



(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 202242118 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110147523

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl.：

C12N15/86 (2006.01)

C07K14/005 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/12/18

歐洲專利局

20215823.4

(71)申請人：瑞士商 A C 免疫有限公司 (瑞士) AC IMMUNE SA (CH)

瑞士

(72)發明人：德 瓦爾 格雷戈里奧 DE VAL, GREGORIO (CH)；內沃爾特里斯 達米安

NEVOLTRIS, DAMIEN (FR)

(74)代理人：廖俊龍

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：18 共 111 頁

(54)名稱

抗體遞送

(57)摘要

載體包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統(central nervous system,CNS)的疾病或病症的方法，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障(blood-brain barrier,BBB)之細胞並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中，優選遞送到腦實質中。可用於這樣的載體的表達盒可從 5' 至 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後且在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點(internal ribosomal entry site,IRES)，或者與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。由此產生的抗體和抗體片段可具有更高的品質，展示出更低水準的聚集和不希望的免疫原性。

A vector comprises a polynucleotide encoding an antibody or antibody fragment for use in a method of treatment of a disease or disorder of the central nervous system (CNS) in a subject, wherein the vector transduces or transfects cells of the blood brain barrier (BBB) and the transduced or transfected BBB cells express the antibody or antibody fragment resulting in delivery of the antibody or antibody fragment into the CNS, preferably into the brain parenchyma. Expression cassettes useful in such vectors may comprise from 5' to 3': at least one promoter operably linked to a first gene encoding a light chain of an antibody or antibody fragment and to a second gene encoding a heavy chain of the antibody or antibody fragment and further comprise an IRES after the first gene encoding the light chain of the antibody or antibody fragment and before the second gene encoding the heavy chain of the antibody or antibody fragment or a first promoter operably linked to a first gene encoding a light chain of an antibody or antibody fragment and a second promoter operably linked to a second gene encoding a heavy chain of the antibody or antibody fragment. The antibodies and antibody fragments thus produced may be of higher quality, displaying lower levels of aggregation and unwanted immunogenicity.

指定代表圖：

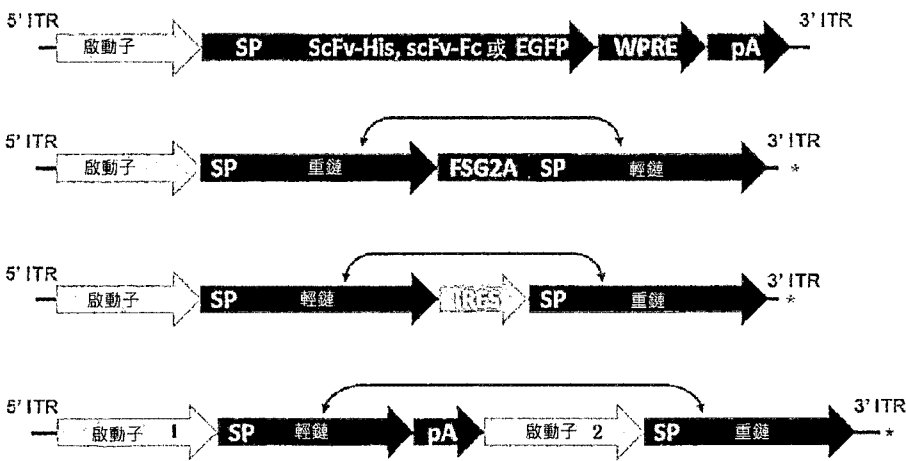


圖1

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

抗體遞送

ANTIBODY DELIVERY

【中文】

載體包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統（central nervous system, CNS）的疾病或病症的方法，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障（blood-brain barrier, BBB）之細胞並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中，優選遞送到腦實質中。可用於這樣的載體的表達盒可從 5' 至 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後且在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點(internal ribosomal entry site, IRES)，或者與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。由此產生的抗體和抗體片段可具有更高的品質，展示出更低水準的聚集和不希望的免疫原性。

【英文】

A vector comprises a polynucleotide encoding an antibody or antibody fragment for use in a method of treatment of a disease or disorder of the central nervous system (CNS) in a subject, wherein the vector transduces or transfects cells of the blood brain barrier (BBB) and the transduced or transfected BBB cells express the antibody or antibody fragment resulting in delivery of the antibody or antibody fragment into the CNS, preferably into the brain parenchyma. Expression cassettes useful in such vectors may comprise from 5' to 3': at least one promoter operably linked to a first gene

encoding a light chain of an antibody or antibody fragment and to a second gene encoding a heavy chain of the antibody or antibody fragment and further comprise an IRES after the first gene encoding the light chain of the antibody or antibody fragment and before the second gene encoding the heavy chain of the antibody or antibody fragment or a first promoter operably linked to a first gene encoding a light chain of an antibody or antibody fragment and a second promoter operably linked to a second gene encoding a heavy chain of the antibody or antibody fragment. The antibodies and antibody fragments thus produced may be of higher quality, displaying lower levels of aggregation and unwanted immunogenicity.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖1 。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗體遞送

ANTIBODY DELIVERY

【技術領域】

【0001】 本發明涉及這樣的方式和方法，其用於通過載體(例如病毒載體等)將編碼抗體或抗體片段的基因有效遞送至來自血腦屏障(blood-brain barrier, BBB)或中樞神經系統(central nervous system, CNS)的細胞(例如腦內皮細胞)，以在細胞中產生釋放至 CNS (優選釋放到腦實質中)的抗體分子。通過將抗體基因遞送到 BBB 或 CNS 中，特別是腦內皮細胞中，本發明還涉及提高中樞神經系統(CNS)中抗體濃度的方法。通過這種方法遞送治療性抗體可用於治療多種起源於 CNS 的疾病或病症，例如神經退行性疾病或病症、運動疾病或病症、腦相關腫瘤、精神病和 CNS 神經炎症等。在一個方面中，本發明來源於意想不到的發現，該發現即通過載體(例如腺相關病毒(adeno-associated virus, AAV)載體)在體外轉導腦內皮細胞導致高品質抗體大量分泌到基底外側空間中。本發明還描述了通過改變鏈位置、使用不同的分泌肽以及定制上游、內部和下游調節元件而獲得的出乎意料的高抗體表達產量和改善的蛋白質品質。本發明繞過了與通過需要以足夠的治療劑量穿過血腦屏障將治療性抗體遞送至腦相關的困難。本發明適用於任何哺乳動物，尤其是人物件，並且旨在改善治療性抗體向腦的遞送。因此，本發明可用於治療與患有 CNS 疾病或病症的患者相關的疾病、障礙或病症，其包括但不限於：澱粉樣蛋白 β 蛋白相關疾病、TDP-43-蛋白質病、 α -突觸核蛋白病、Tau 蛋白病、三核苷酸重複疾病(包括多聚穀氨醯胺疾病例如亨廷頓病)、腦相關癌症和腫瘤、癲癇、精神疾病(psychiatric disease)、神經炎症性疾病、神經肌肉疾病、病毒誘發的腦炎和以小膠質細胞功能障礙為特徵的疾病。

【先前技術】

【0002】 血腦屏障(BBB)是結構性和功能性屏障，其保護腦免受血液攜帶的病原體和毒素的侵害，而且維持用於適當的神經元在中樞神經系統(CNS)中

發揮作用所需的嚴格調節的微環境[1, 2]。BBB 由三種細胞類型構成：形成血流與腦之間的物理屏障的內皮細胞（endothelial cell, EC），以及位於 EC 層的非內腔表面的兩種壁細胞，即周細胞和星形膠質細胞[3]。儘管腦內皮細胞有助於 BBB 的主要功能，但這三種細胞類型構成了大多數脊椎動物的整個血腦屏障。它們的相互作用和交流對於維持嚴格調節的 CNS 穩態是至關重要的。

【0003】 與內皮細胞相比，腦內皮細胞具有獨特的特性；它們通過緊密連接（tight junction, TJ）連接在一起，緊密連接是限制化合物通過細胞旁空間擴散的多蛋白連接網路。雖然小分子（例如水、氧和小脂溶性物質）可容易地從血液穿過進入腦中，但緊密連接阻止了大分子擴散進入腦，包括抗體。[4]

【0004】 這種嚴格調節進入腦是針對開發生物製劑、針對涉及中樞神經系統（CNS）的疾病的主要挑戰之一。實際上，已報導了在外周施用之後，約 0.1% 至 0.3% 的經注射的抗體到達腦[5][6]。即使使用高注射劑量，在腦中獲得足夠濃度的抗體以引發治療性應答通常仍是挑戰。該缺點已被描述為臨床試驗期間被動免疫治療失敗的可能原因之一。（[7]）

【0005】 在過去的數十年期間，已開發了替代的非侵入性方法例如受體介導的轉胞吞作用（[8]）、納米顆粒遞送[9][10]鼻內遞送[11, 12]或基於細胞的技術（[13, 14]）以提高大分子在腦中的滲透。然而，報導了主要與製造挑戰[15]、體內靶點介導的藥物處置[16][17]或經修飾的蛋白質的疑似抗原性[18]相關的有限的效力。

【0006】 在最近的研究[14]中，作者報導了由離體轉染的能夠歸巢至 BBB 並表達治療性抗體的自體內皮前體細胞（endothelial precursor cell, EPC）組成的細胞靶向遞送系統。然而，即使觀察到成功的離體轉染，但預期在靜脈內移植之後經改造的 EPC 的歸巢有限[19]，這降低了這樣的方法的治療潛力。動脈內注射可以是合適的替代，但仍然具有挑戰性，因為必須仔細評價和優化細胞劑量、輸注速度和細胞類型。[20]

【0007】 根據使用病毒載體的基因治療，基於使用經修飾以在其基因組中包含目的轉基因的病毒將治療性基因引入到特定器官、組織或細胞類型中，可將

目的基因直接遞送到 CNS 中。已用於基因遞送治療的病毒載體基於但不限於逆轉錄病毒、慢病毒、腺病毒和腺相關病毒。

【0008】 腺相關病毒 (adeno-associated viruse, AAV) 為基因遞送提供了有效且臨床安全的平臺，如由最近的以下批准所證明的：Luxturna® (voretigene neparvovec-rzyl)，其是首個批准的為患有由於 RPE65 基因的兩種拷貝均突變的遺傳性視網膜疾病的患者提供 RPE65 基因的功能性拷貝的基於 AAV2 的治療，以及 Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec-xioi)，其是將 SMN1 基因的功能性拷貝遞送至脊髓性肌萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA) 患者中運動神經元的 AAV9 載體。

【0009】 AAV 還被用作用於將基因轉移至神經系統使得能夠進行基因表達、敲低和基因編輯的載劑[21]。然而，這些應用中的大部分依賴於 AAV 載體的侵入性、局部注射（室內 (intraventricular) 施用、鞘內施用或腦池內施用），以便 1) 繞過血腦屏障和 2) 在時間和空間上限制轉基因表達。

【0010】 不同的野生型血清型，包括 AAV2，可轉導 BBB 但不能穿過 BBB，因此需要進行侵入性手術用於將其遞送到腦[22, 23]。相比之下，靜脈內施用 AAV9 血清型可克服 BBB 並進入 CNS，導致基因轉移至腦和脊髓[24, 25]。

【0011】 最近報導的經改造的衣殼載體例如但不限於基於 AAV9 的 AAV-S、AAV-F[26]或 AAV-PHP.eB ([27-29]) 提供了良好的腦轉導，其中穿過成年小鼠許多區域的神經元和星形膠質細胞的大部分是使用靜脈內施用途徑來轉導的。類似地，報導了基於 AAV2 的 AAV-BR1 (本文中可互換地稱為 AAV2-BR1) 衣殼[30]或更近期的 AAV9-PHP.V1[31]在持久的轉基因表達的情況下選擇性轉導腦內皮細胞，其具有治療神經血管疾病的潛力。

【0012】 AAV 介導的完整的免疫球蛋白 (IgG) 或不含 Fc 結構域的抗體片段的表達表明在 CNS 內用於多種適應證[32-44]，但也報導了兩種形式的固有局限性[[32, 45, 46]]。實際上，AAV 表達盒的包裝尺寸對完整的 IgG 基因施加了設計限制，其中包含重鏈和輕鏈基因二者的所有轉錄和翻譯所需的元件均需要低於 4.7 kb。迄今為止，大部分構建體由單個啟動子組成並且因此需要在抗體重鏈

基因 (heavy chain, HC) 與輕鏈 (light chain, LC) 之間使用自加工序列, 例如弗林蛋白酶 2A (F2A) [47-49]。由於高表達效價、小 F2A 序列尺寸 (僅 60 至 80 個域基對) 和抗體鏈表達中的等摩爾性 (equimolarity), 研究人員對這種構建體具有明顯偏好。然而, 並且在大部分情況下, F2A 肽仍然與重鏈或輕鏈連接, 這可能引發所表達蛋白質或抗體表達細胞的不希望的免疫原性[45]。用於雙順反子抗體表達的內部核糖體進入位點 (internal ribosomal entry site, IRES) 已被描述為自切割序列的替代物, 但由於重鏈和輕鏈表達上的不平衡, 通常獲得較低的蛋白質表達。雖然抗體片段例如 scFv 或單結構域抗體由於單順反子表達而與完整的 IgG 分子相比存在一些優勢, 例如更高的蛋白質效價, 但所述片段缺乏 Fc 效應子功能並且不具有 FcRn 結合能力, 導致體內半衰期較短。缺乏 Fc 結構域的片段隨後無法募集效應細胞以清除腦實質中的病理複合物, 並存在通過反向轉胞吞作用降低結合抗原從腦至血液的流出[32, 50 至 52]。由於這樣的分子的單價結合能力, 觀察到比 IgG 對應物更低的親和力。因此, 與片段相比, 分泌的靶向和清除胞外蛋白病的完整的 IgG 可以是優選的選擇, 但需要開發規避當前局限性的方法, 以允許高品質表達以提高抗體暴露、募集效應細胞並降低原位產生的 IgG 的不希望的免疫原性的風險。

【發明內容】

【0013】 在此, 首次描述了遞送方法, 該方法通過使用載體 (例如病毒載體) 或者另一種載體 (例如脂質體或納米顆粒) 將編碼抗體或抗體片段的基因遞送至來自血腦屏障 (BBB) 的細胞, 例如但不限於腦內皮細胞, 以局部地使得治療性抗體分子進入 CNS, 優選進入腦實質中。通過這種新方法產生的抗體可用於治療 CNS 相關病症。在這樣的情況下, BBB 的細胞 (腦內皮細胞和/或周細胞和/或星形膠質細胞) 提供進入 CNS, 特別是腦實質中的高品質抗體的長期表達。

【0014】 這種新策略繞過了需要穿過血腦屏障以使達到足夠治療劑量的抗體進入 CNS, 優選進入腦實質中的傳統被動免疫策略的障礙。

【0015】 本發明還涉及用於產生抗體和抗體片段的改善的表達盒, 其通過改變鏈位置、使用不同的分泌肽和定制內部和下游調節元件來產生意想不到的相對於現有技術中先前報導的策略更高的抗體表達產量和改善的蛋白質品質。

【0016】 本發明部分基於以下發現：載體可用於將編碼抗體或抗體片段的多核苷酸遞送至血腦屏障（BBB）的細胞。由 BBB 的細胞表達的編碼抗體或抗體片段的多核苷酸導致將該抗體或抗體片段遞送到 CNS（優選遞送到腦實質）中。該發現提出了繞過傳統策略的局限性的新策略，傳統策略依賴於治療性抗體穿過 BBB 以便實現足夠治療劑量的抗體進入 CNS，優選進入腦實質中，以治療 CNS 的疾病或病症。

【0017】 因此，在一個方面中，本發明提供了包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，該抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統（CNS）的疾病或病症的方法，其中載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）的細胞，並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達該抗體或抗體片段，導致將該抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【0018】 與依賴於將抗體或抗體片段直接遞送至物件的常規抗體治療相比，通過將本文中所述的包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體靶向至 BBB，被遞送至 CNS（優選遞送到腦實質中）的抗體或抗體片段的量提高。如別處所述，已報導了在外周施用之後，僅約 0.1% 至 0.3% 的經注射的抗體到達腦。相比之下，發明人發現使用 AAV 載體將編碼抗體（MAB1）的多核苷酸引入到腦內皮細胞系導致 MAB1 的非極化分泌。這意味著該技術可用於將抗體或抗體片段表達到 CNS 中，優選地表達到腦實質中。

【0019】 CNS 由兩種主要組分，即腦和脊髓組成。感覺衝動傳遞到 CNS 並且運動衝動從 CNS 傳遞過來。CNS 還協調整個神經系統的活動。在一個實施方案中，根據本發明應用的載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）的細胞並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達該抗體或抗體片段，導致將該抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。CNS 包含多種細胞類型，並且在一個實施方案中，抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中的至少一種（多至所有）細胞類型中。在一個實施方案中，抗體或抗體片段可遞送至：腦內皮細胞、神經元、周細胞、星形膠質細胞、少突膠質細胞、小膠質細胞和室管膜細胞。因此，可遞送至 CNS 的神經元和非神經元（膠質）細胞。在一個實施方案中，抗體或抗體片段從 BBB 細胞分泌到 CNS 中。例如，BBB 細胞中至少 20% 的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實

施方案中，BBB 細胞中至少 30%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 40%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 50%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 60%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 70%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 80%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 90%的表達的抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。

【0020】 在一個優選的實施方案中，將抗體或抗體片段遞送到腦實質中。本文中使用的“腦實質”是指由神經元和膠質細胞構成的腦功能性組織。根據本發明應用的載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）之細胞，並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達抗體或抗體片段，導致將該抗體或抗體片段遞送到腦實質中。在一個實施方案中，抗體或抗體片段從 BBB 細胞分泌到腦實質中。例如，BBB 細胞中至少 20%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 30%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 40%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 50%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 60%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 70%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 80%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。在一個實施方案中，BBB 細胞中至少 90%的表達的抗體或抗體片段被遞送到腦實質中。

【0021】 如別處已描述的，BBB 是結構性和功能性屏障，其保護腦免受血液攜帶的病原體和毒素的侵害。BBB 由三種細胞類型構成：內皮細胞、周細胞和星形膠質細胞。雖然發明人的發現主要涉及 BBB 的內皮細胞，但發明人的觀察結果可同樣適用於 BBB 的其他細胞。因此，在一個實施方案中，載體將編碼抗體或抗體片段的多核苷酸轉導或轉染至選自以下的細胞類型：內皮細胞、周細胞和星形膠質細胞。載體可轉導或轉染 BBB 的一種特定細胞類型。例如，載體

可轉導或轉染 BBB 的周細胞。在另一個實例中，載體可轉導或轉染 BBB 的星形膠質細胞。如上所述，在轉導或轉染之後，抗體或抗體片段被表達。

【0022】 在一個優選的實施方案中，載體轉染或轉導 BBB 的內皮細胞。用本文中所述的多核苷酸轉染或轉導 BBB 內皮細胞是優選的，因為 BBB 內皮細胞具有慢的更新速率，這可證明對於進入 CNS 中優選進入腦實質中的抗體或抗體片段在體內的長期表達是最佳的。

【0023】 或者，載體可轉導或轉染 BBB 的多種細胞類型。例如，載體可轉導或轉染 BBB 的內皮細胞和星形膠質細胞。或者，載體可轉導或轉染 BBB 的內皮細胞和周細胞。作為另一個替代方案，載體可轉導或轉染 BBB 的星形膠質細胞和周細胞。在另一個替代方案中，載體可轉導或轉染 BBB 的內皮細胞、星形膠質細胞和周細胞。如上所述，在轉導或轉染之後，抗體或抗體片段被表達。

【0024】 在一些實施方案中，包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體可選擇性地靶向 BBB 的細胞。例如，可通過使用親神經載體實現靶向 BBB 的特定細胞。親神經載體可以是病毒載體，該術語包括經改造的形式。病毒載體通常不能複製。可將多核苷酸併入到 BBB 的細胞的基因組中。親神經載體的一個實例是單純疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)。本文中使用的“親神經載體”是指分別與非 BBB 和/或非 CNS 細胞相比，優先轉導或轉染 BBB 之細胞和/或 CNS 之細胞的載體。因此，在一個實施方案中，載體包括親神經載體。在另一個實施方案中，載體包括經修飾的 HSV。

【0025】 選擇性靶向 BBB 之細胞的替代途徑是利用在載體表面上表達或包含（特別是在表面，例如在病毒衣殼中）將載體靶向 BBB 之細胞的肽、小分子 (small molecule, SME)、抗體或其抗體片段、蛋白質、納米顆粒、脂質、寡核苷酸、適配體或陽離子分子。

【0026】 在一個實施方案中，載體在載體表面表達將載體靶向 BBB 之細胞的肽。換言之，在載體表面上表達或包含的肽、小分子、抗體或其抗體片段、蛋白質、納米顆粒、脂質、寡核苷酸、適配體或陽離子分子賦予了靶向 BBB 的細胞的特異性。在另一個實施方案中，在載體表面上表達或包含的肽或其他列出的

分子將載體靶向 BBB 的特定細胞類型。合適的肽以及包括噬菌體展示法在內的用於產生和測試這樣的肽的方法的一些實例是本領域已知的。例如，肽可包含參與細胞轉胞吞作用的配體或受體靶向肽。這樣的肽允許使用受體介導的轉胞吞作用將載體攝取到 BBB 的細胞中。在一個實施方案中，肽靶向選自以下的受體：轉鐵蛋白受體、胰島素受體和低密度脂蛋白受體。在另一個實施方案中，肽包括轉鐵蛋白肽。一個示例性 BBB 靶向肽是包含在 AAV2 毒株中的 NRGTEWD(SEQ ID NO: 15) 肽，在一些實施方案中，AAV-BR1 肽例如這些可併入非病毒載體中。

【0027】 因此，載體可攜帶突變，例如載體表面蛋白質（例如病毒衣殼蛋白）中的插入、缺失或替換，這導致將載體靶向至 BBB 的細胞。在一個特定的實施方案中，載體可包含將載體靶向至 BBB 之細胞的突變。

【0028】 作為替代或補充，包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的親神經病毒載體可用於選擇性靶向 BBB 的細胞。

【0029】 術語“載體”是本領域公知的，並且在本發明的上下文中適合用於將多核苷酸轉運（通過轉導或轉染）到宿主細胞中。該定義包括非病毒載體和病毒載體二者。病毒載體或非病毒載體可靶向來自 BBB 或 CNS 的細胞，例如但不限於腦內皮細胞，以局部地使得治療性抗體分子進入 CNS，優選進入腦實質中。通過這種新方法產生的抗體，特別是治療性抗體可用於治療 CNS 相關疾病。在這樣的情況下，腦內皮細胞和/或周細胞和/或星形膠質細胞充當儲庫，以提供進入 CNS，優選進入腦實質的抗體的高品質和長期表達。

【0030】 非病毒載體包括但不限於有機納米材料例如脂質體、外排體、樹枝狀聚合物和膠束，或無機納米材料例如金納米顆粒、二氧化矽納米顆粒和碳納米管。在一個實施方案中，非病毒載體在載體表面表達將載體靶向至 BBB 的細胞的肽、小分子（SME）、抗體或其抗體片段、蛋白質、納米顆粒、脂質、寡核苷酸、適配體或陽離子分子。

【0031】 病毒載體包括但不限於野生型病毒和經改造的（例如經修飾的）病毒。病毒載體的一些實例包括但不限於腺相關病毒（AAV）、腺病毒、逆轉錄病毒、鼻病毒、慢病毒、肝炎、HSV 和任何病毒樣顆粒。如本領域已知的，病毒

樣顆粒 (virus-like particle, VLP) 是類比真實天然病毒的組織和構象但缺乏病毒基因組的多蛋白結構。本發明來源於意想不到的發現，即通過 AAV 載體轉導腦內皮細胞導致由腦內皮細胞分泌高品質和大量的抗體。因此，在一個實施方案中，病毒載體是 AAV。AAV 可以是任何合適的血清型，其一些實例包括但不限於 AAV 血清型 1 (AAV1)、AAV 血清型 2 (AAV2)、AAV 血清型 3 (AAV3)、AAV 血清型 4 (AAV4)、AAV 血清型 5 (AAV5)、AAV 血清型 6 (AAV6)、AAV 血清型 7 (AAV7)、AAV 血清型 8 (AAV8)、AAV 血清型 9 (AAV9)、AAV 血清型 10 (AAV10)、AAV 血清型 11 (AAV11) 或 AAV 血清型 12 (AAV12)，或者任何其他野生型血清型或經改造的 AAV。更特別地，AAV 可選自：AAV 血清型 1 (AAV1)、AAV 血清型 2 (AAV2)、AAV 血清型 8 (AAV8)、AAV 血清型 9 (AAV9) 和 AAV 血清型 10 (AAV10)。在另一個實施方案中，病毒載體選自：AAV2、AAV8、AAV9 和 AAVrh.10 (AAV 恒河猴分離株 10)。

【0032】 在另一個實施方案中，病毒載體是經改造的 AAV。經改造的 AAV 可以是經改造的 AAV2、經改造的 AAV9、經改造的 AAV1 或經改造的 AAV10。在一個優選的實施方案中，經改造的 AAV2 是 AAV-BR1。在另一個優選的實施方案中，經改造的 AAV9 是 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB 或 AAV9-PHP-V。在另一個優選的實施方案中，經改造的 AAV1 是 AAV1RX、AAV1R6 或 AAV1R7。經改造的 AAV1 的更多細節在通過引用併入本文的 Albright BH *et al.* [53, 54] 中提供。在一個最優選的實施方案中，載體是對 BBB 內皮細胞具有特異性的 AAV-BR1 或 AAV9-PHP-V1。

【0033】 在另一個實施方案中，載體包含病毒元件和非病毒元件。病毒體是包含病毒元件和非病毒元件二者的載體的一個實例。另一個實例是與陽離子脂質混合的病毒載體。

【0034】 本文中描述的所有載體均包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸。多核苷酸可包含脫氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)。例如，多核苷酸可包含另外的組分以說明編碼抗體或抗體片段的序列在 BBB 的細胞中表達 (例如翻譯)。例如，編碼抗體或抗體片段的多核苷酸包含在表達盒內。在一個實施方案中，表達盒包含選自以下的核苷酸序

列、基本上由選自以下的核苷酸序列組成或者由選自以下的核苷酸序列組成：
SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、
SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。

【0035】 在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 80%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 85%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 90%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 91%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 92%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 93%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 94%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 95%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ

ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 96%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 97%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 98%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。在另一個實施方案中，表達盒包含與選自以下的核苷酸序列具有至少 99%同一性的核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10。

【0036】 本文中使用的“%同一性”用於描述兩個序列（例如核苷酸序列和氨基酸序列）之間的序列相似性。這可通過比較以最佳方式比對的兩個序列來確定，並且其中待比較的核苷酸序列可相對於參照序列包含添加或缺失以用於這兩個序列之間的最佳比對。通過以下計算同一性百分比：確定兩個序列之間殘基相同的相同位置的數目，將該相同位置的數目除以比較視窗中的位置總數並將得到的結果乘以 100 以獲得這兩個序列之間的同一性百分比。例如，可使用 BLAST 程式“BLAST 2 序列”（Tatusova et al, “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250），其可在網站 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上獲得，使用的參數是默認給出的那些（特別是參數“開放空位罰分”：5，和“延伸空位罰分”：2；所選矩陣是例如程式提出的矩陣“BLOSUM 62”），待比較的兩個序列之間的同一性百分比由程式直接計算。

