I880364

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I880364 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：112136735 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 06 月 07 日

(51)Int. Cl.： ***C07K16/28*** ***(2006.01)*** ***C07K14/705*** ***(2006.01)***
C12N9/14 ***(2006.01)*** ***C12N9/24*** ***(2006.01)***
C12N9/34 ***(2006.01)*** ***A61K38/47*** ***(2006.01)***
A61K48/00 ***(2006.01)*** ***A61P3/00*** ***(2006.01)***
A61P43/00 ***(2006.01)***

(30)優先權：2017/06/07 美國 62/516,656
2017/10/19 美國 62/574,719
2018/05/17 美國 62/673,098

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：百克 安德魯 BAIK, ANDREW (US)；席格納 凱瑟琳 CYGNAR, KATHERINE (US)；舍恩赫爾 克里斯托弗 SCHOENHERR, CHRISTOPHER (US)；克瑞特索 克里斯托斯 KYRATSOUS, CHRISTOS (GR)；王成 WANG, CHENG (CN)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

US 2016/0108133A1 US 2017/0151346A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：12 共 195 頁

(54)名稱

用於使酶內化之組成物及方法

(57)摘要

本發明係揭露用於治療酶缺乏症之組成物及方法。揭露了含有內化效應子結合結構域與溶酶體替代酶活性之多結構域治療性蛋白質。該多結構域治療性蛋白質能夠進入細胞，分離到溶酶體內，並將該替代酶活性遞送至溶酶體。

Compositions and methods for treating enzyme-deficiency diseases are disclosed. Multidomain therapeutic proteins containing an internalization effector binding domain and a lysosomal replacement enzyme activity are disclosed. The multidomain therapeutic proteins are capable of entering cells, segregating to the lysosome, and delivering the replacement enzyme activity to the lysosome.

指定代表圖：

圖 1A

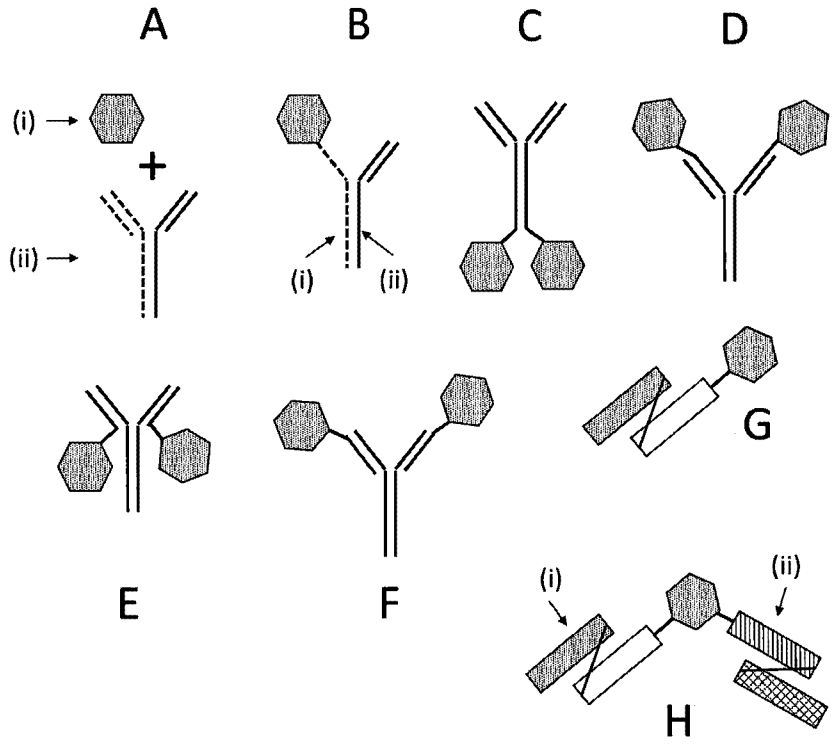


圖 1B

ITR	(可選擇的)肝特異性增強子	(可選擇的肝特異性)啟動子	訊息肽	抗 CD63 scFV	GAA	多腺苷酸	ITR

I880364

發明摘要

【發明名稱】（中文/英文）

用於使酶內化之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INTERNALIZING ENZYMES

【中文】

本發明係揭露用於治療酶缺乏症之組成物及方法。揭露了含有內化效應子結合結構域與溶酶體替代酶活性之多結構域治療性蛋白質。該多結構域治療性蛋白質能夠進入細胞，分離到溶酶體內，並將該替代酶活性遞送至溶酶體。

【英文】

Compositions and methods for treating enzyme-deficiency diseases are disclosed. Multidomain therapeutic proteins containing an internalization effector binding domain and a lysosomal replacement enzyme activity are disclosed. The multidomain therapeutic proteins are capable of entering cells, segregating to the lysosome, and delivering the replacement enzyme activity to the lysosome.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

用於使酶內化之組成物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR INTERNALIZING ENZYMES

相關申請案之交叉引用

【0001】 本申請案係依據 35 U.S.C. § 119(e)主張 2018 年 5 月 17 日申請之第 62/673,098 號、2017 年 10 月 19 日申請之第 62/574,719 號及 2017 年 6 月 7 日申請之第 62/516,656 號美國臨時申請案之權益，其每一者係以全文引用方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本申請案係大致關於治療溶酶體儲積症之組成物及方法。本申請案特別關於靶定之含有替代酶的蛋白複合體及其在治療溶酶體儲積症的用途。

【先前技術】

【0003】 溶酶體儲積症是一類會在溶酶體中影響無數基質的降解之罕見疾病。那些基質包含神經鞘脂質、黏多醣、醣蛋白、肝醣及寡醣，其可堆積在患者的細胞中導致細胞死亡。受溶酶體儲積症影響的器官包含中樞神經系統(CNS)、周圍神經系統(PNS)、肺臟、肝臟、骨骼、骨骼肌及心肌、以及網狀內皮系統。

【0004】 治療溶酶體儲積症的選項包含酶替代療法(ERT)、基質減量療法、藥理伴護蛋白(chaperone)介導的療法、造血幹細胞移植療法及基因療法。基質減量療法的實例包含使用 Miglustat 或 Eliglustat 來治療第 1 型高雪氏症。這些藥物係藉由阻斷合成酶的活性而作用，降低了隨後的基質產

生。造血幹細胞移植療法(HSCT)係（例如）用來改善及減緩某些形式的 MPS 患者的負面中樞神經系統表現型。參見 R.M. Boustany, "Lysosomal storage diseases--the horizon expands," 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98, Oct. 2013。表 1 列舉出一些溶酶體儲積症及其相關的酶或其他蛋白質。

表 1：溶酶體儲積症

類別	疾病	涉及的酶/蛋白質
神經鞘脂質過多症	法布瑞氏症	α-半乳糖苷酶 A
	法伯脂肉芽腫症	神經醯胺酶
	第 I 型高雪氏症	β-醣苷酶
	第 II 及 III 型高雪氏症	Saposin-C 活化體
	A 及 B 型尼曼匹克症	神經鞘磷脂酶
	GM1-神經節苷脂儲積症	β–半乳糖苷酶
	GM2-神經節苷脂儲積症(山德霍夫症)	β–己醣胺酶 A 及 B
	GM2-神經節苷脂儲積症(泰-歇克斯症)	β-己醣胺酶 A
	GM2-神經節苷脂儲積症(GM2-活化體缺乏症)	GM2-活化蛋白
	GM3-神經節苷脂儲積症	GM3 合成酶
	異染性白質退化症	芳基硫酸脂酶 A
	神經鞘脂質活化體缺乏症	神經鞘脂質活化體
黏多醣儲積症	MPS I (賀勒氏症、賀勒-施艾氏症及施艾氏症)	α-艾杜糖醛酸酶
	MPS II (韓特氏症)	艾杜糖醛酸酶-2-硫酸酯酶
	MPS IIIA (聖菲利柏氏症 A 型)	乙醯肝素 *N*-硫酸酯酶
	MPS IIIB (聖菲利柏氏症 B 型)	*N*-乙醯基-α-葡萄胺糖苷酶
	MPS IIIC (聖菲利柏氏症 C 型)	乙醯輔酶 A; α-葡萄糖胺 *N*-乙醯基移轉酶
	MPS IIID (聖菲利柏氏症 D 型)	*N*-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶
	MPS IVA (莫奎歐氏症 A 型)	*N*-乙醯半乳胺糖-6-硫酸鹽硫酸
	MPS IVB (莫奎歐氏症 A 型)	β–半乳糖苷酶
	MPS VI (馬洛托-拉米氏症)	*N*-乙醯半乳胺糖-4-硫酸酯酶 (芳基硫酸酯酶 B)
	MPS VII (史萊氏症)	β–葡萄糖醛酸苷酶
	MPS IX	玻糖醛酸酶
肝醣儲積症	龐貝氏症(肝醣儲積症第 II 型)	α-醣苷酶 2
脂質代謝	溶酶體酸性脂肪酶缺乏症(LAL-D; 伍爾曼氏症)	溶酶體酸性脂肪酶

【0005】 兩種最常見的 LSD 為龐貝氏症及法布瑞氏症。龐貝氏症的發病率估計為一萬分之一，是由有缺陷的溶酶體酶 α-醣苷酶(GAA)所引起的，

其導致溶酶體肝醣的處理缺陷。溶酶體肝醣的堆積主要發生在骨骼、心臟及肝臟組織。嬰兒發病的龐貝氏症通常在 2 歲之前引起心臟肥大、低張症、肝腫大及因為心肺功能衰竭導致的死亡。成人發病的龐貝氏症遲至於第二個至第六個十年發作，且通常僅涉及骨骼肌。目前可用的治療方法包含 Genzyme 公司的 MYOZYME®/LUMIZYME® (alglucosidase alfa)，其為一種在 CHO 細胞中產生的重組人類 α-醣苷酶並通過靜脈輸注施用。

【0006】 法布瑞氏症包括輕度晚發病例，總體估計發病率為三千分之一，是由有缺陷的溶酶體酶 α-半乳糖苷酶 A (GLA)引起的，其導致球形三醯神經醯胺堆積在血管及其他組織與器官內。與法布瑞氏症相關的症狀包含神經損傷及/或小血管阻塞引起的疼痛、腎功能不全及最終衰竭、諸如高血壓及心肌病變之心併發病、諸如兒童肢端假淋巴瘤性血管角化瘤形成之皮膚病症狀、無汗症或多汗症、以及諸如輪狀角膜、輪輻樣白內障、結膜及視網膜血管異常之眼部問題。目前可用的治療方法包含：Genzyme 公司的 FABRAZYME® (agalsidase β)，其為一種在 CHO 細胞中產生的重組人類 α-半乳糖苷酶 A 並通過靜脈內輸注施用；Shire 公司的 REPLAGAL™ (agalsidase alfa)，其為一種在人類纖維母細胞中產生的重組人類 α-半乳糖苷酶 A 並通過靜脈內輸注施用；以及 Amicus 公司的 GALAFOLD™ (migalastat 或 1-deoxygalactonojirimycin)，其為一種口服給藥的小分子伴護蛋白，將異常 α-半乳糖苷酶 A 的折疊轉變為功能性構形。

