



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109963576 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201780069052.6

(22)申请日 2017.09.08

(30) 优先权数据

62/385,656 2016.09.09 US

62/553,048 2017.08.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/050787 2017.09.08

### (87)PCT国际申请的公布数据

W02018/049237 EN 2018.03.15

(71)申请人 瓦莱里昂治疗有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 达斯汀·D·阿姆斯特朗

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 金海霞 杨青

(51) Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

C12N 9/16(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

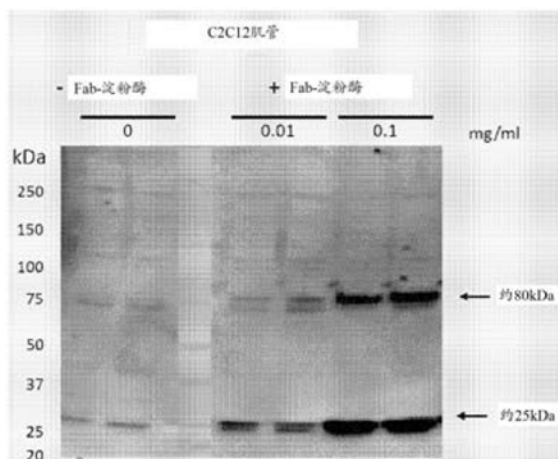
权利要求书4页 说明书76页 附图10页

(54)发明名称

# 用于治疗拉福拉病的方法和组合物

(57)摘要

在某些实施方案中,本公开提供用于治疗拉福拉病的组合物和方法。



1. 一种嵌合多肽,其包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;并且其中所述内化部分是抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域;其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

2. 一种嵌合多肽,其包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,但其中所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽不包含SEQ ID NO:36的全长 $\alpha$ -淀粉酶多肽;并且其中所述内化部分是抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含含有重链可变结构域的重链和含有轻链可变结构域的轻链;其中所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的嵌合多肽,其中所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的嵌合多肽,其中所述重链包含SEQ ID NO:4的前导序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的嵌合多肽,其中所述轻链包含SEQ ID NO:5的前导序列。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽能够在无细胞系统中水解 $\alpha$ -1,4-糖苷键。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽能够在来自患有拉福拉病的受试者的细胞中水解 $\alpha$ -1,4-糖苷键。

9. 如权利要求8所述的嵌合多肽,其中所述受试者是非人动物。

10. 如权利要求9所述的嵌合多肽,其中所述非人动物是小鼠。

11. 如权利要求8所述的嵌合多肽,其中所述受试者是人。

12. 如权利要求8-10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述细胞是体外的。

13. 如权利要求8-10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述细胞是肌肉细胞。

14. 如权利要求8-10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述细胞是膈肌细胞。

15. 如权利要求8-10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述细胞是脑细胞。

16. 如权利要求8-10中任一项所述的嵌合多肽,其中所述细胞是神经元。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的嵌合多肽,其中所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽与所述内化部分化学缀合。

18. 如权利要求1-16中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含融合蛋白,所述融合蛋白包含所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽和所述内化部分的全部或部分。

19. 如权利要求18所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽不包括将所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽与所述内化部分互连的接头。

20. 如权利要求18所述的嵌合多肽,其中所述融合蛋白包含接头。

21. 如权利要求20所述的嵌合多肽,其中所述接头将所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽与所述内化部

分缀合或连接。

22. 如权利要求20或21所述的嵌合多肽,其中所述接头是可切割的接头。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的嵌合多肽,其中所述接头包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分的全部或部分直接或经由接头与所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽的N-末端氨基酸缀合或接接。

25. 如权利要求1-23中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分的全部或部分直接或经由接头与所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽的C-末端氨基酸缀合或连接。

26. 如权利要求1-23中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分的全部或部分直接或间接地与所述 $\alpha$ -淀粉酶多肽的内部氨基酸缀合或连接。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分经由平衡核苷转运蛋白(ENT)转运蛋白促进所述嵌合多肽至细胞中的递送。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分经由ENT2促进所述嵌合多肽至细胞中的递送。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分促进所述嵌合多肽至肌肉细胞中的递送。

30. 如权利要求29所述的嵌合多肽,其中所述肌肉细胞是膈肌细胞。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分促进所述嵌合多肽至神经元细胞中的递送。

32. 如权利要求31所述的嵌合多肽,其中所述神经元细胞是脑神经元细胞。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分包含抗体。

34. 如权利要求33所述的嵌合多肽,其中所述抗体是单克隆抗体。

35. 如权利要求1-32中任一项所述的嵌合多肽,其中所述内化部分包含抗原结合片段。

36. 如权利要求35所述的嵌合多肽,其中所述抗原结合片段是Fab。

37. 如权利要求35所述的嵌合多肽,其中所述抗原结合片段是Fab'。

38. 如权利要求35所述的嵌合多肽,其中所述抗原结合片段是scFv。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽通过重组方式产生。

40. 如权利要求39所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽在原核或真核细胞中产生。

41. 如权利要求40所述的嵌合多肽,其中所述真核细胞选自酵母细胞、禽类细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的嵌合多肽,其中一个或多个糖基化基团与所述嵌合多肽缀合。

43. 如权利要求1-42中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。

46. 如权利要求1-42中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:9的

氨基酸序列。

47. 如权利要求1-43中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

48. 如权利要求1-44中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:9和10的氨基酸序列。

49. 如权利要求1-42中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。

50. 如权利要求1-42中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

51. 如权利要求1-42中任一项所述的嵌合多肽,其中所述嵌合多肽包含SEQ ID NO:8和43的氨基酸序列。

52. 一种核酸构建体,其包含将如权利要求1-51中任一项所述的嵌合多肽编码为包含融合蛋白的嵌合多肽的核苷酸序列。

53. 如权利要求52所述的核酸构建体,其中为了在哺乳动物细胞中表达,对所述核苷酸序列进行密码子优化。

54. 如权利要求53所述的核酸构建体,其中所述哺乳动物细胞是CHO细胞或HEK-293细胞。

55. 一组核酸构建体,所述核酸构建体一起包含编码如权利要求1-51中任一项所述的嵌合多肽的核苷酸序列。

56. 如权利要求55所述的核酸构建体的组,其中为了在哺乳动物细胞中表达,对所述核苷酸序列进行密码子优化。

57. 如权利要求55所述的核酸构建体的组,其中所述哺乳动物细胞是CHO细胞或HEK-293细胞。

58. 一种载体,其包含如权利要求52-54中任一项所述的核酸构建体。

59. 一组载体,其包含如权利要求55-57中任一项所述的核酸构建体的组。

60. 一种宿主细胞,其包含如权利要求58或59所述的载体。

61. 一种用于将 $\alpha$ -淀粉酶活性递送至来自患有拉福拉病的受试者的细胞或所述受试者的细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与如权利要求1-51中任一项所述的嵌合多肽接触。

62. 如权利要求61所述的方法,其中所述受试者是非人动物。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述非人动物是小鼠。

64. 如权利要求61所述的方法,其中所述受试者是人。

65. 如权利要求61-64中任一项所述的方法,其中所述细胞在所述受试者中。

66. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中所述细胞是肌肉细胞。

67. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中所述细胞是膈肌细胞。

68. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中所述细胞是脑细胞。

69. 如权利要求61-65中任一项所述的方法,其中所述细胞是神经元。

70. 如权利要求61所述的方法,其中所述细胞是体外的。

71. 一种用于治疗患有拉福拉病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治

疗有效量的如权利要求1-51中任一项所述的嵌合多肽。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述受试者是非人动物。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述受试者是小鼠。

74. 如权利要求71所述的方法,其中所述受试者是人。

## 用于治疗拉福拉病的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年9月9日提交的美国临时申请第62/385,656号和2017年8月31日提交的美国临时申请第62/553,048号的权益。上述申请的完整教导通过用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 糖原贮积病和糖原代谢紊乱是由基础代谢酶的缺陷(从而导致肌肉、肝脏、神经元和其它细胞类型中糖原合成或分解的缺陷)引起的一系列疾病。糖原贮积病可以是遗传性的(通常为常染色体隐性遗传性病)或获得性的(例如,通过生物碱中毒)(Monga等,)。存在许多不同类型的糖原贮积病,包括I-XI型GSD、0型GSD,以及通常被称为糖原代谢紊乱的拉福拉病。这些疾病在突变的酶和/或受累原生组织方面不同(Monga等,2011,Molecular Pathology of Liver Diseases,Molecular Pathology Library 5,第45章;和Gentry等,2013,FEBS J,280(2):525-37)。

[0005] 拉福拉病,也称为拉福拉进行性肌阵挛性癫痫或MELF,是一种罕见的、致命的神经退行性病,其特征来自于受累个体的大多数组织(包括脑、心脏、肝脏、肌肉和皮肤)的细胞中不溶性、分支不足、过度磷酸化的糖原的积累。拉福拉病患者通常首先在青春期出现症状。症状包括暂时失明、抑郁、癫痫发作、跌倒发作、肌阵挛、共济失调、幻视以及快速发展和严重的痴呆。死亡通常在发作后2-10年(平均5年)发生。

[0006] 拉福拉病的患病率尚不清楚。虽然这种疾病在世界范围内发生,但在地中海国家、中亚、印度、巴基斯坦、北非和中东的部分地区最为常见。在西方国家,患病率估计低于1/1,000,000。

[0007] 拉福拉病是由两种基因EPM2A和EPM2B之一的突变引起的常染色体隐性病症。EPM2A编码称为laforin的331个氨基酸的蛋白质,其包含氨基末端碳水化合物结合模块和羧基末端双特异性磷酸酶结构域。EPM2B编码称为malin的E3遍在蛋白连接酶。laforin和malin一起构成功能性复合物,据信所述复合物通过调节葡萄糖转运蛋白的亚细胞定位来参与负调节葡萄糖摄取。Singh等,2012,Mol Cell Biol,32(3):652-663。最近的研究还表明,糖原的积累是在拉福拉病患者的脑中观察到的神经退行性变性和自噬受损的原因。Duran等,2014,Hum Mol Genet,23(12):3147-56。

[0008] 虽然癫痫发作和肌阵挛可以至少在疾病的早期阶段用抗癫痫药物控制,但目前对患有拉福拉病的患者没有治愈性或有效的治疗。

### 发明内容

[0009] 本领域需要用于清除患有糖原贮积病和糖原代谢紊乱(例如,福布斯科里病(Forbes-Cori)和/或安德森病(Andersen Disease)和/或vonGierke病和/或庞贝氏症(PompeDisease)和/或拉福拉病)的患者的糖原积聚,特别是细胞质糖原积聚,或用于治疗与糖原积聚相关的细胞毒性作用的方法和组合物,以及需要对治疗这些疾病或病症的替代疗法。本公开提供了此类方法和组合物。例如,存在对减少例如细胞诸如肌肉(例如心脏和/或隔膜)细胞和/或肝细胞和/或神经细胞(例如,脑细胞)的细胞质中的糖原积累的需要。作

为进一步的实例,此类方法和组合物可减少细胞质糖原积累。因此,在整个申请中,除非另有说明,否则提及清除糖原积聚或减少糖原积累(或类似术语)包括清除或减少过量(例如,超出正常生理水平)糖原,包括清除或减少以异常形式(例如,多葡聚糖(polyglucosan))存在的过量糖原。在某些实施方案中,本公开提供了清除或减少诸如肌肉细胞(骨骼和/或心脏)、隔膜细胞或神经元细胞中的一种或多种中的诸如细胞质中的过量多葡聚糖(例如,清除或减少多葡聚糖积累)的方法。在某些实施方案中,清除糖原积聚或减少糖原积累(或类似术语)是指在一种或多种受累细胞的至少细胞质中清除糖原积聚或减少糖原积累。在某些实施方案中,清除诸如至少细胞质中的糖原积聚或减少诸如至少细胞质中的糖原积累,是或者包括清除诸如至少细胞质中的多葡聚糖积聚或减少诸如至少细胞质中的多葡聚糖积聚。此类方法和组合物将特别地在其疾病足够严重和/或充分进展至具有显著异常的细胞质糖原积累(例如,正常和/或异常糖原的积累)的患者中改善疾病或病症诸如拉福拉病的治疗。本公开提供了此类方法和组合物。在某些实施方案中,本文提供的方法和组合物减少至少细胞质中的糖原积聚(例如,诸如清除糖原积聚或减少糖原积累)。在某些实施方案中,本公开的方法和组合物减少多葡聚糖积聚(例如,在至少一种或多种细胞(诸如一种或多种肌肉细胞和/或肝细胞和/或隔膜细胞和/或神经元细胞)的细胞质中的积聚)。在某些实施方案中,本公开的方法和组合物减少至少肌肉细胞和/或神经元细胞的至少细胞质中的糖原(诸如多葡聚糖)积聚。

[0010] 在一些实施方案中,本公开提供了嵌合多肽,其包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;并且其中内化部分是抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域;其中重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中轻链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开提供了嵌合多肽,其包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,但其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽不包含SEQ ID NO:36的全长 $\alpha$ -淀粉酶多肽;并且其中内化部分是抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含含有重链可变结构域的重链和含有轻链可变结构域的轻链;其中重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中轻链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,重链包含SEQ ID NO:4的前导序列。在一些实施方案中,轻链包含SEQ ID NO:5的前导序列。在一些实施方案中,嵌合多肽具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性。在一些实施方案中,嵌合多肽能够在无细胞系统中水解 $\alpha$ -1,4-糖苷键。在一些实施方案中,嵌合多肽能够在来自患有拉福拉病的受试者的细胞中水解 $\alpha$ -1,4-糖苷键。在一些实施方案中,受试者是非人动物。在一些实施方案中,非人动物是小鼠。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,细胞是体外的。在一些实施方案中,细胞是肌肉细胞。在一些实施方案中,细胞是膈肌细胞。在一些实施方案中,细胞是脑细胞。在一些实施方案中,细胞是神经元。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分化学缀合。在一些实施方案中,嵌合多肽包括融合蛋白,所述融合蛋白包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分的全部或部分。在一些实施方案中,嵌合多肽不包含将 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分互连的接头。在一些实施方案中,融合蛋白包含接头。在一些实施方案中,接头将 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分缀合或连接。在一些实施方案中,接头是可裂解接头。在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:6的氨基酸序。在一些实施方

案中,内化部分的全部或一部分直接或经由接头与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的N-末端氨基酸缀合或连接。在一些实施方案中,其中内化部分的全部或一部分直接或经由接头与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的C-末端氨基酸缀合或连接。在一些实施方案中,内化部分的全部或一部分直接或间接与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的内部氨基酸缀合或连接。在一些实施方案中,内化部分经由平衡核苷转运蛋白(ENT)转运蛋白促进嵌合多肽至细胞中的递送。在一些实施方案中,内化部分经由ENT2促进嵌合多肽至细胞中的递送。在一些实施方案中,内化部分促进嵌合多肽至肌肉细胞中的递送。在一些实施方案中,肌肉细胞是膈肌细胞。在一些实施方案中,内化部分促进嵌合多肽至神经元细胞中的递送。在一些实施方案中,神经元细胞是脑神经元细胞。在一些实施方案中,内化部分包含抗体。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,内化部分包含抗原结合片段。在一些实施方案中,抗原结合片段是Fab。在一些实施方案中,抗原结合片段是Fab'。在一些实施方案中,抗原结合片段是scFv。在一些实施方案中,嵌合多肽通过重组方式产生。在一些实施方案中,嵌合多肽在原核或真核细胞中产生。在一些实施方案中,真核细胞选自酵母细胞、禽类细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,一个或多个糖基化基团与嵌合多肽缀合。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:9和10的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:8和43的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方案中,本公开提供了核酸构建体,其包含将本文公开的任何嵌合多肽编码为包含融合蛋白的嵌合多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,为了在哺乳动物细胞中表达,对核苷酸序列进行密码子优化。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是CHO细胞或HEK-293细胞。

[0012] 在一些实施方案中,本公开提供了一组核酸构建体,其一起包含编码本文公开的任何嵌合多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,为了在哺乳动物细胞中表达,对核苷酸序列进行密码子优化。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是CHO细胞或HEK-293细胞。

[0013] 在一些实施方案中,本公开提供了包含本文公开的任何核酸构建体的载体。在一些实施方案中,本公开提供了包含本文公开的任何核酸构建体的组的一组载体。

[0014] 在一些实施方案中,本公开提供了包含本文公开的任何载体或载体的组的宿主细胞。

[0015] 在一些实施方案中,本公开提供了用于将 $\alpha$ -淀粉酶活性递送至来自患有拉福拉病的受试者的细胞或所述受试者的细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞与本文公开的任何嵌合多肽接触。在一些实施方案中,受试者是非人动物。在一些实施方案中,非人动物是小鼠。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,细胞存在于受试者中。在一些实施方案中,细胞是肌肉细胞。在一些实施方案中,细胞是膈肌细胞。在一些实施方案中,细胞是脑细胞。在一些实施方案中,细胞是神经元。在一些实施方案中,细胞是体外的。

[0016] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗患有拉福拉病的受试者的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的任何嵌合多肽。在一些实施方案中,受试者是非人



动物。在一些实施方案中,受试者是小鼠。在一些实施方案中,受试者是人。

## 附图说明

[0017] 专利或申请文件含有至少一幅彩色绘制的附图。专利局在提出请求并支付必要费用后将提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本。

[0018] 图1显示了ENT2+C2C12肌管中Fab-淀粉酶的剂量依赖性摄取。提供了0.01mg/ml和0.1mg/ml的-Fab-淀粉酶与+Fab-淀粉酶的比较。(注释:抗H3L2,兔pAb,1:100;驴抗兔-HRP,1:20000)。

[0019] 图2是显示ENT2+C2C12肌管中糖原减少的图。

[0020] 图3A-3F总结了拉福拉体(Lafora body)纯化方案的结果。该方案包括(1)将组织匀浆,重悬和离心;(2)用蛋白酶K消化过夜;(3)过滤;和(4)用SDS和缓冲液洗涤。图3A-3D是显示脑(图3A和图3C)、心脏(图3B)和骨骼肌(图3D)中的拉福拉体的图像。图3E是显示从拉福拉敲除小鼠的脑、心脏和骨骼肌的匀浆、沉淀和最终样品中分离的拉福拉体的产率(mg/g组织)的图。图3F是显示来自脑、心脏和骨骼肌的样品的碘(指示糖原)和总葡萄糖的产率(mg/g组织)的图。

[0021] 图4A-4B显示纯化的拉福拉体可以被Fab-淀粉酶降解,但不被Fab-葡糖苷酶降解。图4A是显示当用Fab-淀粉酶、Fab-葡糖苷酶或对照处理时来自脑、心脏和骨骼肌的拉福拉体的降解百分比的图。图4B是显示用-Fab-淀粉酶和+Fab-淀粉酶处理的WT和KO小鼠的拉福拉体含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提取物)的图。

[0022] 图5A-5B显示注射的Fab-淀粉酶在肌肉和脑中具有活性。图5A是显示注射后1小时、注射后2小时、注射后4小时和注射后24小时肌肉中淀粉酶活性的图。图5B显示注射后立即和注射后1小时鉴定的脑样品(上图)的淀粉酶活性(下图)。

[0023] 图6显示在左腿中注射媒介物(PBS)(左图)并且在右腿中注射Fab-淀粉酶(右图)的8.5月龄的雌性小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉的高碘酸希夫(PAS)染色。

[0024] 图7显示在左腿中注射媒介物(PBS)(左图)并且在右腿中注射Fab-淀粉酶的(右图)8.5月龄的雌性小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉的高碘酸希夫(PAS)染色。

[0025] 图8显示在左腿中注射媒介物(PBS)(左图)并且在右腿中注射媒介物(PBS)(右图)的8.5月龄的雌性小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉的高碘酸希夫(PAS)染色。

[0026] 图9显示在左腿中注射媒介物(PBS)(左图)并且在右腿中注射Fab-淀粉酶(右图)的4月龄的雌性小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉的高碘酸希夫(PAS)染色。

## 具体实施方式

[0027] 糖原是可为人体中的细胞提供现成的葡萄糖储存的复合多糖。糖原主要存在于肝脏(在这里其被水解并释放到血流中以向其它细胞提供葡萄糖)和肌肉(在这里由糖原水解产生的葡萄糖为肌肉细胞提供能量)中。据信蛋白质laforin、malin和 $\alpha$ -淀粉酶在糖原清除中起作用。

[0028] 在一些实施方案中,本公开提供了包含本文公开的任何氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,本公开提供了包含与本文公开的任何氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列的多肽。

### [0029] I. $\alpha$ -淀粉酶多肽

[0030] 在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽(或用于本公开的方法的嵌合多肽)的非内化部分多肽部分是 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,唾液 $\alpha$ -淀粉酶或胰腺 $\alpha$ -淀粉酶)。换句话说,在某些实施方案中,提供了含 $\alpha$ -淀粉酶的嵌合多肽。本文中提供了用于本公开的方法和组合物的示例性 $\alpha$ -淀粉酶(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶)多肽。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶)多肽可用于清除患病细胞中过量的糖原。在一些实施方案中,患病细胞是患有糖原贮积病或糖原代谢紊乱的受试者的细胞。在一些实施方案中,患病细胞来自患有庞贝氏症、安德森病、von Gierke病、拉福拉病和/或福布斯科里病的受试者。在一些实施方案中,患病细胞来自患有拉福拉病和/或福布斯科里病的受试者。在一些实施方案中,患病细胞来自患有拉福拉病的受试者。

[0031] 在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶(例如,成熟的 $\alpha$ -淀粉酶)是单体。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶是二聚体或三聚体。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶已经突变,使得其不能多聚化(例如, $\alpha$ -淀粉酶已经突变,使得其不能二聚化或三聚化)。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶已经用抑制 $\alpha$ -淀粉酶的多聚化(例如,二聚化或三聚化)的剂处理。在一些实施方案中,所述剂是小分子。

[0032] 如本文中所用, $\alpha$ -淀粉酶多肽包括野生型 $\alpha$ -淀粉酶多肽的各种功能片段和变体、融合蛋白和修饰形式。在特定实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶是成熟的 $\alpha$ -淀粉酶。在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体是唾液 $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体。在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体是胰腺 $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体。在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体是哺乳动物 $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体。在特定实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体是人 $\alpha$ -淀粉酶或其片段或变体。 $\alpha$ -淀粉酶多肽的此类功能片段或变体、融合蛋白和修饰形式具有与天然 $\alpha$ -淀粉酶多肽具有实质序列同一性的氨基酸序列的至少一部分,并保留天然 $\alpha$ -淀粉酶多肽的功能(例如,水解 $\alpha$ -1,4-糖苷键的能力)。应当注意,“保留功能”并不意味着特定片段的活性必须与天然蛋白质的活性相同或实质上相同,尽管在一些实施方案中,其可以与天然蛋白质的活性相同或实质上相同。然而,为了保持天然活性,该天然活性应为与此类活性相比较的天然蛋白质的活性的至少为50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%,其中在相同或相似的条件下进行比较。在一些实施方案中,保留天然活性可包括其中片段或变体相对于与此类活性进行比较的天然蛋白质具有提高(例如,至少105%、至少110%、至少120%或至少125%)的活性的情景,其中在相同或相似的条件下进行比较。

[0033] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽的功能片段、变体或融合蛋白包含与 $\alpha$ -淀粉酶多肽诸如成熟的 $\alpha$ -淀粉酶多肽或其片段具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性(例如,与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性)的氨基酸序列。

[0034] 在某些实施方案中,用于本公开的嵌合多肽和方法的 $\alpha$ -淀粉酶多肽是全长或实质上全长的 $\alpha$ -淀粉酶多肽,或全长 $\alpha$ -淀粉酶的成熟形式。在某些实施方案中,用于本公开的嵌合多肽和方法的 $\alpha$ -淀粉酶多肽是具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性的功能片段。

[0035] 在任何前述内容的某些实施方案中,本公开的嵌合多肽的 $\alpha$ -淀粉酶部分包括 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,成熟形式),其在某些实施方案中可以是 $\alpha$ -淀粉酶多肽的功能片段或者可

以是实质上全长的 $\alpha$ -淀粉酶多肽。

[0036] 在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶是 $\alpha$ -淀粉酶的成熟形式。在特定实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶的成熟形式对应于SEQ ID NO:36的氨基酸16-511 (Genbank登录号NP\_000690)。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶的成熟形式对应于与SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0037] 如在体外或体内所评估的,用于本公开的嵌合多肽和方法的合适的 $\alpha$ -淀粉酶多肽或其功能片段具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性。示例性功能片段包含全长 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,SEQ ID NO:36)的至少100个、125个、150个、175个、200个、225个、250个、275个、300个、325个、350个、375个、400个、425个、450个、475个、500个或511个连续氨基酸残基。在一些实施方案中,功能片段包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,SEQ ID NO:1)的100-150个、100-200个、100-250个、100-300个、100-400个、100-450个、100-495个、200-495个、300-495个、400-495个、450-495个、475-495个连续氨基酸。类似地,在某些实施方案中,本公开设想了其中 $\alpha$ -淀粉酶部分是任何前述 $\alpha$ -淀粉酶多肽的变体或生物活性片段的嵌合蛋白。示例性变体具有与天然(例如成熟) $\alpha$ -淀粉酶多肽或其功能片段具有至少90%、92%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列,并且此类变体保留了 $\alpha$ -淀粉酶变体的 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性。本公开设想了嵌合多肽和此类多肽的用途,其中 $\alpha$ -淀粉酶部分包括本文所述的任何 $\alpha$ -淀粉酶多肽、片段或变体与本文所述的任何内化部分的组合。此外,在某些实施方案中,任何前述嵌合多肽的 $\alpha$ -淀粉酶部分在某些实施方案中可以是融合蛋白。包含 $\alpha$ -淀粉酶部分和内化部分部分的任何组合并且任选地包含一个或多个接头、一个或多个标签等的任何此类嵌合多肽,可用于本公开的任何方法中。

[0038] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽的片段或变体可通过筛选从编码 $\alpha$ -淀粉酶多肽的核酸的相应的片段重组产生的多肽来获得。另外,片段或变体可使用本领域已知的技术诸如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学来通过化学方式合成。可以产生(重组或通过化学合成)片段或变体,并对其进行测试以鉴定可以作为天然 $\alpha$ -淀粉酶多肽的那些片段或变体,例如,通过测试它们在体内治疗拉福拉病的能力和/或通过体外确认(例如,在无细胞或基于细胞的测定中)所述片段或变体具有 $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性。用于测试本文公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽的活性的体外测定的实例是用或不用含有 $\alpha$ -淀粉酶的嵌合多肽处理拉福拉细胞,然后在孵育一段时间后检测多葡聚糖的水平。

[0039] 在某些实施方案中,出于诸如增强治疗或预防功效或稳定性(例如,离体保存期限和体内蛋白水解降解抗性)的此类目的,本公开设想了修饰 $\alpha$ -淀粉酶多肽的结构。经修饰的多肽可以例如通过氨基酸取代、缺失或添加来产生。例如,可以合理地预期,例如,用异亮氨酸或缬氨酸单独地置换亮氨酸、用谷氨酸单独地置换天冬氨酸、用丝氨酸单独地置换苏氨酸或用结构相关的氨基酸置换该氨基酸的类似置换(例如,保守突变)不会对所得分子的 $\alpha$ -淀粉酶生物活性产生重大影响。保守置换为侧链相关的氨基酸家族内发生的那些置换。

[0040] 本公开还设想了产生 $\alpha$ -淀粉酶多肽的组合突变体以及截短突变体的组,并且对于鉴定功能性变体序列尤其有用。可以产生组合衍生的变体,其相对于天然存在的 $\alpha$ -淀粉酶多肽具有选择性效力。同样地,诱变可以产生具有与相应的野生型 $\alpha$ -淀粉酶多肽显著不同的细胞内半衰期的变体。例如,可使得改变的蛋白质对蛋白水解降解或其它细胞过程更稳

定或更不稳定,所述细胞过程导致 $\alpha$ -淀粉酶的破坏或以其它方式失活。此类变体可用于通过调节其半衰期来改变 $\alpha$ -淀粉酶多肽水平。存在许多可籍以例如从简并寡核苷酸序列产生潜在 $\alpha$ -淀粉酶变体序列的文库的方法。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,然后可将合成基因连接到合适的基因中以进行表达。基因的简并组的目的是在一种混合物中提供编码所需组的潜在多肽序列的所有序列。简并寡核苷酸的合成是本领域公知的(参见例如,Narang,SA (1983) *Tetrahedron* 39:3;Itakura等,(1981) *Recombinant DNA, Proc.3rdCleveland Sympos.Macromolecules*,编辑AG Walton,Amsterdam:Elsevier 273-289页;Itakura等,(1984) *Annu.Rev.Biochem.*53:323;Itakura等,(1984) *Science* 198:1056;Ike等,(1983) *Nucleic Acid Res.*11:477)。此类技术已用于其它蛋白质的定向进化(参见,例如,Scott等,(1990) *Science* 249:386-390;Roberts等,(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433;Devlin等,(1990) *Science* 249:404-406;Cwirla等,(1990) *PNAS USA* 87:6378-6382;以及美国专利第5,223,409号、第5,198,346号和第5,096,815号)。

[0041] 或者,可以使用其它诱变形式来产生组合文库。例如,使用例如丙氨酸扫描诱变等(Ruf等,(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572;Wang等,(1994) *J.Biol.Chem.*269:3095-3099;Balint等,(1993) *Gene* 137:109-118;Grodberg等,(1993) *Eur.J.Biochem.*218:597-601;Nagashima等,(1993)

[0042] *J.Biol.Chem.*268:2888-2892;Lowman等,(1991) *Biochemistry*30:10832-10838;and Cunningham等,(1989) *Science* 244:1081-1085),通过接头扫描诱变(Gustin等,(1993) *Virology* 193:653-660;Brown等,(1992) *Mol.Cell Biol.*12:2644-2652;McKnight等,(1982) *Science*232:316);通过饱和诱变(Meyers等,(1986) *Science* 232:613);by PCR mutagenesis (Leung等,(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19);或通过随机诱变,包括化学诱变等(Miller等,(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY;and Greener等,(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)通过筛选从文库中产生和分离 $\alpha$ -淀粉酶多肽变体。接头扫描诱变,特别是以组合设置,是用于鉴定 $\alpha$ -淀粉酶多肽的截短(生物活性)形式的有吸引力的方法。

[0043] 本领域已知多种用于筛选通过点突变和截短产生的组合文库的基因产物,并且就此而言,用于筛选具有某种特性的基因产物的cDNA文库的技术。此类技术通常适用于快速筛选由 $\alpha$ -淀粉酶多肽的组合诱变产生的基因文库。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得的载体文库转化合适的细胞,并在其中所需活性的检测有利于相对容易地分离载体的条件下表达组合基因,所述载体编码检测到其产物的基因。每种下面描述的说明性测定都适合于筛选由组合诱变技术产生的大量简并序列所必需的高通量分析。

[0044] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽可包括肽模拟物。如本文中所用,术语“肽模拟物”包括化学修饰的肽和含有非天然存在的氨基酸的肽样分子、类肽等。肽模拟物提供了优于肽的各种有利方面,包括当施用于受试者时增强的稳定性。用于鉴定肽模拟物的方法是本领域公知的,并且包括筛选含有潜在肽模拟物的文库的数据库。例如,剑桥结构数据库(Cambridge Structural Database)包含超过300,000种具有已知晶体结构的化合物的集合(Allen等,*Acta Crystallogr.*部分B,35:2331(1979)).在没有靶分子的晶体结构可用的情况下,可以使用例如程序CONCORD(Rusinko等,*J.Chem.Inf.Comput.Sci.*29:251(1989))

产生结构。另一个数据库,可用化学品目录(Available Chemicals Directory)(Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.),含有约100,000种商购可得的化合物,并且还可搜索所述数据库以鉴定 $\alpha$ -淀粉酶多肽的潜在肽模拟物。

[0045] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽还可包含翻译后修饰。示例性翻译后蛋白质修饰包括多肽侧链或疏水基团的磷酸化、乙酰化、甲基化、ADP-核糖基化、遍在蛋白化、糖基化、羧基化、SUMO化、生物素化或添加。结果,经修饰的 $\alpha$ -淀粉酶多肽可含有非氨基酸元件,诸如脂质、多糖或单糖和磷酸盐。可就其生物活性(例如, $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性和/或其治疗拉福拉病的能力)测试此类非氨基酸元件对 $\alpha$ -淀粉酶多肽功能性的影响。在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽还可包含一个或多个多肽部分,所述多肽部分增强体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用和/或纯化中的一种或多种。在其它实施方案中,内化部分包含抗体或其抗原结合片段。

[0046] 在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽未被N-糖基化或缺乏野生型 $\alpha$ -淀粉酶多肽中存在的一个或多个N-糖基化基团。例如,相对于天然 $\alpha$ -淀粉酶,用于本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽可能缺乏所有N-糖基化位点,或者相对于天然 $\alpha$ -淀粉酶,用于本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽可能糖基化不足。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽包含在一个或多个N-糖基化位点不能被N-糖基化的经修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽中的至少一个预测的N-糖基化位点(即,由氨基酸序列Asn-Xaa-Ser或Asn-Xaa-Thr表示的共有序列)的天冬酰胺(Asn)被另一个氨基酸取代。在一些实施方案中,对应于SEQ ID NO:1的残基412和/或461的氨基酸位置处的天冬酰胺被另一种氨基酸取代。本公开设想了可以组合前述实例中的任何一个或多个以使得本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽缺少一个或多个N-糖基化位点,从而相对于天然 $\alpha$ -淀粉酶未被糖基化或糖基化不足。

[0047] 在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽未被O-糖基化或缺乏野生型 $\alpha$ -淀粉酶多肽中存在的一个或多个O-糖基化基团。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽包含在一个或多个O-糖基化位点不能被O-糖基化的经修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽序列中任何一个或多个预测的O-糖基化位点处的丝氨酸或苏氨酸被取代或缺失。本公开设想了可以组合前述实例中的任何一个或多个以使得本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽缺少一个或多个N-糖基化位点和/或O-糖基化位点,从而相对于天然 $\alpha$ -淀粉酶未被糖基化或糖基化不足。

[0048] 在本公开的一个具体实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽可以用非蛋白质性质的聚合物修饰。在一个具体实施方案中,聚合物是以美国专利第4,640,835号、第4,496,689号、第4,301,144号、第4,670,417号、第4,791,192号或第4,179,337号中所述的方式存在的聚乙二醇(“PEG”)、聚丙二醇或聚氧化烯。PEG是公知的水溶性聚合物,其可商购获得或可通过按照本领域公知的方法对乙二醇进行开环聚合来制备(Sandler和Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, 第3卷, 第138-161页)。

[0049] 术语“生物学活性”、“生物活性”或“功能性”意指 $\alpha$ -淀粉酶多肽实现与野生型成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽相关的功能的能力,例如, $\alpha$ -1,4-糖苷键水解活性或水解多葡聚糖的能力。术语“生物学活性”、“生物活性”和“功能性”在本文中可互换使用。如本文中所用,“片段”被理解为包括表现出如本文所述的“生物活性”的生物活性片段(也称为功能片段)或生物活性变体。也就是说, $\alpha$ -淀粉酶的生物活性片段或变体表现出可以测量和测试的生物活性。例如,生物活性片段/功能片段或变体表现出与天然(即,野生型或正常) $\alpha$ -淀粉酶多肽相同或

实质上相同的生物活性,并且此类生物活性可通过所述片段或变体例如水解碳水化合物中的 $\alpha$ -1,4-糖苷键的能力来评估。如本文中所用,“实质上相同的”是指为对照的至少70%的任何参数(例如,活性),所述参数是针对所述对照测量的。在某些实施方案中,“实质上相同的”还指为对照的至少75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%、100%、102%、105%或110%的任何参数(例如,活性),所述参数是针对所述对照测量的。在某些实施方案中,当在相同或实质上相同的条件下评估时,成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽的片段或变体将优选保留与天然成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽相关的 $\alpha$ -淀粉酶多肽生物活性的至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0050] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽的片段或变体具有相对于天然蛋白质的半衰期延长的半衰期( $t_{1/2}$ )。优选地, $\alpha$ -淀粉酶片段或变体的半衰期相对于天然 $\alpha$ -淀粉酶多肽的半衰期延长了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%或500%,或甚至1000%。在一些实施方案中,在体外,诸如在缓冲盐水溶液或血清中测定蛋白质半衰期。在其它实施方案中,蛋白质半衰期是体内半衰期,诸如动物的血清或其它体液中的蛋白质的半衰期。另外,片段或变体可使用本领域已知的技术诸如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学来通过化学方式合成。可以产生(重组或通过化学合成)片段或变体,并对其进行测试以鉴定可以与天然 $\alpha$ -淀粉酶多肽同样好地或实质上类似地起作用的那些片段或变体。

