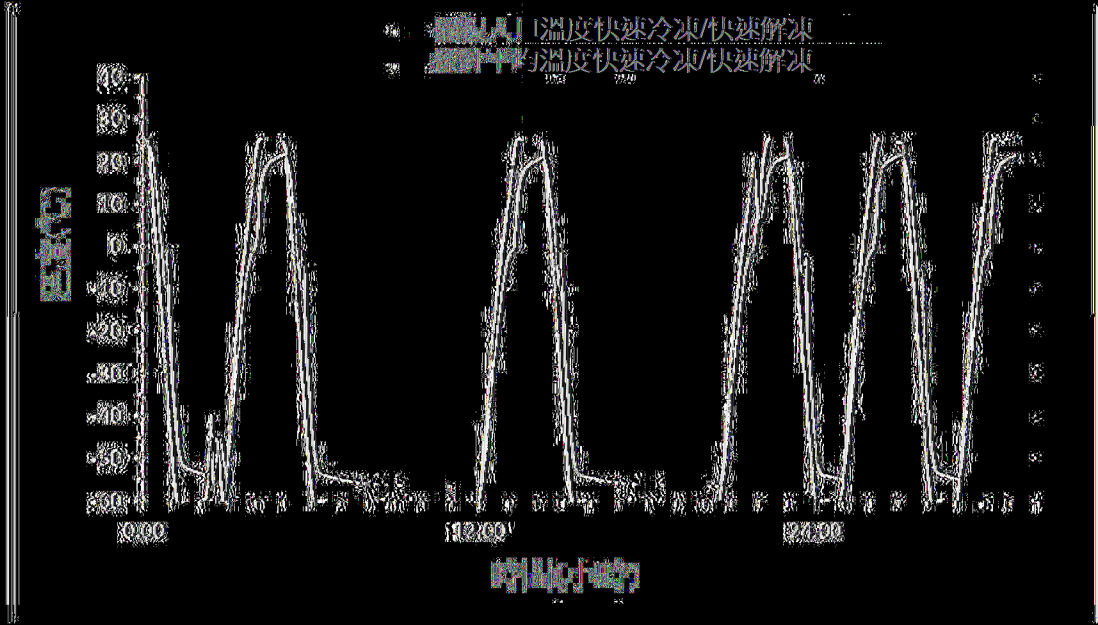
(圖18)



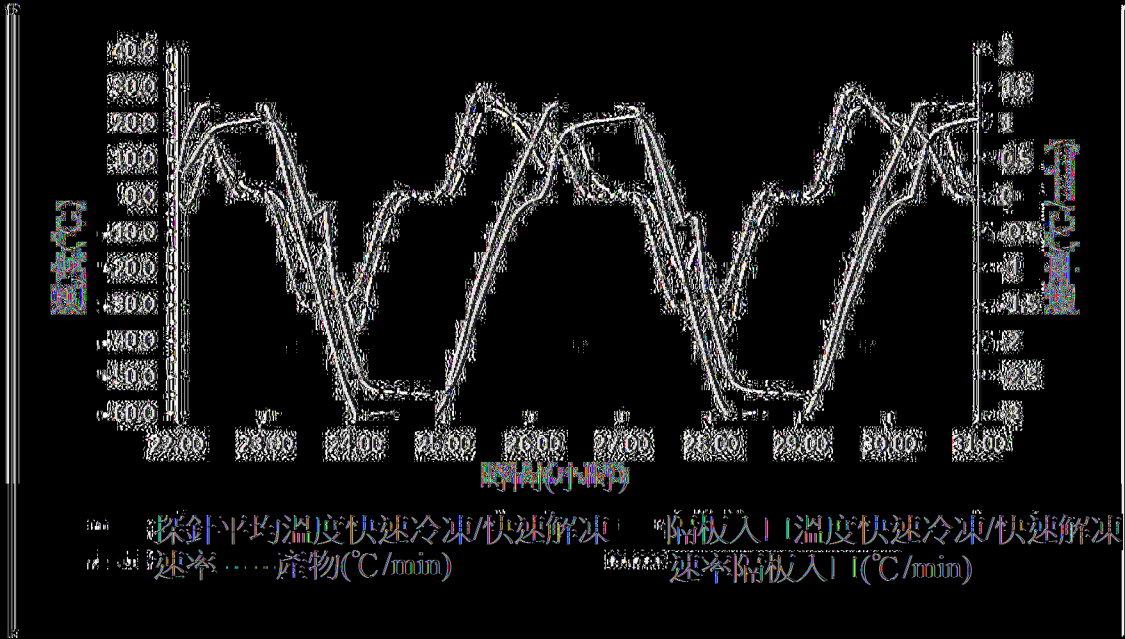
(圖19A)



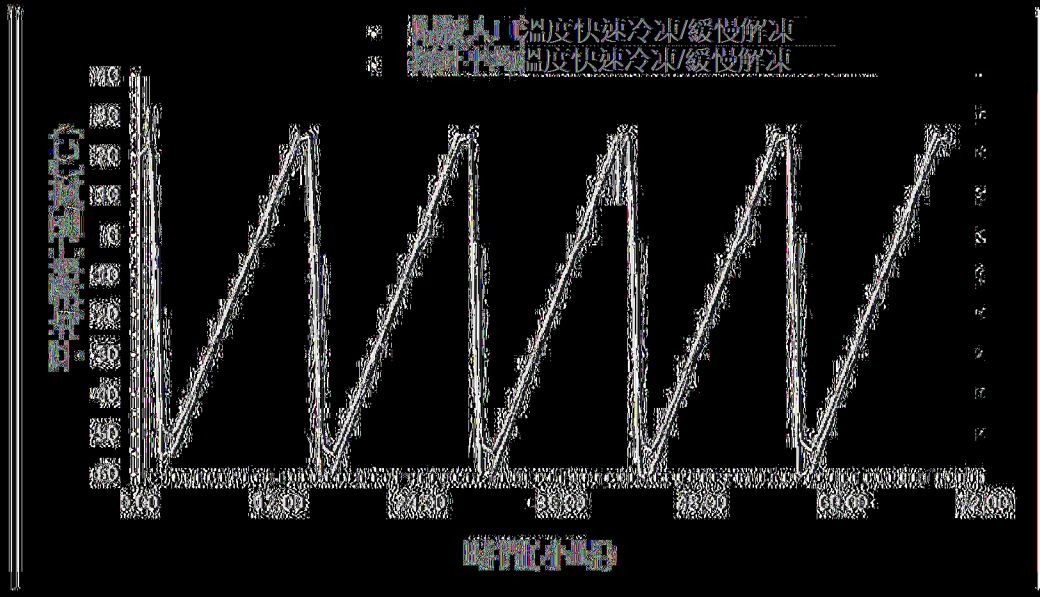
(圖19B)



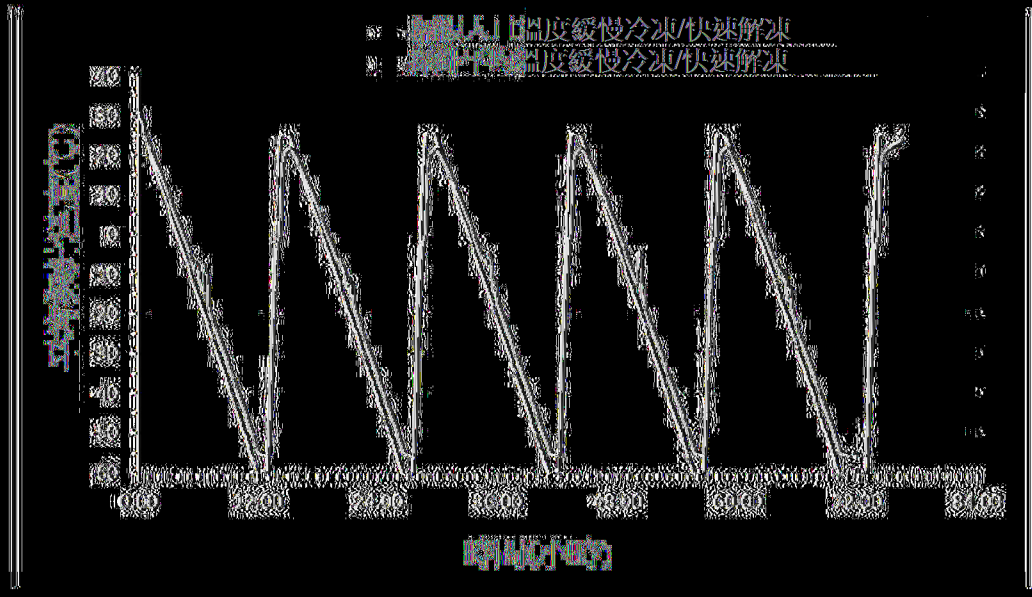
[(图20A)]