【0007】 目前對於溶酶體儲積症的治療不是最佳的。例如，ERT 一般必須以高頻率及高劑量施用，諸如兩週一次及高達 40 mg/kg。此外，某些替代酶可以是免疫交叉反應性的(CRIM)，刺激該個體中的 IgG 產生，因而阻礙酶經由甘露糖-6-磷酸(M6P)受體遞送至溶酶體。IgG 可能會屏蔽該替代

酶的 M6P 殘基，且抗原-IgG-抗體複合體可能經由 Fc 受體而被吸收到細胞溶酶體內，從而優先將替代酶轉移到巨噬細胞。

【0008】 遞送替代酶到適當的受影響組織的效率也很低（參見表 2，及 Desnick & Schuchman, "Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges," 13 Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 307-35, 2012）。例如，對於嬰兒期龐貝氏症進行長期酶替代療法的患者仍然會罹患鼻音過重、殘留的肌肉無力、眼瞼下垂、骨質缺乏、聽力喪失、有誤吸的危險、吞嚥障礙、心律不整及吞嚥困難。替代酶的劑量時常必須隨時間增加至每週或每兩週 40 mg/kg。

表 2：ERT 無效率的靶向組織

疾病	亞型	容易到達的組織	難以到達的組織
高雪氏症	第 1 型	脾臟、肝臟、骨髓	骨骼
	第 2 及 3 型	脾臟、肝臟、骨髓	骨骼、大腦
法布瑞氏症	典型及遲發型	血管內皮	腎臟、心臟
黏多醣儲積症	全部	脾臟、肝臟、骨髓	骨骼、大腦、軟骨
α-甘露醣儲積症	---	脾臟、肝臟、骨髓	骨骼、大腦
尼曼匹克症	B 型	脾臟、肝臟、骨髓	肺泡巨噬細胞
龐貝氏症	嬰兒期	---	心臟、平滑肌及骨骼肌
	晚發型	---	平滑肌及呼吸骨骼肌

【0009】 內源性甘露糖-6-磷酸受體(MPR)係介導大多數重組酶向溶酶體的運送。有兩種互補形式的 MPR 存在：非陽離子依存型(CI-MPR)及陽離子依存型(CD-MPR)。剔除任一種形式都會有錯分的溶酶體酶。溶酶體水解酶係於內質網中合成並移動到順式側-高基氏體網絡，在那裡它們藉由添加甘露糖-6-磷酸(M6P)基團進行共價修飾。此標記物的形成係取決於兩種溶酶體酶的連續作用：UDP-*N*-乙醯葡萄糖胺-l-磷酸轉移酶(G1cNac-磷酸轉移酶)及 *N*-乙醯葡萄糖胺-l-磷酸二酯-α-*N*-乙醯基-葡萄胺糖苷酶(剝離酶)。GlcNac-磷酸轉移酶係催化 G1cNAc-1- 磷酸鹽殘基從 UDP-G1cNAc 轉移到

於水解酶的高度甘露糖型寡醣中所選定之甘露糖的 C6 位置。接著，該剝離酶將 G1cNAc 端移除而暴露出 M6P 識別信號。在反式側的高基氏體網絡處，該 M6P 信號使得溶酶體水解酶可通過選擇性結合至 M6P 受體而與所有其他類型的蛋白質分離。包覆有格形蛋白-的囊泡從反式側的高基氏體網絡出芽產生並與晚期胞內體融合。在晚期胞內體的低 pH 下，水解酶從 M6P 受體解離，空的受體再送回到高基氏體進行其它輪的運送。

【0010】 除了經由甘露糖受體遞送之 β-葡萄糖腦苷脂酶之外，重組的溶酶體酶包括 M6P 醣基化並主要經由 CI-MPR/IGF2R 遞送至溶酶體。然而，醣基化/CI-MPR 介導的酶替代遞送並不會到達到所有的臨床相關組織（表 2）。酶替代療法的改善係藉由下列方式集中在改善 CI-MPR 遞送：(i)使用 β2-促效劑克倫特羅(clenbuterol)增加 CI-MPR 的表面表現(Koeberl 等人, "Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle," 103(2) Mol. Genet. Metab. 107-12, 2011)，(ii)增加酶上的 M6P 殘基數量(Zhu 等人, "Conjugation of mannose-6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in Pompe mice," 279(48) J. Biol. Chem. 50336-41, 2004)，或(iii)將 IGF-II 結構域融合至酶上(Maga 等人, "Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice," 288(3) J. Biol. Chem. 1428-38, 2013)。

【0011】 很多溶酶體儲積症無法適當地藉由酶替代療法或基因療法進行治療的主要原因是替代酶對相關組織或器官的靶向性差、接受宿主的免疫反應無效、及血清半衰期低。需要有可增強與促進更好的組織生體分布及酶的溶酶體攝入之改良酶替代療法。申請人已開發出一種改良酶替代療法，

其可不依賴 CI-MPR 而使用抗體引導的遞送方式將酶遞送至靶定受影響組織的溶酶體中。

【發明內容】

【0012】 申請人已發現到，當與一個做為多結構域治療性蛋白質的一部分之遞送結構域相關聯時，替代酶可有效遞送到標靶細胞中。該多結構域治療性蛋白質可以離體或在活體內的方式經由一包含該多結構域治療性蛋白質之編碼序列的基因治療載體而遞送到細胞，該基因治療載體例如為病毒載體、裸多核苷酸、多核苷酸複合體等。

【0013】 在一態樣中，本發明提供一種含有一編碼多結構域治療性蛋白質之核酸序列的多核苷酸。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質含有一酶結構域及一遞送結構域。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質亦含有一病毒載體核酸序列。於一具體實施例中，該多結構域治療性蛋白質亦含有一腺相關病毒(AAV)核酸序列。

【0014】 於一實施例中，該酶結構域具有水解酶活性，諸如醣基化酶(glycosylase)，諸如醣苷酶(glycosidase)，諸如 α-醣苷酶(GAA)或 α-半乳糖苷酶 A (GLA)。於一些實施例中，該酶結構域包含如 SEQ ID NO:1 所示之胺基酸序列或其生物活性部分。於一些實施例中，該酶結構域包含如 SEQ ID NO:78 所示之胺基酸序列。於一些實施例中，該酶結構域主要由如 SEQ ID NO:78 所示之胺基酸序列所組成。於一些實施例中，該酶結構域係由如 SEQ ID NO:78 所示之胺基酸序列所組成。於一實施例中，該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於一實施例中，該內化效應子為 ITGA7 分子。於一具體

實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 或 ITGA7 之 scFv（例如，圖 1A，區塊 G）。

【0015】 於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質含有兩個遞送結構域（例如，圖 1A，區塊 H）。於一實施例中，第一遞送結構域結合一內化效應子以促進將酶遞送至合適的標靶細胞或標靶次細胞腔室；而第二遞送結構域結合一胞吞轉送效應子以促進將該多結構域治療性蛋白質跨過生理障壁運送，該生理障壁諸如為肺泡膜、肝內皮細胞、血腦障壁等。於一具體實施例中，該第二遞送結構域為抗運鐵蛋白受體(TfR) scFv 結構域。於一具體實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含 GAA 酶結構域、抗 CD63 scFv 第一遞送結構域、及抗 TfR scFv 第二遞送結構域。於另一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包括 GAA 酶結構域、抗 ITGA7 scFv 第一遞送結構域、及抗 CD63 scFv 第二遞送結構域。

【0016】 於一態樣中，本發明提供一種諸如 AAV 載體、裸多核苷酸、多核苷酸複合體等之基因治療載體，其包含一編碼含有酶結構域及遞送結構域之多結構域治療性蛋白質的核酸序列。

【0017】 於一實施例中，該酶結構域具有水解酶活性，諸如醣基化酶(glycosylase)，諸如醣苷酶(glycosidase)，諸如 α-醣苷酶或 α-半乳糖苷酶 A。於一實施例中，該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於一實施例中，該內化效應子為 ITGA7 分子。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 或 ITGA7 之 scFv。

【0018】 於一態樣中，本發明提供一種含有一酶結構域及一遞送結構域之多結構域治療性蛋白質。於一實施例中，該酶結構域具有水解酶活性，

諸如醣基化酶(glycosylase)，諸如醣苷酶(glycosidase)，諸如 α-醣苷酶或 α-半乳糖苷酶 A。於一實施例中，該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於另一實施例中，該內化效應子為 ITGA7 分子。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 或 ITGA7 之 scFv。

【0019】 於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質係用以治療有需要酶替代療法的患者。

【0020】 於一態樣中，本發明提供一種在細胞中產生一含有酶結構域及遞送結構域之多結構域治療性蛋白質的方法。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質係藉由使細胞接觸一包括有編碼該多結構域治療性蛋白質之核酸序列的基因治療載體而產生。於一實施例中，該核酸序列隨後整合入該細胞的基因體基因座內，在該核酸序列是 DNA 的情況下該核酸序列係由細胞轉錄及轉譯，或者在該核酸是 RNA 的情況下該核酸序列係由細胞轉譯，並且產生該多結構域治療性蛋白質。於一實施例中，該基因治療載體為一般用於細胞轉染的一種，諸如腺相關病毒(AAV)載體。於一實施例中，該基因治療載體為裸多核苷酸。於一實施例中，該基因治療載體為多核苷酸複合體，例如脂質奈米粒子。於一實施例中，該基因體基因座為一安全港基因座，其能夠高度表現該多結構域治療性蛋白質，同時不干擾必需基因的表現或促進致癌基因或其他有害基因的表現。於一實施例中，該基因體基因座為腺相關病毒位置。

【0021】 於一實施例中，該細胞為哺乳動物細胞。於一實施例中，該細胞是離體的，諸如 HEK293 細胞株。於另一實施例中，該細胞是在活體內

的，且該含有多結構域治療性蛋白質編碼核酸序列之基因治療載體係施與人類或非人類個體。

【0022】 於一實施例中，該酶結構域具有水解酶活性，諸如醣基化酶(glycosylase)，諸如醣苷酶(glycosidase)，諸如 α-醣苷酶(GAA)或 α-半乳糖苷酶 A (GLA)。於一實施例中，該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 之 scFv（例如，SEQ ID NO:2）。於一些實施例中，該多結構域治療性多肽包括結合 CD63 之 scFv（例如，包括有如 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列之 scFv），其可操作地連接至 GAA（如 SEQ ID NO:1 所示）或其生物活性部分（如 SEQ ID NO:78 所示）。於一些實施例中，該多結構域治療性多肽包括如 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:79 所示之序列。

【0023】 於一具體實施例中，係將一含有編碼 scFv 水解酶融合蛋白之多核苷酸的 AAV 載體施與人類或非人類個體。該多核苷酸隨後整合至一基因體基因組，而產生編碼的融合蛋白。於一具體實施例中，該融合蛋白為抗 CD63scFv-GAA 融合蛋白（例如，如在 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO:79 所示）或抗 ITGA7scFv-GAA 融合蛋白，該人類或非人類個體缺乏內源性 GAA 活性，且 GAA 活性在該個體中係有效恢復。

【0024】 於一態樣中，本發明提供一種治療患有酶缺乏症之患者（人類或非人類）的方法，其係將一含有編碼一多結構域治療性蛋白質之核酸序列的基因治療載體施與該患者，該多結構域治療性蛋白質包含一遞送結構域及一酶結構域。於一實施例中，該酶結構域包含醣苷酶，諸如 GAA（例如，SEQ ID NO:1）或其生物活性部分（例如，SEQ ID NO:78）或