[0051] 关于增加细胞中 $\alpha$ -淀粉酶生物活性的方法,本公开设想了任何前述方面和实施方案的所有组合,以及与详述和实施例中所述的任何实施方案的组合。可以在体外(例如,在细胞或培养物中)或体内(例如,在患者或动物模型中)进行基于施用嵌合多肽或使细胞与嵌合多肽接触的所述方法。在某些实施方案中,所述方法是体外方法。在某些实施方案中,所述方法是体内方法。

[0052] 在一些方面,本公开还提供了产生如本文所述的任何前述嵌合多肽的方法。另外,本公开设想了许多前述方法和组合物的组合。

[0053] 在某些方面, $\alpha$ -淀粉酶多肽可以是还包含一个或多个融合结构域的融合蛋白。此类融合结构域的公知实例包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G和免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP),这些特别适用于通过亲和层析分离融合蛋白。出于亲和纯化的目的,使用用于亲和层析的相关基质,诸如缀合有谷胱甘肽的树脂、缀合有淀粉酶的树脂以及缀合有镍的树脂或缀合有钴的树脂。融合结构域还包括“表位标签”,其通常是可获得针对其的特异性抗体的短肽序列。可容易地获得针对其的特异性单克隆抗体的公知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)、His和c-myc标签。示例性His标签具有序列HHHHHH(SEQ ID NO:15),并且示例性c-myc标签具有序列EQKLISEEDL(SEQ ID NO:16)。在一些情况下,融合结构域具有蛋白酶切割位点,诸如因子Xa或凝血酶的切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白,从而从其释放重组蛋白。然后可以通过随后的层析分离从融合结构域中分离释放的蛋白质。在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽可含有能够稳定多肽的一个或多个修饰。例如,此类修饰延长多肽的体外半衰期,延长多肽的循环半衰期或减少多肽的蛋白水解降解。

[0054] II. 内化部分

[0055] 如本文中所用,术语“内化部分”是指这样的多肽/蛋白质,所述多肽/蛋白质能够

与靶组织或细胞类型相互作用,使得该部分被内化到所述靶组织或所述细胞类型中。

[0056] 如本文中所用,“本公开的抗体或抗原结合片段”是指本文提供的抗体和抗原结合片段中的任何一种或多种。本公开的抗体和抗原结合片段包含含有重链可变结构域的重链和含有轻链可变结构域的轻链。VH结构域包含三个CDR,诸如本文提供的以及如由Kabat和/或IMGT系统定义的或鉴定的任何CDR。这些CDR中通常散布有框架区(FR),并且一起构成VH结构域。类似地,VL包含三个CDR,诸如本文提供的以及如由Kabat和/或IMGT系统定义的任何CDR。这些CDR中通常散布有框架区(FR),并且一起构成VL结构域。可以类似地由Kabat或IMGT系统定义或鉴定FR区诸如FR1、FR2、FR3和/或FR4。在整个本申请中,当CDR被指示为由Kabat或IMGT系统鉴定或定义时,意味着CDR是根据该系统的(例如,Kabat CDR或IMGT CDR)。这些术语中的任何术语都可用于指示指的是Kabat CDR还是IMGT CDR。

[0057] 本公开设想了抗体或抗原结合片段可包含如本文所提供的VH结构域与如本文所提供的VL结构域的任何组合。在某些实施方案中,VH结构域和/或VL结构域中的至少一个被人源化(共同地,为本公开的抗体或抗原结合片段)。还包括嵌合抗体。可以单独提供本公开的任何抗体或抗原结合片段。在其它实施方案中,本公开的任何抗体或抗原结合片段可以作为与异源剂结合的缀合物提供。本文中提供了异源剂的非限制性实例,其可包括多肽、肽、小分子(例如,化学治疗剂小分子)或多核苷酸。缀合物可以指与异源剂缔合的抗体或抗原结合片段。

[0058] 在一些实施方案中,分离和/或纯化抗体或抗原结合片段。本文所述的任何抗体或抗原结合片段,包括以分离或纯化形式提供的那些,可以作为组合物(诸如与一种或多种药学上和/或生理上可接受的载体和/或赋形剂配制的包含抗体或抗原结合片段的组合物)提供。本文所述的任何抗体或抗原结合片段,包括组合物(例如,药物组合物)可以用于本文所述的任何方法,并且可以任选地与异源剂缀合(例如,互连;缔合)提供。在一些实施方案中,内化部分能够与靶组织或细胞类型相互作用以实现异源剂至细胞中的递送(即,穿透所需细胞;跨细胞膜转运;跨细胞膜递送至至少细胞质)。此类缀合物可以类似地作为组合物提供,并且可以用于本文所述的任何方法中。

[0059] 具有有限交叉反应性的内化部分通常是优选的。在某些实施方案中,本公开涉及内化部分,其选择性地但不一定专门地靶向并穿透肌肉细胞、肝细胞和/或神经元细胞。在某些实施方案中,内化部分具有有限的交叉反应性,因此优先靶向特定的细胞或组织类型。然而,应该理解,本公开的内化部分并不专门靶向特定细胞类型。相反,内化部分促进相对于其它细胞类型优先递送至一种或多种特定细胞类型,因此提供并非普遍存在的递送。在某些实施方案中,合适的内化部分包括例如抗体、单克隆抗体或其衍生物或类似物。在某些实施方案中,内化部分经由ENT2转运蛋白介导跨细胞膜的转运。在一些实施方案中,内化部分有助于嵌合多肽有效且高效地通过细胞膜。在一些实施方案中,内化部分经由平衡核苷(ENT)转运蛋白通过细胞膜。在一些实施方案中,内化部分经由ENT1、ENT2、ENT3或ENT4转运蛋白通过细胞膜。在一些实施方案中,内化部分经由平衡核苷转运蛋白2(ENT2)和/或ENT3转运蛋白通过细胞膜。在一些实施方案中,内化部分促进至肌肉(例如,心脏或膈肌)细胞、肝细胞、皮肤细胞或神经元(例如,脑)细胞中的递送。对于任何前述内容,在某些实施方案中,内化部分内化至细胞质中。在某些实施方案中,内化部分内化至细胞核或溶酶体中。

[0060] 在某些实施方案中,内化部分是结合DNA的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,



内化部分是本文所述的任何抗体或抗体片段。换句话说,在某些实施方案中,抗体或抗体片段(例如,包含抗原结合片段的抗体片段)结合DNA。在某些实施方案中,相对于双链DNA底物测量DNA结合能力。在某些实施方案中,内化部分是结合DNA并且可经由ENT2通过细胞膜的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,内化部分结合DNA泡。

[0061] 在某些实施方案中,内化部分能够结合多核苷酸。在某些实施方案中,内化部分能够结合DNA。在某些实施方案中,内化部分是能够结合DNA的抗体。在某些实施方案中,内化部分能够以小于1 $\mu$ M的KD结合DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于100nM、小于75nM、小于50nM或甚至小于30nM的KD结合DNA。KD可根据当前的标准方法使用表面等离子体共振 (SPR) 或石英晶体微量天平 (QCM) 来测量。举例来说,已知3E10抗体或抗体片段(包括包含具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL的抗体或抗体片段)以小于100nM的KD结合DNA。因此,在某些实施方案中,用于本公开的嵌合多肽的内化部分是可通过细胞膜进入细胞质转运并与DNA结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)。这也是抗DNA抗体的示例。在某些实施方案中,用于本文的内化部分是抗DNA抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,本公开的内化部分,诸如本文所述的抗体或抗体片段,与具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或scFv或Fv相比,以更高的亲和力结合给定的DNA底物。在某些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分不是具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分不是鼠抗体或抗体片段。

[0062] 事实上,包含前述VH和VL的全长抗体以如通过ELISA评估的甚至更低的KD结合双链平端DNA底物。在某些实施方案中,内化部分结合双链、平端DNA,并且在或可在使用平端DNA的结合测定(参见,例如,Xu等(2009)EMBO Journal 28:568-577;Hansen等,(2012)Sci Translation Med 4:DOI 10.1126/scitranslmed.3004385)中,诸如通过ELISA、QCM或Biacore来证明DNA结合活性。在某些实施方案中,相对于双链、平端DNA底物诸如Xu等中所述的DNA底物评估抗体或抗体片段(诸如包含抗原结合片段的抗体片段)的前述KD。在某些实施方案中,内化部分是抗DNA抗体。应当认识到,3E10和其它抗DNA抗体能够以高亲和力结合多种DNA底物,如这已被证实的。

[0063] 在一些实施方案中,本文所述的任何内化部分,例如本公开的任何抗体或抗原结合片段,能够结合存在于多核苷酸序列中的特定核苷酸基序。在一些实施方案中,内化部分能够结合富含AT的序列。在一些实施方案中,内化部分以比针对富含GC的序列的亲和力更强的亲和力与富含AT的序列结合。在一些实施方案中,内化部分能够结合TATA序列。在一些实施方案中,内化部分结合6碱基对序列内的4-mer TATA基序。在一些实施方案中,内化部分能够结合DNA泡(DNA bubble)。在一些实施方案中,内化部分能够与DNA泡相邻的DNA序列。在一些实施方案中,内化部分能够结合与DNA泡相邻的DNA序列,所述DNA序列的长度为至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或至少25个碱基对。在一些实施方案中,内化部分能够结合与7-碱基或11碱基的泡相邻的5-mer可变区。在某些实施方案中,本公开的内化部分,诸如本文所述的抗体或抗体片段,与具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或scFv或Fv相比,以更高的亲和力结合给定的DNA底物。在某些实施



方案中,用于本公开的方法的内化部分不是具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分不是鼠抗体或抗体片段。

[0064] 在一些实施方案中,本文所述的任何内化部分结合DNA应答元件处的DNA。在一些实施方案中,内化部分结合DNA应答元件以防止转录因子或蛋白质与该元件结合。在一些实施方案中,内化部分阻断或抑制转录。

[0065] 在某些实施方案中,本文所述的任何内化部分结合DNA修复位点处的DNA。在一些实施方案中,内化部分结合DNA修复位点处形成的DNA泡。在一些实施方案中,内化部分结合DNA修复位点处的DNA,其中DNA修复位点由于化学治疗或放射治疗引起的DNA损伤而存在。在一些实施方案中,内化部分结合DNA修复位点处的DNA,其中DNA修复位点由于化学治疗引起的DNA损伤而存在。在一些实施方案中,化学治疗是利用DNA交联剂(例如,铂诸如顺铂、卡铂、奥沙利铂或其活性类似物)、DNA合成抑制剂(例如,甲氨蝶呤或其活性类似物)、拓扑异构酶毒药(例如,多柔比星、柔红霉素或其活性类似物)、DNA烷化剂(例如,亚硝基脲、三氮烯化合物或其活性类似物)和/或抗代谢物(例如,嘧啶类似物诸如5-氟尿嘧啶或其活性类似物)的治疗。

[0066] 在一些实施方案中,本公开的任何内化部分能够不依赖于DNA修复位点在DNA位点处结合DNA。

[0067] 在某些方面,内化部分包含抗体,包括单克隆抗体、多克隆抗体和人源化抗体。在一些实施方案中,内化部分是全长抗体。在一些实施方案中,内化部分可包括抗体片段、其衍生物或类似物,包括但不限于:包含抗原结合片段的抗体片段(例如,Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段)、单结构域抗体、骆驼化抗体和抗体片段、人源化抗体和抗体片段、人抗体和抗体片段,以及前述的多价形式;多价内化部分,包括但不限于:Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、单结构域抗体、骆驼化抗体和抗体片段、人源化抗体和抗体片段、人抗体和抗体片段,以及前述的多价形式;多价内化部分,包括但不限于:单特异性或双特异性抗体,诸如二硫键稳定的Fv片段、scFv串联体((scFv)<sub>2</sub>片段)、双链抗体、三链抗体或四链抗体,其通常是共价连接或以其它方式稳定的(即,亮氨酸拉链或螺旋稳定的)scFv片段;与所需的靶分子天然相互作用的受体分子。在一些实施方案中,抗体或其变体可以是嵌合的,例如,它们可包括来自鼠3E10抗体的可变重或轻区,但可包括来自另一物种(例如,人)的抗体的恒定区。在一些实施方案中,抗体或其变体可包含恒定区,其是几种不同抗体亚类恒定结构域的杂合体(例如,来自任何物种或物种组合的IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4的任意组合)。在一些实施方案中,抗体或其变体(例如,内化部分)包含以下恒定结构域方案:IgG2a CH1-IgG1铰链-IgG1CH2-CH3,例如,前述的任何一种可以是人IgG或鼠IgG。还设想了其它合适的组合。在其它实施方案中,抗体包括全长抗体,并且CH1、铰链、CH2和CH3来自同一恒定结构域亚类(例如,IgG1)。在一些实施方案中,抗体或其变体是包含免疫球蛋白的恒定结构域的一部分(例如,以下恒定结构域方案:IgG2a CH1-IgG1上部铰链)的抗体片段(例如,内化部分是包含抗原结合片段的抗体片段;例如,内化部分是抗原结合片段)。在一些实施方案中,抗体或其变体是包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列的抗体片段。

[0068] 在一些实施方案中,抗体或其变体包含 $\kappa$ 恒定结构域(例如,Km3同种异型的)。在一些实施方案中,抗体或其变体是包含为SEQ ID NO:12的至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列的抗体片段。相对于天然IgG结构域包含氨基酸取代以降低效应功能和/或促进产生的重链恒定结构域(无论对于全长抗体还是对于抗体片段(例如,抗原结合片段))包括在抗体和抗原结合片段的范围内。例如,相对于天然鼠或人免疫球蛋白恒定区,在重链中(诸如在重链恒定区的铰链或CH2结构域中)的一个、两个、三个或四个氨基酸取代。

[0069] 在某些实施方案中,内化部分包含抗体,并且重链包含VH区和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1、铰链、CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,重链包含VH区和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1结构域和任选的上部铰链。上部铰链可包括例如铰链区的1个、2个、3个或4个氨基酸残基。在某些实施方案中,上部铰链不包含半胱氨酸残基。在某些实施方案中,上部铰链在半胱氨酸的N-末端包含存在于天然铰链序列中的一个或多个连续残基。在某些实施方案中,重链包含CH区和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1结构域和铰链。在某些实施方案中,铰链(无论是作为全长抗体的部分存在的还是作为抗体片段存在)在对应于Kabat位置222的位置处包含C至S的取代(例如,铰链中的C222S,其中变异在对应于Kabat位置222的位置处)。换句话说,在某些实施方案中,内化部分在铰链结构域中在对应于Kabat 222的位置处包含丝氨酸残基而非半胱氨酸残基。在某些实施方案中,重链包含含有CH1、铰链、CH2和任选的CH3结构域的恒定结构域。在某些实施方案中,CH2结构域在对应于Kabat位置297的位置处包含N至Q的取代(例如,CH2结构域中的N297Q,其中变异在对应于Kabat位置297的位置处)。换句话说,在某些实施方案中,内化部分在对应于Kabat 297的位置处包含谷氨酰胺而非天冬酰胺。

[0070] 在一些实施方案中,内化部分包含免疫球蛋白的Fc区的全部或一部分。换句话说,除了抗原结合部分以外,在某些实施方案中,内化部分包含免疫球蛋白的重链恒定区的全部或部分(例如,重链恒定区的一条或两条多肽链)。如所已知的,每个免疫球蛋白重链恒定区包含四个或五个结构域。所述结构域按顺序命名如下:CH1-铰链-CH2-CH3(-CH4)。重链结构域的DNA序列在免疫球蛋白类别中具有交叉同源性,例如IgG的CH2结构域与IgA和IgD的CH2结构域同源,并且与IgM和IgE的CH3结构域同源。如本文中所用,术语“免疫球蛋白Fc区”应理解为意指免疫球蛋白链恒定区(优选免疫球蛋白重链恒定区或其部分)的羧基末端部分。例如,免疫球蛋白Fc区可包含1) CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,2) CH1结构域和CH2结构域,3) CH1结构域和CH3结构域,4) CH2结构域和CH3结构域,或5) 两个或更多个结构域和免疫球蛋白铰链区或铰链的一部分(例如,上部铰链)的组合。在某些实施方案中,内化部分还包含轻链恒定区(CL)。

[0071] 在一些实施方案中,本文所述的任何内化部分的Fc部分已被修饰,使得其不诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,Fc部分已被修饰,使得其不结合补体。在某些实施方案中,Fc部分的CH2结构域在对应于Kabat位置297的位置处包含N至Q的取代(例如,CH2结构域中的N297Q,其中变异在对应于Kabat位置297的位置处)。换句话说,在某些实施方案中,内化部分在对应于Kabat297的位置处包含谷氨酰胺而非天冬酰胺。

[0072] 在一个实施方案中,重链恒定区所源自的免疫球蛋白的类别是IgG(Ig $\gamma$ )( $\gamma$ 亚类1、2、3或4)。可使用免疫球蛋白的其它类别IgA(Ig $\alpha$ )、IgD(Ig $\delta$ )、IgE(Ig $\epsilon$ )和IgM(Ig $\mu$ )。从某

些免疫球蛋白类别和亚类选择特定免疫球蛋白重链恒定区序列以获得特定结果被认为在本领域技术人员的水平内。编码免疫球蛋白Fc区的DNA构建体的部分优选包含铰链结构域的至少一部分,和优选Fc $\gamma$ 的CH3结构域或IgA、IgD、IgE或IgM中的任一种中的同源结构域的至少一部分。此外,设想了免疫球蛋白重链恒定区内氨基酸的取代或缺失可用于本公开的实施例。一个实例是在上部CH2区域中引入氨基酸取代以产生对Fc受体具有减小的亲和力的Fc变体(Cole等(1997) J. IMMUNOL. 159:3613)。本领域普通技术人员可使用公知的分子生物学技术制备此类构建体。

[0073] 在一些实施方案中,本文公开的任何内化部分包含与重链和/或轻链氨基酸序列缀合的信号序列。在一些实施方案中,重链包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的信号序列。在一些实施方案中,轻链包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的信号序列。在一些实施方案中,信号序列缺乏N-末端甲硫氨酸。在一些实施方案中,本文公开的任何多肽缺乏N-末端甲硫氨酸。

[0074] 在一些实施方案中,内化部分是具有3E10抗体序列或与3E10结合相同表位(例如,相同靶标,诸如DNA)的抗体的互补决定区(CDR)的任何肽或抗体样蛋白。另外,还可使用转基因小鼠或其它哺乳动物来表达人源化抗体或人抗体。此种人源化可以是部分的或完全的。

[0075] 在某些实施方案中,内化部分包含单克隆抗体3E10或其抗原结合片段。在其它实施方案中,内化部分包含抗体或其抗原结合片段,诸如本文所述的任何抗原结合片段。例如,抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体3E10,或其保留细胞穿透活性的变体,或3E10或所述3E10变体的抗原结合片段。另外,抗体或其抗原结合片段可以是与3E10结合相同表位(例如,靶标,诸如DNA)的抗体,或与3E10具有实质上相同的细胞穿透活性的抗体,或其抗原结合片段。这些是可以经由ENT2通过细胞运送的剂的实例。在某些实施方案中,内化部分能够结合多核苷酸。在某些实施方案中,内化部分能够结合DNA,诸如双链平端DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于100nM的KD结合DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于100nM、小于75nM、小于50nM或甚至小于30nM的KD结合DNA。根据制造商的说明和现行方法,使用SPR或QCM或ELISA测定KD。在一些实施方案中,使用荧光偏振测定法测定KD。

[0076] 在某些实施方案中,抗原结合片段是其Fv或scFv片段。单克隆抗体3E10可由杂交瘤3E10产生并公开于美国专利第7,189,396号中,所述杂交瘤3E10以ATCC登录号PTA-2439永久保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)。已证明该抗体结合DNA。另外或可选择地,可通过在宿主细胞中表达编码3E10抗体的重链和轻链的核苷酸序列来产生3E10抗体。无论用于产生抗体的方法如何,术语“3E10抗体”或“单克隆抗体3E10”用于指抗体。类似地,当提及3E10的变体或抗原结合片段时,使用此类术语而不参考产生所述抗体的方式。在该点上,3E10通常不是由杂交瘤产生的,而是重组产生的。因此,在本申请的上下文中,除非另有说明,否则3E10抗体是指具有杂交瘤的序列或包含可变重链结构域和可变轻链结构域的抗体及其抗体片段,所述可变重链结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列(如本文所述,其相对于保藏在ATCC的3E10抗体的序列具有一个氨基酸取代),所述可变轻链结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。

[0077] 内化部分还可包含mAb 3E10的变体,诸如保留与mAb 3E10相同的细胞穿透特性的3E10的变体,以及通过突变修饰以提高其效用的变体(例如,提高的靶向特定细胞类型的能力,提高的穿透细胞膜的能力,提高的定位至细胞DNA的能力,方便的缀合位点等)。此类变体包括其中将一个或多个保守或非保守取代引入抗体的重链、轻链和/或一个或多个恒定区的变体。此类变体包括如本文提供的3E10或3E10变体的人源化形式,特别是具有提高的活性或效用的那些形式。在一些实施方案中,可在N-末端或C-末端处修饰轻链或重链。类似地,前述变体描述适用于抗原结合片段。可以通过在宿主细胞中表达一个或多个核苷酸序列来重组产生这些抗体、变体或片段中的任何一种。

[0078] 内化部分还可包括mAb 3E10的突变体,诸如保留与mAb 3E10相同或实质上相同的细胞穿透特性的3E10的变体,以及通过突变修饰以提高其效用的变体(例如,提高的靶向特定细胞类型的能力,提高的穿透细胞膜的能力,提高的定位至细胞DNA的能力,提高的结合亲和力等)。此类突变体包括其中将一个或多个保守取代引入抗体的重链、轻链和/或一个或多个恒定区的变体。已在例如美国专利第7,189,396号和WO 2008/091911(其教导通过引用整体并入本文)中表征了mAb 3E10的许多变体。

[0079] 在某些实施方案中,内化部分包含抗体或抗原结合片段或其人源化变体,所述抗体或抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:17具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、99%或100%同一性的氨基酸序列的VH结构域和/或含有与SEQ ID NO:18具有至少85%、90%、95%、96%、97%、99%或100%同一性的氨基酸序列的VL结构域。应当理解,当包括信号序列以用于表达抗体或抗体片段时,该信号序列通常被切割并且不存在于完成的嵌合多肽中(例如,信号序列通常被切割并且仅在蛋白质生产期间短暂存在)。在某些实施方案中,此类内化部分经由ENT2通过细胞运送和/或结合DNA。在某些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分(或用于此种用途的抗体或抗原结合片段)不是具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分(或用于此种用途的抗体或抗原结合片段)不是具有包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL的抗体或抗体片段。

[0080] 在某些实施方案中,内化部分能够结合多核苷酸。在某些实施方案中,内化部分能够结合(特异性结合)DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于100nM的KD结合DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于50nM的KD结合DNA。在某些实施方案中,内化部分是抗DNA抗体,诸如结合双链平端DNA的抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,内化部分是抗DNA抗体或(其)抗原结合片段,其中针对双链DNA底物(诸如本文提供的)评估KD。

[0081] 在某些实施方案中,内化部分是抗原结合片段,诸如包含SEQ ID NO:17和18的3E10(scFv)的单链Fv。在某些实施方案中,内化部分包含3E10的单链Fv(或另一种抗原结合片段),并且VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:17具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性,VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:18具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。变体3E10或其片段保留内化部分的功能。当内化部分是scFv时,VH和VL结构域通常经由接头诸如gly/ser接头连接。VH结构域可在VL结构域的N末端,反之亦然。

[0082] 在某些实施方案中,内化部分是抗原结合片段,诸如包含VH和VL的Fab。在某些实

实施方案中,内化部分是Fab(或另一种抗原结合片段,诸如Fab'),并且VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:17具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。在某些实施方案中,内化部分是Fab(或另一种抗原结合片段,诸如Fab'),并且VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:18具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。类似地设想了本文描述的我们的VH和VL结构域或其组合。在某些实施方案中,当内化部分是Fab时,重链包含免疫球蛋白恒定区的CH1结构域和上部铰链。在某些实施方案中,上部铰链相对于天然免疫球蛋白恒定区包含取代,诸如以减弱效应功能和/或消除半胱氨酸(例如,C至S)。在某些实施方案中,上部铰链不包含半胱氨酸。

[0083] 在某些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分(或用于此种用途的抗体或抗原结合片段)不是具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分(或用于此种用途的抗体或抗原结合片段)不是具有包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL的抗体或抗体片段。

[0084] 在某些实施方案中,抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)的恒定结构域包含人Fc结构域的全部或部分。在某些实施方案中,内化部分是全长抗体,并且抗体的恒定结构域包含CH1、铰链、CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,恒定结构域相对于天然免疫球蛋白包含一个或多个取代,所述取代减弱效应功能。任选地,在某些实施方案中,此类恒定结构域可在重链恒定结构域中(诸如在铰链和/或CH2结构域中)包含一个或多个(例如,1个取代、2个取代、3个取代)取代,诸如以减弱效应功能。此类取代在本领域中是已知的。

[0085] 在某些实施方案中,内化部分是抗原结合片段-包含抗原结合片段的抗体的片段。本文描述了合适的此类抗体片段,诸如scFv、Fab、Fab'等。在某些实施方案中,内化部分是抗原结合片段或全长抗体。在某些实施方案中,内化部分包含含有恒定区(CL)的轻链。在某些实施方案中,内化部分包含含有恒定区的重链,其中恒定区包含CH1结构域。在某些实施方案中,内化部分包含含有恒定区的重链和含有恒定区的轻链,其中重链恒定区包含CH1结构域。任选地,内化部分还可包含重链恒定区,所述重链恒定区包含铰链的全部或一部分(例如,上部铰链或超过上部铰链)。任选地,内化部分还可包含含有CH2和/或CH3结构域的重链。

[0086] 在一些实施方案中,内化部分包含3E10抗体的CDR中的一个或多个。在某些实施方案中,内化部分包含3E10抗体的CDR中的一个或多个,所述3E10抗体包含与SEQ ID NO:17相同的VH结构域的氨基酸序列和与SEQ ID NO:18相同的VL结构域的氨基酸序列。可使用本领域可获得的任何CDR鉴定方案来确定3E10抗体的CDR。例如,在一些实施方案中,根据Kabat等Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中所述的Kabat定义来定义3E10抗体的CDR。在其它实施方案中,根据Chothia等,1987, J Mol Biol. 196:901-917和Chothia等,1989, Nature. 342:877-883定义3E10抗体的CDR。在其它实施方案中,根据LeFranc等,2003, Development and Comparative Immunology, 27:55-77中所示的国际ImMunoGeneTics数据库(IMG)定义3E10抗体的CDR。在其它实施方案中,根据Honegger A, Pluckthun A., 2001, J Mol Biol., 309:657-670定义3E10抗体的CDR。在一些实施方案中,根据Kunik等,2012, PLoS Comput Biol. 8(2):e1002388中论述的CDR鉴定方案中的任一个来

定义3E10抗体的CDR。为了出于根据本领域已知的任何CDR鉴定方案鉴定CDR的目的对3E10抗体的残基进行编号,可将3E10抗体在抗体序列的同源区域与本领域已知的用于选定的CDR鉴定方案的“标准”编号的序列进行比对。框架残基的最大比对通常需要在编号系统中插入“间隔”残基,以用于Fv区。另外,由于种间或等位基因差异,任何给定的位点编号处的某些个体残基的身份可随抗体链的不同而变化。

[0087] 在某些实施方案中,内化部分包含如使用Kabat CDR鉴定方案确定的3E10的CDR中的至少1个、2个、3个、4个或5个(例如,SEQ ID NO:19-24中所示的CDR;内化部分是抗体或其抗原结合片段,其包含含有分别如SEQ ID NO:19-21所示的CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有分别如SEQ ID NO:22-24所示的CDR1、CDR2和CDR3的轻链;例如,内化部分中的这些CDR是如使用Kabat方案所确定的)。在某些实施方案中,内化部分包含如使用IMGT鉴定方案确定的3E10的CDR中的至少1个、2个、3个、4个或5个(例如,SEQ ID NO:27-32中所示的CDR;内化部分是抗体或其抗原结合片段,其包含含有分别如SEQ ID NO:27-29所示的CDR1、CDR2和CDR3的重链和含有分别如SEQ ID NO:30-32所示的CDR1、CDR2和CDR3的轻链;例如,内化部分中的这些CDR是如使用IMGT鉴定方案所确定的)。在某些实施方案中,内化部分包含使用Kabat CDR鉴定方案确定的3E10的所有六个CDR(例如,包含SEQ ID NO 19-24)。在某些实施方案中,内化部分包含使用IMGT鉴定方案确定的3E10的所有六个CDR(例如,其如SEQ ID NO:27-32所示)。对于任何前述内容,在某些实施方案中,内化部分是3E10结合相同表位(例如,相同的靶标,诸如DNA)的抗体和/或内化部分与3E10竞争与抗原的结合。示例性的内化部分经由ENT2靶向细胞和通过细胞运送。示例性内化部分包含结合DNA诸如双链平端DNA的抗体或抗原结合片段。

[0088] 在某些实施方案中,内化部分包含抗体片段,并且抗体片段包含抗原结合片段,诸如Fab或Fab'。换句话说,在某些实施方案中,内化部分包含Fab或Fab'。

[0089] 在某些实施方案中,内化部分与由杂交瘤3E10产生的抗体(或其抗原结合片段)竞争与DNA底物(诸如双链平端DNA)的结合,所述杂交瘤3E10以ATCC登记号PTA-2439永久地保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0090] 抗体或其片段(例如,由VH-接头-VL或VL-接头-VH编码的单链Fv片段或Fab)的制备是本领域中公知的。特别地,已在WO 2008/091911中描述了重组产生mAb 3E10抗体片段的方法。另外,产生抗体的scFv片段或Fab的方法是本领域公知的。当重组产生抗体或抗体片段时,可以使用接头。例如,柔性蛋白质区域中的典型表面氨基酸包括Gly、Asn和Ser。在SEQ ID NO:6、13或14中提供了一个示例性接头。预期含有Gly、Asn和Ser的氨基酸序列的排列满足接头序列的标准(例如,柔性的并具有最小疏水或带电荷的特性)。另一种示例性接头具有式(G4S)<sub>n</sub>,其中n是1-10的整数,诸如2、3或4。其它近中性的氨基酸,诸如Thr和Ala,也可用于接头序列。

[0091] 抗体的制备可通过许多用于产生单克隆抗体的公知方法来完成。这些方法通常包括用所需免疫原(例如,所需靶分子或其片段)免疫动物(通常是小鼠)的步骤。一旦小鼠被免疫,并且优选一种或多所需免疫原加强一次或多次后,可根据公知的方法(关于单克隆抗体产生的综述,参见,例如,Kuby, Janis, Immunology, 第3版, 第131-139页, W.H. Freeman & Co. (1997), 其该部分通过引用并入本文)制备并筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。在过去的数十年中,抗体生产变得极其稳健。组合抗体识别和噬菌体展示技术的体外方法允许扩增

和选择具有非常特异的结合能力的抗体。参见,例如,Holt,L.J.等,“The Use of Recombinant Antibodies in Proteomics,”Current Opinion in Biotechnology,2000, 11:445-449(通过引用并入本文)。这些方法通常远没有通过常规单克隆抗体制备方法制备杂交瘤麻烦。在一个实施方案中,噬菌体展示技术可用于产生对所需靶分子具有特异性的内化部分。在动物(诸如小鼠、兔、山羊或其它动物)中引发对选定的免疫原的免疫反应,并且加强所述反应以扩增免疫原特异性B细胞群。从这些B细胞或任选的单克隆或多克隆杂交瘤群中分离信使RNA。使用多聚腺苷酸引物或一种或多种鼠免疫球蛋白特异性引物(通常对与所需的VH和VL链相邻的序列具有特异性),通过已知方法反转录mRNA,以产生cDNA。通常使用VH和VL特异性引物组,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增所需的VH和VL链,并将其连接在一起,通过接头隔开。VH和VL特异性引物组可商购获得,例如从Stratagene, Inc. of La Jolla, California购得。组装的VH-接头-VL产物(编码scFv片段)被选择用于PCR并通过PCR扩增。利用包含限制性位点的引物通过PCR将限制性位点引入VH-接头-VL产物的末端,并将scFv片段插入合适的表达载体(通常是质粒)中以用于噬菌体展示。可将其它片段(诸如Fab'片段)克隆到噬菌体展示载体中以在噬菌体颗粒上进行表面表达。噬菌体可以是任何噬菌体,诸如 $\lambda$ 噬菌体,但通常是丝状噬菌体,诸如fd和M13,通常是M13。

[0092] 在某些实施方案中,在宿主细胞中重组产生抗体或抗体片段。换句话说,一旦抗体序列已知(例如,使用上述方法),就可使用标准技术重组产生抗体。

[0093] 在某些实施方案中,可以修饰内化部分以使它们对蛋白酶的切割更具抗性。例如,可以通过用D-氨基酸取代(L)构型中的一种或多种天然存在的氨基酸来增强包含多肽的内化部分的稳定性。在各种实施方案中,内化部分的氨基酸残基中的至少1%、5%、10%、20%、50%、80%、90%或100%可具有D构型。从L到D氨基酸的转换中和了存在于消化道中的许多普遍存在的肽酶的消化能力。或者,可以通过引入常规肽键联的修饰来实现包含肽键的内化部分的增强的稳定性。例如,在多肽骨架内引入环状环可以赋予增强的稳定性,以避免已知在胃或其它消化器官和血清中消化多肽的许多蛋白水解酶的作用。在其它实施方案中,内化部分的增强的稳定性可以通过在内化部分的氨基酸之间嵌入一个或多个右旋氨基酸(诸如,右旋苯丙氨酸或右旋色氨酸)来实现。在示例性实施方案中,此类修饰增加内化部分的蛋白酶抗性而不影响与所需靶分子相互作用的活性或特异性。

[0094] 本公开设想了基于任何前述或下列结构和/或功能特征的任意组合描述的内化部分(包括本公开的抗体或抗原结合片段)的用途。任何此类内化部分,诸如抗体或抗原结合片段,被认为是本公开的抗体和抗原结合片段,并且可用于本文所述的任何用途或方法,诸如以治疗拉福拉病。

[0095] 抗体或抗原结合片段诸如人源化抗体或抗原结合片段的另外实例

[0096] 在一些实施方案中,本公开提供了本文公开的任何抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段被人源化。换句话说,一类内化部分,诸如抗体或抗原结合片段,是人源化抗体或抗原结合片段。此类内化部分可被完全或部分人源化。本文提供了此类人源化内化部分的许多实例,并且所述实例还描述于W0 2015/106290中,其以其整体并入本文。

[0097] 在一个实施方案中,本公开提供了包含人源化抗体或抗原结合片段的抗体或抗原结合片段,其中人源化抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变区(VH)结构域;其中VH结构域被人源化,并且包含:



- [0098] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;
- [0099] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和
- [0100] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;并且VL被人源化,并且包含:
- [0101] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR1;
- [0102] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0103] 具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL CDR3;所述CDR是根据IMGT系统,并且其中人源化抗体或抗原结合片段相对于鼠3E10抗体的DNA结合和/或细胞穿透具有增强的DNA结合和/或细胞穿透,所述鼠3E10抗体包含具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域。在某些实施方案中,当将本公开的抗体或抗原结合片段与鼠抗体或另一种人源化抗体进行比较时,适当的比较是在具有相同结构的两种蛋白质之间(例如,将全长抗体与另一种全长抗体进行比较或将Fab与另一种Fab进行比较)。然而,在其它实施方案中,比较是鼠抗体的scFv或Fv作为比较的恒定基础。
- [0104] 在一些实施方案中,在VH或VL结构域中将天冬酰胺突变为另一种氨基酸残基,以减少人源化抗体或抗体片段的N-连接糖基化。该人源化抗体或抗体片段基于鼠亲本抗体-特别是包含重链和轻链的鼠3E10抗体,其中轻链包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL和并且重链包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH。在优选实施方案中,内化部分和片段与和鼠3E10抗体相关的细胞穿透性质相关(例如,保留至少75%、80%、85%、90%、95%或大于95%的细胞渗透特性)。在某些实施方案中,人源化抗体或抗体片段具有一种或多种优选的细胞穿透特性,诸如提高的穿透效率。在其它实施方案中,人源化抗体或抗体片段具有提高的DNA结合活性和/或不同范围的DNA底物亲和力或特异性。
- [0105] 如本文中所用,术语人源化抗体部分的”片段”或“抗原结合片段(antigen-binding fragment)”或“抗原结合片段(antigen binding fragment)”包括人源化内化部分的任何片段,其至少保留与鼠3E10抗体相关的细胞穿透和/或DNA结合性质。在本申请中,术语“片段”和“抗原结合片段”可互换使用。示例性抗体片段包括scFv片段、Fab片段(例如,Fab'或F(ab')<sub>2</sub>)等。
- [0106] 在一些实施方案中,人源化内化部分(例如,本公开的人源化抗体和抗原结合片段)不与任何异源剂直接融合或不与治疗性或毒性异源剂融合或以其它方式与治疗性或毒性异源剂连接。然而,在此类实施方案中,并且如下文更详细描述,内化部分仍可被翻译后修饰(例如,糖基化或)和/或作为组合物的一部分提供。
- [0107] 在其它实施方案中,将人源化内化部分(例如,本公开的抗体或抗原结合片段,诸如人源化抗体或抗体结合片段)与异源剂或治疗性或毒性异源剂融合。在一些实施方案中,内化部分实现异源剂至细胞中的递送(即,穿透所需细胞;跨细胞膜转运;跨细胞膜递送至至少细胞质)。在某些实施方案中,本公开涉及内化部分,其促进异源剂递送至肌肉细胞、肝细胞和/或神经元细胞以及某些其它细胞类型。该部分促进缀合物进入细胞。与鼠亲本抗体一样,本公开的人源化抗体和抗原结合片段经由ENT转运蛋白诸如ENT2转运蛋白和/或ENT3转运蛋白促进进入细胞。不受理论束缚,ENT2优先在某些细胞类型(包括肌肉(骨骼和心脏)细胞、神经元细胞和/或肝细胞)中表达。因此,缀合物(例如,其中本公开的人源化抗体或抗原结合片段与异源剂缀合的缀合物)被递送到细胞中,但通常不被普遍地递送至细胞中。相