【0037】 表達盒可包含提供或編碼以下的序列：與編碼抗體或抗體片段的

多核苷酸可操作地連接的啟動子、核糖體結合位元點、起始密碼子、終止密碼子和轉錄終止序列中的一種或更多種，並且優選全部。適當地，表達盒還可包含編碼轉錄後調節元件的核酸。適當地，表達盒可另外包含編碼 polyA(多腺苷酸化)元件的核酸。

【0038】 本文中使用的短語“啟動子”是指通常位於待轉錄多核苷酸序列(例如編碼抗體或抗體片段的多核苷酸序列)上游的 DNA 區域，其是轉錄發生所需要的，例如其啟動轉錄。在一些實施方案中，啟動子選自：巨細胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 啟動子；EF1A (人真核翻譯延伸因數 1 α 1)；冠狀動脈血管攝影(Coronary angiography, CAG) (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；CBh (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；SV40 (猿猴病毒 40 增強子/早期啟動子)；GFAP (人膠質原纖維酸性蛋白啟動子)；ATP1A2_1 (Na⁺-K ATP 酶 α 2)；CLDN_5 (密封蛋白 5)；ADRB2_1 (腎上腺素受體 β 2)；TNFRSF6B_1 (TNF 受體超家族成員 6b)；PDYN_1 (強啡肽原)；GH1_1 (人生長激素)；OPALIN_1 (Opalin)；SYN1_1 (突觸蛋白 1)；CAMK2A_1 (鈣/鈣調蛋白依賴性蛋白激酶 II α)；NEFH_1 (神經絲重多肽 (neurofilament heavy polypeptide))；NEUROD6_1 (神經元分化因數 6)；或 OLIG2_1 (少突膠質細胞轉錄因數 2)。在一個優選的實施方案中，啟動子是巨細胞病毒 (CMV) 啟動子；CBh；與 GFAP、ATP1A2_1、CLDN_5、ADRB2_1、TNFRSF6B_1、PDYN_1、GH1_1、OPALIN_1、SYN1_1、CAMK2A_1、NEFH_1、NEUROD6_1 或 OLIG2_1 啟動子融合的 CMV 早期增強子。在一個更優選的實施方案中，啟動子是 CBh、CMV 或與 GFAP 或 OLIG2 融合的 CMV 早期增強子。在一個甚至更優選的實施方案中，啟動子是 CMV 啟動子或 CBh 啟動子。

【0039】 術語啟動子包括合成啟動子。本文中使用的術語“合成啟動子”涉及自然界中不存在的啟動子。例如，可根據本發明使用天然存在的啟動子的功能變體。在本發明的上下文中，啟動子的“功能變體”是參照啟動子的變體，其保留以與參照啟動子相同的方式發揮作用的能力。在一些另外的實施方案中，使用了天然存在的啟動子的截短形式。在一些優選的實施方案中，啟動子與增強子例如 CMV 早期增強子可操作地連接。經截短或經修飾的天然存在的啟動子可用於

促進將相對大的抗體編碼序列插入到載體，特別是病毒載體中。

【0040】 如在別處詳細描述的，載體可特異性靶向 BBB（和/或 CNS）的細胞。然而，在另一些情況下，載體未特異性靶向 BBB（和/或 CNS）。例如，許多野生型病毒載體靶向任何組織或細胞類型。在這樣的情況下，BBB 特異性或 CNS 特異性啟動子可用於驅動編碼抗體或抗體片段的多核苷酸在 BBB 或 CNS 的細胞中以與其他組織相比優先或佔優勢的方式表達。

【0041】 在一個實施方案中，多核苷酸包含與編碼抗體或抗體片段的多核苷酸可操作地連接的 GFAP（人膠質原纖維酸性蛋白(glial fibrillar acidic protein, GFAP)）啟動子。在另一個實施方案中，GFAP 啟動子與 CMV 早期增強子可操作地連接。在這種情況下，抗體或抗體片段在星形膠質細胞中優先或佔優勢地表達。

【0042】 在一個實施方案中，多核苷酸包含與編碼抗體或抗體片段的多核苷酸可操作地連接的選自以下的啟動子：ATP1A2_1（Na、K ATP 酶 $\alpha 2$ ）、CLDN_5（密封蛋白 5）、ADRB2_1（腎上腺素受體 $\beta 2$ ）和 TNFRSF6B_1（TNF 受體超家族成員 6b）。在另一個實施方案中，啟動子與 CMV 早期增強子可操作地連接。在這種情況下，抗體或抗體片段在 BBB 的內皮細胞中優先或佔優勢地表達。

【0043】 在一個實施方案中，多核苷酸包含與編碼抗體或抗體片段的多核苷酸可操作地連接的選自以下的啟動子：PDYN_1（強啡肽原）、GH1_1（人生長激素）和 OPALIN_1（Opalin）。在另一個實施方案中，啟動子與 CMV 早期增強子可操作地連接。在這種情況下，抗體或抗體片段在腦細胞中優先或佔優勢地表達。

【0044】 在一個實施方案中，多核苷酸包含與編碼抗體或抗體片段的多核苷酸可操作地連接的選自以下的啟動子：SYN1_1（突觸蛋白 1）、CAMK2A_1（鈣/鈣調蛋白依賴性蛋白激酶 II α ）、NEFH_1（神經絲重多肽）和 NEUROD6_1（神經元分化因數 6）。在另一個實施方案中，啟動子與 CMV 早期增強子可操作地連接。在這種情況下，抗體或抗體片段在神經元中優先或佔優勢地表達。

【0045】 在一個實施方案中，多核苷酸包含與編碼抗體或抗體片段的多核

苷酸可操作地連接的 OLIG2_1 (少突膠質細胞轉錄因數 2) 啟動子。在另一個實施方案中，OLIG2_1 啟動子與 CMV 早期增強子可操作地連接。在這種情況下，抗體或抗體片段在少突膠質細胞中優先或佔優勢地表達。

【0046】 本文中使用的術語“可操作地連接”是指多種多核苷酸元件相對於彼此的排列，使得該元件在功能上聯繫並且能夠以預期的方式彼此相互作用。這樣的元件可包括但不限於啟動子、增強子和/或調節元件、多腺苷酸化序列、一個或更多個內含子和/或外顯子，以及待表達的目的基因的編碼序列。多核苷酸元件在正確定向或可操作地連接時一起發揮作用以調節彼此的活性，並最終可影響產物（例如，抗體或抗體片段）的表達水準。調節意指提高、降低或維持特定元件的活性水準。如本領域普通技術人員所理解的，可操作地連接意味著功能活性，並且不一定與天然的位置聯繫有關。

【0047】 如上所述，表達盒可包含提供或編碼核糖體結合位元點 (ribosomal binding site, RBS) 的序列。在一個優選的實施方案中，RBS 是內部核糖體進入位點 (IRES)。在一個實施方案中，IRES 來源於腦心肌炎病毒。在另一個實施方案中，IRES 包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 8。因為 IRES 在包含多於一種編碼抗體或抗體片段的基因的表達盒中特別有利。例如，其中表達盒包含編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因和編碼該抗體或抗體片段的重鏈的基因。

【0048】 根據本發明的所有方面，表達盒可另外包含在構建體的 3' 末端提供或編碼土撥鼠肝炎病毒轉錄後調節元件 (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element, WPRE) 的序列，如圖 1 的最頂部構建體中圖示地表示的。WPRE 序列通常用於提高由病毒載體遞送的基因的表達。不希望受理論束縛，將序列包含在表達盒中可提高 mRNA 穩定性並因此提高蛋白質產量。

【0049】 在替代方案中，表達盒可包含編碼自切割肽的序列。所述自切割肽可用於包含多於一種編碼抗體或抗體片段的基因的表達盒中。例如，其中表達盒包含與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因和編碼該抗體或抗體片段的重鏈的基因可操作地連接的單個啟動子。在這樣的情況下，編碼自切割肽的序列位於第一基因（例如，編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因）之後和第二基因（例如，編碼

抗體或抗體片段的重鏈的基因)之前。這樣的體系可允許肽的自切割通過核糖體跳躍(例如,這導致來自單個 mRNA 轉錄物的抗體或抗體片段的單獨的重鏈和輕鏈多肽)共翻譯地發生。一類特定的自切割肽是 2A 肽家族(包括來源於口蹄疫病毒的 F2A 肽),其共用 DxExNPGP (SEQ ID NO: 16) 的核心序列基序。因此,在一個實施方案中,表達盒包含編碼來自 2A 家族的自切割肽的序列。在另一個實施方案中,表達盒還包含編碼自切割位元點上游的弗林蛋白酶切割位點的序列。換言之,表達盒包含與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因和編碼該抗體或抗體片段的重鏈的基因可操作地連接的單個啟動子,其中編碼弗林蛋白酶切割肽和自切割肽的序列位於第一基因之後和第二基因之前。可添加弗林蛋白酶切割位點以消除自切割肽的另外的氨基酸,否則另外的氨基酸在自切割之後與上游蛋白質(例如,抗體或抗體片段的輕鏈)保持連接。然而,值得注意的是,即使在自切割肽上游有弗林蛋白酶切割位點,但另外的氨基酸可保留在一些上游蛋白質(例如,抗體或抗體片段的輕鏈)中,並且這可導致對上游蛋白質的免疫應答(例如免疫原性)。此外,發明人出乎意料地觀察到包含弗林蛋白酶和 2A 以允許自切割的構建體的聚集提高。因此,在一個優選的實施方案中,表達盒不包含在第一基因之後和第二基因之前編碼自切割肽的序列。

【0050】 表達盒還可包含在編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的 5'端的分泌肽。在本發明的上下文中,分泌肽幫助將抗體或抗體片段遞送到 CNS 中,優選遞送到腦實質中。在存在多種編碼抗體或抗體片段的基因的情況下,所有基因還可包含編碼分泌肽的序列。

【0051】 本發明不限於編碼特定抗體或抗體片段的特定多核苷酸。然而,通常抗體或抗體片段是治療性抗體或抗體片段。治療性抗體或抗體片段是在 CNS 中,特別是在腦中有效發揮其活性的抗體或抗體片段。因此,治療性抗體或抗體片段可與 CNS 中表達的靶抗原,特別是腦或脊髓中表達的靶抗原結合。

【0052】 一般而言,術語“抗體”在本文中以最廣義使用,並且涵蓋多種抗體結構,包括但不限於單克隆抗體、多克隆抗體、多特異性抗體(例如,雙特異性抗體)、全人抗體和抗體片段,只要它們表現出所期望的抗原結合活性即可。抗體還可以是嵌合抗體(特別是與人恒定結構域融合的小鼠 VH 和 VL 區)、重組

抗體、重組抗體的抗原結合片段、人源化抗體。

【0053】 抗體的“抗體片段”是指不同於完整抗體的包含完整抗體的一部分並且結合與完整抗體結合的抗原的分子。在一個實施方案中，抗體片段是 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子（例如 scFv 並首選 scFv）；和由抗體片段形成的多特異性抗體。該術語還涵蓋單結構域抗體（例如 VHH、VNAR 或人單結構域抗體）。根據本發明的一種首選抗體片段是 scFv-Fc，其中 scFv（與短接頭肽連接的 VH 和 VL 結構域的融合蛋白，通常約 10 至 25 個氨基酸）與可結晶片段（fragment crystallizable, Fc）區域結合。scFv-Fc 缺乏 CH1 和 CL 結構域。

【0054】 本文中使用的術語“單克隆抗體”是指從基本上同質的抗體的群體獲得的抗體，即除可少量存在的可能天然發生的突變外，構成群體的各抗體是相同的。單克隆抗體是高度特異性的，針對單一抗原位點。經修飾的“單克隆”指示該抗體在基本上同質的抗體群體中的特徵，並且不應解釋為要求該抗體通過任何特定方法來產生。根據本發明使用的單克隆抗體可通過由 Kohler, Nature 256 (1975), 495 描述的雜交瘤方法來製備。

【0055】 因此，在本發明的上下文中，術語“抗體”涉及完整的免疫球蛋白分子以及這樣的免疫球蛋白分子的一部分（即，“抗體片段”）。此外，如上所討論，該術語涉及經修飾和/或經改變的抗體分子。該術語還涉及重組或合成地產生/合成的抗體。該術語還涉及完整的抗體及其抗體片段，例如分離的輕鏈和重鏈、Fab、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂。術語“抗體”還包括但不限於全人抗體、嵌合抗體、人源化抗體、CDR 接枝的抗體和抗體構建體，例如單鏈 Fv（scFv）、scFv-Fc 或抗體融合蛋白。

【0056】 人源化抗體是經修飾的抗體，也稱為經重塑的人抗體。人源化抗體是通過將來源於免疫動物的抗體的 CDR 轉移到人抗體的互補決定區來構建的。用於這樣的目的的常規遺傳重組技術是已知的（參見歐洲專利申請公開 No. EP 239400；國際公開 No. WO 96/02576；Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856；國際公開 No. WO 99/51743）。

【0057】 本文中使用的術語“CDR”涉及本領域公知的“互補決定區”。CDR 是免疫球蛋白的一部分，其決定所述分子的特異性並且與特定配體接觸。CDR 是所述分子的最可變的部分，並且有助於這些分子的多樣性。每個 V 結構域中均存在三個 CDR 區：CDR1、CDR2 和 CDR3。VH-CDR 或 CDR-H 示出了可變重鏈的 CDR 區，並且 VL-CDR 或 CDR-L 涉及可變輕鏈的 CDR 區。VH 意指可變重鏈，VL 意指可變輕鏈。Ig 來源區域的 CDR 區可如 Kabat “Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版. NIH 出版物 no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991)；Chothia J., Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 或 Chothia, Nature 342 (1989), 877-883 中所述確定。

【0058】 “Fc”區包含兩個含有抗體的 CH2 和 CH3 結構域的重鏈片段。兩個重鏈片段通過兩個或更多個二硫鍵以及通過 CH3 結構域的疏水相互作用保持在一起。

【0059】 “Fab’片段”包含一條輕鏈，以及一條重鏈的一部分，所述一條重鏈的一部分包含 VH 結構域和 CH1 結構域以及還具有在 CH1 與 CH2 結構域之間的區域，使得可在兩個 Fab’片段的兩條重鏈之間形成鏈間二硫鍵以形成 F(ab’)2 分子。

【0060】 “F(ab’)2 片段”包含兩條輕鏈和兩條重鏈，所述重鏈包含在 CH1 與 CH2 結構域之間的恒定區的一部分，使得在兩條重鏈之間形成鏈間二硫鍵。因此，F(ab’)2 片段由通過兩條重鏈之間的二硫鍵保持在一起的兩個 Fab’片段構成。

【0061】 “Fv 區”包含來自重鏈和輕鏈二者的可變區，但缺少恒定區。

【0062】 “scFv-Fc”包含來自重鏈和輕鏈二者的“Fv”可變區，其與包含兩個包含抗體的 CH2 和 CH3 結構域的重鏈片段的“Fc”區融合。兩個重鏈片段通過兩個或更多個二硫鍵以及通過 CH3 結構域的疏水相互作用保持在一起。

【0063】 因此，在本發明的上下文中，提供了抗體分子或其抗體片段，其是人源化的並且可成功地用於藥物組合物中，包含至少兩種抗體分子或其抗體片段的混合物。

【0064】 “與蛋白質限定區域中表位元結合的抗體”是要求該區域中存在

一個或更多個氨基酸以與蛋白質結合的抗體。

【0065】 在某些實施方案中，“與蛋白質限定區域中表位元結合的抗體”通過突變分析來鑒定，在突變分析中對該蛋白質的氨基酸進行突變，並且該抗體與所得經改變蛋白質（例如，包含該表位的經改變蛋白質）的結合確定為與未經改變蛋白質的結合的至少 20%。在一些實施方案中，“與蛋白質限定區域中表位元結合的抗體”通過突變分析來鑒定，在突變分析中對該蛋白質的氨基酸進行突變，並且該抗體與所得經改變蛋白質（例如，包含該表位的經改變蛋白質）的結合確定為與未經改變蛋白質的結合的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或至少 90%。在某些實施方案中，抗體的結合通過螢光流式細胞分選儀(fluorescence-activated cell sorter, FACS)、全血 (Whole Blood, WB) 或通過合適的結合測定例如酵素結合免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)來確定。

【0066】 根據本發明應用的抗體或抗體片段優選地是與 CNS 中的表位結合的抗體或抗體片段。更特別地，抗體或抗體片段與 CNS 中與 CNS 的疾病或病症相關的表位結合。在一個優選的實施方案中，抗體或抗體片段選自：抗 ErbB2、抗 TDP-43 (NI-205)、抗 A β （例如巴品珠單抗 (bapineuzumab)、索拉珠單抗 (solanezumab)、lecanemab、阿杜卡尼單抗 (aducanumab)、多奈單抗 (donanemab)、更汀蘆單抗 (gantenerumab) 或克瑞組單抗 (crenezumab))、抗 ApoE4 (載脂蛋白 E4) 和抗 DDX3X (ATP 依賴性 RNA 解旋酶)、抗 Tau (替拉奈單抗 (tilavonemab)、gosuranemab、澤格特奈單抗 (zagotenemab)、西瑞奈單抗 (semorinemab)、bepranemab、BIIB076、JNJ-63733657、Lu AF87908、PNT001、E-2814)、抗 LINGO-1 (例如奧匹努單抗 (opicinumab))、抗 α -突觸核蛋白 (辛帕奈單抗 (cinpanemab)、prasinezumab、MEDI-1341、Lu AF82422、BAN0805)、抗 ASC (IC-100)、抗 NLRP3、抗 C5 (ravulizumab、依庫珠單抗 (eculizumab))、抗 C1q (ANX-005)、抗 C3、抗亨廷頓蛋白 (C-617、NI-302)、抗朊病毒、抗 CD20 (例如奧法木單抗 (ofatumumab)、奧美珠單抗 (ocrelizumab)、利妥昔單抗 (rituximab)、BCD-132、烏妥昔單抗 (ublrituximab)、BAT-4406F、AL-014)、抗 PD-1 (IBC-Ab002) 或抗 VEGF-A (貝伐單抗 (bevacizumab)、雷珠單抗 (ranibizumab)、布洛賽珠單抗

(brolucizumab)、faricimab、伐努賽珠單抗 (vanucizumab))。

【0067】 如本文中實驗部分所述，人腦內皮細胞系 hCMEC/D3 由 AAV2、AAV8、AAV9 和 AAVrh.10 (AAV 恒河猴分離株 10) 轉導，其遞送編碼以下之一的基因：抗 TDP-43 抗體 MAB1 (嵌合人 IgG1)、抗 ErbB2 抗體 (赫賽汀 (Herceptin)) MAB2 或 eGFP (增強型綠色螢光蛋白)。這導致了抗體的高品質和隨時間的長期表達。發明人還確定了其在小鼠細胞系和人原代腦內皮細胞中的觀察結果。遞送體系導致以一系列不同的抗體形式 (包括全長抗體和抗體片段) 產生正確折疊的抗體。至關重要的是，在這些實驗中，在頂端和基底外側二者中均檢測到了分泌的抗體，確定了遞送至該模型中 BBB 的腦實質側。因此，在實例中包含的資料表明本文中所述的方法和載體可用於將正確折疊的抗體或抗體片段 (例如治療性抗體) 遞送至 CNS。

【0068】 本發明的一個目的是首次提供通過將編碼抗體或抗體片段的多核苷酸遞送至 CNS 和/或 BBB 中的細胞來提高 CNS 中抗體濃度以便治療 CNS 相關疾病或病症的方法。這種新方法可用於治療起源於 CNS 的多種疾病或病症。

【0069】 為了避免疑問，本文中使用的術語“治療”包括治療性治療，以及對症治療和病症的預防。術語“治療” (及其語法變體) 的使用意指物件病症的嚴重程度降低、至少部分改善、或改善，和/或者實現至少一種臨床症狀的一些減輕、緩解或降低，和/或者疾病或病症的進展延遲。

【0070】 本文中使用的術語“物件”是指患有 CNS 記憶體在的特定病症、障礙或病症或者處於患有 CNS 記憶體在的特定病症、障礙或病症的風險之中的個體 (例如哺乳動物，例如人)。物件可以是需要根據本發明進行治療的物件。對象可能已接受了針對所述病症、障礙或病症的治療。或者，物件在根據本發明進行治療之前未進行治療。

【0071】 本發明涉及可用於任何哺乳動物，包括人物件並且用於治療患有 CNS 的疾病或病症的物件中相關的疾病或病症的創新策略。通過將治療性抗體基因遞送到腦內皮細胞中，其充當儲庫以提供進入 CNS 的抗體的高品質和長期表達。

【0072】 在一個實施方案中，疾病或病症是神經退行性疾病。

【0073】 在另一個實施方案中，疾病或病症與 CNS 相關，包括但不限於：澱粉樣蛋白 β 蛋白相關疾病、TDP-43-蛋白質病、 α -突觸核蛋白病、Tau 蛋白病、三核苷酸重複疾病(包括多聚穀氨醯胺疾病例如亨廷頓病)、腦相關癌症和腫瘤、癲癇、精神疾病、神經炎性疾病、神經肌肉疾病、病毒誘發的腦炎和以小膠質細胞功能障礙為特徵的疾病。

【0074】 在另一個實施方案中，患者相關的疾病或障礙或病症是：澱粉樣蛋白 β 蛋白相關疾病、TDP-43-蛋白質病、 α -突觸核蛋白病、Tau 蛋白病、三核苷酸重複疾病(包括多聚穀氨醯胺疾病例如亨廷頓病)、腦相關癌症和腫瘤、癲癇、精神疾病、神經炎性疾病、神經肌肉疾病、病毒誘發的腦炎和以小膠質細胞功能障礙為特徵的疾病。

【0075】 在一些實施方案中，根據本發明的澱粉樣蛋白 β 相關疾病、障礙或病症包括輕度認知損傷 (mild cognitive impairment, MCI)、唐氏綜合征 (Down syndrome, DS)、唐氏綜合征相關阿茲海默症、腦澱粉樣血管病 (cerebral amyloid angiopathy, CAA)、多發性硬化、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、帕金森病癡呆 (Parkinson's Disease with Dementia, PDD)、路易體癡呆、肌萎縮側索硬化 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)。這些病症中的許多以認知記憶能力喪失為特徵或與其相關。因此，根據本發明以認知記憶能力喪失為特徵或與其相關的病症包括 AD、輕度認知損傷 (MCI)、唐氏綜合征 (DS)、唐氏綜合征相關阿茲海默症、腦澱粉樣血管病 (CAA)、多發性硬化、帕金森病、帕金森病癡呆 (PDD)、路易體癡呆、ALS (肌萎縮側索硬化)。

【0076】 特別地，澱粉樣蛋白 β 相關疾病、障礙或病症可選自阿茲海默症 (Alzheimer's Disease, AD)、唐氏綜合征 (DS)、唐氏綜合征相關阿茲海默症、腦澱粉樣血管病 (CAA) 或路易體癡呆。

【0077】 在一些實施方案中，TDP-43-蛋白質病包括額顳癡呆 (Frontotemporal dementia, FTD) (FTD，例如散發性或家族性、伴有或不伴有運動神經元病 (motor-neuron disease, MND)、伴顆粒蛋白前體 (GRN) 突變、伴

C9orf72 突變、伴 TARDBP 突變、伴含纈酪肽蛋白(valosine-containing protein,VCP) 突變、與 9p 染色體連鎖、皮質基底節變性、伴泛素陽性 TDP-43 包涵體的額顳葉變性(frontotemporal lobar degeneration,FTLD)(FTLD-TDP)、嗜銀顆粒病、皮克病、語義變異型原發性進行性失語(svPPA)、行為變異型 FTD(bvFTD)、非流暢性變異型原發性進行性失語症(nfvPPA),等)、肌萎縮側索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)(例如散發性 ALS、伴 TARDBP 突變、伴血管生成蛋白(ANG)突變)、亞歷山大病(Alexander disease,AxD)、邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病(LATE)、慢性創傷性腦病(Chronic Traumatic Encephalopathy,CTE)、佩里綜合征、阿茲海默症(Alzheimer's disease,AD,包括散發性和家族性形式的 AD)、唐氏綜合征、家族性英國型癡呆、多聚穀氨醯胺疾病(亨廷頓病和脊髓小腦共濟失調 3 型(SCA3;也稱為馬-約病))、海馬硬化性癡呆和肌病(散發性包涵體肌炎、包涵體肌病,伴含纈酪肽蛋白(VCP)突變(以及佩吉特骨病和額顳癡呆))、創傷性腦損傷(Traumatic Brain Injury, TBI)、路易體癡呆(DLB)或帕金森病(PD)。

【0078】 特別地，TDP-43-蛋白質病疾病、障礙或病症可選自：額顳癡呆(FTD)、肌萎縮側索硬化(ALS)、阿茲海默症(AD)、帕金森病(PD)、慢性創傷性腦病(CTE)、邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病(LATE)和多發性硬化(multiple sclerosis,MS)。

【0079】 在一些實施方案中，突觸核蛋白病是帕金森病(散發性、家族性伴 α -突觸核蛋白突變、家族性伴有除 α -突觸核蛋白以外的突變、純自主神經衰竭和路易體吞嚥困難)、路易體癡呆(Lewy Body dementia,LBD(包括路易體癡呆(dementia with Lewy bodies,DLB)(“純”路易體癡呆)、帕金森病癡呆(PDD))、或彌漫性路易體病、散發性阿茲海默症、家族性阿茲海默症伴 APP 突變、家族性阿茲海默症伴 PS-1、PS-2 或其他突變、家族性英國型癡呆、阿茲海默症路易體變體、多系統萎縮(夏-德綜合征、紋狀體黑質變性和橄欖體腦橋小腦萎縮)、創傷性腦損傷、慢性創傷性腦病、拳擊性癡呆、tau 蛋白病(皮克病、額顳癡呆、進行性核上麻痹、皮質基底節變性、17 號染色體連鎖額顳癡呆伴帕金森綜合征、和尼曼-皮克 C1 型病(Niemann-Pick type C1 disease))、唐氏綜合征、克-雅病、亨廷頓病、運動神經元病、肌萎縮側索硬化(散發性、家族性和關島型 ALS 癡

呆複合體)、神經軸索營養不良、神經退行性變伴腦鐵沉積 1 型(哈勒沃登-施帕茨綜合征(Hallervorden-Spatz syndrome))、朊病毒病、格斯特曼-施特勞斯勒-沙因克病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、共濟失調毛細血管擴張、Meige 綜合征、亞急性硬化性全腦炎、戈謝病(Gaucher disease)、克拉伯病(Krabbe disease)以及其他溶酶體貯積症(包括 Kufor-Rakeb 綜合征和 Sanfilippo 綜合征),或快速眼動(rapid eye movement,REM)睡眠行為障礙。

【0080】 特別地,突觸核蛋白病可選自帕金森病、多系統萎縮、路易體癡呆(LBD;包括路易體癡呆(DLB)(“純”路易體癡呆)、帕金森病癡呆(PDD)),或彌漫性路易體病。

【0081】 在一些實施方案中,tau 蛋白病選自阿茲海默症、肌萎縮側索硬化、帕金森病、克-雅病、拳擊性癡呆、唐氏綜合征、格斯特曼-施特勞斯勒-沙因克病、朊病毒蛋白腦澱粉樣血管病、創傷性腦損傷、肌萎縮側索硬化/關島型帕金森癡呆複合體、非關島型運動神經元病伴神經原纖維纏結、嗜銀顆粒癡呆、皮質基底節變性、彌漫性神經原纖維纏結伴鈣化、額顳癡呆、17 號染色體連鎖額顳癡呆伴帕金森綜合征、哈勒沃登-施帕茨病、多系統萎縮、尼曼-皮克病 C 型、Pallido-ponto-黑質變性、皮克病、進行性皮質下神經膠質增生、進行性核上麻痹、亞急性硬化性全腦炎、僅纏結性癡呆、腦炎後帕金森綜合征和肌強直性營養不良。