GLA（例如，UniProtKB No. P06280, aa32-429, SEQ ID NO:13），且該患者患有龐貝氏症或法布瑞氏症。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質之遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白，諸如 CD63 或 ITGA7。於一實施例中，該遞送結構域為結合 CD63 之 scFv 分子。於一實施例中，該遞送結構域為結合 ITGA7 之 scFv 分子。於另一實施例中，該基因治療載體包括一含有編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的 AAV 載體（例如，SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:79）。於另一實施例中，該基因治療載體為一包含編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的 AAV 載體。於另一實施例中，該基因治療載體係包含一包含編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的裸多核苷酸（例如，SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:79）。於另一實施例中，該基因治療載體係包含一包含編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的裸多核苷酸。於另一實施例中，該基因治療載體係包含一包含編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的多核苷酸（例如，SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:79）。於另一實施例中，該基因治療載體係包含一包含編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之核酸序列的多核苷酸複合體。

【0025】 於一態樣中，本發明係有關一種根據本發明供藥用之組成物。於一實施例中，該組成物（例如，醫藥組成物）可包含一包括有編碼多結構域治療性蛋白質之核酸序列的基因治療載體，該多結構域治療性蛋白質包含一遞送結構域及一酶結構域。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質之遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白，諸如 CD63 或 ITGA7。於一實施例中，該遞送結構域為結合 CD63 之 scFv 分子。於一實施例中，該遞送結構域為結合 ITGA7 之 scFv 分子。於另一實施例中，該

基因治療載體為一含有編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。於另一實施例中，該基因治療載體為一含有編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。於一些實施例中，該多核苷酸（例如，基因治療載體）包含一組織特異性調控因子。於一些實施例中，該組織特異性調控因子包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或此二序列陳述之序列。於一些實施例中，該多核苷酸（例如，基因治療載體）包括 SEQ ID NO:11 之核酸序列。

【0026】 於一態樣中，所描述的是一種包含一基因治療載體的組成物，該基因治療載體含有編碼一包括有遞送結構域及酶結構域之多結構域治療性蛋白質的基因，供使用於治療患有酶缺乏症之患者（人類或非人類），及/或供使用於降低人類或非人類個體的組織中之肝醣堆積。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質之遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白，諸如 CD63 或 ITGA7。於一實施例中，該遞送結構域為結合 CD63 之 scFv 分子。於一實施例中，該遞送結構域為結合 ITGA7 之 scFv 分子。於另一實施例中，該基因治療載體為一含有編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。於另一實施例中，該基因治療載體為一含有編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。造成酶缺乏症的臨床適應症可為（但不限於）例如龐貝氏症或法布瑞氏症。於一些實施例中，該多核苷酸（例如，基因治療載體）包含一組織特異性調控因子。於一些實施例中，該組織特異性調控因子包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或此二序列所示之序列。於一些實施例中，該多核苷酸（例如，基因治療載體）包含 SEQ ID NO:11 之核酸序列。

【0027】 於一態樣中，所描述的是一種根據本發明之醫藥組成物用於製造治療應用的藥物之用途，所述治療應用諸如（例如）為治療患有酶缺乏

症之患者（人類或非人類）及/或降低人類或非人類個體的組織中之肝醣堆積。該組成物包含（例如）含有編碼多結構域治療性蛋白質之基因的基因治療載體，該多結構域治療性蛋白質包含一遞送結構域及一酶結構域。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質之遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白，諸如 CD63 或 ITGA7。於一實施例中，該遞送結構域為結合 CD63 之 scFv 分子。於一實施例中，該遞送結構域為結合 ITGA7 之 scFv 分子。於另一實施例中，該基因治療載體為一含有編碼抗 CD63-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。於另一實施例中，該基因治療載體為一含有編碼抗 ITGA7-GAA 融合多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的 AAV 載體。造成酶缺乏症的臨床適應症可為（但不限於）例如龐貝氏症或法布瑞氏症。

【0028】 於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含 GAA 酶結構域，且於施與該基因治療載體後在患者血清中維持高血清濃度的 GAA 至少 12 週。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含 GAA 酶結構域，且於施與該基因治療載體後在患者心臟、骨骼肌及肝臟組織中的肝醣濃度係維持在野生型濃度 3 個月。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含 GAA 酶結構域，且於治療後患者的肌肉力量係恢復至野生型程度。

【0029】 於一態樣中，本發明提供一種藉由施與一含有編碼多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的基因治療載體，在人類或非人類個體的組織中降低肝醣堆積之方法。於一實施例中，該組織為肝臟、心臟或骨骼肌。於一實施例中，該人類或非人類個體患有龐貝氏症。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含抗 CD63 scFv-GAA 融合蛋白。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含抗 ITGA7 scFv-GAA 融合蛋白。

【0030】 於一態樣中，本文中所描述的是一種針對一種酶在缺乏該酶的患者（人類或非人類）中降低交叉反應免疫物質之方法，該方法包括將一含有只編碼替代酶或編碼多結構域治療性蛋白質之基因的基因治療載體施與該患者，該多結構域治療性蛋白質包含一遞送結構域及一酶結構域。於一些實施例中，該基因治療載體為 AAV 載體，其可為嵌合 AAV 載體（例如，AAV2/8）。於一些實施例中，該酶結構域包含醣苷酶，諸如 GAA（例如，SEQ ID NO:1）或 GLA（例如，UniProtKB No. P06280, aa32-429, SEQ ID NO:13），該患者患有龐貝氏症或法布瑞氏症，且該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一些實施例中，該基因治療載體係以足夠量施用以增加 GAA 的血清濃度，致使交叉反應免疫物質降低或者沒有可檢測量的交叉反應免疫物質產生。於一些實施例中，該基因治療載體係以足夠量施用以在一段時間內增加 GAA 的血清濃度。於一些實施例中，以一包含該基因治療載體之病毒（例如，AAV）來感染患者，可選擇地其中該病毒為假型的以特異性地靶向一選自由 GALT、肝臟、造血幹細胞、紅血球或其組合所組成之群的組織或細胞，且/或其中該基因治療載體包含一細胞或組織特異性增強子及/或啟動子，例如肝特異性增強子（例如，serpina 1）及/或肝特異性啟動子（例如，TTR）。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 之 scFv（例如，SEQ ID NO:2）。於一些實施例中，該方法包括將如本文所述之基因治療載體結合至少一免疫抑制劑施與該患者，其中該基因治療載體及該免疫抑制劑係同時及/或依序施用。於一些實施例中，該患者係維持有恆定量的免疫抑制劑。

【0031】 於一態樣中，本文中所描述的是一種在患有酶缺乏症之患者（人類或非人類）中誘導對於酶的耐受性之方法（例如，使患者耐受該酶），該方法包括降低患者中的交叉反應免疫物質，例如將一含有只編碼替代酶或編碼多結構域治療性蛋白質之基因的基因治療載體施與該患者。在一些實施例中，所揭露的是一種在患有酶缺乏症之患者中誘導對於酶的耐受性之方法，該方法包括在一段時間內將一含有只編碼替代酶、或編碼包括有遞送結構域及酶結構域之多結構域治療性蛋白質的基因的基因治療載體施與該患者，使得在該患者中未增加可檢測的交叉反應免疫物質產生。於一些實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含一遞送結構域及一酶結構域。於一些實施例中，該基因治療載體為 AAV 載體，其可為嵌合 AAV 載體（例如，AAV2/8）及/或經工程改造的 AAV 載體（例如，有助於靶向之經修改向性的重組病毒載體，例如優先由或單獨由細胞或組織表現的受體或標記物，例如肝細胞或肝臟、黏膜細胞、紅血球細胞、造血幹細胞等），且可選擇地其中該基因是在受到對該細胞或組織具特異性之增強子及/或啟動子的控制下而表現，例如肝特異性啟動子等。於一些實施例中，該酶結構域包括醣苷酶，諸如 GAA（例如，SEQ ID NO:1）或 GLA（例如，UniProtKB No. P06280, aa32-429, SEQ ID NO:13），該患者患有龐貝氏症或法布瑞氏症，且該遞送結構域為一結合內化效應子之抗原結合蛋白。於一實施例中，該內化效應子為一被內吞並被運輸到溶酶體之細胞表面分子。於一具體實施例中，該內化效應子為 CD63 分子。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體、抗體片段或單鏈可變片段(scFv)，諸如結合 CD63 之 scFv（例如，SEQ ID NO:2）。於一些實施例中，其為一種治療患有酶缺乏症的患者之方法，包括將該酶的重組形式及/或同工異構酶施與該患者（例如龐貝氏症患者中的 GAA，例如 scFv63::GAA、最佳化的 GAA 或其

組合），其中該患者係對該酶具有耐受性，例如其中該患者已對根據本文中所揭露方法的酶具有耐受性。因此，在一些實施例中，其為一種將酶施與一缺乏該酶之患者的方法，包括使該患者耐受該酶，例如，藉由施與一編碼該酶或包括有該酶之多結構域治療性蛋白質的基因治療載體，較佳地以足夠量來施用以增加該酶的血清濃度而使得交叉反應免疫物質處於一個與未缺乏該酶的患者中所發現的量相當之程度，可選擇地其中該基因治療載體係特異性地靶向肝臟且/或包括一肝臟特異性增強子及/或啟動子。於一些實施例中，該方法進一步包括，於施用該基因治療載體之後進一步施用該酶及/或其重組變異體，其包括一包含該酶之多結構域治療性蛋白質。

【0032】 於另一態樣中，本發明係提供結合至人類 CD63 之抗體及其抗原結合片段。根據本發明此一態樣之抗體尤其有用於特異性地導引該酶（例如 GAA 或 GLA）的內化及/或溶酶體運輸。依此，本發明此態樣亦提供雙特異性抗體、其結合人類 CD63 之抗原結合片段、及抗體-蛋白質融合構築體（參見，例如圖 1A）。

【0033】 本發明之例示性抗 CD63 抗體係列於表 11 中。表 11 陳述重鏈可變區(HCVRs)及輕鏈可變區(LCVRs)的胺基酸及核酸序列識別碼，以及例示性抗 CD63 抗體之重鏈互補決定區(HCDR1, HCDR2 and HCDR3)及輕鏈互補決定區(LCDR1, LCDR2 and LCDR3)。

【0034】 本發明係提供包含 HCVR 之抗體或其抗原結合片段，該 HCVR 包含選自表 11 中所列 HCVR 胺基酸序列中之任一者之胺基酸序列，或是與所述胺基酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0035】 本發明亦提供包含 LCVR 之抗體或其抗原結合片段，該 LCVR 包含選自表 11 中所列 LCVR 胺基酸序列中之任一者之胺基酸序列，或是

與所述胺基酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0036】 本發明亦提供包含 HCVR 與 LCVR 胺基酸序列對(HCVR/LCVR)之抗體或其抗原結合片段，該 HCVR/LCVR 胺基酸序列對包含與表 11 中所列 LCVR 胺基酸序列中之任一者配對之表 11 中所列 HCVR 胺基酸序列中的任一者。根據某些實施例，本發明提供包含 HCVR/LCVR 胺基酸序列對之抗體或其抗原結合片段，所述 HCVR/LCVR 胺基酸序列對係包含在表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者內。在某些實施例中，所述 HCVR/LCVR 胺基酸序列對係選自由 SEQ ID NOs: 14/22、SEQ ID NOs: 30/38、SEQ ID NOs: 46/54 及 SEQ ID NOs: 62/70 組成之群組。