反,缀合物可被以一定的富集水平递送至特定的组织(包括骨骼肌、心肌、隔膜、肝脏和神经元)。

[0108] 在某些实施方案中,内化部分能够结合多核苷酸(例如,本公开的抗体的靶标/抗原是DNA)。这与已知结合DNA(例如,特异性结合DNA)的3E10抗体的性质一致。在某些实施方案中,内化部分能够结合DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于100nM的KD结合DNA。在某些实施方案中,内化部分能够以小于500nM、小于100nM、小于75nM、小于50nM或甚至小于30nM、小于20nM、小于10nM或甚至小于1nM的KD结合DNA(例如,单链DNA或平端双链DNA)。可根据当前的标准方法使用表面等离子体共振 (SPR) 或石英晶体微量天平 (QCM) 或通过ELISA来测量KD。举例来说,包含具有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的VL的抗体或抗体片段以小于100nM的KD特异性结合DNA,并且为抗DNA抗体的实例。在某些实施方案中,内化部分结合双链、平端DNA,并且在或可在使用平端DNA的结合测定(参见,例如,Xu等(2009)EMBO Journal 28:568-577;Hansen等,(2012)Sci Transl Med 4:DOI 10.1126/scitranslmed.3004385)中,诸如通过ELISA、QCM或Biacore来证明DNA结合活性。在一些实施方案中,内化部分是抗DNA抗体。因此,在某些实施方案中,单独使用或与异源剂结合使用的内化部分(例如,抗体或抗原结合片段)包含可通过细胞膜进入细胞质和/或细胞核中运送并且能够与DNA结合的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段,诸如人源化抗体和抗原结合片段,基于如上所述的具有VH和VL结构域的鼠亲本3E10抗体。

[0109] 优选地,与鼠亲本抗体(包括包含鼠恒定结构域(当存在时)的鼠亲本抗体)相比,人源化抗体具有相同、实质上相同或甚至改善的细胞穿透和/或DNA结合特征。

[0110] 在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段具有与如使用IMGT系统定义的,与鼠亲本抗体(例如,包含重链和轻链的抗体,所述重链包含含有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH并且所述轻链包含含有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL)相同的CDR。在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段具有至少一个与鼠亲本抗体的重链和/或轻链的CDR不同(例如,根据Kabat,在VH CDR2和/或VL CDR2和/或VL CDR1处不同)的重链和/或轻链的CDR。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体或抗原结合片段包含VH结构域和VL结构域,所述结构域包含:

[0111] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;

[0112] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;

[0113] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;

[0114] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR1;

[0115] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL CDR2;和

[0116] 具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据IMGT系统。

[0117] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体或抗原结合片段包含VH结构域和VL结构域,所述结构域包含:

[0118] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR1;

[0119] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH CDR2;和

[0120] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据Kabat系统;和

[0121] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR1;

- [0122] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0123] 具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据IMGT系统。
- [0124] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体或抗原结合片段包含VH结构域和VL结构域,所述结构域包含:
- [0125] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;
- [0126] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和
- [0127] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据IMGT系统,以及
- [0128] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1;
- [0129] 具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0130] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据Kabat。
- [0131] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含VH结构域,所述结构域包含:
- [0132] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR1;
- [0133] 具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR2;和
- [0134] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据Kabat系统,以及
- [0135] VL结构域,所述结构域包含:
- [0136] 具有SEQ ID NO:22或38的氨基酸序列的VL CDR1;
- [0137] 具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0138] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据Kabat。
- [0139] 如在整個本申請中詳述的,可將本公開的抗体或抗原结合片段(诸如人源化抗体或抗原结合片段)与鼠亲本抗体或原始3E10抗体或其抗原结合片段进行比较。另外地或可选择地,可将本公开的抗体(或其抗原结合片段)与替代抗体和片段(例如,基于相同鼠亲本的其它人源化抗体)进行比较。在此类情况下,比较可以是与具有前述6个IMGT或Kabat CDR,但相对于本公开的人源化抗体或抗原结合片段在框架区中具有一个或多个变化的替代抗体或抗原结合片段。还设想了具有本文公开的CDR,但在一个或多个CDR中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代(例如,在一个CDR中具有一个取代,具有两个取代-两个CDR中的每一个中具有一个取代,或具有三个取代-三个CDR中的每一个中具有一个取代)的抗体或抗原结合片段。当比较活性时,可以评估经由ENT2和/或ENT3穿透细胞(诸如肌肉细胞、肝细胞和/或神经元细胞)的能力和功效。如果活性大致为鼠亲本抗体活性的70%、75%、80%、85%、90%、95%或大于约95%,则认为活性相当或本质上相同。如果特征至少好约5%,优选至少约10%(例如,大致为鼠亲本抗体或替代人源化抗体的活性的105%、110%、115%、120%、125%、130%、150%或大于150%),则相对于鼠亲本抗体,活性被认为是提高的。在某些实施方案中,如果特征至少好2倍,则相对于另一种抗体,活性被认为是提高的。在其它实施方案中,如果特征至少好3倍、4倍、5倍、6倍、8倍或10倍,则活性被认为是提高的。
- [0140] 在一些实施方案中,抗体或人源化抗体可包含抗体片段、其衍生物或类似物,包括但不限于:包含抗原结合片段的抗体片段(例如,Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段)、单结构域抗体、以及前述的多价形式;多价内化部分,包括但不限于:Fv片段、单链Fv(scFv)片段、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、单结构域抗体、骆驼化抗体和抗体片段、人源化抗体和抗体片段、人抗体和抗体片段,以及前述的多价形式;多价内化

部分,包括但不限于:单特异性或双特异性抗体,诸如二硫键稳定的Fv片段、scFv串联体((scFv) 2片段)、双链抗体、三链抗体或四链抗体,其通常是共价连接或以其它方式稳定的(即,亮氨酸拉链或螺旋稳定的)scFv片段;与所需的靶分子天然相互作用的受体分子。在某些实施方案中,抗原结合片段是scFv,并且肽接头互连VH结构域和VL结构域。在一些实施方案中,抗体或其变体可包含恒定区,所述恒定区是几种不同抗体亚类恒定结构域的杂合体(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4的任意组合)。

[0141] 在某些实施方案中,内化部分是包含抗原结合片段的抗体片段。换句话说,在某些实施方案中,内化部分不是全长抗体,而是其包含抗原结合片段的片段。在某些实施方案中,内化部分是scFv、Fab、Fab'或Fab2'。在某些实施方案中,如本文所述,内化部分是包含重链的全长抗体,所述重链包含CH1、铰链、CH2和CH3结构域,任选地诸如在铰链和/或CH2结构域中被取代以减弱效应功能。在某些实施方案中,重链包含VH结构域和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1、铰链、CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,重链包含VH结构域和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1结构域和任选的上部铰链。上部铰链可包括例如铰链区的1个、2个、3个或4个氨基酸残基。在某些实施方案中,上部铰链不包含半胱氨酸残基。在某些实施方案中,上部铰链在半胱氨酸的N-末端包含存在于天然铰链序列中的一个或多个连续残基。在某些实施方案中,重链包含CH区和恒定结构域,所述恒定结构域包含CH1结构域和铰链。在某些实施方案中,铰链(无论是作为全长抗体的部分存在的还是作为抗体片段存在)在对应于Kabat位置222的位置处包含C至S的取代(例如,铰链中的C222S,其中变异在对应于Kabat位置222的位置处)。换句话说,在某些实施方案中,内化部分在铰链结构域中在对应于Kabat 222的位置处包含丝氨酸残基而非半胱氨酸残基。在某些实施方案中,重链包含含有CH1、铰链、CH2和任选的CH3结构域的恒定结构域。在某些实施方案中,CH2结构域在对应于Kabat位置297的位置处包含N至Q的取代(例如,CH2结构域中的N297Q,其中变异在对应于Kabat位置297的位置处)。换句话说,在某些实施方案中,内化部分在对应于Kabat 297的位置处包含谷氨酰胺而非天冬酰胺。

[0142] 在某些实施方案中,如本文中公开的抗体或抗原结合片段是全长抗体,其包含重链恒定结构域的CH1、铰链、CH2和CH3以及轻链恒定结构域。在某些实施方案中,重链恒定区包含CH1、CH2和CH3结构域中的一种或多种,任选地具有铰链。

[0143] 单克隆抗体3E10可由杂交瘤3E10产生并公开于美国专利第7,189,396号中,所述杂交瘤3E10以ATCC登录号PTA-2439永久地保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)。已证明该抗体结合DNA。另外或可选择地,可通过在宿主细胞中表达编码3E10抗体的重链和轻链的核苷酸序列来产生3E10抗体。术语“3E10抗体”或“单克隆抗体3E10”在本文中也用于指鼠抗体(或抗原结合片段)而不管用于产生抗体的方法,所述鼠抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH结构域。因此,在本申请的上下文中,除非另有说明,否则3E10抗体是指具有杂交瘤的序列或包含可变重链结构域和可变轻链结构域的抗体,所述可变重链结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列(其如本文所述相对于保藏在ATCC的3E10抗体的序列具有一个氨基酸取代,并且先前被证明为保留细胞穿透和DNA结合活性),所述可变轻链结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。然而,在本公开的上下文中,用作人源化基础的亲本鼠抗体是包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH结构域的抗体。在某些实施

方案中,本公开提供了基于鼠3E10的人源化抗体。

[0144] 类似地,当提及3E10的变体或抗原结合片段时,使用此类术语而不参考产生所述抗体的方式。在这点上,通常重组产生3E10。

[0145] 人源化内化部分还可源自mAb 3E10的变体,诸如保留与mAb 3E10相同的细胞穿透特性的3E10的变体,以及通过突变修饰以提高其效用的变体(例如,提高的靶向特定细胞类型的能力,提高的穿透细胞膜的能力,提高的定位至细胞DNA的能力,方便的缀合位点等)。此类变体包括其中将一个或多个保守取代引入抗体的重链、轻链和/或一个或多个恒定区的变体。在一些实施方案中,可在N-末端或C-末端处修饰轻链或重链。此外,可以修饰抗体或抗体片段以促进与异源剂的缀合。类似地,前述变体描述适用于抗原结合片段。可以通过在宿主细胞中表达一个或多个核苷酸序列来重组产生这些抗体、变体或片段中的任何一种。此类内化部分可经由ENT转运蛋白诸如ENT2和/或ENT3通过细胞运送和/或与3E10结合相同的表位(例如,靶标,诸如DNA)。

[0146] 人源化内化部分还可源自mAb 3E10的突变体,诸如保留与mAb 3E10相同或实质上相同的细胞穿透特性的3E10的变体,以及通过突变修饰以提高其效用的变体(例如,提高的靶向特定细胞类型的能力,提高的穿透细胞膜的能力,提高的定位至细胞DNA的能力,提高的结合亲和力等)。此类突变体包括其中将一个或多个保守取代引入重链或轻链的变体。已在例如美国专利第7,189,396号和WO 2008/091911(其教导通过引用整体并入本文)中表征了mAb 3E10的许多变体。在本文提供的实例中,亲本鼠3E10包含含有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL。

[0147] 在某些实施方案中,内化部分是抗原结合片段,诸如人源化单链Fv(scFv)。在其它实施方案中,人源化抗体是Fab'片段。

[0148] 在一些实施方案中,内化部分是包含免疫球蛋白重链恒定区或其片段的抗体或抗体片段。如所已知的,每个免疫球蛋白重链恒定区包含四个或五个结构域。所述结构域按顺序命名如下:CH1-铰链-CH2-CH3(-CH4)。重链结构域的DNA序列在免疫球蛋白类别中具有交叉同源性,例如IgG的CH2结构域与IgA和IgD的CH2结构域同源,并且与IgM和IgE的CH3结构域同源。如本文中所用,术语“免疫球蛋白Fc区”应理解为意指免疫球蛋白重链恒定区(优选免疫球蛋白重链恒定区或其部分)的羧基末端部分。例如,免疫球蛋白Fc区可包含1) CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,2) CH1结构域和CH2结构域,3) CH1结构域和CH3结构域,4) CH2结构域和CH3结构域,或5) 两个或更多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合。在一个实施方案中,免疫球蛋白Fc区至少包含免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域,并且缺少CH1结构域。在一个实施方案中,重链恒定区所源自的免疫球蛋白的类别是IgG(Ig $\gamma$ )( $\gamma$ 亚类1、2、3或4)。可使用免疫球蛋白的其它类别IgA(Ig $\alpha$ )、IgD(Ig $\delta$ )、IgE(Ig $\epsilon$ )和IgM(Ig $\mu$ )。在美国专利第5,541,087号和第5,726,044号中详细地论述了适当的免疫球蛋白重链恒定区的选择。从某些免疫球蛋白类别和亚类选择特定免疫球蛋白重链恒定区序列以获得特定结果被认为在本领域技术人员的水平内。编码免疫球蛋白Fc区的DNA构建体的部分可包含铰链结构域的至少一部分,和优选Fc $\gamma$ 的CH3结构域或IgA、IgD、IgE或IgM中的任一种中的同源结构域的至少一部分。此外,设想了免疫球蛋白重链恒定区内氨基酸的取代或缺失可用于本公开的实施。在某些实施方案中,恒定区结构域是人。在一些实施方案中,本文所述的任何内化部分的Fc部分已被修饰,使得其不诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在

一些实施方案中, Fc部分已被修饰, 使得其不结合补体。在某些实施方案中, CH2结构域在对应于Kabat位置297的位置处包含N至Q的取代(例如, CH2结构域中的N297Q, 其中变异在对应于Kabat位置297的位置处)。换句话说, 在某些实施方案中, 内化部分在对应于Kabat 297的位置处包含谷氨酰胺而非天冬酰胺。

[0149] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段包含杂合重链恒定区, 即, 抗体或抗原结合片段包含选自: CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域的多个重链恒定区结构域; 其中抗体或抗原结合片段中的至少一个恒定区结构域属于与所述抗体或抗原结合片段中的另一个结构域的分类或亚类不同的免疫球蛋白的分类或亚类。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段中的至少一个恒定区结构域是IgG恒定区结构域, 并且抗体或抗原结合片段中的至少一个恒定区结构域属于不同的免疫球蛋白类别, 即, IgA、IgD、IgE或IgM恒定区结构域。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段中的至少一个恒定区结构域是IgG1恒定区结构域, 并且抗体或抗原结合片段中的至少一个恒定区结构域属于不同的IgG亚类, 即, IgG2A、IgG2B、IgG3或IgG4。合适的恒定区可以是人或来自另一物种(例如, 鼠)。本公开的人源化抗体和抗原结合片段被认为是人源化的而无论恒定区序列(重链或轻链)(如果存在的话)对应于人免疫球蛋白的恒定区序列还是对应于另一物种的恒定区序列。

[0150] 人源化内化部分或片段或变体的细胞穿透能力可用于促进异源剂的递送。源自3E10的人源化部分特别适合于此, 因为它们被证明能够有效促进至肌肉细胞、肝细胞和神经细胞的递送。因此, 人源化内化部分尤其可用于促进至受试者(诸如人患者或模型生物)中的细胞中的有效递送。在某些实施方案中, 本公开的抗体和抗原结合片段可作用于与异源剂(诸如异源蛋白质、肽、多核苷酸或小分子)进一步缀合的中间体。然而, 在其它实施方案中, 人源化内化部分或片段或变体不用于递送任何异源剂。

[0151] 抗体或其片段(例如, 由VH-接头-VL或VL-接头-VH编码的单链Fv片段)的制备是本领域中公知的。特别地, 已在WO 2008/091911中描述了重组产生mAb 3E10抗体片段的方法。另外, 产生抗体的scFv片段的方法是本领域公知的。当重组产生抗体或抗体片段时, 可以使用接头。例如, 柔性蛋白质区域中的典型表面氨基酸包括Gly、Asn和Ser。在SEQ ID NO: 6、13或14中提供了一个示例性接头。预期含有Gly、Asn和Ser的氨基酸序列的排列满足接头序列的标准(例如, 柔性的并具有最小疏水或带电荷的特性)。另一种示例性接头具有式(G4S)<sub>n</sub>, 其中n是1-10的整数, 诸如2、3或4。其它近中性的氨基酸, 诸如Thr和Ala, 也可用于接头序列。

[0152] 除了互连例如scFv的部分的接头以外, 本公开预期了使用另外的接头, 例如, 将异源剂与缀合物的抗体部分互连或将异源剂部分与缀合物的抗体部分互连。

[0153] 抗体的制备可通过许多用于产生单克隆抗体的公知方法来完成。这些方法通常包括用所需免疫原(例如, 所需靶分子或其片段)免疫动物(通常是小鼠)的步骤。一旦小鼠被免疫, 并且优选一种或多所需免疫原加强一次或多次后, 可根据公知的方法(关于单克隆抗体产生的综述, 参见, 例如, Kuby, Janis, Immunology, 第3版, 第131-139页, W.H. Freeman & Co. (1997), 其该部分通过引用并入本文)制备并筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。在过去的数十年中, 抗体生产变得极其稳健。组合抗体识别和噬菌体展示技术的体外方法允许扩增和选择具有非常特异的结合能力的抗体。参见, 例如, Holt, L.J. 等, "The Use of Recombinant Antibodies in Proteomics," Current Opinion in Biotechnology, 2000,

11:445-449(通过引用并入本文)。这些方法通常远没有通过常规单克隆抗体制备方法制备杂交瘤麻烦。在一个实施方案中,噬菌体展示技术可用于产生对所需靶分子具有特异性的内化部分。在动物(诸如小鼠、兔、山羊或其它动物)中引发对选定的免疫原的免疫反应,并且加强所述反应以扩增免疫原特异性B细胞群。从这些B细胞或任选的单克隆或多克隆杂交瘤群中分离信使RNA。使用多聚腺苷酸引物或一种或多种鼠免疫球蛋白特异性引物(通常对与所需的VH和VL链相邻的序列具有特异性),通过已知方法反转录mRNA,以产生cDNA。通常使用VH和VL特异性引物组,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增所需的VH和VL链,并将其连接在一起,通过接头隔开。VH和VL特异性引物组可商购获得,例如从Stratagene, Inc. of La Jolla, California购得。组装的VH-接头-VL产物(编码scFv片段)被选择用于PCR并通过PCR扩增。利用包含限制性位点的引物通过PCR将限制性位点引入VH-接头-VL产物的末端,并将scFv片段插入合适的表达载体(通常是质粒)中以用于噬菌体展示。可将其它片段(诸如Fab'片段)克隆到噬菌体展示载体中以在噬菌体颗粒上进行表面表达。噬菌体可以是任何噬菌体,诸如 $\lambda$ 噬菌体,但通常是丝状噬菌体,诸如fd和M13,通常是M13。

[0154] 在某些实施方案中,在宿主细胞中重组产生抗体或抗体片段。换句话说,一旦抗体序列已知(例如,使用上述方法),就可使用标准技术重组产生抗体。

[0155] 在某些实施方案中,可以修饰人源化内化部分以使它们对蛋白酶的切割更具抗性。例如,可以通过用D-氨基酸取代(L)构型中的一种或多种天然存在的氨基酸来增强包含多肽的内化部分的稳定性。在各种实施方案中,内化部分的氨基酸残基中的至少1%、5%、10%、20%、50%、80%、90%或100%可具有D构型。从L到D氨基酸的转换中和了存在于消化道中的许多普遍存在的肽酶的消化能力。或者,可以通过引入常规肽键联的修饰来实现包含肽键的内化部分的增强的稳定性。例如,在多肽骨架内引入环状环可以赋予增强的稳定性,以避免已知在胃或其它消化器官和血清中消化多肽的许多蛋白水解酶的作用。在其它实施方案中,内化部分的增强的稳定性可以通过在内化部分的氨基酸之间嵌入一个或多个右旋氨基酸(诸如,右旋苯丙氨酸或右旋色氨酸)来实现。在示例性实施方案中,此类修饰增加内化部分的蛋白酶抗性而不影响与所需靶分子相互作用的活性或特异性。

[0156] “Fab片段”由一条轻链以及一条重链的CH1和可变区组成。通常,Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。Fab可任选地包括铰链的一部分,例如上部铰链。

[0157] “Fab'片段”含有一条轻链和一条重链,所述重链在CH1与CH2结构域之间含有更多的恒定区,使得可以在两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')<sub>2</sub>分子。

[0158] “F(ab')<sub>2</sub>片段”含有两条轻链和两条重链,所述重链含有CH1与CH2结构域之间的恒定区的一部分,使得在两条重链之间形成链间二硫键。

[0159] 天然抗体通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链也具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一个末端具有可变结构域(VH),随后是许多恒定结构域(CH)。每条轻链在一个末端具有可变结构域(VL),并且在其另一个末端具有恒定结构域(CL);轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。基于轻链恒定区的氨基酸序列将轻链分类为 $\lambda$ 链或 $\kappa$ 链。 $\kappa$ 轻链的可变结构域在本文中也可表示为VK。

[0160] 本公开的抗体包括全长或完整抗体、抗体片段、天然序列抗体或氨基酸变体、人抗

体,人源化抗体(嵌合抗体形式)、翻译后修饰的抗体、嵌合抗体、免疫缀合物及其功能片段。可以在Fc区中修饰抗体以提供所需效应功能或血清半衰期。

#### [0161] 抗体的制备

[0162] 天然存在的抗体结构单元通常包含四聚体。每个这样的四聚体通常由两对相同的多肽链组成,每对具有一条全长“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一条全长“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。每条链的氨基末端部分通常包括约100至110个或更多个氨基酸的可变区,其通常负责抗原识别。每条链的羧基末端部分通常限定了负责效应功能的恒定区。人轻链通常被分类为 $\kappa$ 轻链和 $\lambda$ 轻链。重链通常被分类为 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 或 $\epsilon$ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有几个亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亚类,包括但不限于IgM1和IgM2。IgA被类似地细分为亚类,包括但不限于IgA1和IgA2。参见,例如,Fundamental Immunology, Ch.7, 2. sup.nd ed., (Paul, W., 编辑), 1989, Raven Press, N.Y. (出于所有目的通过引用整体并入)。每个轻链/重链对的可变区的组合通常形成抗原结合位点。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含以下恒定结构域方案: IgG2a CH1-IgG1铰链-IgG1CH2-CH3。还设想了其它合适的组合。在其它实施方案中,抗体包括全长抗体,并且CH1、铰链、CH2和CH3来自同一恒定结构域亚类(例如, IgG1)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含含有免疫球蛋白的恒定结构域的一部分(例如,以下恒定结构域方案: IgG2a CH1-IgG1上部铰链)的抗原结合片段。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含 $\kappa$ 恒定结构域(例如, SEQ ID NO:12)。

[0163] 每条重链和轻链的可变区通常表现出相同的一般结构,其包含由三个高变区(也称为互补决定区或CDR)连接的四个相对保守的框架区(FR)。来自每对的两条链的CDR通常通过框架区对齐,该对齐可以使得能够与特定的靶标(例如,抗原,在本公开的上下文中为DNA)结合。从N末端至C末端,轻链和重链可变区二者通常包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。对每个结构域(FR或CDR)的氨基酸分配通常符合Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(1987和1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)的定义。在某些实施方案中,特定抗体(诸如本文提供的抗体)的CDR是如由该Kabat系统所定义的CDR(例如,使用Kabat系统鉴定被提及用于抗体或抗原结合片段的CDR)。类似地,在某些实施方案中,特别是当通过Kabat系统定义或鉴定CDR时,还使用Kabat系统定义和/或鉴定FR区。然而,用于鉴定CDR和FR区域的替代系统也是可用的,包括IMGT系统(本文中描述的)。在某些实施方案中,特定抗体(诸如本文提供的抗体)的CDR是如由IMGT系统定义的CDR(例如,使用IMGT系统鉴定用于抗体或抗原结合片段的CDR)。

[0164] 随着单克隆抗体的开发,抗体作为药剂变得有用并且令人感兴趣。使用通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的任何方法产生单克隆抗体。用于制备单克隆抗体的合适方法的实例包括Kohler等(1975, Nature 256:495-497)的杂交瘤方法和人B细胞杂交瘤方法(Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; 和Brodeur等, 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York), 第51-63页)。在许多情况下,杂交瘤用于产生鼠或啮齿动物来源的初始抗体。然后可以修饰该初始抗体,诸如使用重组技术产生啮齿动物变体抗体、嵌合抗体、人源化抗体等。存在产生初始抗体的其他方法,并且此类方法是本领域已知的。然而,无论用于产生初始抗体或甚至该初始抗体的变体的方法如何,随后都可修饰任何给定的非人来源的抗体以增加其人性



(humanness)。

[0165] 无论是用于诊断、治疗还是研究目的,可以有利地增加非人抗体的人性质以使其更适合用于人受试者和细胞。可以修饰抗体以用作治疗剂。此类抗体(包括抗体片段)的实例包括嵌合抗体、人源化抗体和完全人抗体。本领域存在许多用于产生嵌合抗体、人源化抗体和人抗体的方法。在本公开的说明书中,如果VH结构域或VL结构域中的至少一个被人源化,则认为抗体是人源化的。此外,如果至少一个FR区的至少一部分的氨基酸序列相对于亲本鼠抗体被修饰,使得该部分的氨基酸序列对应于人抗体或人共有序列的氨基酸序列,则VH或VL结构域被人源化。在某些实施方案中,VH结构域的至少一个、两个、三个或四个FR区和/或VL结构域的至少一个、两个、三个或四个FR区已被修饰(全部或部分),因此它们的序列与人序列的关系更密切。在某些实施方案中,对于任何前述抗体,可以在人或非人轻链和/或重链恒定区的背景(例如,包含CL以及CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域中的一种或多种)下提供人源化抗体片段。在某些实施方案中,在人轻和/或重链恒定结构域(当存在时)的背景下提供本公开的人源化抗体或抗原结合片段。本文提供了基于3E10亲本抗体的人源化轻和重链可变结构域的许多实例。组合本文所述的任何人源化轻链可变结构域和/或重链可变结构域的抗体和抗体结合片段是本公开的抗体和抗原结合片段的示例。

[0166] 一旦确定了编码此类抗体的核苷酸序列,就可以通过重组方法产生嵌合或人源化抗体。将编码抗体的核酸引入宿主细胞中,并使用本领域公知的材料和方法表达所述核酸。

[0167] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段具有IgG1、IgG2或IgG4同种型。在本公开的某些实施方案中,抗体包含人 $\kappa$ 轻链和人IgG1、IgG2或IgG4重链。在某些实施方案中,已经克隆了本公开的抗体以在哺乳动物细胞中表达。

[0168] 无论本公开的抗体是全长抗体还是抗原结合片段,都可使本公开的抗体和抗原结合片段在细胞系中重组表达。在这些实施方案中,编码特定抗体的序列可用于转化合适的宿主细胞,诸如哺乳动物宿主细胞或酵母宿主细胞。根据这些实施方案,可使用任何已知的用于将多核苷酸引入宿主细胞的方法实现转化,所述方法包括例如将多核苷酸包装在病毒中(或病毒载体中)并用病毒(或载体)转导宿主细胞,或通过本领域已知的转染方法。通常,使用的转化程序可取决于待转化的宿主。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域公知的,并且包括但不限于葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、一种或多种多核苷酸在脂质体中的包封以及DNA至细胞核中的直接显微注射。

[0169] 根据本公开的某些实施方案,使用标准连接技术将编码本公开的重链恒定区(全部或部分)、重链可变区、本公开的轻链恒定区或轻链可变区的氨基酸序列的核酸分子插入合适的表达载体中。在优选实施方案中,将重或轻链恒定区附加到适当可变区的C末端并连接到表达载体中。通常选择在所采用的特定宿主细胞中发挥作用的载体(即,载体可与宿主细胞机构相容,从而可以进行基因的扩增和/或基因的表达)。关于表达载体的综述,参见Goeddel(编辑),1990,Meth.Enzymol.第185卷,Academic Press.N.Y.在抗体表达的背景下,重链和轻链都可以从同一载体(例如,从存在于同一载体上的相同或不同的启动子)表达,或者重链和轻链可以从不同的载体表达。在某些实施方案中,重链和轻链从被转染到同一宿主细胞中并且被共表达的不同的载体表达。无论重链和轻链在同一宿主细胞中从同一载体表达还是从不同的载体表达,链随后都可以缔合以形成抗体(或抗体片段,这取决于表



达的重链和轻链的部分)。

[0170] 在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段不与异源剂缀合。在其它实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段与异源剂缀合。在某些实施方案中,异源剂是蛋白质或肽。该蛋白质或肽可以表达为与例如重链的框内共翻译融合蛋白,并如本文所述表达。化学缀合也是可能的。除非另有说明,否则如本文详细描述缀合是指其中本公开的任何抗体或抗原结合部分与异源剂缔合或与异源剂互连而无论互连如何(例如,互连/缔合可包括化学缀合、共价键、二硫键等或其组合)的情况。在某些实施方案中,互连的至少一部分是经由共价键,诸如本公开的抗体的重链与异源剂(其可进一步与本公开的抗体的轻链缔合)之间的融合蛋白的形成。因此,本公开提供了此类缀合物和包含此类缀合物的药物组合物。缀合物是包含与异源剂缔合的本公开的抗体或抗原结合部分的分子。类似地,本公开的抗体或抗原结合片段还可包含异源剂。其中两个部分缔合或互连(例如,互连可包括化学缀合、共价键、二硫键等或其组合)的沿着分子的缀合物。在某些实施方案中,互连的至少一部分是经由共价键,诸如本公开的抗体的重链与异源剂(其可进一步与本公开的抗体或抗体片段的轻链缔合)之间的融合蛋白的形成。

[0171] 通常,用于任何宿主细胞中的表达载体都将含有用于质粒维持和用于外源核苷酸序列的克隆和表达的序列。在某些实施方案中统称为“侧翼序列”的此类序列通常包括以下核苷酸序列中的一种或多种:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完整内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、多腺苷酸化序列、用于插入编码待表达多肽的核酸的多接头区和选择标记元件。这些载体部分是公知的,并且有许多通常可用的载体可供选择并用于蛋白质的表达。可以基于所需的宿主细胞和应用容易地选择载体。

[0172] 复制起点通常是那些商购原核表达载体的一部分,并且所述起点有助于在宿主细胞中扩增载体。如果选择的载体不含有复制起点位点,则可基于已知序列化学合成复制起点位点,并将其连接至载体中。例如,来自质粒pBR322(New England Biolabs,Beverly, Mass.)的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌,并且各种病毒来源(例如,SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳头状瘤病毒诸如HPV或BPV)可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。通常,复制起点组分不为哺乳动物表达载体所需(例如,仅因为SV40起点也含有病毒早期启动子而经常使用其)。

[0173] 本公开的表达和克隆载体通常含有被宿主生物识别并与编码重链和/或轻链的分子可操作连接的启动子。启动子是位于结构基因的起始密码子上游(即,5')的非转录序列(通常在约100-1000bp内),其控制结构基因的转录。启动子依照惯例分组至以下两个类别之一:诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子可响应于培养条件的某一变化(诸如营养物的存在或不存在或温度变化)来启动升高的水平的从其控制下的DNA的转录。另一方面,组成型启动子启动连续的基因产物产生;也就是说,对基因表达几乎没有或没有控制。被多种潜在宿主细胞识别的许多启动子是公知的。合适的启动子与编码重链或轻链的DNA可操作地连接,所述重链或轻链包含本公开的抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,相同的启动子用于重链和轻链。在其他实施方案中,每种使用不同的启动子(存在于同一或不同的载体上)。

[0174] 适合与酵母宿主一起使用的启动子在本领域中也是公知的。酵母增强子有利地与

酵母启动子一起使用。适合与哺乳动物宿主细胞一起使用的合适的启动子是公知的,包括但不限于获自病毒(诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和或最优选地猿猴病毒40(SV40))的基因组的那些启动子。其它适合的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子和肌动蛋白启动子。

[0175] 可能感兴趣的其它启动子包括但不限于:SV40早期启动子区域(Bernoist和Chambon,1981,Nature 290:304-10);CMV启动子;劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中含有的启动子(Yamamoto等,1980,Cell 22:787-97);疱疹胸苷激酶启动子(Wagner等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1444-45);金属硫蛋白基因的调控序列(Brinster等,1982,Nature 296:39-42);原核表达载体诸如 $\beta$ -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3727-31)或tac启动子(DeBoer等,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:21-25)。同样令人感兴趣的是以下动物转录控制区,其表现出组织特异性并已用于转基因动物:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等,1984,Cell 38:639-46;Ornitz等,1986,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409(1986);MacDonald,1987,Hepatology 7:425-515);在胰腺 $\beta$ 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan,1985,Nature 315:115-22);在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等,1984,Cell 38:647-58;Adames等,1985,Nature 318:533-38;Alexander等,1987,Mol.Cell.Biol.7:1436-44);在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺瘤病毒控制区域(Leder等,1986,Cell 45:485-95);在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等,1987,Genes and Devel.1:268-76);在肝脏中有活性的 $\alpha$ -甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf等,1985,Mol.Cell.Biol.5:1639-48;Hammer等,1987,Science 235:53-58);在肝脏中有活性的 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等,1987,Genes and Devel.1:161-71);在骨髓细胞中有活性的 $\beta$ -珠蛋白基因控制区(Mogram等,1985,Nature 315:338-40;Kollias等,1986,Cell 46:89-94);在脑中的少突胶质细胞中有活性的髓鞘碱性蛋白基因控制区(Readhead等,1987,Cell 48:703-12);在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani,1985,Nature 314:283-86)和在下丘脑中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等,1986,Science 234:1372-78)。

[0176] 载体还可包括增强子序列以增加编码轻链或重链的DNA的转录。

[0177] 本公开的表达载体可以由起始载体诸如可商购的载体构建。所述载体可以包含或可以不含有全部所需侧接序列。当本文所述的一种或多种侧接序列并未已存在于载体中时,可单独地获得它们并将其连接至载体中。用于获得各侧接序列的方法为本领域技术人员所熟知。

[0178] 在构建载体并且将编码包含本公开的抗体或抗原结合片段的轻链或重链或轻链和重链的核酸分子插入载体的适当位点后,可将完成的载体插入合适的宿主细胞以用于扩增和/或多肽表达。表达载体至选定的宿主细胞中的转化可通过公知的方法(包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂质转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或其它已知技术)来完成。选定的方法将部分地随待使用的宿主细胞的类型而变。这些方法和其它合适的方法是本领域技术人员所公知的,且阐述于例如Sambrook等(同上)中。

[0179] 当在适当条件下培养时,宿主细胞合成本公开的抗体或抗原结合片段,随后可从

培养基中收集(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从产生其的宿主细胞中收集(如果其不是分泌的)所述抗体或抗原给片段。对适当的宿主细胞的选择将取决于各种因素,诸如所需的表达水平、合乎活性需要或为活性所必需的多肽修饰(诸如糖基化或磷酸化)和折叠成生物活性分子的容易性。

[0180] 可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域公知的,并且包括但不限于可从美国典型培养物保藏中心(A.T.C.C.)获得的许多永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)和许多其它细胞系。在另一个实施方案中,可从B细胞谱系中选择不产生其自身抗体但具有产生和分泌异源抗体的能力的细胞系(例如,小鼠骨髓瘤细胞系NS0和SP2/0)。在其它实施方案中,使用除哺乳动物细胞外的细胞,例如酵母细胞系(例如毕赤酵母属)。