【0082】 特別地,tau 蛋白病可選自阿茲海默症或進行性核上麻痹。

【0083】 在一些實施方案中,神經炎性疾病、病症或異常選自:阿茲海默症;帕金森病;額顳癡呆;邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病;肌萎縮側索硬化;運動神經元病;三核苷酸重複疾病,包括多聚穀氨酰胺疾病例如亨廷頓病;多發性硬化;脫髓鞘;病毒性腦炎;癲癇;缺血性和出血性卒中;創傷性腦損傷;慢性創傷性腦病;冷吡啉相關週期性綜合征(cryopyrin-associated periodic syndrome,CAPS);穆-韋綜合征(Muckle-Wells syndrome,MWS);家族性寒冷性自身炎性綜合征(familial cold autoinflammatory syndrome,FCAS);新生兒發作多系統炎性疾病(neonatal-onset multisystem inflammatory disease,NOMID);週期性發熱綜合征(hyperimmunoglobulin D syndrome, HIDS);鐵粒幼細胞性貧血伴 B 細胞免疫缺陷;週期性發熱;發育遲緩(immunodeficiency, fevers and

development delay ,SIFD)；貝赫切特病 (Behçet's disease)；乾燥綜合征；腦型瘡；來自肺炎球菌腦膜炎、基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus)、羅斯河病毒 (Ross River virus)、流感、HIV、冠狀病毒、登革熱、寨卡病毒、蠕蟲感染、細菌感染、抑鬱、心理壓力的腦損傷；HIV 相關的神經認知障礙、冠狀病毒相關的炎性病理狀況。

【0084】 在一些實施方案中，神經炎性疾病、病症或異常優選地選自：阿茲海默症、帕金森病、肌萎縮側索硬化、額顳癡呆、多發性硬化、脫髓鞘、病毒性腦炎、癲癇、卒中、冷吡啉相關週期性綜合征 (CAPS)、抗中性粒細胞胞漿抗體相關血管炎、狼瘡、銀屑病關節炎和遺傳性復發性發熱 (Hereditary Recurrent Fever,HRF)。

【0085】 在一些實施方案中，神經炎性疾病、病症或異常更優選地選自：阿茲海默症、帕金森病、肌萎縮側索硬化、額顳癡呆、多發性硬化、脫髓鞘、病毒性腦炎、卒中、冷吡啉相關週期性綜合征 (CAPS)。

【0086】 在一些實施方案中，神經肌肉疾病可包括：腦血管意外、帕金森病、多發性硬化、亨廷頓病和克羅伊茨費爾特-雅各病、脊髓性肌萎縮和肌萎縮側索硬化。在另一實施方案中，CNS 疾病或病症是神經退行性病。

【0087】 在一個優選實施方案中，CNS 的疾病或病症選自：額顳癡呆 (FTD)、肌萎縮側索硬化 (ALS)、阿茲海默症 (AD)、帕金森病 (PD)、慢性創傷性腦病 (CTE) 和邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病 (LATE) 和多發性硬化 (MS)。

【0088】 也可根據本發明治療的腦和 CNS 癌症和腫瘤包括：星形膠質細胞瘤 (包括小腦和大腦)、腦幹膠質瘤、腦腫瘤、惡性膠質瘤、室管膜瘤、膠質母細胞瘤、髓母細胞瘤、幕上原始神經外胚葉腫瘤、視覺通路和下丘腦膠質瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤、室管膜瘤、腦幹膠質瘤、視覺通路和下丘腦膠質瘤、顱外生殖細胞腫瘤、髓母細胞瘤、骨髓增生異常綜合征、少突神經膠質瘤、骨髓增生異常/骨髓增生性疾病、髓細胞性白血病 (myelogenous leukemia)、骨髓性白血病 (myeloid leukemia)、多發性骨髓瘤、骨髓增生性病、神經母細胞瘤、漿細胞贅生物/多發性骨髓瘤、中樞神經系統淋巴瘤、內在腦腫瘤、星形膠質細胞

腦腫瘤、膠質瘤和中樞神經系統中的轉移性腫瘤細胞侵襲。

【0089】 如本文中所述的載體可通過任何常規途徑（包括注射或通過隨時間逐漸輸注）施用於對象。可通過胃腸外施用來施用。例如，可通過輸注或通過鞘內、腦池內、腦室內、實質內（intraparenchymal）、鼻內、玻璃體內、皮下或肌內途徑施用。在一個實施方案中，通過靜脈內注射或靜脈內輸注施用載體。作為另外的實例，用於胃腸外注射（包括皮下、肌內、血管內或輸注）的合適形式包括無菌溶液劑、混懸劑或乳劑。優選靜脈內注射。

【0090】 本發明組合物的合適劑量的鑒定完全在本領域普通技術人員的常規能力範圍內。例如，將通過考慮已知改變根據本發明使用的載體的作用的多種因素來確定用於給定物件的合適劑量。例如，CNS 疾病或病症的嚴重程度和類型、體重、性別、飲食、施用時間和途徑、其他藥物和其他相關臨床因素。劑量和方案可根據物件的具體狀況、病症或症狀總體狀況而變化。也可能是這樣的情況，即沒有用於給定疾病的治療的單一接受劑量，但認為一系列劑量是合適的。有效劑量可通過體外或體內方法確定。

【0091】 本文中還提供了用於在物件中治療 CNS 疾病或病症的方法。該方法包括向物件施用包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體。所述方法導致 BBB 細胞的轉導或轉染，並且有利地，經轉導或經轉染的細胞產生（例如表達）抗體或抗體片段，並且所述抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中，優選被遞送到腦實質中。

【0092】 在另一個方面中，本發明提供了用於將抗體或抗體片段遞送至物件中 BBB 的方法，該方法包括向物件施用包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中，所述方法導致 BBB 細胞的轉導或轉染，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段。

【0093】 在另一個方面中，本發明提供了用於將抗體或抗體片段遞送至物件中 CNS 的方法，該方法包括向物件施用包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中，所述方法導致 BBB 細胞的轉導或轉染，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。

【0094】 在再一個方面中，本發明提供了用於在物件中治療 CNS 疾病或病症的方法，該方法包括向物件施用包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中，所述方法導致 BBB 細胞的轉導或轉染，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。

【0095】 在另一個方面中，本發明提供了包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體用於製造用於在物件中治療 CNS 疾病或病症的藥物的用途，其中，所述載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）細胞，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。

【0096】 在另一個方面中，本發明提供了包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體用於將所述編碼抗體或抗體片段的多核苷酸遞送至物件的 BBB 的用途，其中該載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）細胞，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中。

【0097】 本文中描述的涉及根據本發明的前述方面應用的載體的所有實施方案同樣適用於本發明的這些另外的方面。

【0098】 發明人發現，特定的表達盒構建體改善所產生的抗體的品質。當在體內遞送抗體時這很重要。因此，使用本發明的表達盒（如本文中本發明的多個方面和實施方案中詳述的）提供抗體和抗體片段向 CNS 的有利遞送，其可通過直接的遞送至 CNS 或通過經由 BBB 細胞的遞送（根據如本文中和所限定的本發明）。因此，以下方面可以在體內進行，其中細胞是 BBB 細胞，尤其是腦內皮細胞或更通常是 CNS 細胞。因此，抗體或抗體片段通常是治療性抗體或抗體片段，如本文中所述。在一些實施方案中，以下方面還可以離體或體外進行，以用於抗體產生。在那些實施方案中，可以利用任何合適的細胞類型。在此，再次，抗體或抗體片段通常是治療性抗體或抗體片段。

【0099】 因此，本發明提供了包含表達盒的載體，所述表達盒從 5' 至 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統（CNS）的疾病或病症的方法中，其中所述載體轉導或轉染血

腦屏障（BBB）或 CNS 的細胞，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中，優選地被遞送到腦實質中。發明人發現，在這樣的構建體中，將輕鏈排序在重鏈之前是顯著有利的。優選地，IRES 位於第一和第二基因之間。

【0100】 在另一個方面中，本發明提供了包含表達盒的載體，所述表達盒從 5' 至 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統（CNS）的疾病或病症的方法中，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）或 CNS 的細胞，並且經轉導或經轉染的細胞表達抗體或抗體片段，導致抗體或抗體片段被遞送到 CNS 中，優選地被遞送到腦實質中。在這樣的構建體中，不需要 IRES。

【0101】 與 BBB 一樣，CNS 包含多種細胞類型，並且在一個實施方案中，載體將編碼抗體或抗體片段的多核苷酸轉導或轉染到 CNS 中的至少一種（多至所有）細胞類型中。例如，載體可轉導或轉染選自以下的 CNS 細胞：腦內皮細胞、神經元、周細胞、星形膠質細胞、少突膠質細胞、小膠質細胞和室管膜細胞。因此，載體可轉導或轉染 CNS 的神經元和非神經元（膠質）細胞。或者，載體可轉導或轉染 CNS 的一種特定細胞類型。例如，載體可轉導或轉染 CNS 的腦內皮細胞。在另一實例中，載體可轉導或轉染 CNS 的神經元。在另一實例中，載體可轉導或轉染 CNS 的星形膠質細胞。在又一實例中，載體可轉導或轉染少突膠質細胞。在又一實例中，載體可轉導或轉染 CNS 的小膠質細胞。或者，載體可轉導或轉染 CNS 的室管膜細胞。

【0102】 在另一實施方案中，載體轉導或轉染來自 BBB 和 CNS 的多種細胞類型。

【0103】 如上所述，包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體可轉導或轉染特別是 BBB 和/或 CNS 的細胞。與針對其他地方描述的靶向 BBB 而描述的那些技術相同的技術同樣適用於直接靶向 CNS 的載體。在一個實施方案中，載體在載體表面上表達將載體靶向 BBB 或 CNS 的細胞的肽。換句話說，在載體表面上表達的肽賦予靶向 BBB 和/或 CNS 的特異性。在另一實施方案中，在載

體表面上表達的肽將載體靶向 BBB 和/或 CNS 的特定細胞類型。合適的肽以及用於產生和測試這樣的肽的方法（包括噬菌體展示方法）的一些實例是本領域中已知的。

【0104】 作為替代或補充，包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的親神經載體可用於轉導或轉染特別是 BBB 和/或 CNS 的細胞，例如 HSV。因此，在一個實施方案中，載體包括親神經載體。在另一個實施方案中，載體包括經修飾的 HSV。

【0105】 本文中描述的涉及根據本發明的前述方面應用的載體的所有實施方案同樣適用於本發明的這些另外的方面。

【0106】 在一個實施方案中，表達盒從 5' 至 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子。表達盒可還包括在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（Internal ribosome entry site, IRES）。換句話說，表達盒從 5' 到 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的至少一個啟動子、IRES 和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因。在另一個實施方案中，表達盒從 5' 到 3' 包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。表達盒內每個元件的位置是相對於其他元件的，並且按照慣例在此按在 5' 端處開始並朝向 3' 端移動的順序表示。

【0107】 本發明還涉及通過改變鏈位置、使用不同的分泌肽和定制內部和下游調節元件來產生意想不到的相對於現有技術中先前報導的策略更高的抗體表達產量和改善的蛋白質品質。

【0108】 因此，本發明提供了降低抗體或抗體片段聚集的方法，其中該方法包括：

(i) 用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個

啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）；或者用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

（ii）在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0109】 與其中採用其他構建體的方法相比，相同的構建體還導致抗體品質的改善（如本文中所討論的，特別是在盒中重鏈在輕鏈之前和/或併入了自切割肽例如弗林蛋白酶/2A 肽的那些）。本發明因此還提供了改善抗體或抗體片段成熟和/或品質的方法，其中該方法包括：

（i）用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）；或者用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

（ii）在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0110】 換言之，根據本發明的一種方法導致具有與抗體或抗體片段的天然構型相同的三維結構的抗體或抗體片段的比例增加。這可以例如使用電泳例如 SDS-PAGE 測量。樣品也可以被還原（例如使用二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)，然後在凝膠上運行以確定準確的二硫鍵形成以及輕鏈和重鏈二者都以預期的分子量遷移。

【0111】 發明人令人驚訝地觀察到，編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因相對於編碼抗體或抗體片段的重鏈的基因的定位影響所觀察到的聚集的比例。實際上，當編碼輕鏈的基因是表達盒中的第一基因、隨後是編碼重鏈的基因時，與相反的取向（例如，當編碼重鏈的基因是表達盒中的第一基因、隨後是編碼輕鏈

的基因時) 相比, 所表達的抗體的聚集降低。

【0112】 在一個實施方案中, 用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化細胞: 與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子, 並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點 (IRES), 並且與用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化的細胞相比, 抗體聚集降低: 與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子, 並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點 (IRES)。如本文中其他地方進一步詳細描述的, 表達盒可任選地包含在構建體的 3' 端處提供或編碼 WPRE 的序列, 如圖 1 的最頂部構建體中圖解所示的。因此, 在一個實施方案中, 表達盒在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之後包含提供或編碼 WPRE 的序列。注意這適用於本發明的所有相關構建體和方法。

【0113】 在另一個實施方案中, 用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化細胞: 與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子, 並且與用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化的細胞相比, 抗體或抗體片段的聚集降低: 與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。

【0114】 例如, 存在抗體或抗體片段聚集的至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 的降低。

【0115】 發明人還令人驚訝地觀察到, 含有弗林蛋白酶和 2A (例如來源於口蹄疫病毒的 2A 肽, F2A) 以允許自切割的的構建體的聚集增加, 以允許自裂解自切割。因此, 表達盒優選不包含自切割肽, 特別是不包含弗林蛋白酶/2A。

【0116】 發明人還觀察到編碼抗體或抗體片段的輕鏈的基因相對於編碼抗體或抗體片段的重鏈的基因的定位影響抗體效價。實際上, 當編碼輕鏈的基因是

表達盒中的第一基因、隨後是編碼重鏈的基因時，與相反的取向（例如，當編碼重鏈的基因是表達盒中的第一基因、隨後是編碼輕鏈的基因時）相比，所表達的抗體或抗體片段的效價提高。

【0117】 在另一個方面中，本發明提供了提高抗體或抗體片段效價的方法，其中該方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）或自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A 切割位點）；或者用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0118】 儘管該觀察結果適用於含有自切割位點，特別是含有弗林蛋白酶-2A 的構建體，但由於如本文中所討論的聚集和免疫原性問題，優選不包含它們。

【0119】 在一個實施方案中，用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）。因此，與用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化的細胞相比，抗體效價提高：與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）。如本文中其他地方進一步詳細描述的，表達盒可任選地包含在構建體的 3'端處提供或編碼 WPRE 的序列，如圖 1 的最頂部構建體中圖解所示的。因此，在一個實施方案中，表達

盒在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之後包含提供或編碼 WPRE 的序列。

【0120】 在另一個（較不優選的）實施方案中，用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A 切割位點），並且與用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化的細胞相比，抗體效價提高：與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A 切割位點）。如本文中其他地方進一步詳細描述的，表達盒可任選地包含在構建體的 3'端處提供或編碼 WPRE 的序列，如圖 1 的最頂部構建體中圖解所示的。因此，在一個實施方案中，表達盒在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之後包含提供或編碼 WPRE 的序列。

【0121】 在另一個實施方案中，用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子，並且與用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化的細胞相比，抗體效價提高：與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。

【0122】 例如，存在抗體或抗體片段效價的至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%的提高。

【0123】 不希望受理論束縛，發明人還認為，使用不利用自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A）的表達盒產生的抗體與使用利用自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A）的表達盒產生的抗體相比具有降低的免疫原性。這是因為抗體缺乏自切割位點的任何殘餘部分（remnant），所述自切割位點例如已知促進針對抗體的中和抗體回應和/或細胞免疫的弗林蛋白酶-2A 肽。因此，認為使用不利用自切割位點（例如弗林蛋白酶 2A）的表達盒產生的抗體導致降低不希望的免疫原性。

如本文所用，術語“不希望的免疫原性”用於指動物（例如人）針對抗體（特別是針對包括在表達盒中的自切割肽的肽殘餘部分）產生的導致中和抗體和/或細胞免疫（其在體內減弱治療性抗體的活性）的產生的免疫應答。此外，所述不希望的免疫原性可能是與體內抗體或抗體片段治療相關的不良事件的原因。

【0124】 因此，在另一個方面中，本發明提供了降低不希望的抗體或抗體片段免疫原性的方法，其中該方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）：或者用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0125】 本發明的另個一方面提供了降低與抗體或抗體片段治療相關的不良事件的方法，其中該方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）：或者用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0126】 在根據這些方面的一個實施方案中，用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化或轉導細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還

包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點 (IRES)，並且與用從 5' 至 3' 包含以下的表達盒轉化的細胞相比，不希望的免疫原性降低：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因之前的弗林蛋白酶-2A 切割位點。

【0127】 例如，存在抗體或抗體片段免疫原性的至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 的降低和/或與抗體或抗體片段治療相關的不良事件的相應降低。

【0128】 在比較項的上下文中，技術人員將理解將採用相同的細胞和相同的條件。

【0129】 在另一實施方案中，抗體或抗體片段不含自切割元件。在另一實施方案中，抗體或抗體片段不含弗林蛋白酶-2A 肽或其片段。

【0130】 在另一個方面中，本發明提供了通過根據本發明的方法獲得的抗體或抗體片段。與通過使用包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈和重鏈的基因之間的自切割位點的表達盒的方法產生的抗體或抗體片段相比，通過根據本發明的方法獲得的抗體或抗體片段可用於在物件中降低不希望的免疫原性（其可包括炎症）。在另一實施方案中，由本發明的方法產生的抗體或抗體片段還可降低與通過使用包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈和重鏈的基因之間的自切割位點的表達盒的方法產生的抗體相關的任何毒性。

【0131】 本發明還提供了可在這樣的方法中採用的相應表達盒。因此，提供了從 5' 至 3' 包含以下的表達盒：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子；其中表達盒還包含在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因之前的 IRES。將所述表達盒引入到細胞中相比於當將從 5' 至 3' 包含以下的表達盒引入到相同細胞中時產生的抗體效價，產生了更高

的抗體效價：與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因和編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，以及在編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的 IRES。如本文中其他地方進一步詳細描述的，表達盒可任選地包含在構建體的 3'端處提供或編碼 WPRE 的序列，如圖 1 的最頂部構建體中圖解所示的。因此，在一個實施方案中，表達盒在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之後包含提供或編碼 WPRE 的序列。

【0132】 類似地，本發明提供了從 5' 到 3' 包含以下表達盒：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。將表達盒引入到細胞中相比於當將從 5' 至 3' 包含以下的表達盒引入到相同細胞中時產生的抗體效價，產生了更高的抗體效價：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。

【0133】 這些表達盒優選不包含自切割位點，例如弗林蛋白酶/2A 切割位點，因為這樣的構建體導致所表達抗體的較高聚集（即較低品質），並且還提高了免疫原性。

【0134】 本發明還涉及轉導或轉染血腦屏障(BBB)或 CNS 的細胞的載體，其包含如本文中所述的本發明的表達盒。這樣的載體可用於在抗體或抗體片段產生的方法中，該方法包括：用載體轉化細胞，並在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【0135】 本文中所述的表達盒的設計考慮了通過病毒載體的遞送。在這樣的載體中，可被包裝的遺傳物質的量是有限的。因此，本發明提供了包含本發明表達盒的病毒載體，特別是親神經病毒載體或可轉導或轉染 BBB 或 CNS 細胞的病毒載體。病毒載體可包括：經改造的 AAV2 載體，優選 AAV-BR1；或者經改造的 AAV9 載體，例如 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB 或 AAV9-PHP-V1；或者經改造的 AAV1 載體，例如 AAV1RX、AAV1R6 或 AAV1R7。病毒載體可包含從 5' 至 3' 包含以下的表達盒：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編

碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且還包含在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因之後並且在編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的 IRES。病毒載體可包含從 5' 至 3' 包含以下的表達盒：與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。

【0136】 這些載體和表達盒可用於根據本發明的任何方法中。

【圖式簡單說明】

【0137】 圖 1. 為產生 pAAV 來源的抗體、連接的衍生物和其他蛋白質而研究的不同構建體的表示。曲線箭頭表示表達盒中輕鏈和重鏈位置的改變。SP：分泌肽，IRES：內部核糖體進入位點，FSG2A：弗林蛋白酶/2A 可自切割肽，WPRE：土撥鼠肝炎病毒轉錄後調節元件，pA：poly A。重鏈或輕鏈可以是任何抗體序列。啟動子可優選為 CMV（人巨細胞病毒）或其他啟動子，例如但不限於 EF1A（人真核翻譯延伸因數 1 α 1）、CAG（與雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子）、CBh（與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子）、SV40（猿猴病毒 40 增強子/早期啟動子）、GFAP（人膠質原纖維酸性蛋白啟動子）*：3'調節元件不包括在內。

圖 2A. pAAV 轉染之後 MAB1 IgG 和 scFv-Fc 的 CHO 細胞上清液效價。BLI Octet 系統，蛋白質 A 包被的生物感測器。箭頭表示：當在構建體中重鏈基因位於輕鏈之前（HC/LC）時，相比於它們相應的 LC/HC 對應物，表達明顯降低。克隆構建體是根據圖 1 中的選項的，如圖中所詳述。

圖 2B. pAAV 轉染之後 MAB1 Fab 的 CHO 細胞上清液效價。BLI Octet 系統，抗 His 包被的生物感測器。箭頭再次表示：當在構建體中重鏈基因位於輕鏈之前（HC/LC）時，相比於它們相應的 LC/HC 對應物，明顯降低的表達。

圖 3. 用考馬斯藍染色進行的經純化的 MAB1 IgG 的 SDS-PAGE 分離。當指示（DTT）時，樣品在 5 mM 二硫蘇糖醇存在下還原。箭頭表示向更大分子量的轉移。

圖 4. 用考馬斯藍染色進行的經純化的 MAB1 scFv-Fc 的 SDS-PAGE 分離。

當指示（DTT）時，樣品在 5 mM 二硫蘇糖醇存在下還原。

圖 5. MAB1 IgG 與 TP-62 肽結合。Octet-動力學從 100 nM 結合蛋白候選物開始，然後是 2 倍連續稀釋。上部的圖涵蓋具有不同啟動子的 2 個啟動子的 MAB1 IgG 和弗林蛋白酶 HC/LC IgG 構建體。下部的圖涵蓋弗林蛋白酶 HC/LC 和 LC/HC MAB1 IgG 構建體、IRES LC/HC 和 HC/LC IgG 構建體以及 scFv-Fc IgG 構建體。各個構建體的細節見於圖中。每個圖用使用 500 nM TP-62 肽的生物感測器上樣開始。

圖 6. 使用 Superdex 200 Increase 10/300GL 柱對相關經純化的 pAAV 來源的 IgG 進行的尺寸排阻色譜法分析。在 PBS 緩衝液中在 4°C 下進行分離。各個構建體的細節見於圖中。

圖 7. 相關經純化的 pAAV 來源的 IgG 的尺寸排阻色譜圖疊加。與圖 6 中描述的條件相同。

圖 8. 對弗林蛋白酶 MAB2 IgG 構建體的 C 端部分的分析，該分析確定了剩餘的弗林蛋白酶/F2A 肽以及因此的構建體上第一抗體鏈品質的增加。凝膠中進行胰蛋白酶消化，隨後是 LC/MS。

圖 9. 來自 AAV2、8、9 和 10 CHO 轉導的每 mL 培養物的經純化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc，並與轉染進行比較。經純化的蛋白質的量/mL 通過 OD 280 nm 使用其相應的消光係數進行定量。各個構建體的細節見於圖中。

圖 10. 用考馬斯藍染色進行的經純化的 MAB1 IgG 的 SDS-PAGE 分離。當指示（DTT）時，樣品在 5 mM 二硫蘇糖醇存在下還原。

圖 11. 用 AAV2、8、9 和 10 載體化的抗體構建體轉導 CHO、分化的神經元和 BBB 細胞之後的 IgG 效價比較。左圖，CHO 轉導；中間的圖，分化的人神經母細胞瘤細胞系轉導；右圖，分化的血腦屏障（BBB）細胞轉導。各個構建體的細節見於圖中。

圖 12. 用 AAV2、8、9 和 10 載體化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc 構建體轉導大鼠腦原代細胞之後的 IgG 效價比較。各個構建體的細節見於圖中。

圖 13. 在通過不同的 WT AAV 血清型轉導之後 3 天，對 hCMEC/D3 細胞分泌到 OrganoPlate® 3D BBB 模型的頂端上清液中的 MAB1（人 IgG1 亞型）的檢測。MAB1 的表達由 CMV 啟動子驅動。IRES 元件在 LC 和 HC 之間使用以實現雙順反子抗體的產生。總之，受試構建體具有以下排列：5'-CMV 啟動子-具有編碼分泌肽的序列的輕鏈編碼基因-IRES-具有編碼分泌肽的序列的重鏈編碼基因-3'。通過與 hTDP-43 全長（FL）蛋白結合的 ELISA 測量的抗體存在表示為 O.D.（光密度）。對於對照 AAV2-eGFP 轉導，未觀察到結合。如所預期的，對於 2 個對照，mIgG MAB1 和 hIgG MAB2，沒有檢測到抗體結合，因為使用抗人二抗進行檢測，而 MAB2 不能結合 hTDP-43 FL 蛋白。

圖 14. 在通過 AAV2 構建體轉導之後 3 天，對 hCMEC/D3 細胞分泌到 OrganoPlate® 3D BBB 模型的頂端和基底外側區室二者中的 MAB1（人 IgG1 同種型）的檢測。使用 LC 和 HC 之間的 IRES 元件實現了由 CMV 啟動子驅動的 MAB1 的雙順反子表達。總之，受試構建體具有以下排列：5'-CMV 啟動子-具有編碼分泌肽的序列的輕鏈編碼基因-IRES-具有編碼分泌肽的序列的重鏈編碼基因-3'。通過與 TDP-43 全長蛋白結合的 ELISA 測量抗體的存在。對於對照 AAV2-eGFP 轉導，未觀察到結合。資料表示為 O.D.。

圖 15. 在通過 AAV2 構建體轉導之後 3 天，在不同 MOI（感染複數）下，對 hCMEC/D3 細胞分泌到 24 孔培養板的上清液中的 MAB1（人 IgG1 同種型）的檢測。使用 LC 和 HC 之間的 IRES 元件實現了由 CMV 啟動子驅動的 MAB1 的雙順反子表達。總之，受試構建體具有以下排列：5'-CMV 啟動子-具有編碼分泌肽的序列的輕鏈編碼基因-IRES-具有編碼分泌肽的序列的重鏈編碼基因-3'。通過與 TDP-43 全長蛋白結合的 ELISA 測量抗體的存在。資料以由標準曲線計算的濃度表示。

圖 16. 在通過 AAV2 構建體轉導之後 3 天，對 hCMEC/D3 細胞分泌到 Transwell BBB 模型的頂端和基底外側區室二者中的 MAB1（人 IgG1 同種型）的檢測。使用 LC 和 HC 之間的 IRES 元件實現了由 CMV 啟動子驅動的 MAB1 的雙順反子表達。總之，受試構建體具有以下排列：5'-CMV 啟動子-具有編碼分泌肽的序列的輕鏈編碼基因-IRES-具有編碼分泌肽的序列的重鏈編碼基因-3'。通