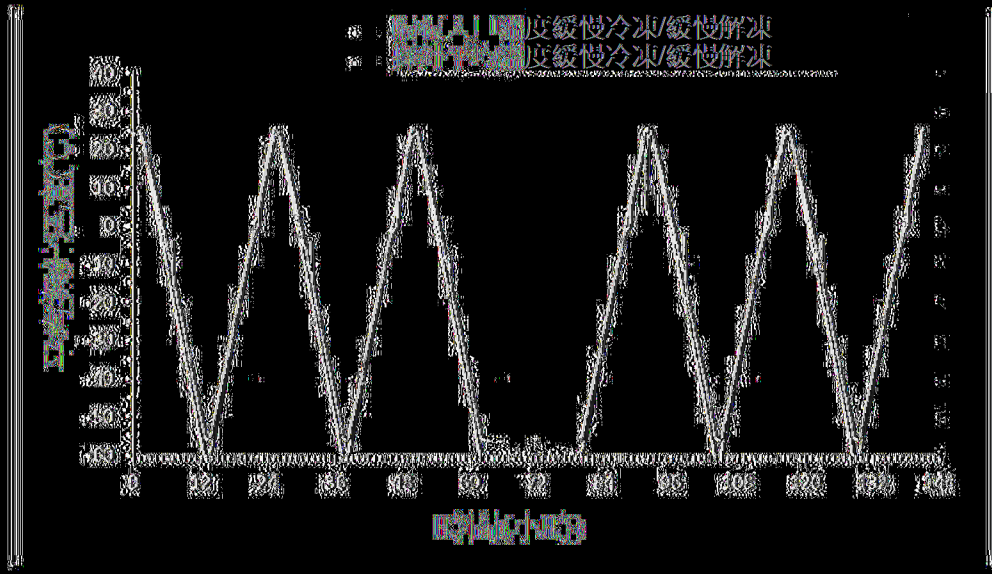
[(图20B)]



[(圖21)]



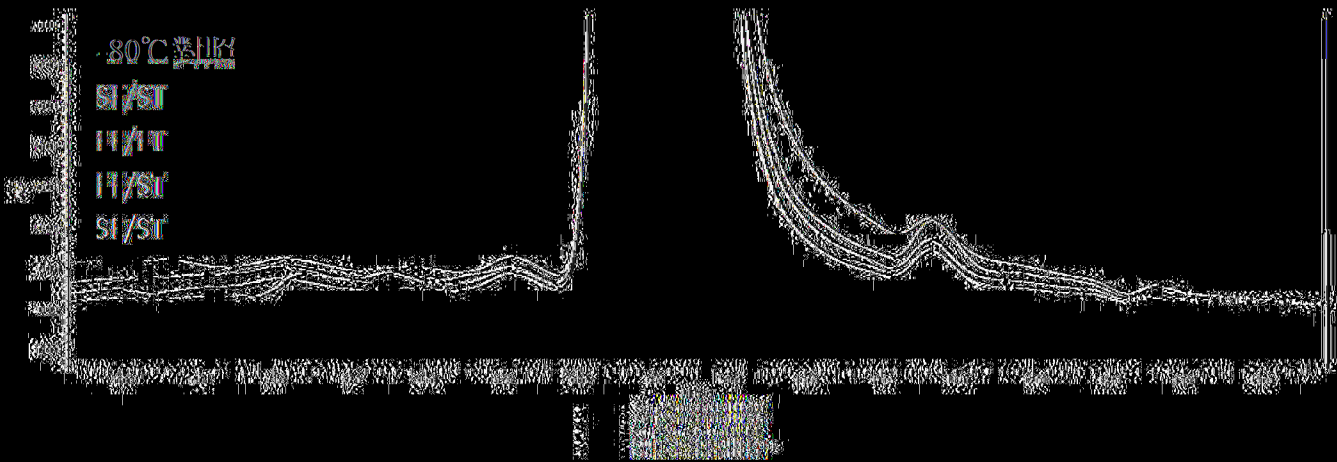
[(圖22)]



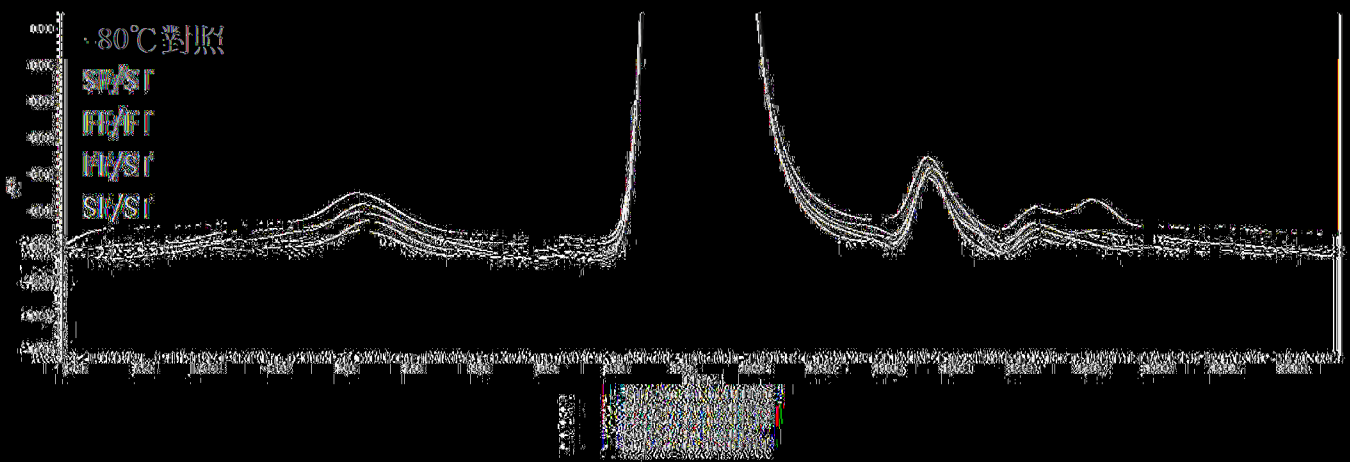
[(圖]2.3)]



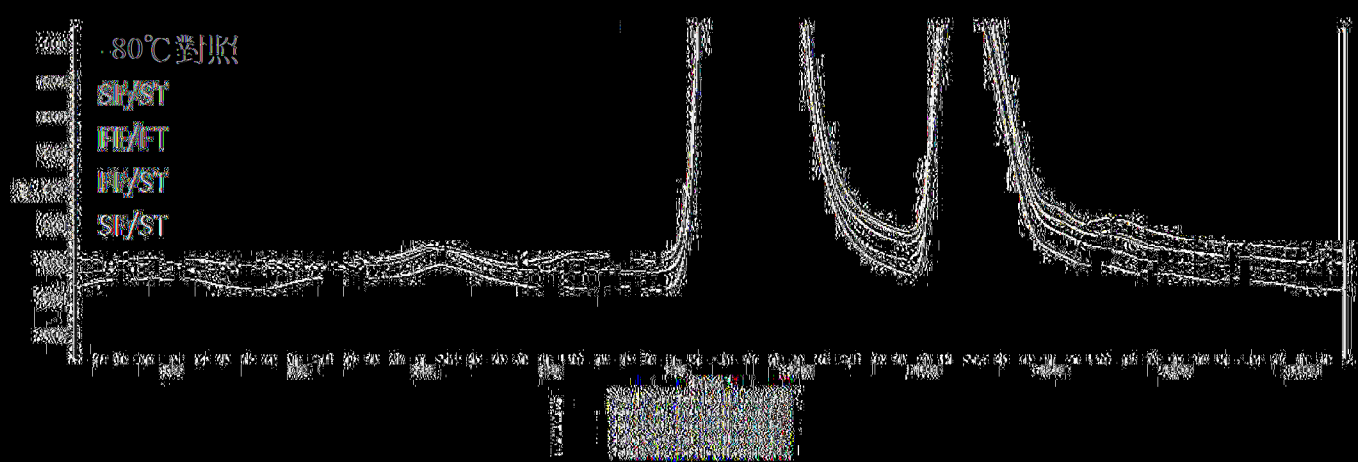
[(圖24)]



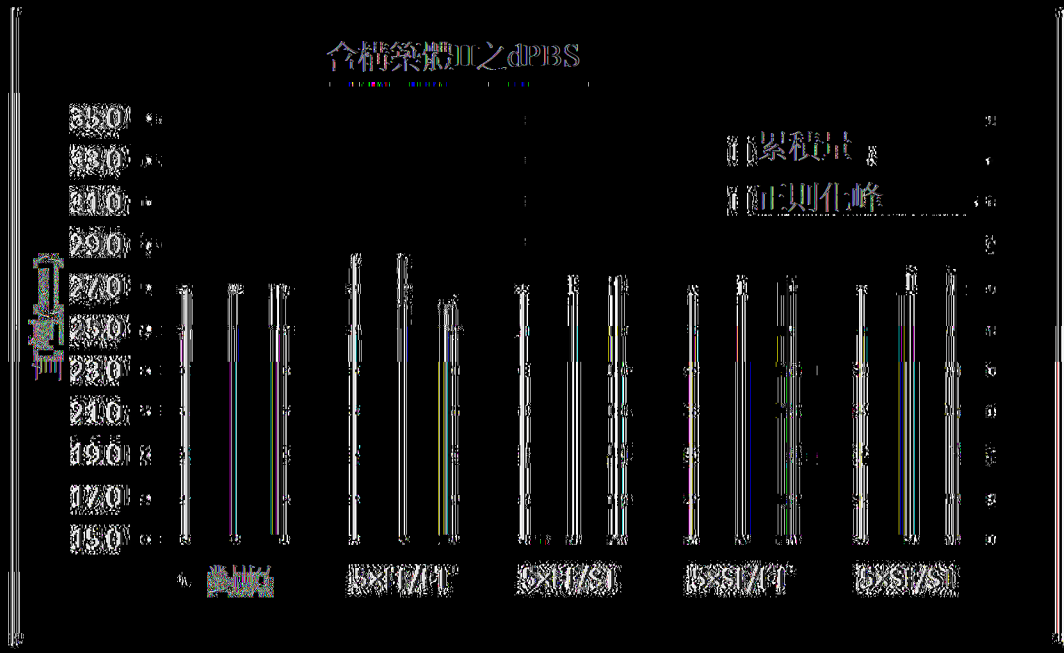
[(H)25]