[0181] 在某些实施方案中,细胞系稳定地表达本公开的抗体或抗原结合片段。在其它实施方案中,细胞系瞬时表达本公开的抗体或抗原结合片段。

[0182] 在某些实施方案中,提供了本质上纯化/分离的本公开的抗体(包括抗原结合片段)。用于本质上纯化在重组细胞培养物中生长的抗体的许多方法、过滤器和装置是可获得的。

[0183] 抗体片段还可通过酶促消化全长抗体来产生。

[0184] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段,无论是单独提供还是作为与异源剂的缀合物提供,都是可检测地标记的。在某些实施方案中,可检测标记物本身就是异源剂的实例。用于与物质(诸如可检测标记物)缀合的方法是本领域公知的。在一个实施方案中,连接的物质是可检测的标记物(在本文中也称为报道分子)。用于连接的合适物质包括但不限于荧光团、发色团、染料、放射性同位素及其组合。将另一种物质缀合或共价连接至抗体的方法是本领域公知的。

[0185] 术语“标记”或“标记的”是指可检测标记物的掺入,例如通过掺入放射性标记的氨基酸或连接至生物素部分的多肽,所述生物素部分可以通过标记的抗生物素蛋白(例如,优选包含可检测的标记物诸如荧光标记物、化学发光标记物或可通过光学或比色法检测的酶活性的链霉抗生物素蛋白)检测。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的,并且可以有利地用于本文公开的方法中。用于多肽的标记物的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )。在某些实施方案中,标记物是放射性同位素。合适的放射性物质的实例包括但不限于碘( $^{121}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、铟( $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{115\text{m}}\text{In}$ )、锝( $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、铈( $^{201}\text{Ti}$ )、镓( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、钯( $^{103}\text{Pd}$ )、钼( $^{99}\text{Mo}$ )、氙( $^{135}\text{Xe}$ )、氟( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 和 $^{97}\text{Ru}$ )。

[0186] 标记物的其它实例包括荧光标记物(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明或镧系元素磷光体)、酶标记物(例如,辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记物、半抗原标记物诸如生物素基团,以及由第二报道分子识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合部位、金属结合结构域、表位标签)。在某些实施方案中,标记物通过各种长度的间隔臂连接以减少潜在的空间位阻。

[0187] 当存在时,无论特定标记物如何,技术人员都可以选择合适的标记物来有利于纯化、诊断或研究用途。在其它实施方案中,异源剂是治疗性分子,并且不包括可检测的标记

物和/或表位标签,或者除了可检测的标记物和/或表位标签以外还包括治疗性分子。

[0188] “人源化”是指这样的免疫球蛋白(诸如抗体),其中重链和轻链的直接参与抗原结合的氨基酸(所谓的互补决定区(CDR))不一定为人来源,而免疫球蛋白分子的一条或两条链的可变结构域的其余部分的至少一部分(例如,FR1、FR2、FR3、FR4中的一个或多个)(所谓的可变重链和/或轻链的框架区)和任选的重链和轻链的恒定区(如果存在的话)被修饰,使得它们的氨基酸序列更接近地对应于人序列。

[0189] 如本文中所用,在两条链或更多条链的抗体的情况下,“人源化抗体”是其中至少一条链被人源化的抗体。人源化抗体链具有这样的可变区,其中一个或多个框架区是人或相对于鼠亲本含有改变,使得一个或多个框架区相比于鼠亲本更接近人。单链的人源化抗体是其中链具有可变区的抗体,在所述可变区中一个或多个框架区是人或相对于鼠亲本含有改变,使得一个或多个框架区更接近于人。人源化抗体链或抗原结合片段的可变区的非人部分源自非人来源,特别是非人抗体(通常是啮齿动物来源的)。对人源化抗体的非人贡献通常以至少一个CDR区的形式提供,所述CDR区散布在源自一种(或多种)人免疫球蛋白的框架区之间。另外,可以改变框架支持残基以保持结合亲和力。因此,如本领域所理解的,特定链上的整个框架区或所有框架区不需要包含对应于人抗体的残基,以使抗体被认为是人源化的。

[0190] “人源化抗体”还可包含恒定区(例如,在轻链的情况下至少一个恒定区或其部分,以及在某些实施方案中,在重链的情况下为三个恒定区)。如果存在,人源化抗体的恒定区通常是人源的。

[0191] 在某些实施方案中,通过首先对鼠3E10轻链或重链抗体序列(例如,分别SEQ ID NO:18和17的鼠3E10抗体轻链和重链氨基酸)进行序列数据库检索(例如,BLAST)以鉴定在序列相似性方面最接近的人免疫球蛋白 $\kappa$ 或重链同源物(例如,前1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个最接近的免疫球蛋白 $\kappa$ 或重链同源物)来产生人源化抗体。最接近的人免疫球蛋白 $\kappa$ 或重链同源物被认为是 $\kappa$ 或重链CDR移植的候选者。在某些实施方案中,然后使用序列比对工具(诸如载体NTi序列比对工具)来分析由来自3E10 $\kappa$ 或重链的CDR和最靠前的人免疫球蛋白 $\kappa$ 或重链同源物中任一种的框架区组成的嵌合氨基酸序列。

[0192] 通常,如本文中所用,人源化抗体包含一个或两个可变结构域,其中完整或部分CDR区对应于源自非人亲本序列的部分,并且其中完整或部分FR区源自人免疫球蛋白序列。然后,人源化抗体可任选地包含免疫球蛋白的恒定区(Fc)(特别是选定的参考人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。

[0193] 在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段(例如,抗体或抗原结合片段,诸如人源化抗体或抗原结合片段)包含3E10抗体的一个或多个CDR。在某些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含3E10抗体的一个或多个CDR,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH结构域和含有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL结构域。Kabat或IMGT CDR中的任一个或两者可用于指代或描述抗体。可使用本领域可获得的任何CDR鉴定方案来确定3E10抗体或本公开的抗体的CDR,并且此类方案可以用于描述抗体。例如,在某些实施方案中,根据Kabat等Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)中所述的Kabat定义来定义CDR。在其它实施方案中,根据Chothia等,1987,J Mol Biol.196:

901-917和Chothia等,1989,Nature.342:877-883定义CDR。在其它实施方案中,根据LeFranc等,2003,Development and Comparative Immunology,27:55-77中所述的国际ImMunoGeneTics数据库 (IMGT) 定义CDR。在其它实施方案中,根据Honegger A,Pluckthun A.,2001,J Mol Biol.,309:657-670定义3E10抗体的CDR。在一些实施方案中,根据Kunik等,2012,PLoSComput Biol.8(2):e1002388中论述的CDR鉴定方案中的任一个定义CDR。在某些实施方案中,与鼠亲本抗体相比,本公开的抗体和抗原结合片段在Kabat CDR中包含一个或多个差异。例如,在某些实施方案中,与鼠亲本抗体相比,本公开的抗体和抗原结合片段在VH CDR2和/或VL CDR2以及任选地在VL CDR1处不同。然而,在某些实施方案中,此类抗体共享鼠亲本抗体的IMGT CDR。

[0194] 在本文中,VH和VL结构域中残基的氨基酸位置由相对于例如SEQ ID NO:17或18的线性序列被提及。因此,可以相对于SEQ ID NO:17或18的一个或多个对应的氨基酸位置描述本公开的抗体或抗原结合片段的VH和/或VL的序列。例如,VH或VL结构域可在特定氨基酸位置处包括改变,并且该位置可以对应于SEQ ID NO:17或18中的特定位置。

[0195] 然而,CDR鉴定方案还提供了可用于帮助抗体之间比较的编号系统。虽然本文中并没有特别使用,但是本领域技术人员可使用统一编号系统而不是通过参考线性序列,来容易地使用可用编号方案来提及本文所述的CDR。在某些实施方案中,为了出于根据本领域已知的任何CDR鉴定方案鉴定CDR的目的而对抗体的残基进行编号,可将抗体在抗体序列的同源区域与本领域已知的用于选定的CDR鉴定方案的“标准”编号的序列进行比对。框架残基的最大比对通常需要在编号系统中插入“间隔”残基,以用于Fv区。另外,由于种间或等位基因差异,任何给定的位点编号处的某些个体残基的身份可随抗体链的不同而变化。用于对残基进行编号的这些统一方案在本文中未明确使用,但可基于所公开的序列和鉴定的CDR容易地使用。

[0196] 在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段(例如,本公开的人源化抗体或抗原结合片段)包含Kabat CDR。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基31-35的VH CDR1、对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基50-66的VH CDR2和/或对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基99-105的VH CDR3。我们注意到该氨基酸残基的编号参考SEQ ID NO:17的线性氨基酸序列。本领域技术人员可容易地使用Kabat系统以使用Kabat编号鉴定这些残基。在某些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基24-38的VL CDR1、对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基54-60的VL CDR2和/或对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基93-101的VL CDR3。我们注意到该氨基酸残基的编号参考SEQ ID NO:18的线性氨基酸序列。本领域技术人员可容易地使用Kabat系统以使用Kabat编号鉴定这些残基。

[0197] 在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段包含使用IMGT系统定义的CDR。在一些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基26-33的VH CDR1、对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基51-58的VH CDR2和/或对应于SEQ ID NO:17的氨基酸残基97-105的VH CDR3。我们注意到该氨基酸残基的编号参考SEQ ID NO:17的线性氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基27-36的VL CDR1、对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基54-56的VL CDR2和/或对应于SEQ ID NO:18的氨基酸残基93-101的VL CDR3。我们注意到该氨基酸残基的编号参考SEQ ID

NO:18的线性氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含所有6个前述CDR。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含前述CDR中的4个CDR,以及如SEQ ID NO:37中所示的VH CDR2和如SEQ ID NO:39中所示的VL CDR 2。

[0198] 在某些实施方案中,本公开的抗体和抗原结合片段包含如使用Kabat CDR鉴定方案确定的3E10的CDR中的至少1个、2个、3个、4个或5个(例如,SEQ ID NO:19-24中所示的CDR)。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包含如SEQ ID NO:37中所示的VH CDR2和/或如SEQ ID NO:38中所示的VL CDR2和/或如SEQ ID NO:39中所示的VL CDR1。在某些实施方案中,抗体和抗原结合片段包含如使用IMGT鉴定方案确定的3E10的CDR中的至少1个、2个、3个、4个或5个(例如,SEQ ID NO:27-32中所示的CDR)。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含如使用Kabat CDR鉴定方案确定的3E10的所有六个CDR(例如,包含SEQ ID NO 19-24)。在其它实施方案中,抗体或抗原结合片段包含如使用IMGT鉴定方案确定的3E10的所有六个CDR(例如,其是如SEQ ID NO:27-32所示的)。对于任何前述内容,在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段是与3E10结合相同表位(例如,相同的靶标,诸如DNA)的抗体和/或内化部分与3E10竞争与抗原(例如,DNA)的结合。示例性抗体和抗原结合片段可以经由ENT2和/或ENT3通过细胞运送。在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含前述CDR中的6个,但在一个或多个CDR中包含1个、2个、3个或4个氨基酸取代。例如,抗体或抗原结合片段包含3个CDR取代:三个CDR的每一个中有一个取代。

[0199] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段(例如,本公开的人源化抗体或抗原结合片段)包含在一个或多个使用IMGT编号(例如,在一个或多个具有SEQ ID NO:27-32的任一个的氨基酸序列的CDR中,诸如具有1至2个、1至3个、1至4或1至5个改变)或Kabat编号(例如,在一个或多个具有SEQ ID NO:19-24的任一个的氨基酸序列的CDR中,诸如具有1至2个、1至3个、1至4个或1至5个改变)的CDR中具有至少一个、两个、三个、四个或五个氨基酸改变的氨基酸序列。在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段(例如,本公开的人源化抗体或抗原结合片段)包含在一个或多个使用Kabat编号(例如,在一个或多个具有SEQ ID NO:19-24的任一个的氨基酸序列的CDR中,诸如具有2个、3个、4或5个改变)的CDR中具有至少一个、两个、三个、四个或五个氨基酸改变的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含VL结构域,如与SEQ ID NO:18的线性氨基酸序列相比并相对于其所编码的,所述VL结构域包含以下氨基酸改变中的一个或多个改变:M37L、H38A或E59Q。在一些实施方案中,本文公开的任何抗体或抗原结合片段包含VH结构域,如与SEQ ID NO:17的线性氨基酸序列相比并相对于其所编码的,所述VH结构域包含T63S改变。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含VL结构域(如与SEQ ID NO:18的线性氨基酸序列相比较并相对于所述序列所编码的,其包含E59Q改变)和VH结构域(如与SEQ ID NO:17的线性氨基酸序列相比并相对于其所编码的,所述VH结构域包含T63S改变)。

[0200] 不希望受理论束缚,本公开的令人惊讶的发现之一是产生抗体和抗原结合片段的能力-所述抗体和抗原结合片段与鼠3E10相比具有提高的DNA结合活性,并且还在某些Kabat CDR中包含氨基酸改变(此处为取代)。此外,在某些实施方案中,这些具有CDR取代的改进的抗体在某些实施方案中也被人源化。

[0201] 在某些实施方案中,本公开的内化部分,诸如本文所述的抗体或抗体片段,与具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或scFv或Fv相

比,以更高的亲和力结合给定的DNA底物。在某些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分不是具有由以ATCC登录号PTA-2439保藏在ATCC的杂交瘤产生的抗体的VH和VL的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,用于本公开的方法的内化部分不是鼠抗体或抗体片段。

[0202] 在某些实施方案中,如使用KabatCDR鉴定方案所确定的,本公开的抗体和抗原结合片段包含含有至少一个与SEQ ID NO:17中所示的相应的CDR不同的CDR的可变重链结构域。在一些实施方案中,至少一个不同的CDR是如SEQ ID NO:37中所示的VH CDR2。

[0203] 在某些实施方案中,如使用KabatCDR鉴定方案所确定的,本公开的抗体和抗原结合片段包含含有至少一个与SEQ ID NO:18中所示的相应的CDR不同的CDR的可变轻链结构域。在一些实施方案中,至少一个不同的CDR是如SEQ ID NO:38中所示的VL CDR1。在一些实施方案中,至少一个不同的CDR是如SEQ ID NO:39中所示的VL CDR2。

[0204] 当受者(acceptor)源自人免疫球蛋白时,可以任选地选择人框架序列,并选择最同源的框架序列作为受者,所述人框架序列是基于其与供体框架序列的同源性通过将供体框架序列与人框架序列集合中的各种人框架序列比对而选择的。受者人框架可以来自或源自可在公共数据库中获得的人抗体种系序列。无论用于产生人源化抗体或抗体片段的具体方法如何,必须评估抗体以确保其(i)保留亲本鼠抗体的所需功能(或任选地具有增强的功能);(ii)没有令其难以制造或使用的有害特性;并且优选地(iii)与鼠亲本抗体相比具有一种或多种有利特性。对于任何特定的人源化抗体,是否以及在何种程度上发生任何或所有这些预测都是不可预测和不确定的。在将取代也被引入CDR中的情况下,尤其如此。此外,在一小组人源化抗体或抗体片段中,一些可能不具有所需活性,并且一种或多种具有所需活性的抗体与其它人源化抗体相比可具有有利特性。这也是不可预测和不确定的。

[0205] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域;其中VL结构域被人源化并且包含:

[0206] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;

[0207] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和

[0208] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据IMGT系统;

[0209] 并且VH被人源化,并且包含:

[0210] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR1;

[0211] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL CDR2;和

[0212] 具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL CDR3;所述CDR是根据IMGT系统,并且其中抗体或抗原结合片段相对于鼠3E10抗体的DNA结合和/或细胞穿透具有增强的DNA结合和/或细胞穿透,所述鼠3E10抗体包含具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域。

[0213] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域;其中VH结构域包含:

[0214] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR1;

[0215] 具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR2;和

[0216] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据Kabat系统;

[0217] 并且VL包含:

[0218] 具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VL CDR1;



- [0219] 具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0220] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据Kabat系统;其中抗体或抗原结合片段结合DNA。
- [0221] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域;其中VH结构域包含:
- [0222] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR1;
- [0223] 具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR2;和
- [0224] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VH CDR3,所述CDR是根据Kabat;
- [0225] 并且VL包含:
- [0226] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1;
- [0227] 具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VL CDR2;和
- [0228] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据Kabat;
- [0229] 其中抗体或抗原结合片段结合DNA。
- [0230] 在某些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段穿透细胞(例如,可以穿过质膜并进入细胞运送,所述细胞诸如表达ENT2的细胞)。
- [0231] 在一些实施方案中,VH结构域被人源化。在一些实施方案中,VL结构域被人源化。
- [0232] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含VL结构域,所述VL结构域包含SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35因相对于SEQ ID NO:35在如通过IMGT系统所定义的框架区中存在总共1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的氨基酸序列。在其它实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3因相对于SEQ ID NO:3在如通过IMGT系统所定义的框架区中存在总共1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。
- [0233] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含VH结构域,所述VH结构域包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:33因相对于SEQ ID NO:33在如通过IMGT系统所定义的框架区中存在总共1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34因相对于SEQ ID NO:34在如通过IMGT系统所定义的框架区中存在总共1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2因相对于SEQ ID NO:2在如通过IMGT系统所定义的框架区中存在总共1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代、插入和/或缺失而不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序。在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序。
- [0234] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域;其中VL结构域被人源化并且包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;其中VH结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。



[0235] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VL结构域被人源化并且包含SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列;其中VH结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0236] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域被人源化并且包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0237] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域被人源化并且包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0238] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0239] 在某些实施方案中本公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域被人源化并且包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0240] 在某些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段的VH结构域包含:

[0241] 具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;

[0242] 具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和

[0243] 具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3。

[0244] 在某些实施例中,本文所述的抗体或抗原结合片段的VL结构域包含:

[0245] 具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR1;

[0246] 具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VL CDR2;和

[0247] 具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL CDR3。

[0248] 在一些实施方案中,本文公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VL结构域包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列;其中VH结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。在一些实施方案中,本文公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VL结构域包含SEQ ID NO:35中所示的氨基酸序列;其中VH结构域包含SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。在一些实施方案中,本文公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。在一些实施方案中,本文公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变 (VL) 结构域和重链可变 (VH) 结构域;其中VH结构域包含SEQ ID NO:33中所示的氨基酸序列;其中VL结

构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。在一些实施方案中,本文公开的抗体或抗原结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域;其中VH结构域包含SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列;其中VL结构域包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的三个CDR,其中抗体或抗原结合片段结合DNA并穿透细胞。

[0249] 在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的V L结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的人源化V L结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的人源化V L结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的人源化VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的人源化VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的人源化VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的人源化VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的人源化VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的人源化VL结构域。在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含:a)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH结构域,和b)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的人源化VL结构域。

[0250] 在一些实施方案中,本公开的抗体或抗原结合片段包含信号序列。在一些实施方案中,信号序列与本文公开的任何VL序列(例如,SEQ ID NO:3)的N末端部分缀合。在一些实施方案中,与轻链缀合的信号序列是SEQ ID NO:5。在一些实施方案中,信号序列与本文公开的任何VH序列(例如,SEQ ID NO:2)的N末端部分缀合。在一些实施方案中,与重链缀合的信号序列是SEQ ID NO:4。应当理解,当包含信号序列以用于表达抗体或抗体片段时,该信号序列通常被切割并且不存在于完最终的多肽中(例如,信号序列通常被切割并且仅在蛋白质产生期间短暂存在)。

[0251] 在一些实施方案中,如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的,本文所述的本公开的任何抗体或抗原结合片段的VH结构域包含以下氨基酸改变中的一个或多个:V5Q、E6Q、L11V、V12I、K13Q、R18L、K19R、V37I、E42G、A49S、T63S、A75S、F80Y、T84N、S88A、M93V、T111L或L112V。换句话说,在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段在对应于前述位置的位置处包含一个或多个氨基酸改变,其中对应位置是与SEQ ID NO:17相比较的。在一些实施方案中,如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的,VH结构域包

含以下氨基酸改变中的一个或多个：V5Q、L11V、K13Q、R18L、K19R、V37I、E42G、A49S、T63S、A75S、F80Y、T84N、M93V、T111L或L112V。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VH结构域包含至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个或至少17个所述改变。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VH结构域中的至少一个改变是V5Q改变。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VH结构域中的至少一个改变是E6Q改变。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VH结构域中的至少一个改变是L11V改变。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:17的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VH结构域中的至少一个改变是V37I改变。在某些实施方案中，VH结构域在对应于SEQ ID NO:17的氨基酸位置88的氨基酸位置处保留丝氨酸。在某些实施方案中，VH结构域在对应于SEQ ID NO:17的氨基酸位置12的氨基酸位置处保留缬氨酸。在某些实施方案中，VH结构域在对应于SEQ ID NO:17的氨基酸位置47的氨基酸位置处保留色氨酸。设想了前述的所有可操作的组合，以及  
与本文针对VL提供的任何方面和实施方案的组合。前述氨基酸残基的编号参考给定的VH的线性氨基酸序列，并且本公开设想了在对应于鼠亲本VH或VL中所述位置的位置处具有一个或多个所述取代的人源化抗体和抗原结合片段。

[0252] 在所述或本文公开的任何方面和实施方案的某些实施方案中，如与SEQ ID NO:18的氨基酸序列相比并参考其所编码的，本文所述的任何人源化抗体或抗原结合片段的VL结构域包含以下氨基酸改变中的一个或多个：V3Q、L4M、A9S、A12S、V13A、L15V、Q17D、A19V、S22T、M37L、H38A、G45E、Q46K、P47A、E59Q、A64S、H76T、N78T、H80S、P81S、V82L、E83Q、E84P、A87V、A87F或G104A。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:18的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VL结构域包含以下氨基酸改变中的一个或多个：V3Q、L4M、A9S、A12S、V13A、L15V、Q17D、A19V、G45E、Q46K、P47A、E59Q、A64S、H76T、N78T、H80S、P81S、V82L、E83Q、E84P、A87V或G104A。在某些实施方案中，如与SEQ ID NO:18的氨基酸序列相比并参考其所编号的，VL结构域包含至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个或至少22个所述氨基酸改变。

[0253] 应当理解，特定位置处的任何前述变化是相对于SEQ ID NO:18或17中所示的氨基酸序列而提及的。相对于SEQ ID NO:18或17的氨基酸序列，本公开的抗体或抗原结合片段可在对应位置处包含一个或多个此类氨基酸改变。举例来说，在某些实施方案中，VH结构域在对应于SEQ ID NO:17的位置11的位置处包含L至V的改变（例如，L11V改变）。这是还可如何描述所有前述改变的示例，并且明确地设想了此类描述。举例来说，在某些实施方案中，VL结构域在对应于SEQ ID NO:18的位置3的位置处包含V至Q的改变（例如，V3Q改变）。

[0254] 在某些实施方案中，VL结构域在对应于SEQ ID NO:18的氨基酸位置80和81的每一个氨基酸位置处包含丝氨酸。在某些实施方案中，VL结构域在对应于SEQ ID NO:18的氨基酸位置53的氨基酸位置处保留赖氨酸。在某些实施方案中，VL结构域不具有以下氨基酸组合中的任何一种或多种：

[0255] a) 在对应于SEQ ID NO:18的氨基酸位置80和81的氨基酸位置处分别为天冬酰胺和丝氨酸；或

[0256] b) 在对应于SEQ ID NO:18的氨基酸位置80和81的氨基酸位置处分别为天冬酰胺和脯氨酸;或

[0257] c) 在对应于SEQ ID NO:18的氨基酸位置80和81的氨基酸位置处分别为天冬酰胺和脯氨酸。设想了前述的所有可操作的组合,以及与本文针对VH提供的任何方面和实施方案的组合。前述氨基酸残基的编号参考给定的VH的线性氨基酸序列,并且本公开设想了在对应于鼠亲本VH或VL中所述位置的位置处具有一个或多个所述取代的人源化抗体和抗原结合片段。

[0258] 在一些实施方案中,人源化内化部分(例如,包含含有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域和含有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域的人源化抗体或抗原结合片段)与至少一种更优(如与参考非人源化内化部分(例如,小鼠亲本3E10抗体)相比)的生理或生物特性相关。在其它实施方案中,人源化内化部分与至少两种更优的(如与参考非人源化内化部分相比)生理或生物特性相关。在其它实施方案中,人源化内化部分与至少三种更优的(如与参考非人源化内化部分(例如,鼠亲本3E10抗体)相比)生理或生物特性相关。在一些实施方案中,参考非人源化内化部分包含鼠亲本抗体,其包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,参考人源化内化部分是包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的抗体。在一些实施方案中,参考内化部分是包含SEQ ID NO:41的VH氨基酸序列的和SEQ ID NO:40的VL氨基酸序列的人源化抗体或抗原结合片段。

[0259] 在某些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段被人源化并且与至少一种更优的(如与鼠抗体(所述鼠抗体包含含有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的VH结构域)相比和/或与替代抗体或其抗原结合片段(其中所述替代抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的CDR的VL结构域和含有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的CDR的VH结构域)相比)生物或生理特性相关;并且其中所述替代抗体或片段不包含含有SEQ ID NO:3或35的氨基酸序列的VL结构域,和/或其中所述替代抗体或片段不包含含有SEQ ID NO:2、33或34中的任一个的氨基酸序列的VH结构域;或者,在一些实施方案中,其中所述替代抗体或片段不包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VL结构域,和/或其中所述替代抗体或片段不包含含有SEQ ID NO:2中的任一个的氨基酸序列的VH结构域。

[0260] 在一些实施方案中,本公开的人源化内化部分(例如,人源化抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列的轻链可变(VL)结构域和含有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的重链可变(VH)结构域)与至少一种更优的(如与替代内化部分或其片段(例如,基于同一亲本鼠抗体并且任选地具有相同CDR的不同人源化抗体)相比)生理或生物特性相关。在其它实施方案中,本公开的人源化内化部分与至少两种更优的(如与替代内化部分(例如,基于同一亲本鼠抗体并且任选地具有相同CDR的不同人源化抗体)相比)生理或生物特性相关。在其它实施方案中,本公开的人源化内化部分与至少三种更优的(如与替代内化部分(例如,基于同一亲本鼠抗体并且任选地具有相同CDR的不同人源化抗体)相比)生理或生物特性相关。在一些实施方案中,替代抗体是人源化抗体所源自的亲本抗体(例如,亲本鼠抗体)。在一些实施方案中,替代抗体是另一种人源化抗体,其源自3E10抗体,但具有与本公开的人源化内化部分或其抗原结合片段不同的氨基酸序列。在一些实施方案

中,与鼠亲本抗体和/或替代人源化抗体相比,本公开的抗体或抗原结合片段具有一种或多种改进的特征。在一些实施方案中,与本公开的抗体相比,替代人源化抗体在Kabat CDR中具有一个、两个或三个氨基酸取代。在一些实施方案中,替代内化部分或其片段包含:

[0261] 具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR1;

[0262] 具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH CDR2;

[0263] 具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VH CDR3;

[0264] 具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR1;

[0265] 具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR2;和

[0266] 具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL CDR3,所述CDR是根据Kabat定义的,但不包含存在于本公开的人源化内化部分或其片段(例如,包含SEQ ID NO:2、3或38-40中的任一个的氨基酸序列的人源化内化部分或其片段)中的相同支架氨基酸序列。

[0267] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与人患者中降低的免疫原性(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在人患者中的免疫原性相比)相关。技术人员熟悉用于测定抗体的免疫原性的多种测定。在优选实施方案中,本公开的人源化抗体与人患者中降低的免疫原性相关,但保留与鼠3E10抗体相关的细胞穿透特性。

[0268] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在生理上可接受的载体中增加的溶解度(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在相同类型的生理上可接受的载体中的溶解度相比)相关。如本文中所用,生理上可接受的载体包括水、乙醇、多元醇(诸如,甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油诸如橄榄油,和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与在生理上可接受的载体中高(如与在相同类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的溶解度相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的溶解度的常规实验。溶解度测定的实例包括标准浊度或光散射测定、商业溶解度测定诸如OptiSol™溶解度测定试剂盒(DiLyx, Seattle, WA),或者可利用Bondos等,2003, Analytical Biochemistry, 316:223-231中描述的蛋白质溶解度测定筛选。

[0269] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在一种类型的细胞中的较高的表达水平(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型细胞中的表达水平相比)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与细胞中高(如与非人源化或替代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中的表达水平相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的表达水平相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的表达水平的常规实验。

[0270] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在细胞类型中的较低的(如与在同一类型细胞中的非人源化或替代抗体或抗原结合片段相关的毒性相比)毒性(例如,细胞毒性和/或遗传毒性)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与低(如与非人源化或替

代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中的毒性相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的毒性相关。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,细胞是人细胞。在一些实施方案中,细胞存在生物体诸如哺乳动物中。在一些实施方案中,细胞是人生物体中的人细胞。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的毒性的常规实验。例如,本公开的人源化内化部分或片段以及非人源化或替代内化部分或其片段的毒性可以在体外细胞或细胞培养物,诸如在源自人细胞的细胞或细胞培养物中进行测试,或者可以在体外动物模型诸如小鼠或大鼠中进行测试。

[0271] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在生理上可接受的载体中减少的聚集(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型的生理上可接受的载体中的聚集相比)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与在生理上可接受的载体中少(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的聚集相关。在一些实施方案中,药学上可接受的载体中的人源化抗体或抗原结合片段与在至少1小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、2天、5天、1周、2周、4周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年的时期后减少的聚集相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的聚集的常规实验。聚集测定的实例包括标准浊度或光散射测定(例如,,A600nm测定)、目视检查、SDS-PAGE、商业聚集测定诸如OptiSol™聚集测定试剂盒(DiLynx,Seattle,WA)、HP-SEC分析,或者可利用Bondos等,2003,AnalyticalBiochemistry,316:223-231中描述的蛋白质聚集测定筛选。

[0272] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或抗原结合片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在生理上可接受的载体中增强的稳定性(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型的生理上可接受的载体中的稳定性相比)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与在生理上可接受的载体中高(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的稳定性相关。在一些实施方案中,药学上可接受的载体中的人源化抗体或抗原结合片段与在至少1小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、2天、5天、1周、2周、4周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年的时期后增强的(与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)稳定性相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的稳定性的常规实验。例如,技术人员可在储存在生理学上可接受的载体中的各种间隔后测试人源化和非人源化或替代内化部分或其片段的稳定性。商业测定诸如ProteoStat™热变换稳定性测定(Enzo,Farmingdale,NY)可用于评估所述部分或其片段的稳定性。或者,可通过HP-SEC或通过SDS-PAGE分析来测定所述部分或其片段的稳定性。

[0273] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或抗原结合片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与提高的细胞穿透(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段的细胞穿透相比)相关。在一些实施方案中,提高的穿透归因于经由ENT转运蛋白(例如,ENT2和/或ENT3转运蛋白)内化的人源化内化部分或抗原结合片段的效率提高。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与高(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、

50%、75%、100%、150%、200%或300%的细胞穿透相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的细胞穿透的常规实验。例如,可以标记(例如荧光或放射性标记)人源化内化部分或其片段,并将其施用于细胞或细胞培养物以测定人源化内化部分或其片段的细胞穿透。或者,可向细胞或细胞培养物施用人源化内化部分或片段,然后用第二试剂(例如,荧光标记的或放射性标记的二抗)对其检测,以测定人源化内化部分或其片段的细胞穿透。

[0274] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中减少的糖基化(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一细胞类型中的糖基化相比)相关。在一些实施方案中,在VH或VL结构域中将天冬酰胺突变为另一种氨基酸残基,以减少人源化抗体或抗体片段的N-连接糖基化。在其它实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中增加的糖基化(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一细胞类型中的糖基化相比)相关。在其它实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中特定的糖基化模式相关,所述糖基化模式与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型细胞中的糖基化模式不同。例如,人源化内化部分或抗原结合片段在某一细胞类型中可能是半糖基化的,而非人源化或替代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中不是半糖基化的。在一些实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段在某一细胞类型中被特定的糖基化基团翻译后修饰,所述翻译后修饰与非人源化或替代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中的翻译后修饰不同。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的糖基化模式的常规实验。用于测试内化部分及其片段的糖基化水平和模式的实验的实例包括Mohammad,2002,Protein Protocols Handbook,第795-802页中描述的方案;涉及质谱和/或HPLC的标准程序;GLYCO-PROTM(Sigma-Aldrich);和Qproteome Total Glycoprotein Kit™(Qiagen,Valencia,CA)。为了鉴定蛋白质序列中糖基化的确切位点,可以进行标准内切蛋白酶切割(例如胰蛋白酶消化),然后通过LC/MS或HILIC-MS/MS(类似于Zauner G等,2010,J Sep Sci.,33:903-10中描述的方案)进行分析。

[0275] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在生理上可接受的载体中减少的脱酰胺(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型的生理上可接受的载体中的脱酰胺相比)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与在生理上可接受的载体中少(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的脱酰胺相关。在一些实施方案中,药学上可接受的载体中的人源化抗体或抗原结合片段与在至少1小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、2天、5天、1周、2周、4周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年的时期后减少的(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)脱酰胺相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的脱酰胺的常规实验。用于测试蛋白质脱酰胺的测定的实例包括商购可得的脱酰胺测定诸如ISOQUANT®异天冬氨酸检测试剂盒(Promega, Madison WI)或DionexUltiMate



3000Titanium系统(Dionex,Sunnyvale,CA)。其它测定可包括肽图谱。通常参见Kalgahgti,K.,&Horvath,C.“Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography”,J.Chromatography 443,343-354(1988)。

[0276] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在生理上可接受的载体中减少的氧化(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型的生理上可接受的载体中的氧化相比)相关。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与在生理上可接受的载体中少(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的氧化相关。在一些实施方案中,药学上可接受的载体中的人源化抗体或抗原结合片段与在至少1小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、2天、5天、1周、2周、4周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年的时期后减少的(与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)氧化相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的氧化的常规实验。例如,可通过使用几种商购可得的氧化测定(诸如甲硫氨酸亚砷免疫印迹试剂盒(Cayman Chemical,Ann Arbor,MI))中的任一种来评估氧化水平。其它测定可包括肽图谱。通常参见Kalgahgti,K.,&Horvath,C.“Rapid Peptide Mapping by High Performance Liquid Chromatography”,J.Chromatography 443,343-354(1988)。

[0277] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中产生时减少的脂质化(如与非人源化或替代抗体或片段在同一类型细胞中产生时的脂质化相比)相关。在其它实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中产生时增加的脂质化(如与非人源化或替代抗体或抗原结合片段在同一类型细胞中产生时的脂质化相比)相关。在一些实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段与在某一细胞类型中产生时特定的脂质化模式相关,所述脂质化模式与非人源化或替代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中产生时的脂质化模式不同。在一些实施方案中,与本文所述的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段在某一细胞类型中产生时被特定的脂质化基团翻译后修饰,所述翻译后修饰与非人源化或替代内化部分或抗原结合片段在同一类型细胞中产生时的翻译后修饰不同。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的脂质化模式的常规实验。例如,内化部分或其片段可以通过Gelb等,1999,Protein Lipidation Protocols, Humana Press,第1-256页中描述的方案评估。

[0278] 在一些实施方案中,与本文所述的本公开的人源化内化部分或片段相关的更优的生物或生理特性是人源化内化部分或抗原结合片段能够以更高的亲和力(更低的KD)(如与非人源化亲代抗体或替代抗体或片段(诸如不同的人源化抗体)的结合亲和力相比)结合多核苷酸(例如,DNA)。在一些实施方案中,人源化内化部分或片段与强(如与在同一类型的生理上可接受的载体中的非人源化或替代内化部分或抗原结合片段相比)至少5%、10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或300%的针对多核苷酸(例如,DNA;双链平端DNA)的结合亲和力相关。技术人员知道可用于测试人源化内化部分或其片段的结合亲和力(KD)的



常规实验。结合亲和力可根据当前的标准方法和制造商的方案,使用表面等离子体共振 (SPR) 或石英晶体微量天平 (QCM) 来测量。

### [0279] III. 嵌合多肽

[0280] 本公开提供了包含内化部分部分和非内化部分部分的嵌合多肽。如上所述,非内化部分多肽部分包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶)或由其组成。上文描述了内化部分和每个潜在的非内化部分多肽部分的许多实例,并且设想了产生嵌合多肽的内化部分部分与非内化部分多肽部分的所有合适的组合。

[0281] 不受理论束缚, $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽)与内化部分部分的缔合促进嵌合多肽的递送,并因此促进非内化部分部分至细胞质和任选地至溶酶体和/或自噬囊泡的递送。在某些实施方案中,内化部分将 $\alpha$ -淀粉酶活性递送到细胞中。在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽包含含 $\alpha$ -淀粉酶的嵌合多肽(例如,非内化部分部分包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽或由其组成)。如本文所述,本文所述的任何内化部分可与任何非内化部分多肽部分组合,以产生本公开的嵌合多肽。