【0037】 本發明亦提供包括有重鏈 CDR1 (HCDR1)之抗體或其抗原結合片段，該 HCDR1 包括有一選自表 11 中所列 HCDR1 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0038】 本發明亦提供包含重鏈 CDR2 (HCDR2)之抗體或其抗原結合片段，該 HCDR2 包含一選自表 11 中所列 HCDR2 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0039】 本發明亦提供包含重鏈 CDR3 (HCDR3)之抗體或其抗原結合片段，該 HCDR3 包含一選自表 11 中所列 HCDR3 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0040】 本發明亦提供包含輕鏈 CDR1 (LCDR1)之抗體或其抗原結合片段，該 LCDR1 包含一選自表 11 中所列 LCDR1 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0041】 本發明亦提供包含輕鏈 CDR2 (LCDR2)之抗體或其抗原結合片段，該 LCDR2 包含一選自表 11 中所列 LCDR2 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0042】 本發明亦提供包含輕鏈 CDR3 (LCDR3)之抗體或其抗原結合片段，該 LCDR3 包含一選自表 11 中所列 LCDR3 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，或是一具有其至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0043】 本發明亦提供包含 HCDR3 與 LCDR3 胺基酸序列對(HCDR3/LCDR3)之抗體或其抗原結合片段，該 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對包含與表 11 中所列 LCDR3 胺基酸序列中之任一者配對之表 11 中所列 HCDR3 胺基酸序列中的任一者。根據某些實施例，本發明提供包含 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對之抗體或其抗原結合片段，所述 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對係包含在表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者內。於某些實施例中，所述 HCDR3/LCDR3 胺基酸序列對係選自由 SEQ ID NOs: 20/28、SEQ ID NOs: 36/44、SEQ ID NOs: 52/60 及 SEQ ID NOs: 68/76 所組成之群組。

【0044】 本發明亦提供包括有一組六個 CDR（即 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3）之抗體或其抗原結合片段，所述 CDR 係包含在表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者內。於某些實施例中，

所述 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 胺基酸序列組係選自由 SEQ ID NOs:16-18-20-24-26-28、SEQ ID NOs: 32-34-36-40-42-44、SEQ ID NOs:48-50-52-56-58-60 及 SEQ ID NOs: 64-66-68-72-74-76 所組成之群組。

【0045】 於一相關的實施例中，本發明提供包含一組六個 CDR（即 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3）之抗體或其抗原結合片段，所述 CDR 係包含在表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者所界定的 HCVR/LCVR 胺基酸序列對之內。例如，本發明包含包括有 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 胺基酸序列之抗體或其抗原結合片段，所述胺基酸序列係包含在一選自由 SEQ ID NOs:14/22、SEQ ID NOs: 30/38、SEQ ID NOs: 46/54 及 SEQ ID NOs: 62/70 所組成之群組的 HCVR/LCVR 胺基酸序列對之內。識別 HCVR 與 LCVR 胺基酸序列內的 CDR 之方法及技術是本領域中所熟知的，且可用以識別本文中所揭露之特定 HCVR 及/或 LCVR 胺基酸序列內的 CDR。可用以識別 CDR 邊界的例示性傳統做法包含(例如)Kabat 定義、Chothia 定義及 AbM 定義。概括的講，Kabat 定義是依據序列的變異性，Chothia 定義是依據結構環狀區域的位置，而 AbM 定義是 Kabat 法與 Chothia 法之間的妥協方案。*參見(例如)Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 國家衛生研究院, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani 等人, J. Mol. Biol. 273*:927-948 (1997); 及 Martin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86*:9268-9272 (1989)。亦可使用公用資料庫來識別一抗體內的 CDR 序列。

【0046】 本發明亦提供編碼抗 CD63 抗體或其部分之核酸分子。例如，本發明提供編碼表 11 中所列 HCVR 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 HCVR 核酸序列

中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0047】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 LCVR 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 LCVR 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0048】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 HCDR1 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 HCDR1 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0049】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 HCDR2 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 HCDR2 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0050】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 HCDR3 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 HCDR3 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0051】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 LCDR1 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列

LCDR1 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0052】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 LCDR2 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 LCDR2 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0053】 本發明亦提供編碼表 11 中所列 LCDR3 胺基酸序列中之任一者的核酸分子；於某些實施例中，該核酸分子包含一選自由表 11 中所列 LCDR3 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列，或是與所述多核苷酸序列有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。

【0054】 本發明亦提供編碼 HCVR 的核酸分子，其中該 HCVR 包含一組三個 CDR（即 HCDR1-HCDR2-HCDR3），其中該 HCDR1-HCDR2-HCDR3 胺基酸序列組係藉由表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者所界定。

【0055】 本發明亦提供編碼 LCVR 的核酸分子，其中該 LCVR 包含一組三個 CDR（即 LCDR1-LCDR2-LCDR3），其中該 LCDR1-LCDR2-LCDR3 胺基酸序列組係藉由表 11 中所列例示性抗 CD63 抗體中之任一者所界定。

【0056】 本發明亦提供皆編碼 HCVR 及 LCVR 的核酸分子，其中該 HCVR 包含表 11 中所列 HCVR 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列，且其中該 LCVR 包含表 11 中所列 LCVR 胺基酸序列中之任一者的胺基酸序列。於某些實施例中，該胺基酸序列包含一選自表 11 中所列 HCVR 核酸

序列中之任一者的多核苷酸序列或是與其有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列，以及一選自表 11 中所列 LCVR 核酸序列中之任一者的多核苷酸序列或是與其有至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%序列一致性之實質上相似的序列。於根據本發明此態樣的某些實施例中，該核酸分子係編碼 HCVR 及 LCVR，其中該 HCVR 及 LCVR 係皆衍生自表 11 中所列的相同抗 CD63 抗體。

【0057】 本發明亦提供能夠表現一包含抗 CD63 抗體之重鏈或輕鏈可變區之多肽的重組表現載體。例如，本發明包括包含上述核酸分子中之任一者的重組表現載體，即編碼表 11 中所陳述 HCVR、LCVR 及/或 CDR 序列中之任一者的核酸分子。這類已引入宿主細胞內之宿主細胞，以及在能夠產生抗體或抗體片段的條件下能夠藉由培養宿主細胞來產生該抗體或其部分之方法，及藉此產生之抗體及抗體片段的回復，係亦包含在本發明範疇內。

【0058】 於一些態樣中，本發明包括抗體或其抗原結合片段，諸如抗 CD63 抗體，其具有經修飾的醣化模式。於一些實施例中，移除非所欲醣化位置的修飾是有利的，或在寡糖鏈上缺少海藻糖部分的存在之抗體是有利的，以增加抗體依存性細胞毒性(ADCC)作用（參見 Shields 等人(2002) JBC 277:26733），其中係期望有細胞毒性。在其它應用中，可製造出半乳糖基化以修飾補體依存性細胞毒性(CDC)。

【0059】 於另一態樣中，本發明提供一種包含特異性地結合 CD63 之重組人類抗體或其片段之醫藥組成物，以及一醫藥學上可接受的載劑。於一相關的態樣中，本發明描寫一種結合了抗 CD63 抗體與第二治療劑之組成物的特徵。於一實施例中，該第二治療劑為有利於與抗 CD63 抗體結合之任何試劑。涉及本發明之抗 CD63 抗體的其他組合療法與共製劑係揭露在

本文中的其他地方。

【圖式簡單說明】

【0060】 **圖 1A** 係以圖示方式表示多結構域治療性蛋白質。區塊 A 係描繪一包括有雙特異性抗體(ii)及替代酶(i)之多結構域治療性蛋白質。區塊 B 係描繪一酶-Fc 融合多肽(i)與一內化效應子-特異性半體(ii)聯結而形成該多結構域治療性蛋白質。區塊 C 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至一抗內化效應子抗體的重鏈 C 端。區塊 D 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至一抗內化效應子抗體的重鏈 N 端。區塊 E 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至一抗內化效應子抗體的輕鏈 C 端。區塊 F 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至一抗內化效應子抗體的輕鏈 N 端。區塊 G 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至一單鏈可變片段(scFv)的 C 端，該 scFv 含有 VH 區（陰影狀長條體）及 VL 區（空白長條體）。區塊 H 係描繪一替代酶（六邊體）共價連接至兩個 scFv 結構域，第一個 scFv (i)係做為第一遞送結構域，第二 scFv (ii)係做為第二遞送結構域。

【0061】 **圖 1B** 為 AAV 基因治療載體之非限制性例示性示意圖，其係編碼區塊中所表示的多結構域治療性蛋白質，其中 scFv 為一抗人類 CD63 scFv 且該替代酶為 GAA（例如，抗 hCD63scFv::hGAA；參見(例如)SEQ ID NO:10 陳述之胺基酸序列）。SEQ ID NO:10 的第 1-119 個胺基酸係提供 H5C6 抗體之重鏈可變結構域(V_H)之胺基酸序列；SEQ ID NO:10 的第 120-134 個胺基酸係提供 H5C6 抗體之重鏈與輕鏈可變結構域之間的胺基酸連接子；SEQ ID NO:10 的第 135-245 個胺基酸係提供 H5C6 抗體之輕鏈可變結構域(V_L)之胺基酸序列；SEQ ID NO:10 的第 136-250 個胺基酸係提供抗 hCD63scFv 與 GAA 之間的胺基酸連接子序列；而 SEQ ID NO:10 的第 251-1133 個胺基酸係提供 GAA 之胺基酸序列。例示性 5'ITR 及 3' ITR 序列係

分別如 SEQ ID NO:6 及 SEQ ID NO:7 陳述。例示性的肝特異性增強子(serpina 1)係如 SEQ ID NO:9 陳述。例示性的肝特異性啟動子(TTR) 係如 SEQ ID NO:8 陳述。另外之可用於構築一包括有抗 CD63 抗體或其抗原結合部分之多結構域治療性蛋白質的例示性抗 CD63 V_H 及 V_L 胺基酸序列（及編碼其之核苷酸序列）係於表 11 中提供。

【0062】 圖 2 為描繪以組織的肝醣儲存量（以微克/毫克為單位）做為經遞送的酶的函數之長條圖。X 軸由左至右係描繪 $CD63^{hu/hu}$; $GAA^{-/-}$ 小鼠之心臟、四頭肌、腓腸肌、橫膈膜、比目魚肌及伸趾長肌(EDL)肌肉。黑色方框(“1”)係描繪在未經處理的小鼠龐貝氏症模型中之肝醣儲存量。橘色方框(“2”)係描繪在未經處理的野生型小鼠中之肝醣儲存量。檸檬綠方框(“3”)係描繪在經以劑量 10^{10} vg 之 AAV-hGAA（含有編碼人類 GAA 之基因的腺相關病毒載體）處理的小鼠龐貝氏症模型中之肝醣儲存量。森林綠方框(“4”)係描繪在經以劑量 10^{11} vg 之 AAV-hGAA 處理的小鼠龐貝氏症模型中之肝醣儲存量。淺藍色方框(“5”)係描繪在經以劑量 10^{10} vg 之 AAV-anti-hCD63scFv::hGAA（含有編碼連結人類 GAA 之抗人類 CD63 scFv 結構域之基因的腺相關病毒載體）處理的小鼠龐貝氏症模型中之肝醣儲存量。深藍色方框(“6”)係描繪在經以劑量 10^{11} vg 之 AAV-anti-hCD63scFv::hGAA 處理的小鼠龐貝氏症模型中之肝醣儲存量。