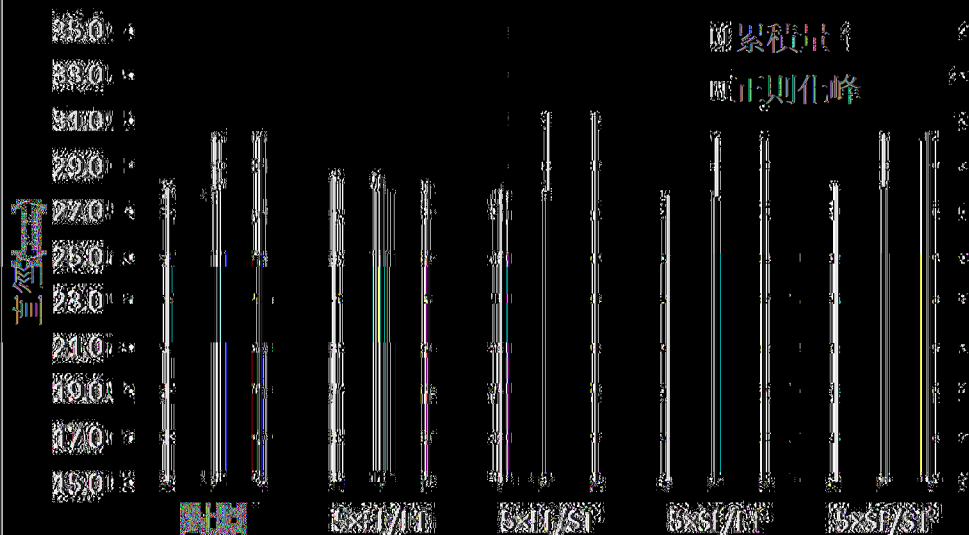
[(111)2.6]

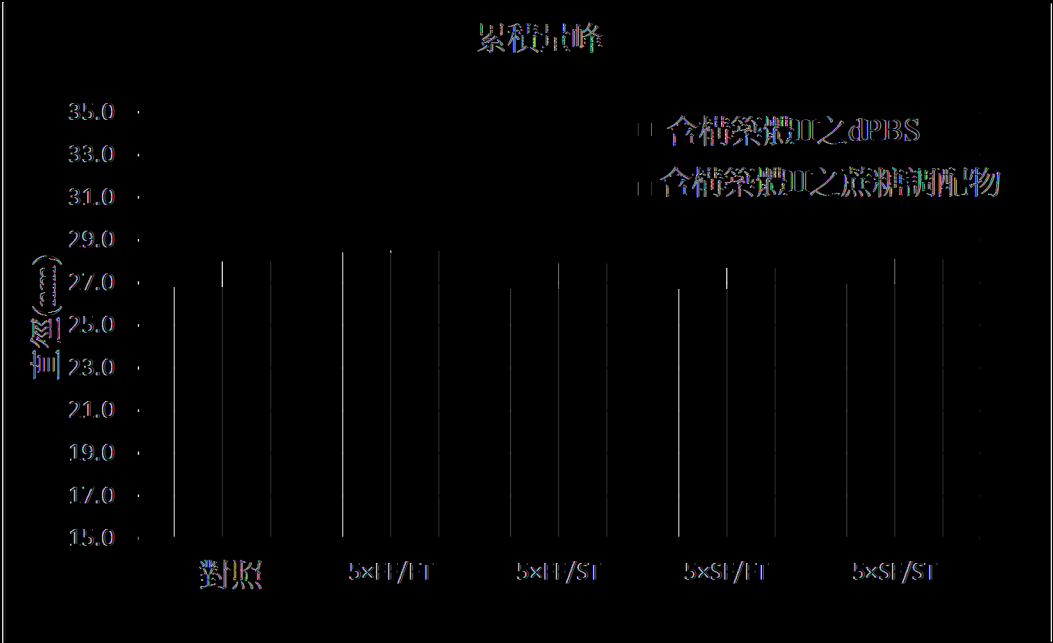


[(H)27]