[0282] 本公开提供了嵌合多肽(例如,本公开的嵌合多肽)。用于本文公开的方法的嵌合多肽可以以各种方式产生。嵌合多肽可包含本文公开的任何内化部分部分和 $\alpha$ -淀粉酶多肽部分。如本文中所用,本公开的嵌合多肽包含(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽部分和(ii) 内化部分部分。另外,本文公开的任何嵌合多肽均可用于本文公开的任何方法或组合物中。在一些实施方案中,内化部分(例如抗体或抗原结合片段)直接或间接地连接至本文公开的任何 $\alpha$ -淀粉酶多肽和/或片段和/或变体。

[0283] 在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽是成熟的 $\alpha$ -淀粉酶,并且包含与内化部分的C-末端融合的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其变体或片段。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽包含与Fab内化部分的重链区段的C末端融合的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其变体或片段。在一些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽包含与全长抗体内化部分的重链区段的C末端融合的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其变体或片段。

[0284] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;并且其中内化部分是抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域;其中重链可变结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列;并且其中轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含:(i)  $\alpha$ -淀粉酶多肽,和(ii) 内化部分;其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;并且其中内化部分是抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域;其中重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;并且其中轻链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链包含SEQ ID NO:4的前导序列。在一些实施方案中,轻链包含SEQ ID NO:5的前导序列。在一些实施方案中,本公开提供了不包含前导序列的嵌合多肽,例如,前导序列已被加工。在一些实施方案中,嵌合多肽包括将 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分互连的接头。在一些实施方案中,接头包含SEQ ID NO:6的氨基酸

序。在一些实施方案中,嵌合多肽包含缺乏前导序列(例如,缺乏SEQ ID NO:4的前导序列)的重链氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含缺乏前导序列(例如,缺乏SEQ ID NO:5的前导序列)的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:7和8两者的氨基酸序列。

[0285] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:9和10两者的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合多肽包含SEQ ID NO:8和43两者的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施方案中,包含本文公开的任何成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽或其片段或变体以及本文公开的任何抗体或抗原结合片段的嵌合多肽(例如,包含SEQ ID NO:8和43的氨基酸序列的蛋白质)与参考野生型成熟 $\alpha$ -淀粉酶(例如,由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的 $\alpha$ -淀粉酶)相比,在微酸性pH(例如,pH 5.5)下具有更高的生物活性(例如,高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%或200%的生物活性)。在一些实施方案中,嵌合多肽在微酸性pH(例如,pH 5.5)下与同一嵌合多肽在中性pH(例如,pH 7.0)下的生物活性相比具有更高的生物活性(例如,高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%或200%的生物活性)。在一些实施方案中,嵌合多肽在微酸性pH(例如,pH 5.5)下与同一嵌合多肽在更加酸性pH(例如,pH 4.3)下的生物活性相比具有更高的生物活性(例如,高至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%或200%的生物活性)。在一些实施方案中,“微酸性pH”选自由以下范围组成的组:4.5至6.5;4.8至6.3;5.2至6.2;5.3至6.3;5.0至6.0;5.2至5.8;5.3至5.7;5.4至5.6;或在5.5。在一些实施方案中,嵌合多肽在4.5至6.5、4.8至6.3、5.2至6.2、5.3至6.3、5.0至6.0、5.2至5.8、5.3至5.7、5.4至5.6的pH范围内或在5.5的pH下具有最高生物活性。在一些实施方案中,生物学活性是嵌合多肽的 $\alpha$ -淀粉酶部分水解糖原的能力。在一些实施方案中,可使用糖原消化测定(类似于本文提供的实施例部分中描述的测定)来测量生物活性。

[0287] 在某些实施方案中,潜在的构型包括根据需要使用抗体的重链和轻链序列的截短部分(例如,mAB 3E10)来维持连接的 $\alpha$ -淀粉酶的功能完整性。此外,内化部分可以与 $\alpha$ -淀粉酶或其片段和/或变体的暴露的内部(非末端)残基连接。在一些实施方案中,可使用 $\alpha$ -淀粉酶-内化部分构型的任何组合,从而导致 $\alpha$ -淀粉酶:内化部分比率大于1:1(例如,两个 $\alpha$ -淀粉酶分子与一个内化部分)。

[0288]  $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分可以彼此直接连接。或者,它们可以经由接头序列彼此连接,所述接头序列将 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分分开足够的距离以确保每个结构域适当地折叠成其二级和三级结构。优选的接头序列(1)应采用柔性延伸构象,(2)不应表现出形成

可与 $\alpha$ -淀粉酶多肽或内化部分的功能性结构域相互作用的有序二级结构的倾向,和(3)应该具有最小的疏水或带电特性,这可促进与功能性蛋白质结构域的相互作用。柔性蛋白质区域中的典型表面氨基酸包括Gly、Asn和Ser。预期含有Gly、Asn和Ser的氨基酸序列的排列满足上述接头序列的标准。其它近中性的氨基酸,诸如Thr和Ala,也可用于接头序列。在具体实施方案中,可使用约20个氨基酸的接头序列长度来提供功能性蛋白质结构域的合适适当分离,尽管也可使用更长或更短的接头序列。将 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分分开的接头序列的长度可以是5至500个氨基酸长,或更优选5至100个氨基酸长。优选地,接头序列的长度为约5-30个氨基酸。在优选的实施方案中,接头序列为约5至约20个氨基酸,并且有利地为约10至约20个氨基酸。在其它实施方案中,将 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分连接的接头可以是抗体的恒定结构域(例如,mAb 3E10的恒定结构域或另一抗体的全部或部分Fc区)。在某些实施方案中,接头是可切割的接头。在某些实施方案中,接头序列包括SEQ ID NO:6的接头序列。在某些实施方案中,内化部分是抗体或抗体片段,并且缀合包括与恒定结构域(诸如抗体或抗体片段的重链的恒定结构域)的化学或重组缀合。在此类实施方案中,应理解, $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分还可经由抗体或抗体片段的重链与轻链之间的缔合而进一步缔合。这也包括在缀合的范围内。

[0289] 在其它实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶多肽或其功能片段可以与内化部分直接缀合或连接。例如,重组缀合的嵌合多肽可以作为 $\alpha$ -淀粉酶部分与内化部分部分的框内融合物而产生。在某些实施方案中,接头可以是可切割的接头。在任何前述实施方案中,内化部分可以与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的N-末端或C-末端氨基酸(直接或经由接头)缀合。在其它实施方案中,内化部分可以与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的内部氨基酸(直接或间接)缀合。注意,构建体的两个部分彼此缀合/连接。除非另有说明,否则将嵌合多肽描述为 $\alpha$ -淀粉酶部分与内化部分的缀合,等同地用作内化部分与 $\alpha$ -淀粉酶部分的缀合。另外,除非另有说明,否则缀合和/或连接是指化学或基因缀合。

[0290] 在某些实施方案中,可使用公知的交联剂和方案产生本公开的嵌合多肽。例如,存在大量本领域技术人员已知的并且可用于使 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分(例如,抗体)交联的化学交联剂。例如,交联剂是异双功能交联剂,其可用于以逐步方式连接分子。异双功能交联剂提供了设计用于缀合蛋白质从而减少不想要的副反应(诸如同型蛋白质聚合物)发生的更加特异的偶联方法的能力。本领域已知多种异双功能交联剂,包括4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺酯(SMPB)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC);4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-a-甲基-a-(2-吡啶基二硫代)-甲苯(SMPT)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯]己酸琥珀酰亚胺酯(LC-SPDP)。具有N-羟基琥珀酰亚胺部分的那些交联剂可以作为N-羟基磺基琥珀酰亚胺类似物获得,所述类似物通常具有更高的水溶性。另外,可以合成在连接链内具有二硫桥的那些交联剂来代替作为烷基衍生物,以减少体内接头切割的量。除了异双功能交联剂以外,还存在许多其它交联剂,包括同双功能和光反应性交联剂。二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)和庚二酰亚胺二甲酯.2HC1(DMP)是有用的同双功能交联剂的实例,双-[B-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(基)和N-琥珀酰亚胺基-6(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨

基)己酸酯(SANPAH)是用于本公开的有用的光反应性交联剂的实例。关于蛋白质偶联技术的最近综述,请参见Means等,(1990) *Bioconjugate Chemistry*.1:2-12,其通过引用并入本文。

[0291] 上面包括的一类特别有用的异双功能交联剂含有伯胺反应性基团,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或其水溶性类似物N-羟基磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)。碱性pH下的伯胺(赖氨酸 $\epsilon$ 基团)是未质子化的并且通过对NHS或磺基-NHS酯的亲核攻击起反应。该反应导致形成酰胺键,并释放作为副产物的NHS或磺基-NHS。可用作异双功能交联剂的一部分的另一种反应性基团是硫醇反应性基团。常见的硫醇反应性基团包括马来酰亚胺、卤素和吡啶基二硫化物。在微酸性至中性(pH 6.5-7.5)条件下,马来酰亚胺在数分钟内与游离巯基(半胱氨酸残基)特异性反应。卤素(碘乙酰基官能团)在生理pH下与--SH基团反应。这两种反应性基团都导致形成稳定的硫醚键。异双功能交联剂的第三组分是间隔臂或桥。桥是连接两个反应端的结构。该桥的最明显的特征是其对空间位阻的影响。在一些情况下,较长的桥可以更容易地跨越连接两个复杂生物分子所必需的距离。

[0292] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含多个接头。例如,如果嵌合多肽包含scFv内化部分,则嵌合多肽可包含将 $\alpha$ -淀粉酶与内化部分缀合的第一接头,以及将VH结构域(例如,SEQ ID NO:2)与VL结构域(例如,SEQ ID NO:3)缀合的scFv中的第二接头。

[0293] 使用异双功能试剂制备蛋白质-缀合物是涉及胺反应和巯基反应的两步法。对于第一步,胺反应,所选择的蛋白质应含有伯胺。这可以是赖氨酸 $\epsilon$ 胺或在大多数蛋白质的N-末端发现的 $\alpha$ 伯胺。蛋白质不应含有游离巯基。在待缀合的两种蛋白质均含有游离巯基的情况下,可以修饰一种蛋白质,以便使用例如N-乙基马来酰亚胺封闭所有巯基(参见Partis等(1983) *J.Pro.Chem.*2:263,其通过引用并入本文)。Ellman试剂可用于计算特定蛋白质中巯基的数量(参见例如Ellman等(1958) *Arch.Biochem.Biophys.*74:443和Riddles等(1979) *Anal.Biochem.*94:75,其通过引用并入本文)。

[0294] 在某些具体实施方案中,本公开的嵌合多肽可通过使用通用载体系统产生。例如, $\alpha$ -淀粉酶多肽可与常见的载体诸如蛋白A、聚-L-赖氨酸、六组氨酸等缀合。然后缀合的载体将与充当内化部分的抗体形成复合物。负责结合免疫球蛋白的一小部分载体分子可用作运载体。

[0295] 在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽可以通过使用标准蛋白质化学技术(诸如,Bodansky,M.Principles of Peptide Synthesis,Springer Verlag,Berlin(1993)和Grant G.A.(编辑),*Synthetic Peptides:A User's Guide*,W.H.Freeman and Company,New York(1992)中描述的那些)来产生。另外,自动肽合成仪是可商购获得的(例如,AdvancedChemTech Model 396;Milligen/Bioscience 9600)。在任何前述用于 $\alpha$ -淀粉酶与内化部分的化学缀合的交联方法中,可使用可切割的结构域或可切割的接头。切割将允许内化部分与 $\alpha$ -淀粉酶多肽的分离。例如,在嵌合多肽穿透细胞后,可切割的接头的切割将允许 $\alpha$ -淀粉酶与内化部分分离。

[0296] 在某些实施方案中,包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分部分的嵌合多肽可以含有 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分的融合蛋白的形式产生。在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽可以包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分(例如,抗体或归巢肽)的融合蛋白的形式产生,表达为一条连续多肽链。在某些实施方案中,嵌合多肽以融合蛋白的形式产生,所述融合蛋白包含 $\alpha$ -淀

粉酶多肽部分和内化部分部分。在制备此类融合蛋白时,构建融合基因,其包含编码 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分以及任选地跨接 $\alpha$ -淀粉酶多肽和内化部分的肽接头序列的核酸。使用重组DNA技术产生融合基因,其中翻译产物是所需的融合蛋白,是本领域公知的。可以重新设计基因的编码序列及其调控区,以改变蛋白质产物的功能性质、制备的蛋白质的量或产生蛋白质的细胞类型。基因的编码序列可被广泛改变-例如,通过将其部分与不同基因的编码序列融合以产生编码融合蛋白的新型杂合基因。用于产生融合蛋白的方法的实例描述于PCT申请PCT/US87/02968、PCT/US89/03587和PCT/US90/07335,以及Traunecker等(1989) *Nature* 339:68,这些文献通过引用并入本文。基本上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接是根据常规技术进行的,所述技术采用平端或交错末端进行连接,限制性酶消化以提供适当的末端,适当时填充粘性末端,碱性磷酸酶处理以避免不希望的连接,以及酶促连接。或者,融合基因可通过常规技术(包括自动DNA合成仪)合成。在另一种方法中,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补悬突(overhangs),随后可将所述互补悬突退火以产生嵌合基因序列(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等,John Wiley&Sons:1992)。由融合基因编码的嵌合多肽可使用本领域公知的各种表达系统重组产生(也见下文)。

[0297] 重组缀合的嵌合多肽包括其中 $\alpha$ -淀粉酶多肽与内化部分的N-末端或C-末端缀合的实施方案。其中 $\alpha$ -淀粉酶与Fv3E10的变体轻链和重链缀合的示例性嵌合多肽分别示于SEQ ID NO:3和2中。

[0298] 重组缀合的嵌合多肽包括其中内化部分在 $\alpha$ -淀粉酶多肽的N-末端的实施方案和其中内化部分在 $\alpha$ -淀粉酶多肽部分的C-末端的实施方案。我们注意到重组制备融合蛋白的方法是本领域公熟知的。本文所述的任何嵌合蛋白都可以容易地重组制备。这包括具有一个或多个标签和/或一个或多个接头的蛋白质。例如,如果嵌合多肽包含scFv内化部分,则嵌合多肽可包含将内化部分与 $\alpha$ -淀粉酶多肽部分互连的第一接头,以及缀合VH结构域的scFv中的第二接头。此外,在某些实施方案中,嵌合多肽在嵌合多肽的N末端(或在N末端的10个氨基酸残基内)包含“AGIH”部分(SEQ ID NO:25),并且可在一个或多个表位标签存在或不存在的条件下提供此类嵌合多肽。在另外的实施方案中,嵌合多肽在多肽的最N末端位置处包含丝氨酸。在一些实施方案中,嵌合多肽在多肽的N末端处(或在N末端的10个氨基酸残基内)包含“SAGIH”(SEQ ID NO:26)部分,并且可在一个或多个表位标签存在或不存在的条件下提供此类嵌合多肽。

[0299] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含信号序列(例如,SEQ ID NO:4和5)。在一些实施方案中,信号序列(例如,SEQ ID NO:5)处于本文公开的任何抗体或抗原结合片段的轻链序列的N末端。在一些实施方案中,信号序列(例如,SEQ ID NO:5)处于氨基酸序列SEQ ID NO:3或其片段或变体的N末端。在一些实施方案中,信号序列(例如,SEQ ID NO:4)处于本文公开的任何抗体或抗原结合片段的轻链序列的N末端。在一些实施方案中,信号序列(例如,SEQ ID NO:4)处于氨基酸序列SEQ ID NO:2或其片段或变体的N末端。

[0300] 在一些实施方案中,在细胞中重组产生嵌合多肽。在一些实施方案中,细胞是细菌(例如,大肠杆菌(*E.coli*))、酵母(例如,毕赤酵母属(*Pichia*))、昆虫细胞(例如,Sf9细胞)或哺乳动物细胞(例如,CHO或HEK-293细胞)。在某些实施方案中,使用本领域公认的用于从细胞或细胞上清液制备蛋白质并纯化其的技术,在培养中的任何前述细胞中制备本公开的

嵌合多肽。

[0301] 免疫球蛋白的全部或部分或表位标签(诸如HA或myc标签)在嵌合多肽中的存在提供了用于纯化嵌合多肽的区域。

[0302] 在一些实施方案中,如美国专利公开第2003/0166877号中所述,可通过鉴定跨越嵌合多肽的接合区域内的候选T细胞表位并改变接合区域内的氨基酸来降低嵌合多肽的免疫原性。

[0303] 根据本公开的嵌合多肽可用于多种目的。我们注意到本文所述的任何嵌合多肽均可用于本文所述的任何方法,并且已明确地设想了此类合适的组合。

[0304] 本文描述的嵌合多肽可用于将 $\alpha$ -淀粉酶多肽递送至细胞,特别是肌肉细胞。在某些实施方案中,嵌合多肽将 $\alpha$ -淀粉酶递送至肝细胞。因此,嵌合多肽可用于在体外或体内促进 $\alpha$ -淀粉酶至细胞的转运。通过促进至细胞的转运,嵌合多肽提高了递送效率,从而在体外或体内促进了 $\alpha$ -淀粉酶多肽的作用。另外,通过提高转运效率,嵌合多肽可以帮助减少体外或体内实验所需的 $\alpha$ -淀粉酶的量。此外,通过促进至细胞质的递送,本公开的嵌合多肽和方法可以解决与例如拉福拉病中的糖原的细胞质积累相关的问题。

[0305] 嵌合多肽可用于研究培养细胞中 $\alpha$ -淀粉酶的功能,以及研究 $\alpha$ -淀粉酶的转运。嵌合多肽可用于鉴定细胞中,诸如细胞质与溶酶体之间的转运的 $\alpha$ -淀粉酶的结合配偶体。嵌合多肽可用于用以鉴定细胞中 $\alpha$ -淀粉酶活性的改性剂(例如,小有机分子或多肽改性剂)的筛选。嵌合多肽可用于帮助治疗或减轻人或动物模型中的拉福拉病的症状。前述仅是主题嵌合多肽的用途的示例。

[0306] 本文所述的任何嵌合多肽,包括组合 $\alpha$ -淀粉酶多肽、内化部分和接头的任何特征的嵌合多肽,可用于本公开的任何方法中。

[0307] IV. $\alpha$ -淀粉酶相关的核酸和表达

[0308] 在某些实施方案中,本公开利用核酸产生 $\alpha$ -淀粉酶多肽(包括成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽及其功能片段、变体和融合物)。在某些具体实施方案中,核酸还可包含编码内化部分的DNA,以用于制备本公开的重组合蛋白。

[0309] 在某些实施方案中,本公开涉及与 $\alpha$ -淀粉酶核苷酸序列(例如,GenBank登录号AH002672.1或AH002671.1)的区域具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的分离的或重组的核苷酸序列。在一些实施方案中,核苷酸序列编码成熟的 $\alpha$ -淀粉酶多肽序列。在特定实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶核苷酸序列编码缺乏对应于SEQ ID NO:1的氨基酸1-15的氨基酸的 $\alpha$ -淀粉酶多肽。在另外的实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶核苷酸序列可以分离的,重组的,和/或与异源核苷酸序列融合的,或存在于DNA文库中。

[0310] 在某些实施方案中, $\alpha$ -淀粉酶核酸还包括在高度严格条件下与任何上述核苷酸序列或其互补序列杂交的核苷酸序列。本领域普通技术人员将容易理解,可以改变促进DNA杂交的适当严格条件。例如,可以在约45°C下在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)下进行杂交,然后在50°C下进行2.0x SSC洗涤。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自在50°C下约2.0x SSC的低严格性至50°C下约0.2x SSC的高严格性。另外,洗涤步骤中的温度可以从室温(约22°C)的低严格条件升高至约65°C的高严格条件。温度和盐均可变化,或者可使温度或盐浓度保持恒定而改变另一个变量。在一个实施方案中,本公开提供了核酸,其在室温下在6x SSC的低严格条件下杂交,然后在室温下在2x SSC下洗涤。

[0311] 由于遗传密码的简并性而与天然 $\alpha$ -淀粉酶核酸不同的分离的核酸也在本公开的范围。例如,许多氨基酸由不止一个三联体指定。指定同一氨基酸的密码子或同义密码子(例如,CAU和CAC是组氨酸的同义密码子)可以引起“沉默”突变,这不影响蛋白质的氨基酸序列。然而,预期在哺乳动物细胞中存在确实引起主题蛋白质的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员将理解,由于天然等位基因变异,编码特定蛋白质的核酸的一个或多个核苷酸(高达约3-5%的核苷酸)的这些变异可存在于给定物种的个体间。任何和所有此类核苷酸变异和所得的氨基酸多态性均在本公开的范围。

[0312] 在一些实施方案中,对于在特定细胞表达系统(例如,哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、植物细胞或昆虫细胞)中表达,对本文公开的任何核酸进行密码子优化。在一些实施方案中,对于在哺乳动物细胞诸如CHO或HEK-293细胞中表达,对核苷酸序列进行密码子优化。

[0313] 在某些实施方案中,在表达构建体中可将重组 $\alpha$ -淀粉酶核酸与一个或多个调控核苷酸序列可操作地连接。调控核苷酸序列通常适用于用于表达的宿主细胞。本领域已知用于多种宿主细胞的多种类型的合适的表达载体和合适的调控序列。通常,所述一种或多种调控核苷酸序列可包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子序列。本公开设想了本领域已知的组成型或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子,或组合不止一个启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可在附加体诸如质粒上存在于细胞中,或者表达构建体可被插入染色体中。在优选实施方案中,表达载体含有选择标记基因以允许选择转化的宿主细胞。选择标记基因是本领域公知的,并且随使用的宿主细胞而变化。在某些方面,本公开涉及表达载体,其包含编码 $\alpha$ -淀粉酶多肽(诸如本文所述的任何 $\alpha$ -淀粉酶多肽)并且可操作地连接至至少一个调控序列的核苷酸序列。调控序列是本领域公认的,并且被选择来指导编码的多肽的表达。因此,术语调控序列包括启动子、增强子和其它表达控制元件。示例性调控序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)中。应当理解,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞(例如,中国仓鼠卵巢细胞)的选择和/或期望表达的蛋白质的类型等因素。此外,还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及由载体编码的任何其它蛋白质(诸如抗生素标记)的表达。

[0314] 在一些实施方案中,包含编码 $\alpha$ -淀粉酶多肽或其生物活性片段的核苷酸序列的核酸构建体与编码内化部分的核苷酸序列可操作地连接,其中所述核酸构建体编码具有 $\alpha$ -淀粉酶生物活性的嵌合多肽。在某些实施方案中,核酸构建体还可包含编码接头的核苷酸序列。

[0315] 本公开还涉及用重组基因转染的宿主细胞,所述重组基因编码本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽或嵌合多肽。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如, $\alpha$ -淀粉酶多肽或嵌合多肽可以在细菌细胞诸如大肠杆菌、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其它合适的宿主细胞为本领域技术人员已知的。

[0316] 本公开还涉及产生本公开的 $\alpha$ -淀粉酶多肽或嵌合多肽的方法。例如,可在合适的条件下培养用编码 $\alpha$ -淀粉酶多肽或嵌合多肽的表达载体转染的宿主细胞,以允许多肽的表达发生。所述多肽可被分泌,并且可从细胞和含有多肽的培养基的混合物中分离所述多肽。



或者,多肽可被保留在细胞质中或膜部分中,收获细胞,裂解并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域公知的。可以使用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离多肽,所述技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳和利用对多肽(例如, $\alpha$ -淀粉酶多肽)的特定表位具有特异性的抗体的免疫亲和纯化。在优选实施方案中,多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。

[0317] 可通过将克隆的基因或其部分连接至适于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中,来产生重组 $\alpha$ -淀粉酶核酸。用于产生重组多肽的表达媒介物包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括以下类型的质粒:用于在原核细胞诸如大肠杆菌中表达的pBR322衍生质粒、pEMBL衍生质粒、pEX衍生质粒、pBTac衍生质粒和pUC衍生质粒。优选哺乳动物表达载体含有的促进载体在细菌中增殖的原核序列以及在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单位两者。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg衍生载体是适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些用来自细菌质粒(诸如pBR322)的序列进行修饰,以促进原核和真核细胞中的复制和药物抗性选择。或者,病毒诸如牛乳头状瘤病毒(BPV-1)或爱泼斯坦-巴尔病毒(pHEBo、pREP衍生的和p205)的衍生物可用于在真核细胞中瞬时表达蛋白质。用于制备质粒和转化宿主生物体的各种方法是本领域公知的。关于用于原核和真核细胞的其它合适的表达系统以及一般重组方法,参见MolecularCloning A Laboratory Manual,第2版,由Sambrook,Fritsch和Maniatis编著(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)第16和17章。在一些情况下,可能需要通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。此类杆状病毒表达系统的实例包括pVL衍生载体(诸如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW衍生载体(诸如pAcUW1)和pBlueBac衍生载体(诸如含有 $\beta$ -gal的pBlueBac III)。

[0318] 用于产生融合基因的技术是公知的。基本上,编码不同多肽序列的各种DNA片段的连接是根据常规技术进行的,所述技术采用平端或交错末端进行连接,限制性酶消化以提供适当的末端,适当时填充粘性末端,碱性磷酸酶处理以避免不希望的连接,以及酶促连接。在另一个实施方案中,融合基因可通过常规技术(包括自动DNA合成仪)合成。或者,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补悬突,随后可将所述互补悬突退火以产生嵌合基因序列(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等,John Wiley&Sons:1992)。

[0319] 本公开设想了诸如上述的重组产生嵌合蛋白的方法。可以容易地选择合适的载体和宿主细胞用于在例如酵母或哺乳动物细胞中表达蛋白质。宿主细胞可以稳定或瞬时地表达编码嵌合多肽的载体。可在合适的条件下培养此类宿主细胞以表达可以容易地从细胞培养基中分离的嵌合多肽。

[0320] 本公开的嵌合多肽(例如,包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶部分和内化部分部分的多肽)可以表达为单条多肽链或多于一条多肽链。单条多肽链的实例是当 $\alpha$ -淀粉酶部分与内化部分框内融合时,该内化部分是scFv。在某些实施方案中,该单条多肽链以融合蛋白形式从单一载体表达。

[0321] 多于一条多肽链的实例是当内化部分是抗体或Fab时。在某些实施方案中,抗体或



Fab的重链和轻链可在表达单一载体或两种载体(一种表达重链,一种表达轻链)的宿主细胞中表达。在任一种情况下, $\alpha$ -淀粉酶多肽可以表达为与例如重链的C-末端的框内融合物,使得 $\alpha$ -淀粉酶多肽附于内化部分但与内化部分的抗原结合区域具有一定距离。

[0322] 如上所述,用于重组表达多肽(包括嵌合多肽)的方法是本领域公知的。表达具有特定氨基酸序列的成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽(诸如人成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽)的核苷酸序列是可获得的并且可以使用。此外,表达内化部分部分(诸如表达包含SEQ ID NO:2和3)中所示的VH和VL的3E10抗体、scFv或Fab)的核苷酸序列是公开可用的,并且可以与编码合适的重链和轻链恒定区的核苷酸序列组合。本公开设想了编码本公开的任何嵌合多肽的核苷酸序列、包含此类核苷酸序列的载体(单一载体或一组载体)、包含此类载体的宿主细胞以及培养此类宿主细胞以表达本公开的嵌合多肽的方法。

[0323] V. 治疗方法及其它使用方法

[0324] 对于本文所述的任何方法,本公开设想了在整个申请中描述的任何嵌合多肽和/或组合物的用途。另外,对于本文所述的任何方法,本公开设想了一种方法的任何一个或多个步骤与来自另一种方法的任何一个或多个步骤的组合。

[0325] 例如,包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽)部分和内化部分部分的本公开的嵌合多肽可用于本公开的任何方法中。

[0326] 在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽(例如,包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽部分和内化部分部分的多肽)被递送至细胞(诸如肌肉(例如,膈肌和/或心肌)细胞、神经元细胞(例如,大脑的神经元细胞)和/或肝细胞)的细胞质,以减少细胞质糖原积累(例如,正常或异常糖原诸如多葡聚糖的有害积累)。此类细胞可以存在于体外或受试者(例如,患者,诸如人)中。在某些实施方案中,受试者是患有或怀疑患有糖原贮积病,特别是庞贝氏症、GSD III或GSD IV和/或糖原代谢紊乱(诸如拉福拉病)的受试者。在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽适合用于在有需要的受试者(诸如患有庞贝氏症、GSD III或GSD IV和/或糖原代谢紊乱(诸如拉福拉病)的受试者)中将 $\alpha$ -淀粉酶递送至细胞质。在某些实施方案中,有需要的受试者患有或怀疑患有GSD III。在某些实施方案中,有需要的受试者患有或怀疑患有GSD IV。在某些实施方案中,本公开提供了治疗GSD III(例如,改善其的一种或多种症状;减少糖原积累,诸如细胞质糖原积累)的方法。在某些实施方案中,本公开提供了治疗GSD IV(例如,改善其的一种或多种症状;减少糖原积累,诸如细胞质糖原积累)的方法。在某些实施方案中,本公开提供了治疗拉福拉病(例如,改善其的一种或多种症状;减少糖原积累)的方法。在某些实施方案中,本公开提供了治疗与缺氧诱导的糖原积累相关的疾病或病症的方法。在一些实施方案中,与缺氧诱导的糖原积累相关的疾病或病症是癌症。本文描述了其它方法。

[0327] 在一些实施方案中,本文公开的任何嵌合多肽可用于减少酸性细胞区室(例如,溶酶体或自噬体)中的糖原积累。在一些实施方案中,嵌合多肽可用于在患有与酸性细胞区室(例如,溶酶体或自噬体)中的糖原积累相关的疾病的患者的一个或多个细胞中减少糖原积累。在一些实施方案中,嵌合多肽可用于减少庞贝氏症(GSD II)细胞中的糖原积累。在一些实施方案中,嵌合多肽可用于治疗患有庞贝氏症(GSD II)的患者。

[0328] 在一些实施方案中,本公开的嵌合多肽可用于增加细胞中的糖原清除率。在一些实施方案中,细胞是肌肉(例如,心肌或膈肌)细胞、肝细胞或神经元(例如,脑的神经元)细胞。在一些实施方案中,细胞存在于患有拉福拉病的受试者中。

[0329] 在某些实施方案中,包含本文公开的任何 $\alpha$ -淀粉酶多肽的嵌合多肽可用于治疗拉福拉病。在某些实施方案中,包含本文公开的任何 $\alpha$ -淀粉酶多肽的嵌合多肽可用于治疗福布斯科里病。在某些实施方案中,本公开提供了将嵌合多肽递送至细胞(包括培养物中的细胞(体外或离体)和受试者中的细胞)的方法。至培养物中的细胞(诸如健康细胞或来自疾病模型的细胞)的递送具有多种用途。这些用途包括鉴定 $\alpha$ -淀粉酶底物或结合配偶体,以评估定位和/或运输(例如,至细胞质、溶酶体和/或自噬囊泡),评估在各种条件(例如,pH)下的酶活性,评估糖原积累等。在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽可用作试剂来了解健康或疾病背景下的 $\alpha$ -淀粉酶活性、定位和运输。

[0330] 至受试者,诸如至受试者的细胞的递送具有多种用途。示例性治疗用途描述于下文中。此外,嵌合多肽可用于诊断或研究目的。例如,本公开的嵌合多肽可以被可检测地标记并施用于受试者,诸如疾病的动物模型或患者,并用于对受试者组织中的嵌合多肽进行成像(例如,定位于肌肉、脑和/或肝脏)。另外的示例性用途包括至受试者中的细胞,诸如至疾病(例如,拉福拉病)的动物模型的递送。举例来说,本公开的嵌合多肽可用作研究试剂并递送至动物以了解 $\alpha$ -淀粉酶生物活性、定位和运输、蛋白质间相互作用、酶活性以及对健康或患病动物的动物生理学的影响。

[0331] 在某些实施方案中,本公开提供了治疗与laforin、 $\alpha$ -淀粉酶和/或malin的功能失常相关、与异常糖原积累相关和/或与拉福拉病相关的病患的方法。在某些实施方案中,糖原积累在细胞质中,并且 $\alpha$ -淀粉酶的递送减少诸如骨骼肌或肝脏中的细胞质糖原积累。在某些实施方案中,受试者在内源性laforin、 $\alpha$ -淀粉酶和/或malin方面没有功能失常(例如,该方法不包括替换突变的或对于其存在功能失常的蛋白质)。

[0332] 在某些实施方案中,这些方法包括向个体施用治疗有效量的如上所述的嵌合多肽(例如,包含(i) $\alpha$ -淀粉酶多肽和(ii)内化部分部分的嵌合多肽)。这些方法特别针地对动物(更特别地,人)的治疗性和预防性治疗。关于治疗拉福拉病的方法,本公开设想了任何前述方面和实施方案的所有组合,以及与详述和实施例中所述的任何实施方案的组合。因此,在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽适用于治疗疾病诸如拉福拉病。在某些实施方案中,嵌合多肽减少细胞(诸如肌肉细胞(例如,膈肌细胞或心肌细胞)、肝细胞和/或神经元细胞)中的糖原积累,以治疗有需要的患者的拉福拉病。

[0333] 本公开提供了经由平衡核苷转运蛋白(ENT2)途径将嵌合多肽或核酸构建体递送到细胞中的方法,包括使细胞与嵌合多肽或核酸构建体接触。在某些实施方案中,该方法包括使细胞与嵌合多肽接触,所述嵌合多肽包含 $\alpha$ -淀粉酶多肽或其生物活性片段和内化部分,所述内化部分可经由ENT2途径(并且任选地经由另一种ENT转运蛋白,诸如ENT3)介导跨细胞膜的转运,从而将嵌合多肽递送至细胞中。在某些实施方案中,细胞是肌肉细胞。使用本文公开的任何方法靶向的肌肉细胞可包括骨骼(例如,膈膜)细胞、心脏细胞或平滑肌细胞。在其它实施方案中,嵌合多肽被递送至肝细胞或神经元(例如,脑)细胞。

[0334] 本公开还提供了经由允许进入除肌肉细胞外的细胞的途径将嵌合多肽或核酸构建体递送至细胞中的方法。可使用本文公开的任何方法靶向的其它细胞类型包括例如肝细胞、神经元(例如,脑的神经元)细胞、上皮细胞、子宫细胞和肾细胞。

[0335] 在某些实施方案中,内化部分是抗体或抗原结合片段,诸如结合DNA的抗体或抗原结合片段。在某些实施方案中,内化部分是抗体,诸如全长抗体或Fab。在某些实施方案中,

全长抗体或Fab相对于天然免疫球蛋白恒定区包含一个或多个取代,诸如以减弱效应功能。

[0336] 拉福拉病,也称为拉福拉进行性肌阵挛性癫痫或MELF,是一种罕见的、致命的神经退行性病症,其特征来自于受累个体的大多数组织(包括脑、心脏、肝脏、肌肉和皮肤)的细胞中细胞质多葡聚糖包涵体(称为拉福拉体)的积累。拉福拉病患者通常首先在青春期出现症状。症状包括暂时失明、抑郁、癫痫发作、跌倒发作、肌阵挛、幻视、失神发作、共济失调以及快速发展和严重的痴呆。死亡通常在发作后2-10年(平均5年)发生。

[0337] 拉福拉病的患病率尚不清楚。虽然这种疾病在世界范围内发生,但在地中海国家、中亚、印度、巴基斯坦、北非和中东的部分地区最为常见。在西方国家,患病率估计低于1/1,000,000。

[0338] 目前对患有拉福拉病的患者没有治愈性或有效的治疗方法。然而,至少在疾病的早期阶段,可以使用抗癫痫药物来控制癫痫发作和肌阵挛。

[0339] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中用来一般意指获得希望的药理作用和/或生理作用。“治疗”病患或疾病是指治愈和改善病患或疾病的至少一种症状,并且包括组合物的施用,相对于未接受该组合物的受试者,所述组合物使有需要的受试者的医学病况的症状的频率降低或延迟其发作。如本文中所用,“治疗”涵盖对哺乳动物,特别是人的疾病或病患的任何治疗,包括:(a)预防疾病或病患的症状在可能易患疾病或病患但是还没有开始经历症状的受试者中发生;(b)抑制疾病或病患(例如,阻止其发展);或(c)缓解疾病或病患(例如,引起疾病或病患的消退,提供一种或多种症状的改善)。例如,设想了拉福拉病的“治疗”,并且所述治疗包括疾病的完全逆转或治愈,或由疾病引起的症状和/或不良作用的任何范围的改善。