【0063】 圖 3 為描繪在注射 AAV 3 個月後各小鼠組織的骨骼肌組織中所測得平均肝醣量(μg/mg)之長條圖。每隻經特定劑量之特定酶構築體處理的小鼠中，各測量結果係做為 GAA 暴露量（即血清濃度）的函數標繪出。實心方塊係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-hGAA。實心錐形係表示 10^{11} vg 劑量之 AAV-hGAA。實心倒錐形係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-抗-

hCD63scFv::hGAA。實心菱形係表示 10^{11} vg 劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。

【0064】 **圖 4** 為描繪每隻經特定劑量之特定酶構築體處理的小鼠中，以在注射 AAV 3 個月後於心臟組織中所測得平均心肌肝醣量(μg/mg)做為 GAA 暴露量（即血清濃度）的函數之點陣圖。實心方塊係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-hGAA。實心錐形係表示 10^{11} vg劑量之 AAV-hGAA。實心倒錐形係表示 10^{10} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。實心菱形係表示 10^{11} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。

【0065】 **圖 5** 為描繪每隻經特定劑量之特定酶構築體處理的小鼠中，以在注射 AAV 3 個月後之抗-GAA 抗體效價做為 GAA 暴露量（即血清濃度）的函數之點陣圖。空心方塊係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-hGAA。空心圓形係表示 10^{11} vg劑量之 AAV-hGAA。空心菱形係表示 10^{10} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。六角形係表示 10^{11} vg 劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。

【0066】 **圖 6** 為描繪以在注射 AAV 3 個月後之抗-GAA 抗體效價做為酶構築體與劑量的函數之點陣圖。圓形係表示接受空的 AAV 載體之對照小鼠。方塊係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-hGAA。錐形係表示 10^{11} vg 劑量之 AAV-hGAA。倒錐形係表示 10^{10} vg 劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。菱形係表示 10^{11} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。

【0067】 **圖 7A** 為在注射基因治療載體數週後以 GAA 的血清濃度（任意單位“a.u.”; y-軸）做為時間的函數之線形圖。方塊係表示 10^{10} vg劑量之 AAV-hGAA。錐形係表示 10^{11} vg 劑量之 AAV-hGAA。倒錐形係表示 10^{10} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。菱形係表示 10^{11} vg劑量之 AAV-抗-hCD63scFv::hGAA。

【0068】 **圖 7B** 為描繪在 CD63 HumIn GAA KO 小鼠(GAA-/-,CD63hu/hu mice)或 GAA+/+,CD63hu/hu 小鼠中施與 AAV 構築體之後的 mRNA 比例（相對於 mGADPH mRNA 之 hGAA mRNA）長條圖，如下：(1)未經處理的對照組、(2) AAV-肝特異性啟動子-hGAA (1e10 vg)、(3) AAV-肝特異性啟動子-hGAA (1e11 vg)、(4) AAV-肝特異性啟動子-抗-hCD63::hGAA (1e10 vg)、(5) AAV-肝特異性啟動子-抗-hCD63::hGAA (1e11 vg)或(6)未經處理的對照組(GAA+/+,CD63hu/hu)。對所有注射 AAV 構築體者偵測肝的 GAA 表現。

【0069】 **圖 7C** 為在接受所述編碼融合蛋白(方塊)的 AAV 之小鼠及接受所述編碼 GAA 的 AAV 之小鼠（此二構築體皆提供一肝特異性啟動子(LSP)以驅動表現）中，比較血清 GAA 濃度與 GAA 的 RNA 表現程度的點陣圖。

【0070】 **圖 7D** 為顯示以肝特異性啟動子驅動之構築體來短暫轉染 Huh-7 人類肝細胞之長條圖，所述構築體係編碼 hGAA、抗-hCD63 scFv::GAA (融合構築體)或非結合性融合構築體 scFv::GAA 對照組。與單獨以 hGAA 轉染 3 天之後相比，兩種 scFv::GAA 融合構築體在分泌的上清液中皆有較高的蛋白質比例。在實驗期間添加 M6P 到上清液內來緩和 CI-MPR 介導的攝入時，並未影響到所述比例。(* = $p < 0.05$, n=3)。

【0071】 **圖 8** 為顯示在小鼠肌肉纖維中經 lamp1 染色的溶酶體並用 DAPI 進行對比染色以顯示細胞核之螢光顯微照片。區塊 A 及 A1 係描繪取自未經處理的野生型($GAA^{+/+}$)小鼠並用 lamp1 染色之四頭肌細胞（區塊 A），及細胞核（區塊 A1）。區塊 B 及 B1 係描繪取自未經處理的 GAA 缺失($GAA^{-/-}$)小鼠並用 lamp1 染色之四頭肌細胞（區塊 B），及細胞核（區塊 B1）。區塊 C 及 C1 係描繪取自一經以 AAV-hGAA 構築體處理的 $GAA^{-/-}$小鼠並用 lamp1 染色之四頭肌細胞（區塊 C），及細胞核（區塊 C1）。

區塊 D 及 D1 係描繪取自一經以 AAV-hCD63scFv::hGAA 構築體處理的 $GAA^{-/-}$小鼠並用 lamp1 染色之四頭肌細胞（區塊 D），及細胞核（區塊 D1）。

【0072】 **圖 9（圖 9A 及 9B）**係描繪經以 AAV-LSP hGAA 或 AAV-LSP 抗 hCD63::hGAA 處理的小鼠之抓緊強度及 Rotarod 測試表現的線形圖。野生型 GAA 小鼠(倒三角形)、未經處理的對照組(方塊)、AAV-LSP-hGAA 處理(1e11 vg/小鼠) (三角形)或 AAV-LSP-抗-hCD63::hGAA 處理(1e11 vg/小鼠)(圓形)的小鼠之加速轉棒儀(Rotarod)的測量（**圖 9A**）及前肢抓緊強度的測量（**圖 9B**）係以每月一次的間隔進行 6 個月。誤差槓為+/- SD。所有群組的 N=8-10。

【0073】 **圖 10A 及圖 10B** 係描繪使用其他膜蛋白做導引物（諸如抗 ITGA7 (整聯蛋白 α-7) scFv 融合蛋白）來導引 GAA。**圖 10A** 係顯示於存在有 5mM M6P 或沒有的情況下，C2C12 小鼠肌原細胞與抗小鼠 CD63-GAA 或抗小鼠 ITGA7-GAA 過夜培養之 GAA 活性（y 軸）。**圖 10B** 係顯示藉由流體動力傳遞方式(HDD)，針對 CD63 (GAA-/-;CD63hu/hu)給予編碼 scFv::GAA 形式的抗 hCD63::GAA (2)、或全長 IgG4::GAA 形式的抗小鼠整聯蛋白 α-7 (3)之質體的人源化 GAA KO 小鼠，接著在 HDD 後測量組織的肝醣濃度 3 週。未經處理的對照小鼠 GAA-/-；CD63hu/hu (1)及未經處理的野生型 GAA 對照小鼠 GAA+/+；CD63hu/hu (4)小鼠亦在相同的組織中測試肝醣濃度。

【0074】 **圖 11** 為描繪注射 AAV 一個月後以 GAA 血清濃度（任意單位 “a.u.”; y-軸）做為酶構築體與劑量的函數之點陣圖。方塊表示 AAV-LSP-Δ8GAA。錐形表示 AAV-抗-hCD63scFv::GAA。兩個構築體皆提供肝特異性啟動子(LSP)以驅動表現。劑量係以小鼠每公斤(kg)之病毒基因體(vg)量

來供應。

【0075】 **圖 12** 係提供描繪以組織（心臟、四頭肌、橫膈膜或三頭肌）的肝醣濃度（以微克/毫克為單位）做為 GAA 血清濃度的函數之點陣圖。方塊表示 AAV-LSP-Δ8GAA。錐形表示 AAV-抗-hCD63scFv::GAA。兩個構築體皆提供肝特異性啟動子(LSP)以驅動表現。

【實施方式】

定義

【0076】 本發明並不限於所描述之特定實施例、組成物、方法及實驗條件，因這類實施例、組成物、方法及實驗條件可能會改變。本文中所使用的術語僅用於描述特定實施例的目的，且非意欲限制本發明，因本發明的範疇將僅受所附申請專利範圍的限制。

【0077】 儘管與本文中所述相似或等效之任何方法及材料係可用於本發明的實施或試驗中，現將描述一些較佳方法與材料。本文中所引用的全部公開文獻係以全文引用方式併入本文中描述。除非另外定義，本發明中所使用的全部技術術語及科學術語係具有如本發明所屬領域中具有通常知識者一般理解的相同意義。

【0078】 「酶缺乏症」包含非溶酶體儲積症，諸如克拉貝氏症（半乳糖基神經醯胺酶）、苯酮尿症、半乳糖血症、楓糖尿症、粒線體異常、福萊德瑞克氏運動失調症(Friedreich ataxia)、齊威格氏症、腎上腺腦白質失養症、威爾森氏症、血色素沉著症、鳥胺酸胺甲醯基轉移酶缺乏症、甲基丙二酸血症、丙酸血症，以及溶酶體儲積症。「溶酶體儲積症」包含由溶酶體功能缺陷所引起的任何異常。目前，約已鑑別出 50 種溶酶體儲積症，其最為熟知的包含泰-歇克斯症、高雪氏症及尼曼匹克症。這些疾病的發病機制歸因於溶酶體中不完全降解產物的累積，通常是由於蛋白質功能的喪

失。溶酶體儲積症由蛋白質的功能喪失或衰減變異體引起，所述蛋白質的正常功能是降解或溶酶體內含物協同降解。與溶酶體儲積症有關的蛋白質包含酶、受體及其它穿膜蛋白（例如 NPC1）、轉譯後修飾蛋白（例如硫酸脂酶）、膜運輸蛋白、非酶輔因子及其他可溶蛋白質（例如 GM2 神經節苷脂活化子）。因此，溶酶體儲積症不只是涵蓋由缺陷酶本身引起的那些異常，且包含由任何分子缺陷引起的任何異常。因此，如本文中所用，術語「酶」意指涵蓋那些與溶酶體儲積症相關的其他蛋白質。

【0079】 在許多情況下，分子病變的性質影響疾病的嚴重程度，即完全喪失功能往往與產前或新生兒發病有關，且涉及嚴重的症狀；部分功能喪失與較輕微（相對性的）及遲發性疾病有關。一般而言，只需要恢復一小部分的活性以在缺陷細胞中修正代謝的缺陷。表 1 列出了一些較常見的溶酶體儲積症及其相關的功能喪失蛋白。溶酶體儲積症大致上係描述於 Desnick 及 Schuchman (2012)中。

【0080】 溶酶體儲積症可根據在缺陷溶酶體內堆積的產物類型進行分類。神經鞘脂質過多症是一類影響神經鞘脂質代謝的疾病，神經鞘脂質為含有與脂肪族胺醇連接的脂肪酸之脂質（綜述於 S. Hakomori, "Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis," 50 Annual Review of Biochemistry 733-764, July 1981）。神經鞘脂質的堆積產物包含神經節苷脂（例如，泰-歇克斯症）、醣脂（例如，法布瑞氏症）及葡萄糖腦苷脂（例如，高雪氏症）。

【0081】 黏多醣儲積症是一群影響醣胺聚醣（GAGS 或黏多醣）代謝的疾病，醣胺聚醣為長形未分枝的重複雙醣鏈，其有助於構建骨骼、軟骨、肌腱、角膜、皮膚及結締組織（綜述於 J. Muenzer, "Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses," 111(2) Mol.