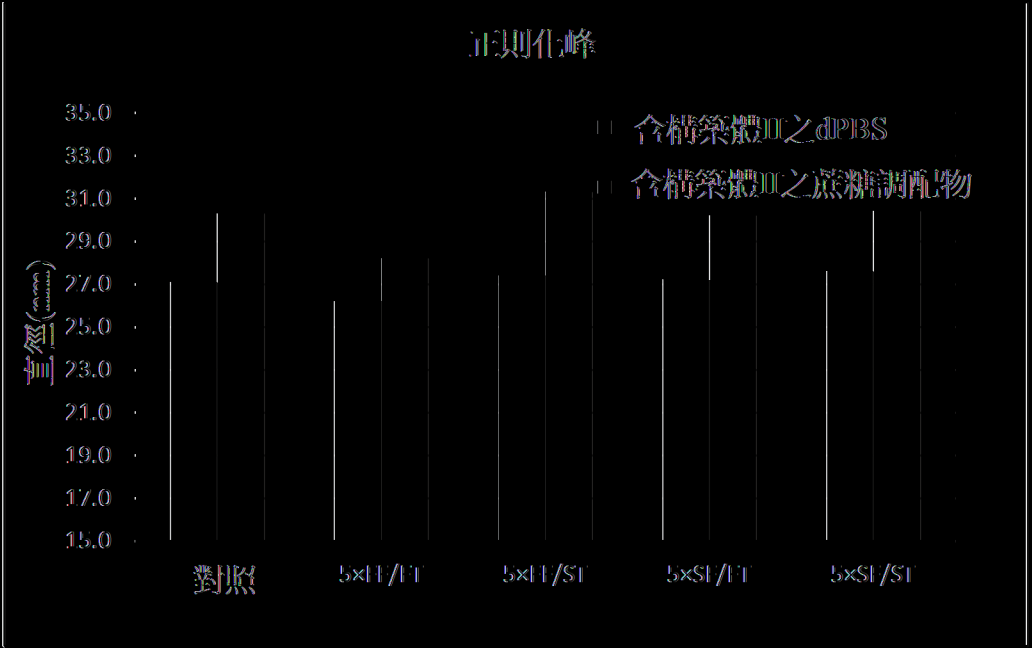


|(100%28)|

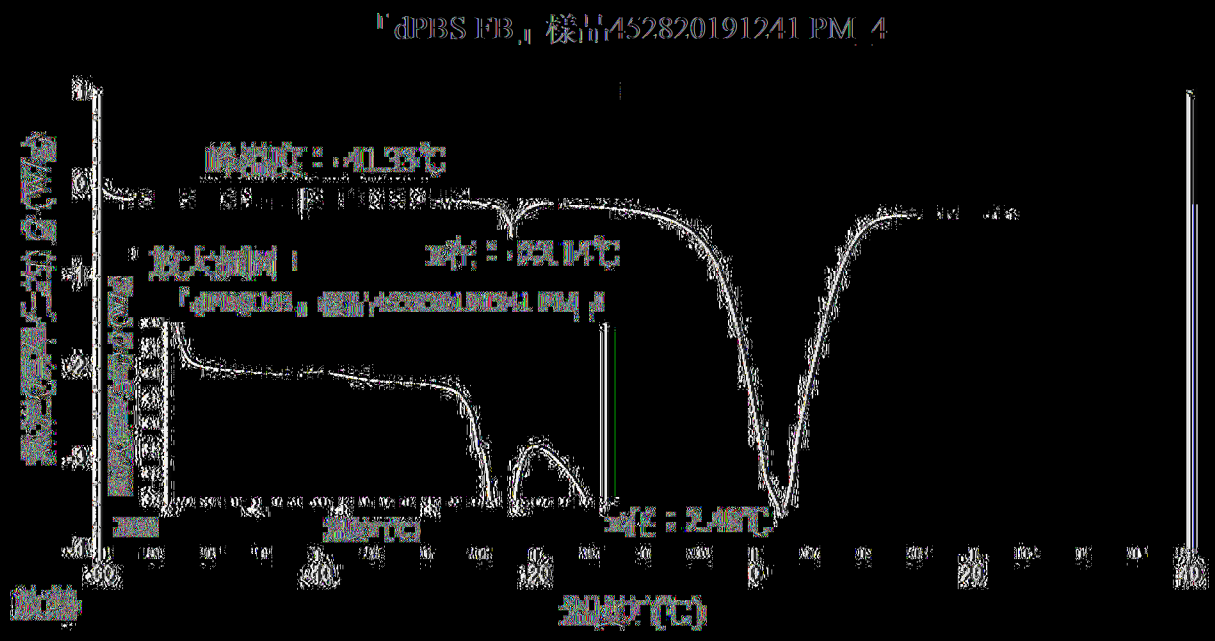

$$|(\mathbb{H}^2, 29)|$$



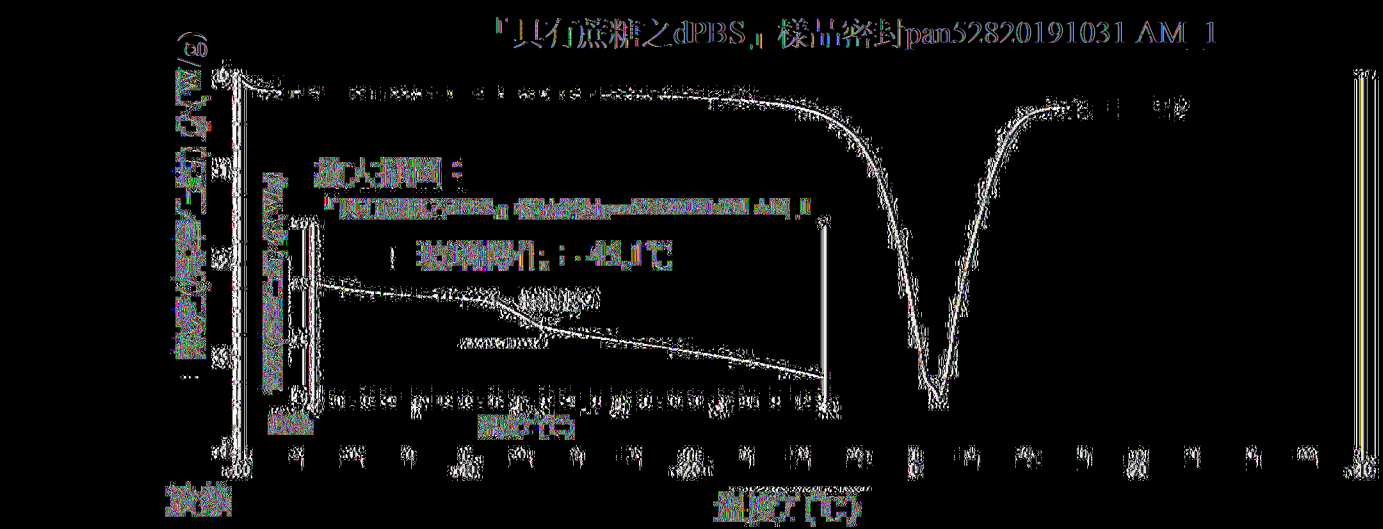
|(圖30)|



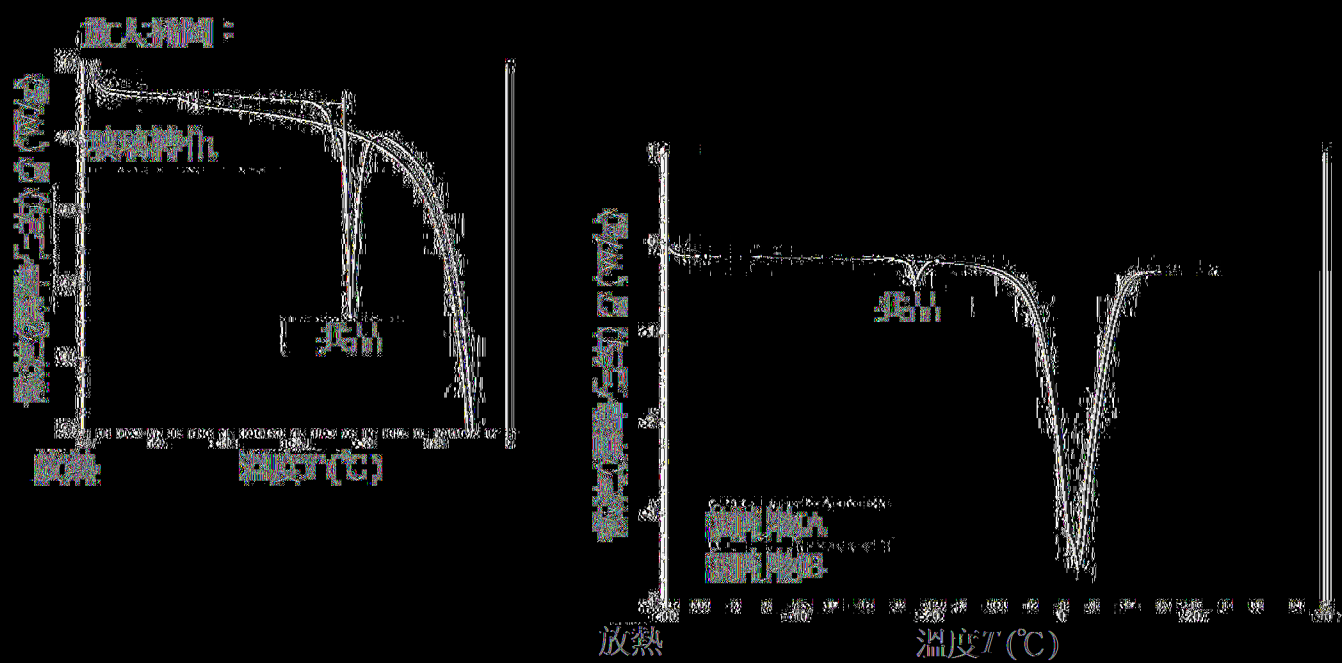
[(圖31)]



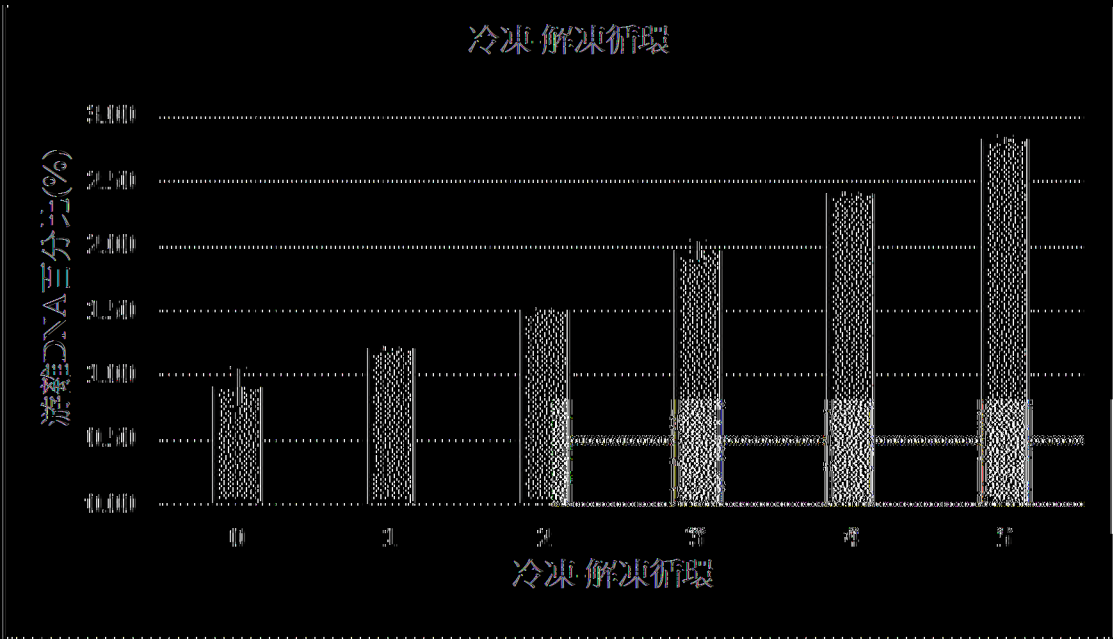
[(圖32)]



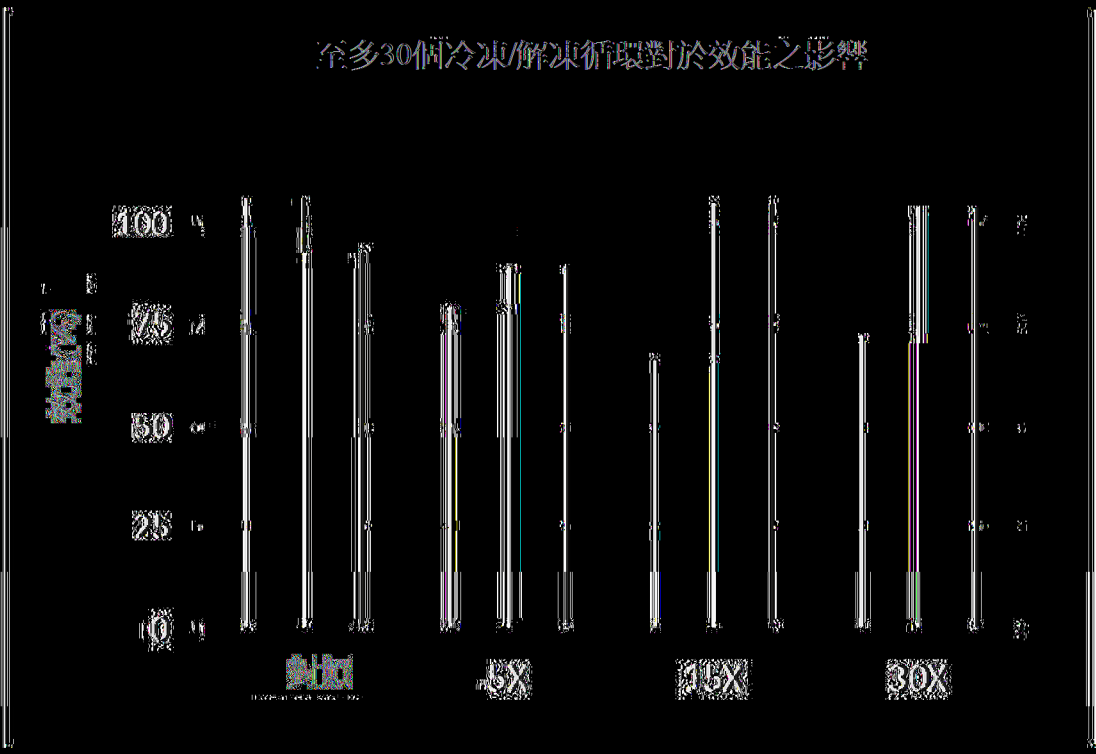
[(圖33)]