過與 hTDP-43 全長蛋白結合的 ELISA 測量抗體的存在。對於對照 AAV2-eGFP 轉導，未觀察到結合（資料未顯示）。資料以抗體存在的相對百分比表示。

圖 17. 在 (A) b.End3 和 b.End5 小鼠腦內皮瘤細胞系和 (B) hCMEC/D3 細胞中，在由 AAV2、AAV-BR1 和 AAVrh10 構建體以 100'000 的 MOI 轉導之後 6 天，對細胞上清液中的 MAB1 hIgG1 和 scFv-Fc 的檢測。使用 LC 和 HC 之間的 IRES 元件實現了由 CMV 啟動子驅動的 MAB1 的雙順反子表達。總之，受試構建體從 5'至 3'具有以下排列：CMV 啟動子-分泌肽-輕鏈-IRES-分泌肽-重鏈-WPRE-polyA。使用抗 hFc 試劑盒（PerkinElmer，Cisbio）通過 HTRF（均相時間分辨螢光）測量抗體存在。資料以從標準曲線內插的濃度表示，並從單個實驗內的 3 至 6 個生物學重複產生，並繪製了平均值 $\pm$ SD。

圖 18. 對由來自可商購的 3D 人體外 BBB 模型（Neuromics）的原代人腦微脈管系統內皮細胞分泌的 MAB1 hIgG1 或 mIgG2a 的檢測。在由 AAV2 和 AAV-BR1 載體以 100'000 的 MOI 轉導之後 7 天，在頂端和基底外側區室二者中進行檢測。使用 LC 和 HC 之間的 IRES 元件實現了由 CMV 或 CBh 啟動子驅動的 MAB1 的雙順反子表達。總之，受試構建體從 5'至 3'具有以下排列：CMV 或 CBh 啟動子-分泌肽-輕鏈-IRES-分泌肽-重鏈-WPRE-polyA。使用抗 hFc 試劑盒（PerkinElmer，Cisbio）通過 HTRF 測量抗體存在。資料以從相應的頂端和基底外側區室中的標準曲線內插的 (A) 濃度或 (B) 數量表示。為了允許在所評價條件之間進行直接比較，在單個實驗內進行了 2 至 3 個生物學重複，並繪製了平均值 $\pm$ SD。

在以下實施例中進一步描述本發明。這些實施例僅用於舉例說明本發明，並且不旨在以任何方式限制本發明的範圍。

【實施方式】

實施例

實施例 1：載體化的抗體構建體：

1. 選擇用於載體化的最佳克隆

1.1 介紹

【0138】 在 AAV 衣殼中使用單鏈 DNA (ssDNA) 載體化進行的主要挑戰之一是容量。表達盒尺寸包含 a) 啟動子, b) 開放閱讀框 (編碼抗體或抗體片段, 通常包括重鏈和輕鏈) 以及 c) 下游調節元件。一旦 DNA 被轉化為單鏈並在 AAV 衣殼中載體化, 建議的尺寸不大於 4.7 kb, 包括 5'ITR 和 3'ITR。較大尺寸的構建體會難以進入 AAV 病毒衣殼複合物, 從而降低產量。自互補構建體在 5'ITR 和 3'ITR 內的容量甚至更小, 即不大於 2.3 kb。

【0139】 常用的抗體質粒 AAV (pAAV) 設計用尺寸較小並適合於由單個啟動子驅動的表達盒的抗體片段製備, 該抗體片段例如: a) 抗體單鏈可變片段 (scFv) [44,55], b) 與 IgG Fc 結構域融合的 scFv (scFv-Fc) [56,57], 或 c) 單結構域抗體, 例如鯊魚和/或駱駝科抗體[58-62]。

【0140】 在全抗體的情況下, 由於表達盒的上述尺寸限制, 因此很難適合輕鏈和重鏈基因二者。迄今為止, 大多數學術和工業研究者依賴於 pAAV 構建體, 該構建體由在自加工蛋白質融合體中翻譯的開放閱讀框組成。在大多數情況下, 相應的編碼順序由以下組成: 1) 抗體重鏈, 2) 弗林蛋白酶蛋白酶識別位點, 也稱為 PACE (成對鹼性氨基酸切割酶) [63], 3) 促進弗林蛋白酶切割[47-49]並預期促進清潔過程的自切割 2A 肽, 即 E2A、F2A、P2A 或 T2A, 以及 4) 抗體輕鏈。由於獲得了高表達效價和等摩爾數的抗體鏈表達, 研究者對該構建體有顯著的偏好。然而, 並在大多數情況下, 蛋白質未適當地成熟, 弗林蛋白酶和 2A 融合肽的殘餘部分被包含在所表達的蛋白質中[64], 從而可能利用所表達蛋白質的不希望的免疫原性[45]。不同的 2A 肽具有不同的自切割效率, T2A 和 P2A 的自切割效率最高, F2A 的自切割效率最低[65]。因此, 高達 50% 的 F2A 連接蛋白可留在細胞中作為融合蛋白, 這可導致一些不可預測的結果, 包括功能的獲得[66]。2A 位點導致核糖體在大約 60% 的時間從多核苷酸上脫離。連同 P2A 和 T2A 的約 10% 的核糖體通讀, 這導致下游肽鏈的表達降低了約 70%[47]。此外, 值得注意的是, 2A 肽來源於病毒, 即 F2A 來源於口蹄疫病毒 18; E2A 來源於馬鼻炎 (equine rhinitis) A 病毒; P2A 來源於豬捷申病毒-1 2A; T2A 來源於明脈扁刺蛾 (*thosa asigna*) 病毒 2A。因此, 哺乳動物和人免疫系統可認為重鏈或輕鏈上剩餘的 2A 肽殘基是非自身的。

【0141】 用於抗體表達的弗林蛋白酶/2A 融合體的較不常見 pAAV 構建體替代方案是：1) 使用兩個啟動子，每個啟動子驅動抗體重鏈和輕鏈；或者 2) 使用一個啟動子，並在兩個抗體基因鏈之間定位內部核糖體進入位點 (IRES，源自腦心肌炎病毒的 DNA 序列)。第一種由於啟動子的常見的大尺寸提高了 pAAV 設計中的限制，從而需要使用小啟動子來控制重鏈和輕鏈抗體基因，並去除可大大提高蛋白質效價的 3'ITR 調節元件。第二種，IRES 構建體，迄今為止被認為是差的蛋白質表達體[56,67-69]，因此被許多 pAAV 構建體忽視（其中 IRES 構建體表達的效價比 2A 或弗林蛋白酶 2A 構建體低得多）。

1.2 選擇方法

【0142】 我們篩選了多於 55 種的 pAAV 構建體，這些構建體是根據開放閱讀框元件位置、啟動子強度、分泌肽和融合肽而產生和研究其表達的。不同類型的構建體在圖 1 中示出。據我們所知，文獻中報導的使用 AAV 載體的完整 IgG 表達具有重鏈位於輕鏈之前的弗林蛋白酶/2A 構建體（參見圖 1，第 2 構建體）。我們的方法還研究了這種類型的構建體的其他輕鏈和重鏈位置，以及雙順反子構建體的不同啟動子強度（圖 1，第 4 構建體）。此外，我們通過改變鏈位置、使用不同的分泌肽和定制內部和下游調節元件來挑戰 IRES 雙順反子構建體的所報導的低表達（圖 1，第 3 構建體）。最後，我們測試了兩個完整的抗體克隆和相應的抗體片段（圖 1，第 1 構建體），例如 scFv-Fc、Fab 和 scFv，即 MAB1（抗 TDP-43 抗體）和 MAB2（抗 ErbB2 抗體）。此外，我們還包括了表達增強型綠色螢光蛋白（eGFP）的克隆。在我們的研究中，我們定義了用於鑒定最佳 pAAV 構建體的選擇標準如下：1) 高蛋白效價、2) 低聚集體水準、3) 正確的成熟和折疊以及 4) 與靶標結合。

1.3. 中國倉鼠卵巢（Chinese hamster ovary cell, CHO）細胞轉染及上清液效價

【0143】 簡言之，將 CHO 細胞（ExpiCHO-S™ (ThermoFisher，目錄號：A29127)）按照製造商的建議用 1 µg/mL 質粒/構建體轉染，一式三份。使細胞在具有優化的合成培養基的 24 深孔微板中在 37°C 下生長 24 小時，然後將溫度轉變到 32°C，然後使其在最終體積為約 3.5 mL 的培養基中生長 11 天。然後使用生物膜層干涉法（Bio-Layer Interferometry, BLI）用 Octet 系統以及包被有以下的

生物感測器尖端對每份上清液的效價一式三份地進行估計：a) 蛋白質 A (全長抗體和 scFv-Fc 的情況下) 或 b) 結合經 His 標記的蛋白質的單克隆抗體 (此處為 Fab、scFv 和 EGFP)。對於所有測量，使用相應的和先前純化的蛋白質進行標準曲線。圖 2A 中顯示了抗體和 scFv-Fc 的結果，圖 2B 中顯示了 Fab 的結果。

【0144】 觀察結果。在 MAB1 IgG 的情況下，每個 2 個啟動子的構建體產生範圍為約 30 至 100 $\mu\text{g/mL}$ 的顯著效價。令人驚訝的是，用弗林蛋白酶和 IRES 構建體獲得範圍為 150 至 350 $\mu\text{g/mL}$ 的約 2 至 10 倍高的效價，但與 2 個啟動子的 IgG 構建體相比，僅當構建體中輕鏈基因位於重鏈基因之前 (LC/HC) 時明顯。IRES IgG 構建體 LC/HC 中的高蛋白質水準與弗林蛋白酶 IgG 構建體相當。這是預料不到的，並且據我們所知，這是第一次報導，因為現有技術提到了相反的情況[56,67-69]。對圖 2B 中的 MAB1 Fab 構建體進行了類似的觀察，表明了與弗林蛋白酶和 2 個啟動子的構建體相似的效價。此外，在 IRES Fab 構建體中輕鏈位於重鏈之前 (LC/HC) 相比於它們的 HC/LC 構建體對應物具有顯著更高的表達效價。所收集的資料表明，在使用弗林蛋白酶和 IRES 的 IgG 或 Fab 構建體中，輕鏈位於重鏈之前提高了效價。該效價顯著高於 HC/LC 對應物。最後，當中等強度的啟動子 SV40 作為兩個啟動子之一包含在兩個啟動子的 IgG 構建體中時，表達似乎降低。

1.4. SDS-PAGE 上的蛋白質純化及分析

【0145】 在該實驗之後，收穫細胞並且將每個克隆的上清液一式三份地分離併合並。在全長抗體和 scFv-Fc 克隆的情況下，使用可商購的蛋白質 A 樹脂捕獲蛋白質，並用補充有 100 mM NaCl 的 100 mM 甘氨酸 pH 2.8 緩衝液對其進行洗脫。然後，通過分光光度法 OD 280 nm 使用其相應的消光係數對蛋白質進行定量。在 Fab 和 scFv 構建體的情況下，我們採用了可商購的親和柱用於經 His 標記的蛋白質。

【0146】 然後通過 SDS-PAGE 12-4% 分離蛋白質，並用考馬斯藍染色。獨立於蛋白質濃度，每個凝膠孔上樣 13 μL /樣品，以：a) 對純化的效價進行第二次估計，以及 b) 查看任何可能的降解產物。此外，在不存在二硫蘇糖醇 (DTT) 的情況下，在 150 kDa 下進行了鏈間二硫鍵形成和適當複合物的驗證，以及在二

硫蘇糖醇存在的情況下進行了輕鏈和重鏈的釋放的驗證。經純化的 MAB1 IgG pAAV 克隆的所得凝膠在圖 3 中呈現。

【0147】 觀察結果。所有樣品都具有正確的二硫鍵構型，並且抗體在 150 kDa 的相應分子量下遷移。當還原時，兩個構建體，2 個啟動子的和 IRES IgG，在分別為約 25 和約 50 kDa 的預期輕鏈和重鏈分子量下分離。然而，注意到弗林蛋白酶/2A IgG 構建體的第一鏈即 HC/LC 構建體構型中的重鏈和 LC/HC 構型中的輕鏈的分子量較大。通過 LC/MS 進一步研究了每個弗林蛋白酶/2A IgG 鏈構建體的尺寸，用於肽的準確性。這證實了在 LC/HC 構建體的輕鏈或 HC/LC 構建體的重鏈的 C 端添加了完整或一些部分的弗林蛋白酶/2A 肽(參見圖 3、7 和 8)。相比之下，第二抗體構建體鏈被適當加工，並通過 LC/MS 在 N 端處未觀察到肽殘留部分。總的來說，所有克隆在所應用的細胞培養條件下都表現出低水準的降解。2 個啟動子和 IRES 蛋白似乎具有最準確的成熟品質。最後，對克隆 MAB2 (一種不同的 IgG 抗體)進行了相同的觀察。同樣，弗林蛋白酶/2A 構建體的第一構建體鏈具有較大的分子量，並且通過 LC/MS 確認了弗林蛋白酶/2A 肽的添加，而 2 個啟動子和 IRES IgG 具有最準確的成熟。經純化的 MAB1 scFv-Fc 樣品也在相同的 SDS-PAGE 條件下分離。結果在圖 4 中呈現。

【0148】 觀察結果。按照經純化的 MAB1 樣品，scFv-Fc 具有正確的鏈間二硫鍵形成，並且蛋白質在其約 100 kDa 的預期分子量下遷移。當用 5 mM DTT 還原樣品時，單鏈被釋放，並以 50 kDa 的預期分子量遷移。總的來說，所有克隆在所使用的細胞培養條件下都表現出低水準的降解。

1.5. 通過 BLI 對轉染來源的蛋白質的結合親和力的分析

【0149】 為了證明 pAAV 系統產生的蛋白質是功能性的，我們使用 Octet 系統通過 BLI 測量了它們與 TAR DNA 結合蛋白 43 (TDP-43) C 端肽的結合親和力。簡言之，鏈黴親和素生物感測器尖端包被有 500 nM TDP-43 C 端肽 (稱為 TP-62)。然後使用反應緩衝液進行測量，該緩衝液由補充有 0.1%牛血清白蛋白和 0.02%吐溫的 PBS 組成。反應在 30°C 下進行。然後用從 100 nM 濃度開始的兩倍連續稀釋對樣品進行分析。使用其在 OD 280 nm 下相應的消光係數計算蛋白質摩爾濃度。在反應緩衝液中使樣品與 TP-62 肽締合 900 秒，然後在相同緩

衝液中解離 600 秒。將生物感測器在 pH 2.0 的 10 mM 甘氨酸中再生，並在每次樣品測量之前在反應緩衝液中中和。針對相關經純化的樣品，所收集的資料在圖 5 中呈現。

【0150】 觀察結果。總的來說，所有 MAB1 克隆都是功能性的，並結合 TDP-43 C 端肽，具有約 1 至 6 nM 的相當的 K_D 。2 個啟動子和 IRES 構建體具有約 2.5 至 3 nM 的相似的 R_{max} 。重要的是，2 個啟動子的構建體的 K_D 親和力相應地作為啟動子或分泌肽的函數而沒有變化（CMV/CMV、CMV/SV40 或 SV40/CMV 啟動子構建體以及 Igk 或 GH1 分泌肽）。相比之下，弗林蛋白酶 IgG HC/LC 構建體產生的蛋白質的 R_{max} 是 2 個啟動子和 IRES 構建體的大約兩倍，二者分別為約 5 至 6 nM 和約 2.5 至 3 nM。此外，弗林蛋白酶 IgG LC/HC 構建體的 R_{max} 相比於其 2 個啟動子和 IRES 的對應物的 R_{max} ，較不明顯但也更大，二者分別為約 3.5 nM 和約 2.5 至 3 nM。根據 BLI 系統，資料表明，弗林蛋白酶 /2A 構建體在等摩爾濃度下相比於其 2 個啟動子和 IRES 的對應物，蛋白質分子量更大，例如在測定條件下的弗林蛋白酶 IgG HC/LC 蛋白質。在使用尺寸排阻色譜法分離（參見 1.6）的下一個分析步驟中，證實了該觀察結果。最後，資料表明可用 pAAV 表達系統獲得功能性 IgG 和 scFv 蛋白。下文描述了進一步的 Octet 分析（參見 1.6）。

1.6. 通過尺寸排阻色譜法和 LC/MS 進行的蛋白質分析

【0151】 然後通過尺寸排阻色譜法分離以監測降解、聚集的存在和正確的蛋白質折疊的經純化的蛋白質以 150 kDa 的分子量作為單體分離。對此，我們在來自 G&E Healthcare 的 Superdex 200 Increase 10/300GL 柱上在 4°C 下使用 PBS 緩衝液分離了 100 μ L 經純化樣品。產生的分離在圖 6 中呈現。

【0152】 觀察結果。對於所有構建體，IgG 單體如所預期的以約 11.7 mL 的洗脫體積分離。相比之下，弗林蛋白酶 IgG 構建體具有大的聚集體水準；對於 LC/HC 構建體為 26%，對於 HC/LC 構建體為 38%。此外，弗林蛋白酶構建體的單體峰未與 IRES 和 2 個啟動子的 IgG 構建體對齊（參見疊加的圖 7），並且在較早洗脫的分離物中具有稍大的分子量。顯然，較早洗脫的 0.25 mL 弗林蛋白酶 IgG LC/HC 構建體就是這種情況。弗林蛋白酶/2A 構建體中較大的聚集體水準

(圖 6、7 和 8)可反映這種類型的蛋白質的所報導的預料不到的結果和毒性[66]。這些資料證實了以上 BLI 測量，表明了較大分子量的弗林蛋白酶/2A 來源的 IgG。相反，IRES IgG 構建體蛋白展示出非常低的 2%的聚集體水準和 98%的豐富的單體蛋白，因此證明了更高的品質。2 個啟動子的 IgG 蛋白也具有 13%的低聚集體水準（儘管高於 IRES 構建體）。這些結果鑒定了 IgG IRES LC/HC 和 2 個啟動子的 LC/HC 是具有更好的品質、表達產量、穩定性和潛在較少的不希望的免疫原性和/或毒性的構建體。

2. MAB1 和 MAB2 前導候選物的載體化

2.1. 用於細胞轉導的 AAV 衣殼選擇

【0153】 如上所討論的，選擇了提供最高品質蛋白質的 MAB1 和 MAB2 最佳構建體用於載體化，即 a) MAB1 IgG IRES LC/HC 和 2 個啟動子 IgG LC/HC 構建體，b) MAB2 2 個啟動子 IgG LC/HC 以及 c) MAB1 scFv-Fc。選擇一組不同的目標細胞用於轉導的基因遞送，即中國倉鼠卵巢細胞（CHO）、在神經元中分化的人神經母細胞瘤細胞系和腦內皮細胞系（hCMEC/D3）。對此，以上最佳 pAAV 構建體在 AAV2、AAV8、AAV9 和 AAV10 衣殼中被載體化。所產生的具有低內毒素的經超純化的衣殼被用於轉導細胞。

2.2. CHO 細胞轉導、蛋白質純化和與經轉染的相同克隆的效價比較

【0154】 簡言之，使用載體化的前導構建體以 100K gc（基因組拷貝）/CHO 細胞轉染 CHO 細胞培養物，一式三份，然後使其在如上的經優化的合成培養基中在 37°C 下在 24 深孔微板中生長 24 小時，隨後將溫度轉變至 32°C，然後使其以 3.5 mL/孔的最終體積生長 11 天。細胞生長不受 AAV 存在的影響。在此之後，收穫細胞並且將每個克隆的上清液一式三份地分離併合。使用蛋白質 A 樹脂如上捕獲全長抗體和 scFv-Fc 克隆，並用補充有 100 mM NaCl 的 100 mM 甘氨酸 pH 2.8 緩衝液對其進行洗脫。然後，通過分光光度法 OD 280 nm 使用其相應的消光係數對蛋白質進行定量。所得的效價在圖 9 中示出。

【0155】 觀察結果。所有經轉導的前導基因構建體均使用每種受試 AAV 衣殼表達。表達水準作為用於載體化的衣殼的函數而變化，但總體上與用經純化質

粒轉染的相同構建體相似。

2.3. 使用 MAB1 抗原 ELISA 的大鼠原代腦細胞轉導和抗體效價

【0156】 簡言之，大鼠原代細胞是通過從大鼠幼崽腦中解剖獲得的，並在 96 孔微板中在補充有 B27™ (ThermoFisher, 目錄號: 17504044) 的 100 μ L 神經基礎培養基中在 37°C 下生長，每孔含有 50K 原代細胞。使用載體化的前導構建體以 100K gc/大鼠原代細胞一式三份地轉導大鼠原代腦細胞，然後在補充有 B27 的神經基礎培養基中在 37°C 下生長 7 天。顯微形態學評價表明細胞不受 AAV 存在的影響。然後收集一式三份的轉導細胞上清液以通過 ELISA 量化針對 hTDP-43 全長蛋白的抗體效價。簡言之，將 96 孔微板在 4°C 下在 PBS 緩衝液中用 1 μ g/ml 人全長 TDP-43 包被過夜。然後將板用補充有 0.05%吐溫的 PBS 洗滌 3 次，然後在 37°C 下用補充有 1%牛血清白蛋白的 PBS、0.05%吐溫封閉 1 小時。將收集的含有抗體的上清液在封閉緩衝液中稀釋 20、40 和 80 倍，然後將 50 μ L 樣品添加至微板，並在 37°C 下孵育 1 小時。然後如上洗滌板並將其與在封閉緩衝液中以 1/10000 稀釋度稀釋的山羊抗人 IgG Fc-HRP (abcam, #ab98624) 一起在 37°C 下孵育 1 小時。如上洗滌板，並用 100 μ L TMB 底物補充孔，在室溫下孵育幾分鐘。之後，用 50 μ L 的 H₂SO₄ 0.16M 封閉 HRP 反應。最後，所得溶液在微板讀取器 (BioTek) 情況下在 450 nm 處為紅色。相應的抗體效價在圖 12 中示出。資料表明在 AAV2 中載體化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc 克隆具有顯著較低的表達效價，範圍在 5 至 50 ng/mL 細胞上清液之間。相比之下，其他 AAV8、9 和 10 載體化的候選物具有大得多的 IgG 和 scFv-Fc 效價，範圍在約 500 和 2000 ng/mL 細胞上清液之間，與表達驅動系統 (IRES 或 2 個啟動子) 無關，在 AAV9 中載體化的 MAB1 除外，其在 2 個 CMV 啟動子下表達，效價為約 180 ng/mL。

【0157】 觀察結果。所有經轉導的前導基因構建體均使用每種受試 AAV 衣殼表達。如上，表達水準作為用於載體化的衣殼的函數而變化，但總體上與用經純化質粒轉染的相同構建體相似。

2.4. 通過 SDS-PAGE 的分析以驗證蛋白質成熟

【0158】 通過 SDS-PAGE 12-4%分離經純化的前導蛋白，並用考馬斯藍染

色。如上，在沒有協調上樣量的情況下，等體積（13 μ L/樣品）地上樣蛋白質樣品，以通過 OD 280 nm 驗證所測得的量。圖 10 呈現了 MAB1 pAAV 克隆的所產生的分離。

【0159】 觀察結果。所有樣品都具有正確的二硫鍵構型，並且抗體在 150 kDa 的相應分子量下遷移，如圖 10 中所展示的。當還原時，兩個構建體，2 個啟動子的和 IRES IgG，在分別為約 25 和約 50 kDa 的預期輕鏈和重鏈分子量下分離。scFv-Fc 具有正確的鏈間二硫鍵形成，並且蛋白質在約 100 kDa 的其預期分子量下遷移。當用 5 mM DTT 還原樣品時，單鏈被釋放，並以 50 kDa 的預期分子量遷移。總的來說，如由先前篩選實驗所預期的，所有克隆在所採取的細胞培養條件下都表現出低水準的降解。

2.5. 通過 BLI 對轉染來源、轉導來源的蛋白質的結合親和力的分析

【0160】 為了證明使用 pAAV 系統產生的蛋白質是功能性的，我們在如上所述的相同條件下通過 BLI 使用 Octet 系統測量了它們與 TAR DNA 結合蛋白 43（TDP-43）C 端肽的結合親和力。簡言之，鏈黴親和素生物感測器尖端包被有 500 nM TDP-43 C 端肽（稱為 TP-62）。然後使用反應緩衝液進行測量，該緩衝液由補充有 0.1%牛血清白蛋白和 0.02%吐溫的 PBS 組成。反應在 30°C 下進行。然後用從 100 nM 濃度開始的兩倍連續稀釋對樣品進行分析。所收集的資料在下表 1 中呈現：

表 1.