[0340] 仅仅为了说明,拉福拉病的“治疗”包括以下与拉福拉病相关的影响的任一种或其组合的改善:失明、抑郁、癫痫发作、跌倒发作、肝病、肌肉萎缩、肌阵挛、幻视、失神发作、共济失调、痴呆和/或缩短的寿命。治疗还可包括减少拉福拉体和/多葡聚糖在例如肌肉(例如,心脏或隔膜)、肝脏和/或脑中的异常积聚。还可以监测上面未列出的其它症状,以确定治疗拉福拉病的有效性。通过本公开的方法治疗的受试者群体包括患有不希望的病患或疾病的受试者,以及有发展病患或疾病的风险的受试者。在某些实施方案中,在痴呆发作之前或在可测量的、明显的痴呆发作之前治疗待治疗的受试者。

[0341] 在某些实施方案中,本公开提供了向患有拉福拉病的受试者的细胞(诸如肌肉细胞和/或肝细胞和/或肾细胞)递送 $\alpha$ -淀粉酶活性的方法,所述方法包括施用本公开的嵌合多肽或用一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂配制的包含本公开的嵌合多肽的组合物。

[0342] 术语“治疗有效剂量”是指对于其施用产生所需效果的剂量。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且是可由本领域技术人员使用已知技术(参见,例如,Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)确定的。

[0343] 在某些实施方案中,本公开的嵌合多肽的施用是经由本文所述的施用途径(诸如皮下、静脉内或经由肝门静脉)中的任一种施用途径。换句话说,本公开设想了通过经由任何此类施用途径施用来进行递送的方法。

[0344] 在某些实施方案中,与未和内化部分缀合的 $\alpha$ -淀粉酶多肽的递送相比和/或与和不同内化部分缀合的 $\alpha$ -淀粉酶多肽的递送后的 $\alpha$ -淀粉酶活性相比,所述方法引起向细胞质

递送更高的 $\alpha$ -淀粉酶活性。

[0345] 在某些实施方案中,可将本公开的一种或多种嵌合多肽一起(同时)施用或在不同时间(顺序)施用。另外,本公开的嵌合多肽可以单独施用或与一种或多种另外的化合物或疗法组合施用以治疗拉福拉病。例如,可将一种或多种嵌合多肽与一种或多种其它治疗化合物结合共施用。当指示共施用时,组合治疗可包括同时或交替施用。另外,该组合可包括可为短期施用或长期施用。任选地,本公开的嵌合多肽和另外的化合物以累加或协同方式起作用以治疗拉福拉病。用于联合治疗的另外的化合物包括但不限于小分子、多肽、抗体、反义寡核苷酸和siRNA分子。取决于联合治疗的性质,可以在施用另外的疗法的同时和/或之后继续施用本公开的嵌合多肽。嵌合多肽的施用可以以单剂量或多剂量进行。在一些情况下,嵌合多肽的施用在另一种疗法之前至少几天开始,而在其它情况下,在即将施用另一种疗法时或施用另一种疗法时开始施用。

[0346] 在一些实施方案中,向受试者(例如,患有拉福拉病的受试者)施用本文所述的任何嵌合多肽与抗癫痫药物的组合。在一些实施方案中,向受试者(例如,患有拉福拉病的受试者)施用本文所述的任何嵌合多肽与WO 2015/192092(其通过引用整体并入)中公开的任何嵌合多肽的组合。在特定实施方案中,向受试者(例如,患有拉福拉病的受试者)施用本文所述的任何嵌合多肽与WO 2015/192092中公开的任何malin和/或laforin嵌合多肽的组合。

[0347] 在组合治疗的另一个实例中,可将本公开的一种或多种嵌合多肽作为与一种或多种另外的治疗方式组合的治疗方案的一部分使用。举例来说,此类其它治疗方式包括但不限于饮食疗法、职业疗法、物理疗法、呼吸机支持疗法、按摩、针灸、针压法、助行器、辅助动物等。

[0348] 在某些实施方案中,本公开的一种或多种嵌合多肽可在肝脏移植之前或之后施用。

[0349] 注意,尽管本文所述的嵌合多肽可以与其它疗法组合使用,但在某些实施方案中,将嵌合多肽作为唯一的治疗形式提供。无论是单独施用还是与其它药物或治疗方案组合施用,嵌合多肽的施用剂量、施用频率、施用途径和施用时间安排由医师基于患者的状况和需要来确定。本公开设想了方法可包括以一定的剂量并按给药方案(诸如在一段时间内以指定间隔施用)进行的施用。在此类情况下,每种剂量都有助于功效,因此是有效的,尽管症状的改善可能仅在施用多个剂量后才能观察到。

[0350] 本公开的嵌合多肽具有多种用途,包括体外和体内用途。体内用途不仅包括治疗用途,而且还包括在例如任何前述动物模型中的诊断和研究用途。举例来说,本公开的嵌合多肽可用作研究试剂并被递送至动物以了解 $\alpha$ -淀粉酶的生物活性、定位和运输、蛋白质间相互作用、酶活性以及对健康或疾病动物的动物生理学的影响。

[0351] 嵌合多肽也可以在体外用于评估例如培养细胞(包括培养中的健康细胞和 $\alpha$ -淀粉酶缺陷细胞)中的 $\alpha$ -淀粉酶生物活性、定位和运输、蛋白质间相互作用和酶活性。本公开设想了本公开的嵌合多肽可用于将 $\alpha$ -淀粉酶递送至细胞(包括培养中的细胞)的细胞质、溶酶体和/或自噬囊泡。

[0352] 本公开设想了本文所述的任何方法可以通过施用本公开的嵌合多肽和/或本公开的组合物(例如,用一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂配制的包含本公开的嵌合

多肽的组合物)或使细胞与所述嵌合多肽和/或组合物接触来进行。

#### [0353] VI. 基因疗法

[0354] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于将编码 $\alpha$ -淀粉酶(例如,成熟 $\alpha$ -淀粉酶)的多肽和/或包含 $\alpha$ -淀粉酶的嵌合多肽的核酸引入哺乳动物细胞或靶组织中。此类方法可用于在体外向细胞施用编码本公开的多肽(例如, $\alpha$ -淀粉酶,包括其变体,并包括嵌合多肽)的核酸。本公开设想了基因转移方法可用于递送编码本公开的任何嵌合多肽或 $\alpha$ -淀粉酶多肽的核酸。在一些实施方案中,施用编码 $\alpha$ -淀粉酶的核酸以用于体内或离体基因治疗用途。在其它实施方案中,将基因递送技术用于研究嵌合多肽或 $\alpha$ -淀粉酶多肽的活性或研究基于细胞或动物模型的拉福拉病,诸如以评估递送至健康或患病细胞和组织后的细胞运输、酶活性和蛋白质间相互作用。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、裸核酸和与递送运载体诸如脂质体复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加型基因组或整合的基因组。此类方法在本领域是公知的。

[0355] 编码本公开的工程改造的多肽的核酸的非病毒递送方法包括脂转染、显微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子和DNA的剂增强的摄取。脂转染方法和脂转染试剂是本领域公知的(例如,Transfectam<sup>TM</sup>和Lipofectin<sup>TM</sup>)。适用于多核苷酸的高效受体识别脂转染的阳离子性和中性脂质包括Felgner、WO 91/17424、WO 91/16024的那些。递送可以是至细胞(离体施用)或靶组织(体内施用)。脂质:核酸复合物的制备,包括靶向脂质体诸如免疫脂质复合物,是本领域技术人员公知的。

[0356] 使用基于RNA或DNA病毒的系统来递送编码 $\alpha$ -淀粉酶或其变体的核酸利用高度进化的方法来将病毒靶向体内的特定细胞并将病毒载荷运输至细胞核。可向患者(体内)直接施用病毒载体,或者可将它们用于体外处理细胞,并将向患者(离体)施用所述改良的细胞。用于递送本公开的多肽的常规基于病毒的系统可包括用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关和单纯疱疹病毒载体。病毒载体目前是靶细胞和组织中最高效和通用的基因转移方法。用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因转移方法使宿主基因组中的整合成为可能,这常常导致插入的转基因长期表达。另外,已经在许多不同的细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。

[0357] 逆转录病毒的向性(tropism)可通过掺入外来包膜蛋白质、扩增靶细胞的潜在靶群体来改变。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并且通常产生高病毒滴度的逆转录病毒载体。因此,逆转录病毒基因转移系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体由顺式作用长末端重复序列组成,具有高达6-10kb外源序列的包装能力。最小顺式作用LTR足以用于载体的复制和包装,然后将其用于将治疗基因整合到靶细胞中以提供永久性转基因表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SW)、人免疫缺陷病毒(HIV)及其组合的那些载体,所有这些载体都是本领域公知的。

[0358] 在其中优选本公开的多肽的瞬时表达的应用中,通常使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体在许多细胞类型中能够具有非常高的转导效率,并且不需要细胞分裂。通过使用此类载体,已经获得了高的滴度和表达水平。这种载体可在相对简单的系统中大量产生。腺相关病毒("AAV")载体也用于用靶核酸转导细胞(例如在核酸和多肽的体外产生

中),以及用于体内和离体基因疗法程序。重组AAV载体的构建描述于许多出版物中,包括美国专利第5,173,414号;Tratschin等,Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985);Tratschin等,Mol.Cell.Biol.4:2072-2081(1984);Hermonat和Muzyczka,PNAS 81:6466-6470(1984);和Samulski等,J.Virol.63:03822-3828(1989)。

[0359] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是基于缺陷性和非病原性细小病毒属腺相关2型病毒的有前景的替代基因递送系统。所有载体均源自仅保留了侧接转基因表达盒的AAV 145bp反向末端重复的质粒。由于整合到转导细胞基因组中所引起的高效基因转移和稳定的转基因递送是这种载体系统的关键特征。

[0360] 可对复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)进行工程改造,使得转基因取代Ad E1a、E1b和E3基因;随后,在人293细胞中扩增复制缺陷型载体,所述细胞以反式提供缺失的基因功能。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂的分化细胞,诸如存在于肝脏、肾脏和肌肉系统组织中的那些。常规Ad载体具有大的携带能力。

[0361] 包装细胞用于形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括293细胞(其包装腺病毒)和42细胞或PA317细胞(其包装逆转录病毒)。用于基因疗法的病毒载体通常由将核酸载体包装入病毒颗粒的生产性细胞系产生。载体通常含有包装和随后整合到宿主中所需的最小病毒序列、被待表达蛋白质的表达盒取代的其它病毒序列。缺失的病毒功能由包装细胞系反式提供。例如,用于基因疗法的AAV载体通常仅具有来自AAV基因组的ITR序列,其是包装和整合到宿主基因组中所必需的。将病毒DNA包装在细胞系中,所述细胞系包含编码另外的AAV基因(即rep和cap)但缺少ITR序列的辅助质粒。还用作为辅助病毒的腺病毒来感染细胞系。辅助病毒促进AAV载体的复制以及AAV基因从辅助质粒的表达。由于缺乏ITR序列,辅助质粒未被大量地包装。腺病毒污染可以通过例如腺病毒比AAV对其更敏感的热处理来减少。

[0362] 在许多基因疗法应用中,期望以对特定组织类型的高度特异性递送基因治疗载体。通常通过将配体作为与病毒外壳蛋白的融合蛋白表达在病毒外表面上来修饰病毒载体以对给定的细胞类型具有特异性。选择对已知存在于目标细胞类型上的受体具有亲和力的配体。该原理可以扩展到其它的表达配体融合蛋白的病毒和表达受体的靶细胞对。例如,可对丝状噬菌体进行工程改造以展示对几乎任何选择的细胞受体具有特异性结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。虽然以上描述主要适用于病毒载体,但是相同原理可应用于非病毒载体。可将此类载体工程改造以含有特定的摄取序列,所述摄取序列被认为有利于被特定靶细胞(诸如肌肉细胞)摄取。

[0363] 可以通过全身性施用(例如,静脉内、腹膜内、肌内、皮下或颅内输注)或局部施用向个体患者施用来体内递送基因治疗载体。或者,可将载体离体递送至细胞,诸如从个体患者移出的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽吸物、组织活检物)或通用供体造血干细胞,然后通常在选择已掺入载体的细胞后将细胞重新植入患者体内。

[0364] 用于诊断、研究或基因疗法(例如,经由将转染的细胞重新输注到宿主生物体中)的离体细胞转染是本领域技术人员公知的。例如,从受试生物体中分离细胞,用编码例如 $\alpha$ -淀粉酶或其变体的核酸(基因或cDNA)转染细胞,并将所述细胞再次输注回受试生物体(例如患者)。适用于离体转染的各种细胞类型是本领域技术人员公知的。

[0365] 在某些实施方案中,将干细胞用于细胞转染和基因疗法的离体方法。使用干细胞

的有利方面是它们可以在体外分化成其它细胞类型,或者可被引入哺乳动物(诸如细胞的供体)中,在所述哺乳动物中它们将移入骨髓中。使用已知方法分离干细胞以用于转导和分化。

[0366] 还可向生物体直接施用含有治疗性核酸的载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)以在体内转导细胞。或者,可施用裸DNA。施用通过通常用于引入分子与血液或组织细胞最终接触的任何途径进行。施用此类核酸的合适方法是可用的,并且为本领域技术人员所公知,尽管可以使用多于一种途径来施用特定组合物,但特定途径通常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0367] 药学上可接受的载体部分地通过所施用的特定组合物以及通过用来施用组合物的特定方法来确定。因此,如本文所述,存在多种合适的本公开的药物组合物的制剂。

[0368] VII. 施用方法

[0369] 各种递送系统是已知的并且可用于施用本公开的嵌合多肽。任何此类方法可用于施用本文所述的任何嵌合多肽。本公开设想了本文公开的任何施用方法可用于在本文所述的任何方法(例如,治疗方法;减少细胞质糖原积累的方法)的背景下递送本公开的任何嵌合多肽。

[0370] 引入方法可以是肠内或肠胃外的,包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、心肌内、静脉内、皮下、肺、鼻内、眼内、硬膜外、鞘内、颅内、心室内和口服途径。嵌合多肽可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过经由上皮或粘膜皮肤衬(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)的吸收,并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。

[0371] 在某些实施方案中,嵌合多肽通过静脉内施用。

[0372] 在某些实施方案中,可能期望将本公开的嵌合多肽局部施用于需要治疗的区域(例如,肌肉);这可以例如但不限于通过在手术期间的局部输注,通过导管或通过植入物来实现,所述植入物具有多孔、无孔或凝胶状的材料,包括膜,诸如硅橡胶膜、纤维或商业皮肤替代品。

[0373] 在另一个实施方案中,此类局部施用可以是向心脏的全部或部分。例如,施用可以通过心包内或心肌内施用。类似地,可使用旨在将剂递送至心脏的各个区域的导管、线等来实现向心脏组织的施用。

[0374] 在另一个实施方案中,局部施用是针对肝脏的。肝脏中的糖原储存和糖原分解影响体内许多其它组织的糖原的可用性。例如,可将静脉导管置于肝门静脉中以将嵌合多肽直接递送至肝脏。另外,在嵌合多肽的内化部分对肝细胞的亲和力低于对其它细胞类型的一些实施方案中,通过肝门静脉的递送确保足够浓度的 $\alpha$ -淀粉酶到达肝细胞。

[0375] 注意,本公开设想了其中经由超过一种的施用途径在相同或不同的时间施用嵌合多肽的方法。例如,本公开设想了其中诸如通过静脉内输注、与经由肝门静脉的局部施用组合来全身性施用嵌合多肽的方案。

[0376] 在其它实施方案中,可将本公开的嵌合多肽在小囊泡特别是脂质体中进行递送(参见Langer,1990,Science 249:1527-1533)。在另一个实施方案中,可将本公开的嵌合多肽在控释系统中递送。在另一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,1990,同上)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参见Howard等,1989,J.Neurosurg.71:105)。在某些具体实施方案中,可以静脉内递送本公开的嵌合多肽。



[0377] 在某些实施方案中,通过静脉内输注施用嵌合多肽。在某些实施方案中,在至少10分钟、至少15分钟、至少20分钟或至少30分钟的时间内输注嵌合多肽。在其它实施方案中,在至少60分钟、90分钟或120分钟的时间内输注嵌合多肽。无论输注时间如何,本公开设想每次输注是整体治疗计划的一部分,其中根据常规方案(例如,每周、每月等)施用嵌合多肽。

[0378] 前述内容适用于本文所述的任何嵌合多肽、组合物和方法。本公开特别地设想了此类嵌合多肽、组合物和方法(单独地或组合地)的特征与针对本节中描述的各种药物组合物和施用途所述的特征的任何组合。

[0379] VIII. 药物组合物

[0380] 在某些实施方案中,用药学上可接受的载体配制(例如,用一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂配制)用于本文公开的任何方法的主题嵌合多肽。一种或多种嵌合多肽可以单独施用或作为药物制剂(组合物)的组分施用。如本文所述,可以配制本文所述的任何嵌合多肽,并且任何此类组合物(例如,药物组合物,或制备物或制剂)可用于本文所述的任何方法中。在其它实施方案中,组合物包含含有 $\alpha$ -淀粉酶多肽的嵌合多肽。可将嵌合多肽配制成用于以任何方便的方式施用以用于人或兽医学中。润湿剂、乳化剂和润滑剂(诸月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。

[0381] 主题嵌合多肽的制剂包括例如适用于口服、经鼻、局部、肠胃外、直肠和/或阴道内施用的那些。制剂可以方便地以单位剂型提供,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的宿主和特定的施用方式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的那个量。

[0382] 在某些实施方案中,制备这些制剂或组合物的方法包括将另一种类型的治疗剂和载体以及任选的一种或多种辅助成分组合。通常,制剂可以用液体载体或细碎的固体载体或两者制备,然后,如果需要,可将产品成形。

[0383] 在某些实施方案中,本文所述的任何药物组合物包含浓缩量的本文所述的任何嵌合多肽。在一些实施方案中,与最初从产生嵌合多肽的细胞中纯化的嵌合多肽的水平相比,所述组合物具有浓50%、100%、150%、200%、250%、300%、350%或400%的水平的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml或20mg/ml。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少10mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少15mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少20mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少30mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少50mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少70mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少90mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为至少110mg/ml或更高。在一些实施方案中,嵌合多肽的浓度为10-50mg/ml、10-40mg/ml、10-30mg/ml、10-25mg/ml、10-20mg/ml、20-50mg/ml、50-70mg/ml、70-90mg/ml或90-110mg/ml。在一些实施方案中,当在4℃下以药学上可接受的制剂储存时,本文所述的任何组合物保持至少80%、90%、95%或100%的生物活



性(如本文所定义的)持续至少24小时、2天、4天、1周、2周或1个月。在任何前述的一些实施方案中,如本文所述的,组合物的嵌合多肽部分是实质上纯的(例如,超过85%的存在的 $\alpha$ -淀粉酶与内化部分缔合或互连)。

[0384] 用于口服施用的制剂可以呈胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂形式或作为含水液体或非水液体中的溶液或混悬液,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酞剂或糖浆,或作为软锭剂(使用惰性基质,诸如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为口腔清洗剂等,各自含有预定量的主题嵌合多肽治疗剂作为活性成分。除了活性化合物以外,混悬液还可含有助悬剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶及其混合物。

[0385] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖锭剂、粉剂、颗粒剂等)中,本公开的一种或多种嵌合多肽治疗剂可以与一种或多种药学上可接受的载体(诸如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或以下物质中的任何一种混合:(1)填充剂或增充剂诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂诸如例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)增湿剂诸如甘油;(4)崩解剂诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液缓凝剂诸如石蜡,(6)吸收促进剂诸如季铵化合物;(7)润湿剂诸如,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸附剂诸如高岭土和膨润土;(9)润滑剂诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠以及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊、片剂及丸剂的情况下,所述药物组合物还可包含缓冲剂。在使用赋形剂诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的软填充和硬填充的明胶胶囊中还可以采用相似类型的固体组合物作为填充剂。用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂和酞剂。除了活性成分以外,液体剂型还可含有本领域中常用的惰性稀释剂,诸如水或其它溶剂、增溶剂及乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇)、油(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇及脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂以外,口服组合物还可包括佐剂诸如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0386] 在某些实施方案中,本公开的方法包括局部施用于皮肤或粘膜(诸如宫颈和阴道上的那些粘膜)。局部制剂还可包含已知作为皮肤或角质层渗透促进剂是有效的多种试剂中的一种或多种。这些试剂的实例是2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、丙二醇、甲醇或异丙醇、二甲基亚砷和氮酮。还可包括另外的试剂以使制剂在美容上是可接受的。这些试剂的实例是脂肪、蜡、油、染料、芳香剂、防腐剂、稳定剂和表面活性剂。还可包括角质层分离剂诸如本领域已知的那些。实例是水杨酸和硫。用于局部或透皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。可将主题多肽治疗剂在无菌条件下与药学上可接受的载体混合,并与任何防腐剂、缓冲剂(例如,HEPES缓冲剂)或可能需要的推进剂混合。除了主题嵌合多肽剂以外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶还可含有赋形剂,诸如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。除了主题嵌合多肽以外,粉剂和喷雾剂还可含有赋形剂,诸如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷

雾剂可另外含有常用的推进剂,诸如氯氟烃和挥发性未取代的烃,诸如丁烷和丙烷。

[0387] 适用于肠胃外施用的药物组合物可包含一种或多种嵌合多肽与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散剂、混悬液或乳剂或无菌粉末的组合,可在即将使用时将所述无菌粉末复原成无菌可注射溶液或分散液,所述注射液或分散液可含有抗氧化剂、缓冲剂(例如,HEPES缓冲剂)、抑菌剂、使制剂与预期受者的血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。可用于本公开的药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油诸如橄榄油,和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。例如,可以通过使用包衣材料(诸如卵磷脂),通过维持所需的粒度(在分散体的情况下),以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0388] 这些组合物还可含有佐剂诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等),可以确保防止微生物的作用。也可取的是,在组合物中包含等渗剂诸如糖、氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收的剂诸如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射药物形式的吸收。

[0389] 通过在诸如聚丙交酯-聚乙交酯的可生物降解聚合物中形成一种或多种多肽治疗剂的微囊基质来制备可注射的储库形式。取决于药物与聚合物的比率,以及所用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放速率。其它可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过将药物截留在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备储库可注射制剂。

[0390] 在优选的实施方案中,根据常规程序将本公开的嵌合多肽配制为适于向人类静脉内施用的药物组合物。必要时,该组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂诸如利多卡因,以缓解注射部位的疼痛。当通过输注施用组合物时,可用装有制药级无菌水或盐水的输液瓶将其分散。当组合物通过注射施用,可提供注射用无菌水或盐水的安瓿以使得成分可在施用之前混合。

[0391] 在另一个实施方案中,将本公开的嵌合多肽配制成用于向人类皮下施用。

[0392] 在某些实施方案中,将本公开的嵌合多肽配制成用于鞘内、颅内和/或心室内施用。在某些实施方案中,将用于在诸如患有拉福拉病的受试者中治疗拉福拉病或减少神经元中的糖原积累的本公开的嵌合多肽配制成用于鞘内、颅内和/或心室内递送。在某些实施方案中,本公开的方法,诸如治疗拉福拉病或减少神经元中的糖原积累的方法,包括鞘内、颅内和/或心室内递送本公开的嵌合多肽。

[0393] 在某些实施方案中,将本公开的嵌合多肽配制成用于递送至心脏,诸如用于心肌内或心包内递送。

[0394] 在某些实施方案中,该组合物意图用于经由肝门静脉向肝脏局部施用,并相应地配制嵌合多肽。

[0395] 注意,在某些实施方案中,特定制剂适合用于经由超过一种途径递送的情况。因此,例如,适于静脉内输注的制剂也适合于经由肝门静脉递送。然而,在其它实施方案中,制剂适用于一种递送途径的情况,但不适合用于第二种递送途径的情况。

[0396] 在治疗组织相关病患或疾病(例如,拉福拉病)方面将有效的本公开的嵌合多肽的量可通过标准临床技术来确定。另外,可任选地采用体外测定来帮助鉴定最佳剂量范围。制剂中有待采用的精确剂量还将取决于施用途径以及病患的严重程度,并且应根据医生的判

断和每一位受试者的情况来决定。然而,静脉内施用的合适剂量范围通常为约20-5000微克活性嵌合多肽/千克体重。鼻内施用的合适剂量范围通常为约0.01pg/kg体重至1mg/kg体重。可由从体外或动物模型测试系统得到的剂量-反应曲线推断有效剂量。

[0397] 在某些实施方案中,本公开的组合物(包括药物制剂)是无热原的。换句话说,在某些实施方案中,组合物本质上无热原。在一个实施方案中,本公开的制剂是无热原的制剂,其本质上不含内毒素和/或相关的致热物质。内毒素包括限制在微生物内的毒素,并且仅在微生物分解或死亡时释放。致热物质还包括来自细菌和其它微生物的外膜的诱导发热的热稳定物质(糖蛋白)。如果向人施用,则这两种物质都可引起发热、低血压和休克。由于潜在的有害作用,必须从静脉内施用的药物溶液中除去即使少量的内毒素。美国食品和药品管理局(“FDA”)已对于静脉内药物应用设定了在单个1小时的时间内5个内毒素单位(EU)/剂量/千克体重的上限(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000))。当治疗性蛋白质以相对大的剂量和/或长时间(例如,诸如持续患者的整个生命期)施用时,即使少量有害和危险的内毒素也可能是危险的。在某些具体实施方案中,组合物中的内毒素和热原水平小于10EU/mg,或小于5EU/mg,或小于1EU/mg,或小于0.1EU/mg,或小于0.01EU/mg,或小于0.001EU/mg。

[0398] 在一些实施方案中,本公开提供了组合物,诸如用一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂配制的包含本公开的嵌合多肽的药物组合物。此类组合物包括含有本文所述的任何内化部分部分和如本文所述的 $\alpha$ -淀粉酶部分(包含)的组合物。例如,本公开提供了包含含有 $\alpha$ -淀粉酶的嵌合多肽的组合物。在某些实施方案中,本文所述的任何组合物可基于本文所述的任何 $\alpha$ -淀粉酶部分和/或内化部分部分。此外,可基于本文所述的任何结构和/或功能特征描述任何此类组合物。任何此类组合物可用于本文所述的任何方法中,诸如施用于细胞和/或需要治疗的受试者,诸如施用于细胞和/或施用于患有拉福拉病的受试者。任何此类组合物可用于将 $\alpha$ -淀粉酶活性递送至细胞中,诸如递送至有需要的患者(例如,患有拉福拉病的患者)的肌肉细胞和/或肝细胞中。

[0399] 此类组合物,包括本文所述的任何组合物,可以例如在瓶子或注射器中提供,并在施用前储存。

[0400] 前述内容适用于本文所述的任何嵌合多肽、组合物和方法。本公开特别地设想了此类嵌合多肽、组合物和方法(单独地或组合地)的特征与针对本节中描述的各种药物组合物和施用途径所述的特征的任何组合。

#### [0401] IX. 动物模型

[0402] 经工程改造为malin缺陷的小鼠显示出与在人拉福拉病病例中观察到的类似的表型。具体地,malin<sup>-/-</sup>小鼠以年龄依赖性方式呈现神经变性、增强的突触兴奋性和患肌阵挛性癫痫发作的倾向。Valles-Ortega等,2011,EMBO Mol Med,3(11):667-681。另外,这些小鼠积累了充满糖原的包涵体,所述包涵体在海马和小脑中最为丰富,但也存在于骨骼肌细胞和心肌细胞中。Valles-Ortega等还发现在malin<sup>-/-</sup>小鼠的细胞中糖原的分支比在健康对照小鼠的细胞中观察到的糖原少。Valles-Ortega等还在该小鼠模型中还描述了升高的水平的糖原过度磷酸化。Turnbull等,2010,Ann Neurol,68(6):925-33。

[0403] 经工程改造为具有laforin缺陷的小鼠也显示出与人拉福拉病病例的一些表型相似性。具体地,laforin<sup>-/-</sup>小鼠出生发育正常,但发展出年龄依赖性共济失调和肌阵挛性癫

病。Ganesh等,2002, Hum Mol Genet, 11 (11):1251-62。另外, laforin-/-小鼠在2月龄时显示出神经元的广泛变性,并且在4-12月龄时显示包涵体的发展。Ganesh等,2002。laforin缺陷小鼠也显示脑中的过度磷酸化和tau蛋白的聚集。Puri等,2009, J Biol Chem, 284 (34): 22657-63。

[0404] 因此,在某些实施方案中,本公开设想了使用本文公开的本公开的任何 $\alpha$ -淀粉酶(例如,熟 $\alpha$ -淀粉酶)构建体在任何一种或多种动物模型(诸如本文所述的小鼠模型)中调查疾病表型改善的方法。举例来说,可以在用主题嵌合多肽处理的实验动物中检查各种参数,并且可将此类动物与对照进行比较。可被评估以估计潜在功效的示例性参数包括但不限于:寿命的增加、糖原清除率的增加、糖原积累减少和增强的肌肉力量(例如在旷场模式和明线悬挂模式(open field and open wire hang paradigms)中)、改善的心脏功能、改善的肝功能或肝尺寸的减小。可以例如通过来自处理的或未处理的动物模型的活检物(例如,肌肉(例如,心脏或膈膜)、肝脏或神经元)中的高碘酸希夫染色来评估糖原清除率的增加和糖原积累的减少。可以观察到的另外的参数包括以下方面的减少:神经变性、癫痫发作的次数/持续时间/强度、包涵体的数量或尺寸、糖原过度磷酸化的量、共济失调、tau过度磷酸化和/或tau聚集。在某些实施方案中,本公开提供了在具有任何前述病患的受试者中减少细胞质糖原积累的方法。在特定实施方案中,可在来自拉福拉病动物模型的骨骼肌(例如,膈膜)、肝脏、心肌和/或脑神经元中监测本文公开的任何参数。

[0405] 此外,确定了用于确定本文所述的任何嵌合多肽的有效剂量、清除率、分布体积和半衰期的完整药代动力学研究。可在较大的动物诸如大鼠、狗和灵长类动物中检查最终产物的PK/PD/TK。

[0406] 上述模型是用于评估主题嵌合多肽和/或制剂的活性和功效的合适动物模型系统的示例。这些模型与拉福拉病的症状相关,因此为研究拉福拉病提供了合适的模型。在这些模型中的任何一个或多个中评估主题嵌合多肽和/或制剂的活性,并将结果与在野生型对照动物和未用嵌合多肽处理(或仅用 $\alpha$ -淀粉酶处理)的动物中观察到的结果进行比较。类似地,可以使用培养中的细胞(例如,从任何前述突变小鼠或其它动物制备的细胞,以及野生型细胞,诸如成纤维细胞、成肌细胞或肝细胞)评估主题嵌合多肽。也可以使用来自患有该疾病的受试者的细胞。用于测试本文公开的嵌合多肽的活性的体外测定的实例是用或不用嵌合多肽处理拉福拉病细胞,然后在孵育一段时间后,就糖原的存在例如通过使用高碘酸希夫(PAS)染色对细胞进行染色。还可以监测包涵体的量和糖原过度磷酸化的量。还可在处理或未处理的细胞中监测细胞增殖、形态学和细胞死亡。

[0407] 本公开的嵌合多肽具有多种用途,包括体外和体内用途。体内用途不仅包括治疗用途,而且还包括在例如任何前述动物模型中的诊断和研究用途。举例来说,本公开的嵌合多肽可用作研究试剂并被递送至动物以了解 $\alpha$ -淀粉酶的生物活性、定位和运输、蛋白质间相互作用、酶活性以及对健康或疾病动物的动物生理学的影响。

[0408] 嵌合多肽也可以用于在体外评估例如培养中的细胞(包括培养中的健康细胞、患病(但非 $\alpha$ -淀粉酶缺陷)细胞以及laforin、 $\alpha$ -淀粉酶和/或malin缺陷细胞)中的 $\alpha$ -淀粉酶的生物活性、定位和运输、蛋白质间相互作用和酶活性。本公开设想了本公开的嵌合多肽可用于将 $\alpha$ -淀粉酶递送至细胞(包括培养中的细胞)的细胞质、溶酶体和/或自噬囊泡。在一些实施方案中,培养的细胞获自拉福拉病受试者,例如来自拉福拉病人患者或来自拉福拉病动

物模型。在一些实施方案中,嵌合多肽可用于缺氧细胞模型,类似于Pelletier等, *Frontiers in Oncology*, 2 (18):1-9.中所述的缺氧细胞模型。

[0409] 另外,无细胞系统可用于评估例如主题嵌合多肽的酶活性。例如,糖原可获自健康和/或患病受试者(例如,来自拉福拉病受试者)的样品,并且可以例如,以与本文提供的实施例部分中描述的方式类似的方式评估本文公开的任何嵌合多肽水解糖原的能力。在一些实施方案中,用于此类无细胞系统的糖原可获自受试者(例如,来自拉福拉病受试者)的肌肉(例如,膈肌或心肌)细胞、肝细胞或神经元(例如,脑)细胞。在一些实施方案中,受试者是人拉福拉病患者或拉福拉病的动物模型。

[0410] 嵌合多肽,诸如 $\alpha$ -淀粉酶嵌合多肽,还可被用于鉴定其中蛋白质诸如 $\alpha$ -淀粉酶无缺陷的系统中(诸如在在福布斯科里病中)的蛋白质间相互作用。嵌合多肽还可被用于理解减少某些细胞类型(但可能不是存在症状的所有细胞类型)中的糖原积累的相对益处。嵌合多肽可用于鉴定 $\alpha$ -淀粉酶的底物,特别是在内源 $\alpha$ -淀粉酶未突变的环境中。嵌合多肽可用于评估健康细胞以及其中糖原积累归因于不同的潜在原因的患病细胞中的 $\alpha$ -淀粉酶和嵌合多肽的运输。

[0411] X. 试剂盒

[0412] 在某些实施方案中,本公开还提供药物包装或试剂盒,其包括一个或多个填充有至少一种本公开的嵌合多肽的容器。任选地,与一个或多个此类容器相关联的可以是管理药品或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,该通告反映了(a)获得了有关用于人施用的生产、使用或销售的机构的批准,(b)使用说明书,或两者兼而有之。

[0413] 在某些实施方案中,试剂盒包括另外的材料以帮助主题嵌合多肽的递送。例如,试剂盒可包括导管、管、输液袋、注射器等中的一种或多种。在某些实施方案中,以冻干形式包装嵌合多肽,并且试剂盒包括至少两个容器:包含冻干嵌合多肽的容器和包含适量的水、缓冲液(例如,HEPES缓冲液)或其它适于复原冻干物质的液体的容器。

[0414] 前述内容适用于本文所述的任何嵌合多肽、组合物和方法。本公开特别地设想了此类嵌合多肽、组合物和方法(单独地或组合地)的特征与针对本节中描述的各种试剂盒所描述的特征的任何组合。

[0415] 实施方式

[0416] 现在一般性地描述本公开,通过参考以下实施例将更容易地对其理解,所述实施例仅出于说明本公开的某些方面和实施方案的目的而被包括,并且不旨在限制本公开。例如,本文公开的特定构建体和实验设计代表用于验证适当功能的示例性工具和方法。因此,显而易见的是,可在本公开的范围内替代任何公开的具体构建体和实验计划。

[0417] 实施例:Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白的产生和表征

[0418] A. Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白的合成

[0419] 在两种不同的哺乳动物细胞系CHO-3E7和HEK-293 6E细胞中重组产生包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽部分和内化部分部分的嵌合多肽。将包含成熟 $\alpha$ -淀粉酶多肽的 $\alpha$ -淀粉酶多肽(例如,具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽)与包含SEQ ID NO:7中所示的重链可变结构域的人源化3E10抗体的Fab融合。具体地,通过具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的接头将具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的 $\alpha$ -淀粉酶多肽与人源化3E10Fab片段(其包含SEQ ID NO:4

的信号序列)的重链恒定区的C末端融合,产生具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的融合多肽。轻链包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列和SEQ ID NO:5的信号序列,以提供SEQ ID NO:10的序列。在下面描述的实验设计中提及包含重链和轻链的所得“Fab- $\alpha$ -淀粉酶”。

[0420] 通过在两种细胞系中的任一种中表达编码轻链的载体和编码重链-淀粉酶融合物的载体来产生该Fab。尽管使用了两种单独的载体,但也可以使用编码重链和轻链的单一载体。

[0421] 为了在哺乳动物细胞中表达,对编码重组重链(SEQ ID NO:9)的核苷酸序列和编码轻链(SEQ ID NO:10)的核苷酸序列进行密码子优化,并使用标准方法将其克隆到pTT5载体中。编码SEQ ID NO:9的序列的表达质粒和编码SEQ ID NO:10的序列的表达质粒的低内毒素的巨大规模(giga-prep scale)生产产生了7.0mg的每种质粒DNA(每种,载体)。然后将CHO-3E7细胞和HEK-293-6E细胞各自以下文概述的方式用这两种质粒进行转染。