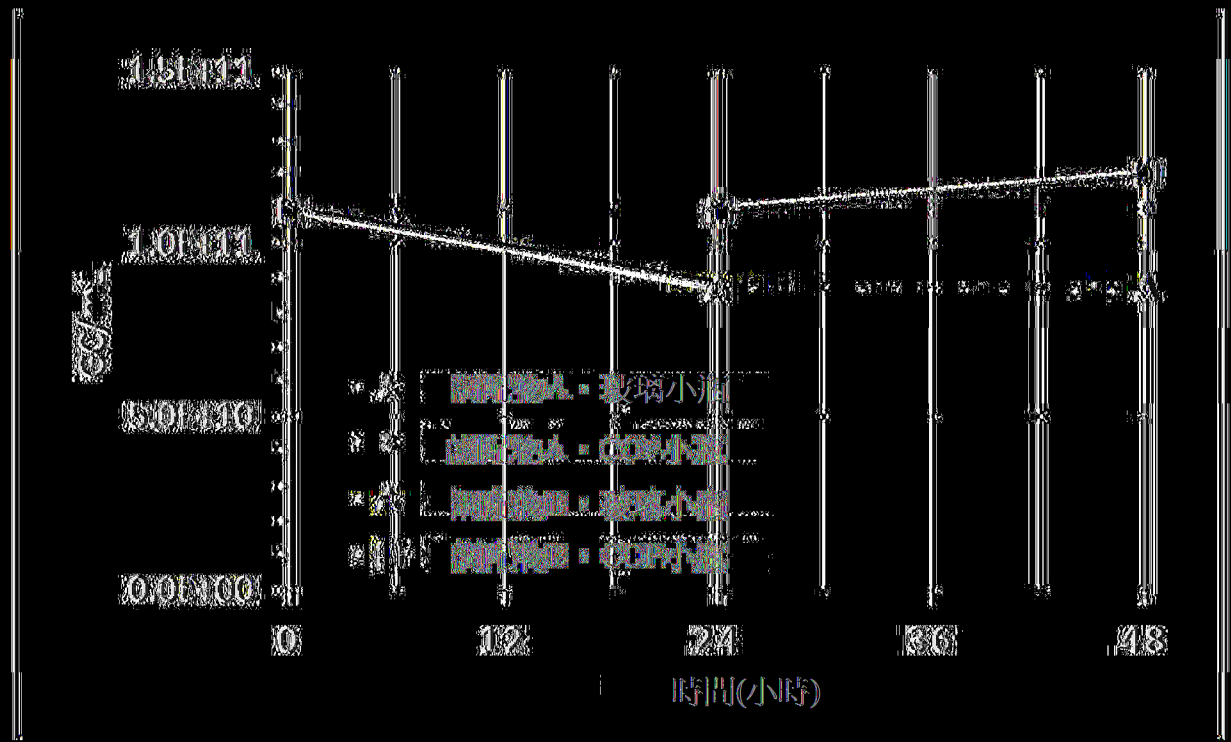
〔圖 34〕



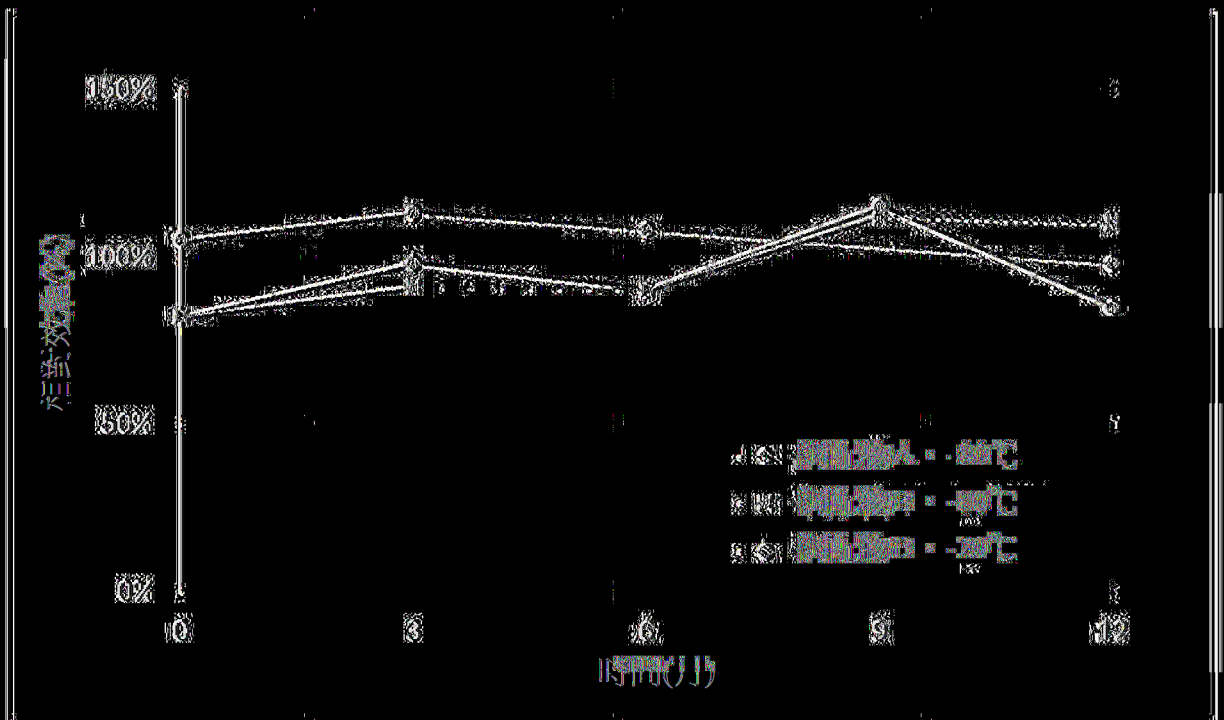
[(圖35)]



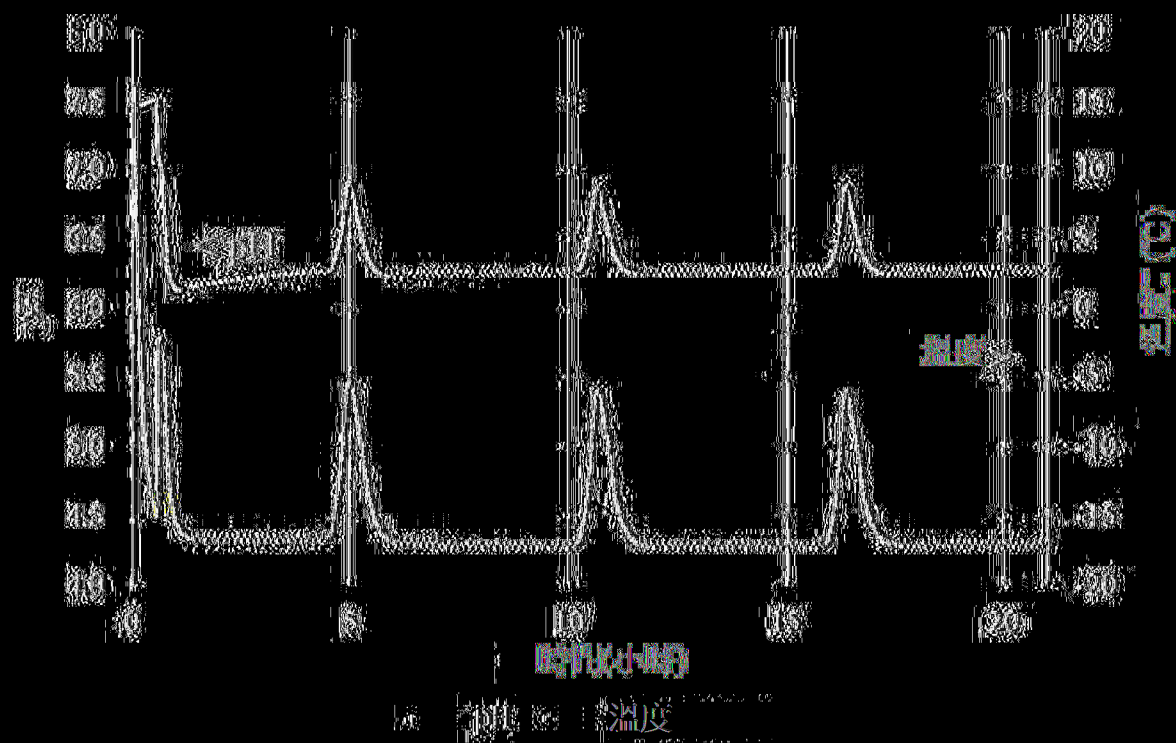
[(圖)36]