MAB1 抗體	K _D (nM)
IgG 標準品	5.7
IgG IRES pAAV 轉染的	4.7
IgG IRES pAAV 載體化的	5.7
IgG 2 個啟動子 pAAV 轉染的	4.7
IgG 2 個啟動子 pAAV 載體化的	4.3
scFv-Fc 標準品	12.3

scFv-Fc pAAV 轉染的	4.0
scFv-Fc pAAV 載體化的	21.25

【0161】 觀察結果。資料表明，來自 IRES 或 2 個啟動子的 pAAV 構建體的 IgG 克隆具有與所用的標準品相當的 K_D （表 1）。此外， K_D 在轉染或載體化的構建體類型之間是相當的，範圍在約 4 至 6 nM 之間，因此證明了載體化產生了高品質蛋白質，其針對被靶向的 TDP-43 抗原具有預期的結合親和力。對於 scFv-Fc 蛋白也可以這樣說，但可能略有變化。

2.6. 人神經母細胞瘤細胞系和 BBB 細胞轉導以及細胞上清液中的蛋白效價

【0162】 下一步是驗證 AAV2、8、9 和 10 載體化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc 構建體以及陰性對照 MAB2 IgG 2 啟動子 LC/HC 是否可有效轉導 CHO 以外的其他細胞類型。對此，我們使用補充有 10 μ M 視黃酸和 2%胎牛血清的濃縮合成培養基在 37°C、5% CO₂ 下轉導分化為神經元的人神經母細胞瘤細胞。一式三份地轉導約 200K 細胞，並在每孔含 500 μ L 培養基的 24 孔微板中孵育。通過添加約 100K 基因組拷貝/細胞進行轉導。通過 ELISA 確定載體化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc 二者的效價。對血腦屏障微血管中分化的 hCMEC/D3 細胞進行了類似的實驗（參見以下實施例中的程式）。在此，使血腦屏障細胞在 50K 或 100K/孔、37°C、5% CO₂ 下生長，並通過 AAV 載體化的 MAB1 IgG IRES LC/HC 構建體的 50K 基因組拷貝（gc）/細胞進行轉導。在兩種細胞類型情況下，均每 3 天更換培養基。簡言之，用全長 TDP-43 蛋白包被 96 孔微板，然後用補充有 1%血清牛白蛋白和 0.05%吐溫的 PBS 緩衝液飽和。然後將樣品添加到微板孔中，並在 37°C 下孵育 1 小時。同時，從 2 μ g/mL 濃度開始然後使用與樣品相同的緩衝液（補充有 1%血清牛白蛋白和 0.05%吐溫的 PBS 緩衝液）以 2 倍連續的方式稀釋，添加相應的樣品標準品。用補充有 0.05%吐溫的 PBS 緩衝液洗滌板。在此之後，將用辣根過氧化物酶標記的抗人 IgG Fc 抗體添加到板中的補充有 1%血清牛白蛋白和 0.05%吐溫的 PBS 緩衝液中，並在 37°C 下孵育 1 小時。如上洗滌板，並將辣根過氧化物酶底物（3,3',5,5'-四甲基聯苯胺，稱為 TMB）添加到孔中，

在室溫下孵育約 5 至 10 分鐘，並使用 0.5 M H₂SO₄ 停止反應。然後在微板讀取器中在 OD 450 nm 下獨立地讀取樣品。所收集的資料在圖 11 中呈現，並與以上在用 MAB1 前導構建體進行的相同載體化 CHO 轉導的情況下獲得的經純化的效價進行了比較。

【0163】 觀察結果。兩種經轉導的可商購細胞類型（從人神經母細胞瘤細胞系和腦內皮細胞系（hCMECD/3）分化的神經元）產生了能夠結合全長 TDP-43 蛋白的功能性 MAB1 IgG 和 scFv-Fc（圖 11）。總的來說，抗體和衍生物隨時間大量產生（參見中間的圖，第 18 天，分化的人神經母細胞瘤細胞系）。它們代表約 0.2 至 1 pg 抗體/細胞/天的平均值，這是穩健的細胞表達，類似於針對在較高細胞密度（約 1000 萬/mL）下生長的 CHO 細胞所報導的，其表達約 0.5 至 4 pg/細胞/天。在這些實驗中，對於 AAV2 載體化的 MAB1 IgG 和 scFv-Fc，所獲得的效價較高。此外，與載體化的 IgG 對應物相比，每種 AAV8、9 和 10 載體化中的 scFv-Fc 效價更高。作為用於載體化的衣殼的函數，IRES 構建體的分化的人神經母細胞瘤細胞系效價高於 2 個啟動子的構建體對應物。最後，由於其結合除 TDP-43 以外的另一特異性抗原的特性，未檢測到載體化的 MAB2 IgG 2 個啟動子 LC/HC（參見中間的圖）。總之，所收集的資料證實了較早的觀察結果，該觀察結果表明 IgG IRES 構建體相比於使用 LC/HC 構型的 2 個啟動子達到更高的表達效價。

表 2：載體化的抗體構建體中使用的核酸序列：

序列描述	核酸序列
內部核糖體進入位點（IRES）序列	GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTG GCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCG TTTGCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGT CTTTTGGAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGC CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTT

	TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG CTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACC CTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTAT AAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAG TGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAG AGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA AGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAA AACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTG GTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGG CCACAACC (SEQ ID NO: 1)
小鼠 MAB2，啟動子-LC-IRES-HC-WPRE	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGTTCTTCTAGACAACCTTTGTATAG AAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGG GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC

	GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCGACATCGTGATGACCCAGAGC CACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACAG AGTGTCCATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACG TGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCATTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAGC GCCAGCTTCAGATACACCGGCGTGCCCGATAG ATTCACCGGCAACAGAAGCGGCACCGACTTCA CCTTCACCATCAGCTCTGTGCAGGCCGAGGAT CTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGCACTACAC CACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGG TGGAAATCAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACC GTGTCTATCTTCCCACCTAGCAGCGAGCAGCT GACATCTGGCGGAGCCTCTGTCTGTGTCTCCT GAACAACCTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGA AGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGACAGAA CGGCGTGCTGAACTCTTGACCGACCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGCACC
--	---

	CTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAGAGAC ACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAAG ACCAGCACAAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAA CAGAAACGAGTGCTGAACCCAGCTTTCTTGTA CAAAGTGGGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAA CGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCC GGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCA TATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGG AAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTT AGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCA AGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTC CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCC ACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGC CACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCA CAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGT TGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCG TATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAG GTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCT CGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGG TTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGG GGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGAT AATATGGCCACAACCATGGAGACAGATACACT GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCCAGGTTTCACTGCAGCAGTCT GGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTCT GAAGCTGAGCTGTACCGCTTCCGGCTTCAACA TCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCAAGCAG AGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGATCGGCAG
--	---

	AATCTACCCACCAACGGCTACACCAGATACG ACCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCATCACA GCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTATCTCCA GGTGTCCAGGCTGACCAGCGAGGACACAGCCG TGTACTIONGCTCTAGATGGGGAGGCGACGGC TTCTACGCCATGGATTATTGGGGACAGGGCGC CAGCGTGACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACAG CCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTG GCGACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGC TGTCTGGTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGT GACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCTA GCGGCGTGACACATTTCCAGCCGTGCTGCAG AGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGCGTGAC CGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCCAGAGCA TCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCAGCAGC ACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGCCTAGAG GCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGT GCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCCCAAGC GTGTTGATCTTCCCACCTAAGATCAAGGACGT GCTGATGATCTCTCTGAGCCCCATCGTGACCTG CGTGGTGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTG ACGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTG GAAGTGCACACAGCCCAGACACAGACCCACA GAGAGGACTACAACAGCACCCCTGAGAGTGGTG TCTGCCCTGCCTATCCAGCACCAGGATTGGAT GAGCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAAC AACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAAC CATCAGCAAGCCCAAGGGCTCTGTCAGGGCTC CTCAGGTGTACGTTCTGCCACCTCCTGAGGAA
--	---

	GAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCCTCACCTG TATGGTCACCGACTTCATGCCCCGAGGACATCT ACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACCGA GCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTACTTCATGTACAGCAAG CTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTGCGAGA GAAACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGAG GGACTGCACAACCACCACACCACCAAGAGCTT CAGCAGAACCCCTGGCAAGTGACAACTTTATT ATACATAGTTGGAATTCCGATAATCAACCTCT GGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTA TTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTG GATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA TTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTT GTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGA GTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGG TGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTG GTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTT CCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA CGGCGGAATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGT CCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCC CTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT CCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATTCC TAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTC
--	--

	TAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCC CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC CACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG GGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCT GGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC GCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 2)
小鼠 MAB2 - 2 個啟動子的 IgG，由啟動子 1 (CMV)-LC-polyA-啟動子 2 (CMV)-HC-WPRE-poly A 組成	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGTTCCCTTCTAGACAACTTTGTATAG AAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGG GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACCTTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG

	GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCOAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCGACATCGTGATGACCCAGAGC CACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACAG AGTGTCCATCACATGCAAGGCCAGCCAGGACG TGAACACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCATTCTCCTAAGCTGCTGATCTACAGC GCCAGCTTCAGATACACCGGCGTGCCCGATAG ATTCACCGGCAACAGAAGCGGCACCGACTTCA CCTTCACCATCAGCTCTGTGCAGGCCGAGGAT CTGGCCGTGTACTACTGTCAGCAGCACTACAC CACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGG TGGAATCAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACC GTGTCTATCTTCCCACCTAGCAGCGAGCAGCT GACATCTGGCGGAGCCTCTGTGCTGTGCTTCCT GAACAACCTCTACCCCAAGGACATCAACGTGA AGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGACAGAA CGGCGTGCTGAACTCTTGACCGACCAGGACA GCAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGCACC CTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAGAGAC ACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAAG ACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAA
--	---

	CAGAAACGAGTGCTGACAGACATGATAAGATA CATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAA TGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTT GTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGC ATTCATTTTATGTTTCAGGTT CAGGGGGAGGTG TGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTA CAAATGTGGTATAGTTATTAATAGTAATCAATT ACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC ACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCACCCAGCTTTCTTGT ACAAAGTGGGCCACCATGGAGACAGATACACT GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCCAGGTT CAGCTGCAGCAGTCT
--	---

	GGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTCT GAAGCTGAGCTGTACCGCTTCCGGCTTCAACA TCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCAAGCAG AGGCCTGAGCAGGGACTCGAGTGGATCGGCAG AATCTACCCACCAACGGCTACACCAGATACG ACCCCAAGTTCCAGGACAAGGCCACCATCACA GCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTATCTCCA GGTGTCCAGGCTGACCAGCGAGGACACAGCCG TGTACTACTGCTCTAGATGGGGAGGCGACGGC TTCTACGCCATGGATTATTGGGGACAGGGCGC CAGCGTGACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACAG CCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTG GCGACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGC TGTCTGGTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGT GACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCTA GCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAG AGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGCGTGAC CGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCCAGAGCA TCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCAGCAGC ACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGCCTAGAG GCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGT GCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCCCAAGC GTGTTCATCTTCCCACCTAAGATCAAGGACGT GCTGATGATCTCTCTGAGCCCCATCGTGACCTG CGTGGTGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTG ACGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTG GAAGTGACACAGCCCAGACACAGACCCACA GAGAGGACTACAACAGCACCCCTGAGAGTGGTG TCTGCCCTGCCTATCCAGCACCAAGGATTGGAT
--	---

	GAGCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAAC AACAAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAAC CATCAGCAAGCCCAAGGGCTCTGTCAGGGCTC CTCAGGTGTACGTTCTGCCACCTCCTGAGGAA GAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCTCACCTG TATGGTCACCGACTTCATGCCCCGAGGACATCT ACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACCGA GCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTACTTCATGTACAGCAAG CTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTCGAGA GAAACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGAG GGACTGCACAACCACCACACCACCAAGAGCTT CAGCAGAACCCCTGGCAAGTGACAACCTTTATT ATACATAGTTGGAATTCCTAGAGCTCGCTGAT CAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT CTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGA CCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCCT AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA GAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCA GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG CGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 3)
小鼠 MAB1，啟動子-LC-較短的 IRES-HC-WPRE	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGG

	CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGTTCTTCTAGACAACTTTGTATAG AAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACC CCTCTGACACTGAGCGTGACCATCGGACAGCC TGCCAGCATCAGCTGCAAGAGCAGTCAGAGCC TGCTGCACAGCGACGGCAAGACCTACCTGAAC TGGCTGCTGCAAAGACCCGGCCAGTCTCCTAA
--	--

	GAGGCTGATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGACA GCAGAATCCCCGACAGATTACAGGCAGCGGC TCTGGCACAGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG AGTGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTACT GTTGGCAGGGCACACACTTCCCTCACACATTC GGCGCTGGCACAAAGCTGGAAGTGAAGAGAG CTGACGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCAC CTAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCC TCTGTCGTGTGCTTCCTGAACAACTTCTACCCC AAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGACG GCAGCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACTCT TGGACCGACCAAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCATGAGCAGCACCCCTGACACTGACCAAGG ACGAGTACGAGAGACACAACAGCTACACATGC GAGGCTACCCACAAGACCAGCACAAAGCCCCAT CGTGAAGTCCTTCAACAGAAACGAGTGCTGAG CCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGG CCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGT TTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGT CTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTT TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG CTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACC CTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTAT AAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAG TGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAG AGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA
--	---

	AGGGGCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCCAT
	TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC
	ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAA
	AACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTG
	GTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGG
	AGACAGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTC
	CTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGAGGTTCA
	GCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTAAGC
	CTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGACA
	AGCGGCTTCACCTTCACCGAGTACAGCATGCA
	CTGGGTCAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGG
	AATGGATCGGCGGCATCAACCCTAACAACGGC
	GGCACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAA
	AGCCCACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGC
	ACCGCCTACATGGAAGTGAAGCCTGACCAG
	CGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAG
	AGTCTTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTC
	TCTTCTGCCAAGACAACAGCCCCTAGCGTGTA
	CCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGCGACACAACAG
	GCAGCTCTGTGACACTGGGCTGTCTGGTCAAG
	GGCTACTTCCCCGAACCAGTGACACTGACCTG
	GAACAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGCGTGACACA
	CATTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTAC
	AACTGTCTCTAGCGTGACCGTGACCAGCTCT
	ACATGGCCCAGCCAGAGCATCACCTGTAACGT
	GGCCCATCCTGCCAGCAGCACCAAGGTGGACA
	AGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTACCATCAAG
	CCCTGTCTCCATGCAAGTGCCCCGCTCCTAAT
	CTGCTCGGAGGCCCAAGCGTGTTTCATCTCCCA

	CCTAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCTCT GAGCCCCATCGTGACCTGCGTGGTGGTGGATG TGTCTGAGGACGACCCTGACGTGCAGATCAGT TGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACAGC CCAGACACAGACCCACAGAGAGGACTACAAC AGCACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTAT CCAGCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAAT TCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCT GCTCCTATCGAGAGAACCATCAGCAAGCCCAA GGGCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCT GCCACCTCCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAAC AAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCGACTTC ATGCCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACCAA CAACGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGAAC ACCGAGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTA CTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAGAAGA AGAACTGGGTCGAGAGAAACAGCTACAGCTGC TCCGTGGTGCACGAGGGACTGCACAACCACCA CACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACCCCTGGCA AGTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAA TTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTG TGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGC TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAAT GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGC TTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTG CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTC AGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGC TGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTT
--	--

	TCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCG CCGCCTGCCTTGCCCCTGCTGGACAGGGGCT CGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGT GTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGC TCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA CGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCG GCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGC CCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGC CTCCCCGCATCGGGAATTCCTAGAGCTCGCTG ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC ATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTT GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTC CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC TGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG AAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCG CAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTG CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 4)
MAB1 啟動子-LC-IRES-HC-WPRE-PolyA	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGTTTCCTTCTAGACAACTTTGTATAG AAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC

	GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACC CCTCTGACACTGTCCGTGACCATCGGACAGCC TGCCTCCATCTCCTGCAAGTCCTCTCAGTCCCT GCTGCACTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACT GGCTGCTGCAGAGGCCTGGCCAGAGTCCTAAG AGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGACTC TCGGATCCCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCTC TGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAG TGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTA
--	---

	TGGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCTTTGG CGCTGGCACAAAGCTGGAAGTGAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCT TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTC TGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCG GGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGT GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACA GCCTGTCTTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCC GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGA AGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGA CCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTTGAACC CAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCCCCTCTCCCT CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGC TTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATG TTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAAT GTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTT GACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGC CAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGA AGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCA GCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCT GCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCT GCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGT GAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGC TCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG GATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATC TGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG TGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCC
--	--

	CCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGA AAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGG AGACAGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTC CTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGAGGTTCA GCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTAAGC CTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGACC TCTGGCTTCACCTTCACCGAGTACTCCATGCAC TGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGTCCCTGGA ATGGATCGGCGGCATCAACCCTAACAACGGCG GCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAA GCTACCCTGACCGTGGACAAGTCCTCCTCCAC CGCCTACATGGAAGTGCGGTCCCTGACCTCTG AGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAG TCTTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTCTC TTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCC TCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGT CTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGACACCTTTC CAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCTGTACTCTC TGTCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCTAGCTCTC TGGGCACACAGACCTACATCTGCAATGTGAAC CACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCG GCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGC CTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCT GAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCA CGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG
--	---

	TGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTA CAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTAT CGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCTCCAT CTCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC GATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCA GCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACT CCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAG CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCTCTGAGCCCCGCAAGTAGCAACTTT ATTATACATAGTTGGAATTCCGATAATCAACCT CTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG TATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGT GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCT ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCT TGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGG AGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTG GTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC ACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCG CTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG ACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACG
--	--

	TCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACC TGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTC CCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCC CGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG CGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATC TCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATTC CTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCC CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTC CCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG GGGAGGATTGGAAGAGAATAGCAGGCATGC TGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCT CACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC GCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 5)
MAB1 - 2 個啟動子的 IgG，由啟動子 1 (CMV)- LC-polyA-啟動子 2 (CMV)-HC-WPRE-poly A 組成	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGTTCTTCTAGACAACTTTGTATAG AAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCAATTAC GGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCG CCTGGCTGACCGCCCCAACGACCCCCGCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAA

	CGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGG GTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGC CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCOAAGTCTCCACCCCATTG ACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT TTAGTGAACCGTCAGATCCAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTGCCACCATGGAGACAGATACAC TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAG GATCTACAGGCGACGTGGTCATGACACAGACC CCTCTGACACTGTCCGTGACCATCGGACAGCC TGCTTCCATCTCCTGCAAGTCCTCTCAGTCCCT GCTGCACTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACT GGCTGCTGCAGAGGCCTGGCCAGAGTCCTAAG AGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGCTGGACTC TCGGATCCCTGACAGATTACCGGCTCTGGCTC TGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAG TGGAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGT TGGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCTTTGG CGCTGGCACAAAGCTGGAAGTGAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCACCT TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTC
--	---

	TGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCTCG GGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGT GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACA GCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCC GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGA AGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGA CCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTTGACAG ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAA ACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTT TATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATT TGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTA ACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGG TTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGC AAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATAGTTAT TAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA CGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA AACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATC ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCOA AGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
--	--

	GTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA AATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA TCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCACC ATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCT GCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGAGG TTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTT AAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAA GACCTCTGGCTTCACCTTCACCGAGTACTCCAT GCACTGGGTCAAGCAGTCCCACGGCAAGTCCC TGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCTAACAAC GGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGG CAAAGCTACCCTGACCGTGGACAAGTCCTCCT CCACCGCCTACATGGAAGTGCGGTCCCTGACC TCTGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTAG AGAGTCTTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAG TCTCTTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGT TCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTG GCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTG AACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACAC CTTTCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCTGTA CTCTCTGTCCTCCGTCGTGACCGTGCCTTCTAG CTCTCTGGGCACACAGACCTACATCTGCAATG TGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAC TGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTC
--	--

	CAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGG ACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT GTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCC AAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAAC CCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTA CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG CTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTT GCCTCCATCTCGGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCT ACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCT AATGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTT CCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGT AGCAACTTTATTATACATAGTTGGAATTCCTAG AGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGT GCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATC GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG GATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGG AGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
--	--

	AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCG GGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 6)
MAB1，啟動子-scFv-Fc-WPRE	cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaag cccgggcgctgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagc gcgagagaggagtggtgccaactccatcactagggttccttagacaact ttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaatcaattacggggtcattagtcata gcccataatgaggtccggttacataacttacggtaaatggccgcctggc tgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtccat agtaacccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggt aaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccct attgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattacca tggtgatgcggttttggcagtacatcaatggcggtgtagcggttgactca cggggatttccaagttccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcac caaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgc aaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctggttt agtgaaccgtcagatccaagttgtacaaaaaagcaggctgccaccatgga gacagatacactgctgctgtgggtgctgctccttgggtgccaggatctaca ggcgagggtcagctgcagcagcttgacctgagctggttaagcctggcgcc tccgtgaagatctctgcaagacctctggcttcaccticaccgagtactccatg cactgggtcaagcagtcacacggcaagtccctggaatggatcggcggtac aaccctaacaacggcgccacctcctacaaccagaagtcaagggcaaagct accctgaccgtggacaagtctcctccaccgcctacatggaactgcggtccc tgacctctgaggactccgctgtactactcgctagagagtcttggggcca gggcaccacactgacagtctcttctggaggcggaggatctggcggaggtg gaagtggcgaggcggtatctgacgtggtcatgacacagacccctctgacac tgtccgtgaccatcgacagcctgcctccatctcctgcaagtccctcagtc

	ctgctgcactctgacggcaagacctacctgaactggctgctgcagaggcctg gccagagtctaagagactgaatctacctgggtccaagctggactctcggat ccctgacagattcaccggctctggctctggcaccgacttcacctgaagatct ccagagtggaaagccgaggacctggcggtgtactactgttggcagggcacc cactttccacacacctttggcgctggcacaaagctggaactgaaggagggc ggaggatctgacaagaccacacctgtcctccatgtcctgctccagaactgc tcggcggaccttcctgttctctttcctccaaagcctaaggacacctgatg atctctcggaccctgaagtacctgcgtggtggtgatgtgtctcacagg atcccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcggtggaagtgcacaacg ccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctacagagtgggtg ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattgctgaacggcaaagagtacaagt gcaaggtgtccaacaaggccctgcctgctctatcgaaaagaccatctccaa ggccaagggccagcctagggaacccagggttacacctgacctccatctcg ggaagagatgaccaagaaccagggtgccctgacctgtctcgtgaaggctt ctacccctccgatatcgccgtggaatgggagtctaattggccagcctgagaac aactacaagacaacccctcctgtgctggactccgacggctcattctcctgta ctccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggcaacgtgttctc ctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaatcactacaccagaagtccctg tctctgagccccggcaagtagaccagctttctgtacaaagtgggaattccg ataatcaacctctggattacaaaattgtgaagattgactggtattcttaactat gtgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcccttgatcatgctattg ctccccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggtgctgtctcttat gaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcggtggtgctgctgtgttgc tgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccg ggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgc ctgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggcactgacaattccgtgg tgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgcacct ggattctgcgaggacgtccttctgtactgtcccttcggccctcaatccagcg gaccttcctccccggcgctgctgcgggctgtggcgcttctccgcgtcttcg
--	--

	ccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggcccgcctccccgcacgg gaattcctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgccagccat ctgttgtttgccccctccccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactccca ctgtcccttcctaataaaataggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtca ttctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattggg aagagaatagcaggcatgctggggaggggccgcaggaacccctagtgatg gagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggggcga ccaaaggctgcccgcgcccgggctttgccgggcggcctcagtgagcga gcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 7)
內部核糖體進入位點較短序列(較短的 IRES)	GCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTG GCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCG TTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGT CTTTTGGAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTT TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAG CTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACC CTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGA CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTAT AAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAG TGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAG AGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA AGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCAT TGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAAAAA AACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTG GTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAT (SEQ ID NO: 8)

MAB1 FAB 啟動子-LC-IRES-HC-WPRE-PolyA	cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgccgggcaaag ccccggcgtcggcgaccttggcgccccggcctcagtgagcgagcgagc gcgcagagagggagtgccaactccatcactaggggttccttagacaact ttgtatagaaaagttgtagttaataagtaataatcaggggtcattagtcata gcccataatatggagttccggttacataacttacggtaaatggccgcctggc tgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccat agtaacgccaatagggaactttcattgacgtcaatgggtggagtattacggt aaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccct attgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattacca tggtgatgcggttttggcagtacatcaatggcggtggatagcggttgactca cggggatttccaagtctccacccttgacgtcaatgggagttgttttggcac caaaatcaacgggactttcaaatgtcgtacaactccgccccattgacgc aaatggcggttaggcgtgtacgggtggaggtctatataagcagagctggtt agtgaaccgtcagatccaagttgtacaaaaagcaggctgccaccatgga gacagatacactgctgctgtgggtgctgctccttgggtgccaggatctaca ggcgacgtggtcatgacacagaccctctgacactgtccgtgaccatcgga cagcctgcctccatctcctgcaagtccttcagtcctgctgcactctgacgg caagacctacctaactggctgctgcagaggcctggccagagtctaagag actgatctacctgggtccaagctggactctcgatccctgacagattcaccg gctctggcttggcaccgacttcaccctgaagatctccagagtgaagccga ggacctggcggtgtactactgttggcagggcacccactttccacacaccttg gcgctggcacaagctggaactgaagcggacagtggcgcctccttccgtgt tcatcttccacctccgacgagcagctgaagtcggcacagcttctgtcgtg tgctgtctgaacaacttctaccctcgggaagccaaggtgcagtgaaggtg gacaatgccctgcagtccggcaactccaagagtctgtgaccgagcaggac tccaaggacagcacctacagcctgtcctccacactgacctgtccaaggcc gactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgacctatcagggcct gtctagccctgtgaccaagtcttcaaccggggcgaggttgaaccagcttt
------------------------------------	--

	ctgtacaaagtggccctctcctcccccccctaacgttactggccgaa ggcgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattg ccgtcttttgcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgag cattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaaatgaaggctgtgtgaatgt cgtgaagggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgta gcgaccctttgaggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctg cggcctaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccc agtgccacgtgtgagttggaatgtgtggaagagtcacatggctctcctca agcgtattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtagccctattgtatg ggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttagtcgaggtta aaaaaacgtctaggcccccgaaaccggggacgtgttttctttgaaaaa cacgatgataatatggccacaacctggagacagatacactgtctgtgtggg tgtctgtcctctgggtgccaggatctacaggcggaggttcagctgcagcagtc tggacctgagctggtaagcctggcgctccgtgaagatctcctgcaagacc tctggcttcaccttcaccgagtactccatgcactgggtcaagcagtcacagg caagtccttggaatggatcggcgcatcaaccctaacaacggcgacacctc ctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgacctggacaagtctc ctccaccgcctacatggaactgcggccttgacctctgaggactccgcccgtg tactactgcgctagagagtcttggggccagggcaccacactgacagtctctt ctgcttaccgaaggaccagcgtgtccctctggctccttcagcaagtcta cctctggcggaacagctgctctgggctgcctgtgaaggactacttctgag cctgtgacctgtcttgaactctggcgtctgacatccggcgtgcacacctt ccagctgtctgcaatccagcggcctgtactctgtctcctcgtctgacctg gccttctagctctctgggcacacagacctacatctgcaatgtgaaccacaagc ctccaacaccaaggtggacaagaaggtggaaccaagtctcgggtctccc accaccatcaccatcattagcaactttattatacatagttggaattccgataatc aacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaactatgttgc cctttacgctatgtggatagcgtcttaaatgccttctgtatcatgctattgtcc cgtatggcttctttctcctcctgtataaatcctgttgctgtctctttatgagg
--	---

	agttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgcac gcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccggga ctttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttg cccgtgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtt gtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgtgccacctgga ttctgcggggacgtccttctgctacgtccctcggccctcaatccagcggac cttcctcccgcgccctgtgcccgtctgcggcctcttccgcgtcttcgcctt cggccctcagacgagtcggatctcccttggggccctcccgcatcgggaat tcctagagctcgtgatcagcctcgactgtgccttctagtggccagccatctgtt gttgccccctccccgtgccttcttgacctggaagggtccactcccactgtc ctttcctaataaaataggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctat tctggggggtgggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaaga gaatagcaggcatgctggggaggggccgaggaacccctagtgtatggagtt ggccactccctctctgcgcgtcgtcgtcactgaggccggcgacaaaa ggtcggcgacggcggttggccggcgccctcagtgagcgagcga gcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 9)
MAB1 Fab - 2 個啟動子的 IgG，由啟動子 1 (CMV)- HC-polyA-啟動子 2 (CMV)-LC-WPRE-poly A 組成	cctgcaggcagctgcgcgtcgtcgtcactgaggccgccccgggcaaag cccgggcgtcggcgacctttgtgcggcgccctcagtgagcgagcgagc gcgcagagaggagtggtgccaactccatcactagggttcttctagacaact ttgtatagaaaagtgtagttattaatagtaataattacggggtcattagttcata gcccataataggagtccgcgttacataacttacggtaaatggccccgctggc tgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccat agtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggt aaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccct attgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagtacatgac cttatgggactttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgtattacca tggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactca cggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcac

	caaaatcaacgggactttcaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgc aatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctggttt agtgaaccgtcagatccaagttgtacaaaaagcaggctgccaccatgga gacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctaca ggcgagggttcagctgcagcagcttgacctgagctggttaagcctggcgcc tccgtgaagatctcctgcaagacctctggcttcaccttcaccgagtactccatg cactgggtcaagcagtcacacggcaagtcctggaatggatcggcggcac aacctaacaacggcgccacctcctacaaccagaagttcaagggcaaagct acctgaccgtggacaagtcctcctccaccgcctacatggaactgcggctcc tgacctctgaggactccgccgtgtactactgcgctagagagtcttggggcca gggcaccacactgacagtctcttctgtcttaccaggaccagcgtgttc ctctggctcctccagcaagtctacctctggcggaacagctgctctgggctgc ctggcaaggactacttctctgagcctgtgaccgtgtcttgaactctggcgct ctgacatccggcgtgcacaccttccagctgtgtgcaatccagcggcctgta ctctctgtcctccgtgtgaccgtgccttctagctctctgggcacacagacct catctgcaatgtgaaccacaagcctccaacaccaaggtggacaagaaggt ggaaccaagtcctgcggctcccaccaccatcaccatcattagcagacatga taagatacattgatgagtttggaacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaa tgctttattgtgaaattgtgatgtattgctttattgtaccattataagctgcaa taaacaagttaacaacaacaatgcattcattttatgttcagggtcagggggag gtgtgggaggtttttaagcaagtaaacctctacaatgtggtatagtatta atagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagtccgcgtt acataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgc ccattgacgtcaataatgacgtatgtccatagtaacgccaatagggactttc cattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtacat caagtgtatcatatgccaagtacggccctattgacgtcaatgacggtaaatg ggccgcctggcattatgccagtcacatgacctatgggactttctacttgga gtacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtatgcggtttggcagtac atcaatggcggtgtagcggtttgactcacggggattccaagtctccacc
--	---

	cattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaatcaacgggactttccaaa atgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacg gtgggaggtctatataagcagagctggtttagtaaccgtcagatcaccag ctttctgtacaaagtgggccaccatggagacagatacactgctgctgtgggt gctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgacgtggtcatgacacagac ccctctgacactgtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagt cctctcagtcctctgctgactctgacggcaagacctacctaactggctgctg cagaggcctggccagagtccaagagactgatctacctggtgtccaagctg gactctcggatccctgacagattcaccggctctggctctggcaccgacttcac cctgaagatctccagagtggagccgaggacctggcggtgtactactgttg cagggcacccactttccacacaccttggcgctggcacaaagctggaactga agcggacagtggccgctcctccgtgttcattctccacctccgacgagcag ctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgcctgtgaacaactctacctcg ggaagccaagggtgcagtggaggtggacaatgccctgcagtccggcaact cccaagagtctgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctacagcctgt cctccacactgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgtacg cctgcgaagtgacctatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtcttcaac cggggcgagtggtgacaactttattatacatagttggaattccgataatcaacct ctggattacaaaattgtgaagattgactggtattcttaactatgtgtcctttt acgctatgtggatacgcctgttaatgccttgtatcatgctattgcttccgtat ggctttcattttctcctctgtataaatcctggtgtctgtcttcttatgaggagttg tggcccgtgtcaggcaacgtggcggtggtgtgactgtgttctgacgcaac ccccactgggtgggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcg ctttccccctccctattgccacggcggaactcatgcgcgcctgacctgcccgc tgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcgg ggaagctgacgtccttccatggctgtcgcctgtgttgccacctggattctgc gggggacgtccttctgtacgtccctcggccctcaatccagcggaccttct tcccgcggcctgtgcggctctgcggcctctccgcgtcttgccttgcgcc tcagacgagtcggatctcccttgggcgcctccccgcacgggaattccta
--	---

	gagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtgtttg ccccccccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttc ctaataaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctg gggggtgggtgggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaat agcaggcatgtggggaggggccgcaggaacccctagtgatggagtggcc actcctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggaccaaaggtc gcccgacgcccgggctttgccggggcgcctcagtgagcgagcgagcgc gcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 10)
--	---