Genet. Metab. 63-72 (Feb. 2014); Sasisekharan等人, "Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans," 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (Dec. 2014))。黏多醣的堆積產物包含肝黏醣硫酸鹽、皮膚素硫酸鹽、硫酸角質素、各種形式的硫酸軟骨素及玻糖醛酸。例如，莫奎歐氏症 A 型為由於溶酶體酶半乳糖-6-硫酸鹽硫酸酯酶的缺陷，其引起溶酶體堆積硫酸角質素及軟骨素 6-硫酸鹽。

【0082】 由細胞無法代謝（製造或分解）肝醣所引起的肝醣儲積症（又名肝醣病）。肝醣代謝係受各種酶或其他蛋白質的調節，包含葡萄糖-6-磷酸酶、酸性 α-醣苷酶、肝醣去分枝酶、肝醣分枝酶、肌肉肝醣磷酸化酶、肝臟肝醣磷酸化酶，肌肉磷酸果糖激酶、磷酸化酶激酶、葡萄糖轉運蛋白、醛醇縮酶 A、β-烯醇酶及肝醣合成酶。例示性溶酶體儲積症/肝醣儲積症為龐貝氏症，其缺陷的酸性 α-醣苷酶致使肝醣堆積於溶酶體中。症狀包含肝腫大、肌肉無力、心臟衰竭、以及在嬰兒期變異體例子中於 2 歲時死亡（參見 DiMauro 及 Spiegel, "Progress and problems in muscle glycogenosis," 30(2) Acta Myol. 96-102 (Oct. 2011)）。

【0083】 「多結構域治療性蛋白質」包含(i)含有一個以上的功能性結構域之單一蛋白質，(ii)含有一個以上的多肽鏈之蛋白質，及(iii)一個以上的蛋白質與一個以上的多肽之混合體。術語多肽一般被認為意指一個經由肽鍵連結在一起的單鏈胺基酸。術語蛋白質係涵蓋術語多肽，但也包含更複雜的結構。亦即，單個多肽為蛋白質，且蛋白質可含有一或多個聯結成更高級結構的多肽。例如，血紅蛋白為含有四個肽的蛋白質：兩個 α 球蛋白多肽及兩個 β 球蛋白多肽。肌紅蛋白也是一種蛋白質，但它只含有單個肌紅蛋白多肽。

【0084】 該多結構域治療性蛋白質包含一或多個多肽及提供兩種功能的至少兩個結構域。該等結構域中之一者為「酶結構域」，其提供了與酶缺乏症相關的缺陷蛋白活性之替代。該等結構域中之另一者為「遞送結構域」，其提供了與內化效應子的結合。因此，提供酶替代活性與結合內化效應子能力（又名內化效應子結合蛋白(遞送結構域活性)）之單一個多肽為一種多結構域治療性蛋白質。並且，於其中有一個蛋白質提供酶的功能且領一個蛋白質提供內化效應子結合活性之蛋白質混合體，其為一種多結構域治療性蛋白質。圖 1A 係描繪多種多結構域治療性蛋白質的範例。於一實例中（圖 1A，區塊 A），該多結構域治療性蛋白質含有一個酶（由六邊體表示）及一個結合該酶（散列線）與內化效應子（實線）之雙特異性抗體（IE-BP）。於此例中，該雙特異性抗體的一臂係以非共價方式結合酶，而另一臂係以非共價方式結合內化效應子，藉以使該替化酶可內化到細胞或次細胞腔室內。於另一實例中（區塊 B），該多結構域治療性蛋白質包含單一個蛋白質，其含有兩個多肽，一多肽係具有酶的功能，而另一多肽具有遞送結構域功能。於此例中，酶係融合至免疫球蛋白 Fc 結構域或重鏈恆定區，該區係與酶半抗體的 Fc 結構域聯結以形成雙功能性多結構域治療性蛋白質。此於區塊 B 繪示之實施例係與區塊 A 中的相似，除了酶是以共價方式附接該等半抗體中之一者，而非通過在該半抗體免疫球蛋白變異結構域處的抗原-抗體交互作用。

【0085】 於其他實例中，該多結構域治療性蛋白質係由所述以共價方式（直接或間接地通過一連接子）連接該遞送結構域的酶所組成。於一實施例中，該酶係附接一免疫球蛋白分子的 C 端（例如，重鏈或輕鏈）。於另一實施例中，該酶係附接該免疫球蛋白分子的 N 端（例如，重鏈或輕鏈）。

在這些範例中，該免疫球蛋白分子為遞送結構域。於又另一實施例中，該酶係附接 scFv 分子之結合內化效應子的 C 端。

【0086】 於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質包含兩個遞送結構域。於一實施例中，第一遞送結構域係結合一溶酶體運輸分子或其他內化效應子（例如 CD63）。於另一實施例中，第二遞送結構域係結合一胞吞轉送效應子以促進該多結構域治療性蛋白質的跨細胞運輸。於一實施例中，該胞吞轉送效應子特別為一 LDL 受體、IgA 受體、運鐵蛋白受體或新生的 Fc 受體(FcRn)。於一具體實施例中，胞吞轉送遞送結構域包括一結合運鐵蛋白受體之分子，諸如(例如)抗運鐵蛋白受體抗體或抗運鐵蛋白受體 scFv 分子。Tuma 及 Hubbard, "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," Physiological Reviews, 83(3): 871-935 (1 July 2003)之對於有用於實施本發明之介導胞吞轉送的細胞表面受體的部分係以引用方式併入本文中。

【0087】 「酶結構域」或「酶」係指代任何與酶缺乏症的病因或生理作用相關之蛋白質。酶係包含實際的酶、運送蛋白、受體、或其他有缺陷且歸因於引起疾病的分子病變之蛋白質。酶亦包含任何可提供相似或足夠的生化或生理活性來取代或回避疾病的分子病變之蛋白質。例如，「同功異構酶」可使用為酶。溶酶體儲積症相關蛋白的實例包含表 1 中列舉之「涉及的酶/蛋白質」，及任何已知或後來發現的蛋白質或可回避酶缺乏症之分子缺陷的其它分子。

【0088】 在一些實施例中，該酶為水解酶，包含酯解酶、醣苷酶、可作用在醚鍵上的水解酶、肽酶、線性醯胺酶、二磷酸酶、酮水解酶、鹵化酶、磷酸醯胺酶、磺基水解酶、磺酸鹽酶、脫磺酸鹽酶等。於一些實施例中，該酶為醣基化酶，包含醣苷酶及 *N*-醣基化酶。於一些實施例中，該酶為醣苷酶，包含 α-澱粉酶、β-澱粉酶、葡聚醣 1,4-α-醣苷酶、纖維素、內-

1,3(4)-β-聚葡萄糖酶、菊醣酶、內-1,4-β-聚木糖酶、內-1,4-b-聚木糖酶、葡聚醣酶、幾丁質酶、聚半乳糖醛酸苷酶、溶菌酶、外-α-唾液酸酶、α-醣苷酶、β-醣苷酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-甘露糖苷酶、β-甘露糖苷酶、β-果糖苷酶、α,α-海藻糖、β-葡萄糖醛酸苷酶、聚木糖 內-1,3-β-木糖苷酶、澱粉-α-1,6-醣苷酶、透明質酸胺基葡萄糖苷酶、透明質酸葡萄糖醛酸苷酶等。

【0089】 在龐貝氏症的例子中，其分子缺陷為缺乏 α-醣苷酶活性，其酶包含 α-醣苷酶，而同功異構酶為其它種 α-醣苷酶、經工程改造的 α-醣苷酶、其它醣苷酶、重組醣苷酶、任何經工程改造以將一個非還原性 1-4 連接的 α-葡萄糖殘基的末端水解掉而釋放單個 α-葡萄醣分子之蛋白質、EC 3.2.1.20 酶、用於肝醣或澱粉之天然或重組的低 pH 碳水化合物水解酶以及葡萄糖苷基水解酶（諸如蔗糖酶-異麥芽糖酶、麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶、醣苷酶 II 及中性 α-醣苷酶）。

【0090】 「內化效應子」包含一個能夠內化至細胞中或以其他方式參與或有助於逆梯度膜運輸的蛋白質。在一些情況下，內化效應蛋白是經歷轉胞吞作用的蛋白質；即，蛋白質在細胞的一側內化並運輸至細胞的另一側(例如，頂端至基底）。在許多實施例中，內化效應蛋白是細胞表面表達的蛋白質或可溶解的胞外蛋白質。然而，本發明還設想了其中內化效應蛋白表達在胞內隔室如內體、內質網、高基氏體、溶酶體等內部的實施例。例如，參與逆梯度膜運輸(例如，從早期/再迴圈型內體至反-高基氏體網絡的途徑)的蛋白質可以在本發明的多個實施例中充當內化效應蛋白。在任何情況下，遞送結構域與內化效應蛋白的結合造成整個多特異性治療性蛋白質和與之締合的任何分子(例如，酶)也變得內化至細胞中。如下文解釋，內

化效應蛋白包括直接內化至細胞中的蛋白質，以及間接地內化至細胞中的蛋白質。

【0091】 直接內化至細胞中的內化效應蛋白包括經歷細胞內化並且優選地由胞內降解及/或再迴圈途徑加工的具有至少一個胞外結構域的膜結合分子(例如，跨膜蛋白、GPI-錨定蛋白等）。直接內化至細胞中的內化效應蛋白的具體非限制性實例包含(例如)CD63、MHC-I (例如，HLA-B27)、Kremen-1、Kremen-2、LRP5、LRP6、LRP8、運鐵蛋白受體、LDL 受體、LDL 相關蛋白 1 受體、ASGR1、ASGR2、類澱粉蛋白前驅蛋白樣蛋白-2 (APLP2)、apelin 受體(APLNR)、MAL (髓鞘質及淋巴細胞蛋白，又名 VIP17)、IGF2R、液泡型 H+ ATP 酶、白喉毒素受體、葉酸受體、麩胺酸受體、麩胱甘肽受體、瘦蛋白受體、清道夫受體(例如，SCARA1-5、SCARB1-3、CD36)等。

【0092】 在某些實施例中，內化效應子是催乳素受體(PRLR)。發現 PRLR 不僅是某些治療應用的靶標，而且是基於其高內化速率和翻轉率的有效內化效應蛋白。例如，PRLR 作為內化效應蛋白的潛力在 WO2015/026907 中示出，其中尤其證明了抗 PRLR 抗體在體外被 PRLR 表現細胞有效內化。