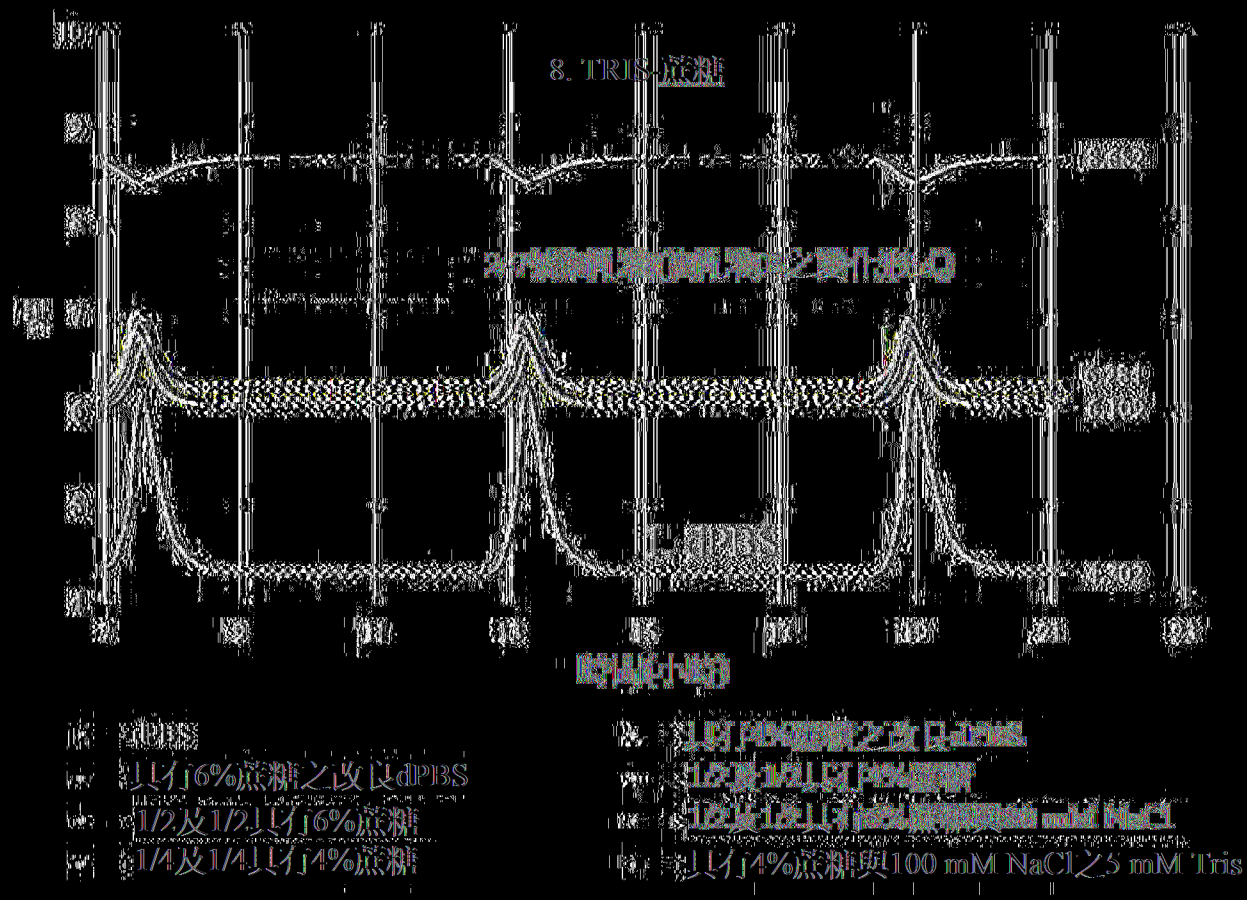
[(圖37)]



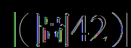
[(図38)]

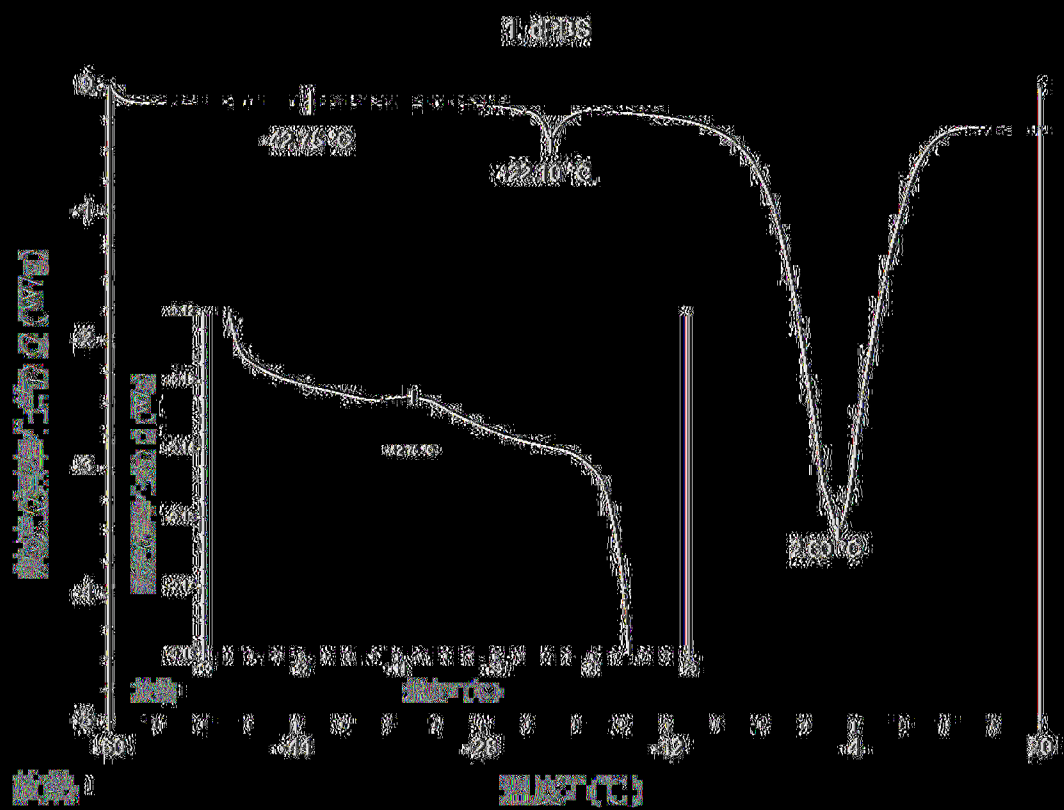


[(圖39)]

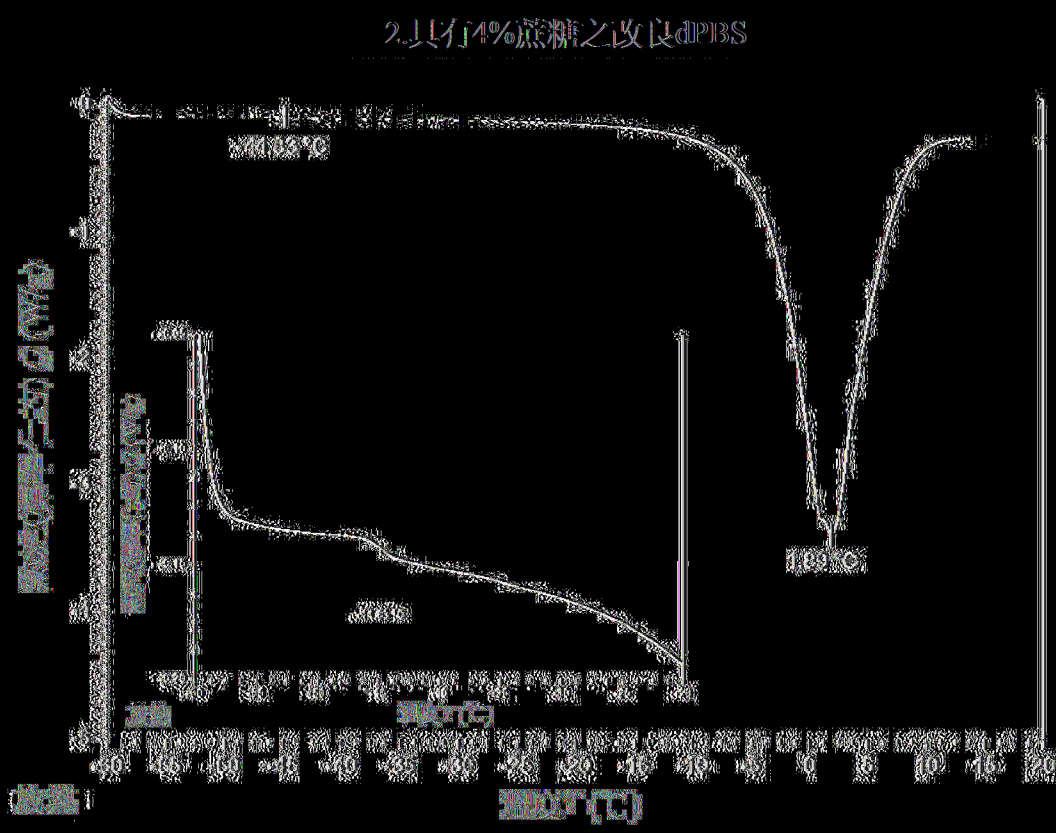


(圖40)