實施例 2. 細胞培養

【0164】 在 37℃ 下在含 5% CO₂ 的濕潤氣氛中將人腦微血管內皮 hCMEC/D3 細胞維持在預包被有 100 µg/mL 鼠尾 I 型膠原 (08-115, Merck) 的 75 cm² 的燒瓶中的補充有試劑盒中包含的所有因數和 1 ng/mL bFGF (Merck, GF003) 的 EndoGRO-MV 生長培養基 (Merck, SCME004) 中。

【0165】 B.End3 和 b.End5 小鼠腦內皮瘤細胞系在補充有 Pen/strep 和 10% FBS 的 DMEM 培養基 (生長培養基) 中培養。將細胞在經 TC 處理的 75 cm² 燒瓶中培養，並用胰蛋白酶-EDTA 溶液脫離，以用於以 1:10 的比例傳代進行繼代培養。將細胞在 37℃ 下在含有 5% CO₂ 的濕潤氣氛中孵育。

實施例 3. OrganoPlate® 3 通道體外 BBB 模型

【0166】 用於 3D 體外 BBB 建模的 OrganoPlate® 3 通道系統包含嵌入標準 384 孔微量滴定板格式的 40 個微流控細胞培養結構。每個組織晶片由三個通道構成，這些通道與微量滴定板的相應孔相連，其起入口和出口的作用，以進入微流控培養。首先，通過混合 1M HEPES、37 g/L NaHCO₃ 和 5 mg/mL 膠原-I 來製備 4 mg/mL 膠原-I (大鼠尾, Merck) 的胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 凝膠，並將其引入到中心通道中。相位導向器 (phase guide) 用於通過彎月形釘在中心通道中選擇性地形成 ECM 凝膠的圖案。ECM 凝膠 (在 37℃、5% CO₂ 下

過夜或過週末) 之後，在頂部通道中以 40000 個細胞/晶片的密度將 hCMEC/D3 細胞接種在補充有 1 ng/mL bFGF 的 EndoGRO-MV 生長培養基中。一旦細胞貼壁，就將板水準放置在通過儲器之間的相互調平誘導流動的間隔搖杆上，並在 37 °C、5% CO₂ 下孵育至少 3 天以允許小管形成。約每 3 天進行培養基更換，以維持最佳屏障完整性，其在每次轉導或胞吞轉運實驗之前通過通透性測定進行控制。通過灌注在培養基中的 0.5 mg/mL FITC-右旋糖酐 (Sigma 46946，平均 150 kDa；FD20S，平均 20 kDa，和 Sigma FD10S，平均 10 kDa) 通過管腔，然後確定基礎凝膠區的螢光水準 (相對於腔中的螢光歸一化) 來評估屏障功能。使用 Incucyte 活細胞讀取器在 1 小時期間每 5 分鐘進行螢光測量。

實施例 4. Transwell 體外 BBB 模型

【0167】 對於基於 Transwell 的體外 BBB 模型，首先在濕潤的培養箱中用大鼠尾膠原-I (Merck) 包被含有孔徑為 0.4 μm 的 Corning Transwell 膜 (0.33 cm² 培養面積，Sigma) 的 24 孔板的頂端 1 小時。然後將 hCMEC/D3 細胞以 100000 個細胞/cm² 的密度接種在補充有 1 ng/mL bFGF 的 EndoGRO-MV 生長培養基中。約每 2 至 3 天進行培養基更換，總是維持 100 μL 的頂端體積，並且在基底外側為 600 μL。從內皮細胞接種之後 4 天進行通透性和跨上皮電阻 (Transepithelial Electrical Resistance, TEER) 測量，並且發現細胞單層直到接種之後第 15 天仍保持合適的屏障特性。對於通透性測量，在基底外側區室中用 600 μL 新鮮培養基替換內皮細胞培養基。然後將培養基中的 100 μL 0.25 mg/mL FITC (Sigma 46946，平均 150 kDa；FD20S，平均 20 kDa 和 Sigma FD10S，平均 10 kDa) 添加到上部區室中，並將細胞在濕潤培養箱中孵育 1 小時。然後從基底外側區室收集 100 μL 級分，並將其轉移到 Greiner black 96 孔板中，用於使用 Tecan Spark 微板讀取器進行螢光測量。根據公式 $Papp = (\Delta Q / \Delta t) \times (1 / AC_0)$ 計算表觀通透性，其中 Papp 是表觀通透性係數 (cm/分鐘)， $\Delta Q / \Delta t$ 是右旋糖酐穿過內皮細胞層的通透速率 (μg/分鐘)，A 是細胞層的表面積 (cm²)，以及 C₀ 是施加到頂端細胞表面的初始右旋糖酐濃度 (μg/ml)。對於 TEER 測量，在下部區室中用 1050 μL 新鮮培養基替換內皮細胞培養基，並且在上部區室中用 325 μL 替換。使用 EVOM-3 上皮伏特歐姆計 (WPI) 測量 TEER。

實施例 5. hBMEC 的 AAV 轉導/通過靶向結合檢測 hBMEC 和抗體-通過使用 OrganoPlate® BBB 模型的 hCMEC/D3 細胞的抗體分泌

【0168】 建立的 OrganoPlate® hCMEC/D3 體外 BBB 模型用於評價 hCMEC 是否可有效分泌 AAV WT 衣殼中的載體化抗體。將 MAB1 (人 IgG1 同種型) 抗體載體化到 AAV2、AAV8、AAV9 和 AAVrh10 衣殼中，並在以 50'000 的 MOI 接種到 OrganoPlate® 3-通道中之後 24 小時轉導到 hCMEC/D3 單層中。在轉導之後 3 天收集來自頂部通道 (頂端) 和底部通道 (基底外側) 兩處的上清液，並使用間接 ELISA 通過與人全長 (FL) TDP-43 的結合確定頂端和基底外側區室中的抗體濃度。簡言之，用 1 µg/ml 人 FL TDP-43 在 4°C 下在碳酸鹽緩衝液中對 ELISA 板進行包被過夜。用 0.05%吐溫-20/PBS 洗滌板，然後用 0.05%吐溫-20/PBS 中的 1%牛血清白蛋白 (BSA) 在 37°C 下封閉 1 小時。然後將所收集的含有抗體的上清液添加到板中，並在 37°C 下孵育 2 小時然後洗滌板。添加以 1/1000 的稀釋度在 0.05%吐溫-20/PBS 中稀釋的 AP 綴合的抗小鼠 IgG 二抗 (Jackson, 115-055-206)，在 37°C 下持續 1 小時。在最終洗滌之後，將板與 pNPP 溶液一起孵育，並在 1 小時之後使用讀板器 (BioTek) 在 405 nm 下讀取。如圖 13 所示，在通過被評價的所有 WT AAV 衣殼轉導的 hCMEC/D3 單層的頂端上清液中均檢測到 MAB1 (人 IgG1 同種型)，並且其保留與 TDP-43 的結合。對於 AAV2，頂端區室中的 MAB1 效價被估計為約 40 ng/mL，對於 AAV8、AAV9 和 AAVrh10 血清型，為約 4 ng/mL。相關陰性對照 (AAV2-eGFP) 在 TDP-43 ELISA 測定中未誘導任何信號。由 AAV2 轉導的 MAB1 (人 IgG1 同種型) 也在基底外側區室中被檢測到，其水準是頂端的 20 倍低 (圖 14)，這與在 OrganoPlate®中緻密 ECM 層中觀察到的有限擴散一致 (資料未顯示)。如圖 15 所示，MAB1 (人 IgG1 同種型) AAV2 構建體當以 5'000 至 160'000 的 MOI 在 hCMEC/D3 細胞中轉導時，以劑量依賴性方式產生抗體效價。Transwell 體外 BBB 模型也用於進一步驗證載體化抗體的遞送。在接種到 24 孔 Transwell 插入物中之後 24 小時使用 MAB1 AAV2 構建體轉導 hCMEC/D3 單層。如先前所述，在轉導之後 3 天收集來自頂端和基底外側兩處的上清液，並使用間接 ELISA 通過與人 FL TDP-43 的結合來確定頂端和基底外側區室中的抗體濃度。該初步評估表明了抗體向頂端和基底

外側的相對均勻的分泌，以及因此的載體化的 MAB1 抗體的非極化分泌，如圖 16 所示。

實施例 6. 小鼠和人腦微脈管系統內皮細胞系的抗體分泌

【0169】 永生化的 hCMEC/D3、b.End3 和 b.End5 細胞系用於評價腦內皮細胞是否能夠產生高品質抗體。評價了不同 AAV 載體（例如 AAV2、AAV-BR1 和 AAVrh10）將 MAB1 抗體轉基因遞送到人和小鼠細胞系中的能力。所有抗體（例如 hIgG1 和 scFv-Fc）的表達均由 CMV 啟動子驅動；在編碼 hIgG1 的 LC 和 HC 的基因之間使用 IRES 元件以實現雙順反子抗體的產生。將細胞以 100'000 個細胞/cm² 平板接種到 96 孔培養板中。然後在生長培養基中以 100'000 的 MOI 平板接種之後 4 小時至 16 小時轉導內皮細胞系。將細胞在 37°C、5%CO₂ 下孵育過夜，第二天更換培養基以去除 AAV 顆粒。轉導之後 7 天收集細胞培養上清液，並使用 hFc 試劑盒（PerkinElmer，Cisbio，62HFCPEH）根據製造商的說明通過均相時間分辨螢光（Homogeneous time resolved fluorescence, HTRF）確定所分泌的抗體效價。這種定量方法允許檢測所分泌的和正確折疊的抗體。經純化的重組 MAB1 hIgG1 用作培養基中抗體定量的標準品。使用 Tecan Spark®微板讀取器讀取螢光信號（Em：317 nm；Ex：620 nm 和 665 nm；75 次閃光；400 μ s 積分時間；100 μ s 滯後時間）。內插的所分泌抗體效價在圖 17 中描繪。由 AAV2 遞送的 MAB1 hIgG1 在(A)b.End3 和 b.End5 小鼠內皮瘤細胞系上清液中以 20 ng/mL 以及在(B)hCMEC/D3 細胞上清液中以 200 ng/mL 定量。對於 b.End3/b.End5 和 hCMEC/D3，MAB1 scFv-Fc 構建體在上清液中產生，並且分別以 50/100 ng/mL 和 2500 ng/mL 定量。在所有三種細胞系中，在 AAVrh10 和 AAV-BR1 血清型的情況下獲得的 MAB1 hIgG1 少於 10 ng/mL。所獲得的抗體水準顯示，腦內皮細胞產生正確折疊的抗體，與所用的 AAV 衣殼或抗體的形式無關。表達效價取決於所評價的條件，並且與兩種小鼠細胞系相比，對於人 hCMEC/D3 細胞系觀察到更高的效價（圖 17A 和 B）。此外，對於 MAB1 scFv-Fc，與整個 MAB1 IgG1 對應物相比，當每個都由 AAV2 遞送時，總是觀察到更高的抗體效價。在該實驗中，與 AAV-BR1 相比，AAV2 在遞送轉基因方面更強效。

實施例 7. 3D 人 BBB 模型中人原代腦微脈管系統內皮細胞的抗體分泌

【0170】 使用可商購的基於 Transwell 的模型評價 BBB 細胞的抗體產生，該模型由人原代腦內皮微脈管系統細胞、星形膠質細胞和周細胞構成，購自 Neuromics (3D45002)。按照製造商的說明培養該模型。簡言之，將 24 孔板在第 0 天時解凍，並將冷凍培養基替換為溫熱的生長培養基（培養基 1）。在濕潤的培養箱中孵育 3 小時之後，去除培養基 1 並用第二維持培養基（培養基 2）代替。沒有進行進一步的培養基更換，將細胞保持在培養基中直到解凍之後第 11 天。評價 AAV2 和 AAV-BR1 載體以遞送 MAB1 抗體轉基因的人形式（hIgG1）和小鼠形式（mIgG2a）。抗體的表達由 CMV 或 CBh 啟動子驅動；在 LC 和 HC 之間使用 IRES 元件來實現雙順反子抗體的產生。如先前針對 AAV 構建體所述的，在解凍之後第 4 天以 100'000 的 MOI 在生長培養基中轉導存在於細胞培養插入物中的內皮細胞。轉導之後的 7 天之後收集來自頂端和基底外側區室兩處的上清液，並使用人 Fc 和小鼠 Fc 試劑盒（PerkinElmer Cisbio，62HFCPEH 和 6FMIGPEH）按照製造商的說明通過 HTRF 確定所分泌的抗體效價。作為 hIgG1 或 mIgG2a 形式的經純化的重組 MAB 相應地用作抗體定量的標準品，並在用於維持模型的相同培養基中滴定。使用 Tecan Spark®微板讀取器讀取螢光信號（Em：317 nm；Ex：620 nm 和 665 nm；75 次閃光；400 μ s 積分時間；100 μ s 滯後時間）。內插的分泌抗體效價在圖 18 中描繪。對於 AAV2 和 AAV-BR1 血清型獲得了類似的 MAB1 hIgG1 效價，其在頂端區室（細胞培養插入物）中為約 50 ng/mL，在基底外側為 10 至 20 ng/mL。與 hIgG1 對應物相比，在 CMV 或 CBh 啟動子下表達的 MAB1 mIgG2a 同種型的 AAV-BR1 遞送展示出 2 至 3 倍低的效價。當與來自原代人腦微脈管系統內皮細胞的資料相比時（圖 18A 和 B），在 hCMEC/D3 細胞系中在 AAV-BR1 情況下觀察到向性（tropism）差異（圖 17A，無可檢測的 MAB1 hIgG1 表達）。雖然體外細胞係數據可預測體內效應，但原代細胞資料是體內 AAV 向性的優選預測因數。圖 18B 描繪了在每個 AAV 載體的頂端（200 μ L）和基底外側（500 μ L）區室中確定的抗體的相對數量。抗體重新分配表明來自內皮細胞層的雙側分泌抗體。

【0171】 總之，所獲得的抗體效價顯示，原代腦內皮細胞產生正確折疊的抗體，與所使用的 AAV 衣殼無關，也與抗體的形式無關。作為重要的注意事項，

在頂端和基底外側兩處都檢測到抗體，後者的觀察結果模擬了腦實質。所產生的資料驗證了本文中所述的創新方法，並證實了用這種新的遞送策略實現了高品質的 IgG 效價。

【0172】 在本說明書的描述和請求項書通篇，詞語"包括"和"包含"及其變化形式意指"包括但不限於"，並且它們不旨在（並且不）排除其他部分、添加物、元件、整數或步驟。

【0173】 在本說明書的描述和請求項書通篇，除非上下文另有要求，否則單數形式涵蓋複數形式。特別地，在使用沒有數量詞修飾的名詞的情況下，除非上下文另有要求，否則本說明書應理解為涵蓋一個/種或更多個/種。

【0174】 除非另有定義，否則本文中使用的所有技術和科學術語均具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常理解的相同含義。出於與本發明有關的所有目的，本文中具體提及的所有出版物和專利均通過引用整體併入。

【0175】 本發明的範圍不限於本文中描述的一些具體實施方案。實際上，通過前面的描述和圖式，除了本文中所述的那些之外的本發明的多種修改對於本領域技術人員來說將變得明顯。這樣的修改旨在落入所附請求項書的範圍內。此外，本文中描述的本發明的所有方面和實施方案被認為是廣泛適用的並且可與任何和所有其他一致的實施方案組合，包括適當地從本發明的其他方面獲得的那些（包括單獨的（in isolation））。

【符號說明】

【0176】

無

申請專利範圍

【請求項1】 包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統（CNS）的疾病或病症的方法，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障（BBB）之細胞並且經轉導或經轉染的 BBB 細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項2】 如請求項 1 所述應用的載體，其中所述抗體或抗體片段被遞送到腦實質中，任選地其中所述抗體或抗體片段被分泌到腦實質中。

【請求項3】 如請求項 1 或請求項 2 所述應用的載體，其中所述載體轉導或轉染 BBB 之內皮細胞。

【請求項4】 如請求項 1 至 3 中任一項所述應用的載體，其中所述載體轉導或轉染 BBB 之周細胞或星形膠質細胞。

【請求項5】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體包括野生型病毒載體或經改造的病毒載體。

【請求項6】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體包括親神經載體。

【請求項7】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體在所述載體表面上表達將所述載體靶向至 BBB 之細胞的肽、小分子、抗體或其抗體片段、蛋白質、納米顆粒、脂質、寡核苷酸、適配體或陽離子分子。

【請求項8】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體包含所述載體表面上的將所述載體靶向至 BBB 之細胞的修飾。

【請求項9】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體包含有機納米材料、無機納米材料，所述有機納米材料例如脂質體、外排體、樹枝狀聚合物、膠束，所述無機納米材料例如金納米顆粒、二氧化矽納米顆粒或碳納米管。

【請求項10】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體選自：腺相關病毒（AAV）、腺病毒、逆轉錄病毒、鼻病毒、慢病毒、單純疱疹

病毒（HSV）或任何病毒樣顆粒。

【請求項11】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體是選自以下的 AAV：AAV 血清型 1（AAV1）、AAV 血清型 2（AAV2）、AAV 血清型 8（AAV8）、AAV 血清型 9（AAV9）和 AAV 血清型 10（AAV10）。

【請求項12】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體是經改造的 AAV 載體，其中任選地

（i）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV2 載體，優選 AAV-BR1；或者

（ii）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV9 載體，例如 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB、AAV9-PHP-V1；或者

（iii）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV1 載體，例如 AAV1RX、AAV1R6 或 AAV1R7，或者

（iv）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV10 載體。

【請求項13】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體是 AAV-BR1 或 AAV9-PHP-V1。

【請求項14】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述 CNS 的疾病或病症選自：澱粉樣蛋白 β 蛋白相關疾病、TDP-43-蛋白質病、 α -突觸核蛋白病、Tau 蛋白病、包括多聚穀氨醯胺疾病例如亨廷頓病的三核苷酸重複疾病、腦相關癌症和腫瘤、癲癇、精神疾病、神經炎性疾病、神經肌肉疾病、病毒誘發的腦炎和以小膠質細胞功能障礙為特徵的疾病。

【請求項15】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述 CNS 的疾病或病症選自：額顳癡呆（FTD）、肌萎縮側索硬化（ALS）、阿茲海默症（AD）、帕金森病（PD）、慢性創傷性腦病（CTE）、邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病（LATE）和多發性硬化。

【請求項16】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述抗體或抗體片段選自：抗 ErbB2、抗 TDP-43（NI-205）、抗 A β （例如巴品珠單抗、

索拉珠單抗、lecanemab、阿杜卡尼單抗、多奈單抗、更汀蘆單抗或克瑞組單抗)、抗 ApoE4 (載脂蛋白 E4) 和抗 DDX3X (ATP 依賴性 RNA 解旋酶)、抗 Tau (替拉奈單抗、gosuranemab、澤格特奈單抗、西瑞奈單抗、bepranemab、BIIB076、JNJ-63733657、Lu AF87908、PNT001、E-2814)、抗 LINGO-1 (例如奧匹努單抗)、抗 α -突觸核蛋白 (辛帕奈單抗、prasinezumab、MEDI-1341、Lu AF82422、BAN0805)、抗 ASC (IC-100)、抗 NLRP3、抗 C5 (ravulizumab、依庫珠單抗)、抗 C1q (ANX-005)、抗 C3、抗亨廷頓蛋白 (C-617、NI-302)、抗朊病毒、抗 CD20 (例如奧法木單抗、奧美珠單抗、利妥昔單抗、BCD-132、烏妥昔單抗、BAT-4406F、AL-014)、抗 PD-1 (IBC-Ab002) 或抗 VEGF-A (貝伐單抗、雷珠單抗、布洛賽珠單抗、faricimab、伐努賽珠單抗) 的抗體或抗體片段。

【請求項17】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述載體腸胃外施用於所述物件。

【請求項18】 如請求項 17 所述應用的載體，其中所述載體通過靜脈內注射或靜脈內輸注施用於所述對象。

【請求項19】 根據前述請求項中任一項所述應用的載體，其中所述多核苷酸包含選自以下的至少一個啟動子：巨細胞病毒 (CMV) 啟動子；EF1A (人真核翻譯延伸因數 1 α 1)；CAG (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；CBh (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；SV40 (猿猴病毒 40 增強子/早期啟動子)；GFAP (人膠質原纖維酸性蛋白啟動子)；ATP1A2_1 (Na、K ATP 酶 α 2)；CLDN_5 (密封蛋白 5)；ADRB2_1 (腎上腺素受體 β 2)；TNFRSF6B_1 (TNF 受體超家族成員 6b)；PDYN_1 (強啡肽原)；GH1_1 (人生長激素)；OPALIN_1 (Opalin)；SYN1_1 (突觸蛋白 1)；CAMK2A_1 (鈣/鈣調蛋白依賴性蛋白激酶 II α)；NEFH_1 (神經絲重多肽)；NEUROD6_1 (神經元分化因數 6)；或 OLIG2_1 (少突膠質細胞轉錄因數 2)；與 GFAP、ATP1A2_1、CLDN_5、ADRB2_1、TNFRSF6B_1、PDYN_1、GH1_1、OPALIN_1、SYN1_1、CAMK2A_1、NEFH_1、NEUROD6_1 或 OLIG2_1 啟動子融合的 CMV 早期增強子；所述至少一個啟動子優選巨細胞病毒 (CMV) 啟動子或 CBh 啟動子，並且其中所述至少一個啟動子與編碼抗體或抗體片段的序列

可操作地連接。

【請求項20】 如請求項 19 所述應用的載體，其中所述至少一個啟動子選自：ATP1A2_1 (Na、K ATP 酶 $\alpha 2$)、CLDN_5 (密封蛋白 5)、ADRB2_1 (腎上腺素受體 $\beta 2$) 和 TNFRSF6B_1 (TNF 受體超家族成員 6b)，任選地其中所述至少一個啟動子與增強子可操作地連接，所述增強子例如 CMV 早期增強子。

【請求項21】 用於將抗體或抗體片段遞送至物件中的 BBB 的方法，所述方法包括向所述物件施用包含編碼所述抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中所述方法導致轉導或轉染 BBB 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段。

【請求項22】 用於將抗體或抗體片段遞送至物件中的 CNS 的方法，所述方法包括向所述物件施用包含編碼所述抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中所述方法導致轉導或轉染 BBB 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項23】 用於在物件中治療 CNS 的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述物件施用包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體，其中所述方法導致轉導或轉染 BBB 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項24】 包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體用於製造用於在物件中治療 CNS 的疾病或病症的藥物的用途，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障 (BBB) 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項25】 包含編碼抗體或抗體片段的多核苷酸的載體用於將編碼所述抗體或抗體片段的多核苷酸遞送至物件的 BBB 的用途，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障 (BBB) 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項26】 如請求項 21 至 25 中任一項所述的方法或用途，其還如請求項 2 至 20 中任一項所述的特徵來限定。

【請求項27】 包含表達盒的載體，所述表達盒從 5'到 3'包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統(CNS)的疾病或病症的方法，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障(BBB)之細胞或 CNS 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項28】 包含表達盒的載體，所述表達盒從 5'到 3'包含：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子，所述抗體或抗體片段用於在物件中治療中樞神經系統(CNS)的疾病或病症的方法，其中所述載體轉導或轉染血腦屏障(BBB)之細胞或 CNS 之細胞並且經轉導或經轉染的細胞表達所述抗體或抗體片段，導致將所述抗體或抗體片段遞送到 CNS 中。

【請求項29】 如請求項 27 或請求項 28 所述應用的載體，其中所述抗體或抗體片段被遞送到腦實質中，任選地其中所述抗體或抗體片段被分泌到腦實質中。

【請求項30】 如請求項 27 至 29 中任一項所述應用的載體，其中所述載體轉導或轉染 CNS 之細胞並且所述細胞選自：腦內皮細胞、神經元、周細胞、星形膠質細胞、少突膠質細胞、小膠質細胞和室管膜細胞。