[0422] i. CHO-3E7

[0423] 以1:4 (w/v) DNA:PEI比率使用PolyPlus线性Q-PEI,用总共1mg (1:1比率的HC:LC)的质粒DNA/L培养物转染4份2L摇瓶中的1L CHO-3E7细胞培养物(初始密度为 $1.9 \times 10^6$ 个细胞/mL)。针对密度和活力,使用CedexXS(第0-1天)或Vi-Cell XR(第2-8天)监测培养参数。培养基为补充有0.1%Pluronic F-68、4mM GlutaMAX的F17。将细胞以在 $0.5-5 \times 10^6$ 个细胞/mL之间的密度维持在摇瓶中。在以135rpm振动下,将烧瓶在37℃下于潮湿的5%CO<sub>2</sub>环境中孵育。转染后8天通过以1000x g离心5分钟收获培养物。通过以9300x g离心30分钟来使条件培养物上清液变澄清。

[0424] 使用CaptureSelect IgG-CH1亲和基质(Life Technologies,#194320001)从CHO-3E7细胞中纯化Fab- $\alpha$ -淀粉酶。在缓冲液A(1xPBS(2.7mM KCl,1.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,136mM NaCl,10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),pH7.2(23℃))中平衡CaptureSelect IgG-CH1亲和树脂(床体积为5mL)。在4℃下在搅拌下分批地使来自4L耗尽上清液的Fab- $\alpha$ -淀粉酶与CaptureSelect IgG-CH1亲和树脂结合过夜。将树脂收集在2.5cm直径的Econo柱中,并用约15倍柱体积(CV)的缓冲液A、15CV的缓冲液B(1X PBS,500mM NaCl,pH 7.2(23℃))和15CV的缓冲液A洗涤。将树脂结合的Fab- $\alpha$ -淀粉酶用约4CV的缓冲液C(30mM NaOAc,pH 3.5-3.6(23℃))洗脱,然后用约4CV的缓冲液D(100mM甘氨酸,Ph2.7(23℃))洗脱,收集2mL级分中的蛋白质,将其用1/10体积缓冲液E(3M乙酸钠,约pH 9.0(23℃))稀释以用于中和。为了使洗脱体积最小化,在收集的每个级分之间暂停洗脱数分钟。在合并分别来自缓冲液C洗脱和缓冲液D洗脱的级分6-12和1-11之前,通过A280分析级分。将合并的CaptureSelect IgG-CH1亲和剂汇集物(pool)(50mL)在4℃下针对3x 1L透析缓冲液(20mM组氨酸,150mM NaCl,pH 6.5(23℃))进行透析。在最终分析之前,使用VivaSpin 20(10K MWCO,PES膜)离心装置将透析的汇集物浓缩至约10mg/mL,并在-80℃下储存。通过SDS-PAGE和尺寸排阻色谱法分析选择的级分,其中确认了Fab- $\alpha$ -淀粉酶正在产生并被成功纯化(数据未显示)。

[0425] ii. HEK-293-6E细胞

[0426] 以1:1.5 (w/v)的DNA:PEI比率使用PolyPlus线性Q-PEI,用总共1mg (1:1比率的HC:LC)质粒DNA/L培养物转染20份2L摇瓶中的1L 293-6E细胞培养物(初始密度为 $2.6 \times 10^6$ 个细胞/mL)。针对密度和活力,使用ViCell XR监测培养参数。培养基为补充有0.1%Pluronic F-68、4mM GlutaMAX、25 $\mu$ g/mL G418的F17。将细胞以在 $0.5-5 \times 10^6$ 个细胞/mL之间的密度维

持在摇瓶中。在以135rpm振动下,将烧瓶在37℃下于潮湿的5%CO<sub>2</sub>环境中孵育。转染后6天通过以1000x g离心5分钟收获培养物。通过以9300x g离心30分钟来使条件培养物上清液变澄清。

[0427] 使用CaptureSelect IgG-CH1亲和基质(Life Technologies,#194320001)从HEK-293-6E细胞中纯化Fab- $\alpha$ -淀粉酶。在缓冲液A(1xPBS(2.7mM KCl,1.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,136mM NaCl,10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),pH 7.2(23℃))中平衡CaptureSelect IgG-CH1亲和树脂。在4℃下在搅拌下分批地使来自20L耗尽上清液的Fab- $\alpha$ -淀粉酶与CaptureSelect IgG-CH1亲和树脂(40mL床体积)结合过夜。将树脂收集在5cm直径的Econo柱中,并用约15倍柱体积(CV)的缓冲液A、15CV的缓冲液B(1X PBS,500mM NaCl,pH 7.2(23℃))和15CV缓冲液A洗涤。将树脂结合的融合蛋白用约4CV的缓冲液C(30mM NaOAc,pH 3.5-3.6(23℃))洗脱,然后用约4CV的缓冲液D(100mM甘氨酸,pH 2.7(23℃))洗脱,收集10mL级分中的蛋白质,将其用1/10体积的缓冲液E(3M乙酸钠,约pH9.0(23℃))稀释以用于中和。为了使洗脱体积最小化,在收集的每个级分之间暂停洗脱数分钟。在合并级分7-25之前通过A280分析级分。通过SDS PAGE分析选择的级分。Fab- $\alpha$ -淀粉酶保留在来自第一次亲和层析通过液(affinity chromatography pass)的非结合汇集物(pool)中。重复上述过程以捕获剩余的Fab- $\alpha$ -淀粉酶。在透析之前合并亲和力和汇集物。

[0428] 将合并的CaptureSelect IgG-CH1亲和力和汇集物(250mL)在4℃下针对3x 4L透析缓冲液(20mM组氨酸,150mM NaCl,pH 6.5(23℃))进行透析。在最终分析之前,使用VivaCell 100(10K MWC0,PES膜)离心装置将透析的汇集物缩至约10mg/mL,并在-80℃下储存。通过SDS-PAGE和尺寸排阻色谱法分析选择的级分,其中确认了Fab- $\alpha$ -淀粉酶正在产生并被成功纯化(数据未显示)。

[0429] 在替代实施方案中,可产生包含全长人源化3E10抗体和 $\alpha$ -淀粉酶蛋白的蛋白质。可以例如类似地制备本公开的其它嵌合蛋白,并且任何此类蛋白质都可用于本文描述的任何方法中。

[0430] B. 无细胞活性测定中的Fab- $\alpha$ -淀粉酶

[0431] 在无细胞测定中评估Fab- $\alpha$ -淀粉酶消化糖原的能力。通过从来自葡萄糖氧化酶试剂盒(Sigma GAG020-1KT)的1mg/mL葡萄糖在水中稀释来制备葡萄糖标准品:0.08mg/mL、0.06mg/mL、0.04mg/mL、0.02mg/mL、0.01mg/mL、0.005mg/mL(0.1mg/mL=555.1 $\mu$ M)。通过以表1中所示的量添加0.1M柠檬酸和0.2M磷酸氢二钠来制备pH 3.5至pH 7.0的20mL柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液。将缓冲液掺入10%Tween-80中至0.02%的终浓度,并用pH计验证pH。还制备0.1M乙酸钠(pH 4.3)+0.02% tween-80。

[0432] 表1

[0433]

pH	0.1M柠檬酸(mL)	0.2M磷酸氢二钠(mL)
3.5	6.04	13.96
4	7.72	12.28
4.3	8.49	11.51
4.5	9	11
5	10.28	9.72

5.5	11.36	8.64
6	12.84	7.16
6.5	14.2	5.8
7	17.44	2.56

[0434] 然后在每种待测试的缓冲溶液中制备10mg/mL糖原。将Fab- $\alpha$ -淀粉酶在反应缓冲液中稀释至1mg/mL,然后将1.8 $\mu$ L的1mg/mL Fab- $\alpha$ -淀粉酶加入到500 $\mu$ L小瓶中的178.2 $\mu$ L糖原溶液中(10 $\mu$ g/mL的终Fab- $\alpha$ -淀粉酶浓度)。将样品充分混合并在环境温度下孵育1小时。也将糖原溶液保留作为阴性对照。通过在95℃下加热样品10分钟来终止消化。将Fab- $\alpha$ -淀粉酶阴性糖原样品加热作为阴性对照/空白样品。然后将葡萄糖标准品和消化的糖原测试样品(40 $\mu$ L/孔)一式三份移液到96孔板中,并在室温下用多通道移液管向每个孔中加入80 $\mu$ L葡萄糖氧化酶试剂盒试剂混合物(Sigma GAG020-1KT;如试剂盒中所述制备的),充分混合并在37℃下孵育30分钟。通过用多通道移液管加入80 $\mu$ L12N硫酸并充分混合来终止反应。然后在540nm处读板。在阴性对照样品中未观察到有明显的糖原消化。相比之下,在具有Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白的样品中观察到糖原消化,其中在微酸性pH下观察到最强劲的活性。测试样品的代表性结果示于下表2中。

[0435] 表2

[0436]

pH	比活性( $\mu$ M/min/mg)
5.5	753.5
6.0	689.4
6.5	562.3
7.0	435.1
7.5	390.2

[0437] 还发现Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白质在4.3的pH下无活性(未显示数据)。

[0438] 在另外或替代实验中,以与Zeng等,2012,FEBS J,279(14):2467-78中描述的方式类似的方式,从拉福拉病动物模型中(例如,Ganesh等,2002,Hum Mol Genet,11:1251-1262的小鼠模型)分离出多葡聚糖体。简言之,以与Wang等,2013,Mol Neurobiol,48(1):49-61中所述的方式类似的方式,从出生后第2天的Epm2a野生型小鼠或敲除小鼠的脑中将前脑皮层神经元显微分离至神经基础培养基中。然后以与Wang等中描述的方式类似的方式分离多葡聚糖。将纯化的Fab- $\alpha$ -淀粉酶融合蛋白与分离的多葡聚糖以各种剂量一起孵育持续不同的时间点,并监测Fab- $\alpha$ -淀粉酶消化多葡聚糖的能力。

[0439] C.细胞培养物中的Fab- $\alpha$ -淀粉酶

[0440] 以与Wang等描述的方式类似的方式测试Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白在降低原代神经元细胞培养物中的多葡聚糖水平方面的功效。(也参见上述细胞分离方案)。或者,可使用N2A细胞,其中通过以与Wang等描述的方式类似的方式用ER应激物毒胡萝卜素处理这些细胞来模拟拉福拉病表型。然后向原代神经元细胞或经ER应激的N2A细胞(或对照无应激的N2A细胞)施用(或不施用)Fab- $\alpha$ -淀粉酶蛋白,并通过PAS染色监测蛋白质对多葡聚糖水平的影响。经蛋白质处理的细胞中PAS染色的减少与通过嵌合多肽从细胞中清除的多葡聚糖一致。在一些实施方案中,在来自GSDIII和/或GSDIV人患者或动物模型的原代细胞上或动物模型中测



试Fab- $\alpha$ -淀粉酶对糖原水平的影响。

[0441] 在一些实施方案中,在缺氧细胞模型中测试Fab- $\alpha$ -淀粉酶对糖原水平的影响。在特定的实施方案中,缺氧肿瘤细胞模型与Pelletier等,Frontiers in Oncology,2(18):1-9中描述的相同或相似,其中显示了缺氧在某些细胞类型中诱导糖原积累。。简言之,在存在或不存在Fab- $\alpha$ -淀粉酶的情况下,将非癌性细胞(例如,中国仓鼠肺成纤维细胞(CCL39)或小鼠胚胎成纤维细胞(MEF))和/或癌性细胞(例如,LS174或BE结肠癌细胞)在含氧量正常或缺氧(1%O<sub>2</sub>)条件下培养96小时。通过电子显微镜检查和/或高碘酸希夫染色评估糖原水平。评估如与未处理的缺氧细胞相比的Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的缺氧细胞中糖原水平的降低。

[0442] 测试了Fab-淀粉酶在降低ENT2+C2C12肌管中的多葡聚糖水平方面的功效。图1中显示了ENT2+C2C12肌管中Fab-淀粉酶的剂量依赖性摄取。提供了0.01mg/ml和0.1mg/ml的-Fab-淀粉酶与+Fab-淀粉酶的比较。通过比较未转染的C2C12肌管与处理的C2C12肌管的糖原(mg)/蛋白质(mg)水平来证明Fab-淀粉酶减少ENT2+C2C12肌管中的糖原(图2)。通过用PTG转染C2C12肌管,然后在24小时后在培养基中用0.01mg/ml Fab-淀粉酶处理转染的肌管来制备经处理的C2C12肌管。

[0443] D.Fab-淀粉酶对拉福拉体的作用

[0444] 拉福拉病的特征可在于糖原填充的包涵体(在本文中也称为拉福拉体或多葡聚糖体)在脑、心脏、肝脏、肌肉和皮肤中的细胞的细胞质内的积累。

[0445] i.包涵体的纯化

[0446] 包涵体可以以类似于Yokoi等,Arch Neurol,19(1):15-33中所述的方式进行纯化。包涵体还可通过利用改进的纯化方案进行纯化,所述改进的方案包括四个步骤:(1)将组织匀浆,重悬浮混合物并离心;(2)用蛋白酶K消化过夜;(3)过滤;和(4)用SDS和缓冲液洗涤。可以评估来自匀浆、沉淀物和最终样品的样品的产率(例如,从组织裂解物中成功纯化/分离的拉福拉体的百分比)。将改进的纯化方案用于从拉福拉敲除小鼠的脑(图3A和图3C)、心脏(图3B)和骨骼肌(图3D)获得的组织样品。样品证明来自拉福拉敲除小鼠(例如laforin-/-)的分离的拉福拉体之间存在一些明显的视觉相似性和差异。甚至在大脑内也存在具有较大聚集的拉福拉体的异质性的证据(图3C)。测量来自从脑、心脏和骨骼肌获得的匀浆、沉淀物和最终样品的产率(mg/g组织)(图3E),显示骨骼肌中纯化的包涵体的产率为50-70%。另外,从脑、心脏和骨骼肌样品测量碘和总葡萄糖的产率(mg/g组织)(图3F)。

[0447] ii.纯化的包涵体的评估

[0448] 可使用纯化的包涵体评估Fab融合物的功效。将Fab-淀粉酶和Fab-葡糖苷酶应用于从拉福拉敲除小鼠的脑、心脏和骨骼肌组织分离的纯化的包涵体来进行降解测定。结果显示Fab-淀粉酶而非Fab-葡糖苷酶降解纯化的包涵体(图4A)。通过测量从用-Fab-淀粉酶和+Fab-淀粉酶离体处理的野生型小鼠和敲除小鼠获得的样品的包涵体含量( $\mu$ g/mL提取物),进一步评估Fab-淀粉酶对包涵体的作用(图4B)。

[0449] E.Fab- $\alpha$ -淀粉酶活性

[0450] 可使用淀粉酶活性比色测定试剂盒(BioVision)测量Fab-淀粉酶的活性。通过确定在OD 405nm处测量样品的时间点的选择并选择最佳时间点来优化使用所述测定试剂盒的方法。在注射后的不同时间点(包括在注射后1小时、注射后2小时、注射后4小时和注射后24小时)在肌肉中测量Fab-淀粉酶活性(nmol P/mg组织)(图5A)。还在注射后立即和注射后

1小时(图5B, 下图)测量脑的各个切片(如图5B的上图中确定的)的淀粉酶活性(nmol P/min/g组织)。

[0451] F. 体内Fab- $\alpha$ -淀粉酶

[0452] 经工程改造为malin缺陷的小鼠显示出与在人拉福拉病病例中观察到的类似的表型。具体地,malin-/-小鼠以年龄依赖性方式呈现神经变性、增强的突触兴奋性和患肌阵挛性癫痫发作的倾向。Valles-Ortega等,2011,EMBO Mol Med,3(11):667-681。另外,这些小鼠积累了充满糖原的包涵体,所述包涵体在海马和小脑中最为丰富,但也存在于骨骼肌细胞和心肌细胞中。Valles-Ortega等还发现在malin-/-小鼠的细胞中糖原的分支比在健康对照小鼠的细胞中观察到的糖原少。Valles-Ortega等还在该小鼠模型中还描述了升高的水平的糖原过度磷酸化。Turnbull等,2010,Ann Neurol,68(6):925-33。可用于本文所述的体内实验的替代小鼠模型包括Ganesh等,2002,Hum Mol Genet,11(11):1251-62中描述的laforin-/-小鼠模型。

[0453] i. Fab- $\alpha$ -淀粉酶的剂量的选择

[0454] 根据经验确定递送至拉福拉病小鼠的Fab- $\alpha$ -淀粉酶的评估剂量。为了最大限度地减少中和免疫反应对Fab- $\alpha$ -淀粉酶的混杂影响,并最大限度地展示治疗效果的能力,在一周内递送两次高剂量的5mg/kg Fab- $\alpha$ -淀粉酶,然后评估疾病终点的变化。还监测了抗Fab- $\alpha$ -淀粉酶抗体的开发。在确立静脉内Fab- $\alpha$ -淀粉酶导致鼠的脑、心脏、隔膜或肝脏中的异常糖原储存的改善后,开始其它模型(例如,灵长类动物)中的随后体内评估,然后如通过免疫组织化学(例如,PAS染色)所测定的,评估糖原清除率的变化。

[0455] ii. 材料和方法

[0456] a) 化学和遗传缀合的Fab- $\alpha$ -淀粉酶的注射

[0457] 配制Fab- $\alpha$ -淀粉酶并在符合静脉内注射的缓冲液(例如无菌盐水溶液或50mM Tris-HCl(pH7.4),0.15M NaCl的缓冲溶液)中稀释。如下计算给予每只小鼠的Fab- $\alpha$ -淀粉酶的量:剂量(mg/kg) x 小鼠体重(kg) x 储液浓度(mg/ml) = 储液的体积(ml) / 小鼠,用媒介物定容至100 $\mu$ l。

[0458] b) 血液收集

[0459] 在处死动物以进行组织解剖时通过心脏穿刺收集血液。取出血清并在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。为了使解冻和处理的影响最小化,在同一天进行在血液中循环的Fab- $\alpha$ -淀粉酶的所有分析。

[0460] c) 组织收集和制备

[0461] 将取样的组织分份用于免疫印迹、糖原分析、福尔马林固定的石蜡包埋的组织块和在OCT中的冷冻切片。将心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏、四头肌、EDL、比目鱼肌、隔膜、脑和二头肌组织(50-100mg)细分并在塑料管中冷冻,用于进一步处理以用于免疫印迹和糖原分析。将心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏、四头肌、EDL、比目鱼肌、膈肌、脑和二头肌的另外样品细分,于OCT组织切片培养基中冷冻,或在4 $^{\circ}$ C下在3%戊二醛甲醛固定液中固定24至48小时,并将其包埋在Epon树脂中,或固定在10%NBF中并加工成石蜡块。将一些样品在30%KOH中匀浆15分钟,并使用Valles-Ortega等描述的基于淀粉葡萄糖苷酶的测定来测定糖原水平。另外,使用Valles-Ortega等描述的方法在匀浆的样品中评估糖原分支。与未处理的对照小鼠相比,来自用Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的小鼠的样品中糖原积累的减少和糖原分支的增加表明嵌

合多肽能够在小鼠细胞中清除糖原并改善糖原分支。

[0462] d) 组织学评价

[0463] 以1 $\mu$ m切割对Epon-树脂包埋的样品进行切片并用PAS-Richardson染色(用于糖原染色)对其进行染色。如与对照处理的拉福拉病小鼠相比的用Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的拉福拉病小鼠的组织(例如,肌肉或肝脏)中的降低的糖原积累水平表明Fab- $\alpha$ -淀粉酶能够在体内降低糖原水平。

[0464] e) 免疫荧光

[0465] 使用多克隆或单克隆抗 $\alpha$ -淀粉酶抗体检测外源递送的Fab- $\alpha$ -淀粉酶。切割10微米的冷冻切片并置于Superfrost Plus显微镜载玻片上。

[0466] f) 免疫印迹

[0467] 免疫印迹用于检测Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的肌肉(例如,隔膜)、心脏和脑组织中的3E10和 $\alpha$ -淀粉酶免疫反应性物质。根据常规免疫印迹方法进行3E10和 $\alpha$ -淀粉酶的蛋白质分离和免疫印迹检测。用对该蛋白质有特异性的抗体检测 $\alpha$ -淀粉酶。印迹蛋白的抗体检测使用NBT/BCIP作为底物。对照包括媒介物处理的拉福拉病小鼠以及媒介物处理的纯合野生型小鼠。

[0468] g) 循环Fab- $\alpha$ -淀粉酶的分析

[0469] 开发对人Fab- $\alpha$ -淀粉酶有特异性的ELISA并使用可用的抗人淀粉酶抗体(或抗CH1抗体以检测Fab- $\alpha$ -淀粉酶的Fab部分的恒定重链)和缀合有辣根过氧化物酶的抗小鼠二抗(Jackson ImmunoResearch)进行验证。稀释重组Fab- $\alpha$ -淀粉酶并将其用于产生标准曲线。从血清稀释液(标准化成ng/ml血清)或组织提取物(标准化成ng/mg组织)测定Fab- $\alpha$ -淀粉酶的水平。对照包括媒介物处理的野生型小鼠和拉福拉病小鼠。

[0470] h) 抗Fab- $\alpha$ -淀粉酶抗体反应的监测

[0471] 将用于注射拉福拉病小鼠的纯化的Fab- $\alpha$ -淀粉酶以在包被缓冲液(Pierce Biotech)中的1 $\mu$ g/ml涂布在高结合96孔ELISA板上,使其包被过夜,在1%的TBS中的脱脂奶粉(Biorad)中封闭30分钟,然后在TBS中漂洗三次。将来自注射媒介物和Fab- $\alpha$ -淀粉酶的动物的血清的两倍稀释液加载到孔中,使其在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,洗涤三次,与缀合有辣根过氧化物酶(HRP)的兔抗小鼠IgA、IgG和IgM在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,并洗涤三次。用TMB液体底物检测小鼠抗Fab- $\alpha$ -淀粉酶抗体,并在ELISA平板读数器中在405nm处读数。将多克隆抗 $\alpha$ -淀粉酶抗体,然后是HRP缀合的山羊抗兔用作阳性对照抗体反应。大于媒介物处理的拉福拉小鼠的吸光度的405nm处的任何吸光度构成阳性抗Fab- $\alpha$ -淀粉酶抗体反应。对照包括媒介物处理的野生型小鼠和拉福拉小鼠。

[0472] i) 组织糖原分析

[0473] 使用Akman(2011)中描述的方案测定组织糖原含量。在偶尔摇动下将冷冻的肌肉(例如,膈肌和心肌)、脑和肝脏组织的样品(约30-60mg)在200 $\mu$ l 30%(重量/体积)KOH中煮沸30分钟。冷却后,加入67 $\mu$ l的0.25m Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和535 $\mu$ l的乙醇。接下来,将样品在4 $^{\circ}$ C以14500g离心20分钟以收集糖原。将糖原沉淀悬浮于水(100 $\mu$ l)中,加入200 $\mu$ l乙醇并将如上所述的离心用于收获糖原。重复该乙醇沉淀步骤,并将糖原沉淀在Speed-Vac中干燥。将干燥的糖原沉淀悬浮于100 $\mu$ l淀粉葡萄糖苷酶[在0.2m乙酸钠(pH4.8)中的0.3mg/ml]中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时以消化糖原。为了测定样品中的葡萄糖浓度,将经消化糖原的等分试样(5 $\mu$

1) 加入到95 $\mu$ l含有0.3m三乙醇胺(pH 7.6)、0.4mm MgCl<sub>2</sub>、0.9mm NADP、1mm ATP和0.1 $\mu$ g葡萄糖-6-磷酸脱氢酶/ml的溶液中。在添加0.1 $\mu$ g己糖激酶之前和之后读取340nm处的吸光度。

[0474] j) 癫痫发作评估

[0475] 在C57BL6小鼠品系中产生由Valles-Ortega等描述的malin<sup>-/-</sup>小鼠,所述C57BL6小鼠品系通常对癫痫发作具有抗性。然而,虽然红藻氨酸盐的施用在野生型C57BL6小鼠中没有诱导任何癫痫发作,但用红藻氨酸盐处理的malin<sup>-/-</sup>小鼠显示出阵挛性海马癫痫发作。Valles-Ortega等用红藻氨酸盐并且用或不用Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理malin<sup>-/-</sup>小鼠。如果用红藻氨酸盐和Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的小鼠与用红藻氨酸处理但不用任何嵌合多肽处理的malin<sup>-/-</sup>小鼠相比显示出减少的癫痫发作,这表明嵌合多肽在治疗一些在malin<sup>-/-</sup>小鼠中观察到的神经缺陷方面是有效的。

[0476] k) 神经变性分析

[0477] 在用或不用Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的malin<sup>-/-</sup>小鼠的海马中评估小白蛋白阳性中间神经元的总数。Valles-Ortega等。如果来自用Fab- $\alpha$ -淀粉酶处理的小鼠的海马显示出比来自未处理的小鼠的海马中的更少的小白蛋白阳性神经变性,那么这表明嵌合多肽在减少malin<sup>-/-</sup>小鼠中的神经变性方面是有效的。

[0478] l) 统计分析

[0479] 成对比较采用学生t检验。多组之间的比较采用ANOVA。在两种情况下,p值<0.05被认为是统计学上显著的。

[0480] iii. 肌肉注射后Fab- $\alpha$ -淀粉酶的评估

[0481] 通过比较Fab-淀粉酶处理的小鼠与对照小鼠来评估肌肉注射Fab-淀粉酶的效果。在Fab-淀粉酶处理的小鼠中,在两周的时间内将四次20 $\mu$ l (10mg/ml) 肌肉注射施用至右腿的胫骨前肌(TA)肌肉中,同时将PBS注射到左腿中。在对照小鼠中,将PBS注射到小鼠的右腿和左腿中。在两周结束时,处死小鼠并将胫骨前肌用OCT封固剂包埋,在液氮冷却的异丁烷中快速冷冻,然后切片以进行高碘酸希夫(PAS)染色。

[0482] 用Fab-淀粉酶处理的小鼠显示利用PAS染色的暗粉红色糖原检测的非常强的实例减少,以及肌肉结构的改善(例如,快肌纤维与慢肌纤维之间的明显区别)。例如,如图6中所见,经处理的8.5月龄的雌性小鼠(样品#8)在左腿(PBS处理的)(左图)中显示非常暗的粉红色染色,表示过度累积的糖原。相比之下,Fab-淀粉酶处理的肌肉未显示相同的染色(右图)。第二次处理的8.5月龄的雌性小鼠(样品#7)显示出与图7中所见相似的结果。与PBS处理的肌肉(左图)相比,Fab-淀粉酶处理的肌肉(右图)还显示快纤维(小的,浅紫色的)与慢纤维(更大的,更清晰)之间的正常纤维差异。图9提供了4月龄雌性小鼠(样品#6)的PBS处理的肌肉(左图)与Fab-淀粉酶处理的肌肉(右图)的比较,进一步支持了这些发现。8.5月龄的雌性小鼠(样品#10)作为对照(图8),其中用PBS处理左腿和右腿的肌肉(分别为左图和右图)。

[0483] 示例性序列

[0484] SEQ ID NO:1- $\alpha$ 淀粉酶多肽氨基酸序列(Genbank登录号NP\_000690)

- [0485] QYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLAPKGFGGVQVSPPNENVAIYNPFR  
PWWERYQPVSYKLCSTRSGNEDEFNMVTRCANNVGVRIYVDAVINHMCNAVSAG  
TSSTCGSYFNPGRDFPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENYNDATQVRDCRLTGL  
LDLALEKDYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRLDASKHMWPGDIKAILDKLHNLNSN  
WFPAGSKPFIYQEVIDLGGEPIKSSDYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSY  
LKNWGEWGFVPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKMAVGFML  
AHPYGFTRVMSSYRWPRQFQNGNDVNDWVGPPNNNGVIKEVTINPDTTTCGNDWV  
CEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQPFNTWYDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWSFS  
LTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGIKIYVSDDGKAHFSISNSAEDPFIAHAESK  
L
- [0486] SEQ ID NO:2--人源化可变重链氨基酸序列 (VH3)
- [0487] EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSS  
TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT  
LTVSS
- [0488] SEQ ID NO:3--人源化可变轻链氨基酸序列 (VL2)
- [0489] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPEKAPKLLIKYAS  
YLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHSREFPWTFGAGTKLELK
- [0490] SEQ ID NO:4--重链前导氨基酸序列
- [0491] MEFGLSWLFLVAILKGVQC
- [0492] SEQ ID NO:5--轻链前导氨基酸序列
- [0493] MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC
- [0494] SEQ ID NO:6--甘氨酸-丝氨酸接头氨基酸序列
- [0495] GSGSGSGSGSGG
- [0496] SEQ ID NO:7--人源化重链氨基酸序列 (包括人IgG1 CH1和截短的铰链恒定区)
- [0497] EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSS  
TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT  
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
- [0498] SEQ ID NO:8--人源化轻链氨基酸序列 (包括人 $\kappa$ 轻链区)
- [0499] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPEKAPKLLIKYAS  
YLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHSREFPWTFGAGTKLELKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0500] SEQ ID NO:9--重链+ $\alpha$ -淀粉酶融合蛋白氨基酸序列 (包括前导序列和接头序列)
- [0501] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHW  
IRQAPGKGLEWVSYISSGSS TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRSEDTAV  
YYCARRGLLLDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY  
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKVEPKSCDKTHTGGSGGGSGGGSGGQYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWV  
DIALECERYLAPKGFGGVQVSPPNENVAIYNPFRPWWERYQPVSYKLCSTRSGNEDE  
FRNMVTRCANNVGVRIYVDAVINHMCNAVSAGTSSTCGSYFNPGRDFPAVPYSG  
WDFNDGKCKTGSGDIENYNDATQVRDCRLTGLLDLALEKDYVRSKIAEYMNHLID  
IGVAGFRLDASKHMWPGDIKAILDKLHNLNSNWFPAAGSKPFIYQEVIDLGGEPIKSS  
DYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSY LKNWGEWGFVPSDRALVFVDN  
HDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKMAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWPRQFQNG  
NDVNDWVGPPNNNGVIKEVTINPDTTTCGNDWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQP  
FTNWYDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWSFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKING  
NCTGIKIYVSDDGKAHFSISNSAEDPFIAHAESKL

- [0502] SEQ ID NO:10--轻链+前导氨基酸序列  
MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITISCRASKSVSTSSY  
SYMHWYQQKPEKAPKLLIKYASYLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATY
- [0503] YCQHSREFPWTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE  
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0504] SEQ ID NO:11--重链IgG1 CH1和截短的铰链恒定结构域
- [0505] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
- [0506] SEQ ID NO:12--Km3同种异型的人κ恒定结构域
- [0507] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0508] SEQ ID NO:13=GS3接头
- [0509] GGGSGGGSGGGGS
- [0510] SEQ ID NO:14=接头
- [0511] GSTSGSKSSEKKG
- [0512] SEQ ID NO:15=His标签
- [0513] HHHHHHH
- [0514] SEQ ID NO:16=c-Myc标签
- [0515] EQKLISEEDL
- [0516] SEQ ID NO:17=示例性3E10可变重链(具有D31N取代的VH;参见实施例)  
EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSNYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGS
- [0517] STIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARRGLLLDYWGQGT  
TLTVSS
- [0518] SEQ ID NO:18=3E10可变轻链(VL)
- [0519] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHYQQKPGQPPKLLIKYASY  
LESQVPSRFSGSGSGTDFHLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLELK
- [0520] SEQ ID NO:19-根据Kabat系统的3E10 VH的重链可变结构域CDR1(当该VH参考SEQ  
ID NO:9定义时)
- [0521] NYGMH
- [0522] SEQ ID NO:20-根据Kabat系统的3E10 VH的重链可变结构域CDR2(当该VH参考SEQ  
ID NO:9定义时)
- [0523] YISSGSSTIYYADTVKG
- [0524] SEQ ID NO:21-根据Kabat系统的3E10 VH的重链可变结构域CDR3(当该VH参考SEQ  
ID NO:9定义时)
- [0525] RGLLLDY
- [0526] SEQ ID NO:22-根据Kabat系统的3E10 VL的轻链可变结构域CDR1(当该VL参考SEQ  
ID NO:10定义时)
- [0527] RASKSVSTSSYSYMH
- [0528] SEQ ID NO:23-根据Kabat系统的3E10 VL的轻链可变结构域CDR2(当该VL参考SEQ  
ID NO:10定义时)

- [0529] YASYLES
- [0530] SEQ ID NO:24-根据Kabat系统的3E10 VL的轻链可变结构域CDR3 (当该VL参考SEQ ID NO:10定义时)
- [0531] QHSREFPWT
- [0532] SEQ ID NO:25
- [0533] AGIH
- [0534] SEQ ID NO:26
- [0535] SAGIH
- [0536] SEQ ID NO:27-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的重链可变 (VH) 结构域CDR1
- [0537] GFTFSNYG
- [0538] SEQ ID NO:28-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的重链可变 (VH) 结构域CDR2
- [0539] ISSGSSTI
- [0540] SEQ ID NO:29-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的重链可变 (VH) 结构域CDR3
- [0541] ARRGLLLDY
- [0542] SEQ ID NO:30-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的轻链可变 (VL) 结构域CDR1
- [0543] KSVSTSSYSY
- [0544] SEQ ID NO:31-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的轻链可变 (VL) 结构域CDR2
- [0545] YAS
- [0546] SEQ ID NO:32-根据如由IMGT系统定义的CDR的示例性3E10分子的轻链可变 (VL) 结构域CDR3
- [0547] QHSREFPWT
- [0548] SEQ ID NO:33-人源化3E10重链 (hVH1) 的氨基酸序列  
EVQLVQSGGGLIQPGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSS
- [0549] TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRG  
LLLDYWGQGTTTVTVSS
- [0550] SEQ ID NO:34-人源化3E10重链 (hVH2) 的氨基酸序列  
EVQLVESGGGLIQPGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSS
- [0551] TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARRG  
LLLDYWGQGTTTLTVSS
- [0552] SEQ ID NO:35-人源化3E10轻链 (hVL1) 的氨基酸序列  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSSYSYLA WYQQKPEKAPKLLIKYASY
- [0553] LQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGAGTKLELK
- [0554] SEQ ID NO:36-人胰腺 $\alpha$ 淀粉酶氨基酸序列 (Genbank登录号:NP\_000690.1)

- [0555] MKFFLLLFITIGFCWAQYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLAPKGFGGVQ  
VSPPNENVAIYNPFRPWERYQPVSYKLCITRSGNEDEFNMVTRCANNVGVRIYVD  
AVINHMCGNAVSAGTSSTCGSYFNPGSRDFPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENY  
NDATQVRDCRLTGLLDLALEKDYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRLDASKHMWPG  
DIKAILDKLHNLNSNWFPAGSKPFIYQEVIDLGGEPIKSSDYFGNGRVTEFKYGA  
KL GTVIRKWNGEKMSYLKNWGEWGFVPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTF  
WDARLYKMAVGFM LAHPYGFTRVMSSYRWPRQFQNGNDVNDWVGPPNNNGVI  
KEVTINPDITTCGNDWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR  
GNRGFIVFNDDWSFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGIKIYVSDDGKAHFS  
ISNSAEDPFIAIHAESKL
- [0556] SEQ ID NO:37-根据如由Kabat定义的CDR的本公开的某些抗体的重链可变结构域  
CDR2
- [0557] YISSGSSTIYYADSVKG
- [0558] SEQ ID NO:38-根据如由Kabat定义的CDR的本公开的某些抗体的轻链可变结构域  
CDR1
- [0559] RASKSVSTSSSYLA
- [0560] SEQ ID NO:39-根据如由Kabat定义的CDR的本公开的某些抗体的轻链可变结构域  
CDR2
- [0561] YASYLQS
- [0562] SEQ ID NO:40-参考人源化3E10轻链的氨基酸序列
- [0563] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYYASY  
LESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIK
- [0564] SEQ ID NO:41-参考人源化3E10重链的氨基酸序列
- [0565] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLVYSYISSGSS  
TIYYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVKRG LLLDYWGQGTL  
VTVSS
- [0566] SEQ ID NO:42-参考人源化Fv3E10
- [0567] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYYASY  
LESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSREFPWTFGQGTKVEIKGG  
GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSNYGMHWVRQAP  
GKGLVYSYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCV  
KRG LLLDYWGQGTLVTVSS
- [0568] SEQ ID NO:43--重链+α-淀粉酶融合蛋白氨基酸序列(不包括接头序列)



[0569]

EVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWVSYISSGSS  
TIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARRGLLLDYWGQGT  
L VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT  
GGSGGGSGGGSGGQYSPNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLAPKGFGGVQV  
SPPNENVAIYNPFRPWERYQPVSYKLCTRSGNEDEFNMVTRCANNVGVRIYVDA  
VINHMCNAVSAGTSSTCGSYFNPGSRDFPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENYN  
DATQVRDCRLTGLLDLALEKDYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRLDASKHWP  
GDI KAILDKLHNLNSNWFPAGSKPFIYQEVIDLGGEPIKSSDYFGNGRVTEFKYGA  
KLGT VIRKWNGEKMSYLNWGEWGFVPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWD  
ARLYKMAVGFM LAHPYGFTRVMSSYRWPRQFQNGNDVNDWVGPPNNNGVIKEV  
TINPDITTCGNDWVCEHRWRQIRNMVIFRNVVDGQPFTNWYDNGSNQVAFGRGNR  
GFIVFNDDWSFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGIKIYVSDDGKAHFSISNS  
AEDPFIAIHAESKL

[0570] 通过引用并入

[0571] 本文提及的所有出版物和专利由此通过引用整体并入,就如同将每个单独的出版物或专利具体地和单独地指示为通过引用并入。

[0572] 虽然已讨论了本公开的具体实施方案,但上述说明是说明性的而非限制性的。在回顾本说明书和以下权利要求书后,对本领域技术人员来说,本公开的很多变化将变得明显。应该参考权利要求以及其等效物的完整范围和说明书以及此类变化来确定本公开的完整范围。

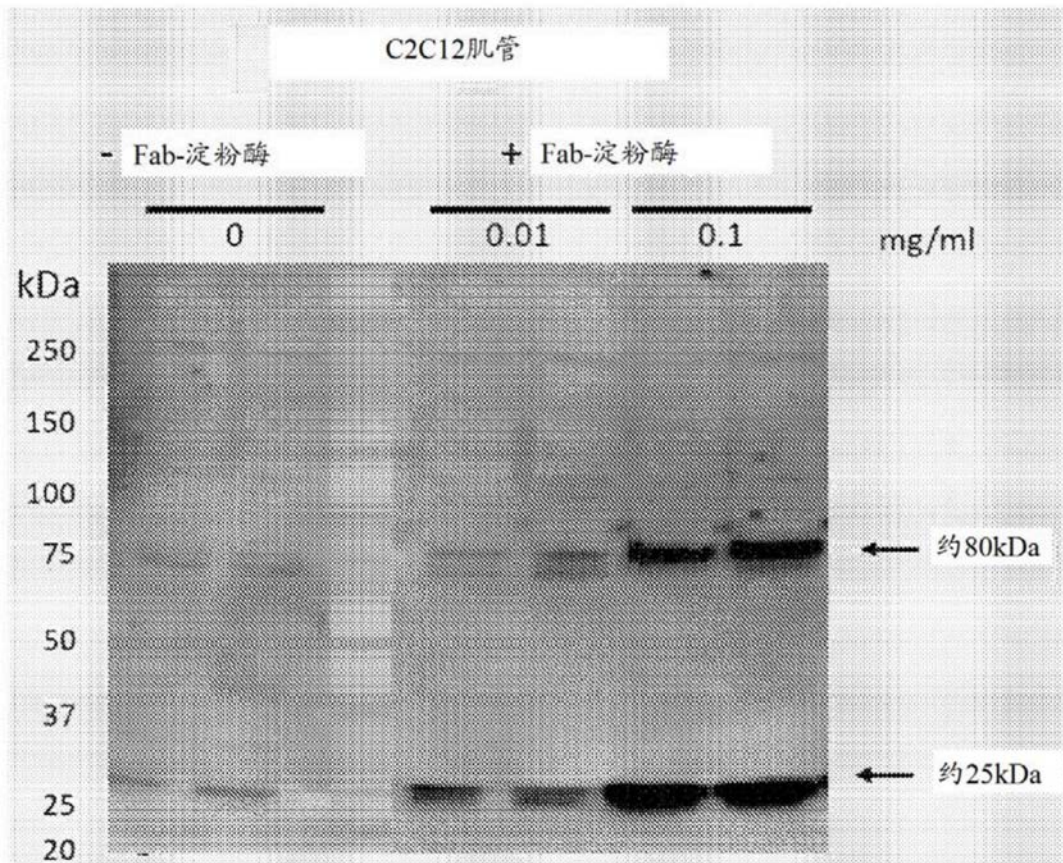


图1

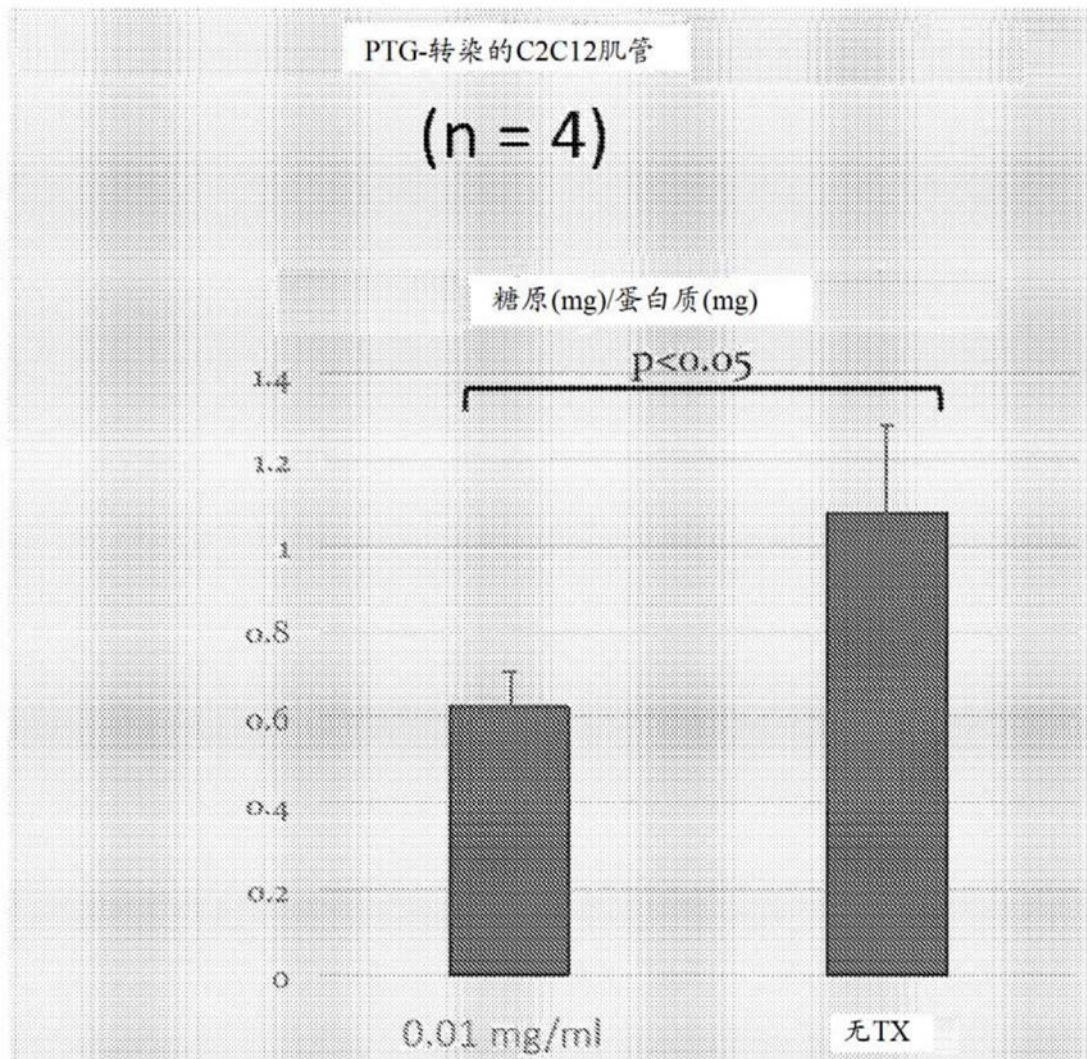


图2



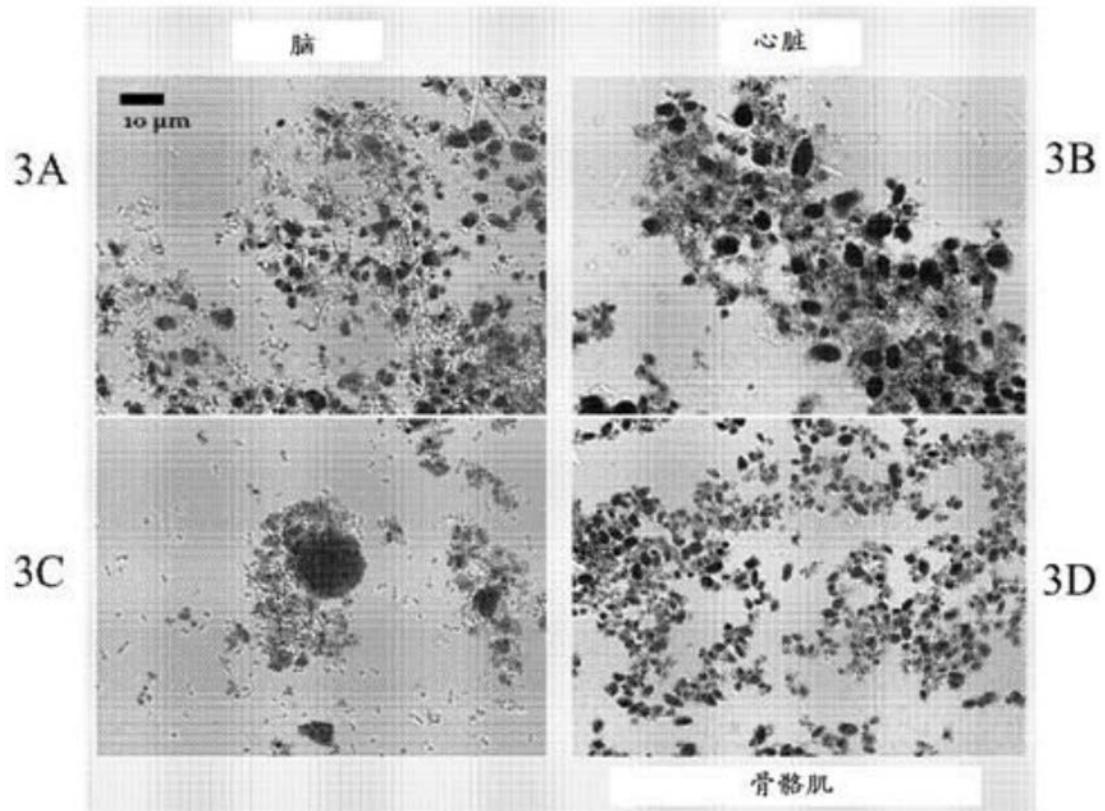
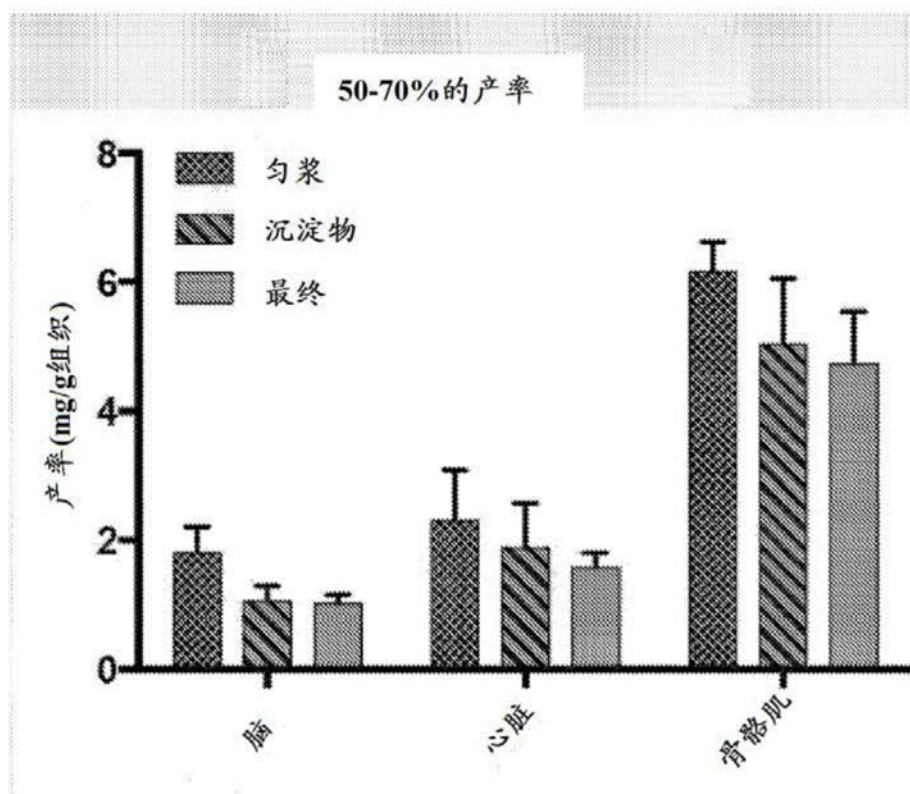


图3A-3D

3E



3F

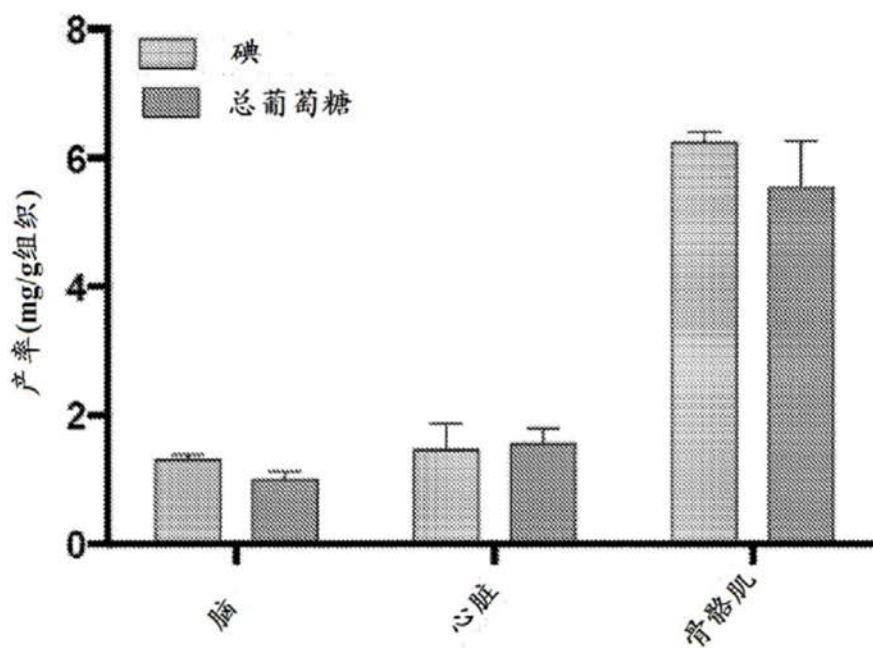


图3E-3F

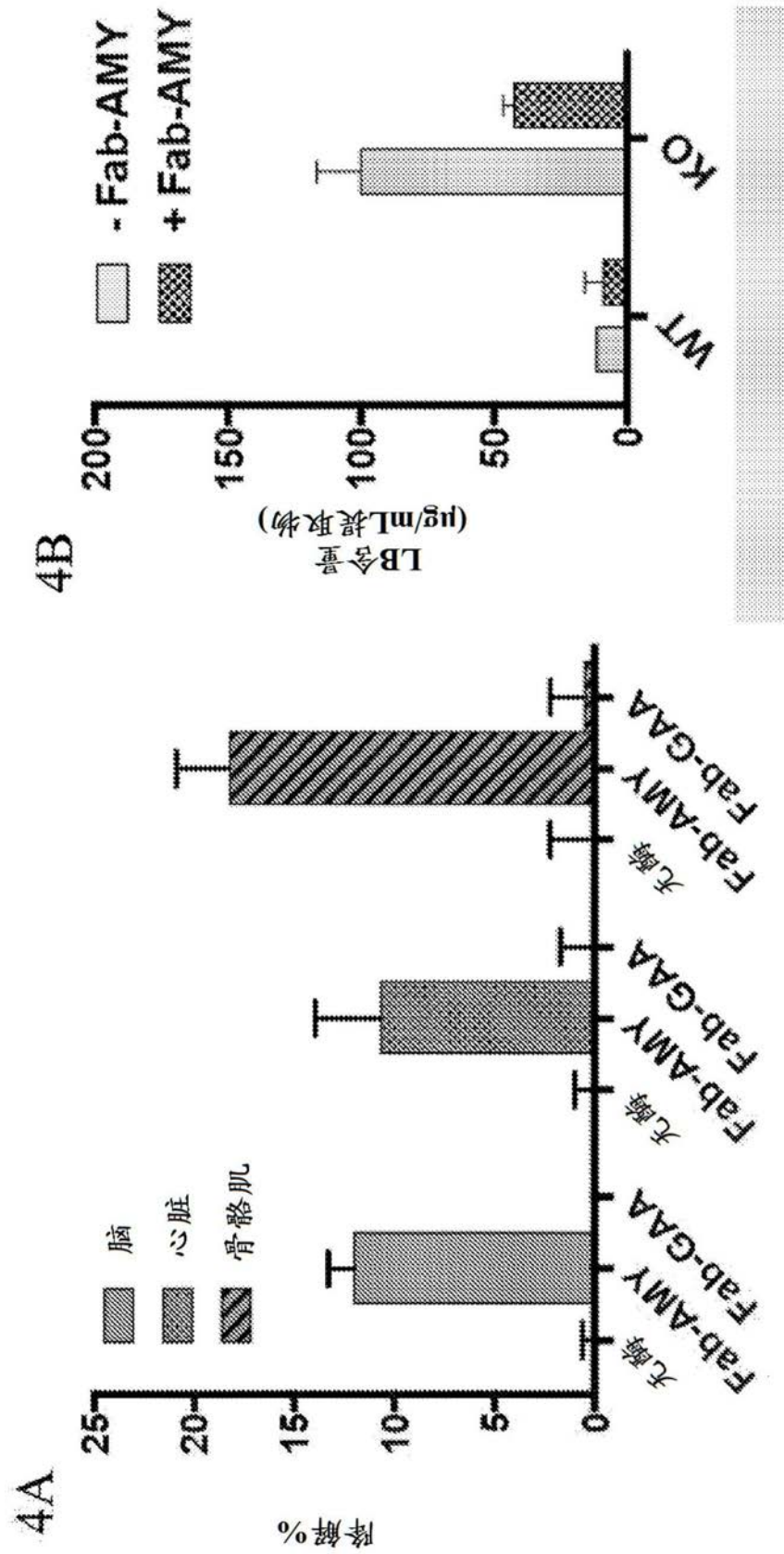


图4A-4B

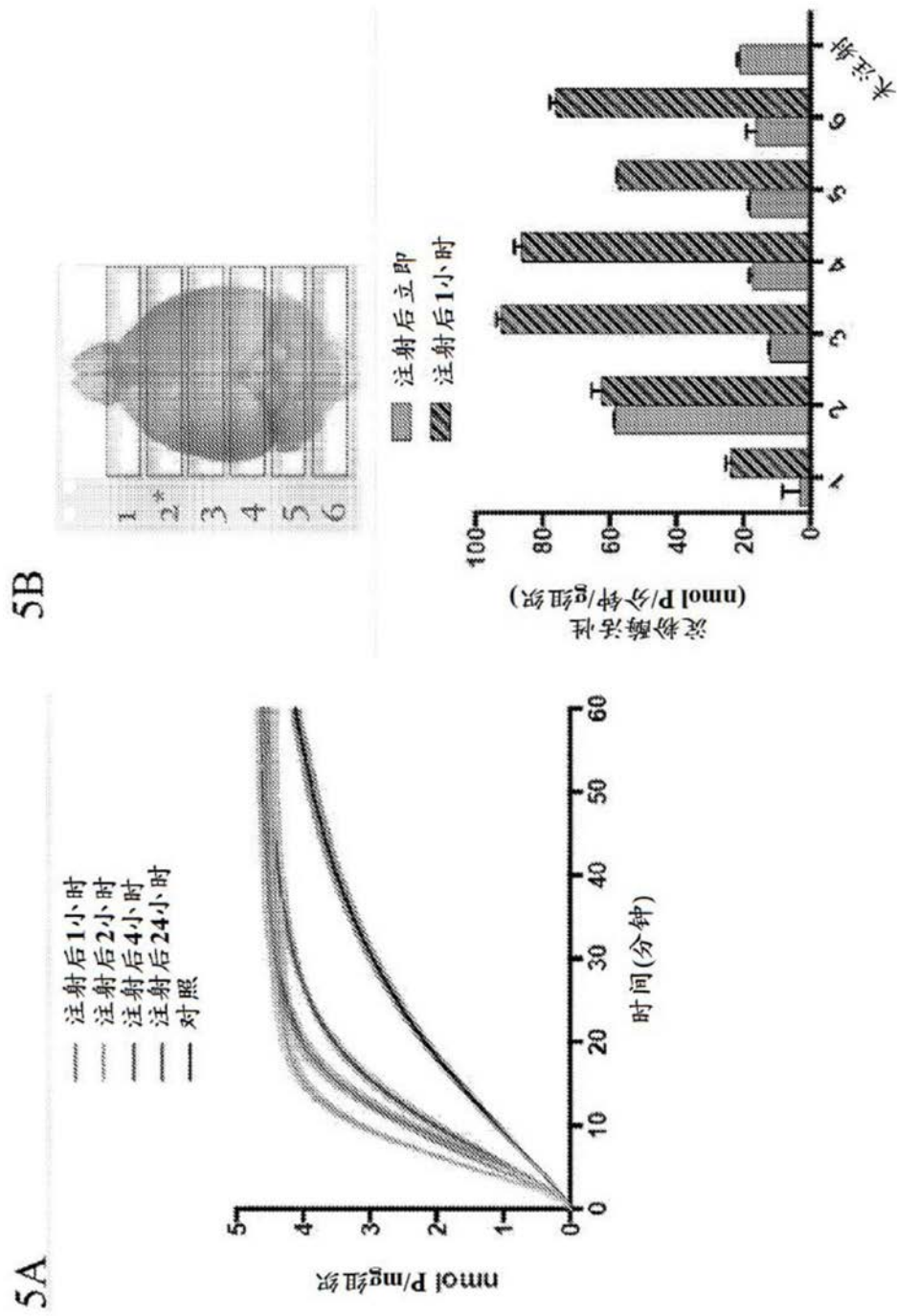


图5A-5B



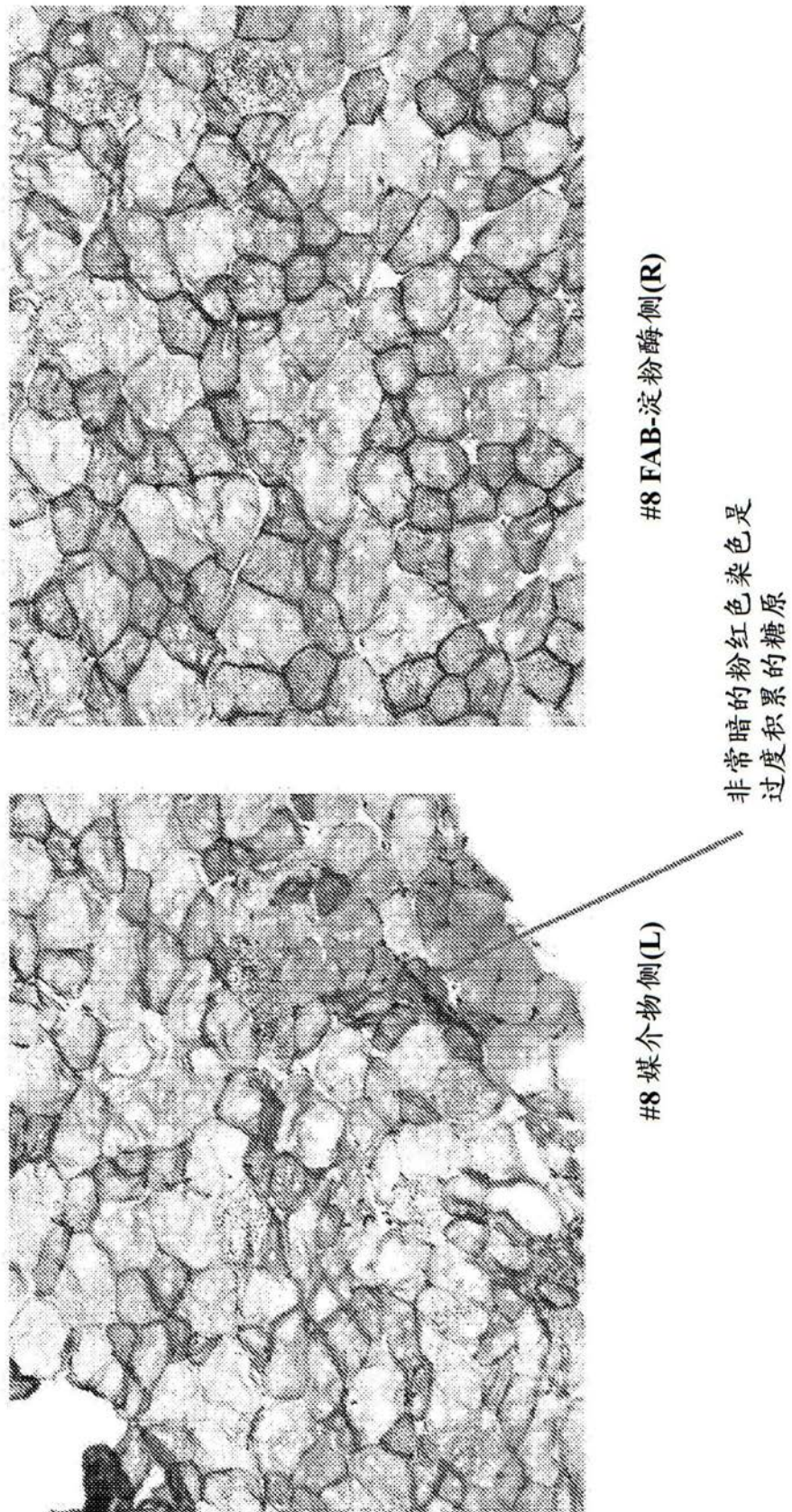


图6



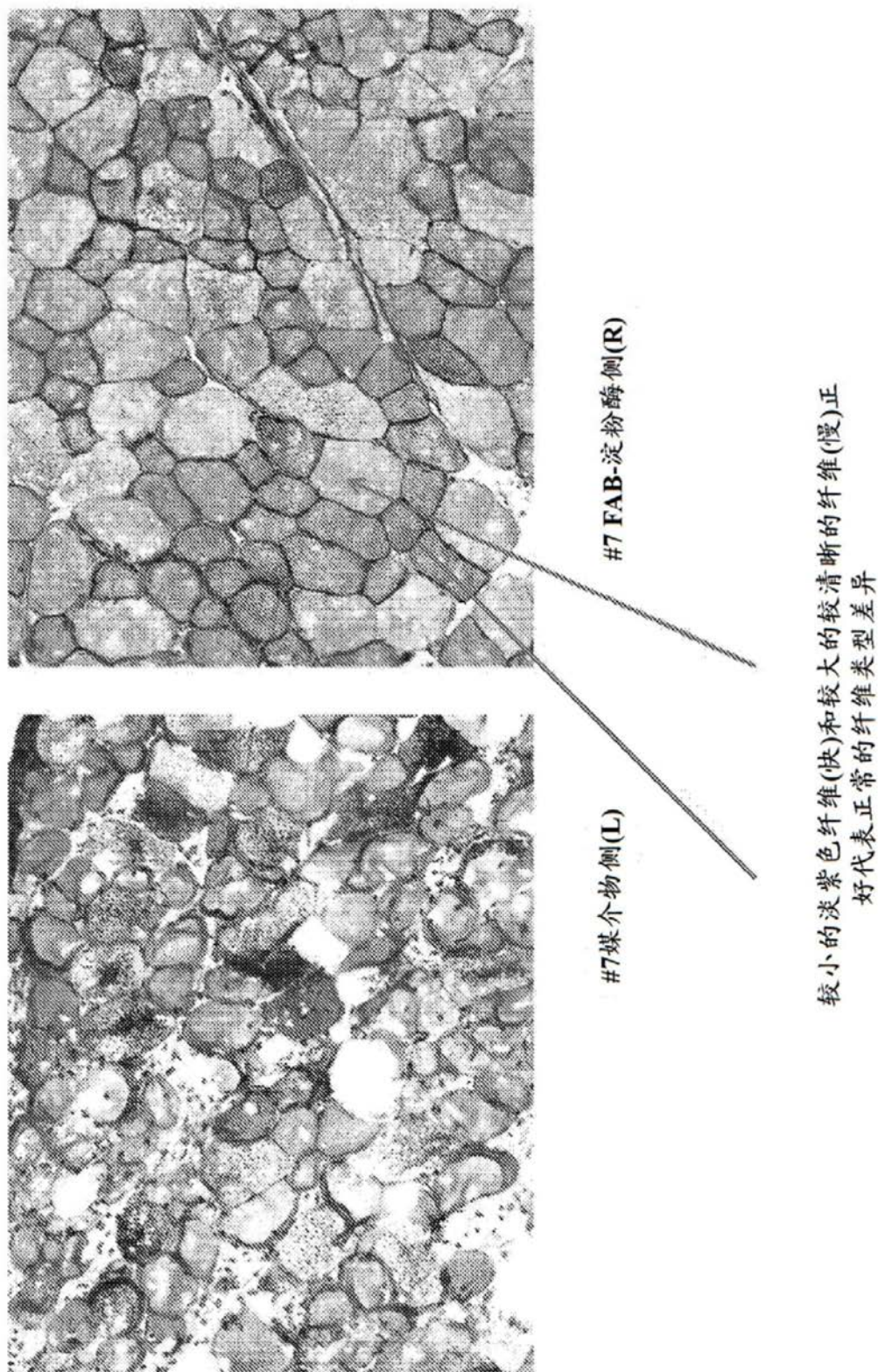
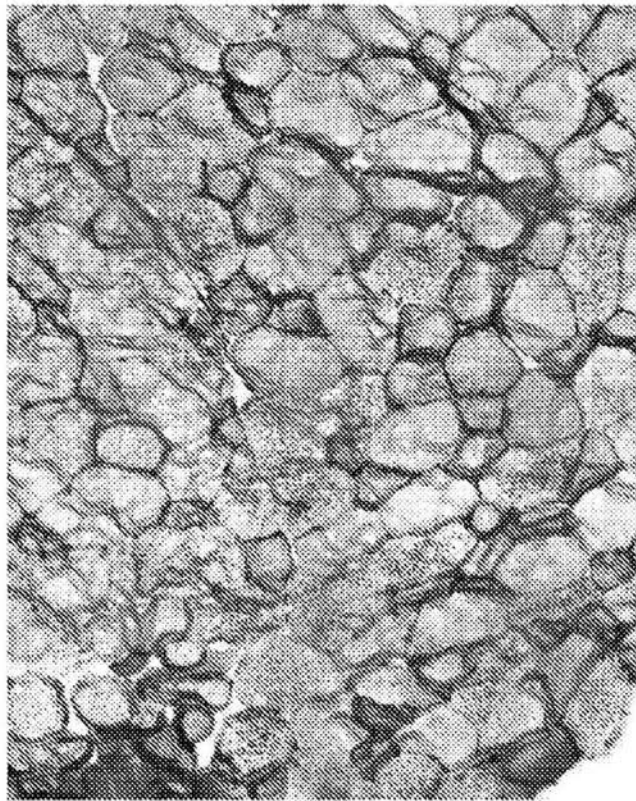
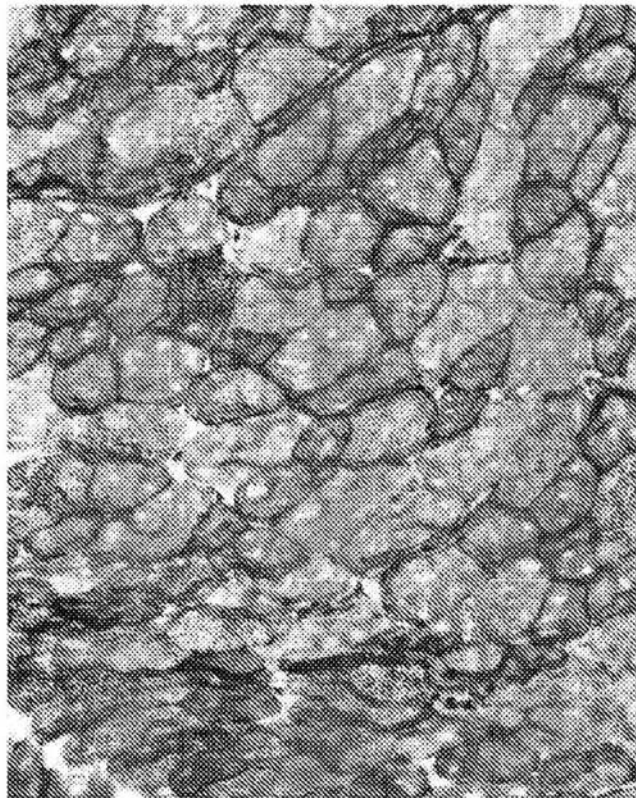


图7





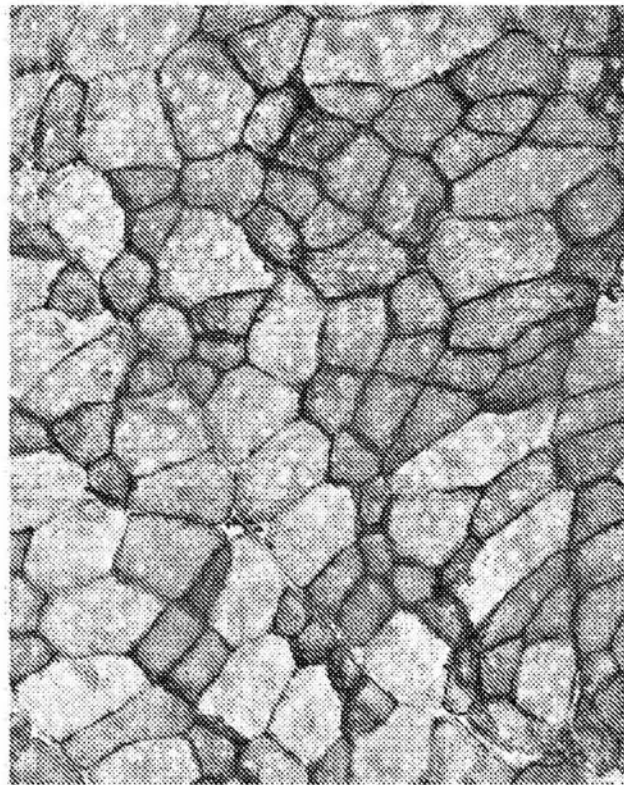
#10煤介物侧(R)



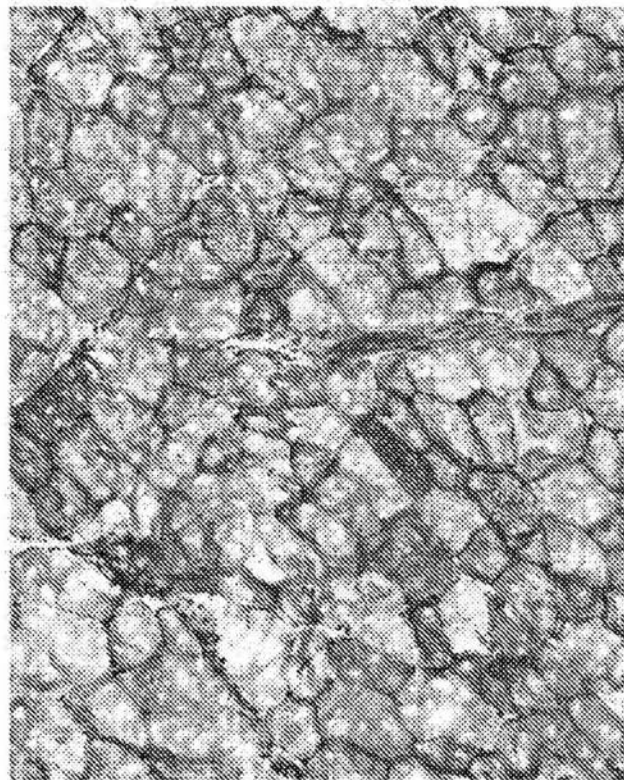
#10煤介物侧(L)

图8





#6 FAB-淀粉酶侧(R)



#6煤介物侧(L)

图9