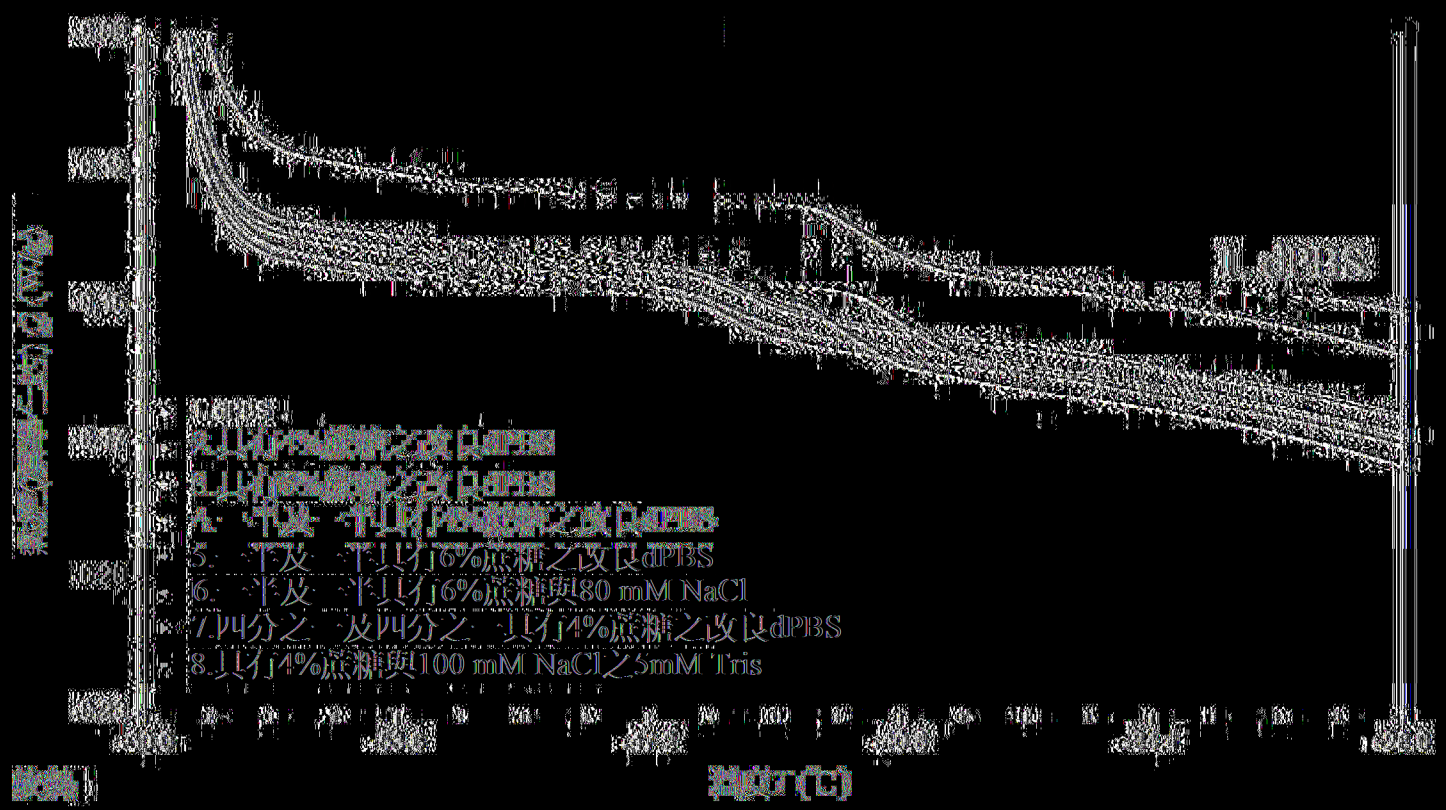




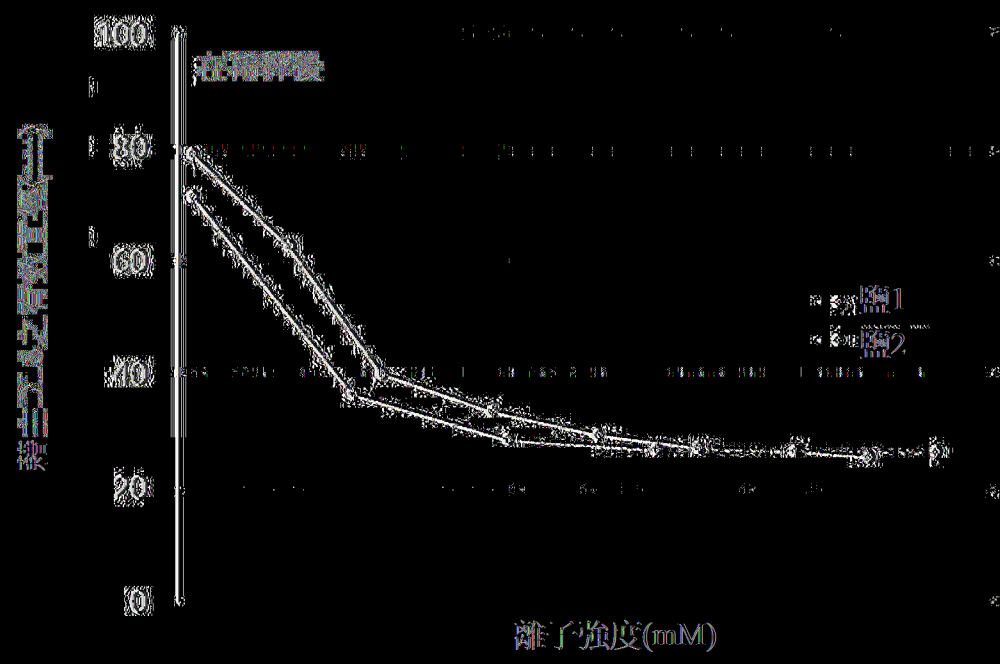
[(同43)]



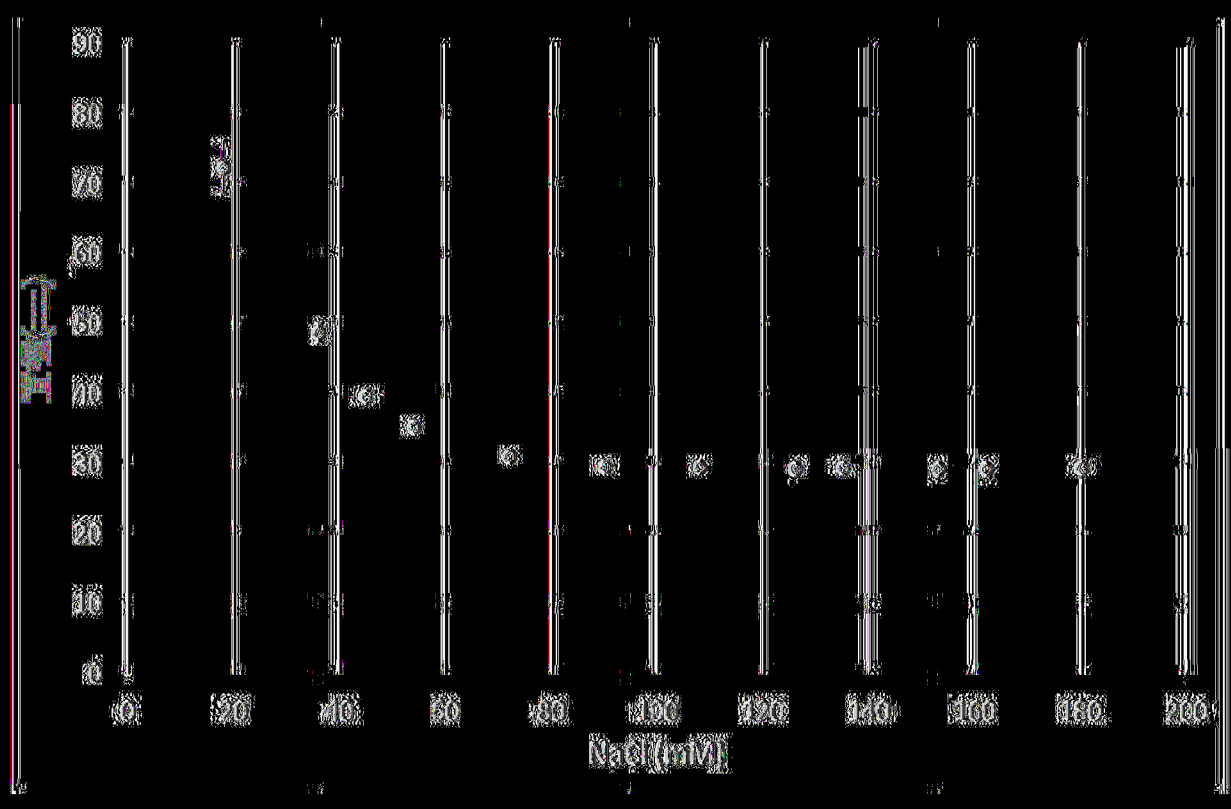
[(圖44)]