【請求項31】 如請求項 27 至 30 中任一項所述應用的載體，其中所述載體轉導或轉染 BBB 之內皮細胞。

【請求項32】 如請求項 27 至 31 中任一項所述應用的載體，其中所述載體轉導或轉染 BBB 之周細胞或星形膠質細胞。

【請求項33】 如請求項 27 至 32 中任一項所述應用的載體，其中所述抗體或抗體片段被分泌到 CNS 中，優選被分泌到腦實質中。

【請求項34】 如請求項 27 至 33 中任一項所述應用的載體，其中所述載體包含所述載體表面上的將所述載體靶向至 BBB 之細胞的修飾。

【請求項35】 如請求項 27 至 34 中任一項所述應用的載體，其中所述載

體在所述載體表面上表達將所述載體靶向至 BBB 之細胞或 CNS 之細胞的肽、小分子、抗體或其抗體片段、蛋白質、納米顆粒、脂質、寡核苷酸、適配體或陽離子分子。

【請求項36】 如請求項 27 至 35 中任一項所述應用的載體，其中所述載體包括親神經載體。

【請求項37】 如請求項 27 至 36 中任一項所述應用的載體，其中所述載體包含有機納米材料或無機納米材料，所述有機納米材料例如脂質體、外排體、樹枝狀聚合物和膠束，所述無機納米材料例如金納米顆粒、二氧化矽納米顆粒和碳納米管。

【請求項38】 如請求項 27 至 37 中任一項所述應用的載體，其中所述載體包括野生型病毒載體或經改造的病毒載體。

【請求項39】 如請求項 27 至 38 中任一項所述應用的載體，其中所述載體選自：腺相關病毒（AAV）、腺病毒、逆轉錄病毒、鼻病毒、慢病毒、單純疱疹病毒（HSV）或病毒樣顆粒。

【請求項40】 如請求項 27 至 39 中任一項所述應用的載體，其中所述載體是選自以下的 AAV：AAV 血清型 1（AAV1）、AAV 血清型 2（AAV2）、AAV 血清型 8（AAV8）、AAV 血清型 9（AAV9）和 AAV 血清型 10（AAV10）。

【請求項41】 如請求項 27 至 40 中任一項所述應用的載體，其中所述載體是經改造的 AAV 載體，其中任選地

（i）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV2 載體，優選 AAV-BR1；或者

（ii）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV9 載體，例如 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB、AAV9-PHP-V1；或者

（iii）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV1 載體，例如 AAV1RX、AAV1R6 或 AAV1R7，或者

（iv）所述經改造的 AAV 載體是經改造的 AAV10 載體。

【請求項42】 如請求項 27 至 41 中任一項所述應用的載體，其中所述 CNS 的疾病或病症選自澱粉樣蛋白 β 蛋白相關疾病、TDP-43-蛋白質病、 α -突觸核蛋白病、Tau 蛋白病、包括多聚穀氨醯胺疾病例如亨廷頓病的三核苷酸重複疾病、腦相關癌症和腫瘤、癲癇、精神疾病、神經炎性疾病、神經肌肉疾病、病毒誘發的腦炎和以小膠質細胞功能障礙為特徵的疾病。

【請求項43】 如請求項 27 至 42 中任一項所述應用的載體，其中所述 CNS 的疾病或病症選自：額顳癡呆(FTD)、肌萎縮側索硬化(ALS)、阿茲海默症(AD)、帕金森病(PD)、慢性創傷性腦病(CTE)、邊緣主導年齡相關性 TDP-43 腦病(LATE)和多發性硬化。

【請求項44】 如請求項 27 至 43 中任一項所述應用的載體，其中所述抗體或抗體片段選自：抗 ErbB2、抗 TDP-43 (NI-205)、抗 $A\beta$ (例如巴品珠單抗、索拉珠單抗、lecanemab、阿杜卡尼單抗、多奈單抗、更汀蘆單抗或克瑞組單抗)、抗 ApoE4 (載脂蛋白 E4) 和抗 DDX3X (ATP 依賴性 RNA 解旋酶)、抗 Tau (替拉奈單抗、gosuranemab、澤格特奈單抗、西瑞奈單抗、bepranemab、BIIB076、JNJ-63733657、Lu AF87908、PNT001、E-2814)、抗 LINGO-1 (例如奧匹努單抗)、抗 α -突觸核蛋白 (辛帕奈單抗、prasinezumab、MEDI-1341、Lu AF82422、BAN0805)、抗 ASC (IC-100)、抗 NLRP3、抗 C5 (ravulizumab、依庫珠單抗)、抗 C1q (ANX-005)、抗 C3、抗亨廷頓蛋白 (C-617、NI-302)、抗朧病毒、抗 CD20 (例如奧法木單抗、奧美珠單抗、利妥昔單抗、BCD-132、烏妥昔單抗、BAT-4406F、AL-014)、抗 PD-1 (IBC-Ab002) 或抗 VEGF-A (貝伐單抗、雷珠單抗、布洛賽珠單抗、faricimab、伐努賽珠單抗)。

【請求項45】 如請求項 27 至 44 中任一項所述應用的載體，其中所述載體腸胃外施用於所述物件。

【請求項46】 如請求項 45 所述應用的載體，其中所述載體通過靜脈內注射或靜脈內輸注施用於所述對象。

【請求項47】 如請求項 27 至 46 所述應用的載體，其中所述表達盒還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並且在編碼所述抗體或抗

體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點 (IRES) 或弗林蛋白酶 2A 切割位點。

【請求項48】 如請求項 47 所述應用的載體，其中所述 IRES 來源於腦心肌炎病毒，並且任選地包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 8。

【請求項49】 如請求項 27 至 48 中任一項所述應用的載體，其中編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因還包含分泌肽，和/或編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因還包含分泌肽。

【請求項50】 如請求項 27 至 49 中任一項所述應用的載體，其中所述至少一個啟動子和/或所述第一啟動子和/或所述第二啟動子選自：巨細胞病毒 (CMV) 啟動子；EF1A (人真核翻譯延伸因數 1 α 1)；CAG (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；CBh (與經修飾的雞 β -肌動蛋白啟動子融合的 CMV 早期增強子)；SV40 (猿猴病毒 40 增強子/早期啟動子)；GFAP (人膠質原纖維酸性蛋白啟動子)；ATP1A2_1 (Na、K ATP 酶 α 2)；CLDN_5 (密封蛋白 5)；ADRB2_1 (腎上腺素受體 β 2)；TNFRSF6B_1 (TNF 受體超家族成員 6b)；PDYN_1 (強啡肽原)；GH1_1 (人生長激素)；OPALIN_1 (Opalin)；SYN1_1 (突觸蛋白 1)；CAMK2A_1 (鈣/鈣調蛋白依賴性蛋白激酶 II α)；NEFH_1 (神經絲重多肽)；NEUROD6_1 (神經元分化因數 6)；或 OLIG2_1 (少突膠質細胞轉錄因數 2)；CBh；與 GFAP、ATP1A2_1、CLDN_5、ADRB2_1、TNFRSF6B_1、PDYN_1、GH1_1、OPALIN_1、SYN1_1、CAMK2A_1、NEFH_1、NEUROD6_1 或 OLIG2_1 啟動子融合的 CMV 早期增強子；所述至少一個啟動子優選巨細胞病毒 (CMV) 啟動子或 CBh 啟動子，並且其中所述至少一個啟動子與編碼抗體或抗體片段的序列可操作地連接。

【請求項51】 如請求項 50 所述應用的載體，其中所述至少一個啟動子和/或所述第一啟動子和/或所述第二啟動子選自：ATP1A2_1 (Na、K ATP 酶 α 2)、CLDN_5 (密封蛋白 5)、ADRB2_1 (腎上腺素受體 β 2) 和 TNFRSF6B_1 (TNF 受體超家族成員 6b)，任選地其中所述至少一個啟動子和/或所述第一啟動子和/或所述第二啟動子與增強子可操作地連接，所述增強子例如 CMV 早期增強子。

【請求項52】 如請求項 27 至 51 中任一項所述應用的載體，其中所述表達盒包含選自以下的序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10，或者與其具有至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%的同一性的序列。

【請求項53】 降低抗體或抗體片段聚集、改善抗體或抗體片段成熟和/或品質的方法，其中所述方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中所述表達盒還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）；或者用從 5'到 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【請求項54】 提高抗體或抗體片段效價的方法，其中所述方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中所述表達盒還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點（IRES）或自切割位點（例如弗林蛋白酶-2A 切割位點）；或者用從 5'到 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【請求項55】 降低不希望的抗體或抗體片段免疫原性和/或者與抗體或抗體片段治療相關的不良作用的方法，其中所述方法包括：

(i) 用從 5'至 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且其中所述表達盒還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的內部核糖體進入位點 (IRES)；或者用從 5'到 3'包含以下的表達盒轉化細胞：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子；以及

(ii) 在適合於抗體或抗體片段產生的條件下維持經轉化的細胞。

【請求項56】 如請求項 53 至 55 中任一項所述的方法，其中所述抗體或抗體片段不含自切割元件。

【請求項57】 如請求項 53 至 56 中任一項所述的方法，其中所述表達盒包含在載體中，並且所述方法還如請求項 29 至 52 中任一項所述的特徵來限定。

【請求項58】 抗體或抗體片段，其通過如請求項 53 至 57 中任一項所述的方法來獲得。

【請求項59】 病毒載體，其包含經改造的 AAV2 載體，優選 AAV-BR1；或者經改造的 AAV9 載體，例如 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB 或 AAV9-PHP-V1；或者經改造的 AAV1 載體，例如 AAV1RX、AAV1R6、AAV1R7；或者經改造的 AAV10 載體；並且其中經改造的病毒載體包含從 5'到 3'包含以下的表達盒：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因和編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的至少一個啟動子，並且還包含在編碼所述抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因之後並在編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因之前的 IRES。

【請求項60】 病毒載體，其包含經改造的 AAV2 載體，優選 AAV-BR1；或者經改造的 AAV9 載體，例如 AAV-S、AAV-F、AAV-PHP.eB 或 AAV9-PHP-V1；或者經改造的 AAV1 載體，例如 AAV1RX、AAV1R6 或 AAV1R7；或者經改造的 AAV10 載體；並且其中經改造的病毒載體包含從 5'到 3'包含以下的表達盒：與編碼抗體或抗體片段的輕鏈的第一基因可操作地連接的第一啟動子和與

編碼所述抗體或抗體片段的重鏈的第二基因可操作地連接的第二啟動子。

【請求項61】 如請求項 59 或 60 所述的經改造的病毒載體，其中所述經改造的病毒載體是 AAV-BR1 或 AAV9-PHP-V1。

【請求項62】 如請求項 59 至 61 中任一項所述的病毒載體，其還如請求項 29 至 52 中任一項來限定。

圖 式

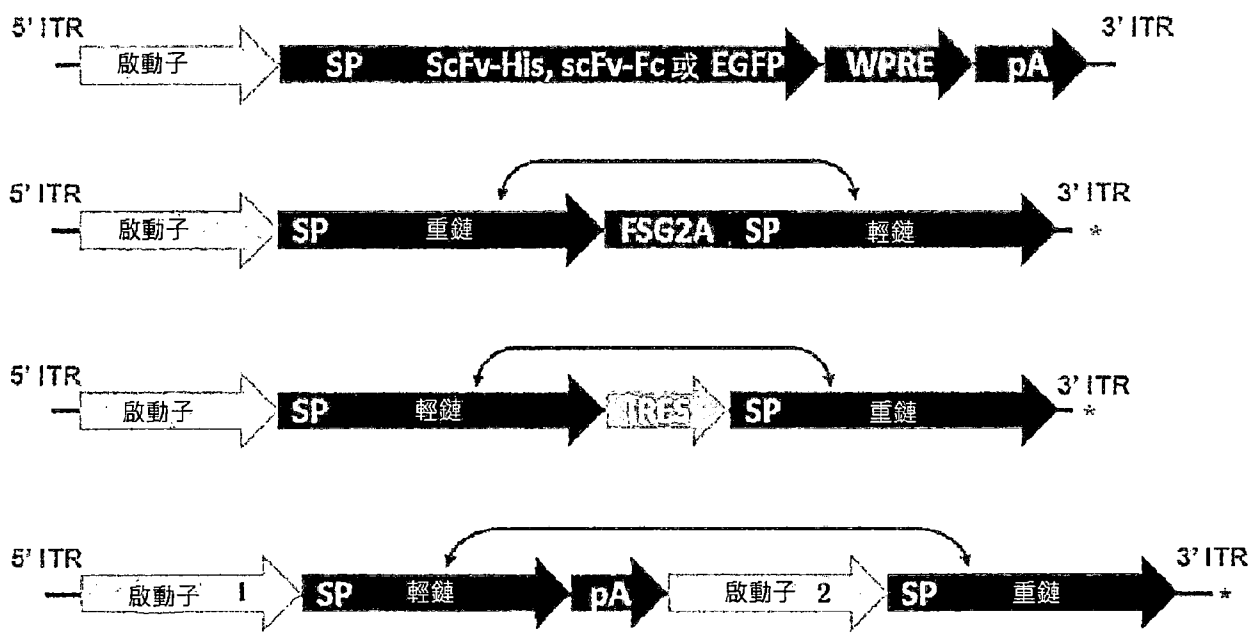


圖1

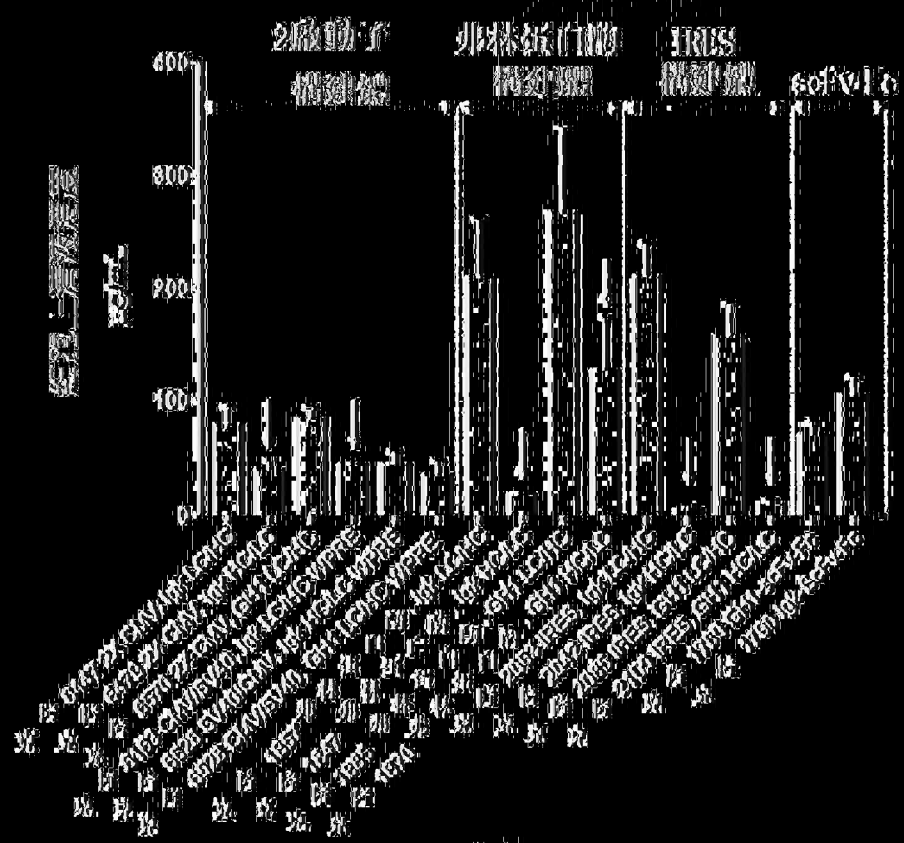


Figure 2A

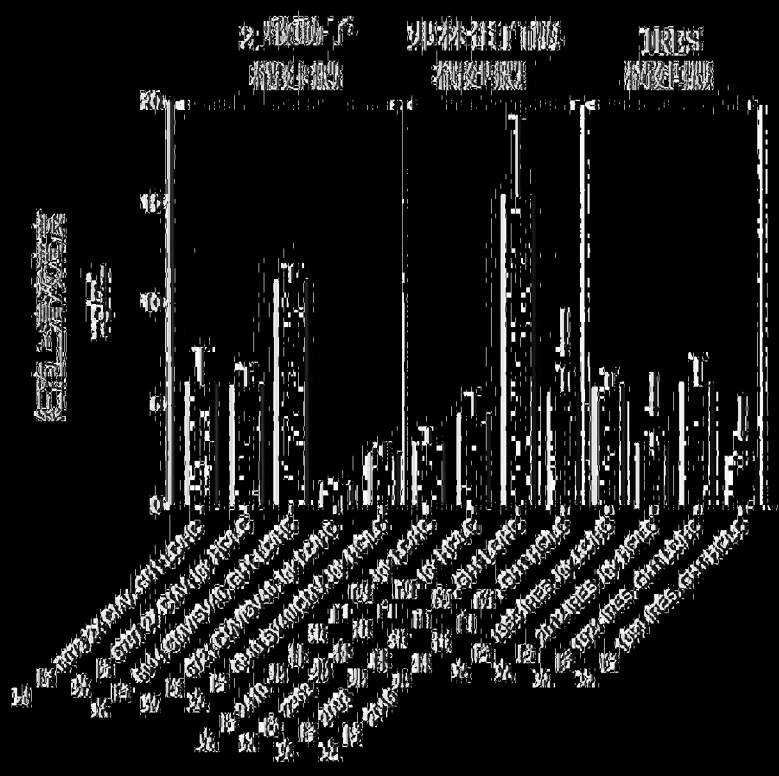
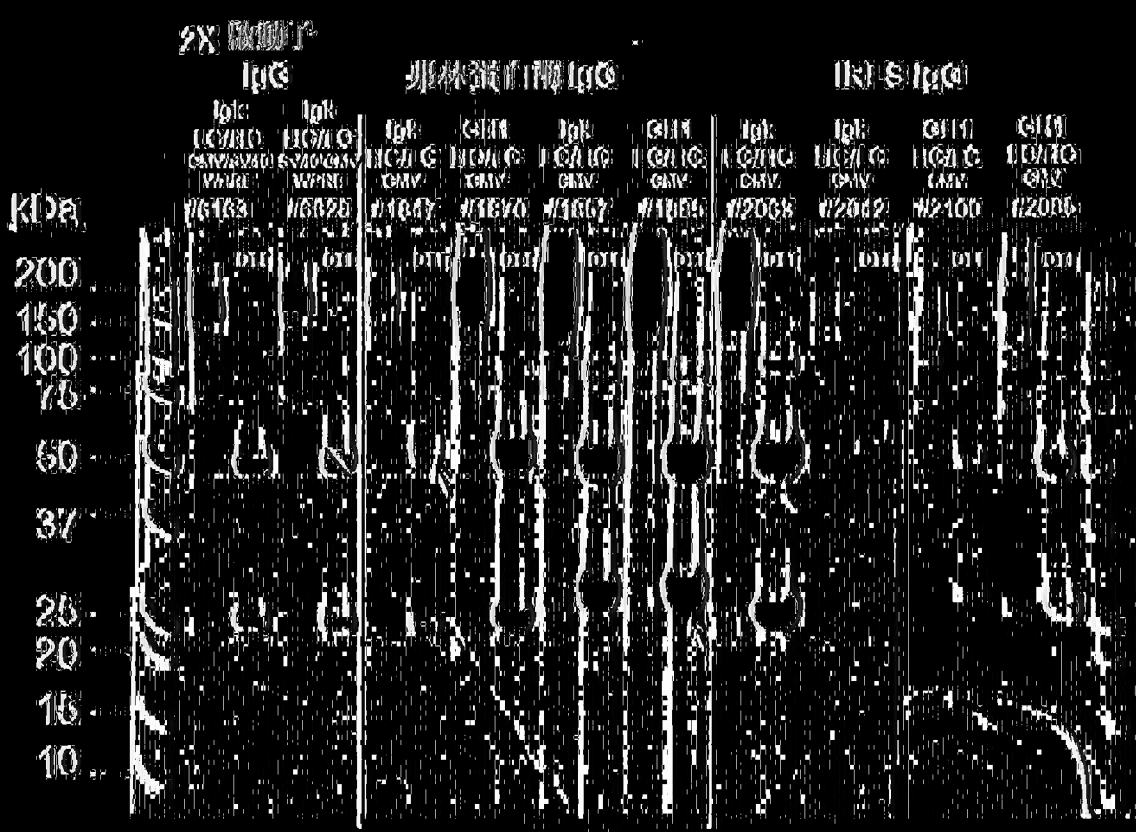