【0093】 於某些實施例中，該內化效應子為腎特異性內化子，諸如 CDH16 (Cadheri-16)、CLDN16 (Claudn-16)、KL (Klotho)、PTH1R (副甲狀腺素受體)、SLC22A13 (溶質載體家族 22 成員 13)、SLC5A2 (鈉/葡萄糖協同轉運蛋白 2)及 UMOD (尿調理素)。於其它某些實施例中，該內化效應子為肌肉腎特異性內化子，諸如 BMPR1A (骨成形性蛋白質受體 1A)、m-黏附蛋白、CD9、MuSK (肌肉特異性激酶)、LGR4/GPR48 (G 蛋白耦聯受體 48)、乙醯膽鹼受體(菸鹼) α 1、CDH15 (Cadheri-15)、ITGA7 (整聯蛋白 α-

7)、CACNG1 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-1)、CACNAlS (L 型鈣離子通道亞單元 α-15)、CACNG6 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-6)、SCN1B (鈉離子通道亞單元 β-1)、CHRNA1 (ACh 受體亞單元 α)、CHRND (ACh 受體亞單元 δ)、LRRC14B (含富集重複白胺酸之蛋白 14B)、肌營養不良蛋白聚醣(DAG1)及 POPDC3 (含 Popeye 結構域之蛋白 3)。於一些具體實施例中，該內化效應子為 ITGA7、CD9、CD63、ALPL2、ASGR1、ASGR2 或 PRLR。

【0094】 在其中內化效應子(IE)是直接內化到細胞內的那些實施例中，遞送結構域可以是(例如)特異性結合 IE 的抗體或抗體的抗原結合片段，或是與 IE 相互作用的配位體或配位體的部分。例如，若 IE 是 Kremen-1 或 Kremen-2，則遞送結構域可包括 Kremen 配位體（例如，DKK1)或其 Kremen 結合部分，或由 Kremen 配體或其 Kremen 結合部分組成。於另一實例中，若 IE 為諸如 ASGR1 的受體分子，則遞送結構域可包括對該受體具特異性的配位體(例如，脫唾液酸血清類黏蛋白[ASOR]或 β-GalNAc)或其受體結合部分，或由對該受體具特異性的配位體或其受體結合部分組成。

【0095】 間接內化至細胞中的內化效應蛋白包含本身不內化，但與直接內化至細胞中的第二蛋白質或多肽結合或以其他方式締合後變成內化至細胞中的蛋白質和多肽。間接內化至細胞中的蛋白質包括例如能夠與內化性細胞表面表現受體分子結合的可溶性配位體。通過可溶性配位體與內化性細胞表面表現受體分子相互作用（間接）內化至細胞中的可溶性配位體的非限制性實例為運鐵蛋白。在其中 IE 為運鐵蛋白（或另一種間接內化的蛋白質）的實施例中，遞送結構域與 IE 的結合和 IE 與運鐵蛋白受體(或另一種內化細胞表面表現的受體分子）的相互作用，造成整個遞送結構域和與之締合的任何分子(例如，酶)變得內化至細胞中，與此同時內化 IE 和其結合配偶體。

【0096】 在其中 IE 間接內化到細胞內的那些實施例中，遞送結構域可以是(例如)特異性結合 IE 的抗體、抗體的抗原結合片段、或 scFv，或是與可溶性效應蛋白特異性相互作用的受體或受體的部分。例如，若 IE 為細胞介素，則遞送結構域可以包括相應的細胞介素受體或其配位體結合部分，或由相應的細胞介素受體或其配位體結合部分所組成。

【0097】 一個 IE 範例為 CD63，其為跨越細胞膜四次的細胞表面蛋白四跨膜蛋白超家族的一員。CD63 幾乎在所有的組織中都有表現，且被認為涉及形成及穩定訊息複合物。CD63 係定位於細胞膜、溶酶體膜及晚期胞內體上。已知 CD63 與整聯蛋白有關且可能涉及上皮-間質的轉化。參見 H. Maecker 等人, "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators," 11(6) FASEB J. 428-42, May 1997;及 M. Metzelaar 等人, "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells," 266 J. Biol. Chem. 3239-3245, 1991。

【0098】 另一個 IE 範例為類澱粉蛋白 β (A4)前驅物樣蛋白 2 ("APLP2")，其為一種廣泛表現的 APP（類澱粉蛋白前驅蛋白）家族的一員。APLP2 為一種已知會與第 I 類主要組織相容性複合體(MHC)分子（例如，Kd）交互作用之膜連型蛋白。其係於細胞表面結合 Kd 並以依存 clathrin 的方式內化，且 Kd 緊隨其後。參見 Tuli 等人, "Mechanism for amyloid precursor-like protein 2 enhancement of major histocompatibility complex class I molecule degradation," 284 The Journal of Biological Chemistry 34296 -34307 (2009)。

【0099】 另一個 IE 範例為泌乳素受體(PRLR)。泌乳素受體為第 I 型細胞介素受體家族的一員，且於配位子結合及隨後二聚化時，活化「酪胺酸激酶 Jak2、Fyn 及 Tec，磷酸腌 SHP-2，鳥嘌呤核苷酸交換因子 Vav，以及訊息抑制因子 SOCS」（參見 Clevenger 及 Kline, "Prolactin receptor

signal transduction," 10(10) Lupus 706-18 (2001),摘要）。泌乳素受體經歷細胞內噬循環，且可在溶酶體片斷中發現到。參見 Genty 等人, "Endocytosis and degradation of prolactin and its receptor in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor cDNA," 99(2) Mol. Cell Endocrinol. 221-8 (1994)；及 Ferland 等人, "The effect of chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver," 115(5) Endocrinology 1842-9 (1984)）。

【0100】 如本文中所使用，「免疫反應」一般意指患者對於外界或「非自體的」蛋白質之免疫反應。此免疫反應包含會干擾替代酶有效性之過敏反應及抗體的長成。一些患者可能不會產生任何沒有作用的蛋白，因而使替代酶變成一個「外來的」蛋白質。例如，對缺少 GLA 的法布瑞氏症患者重複注射重組 GLA (rGLA)經常導致過敏反應。在其他患者中，已顯示出產生抗 rGLA 的抗體會減少治療該疾病之替代酶的有效性。參見(例如) Tajima 等人 ("Use of a Modified α-*N*--Acetylgalactosaminidase (NAGA) in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease," 85(5) Am. J. Hum. Genet. 569-580 (2009))，其討論了使用經修飾的 NAGA 做為取代 GLA 的「同功異構酶」。經修飾的 NAGA 與 GLA 沒有免疫交叉反應，且「不會與重複用重組 GLA 治療之法布瑞氏症患者的血清有反應」。*Id,*摘要。

【0101】 「免疫抑制劑」包含藥物及/或引起一般免疫抑制反應的蛋白質，且可用以預防針對替代酶的交叉反應免疫物質(CRIM)，例如，分別在龐貝氏症患者或法布瑞氏症患者中的 GAA 或 GLA。免疫抑制劑的非限制性實例包含胺甲葉酸、山喜多、環磷醯胺、雷帕黴素 DNA 烷化劑、抗 CD20 抗體、抗 BAFF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD4 抗體及其組合。

【0102】 在組織中之具特異性的調控因子受控制下，對組織（例如，肝

臟）具特異性的調控因子（例如，啟動子）會增強核酸序列（例如，基因）的表現。非限制性的肝特異性調控因子（例如，肝特異性啟動子）實例係可見於 Chuah 等人 (2014) *Mol. Ther.* 22:1605-13。

【0103】 術語「蛋白」係指任何具有約 20 個以上的胺基酸經由醯胺鍵共價連結之胺基酸聚合物。蛋白含有一或多個胺基酸聚合鏈，在本項技術中一般稱為「多肽」。因此，多肽可為一蛋白，且該蛋白可含有多個多肽以形成一單一運作雙分子。在某些蛋白中可存有雙硫鍵(即於半胱胺酸之間形成胱胺酸)。這些共價鍵連可在一單一多肽鏈內，或在二個個別的多肽鏈之間。例如，雙硫鍵為胰島素、免疫球蛋白、魚精蛋白及其類似物之正當結構的關鍵。就最近雙硫鍵形成的評論，請參見 Oka 及 Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013)。

【0104】 如本文中所使用，「蛋白」係包括生物治療蛋白、用於研究或治療的重組蛋白、trap 蛋白和其他 Fc-融合蛋白、嵌合蛋白、抗體、單株抗體、人類抗體、雙特異性抗體、抗體片段、奈抗體、重組抗體嵌合體、scFv 融合蛋白、細胞激素、趨化激素、肽激素及其類似物。蛋白可使用以重組細胞為基礎的製造系統來製造，例如昆蟲桿狀病毒系統、酵母菌系統（例如畢赤酵母菌屬(*Pichia* sp.)）、哺乳動物系統(例如 CHO 細胞和 CHO 衍生物，如 CHO-K1 細胞)。對於最近討論生物治療蛋白及其生產的評論，請參見 Ghaderi 等人, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012)。

【0105】 如本文中所使用，術語「抗體」係包括藉由雙硫鍵相連接的四條多肽鏈(二條重(H)鏈和二條輕(L)鏈)所組成的免疫球蛋白分子。各重鏈係

包含一重鏈可變區(文中縮寫為 HCVR 或 VH)及一重鏈恆定區。重鏈恆定區係包含三個結構域 CH1、CH2 和 CH3。各輕鏈係包含一輕鏈可變區(文中縮寫為 LCVR 或 VL)及一輕鏈恆定區。輕鏈恆定區係包含一個 CL 結構域。VH 和 VL 區可進一步細分為高變區，稱為互補決定區(CDR)，其間散佈著較保守性區域，稱為框架區(FR)。各 VH 和 VL 係由三個 CDR 和四個 FR 所組成，以下列順序由胺基端排列至羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (重鏈 CDR 可縮寫為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；輕鏈 CDR 可縮寫為 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)。術語「高親和力」抗體係指如表面電漿共振，例如 BIACORE™ 或溶液-親和力 ELISA 所測，該等對其目標具有至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M、或至少 10^{-12} M 之結合親和力的抗體。術語「抗體」可涵蓋任何類型的抗體，諸如(例如)單株或多株的。再者，抗體可以是任何來源的，諸如(例如)哺乳動物或非哺乳動物。於一實施例中，抗體可為哺乳動物的或禽類的。於另一實施例中，抗體可為人類來源的並可進一步為人類單株抗體。

【0106】 術語「雙特異性抗體」係包括能選擇性結合二或多個表位之抗體。雙特異性抗體一般係包含二條不同的重鏈，其中各重鏈係特異性結合一不同的表位一在二個不同的分子上(例如抗原)或在相同的分子上(例如在相同的抗原上)。若雙特異性抗體能選擇性結合二個不同的表位(第一表位和第二表位)，則第一重鏈對第一表位的親和力一般將至少低於第一重鏈對第二表位之親和力 1 至 2，或 3 至 4 個數量級，且反之亦然。經雙特異性抗體所辨識的表位可在相同或不同的目標上(例如在相同或不同的蛋白上)。雙特異性抗體可例如藉由將辨識相同抗原上的不同表位之重鏈組合來製造。例如，辨識相同抗原的不同表位之編碼重鏈可變序列的核酸序列可與編碼不同重鏈恆定區之核酸序列融合，且此等序列可在表現一免疫球蛋白輕鏈