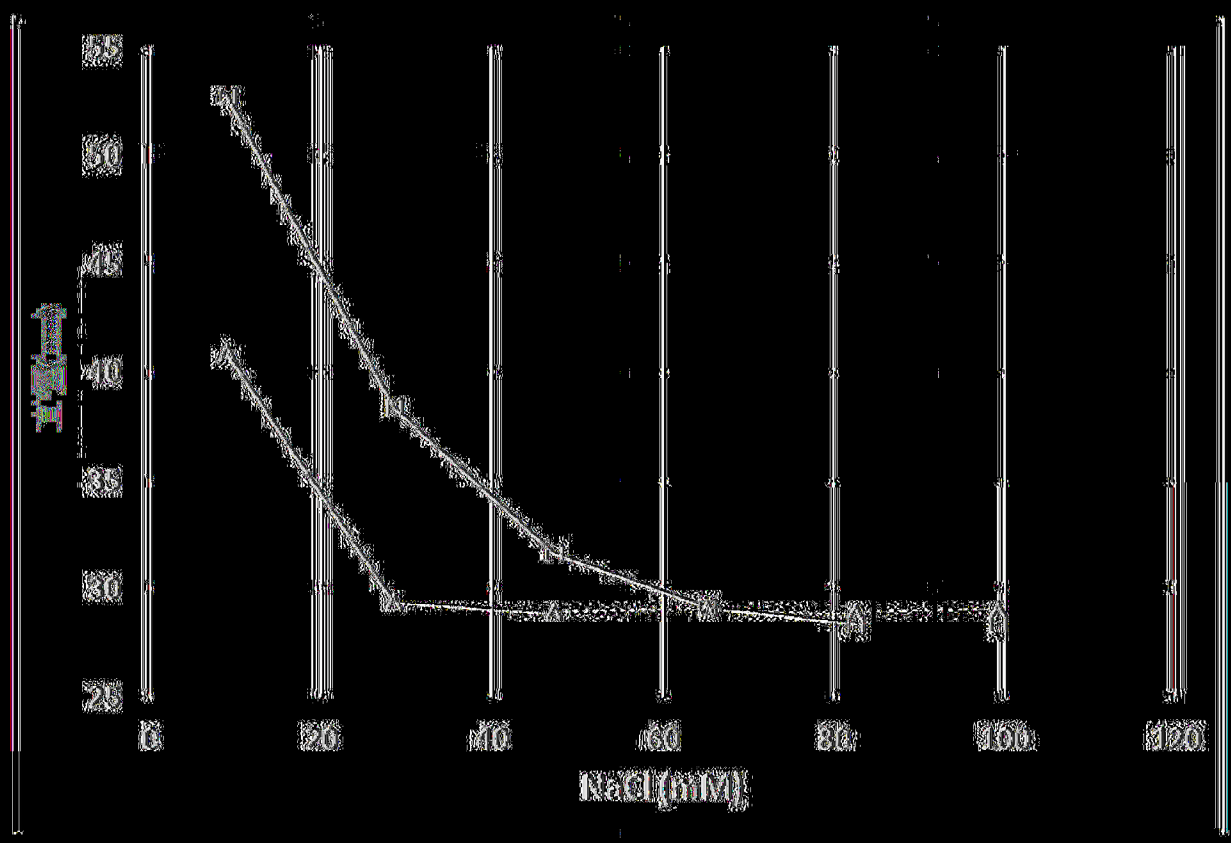
[(圖45)]



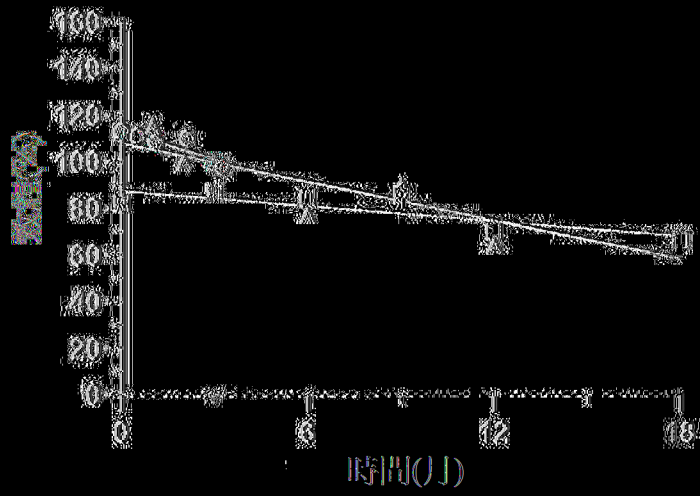
|(圖46)|



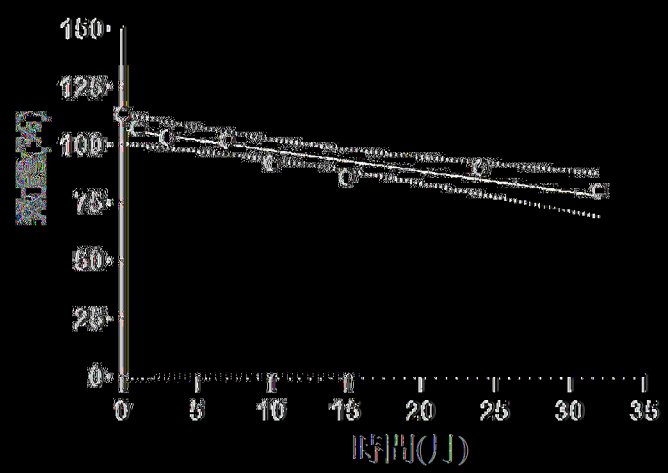
(B47)



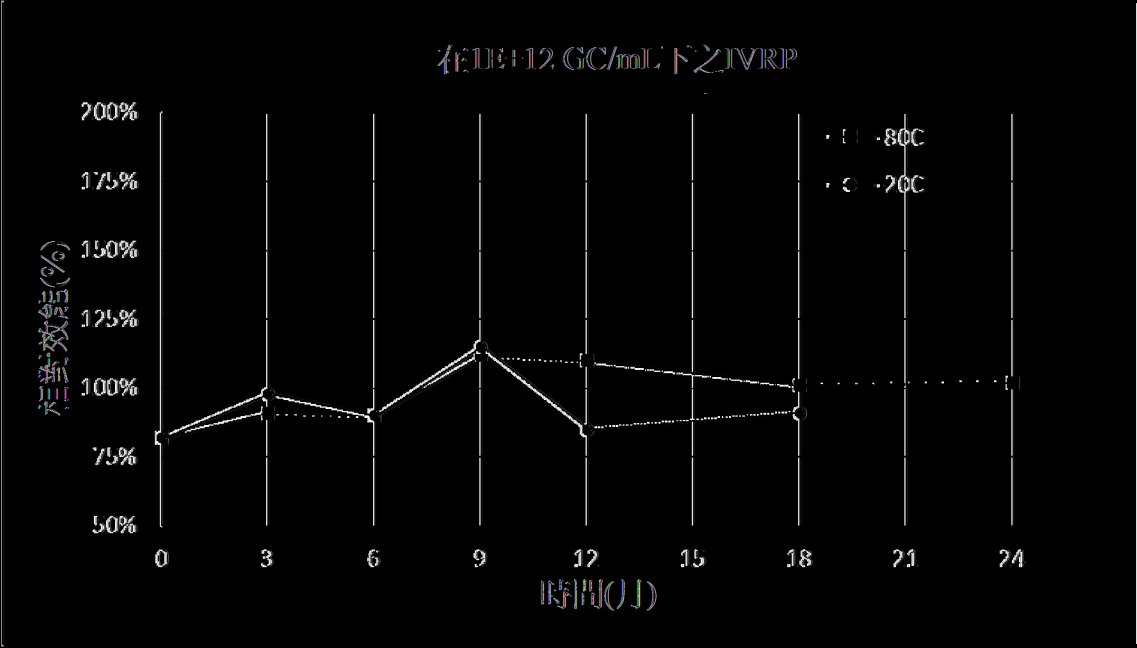
[(P48)]



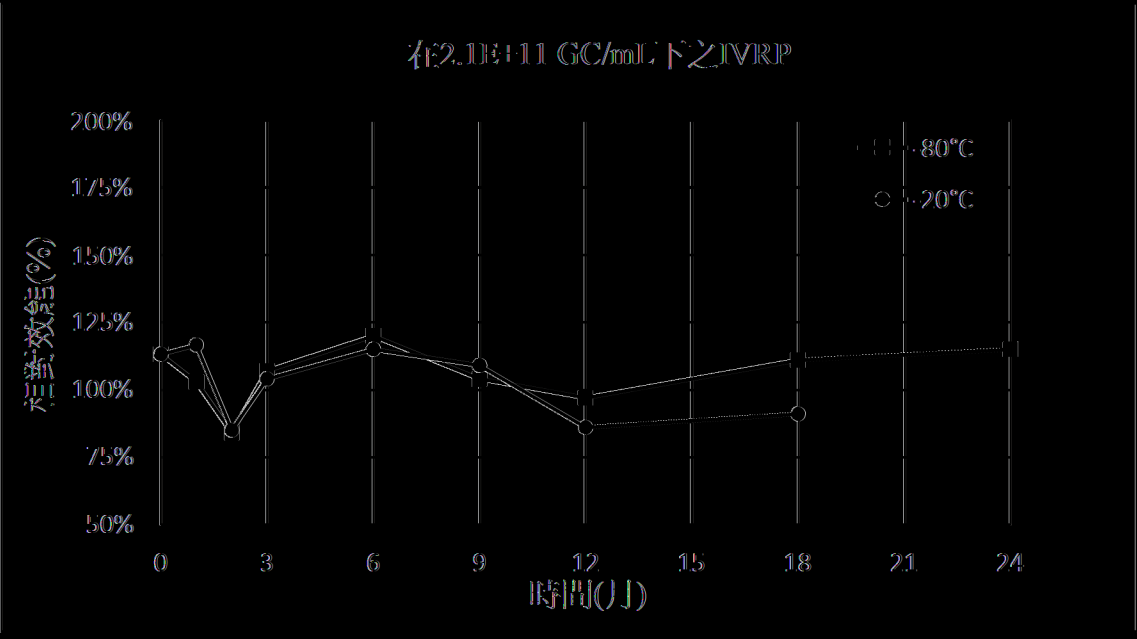
|(図50)|



|(図51)|



[(圖52)]



[(圖53)]