Figure 2B

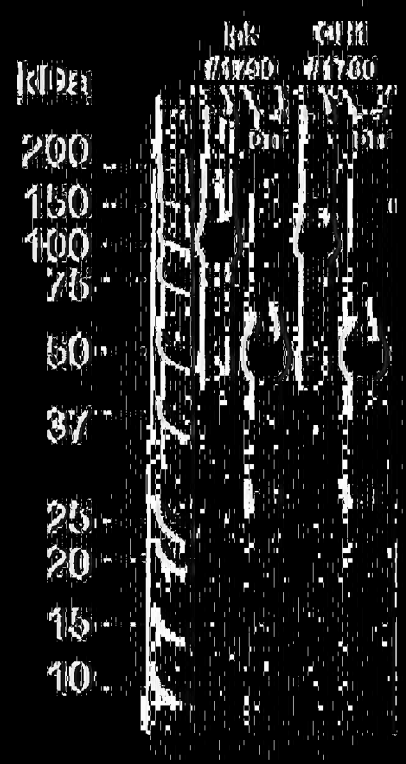
SDS-PAGE 12-4%



M3

ECFV-1a

SDS-PAGE 12-4%



M4

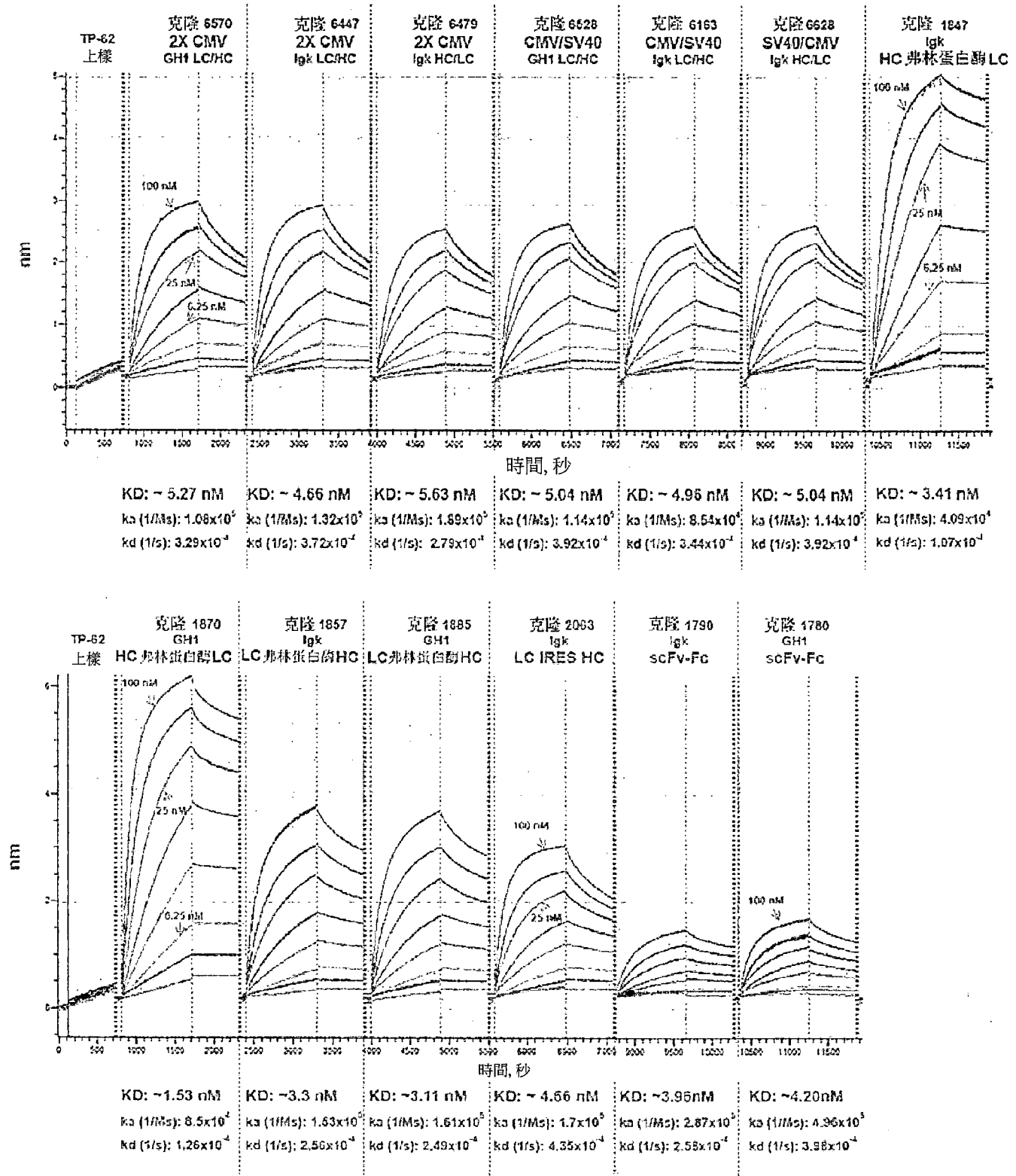


圖5

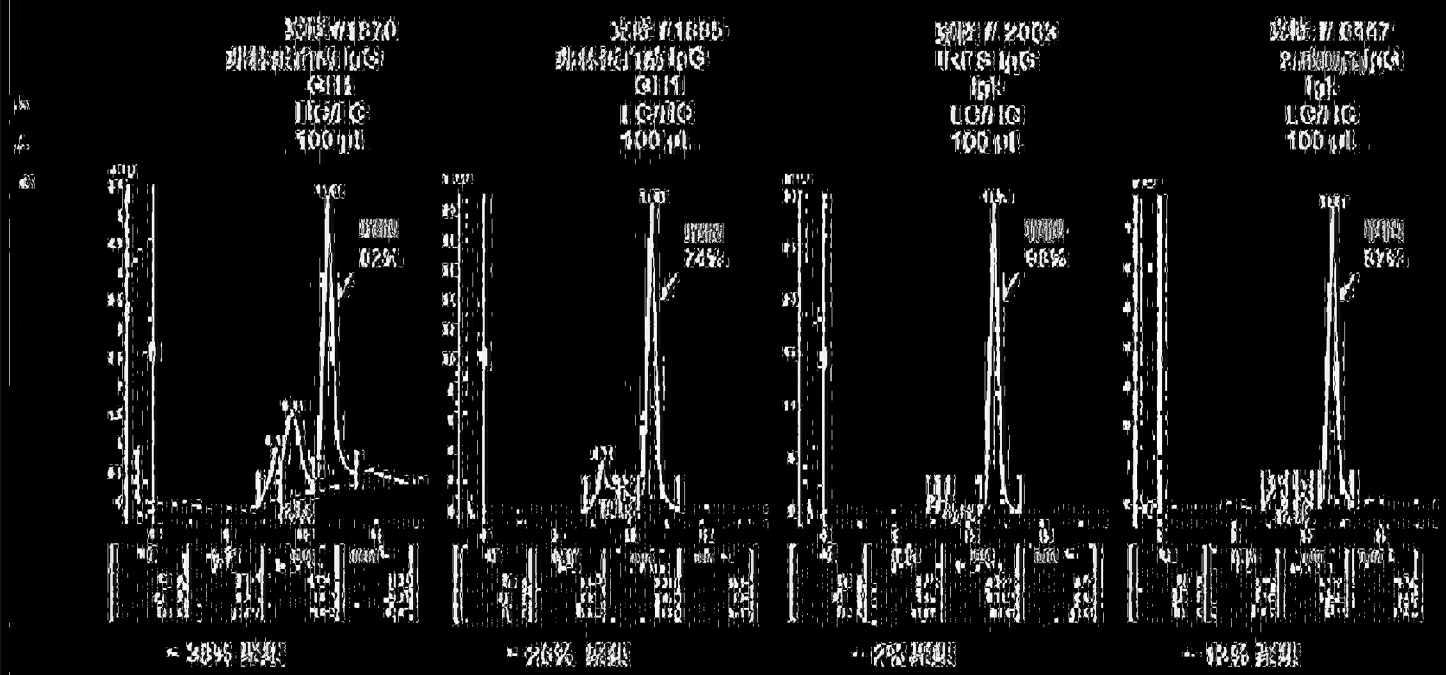


图16

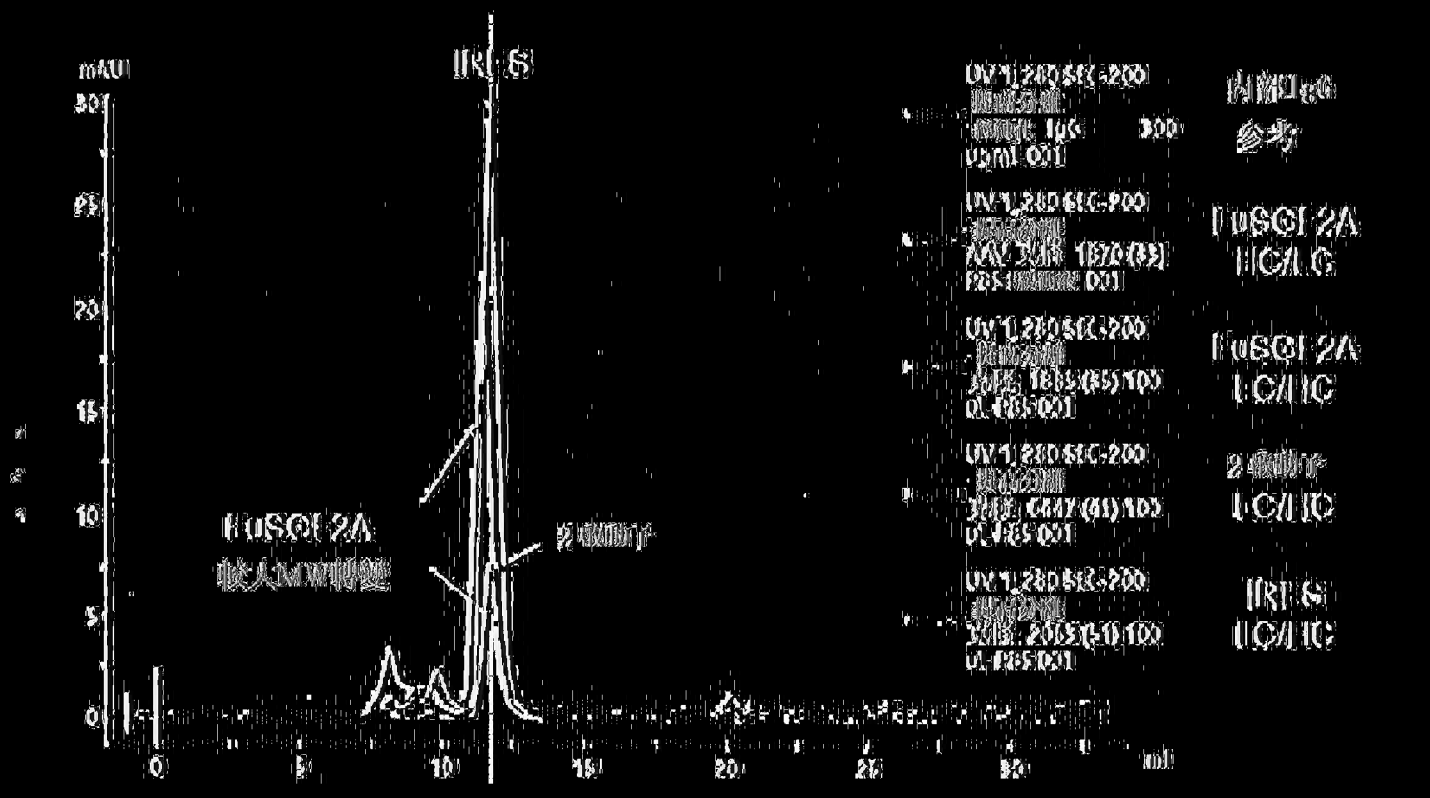


图17

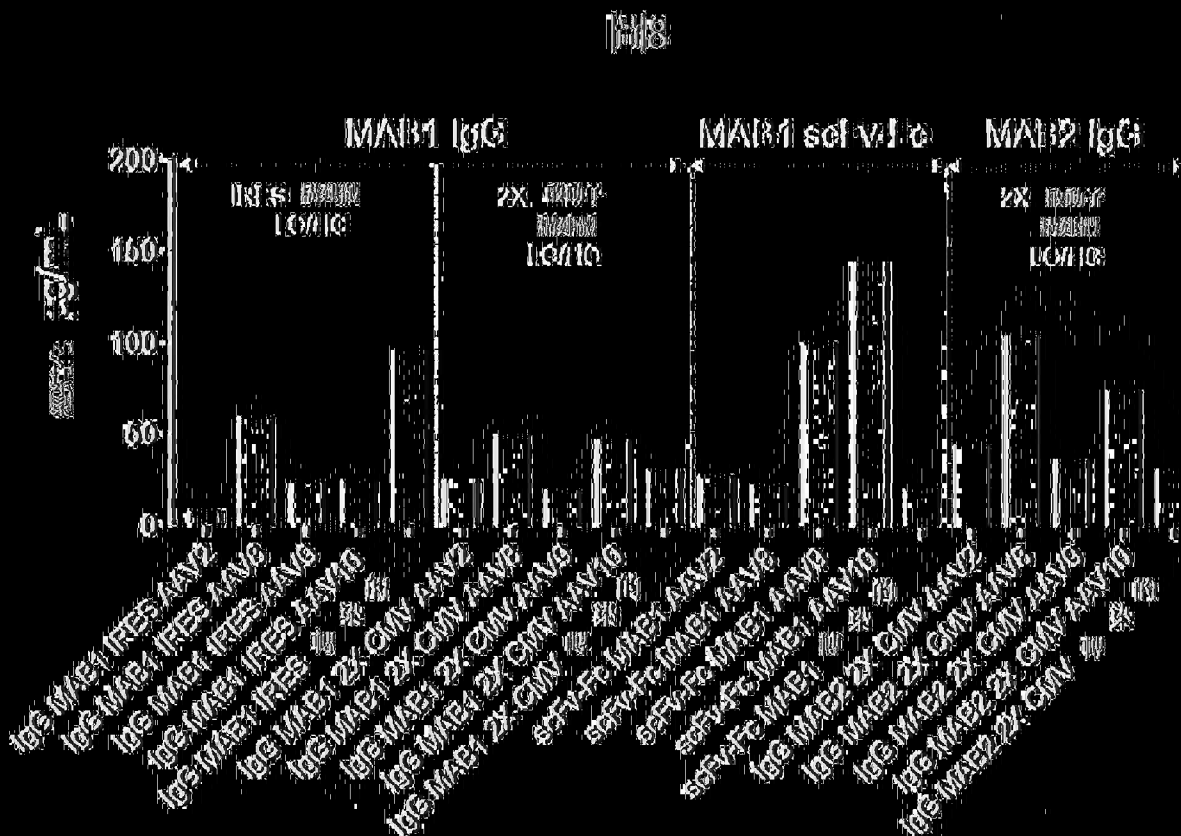
1. 2018 15G MAB21C-01-2018-11G

SCIENCE

SFO ID NO. 12 **INVESTIGATIVE DIVISION** **RECEIVED** **APR 10 1968** **FBI - SFO**

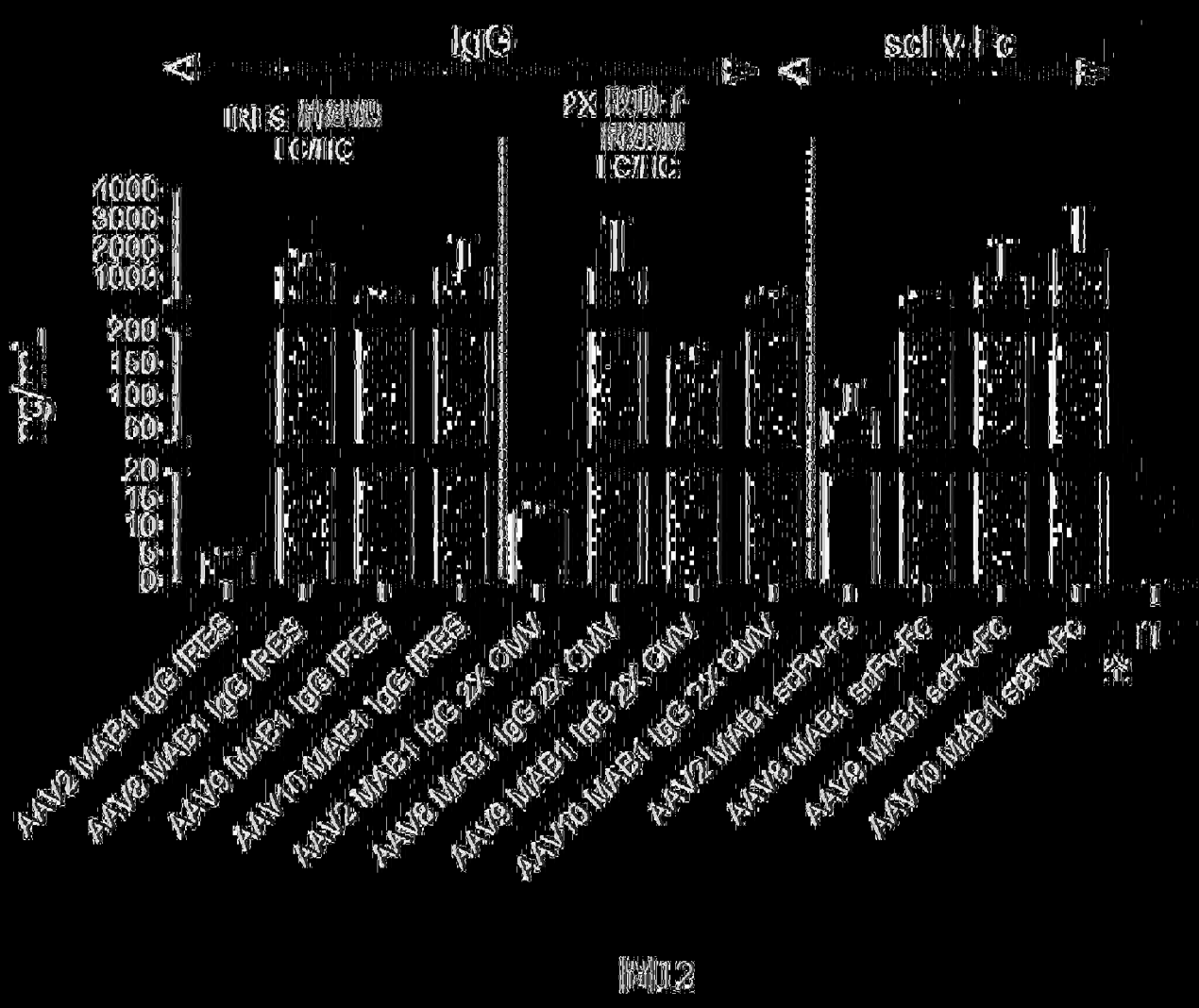
2. Anti IgG MAR2 HC: 250 μg/ml + IgG

STANDARD: 180005-20
STANDARD: 180005-20

[illegible]



HEXAMETHYLENE DIAMINE, 第7天
MAB1A.MAB1.DSA



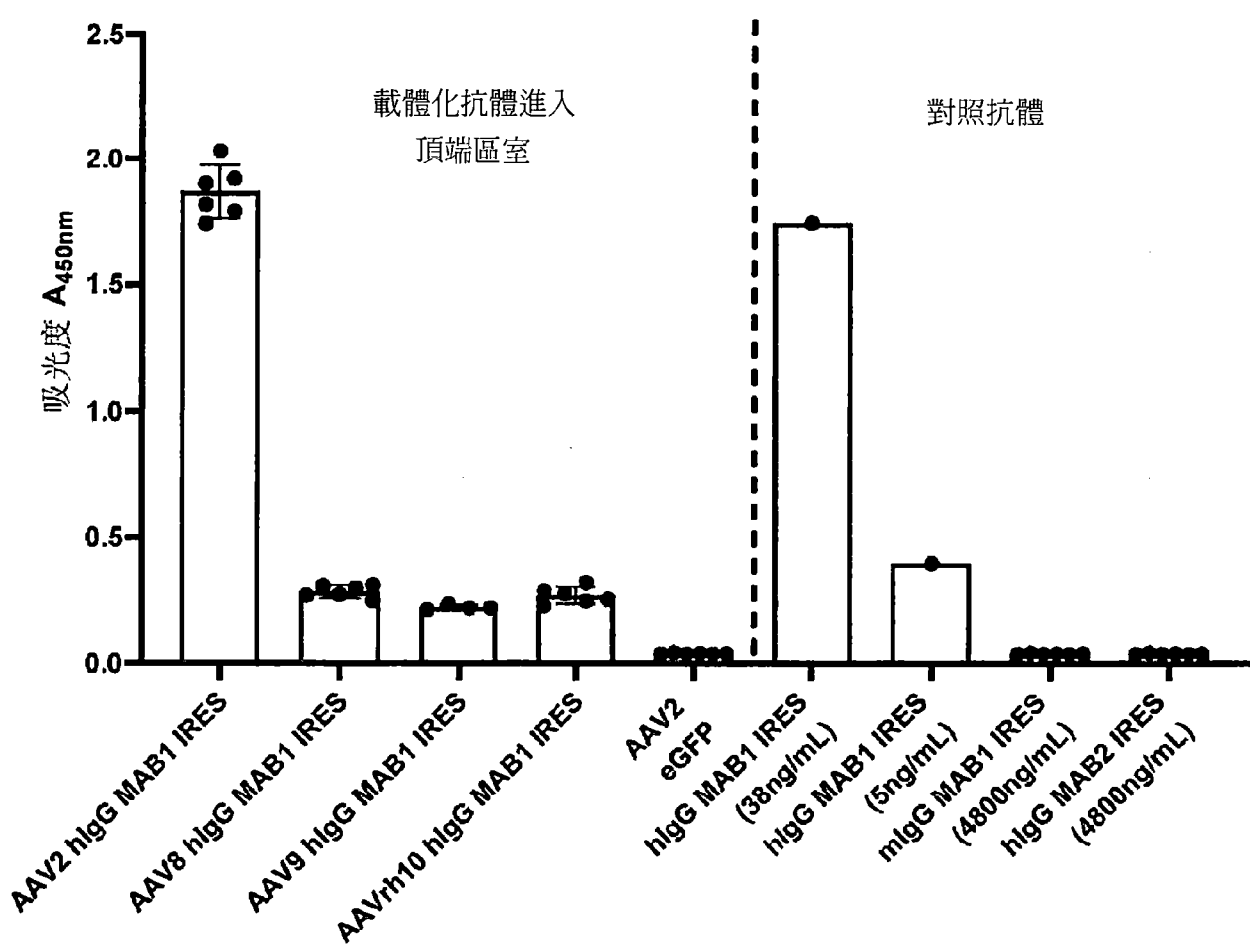


圖13

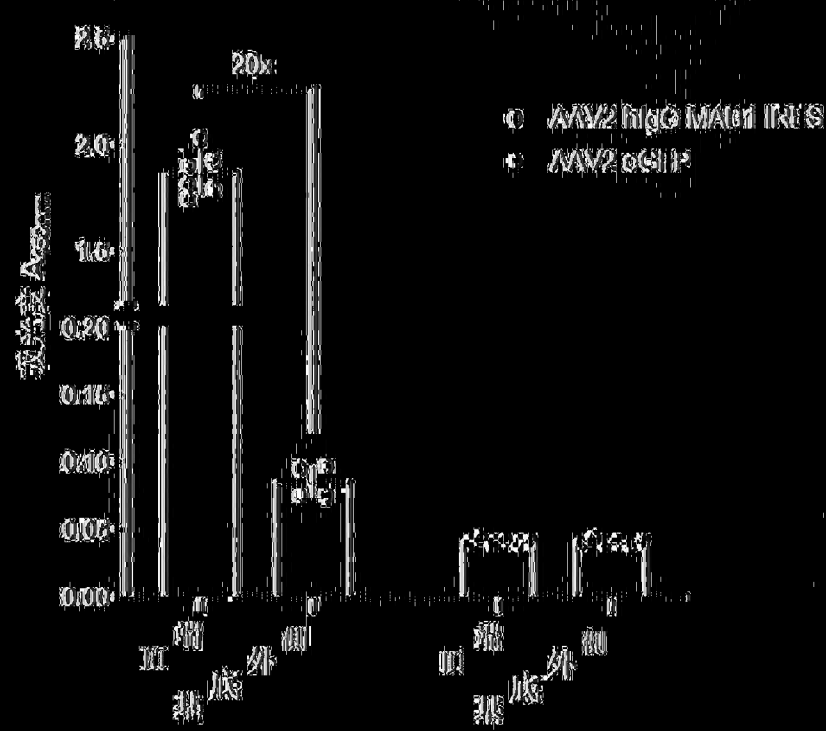


圖 14

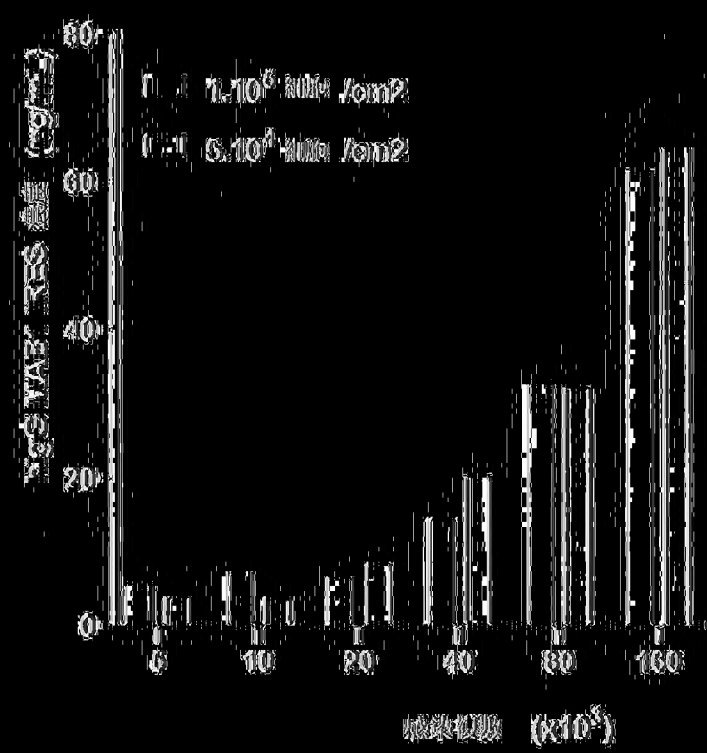


圖 15

Fig. 16

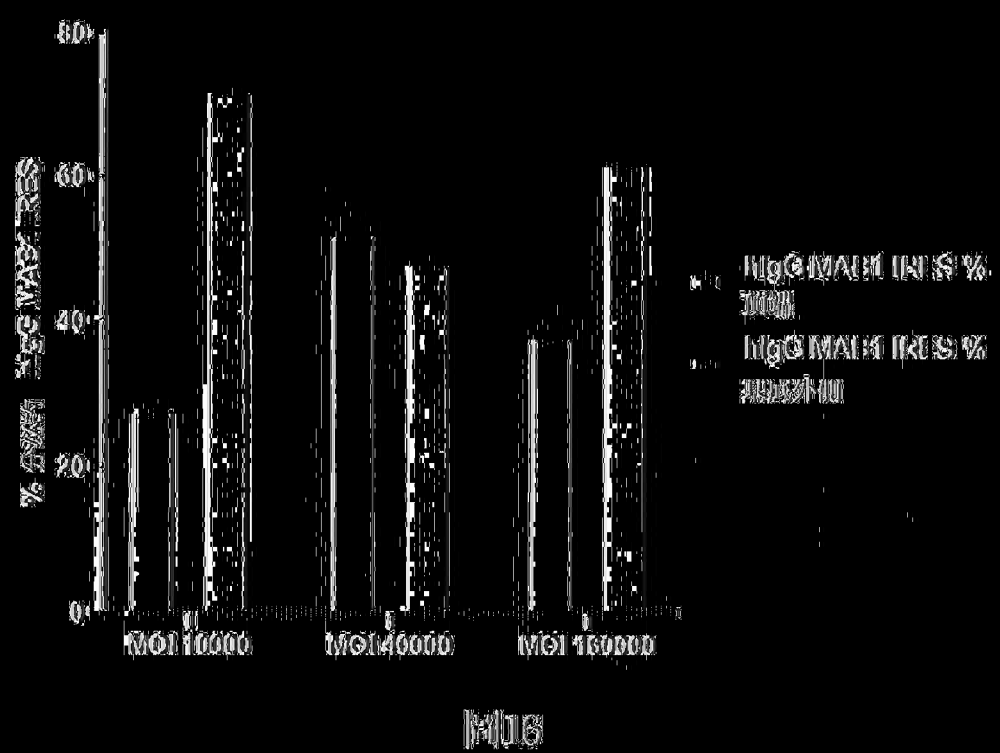
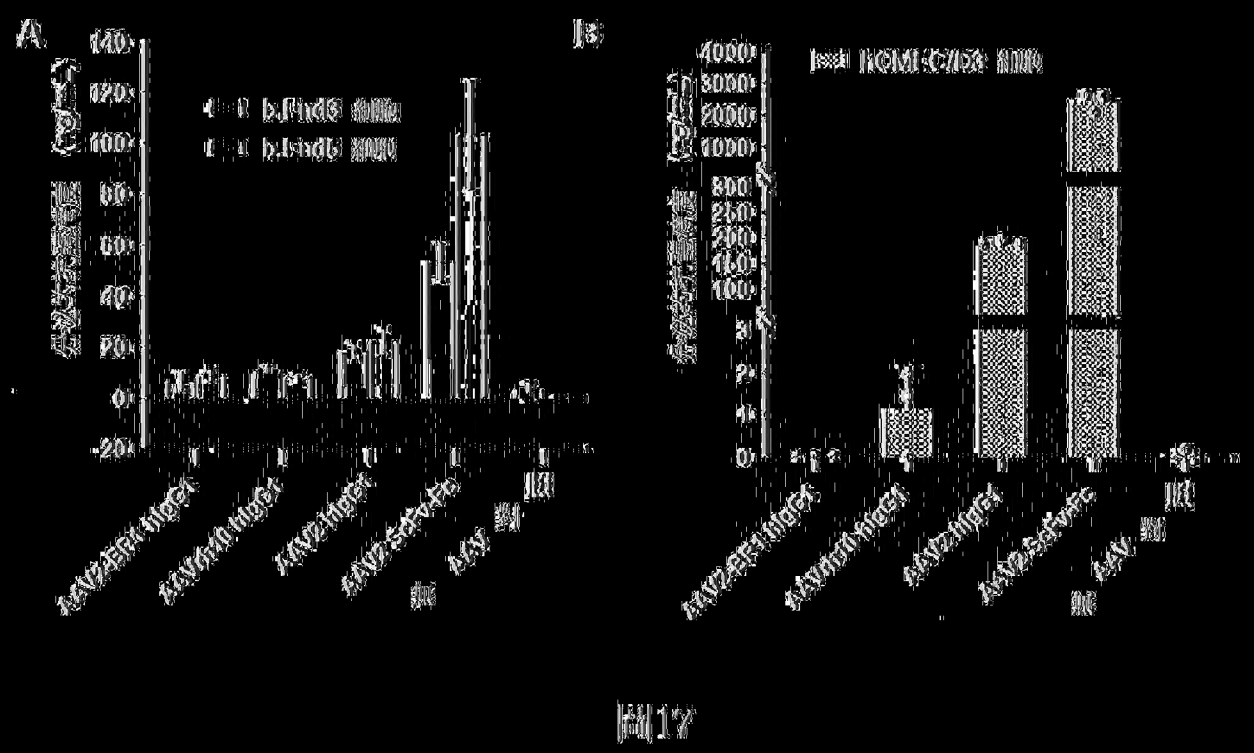


Fig. 17



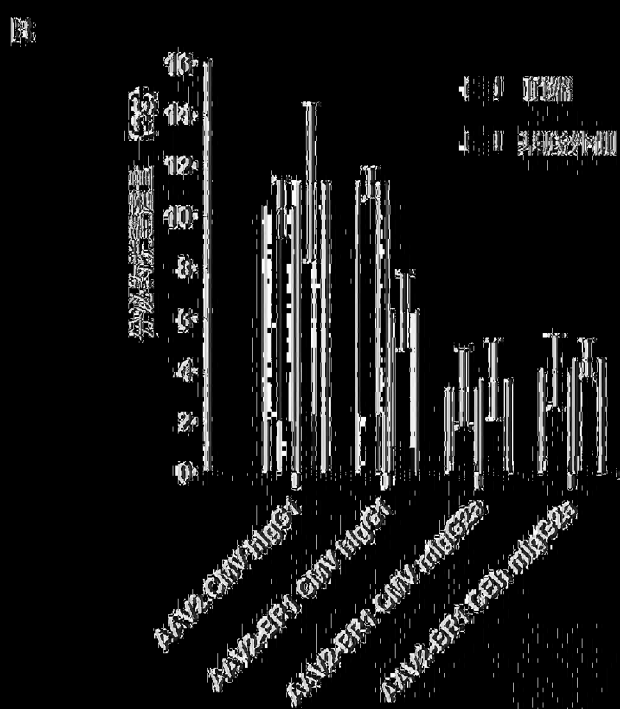
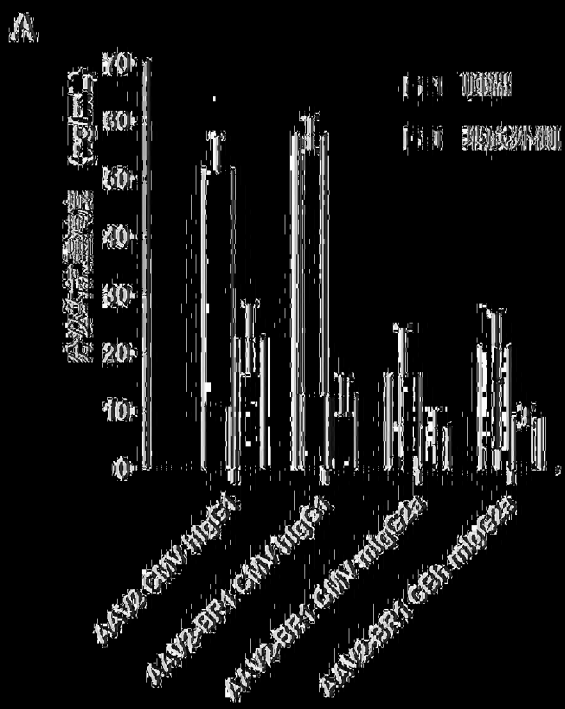


Figure 1

Figure 1