的細胞中表現。典型的雙特異性抗體具有二條各具有三個重鏈 CDR 之重鏈，接著一(N-端或 C-端) CH1 結構域、絞鏈、一 CH2 結構域及一 CH3 結構域，而免疫球蛋白輕鏈並未賦予抗原結合特異性但可與各重鏈相結合，或可與各重鏈結合及可結合一或多個與重鏈抗原結合區結合之表位，或可與各重鏈結合並使該一或二條重鏈與一或二個表位結合。

【0107】 「重鏈」或「免疫球蛋白重鏈」一詞係包括來自任何生物之免疫球蛋白重鏈恆定區序列，除非另有說明係包括一重鏈可變結構域。除非另有說明，否則重鏈可變結構域係包括三個重鏈 CDR 和四個 FR 區。重鏈的片段包含一或多個 CDR 和一或多個 FR，以及其組合。典型的重鏈，在可變結構域之後，係具有(從 N-端至 C-端)：CH1 結構域、絞鏈、CH2 結構域及 CH3 結構域。重鏈之功能性片段係包括能特異性辨識一抗原(例如，以微莫耳(micromolar)、奈莫耳(nanomolar)或皮莫耳(picomolar)範圍之 KD 辨識抗原)，其能從細胞表現及分泌，及其係包含至少一 CDR 之片段。

【0108】 「輕鏈」一詞係包括來自任何生物之免疫球蛋白輕鏈恆定區序列，除非另有說明係包括人類 κ 和 λ 輕鏈。除非另有說明，否則輕鏈可變(VL)結構域典型地係包括三個輕鏈 CDR 和四個框架(FR)區。一般而言，全長的輕鏈，從胺基端至羧基端，係包括一包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 之 VL 結構域，及一輕鏈恆定結構域。可為本發明所用之輕鏈包括(例如)該等不會選擇性結合與抗原結合蛋白選擇性結合之第一或第二抗原。適合的輕鏈包括該等可藉由針對現存的抗體庫(濕式庫或於矽中)中最常用的輕鏈作篩選而加以辨識者，其中輕鏈實質上不會干擾抗原結合蛋白之抗原結合結構域的親和力及/或選擇性。適合的輕鏈包括該等可結合一或二個與抗原結合蛋白之抗原結合區鍵結的表位者。

【0109】 「可變結構域」一詞包括免疫球蛋白輕鏈或重鏈之胺基酸序列(若需要經修飾)，其以從 N-端至 C-端的順序(除非另有指出)，其包含下列胺基酸區：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「可變結構域」係包括能摺疊成具有雙 β 平板結構之典範結構域(VH 或 VL)的胺基酸序列，其中該 β 平板係在第一 β 平板和第二 β 平板之殘基間以雙硫鍵相連接。

【0110】 「互補決定區」一詞或術語「CDR」係包括由生物的免疫球蛋白基因之核酸序列所編碼的胺基酸序列，其一般(亦即野生型動物)出現在免疫球蛋白分子(例如抗體或 T 細胞受體)之輕鏈或重鏈可變區的二個框架區之間。CDR 可由，例如，胚源序列或重排或未重排序列，及例如由未成熟或成熟的 B 細胞或 T 細胞所編碼。在某些情況下(例如就 CDR3)，CDR 可由二或多個序列(例如胚原序列)所編碼，其為非毗鄰的(例如未重排的核酸序列)但在 B 細胞核酸序列中為毗鄰的，例如因剪接或連接序列之結果(例如 V-D-J 重組而形成一重鏈 CDR3)。

【0111】 術語「抗體片段」係指抗體之保有特異性地結合到抗原之能力的一或多個片段。涵蓋在術語「抗體片段」內之結合片段實例包括(i) Fab 片段，其為一由 VL、VH、CL 及 CH1 結構域組成之單價片段；(ii) F(ab')2 片段，其為一包含兩個在鉸鏈區由雙硫鍵連接的 Fab 片段之雙價片段；(iii) 由 VH 及 CH1 結構域組成之 Fd 片段；(iv)由抗體的單臂的 VL 與 VH 結構域所組成的 Fv 片段；(v) dAb 片段（Ward 等人(1989) Nature 241:544-546），其由 VH 結構域所組成；(vi)經分離的 CDR；以及(vii) scFv，其係由 Fv 片段的兩個結構域 VL 及 VH 所組成，所述 VL 及 VH 係藉由一合成連接子所接合以形成單一個蛋白質，其中 VL 及 VH 區係配對以形成單價分子。其他形式的單鏈抗體（諸如雙價抗體）係亦涵蓋在術語「抗體」之下（參見

Holliger等人(1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123）。

【0112】 「含 Fc 蛋白」一詞包括抗體、雙特異性抗體、免疫黏附素(immunoadhesin)及包含至少一免疫球蛋白 CH2 和 CH3 區之功能部份的其他結合蛋白。「功能部份」係指可結合一 Fc 受體(例如 FcγR；或 FcRn，亦即新生的 Fc 受體)，及/或可參與補體活化之 CH2 和 CH3 區。若 CH2 和 CH3 區含有刪除、取代及/或插入或其他修飾，使其無法結合任何 Fc 受體且亦無法活化補體，則該 CH2 和 CH3 區並不具功能性。

【0113】 含 Fc-蛋白可在免疫球蛋白結構域包括修飾，其包括其中該等修飾係影響一或多個結合蛋白之效應子功能(例如影響 FcγR 結合、FcRn 結合及因而影響半衰期及/或 CDC 活性之修飾)。此等修飾包括(但不限於)下列修飾及其組合：就免疫球蛋白恆定區之 EU 編號為：238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438 及 439。

【0114】 例如，但不限於，此結合蛋白為一含 Fc-蛋白並具有提升的血清半衰期(相較於無所述的修飾之相同的含 Fc-蛋白)且在位置 250 (例如，E 或 Q)；250 和 428 (例如，L 或 F)；252 (例如，L/Y/F/W 或 T)，254 (例如，S 或 T)，及 256 (例如，S/R/Q/E/D 或 T)具有一修飾；或在 428 及/或 433 (例如，L/R/SI/P/Q 或 K)及/或 434 (例如，H/F 或 Y)之修飾；或在 250 及/或

428 之修飾；或在 307 或 308 (例如，308F、V308F)及 434 之修飾。在另一實例中，此修飾可包括 428L (例如，M428L)和 434S (例如，N434S)修飾；428L、2591 (例如，V259I)及 308F (例如，V308F)修飾；433K (例如，H433K)和 434 (例如，434Y)修飾；252、254 及 256 (例如，252Y、254T 和 256E)修飾；250Q 和 428L 修飾(例如，T250Q 和 M428L)；307 及/或 308 修飾(例如，308F 或 308P)。

【0115】 如本文中所使用，術語「抗原結合蛋白」係指一個特異性地辨識抗原上的表位之多肽或蛋白質（與一功能性單元複合之一或多個多肽），諸如細胞特異性抗原及/或本發明之標靶抗原。抗原結合蛋白可為多重特異性的。關於抗原結合蛋白之術語「多重特異性」意指該蛋白質可在相同的抗原上或不同的抗原上辨識不同的表位。本發明之多重特異性抗原結合蛋白係可為單個多重功能多肽，或其可為一個含有二或多個以共價方式或非共價方式彼此相連之多肽的多聚體蛋白。術語「抗原結合蛋白」包含本發明之抗體或其片段，其可連接另一個功能性分子（例如，另一個肽或蛋白質）或與該分子共同表現。例如，抗體或其片段係可以具功能性的方式連接（例如，藉由化學耦連、基因融合、非共價連結或其它方式）一或多個其他分子實體（諸如蛋白質或其片段），以產生一個具有第二結合特異性之雙特異性或多重特異性的抗原結合分子。

【0116】 如本文中所使用，術語「表位」係指該抗原被多重特異性抗原結合多肽辨識的部分。單個抗原（諸如抗原多肽）可具有一個以上的表位。表位可界定成結構性的或功能性的。功能性的表位一般為一個結構性表位子集，且界定為那些直接有助於抗原結合多肽與抗原之間相互作用的親和力之殘基。表位亦可為構象性的，即由非線性胺基酸所構成。於某些實施例中，表位可包含決定位，所述決定位為諸如胺基酸、糖側鏈、磷酸基、

磺醯基之分子的化學活性表面分組，而於某些實施例中，其可具有特異性的三維結構特徵及/或特異性的電荷特徵。由鄰近的胺基酸所形成的表位通常保持暴露於變性溶劑下，在變性溶劑處理下通常會於該處喪失由三級摺疊所形成的表位。

【0117】 術語「結構域」係指蛋白質或多肽具有特定功能或結構的任何部分。較佳地，本發明的結構域係結合至細胞特異性或標靶抗原。細胞特異性的抗原結構域或標靶抗原結合結構域，及其類似物，係使用於本文中，包含任何天然存在的、酶促獲得的、合成的或基因工程改造之結合抗原的多肽或醣蛋白。

【0118】 術語「半體」或「半抗體」是可交換使用的，其係指抗體之基本上含有一個重鏈及一個輕鏈的一半。抗體重鏈可形成二聚體，因此一個半體的重鏈可以與不同分子（例如，另一個半體）或另一個含 Fc 的多肽所聯結之重鏈聯結。兩個些微不同的 Fc 結構域可「異源二聚化」，如同形成雙特異性抗體或其它異源二聚體、-三聚體、-四聚體等。參見 Vincent 及 Murini, "Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates," 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (20912); 及 Shimamoto 等人, "Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies," 4(5) MAbs 586-91 (2012)。

【0119】 於另一實施例中，該半體可變結構域係特異性地辨識該內化效應子，且該半體 Fc 結構域與一包括有替代酶（例如，胜肽抗體）之 Fc 融合蛋白進行二聚化。Id, 586。

【0120】 術語「單鏈可變片段」或「scFv」包括一個含有一免疫球蛋白重鏈可變區(VH)及一免疫球蛋白輕鏈可變區(VL)之單鏈融合多肽。於一些實施例中，VH 及 VL 係藉由一個 10 至 25 個胺基酸的連接子序列所連接。

ScFv 多肽亦可包含其它胺基酸序列，諸如 CL 或 CH1 區。ScFv 分子可藉由噬菌體顯示來製造或直接從融合瘤或 B 細胞再轉殖重鏈與輕鏈而製作。Ahmad 等人, Clinical and Developmental Immunology, 冊別 2012, 文章 ID 98025 之文獻中的藉由噬菌體顯示與抗體結構域選殖來製作 scFv 片段的方法係以引用方式併入本文中。

【0121】 「alpha-醣苷酶」（或「α-醣苷酶」）、「α-醣苷酶活性」、「GAA」及「GAA 活性」係可交換使用並且指可促進肝醣的 1,4-α 鍵水解及促進澱粉變成葡萄糖之任何蛋白質。尤其是亦已知 GAA 為 EC 3.2.1.20、麥芽糖酶、葡萄糖轉化酶、葡糖苷蔗糖酶、麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶、α-吡喃葡萄糖苷酶、葡糖苷轉化酶、α-D-醣苷酶、α-葡萄糖苷水解酶、α-1,4-醣苷酶及 α-D-葡萄糖苷糖水解酶。可在溶酶體及小腸的刷狀緣中發現到 GAA。罹患龐貝氏症的患者缺少可作用的溶酶體 α-醣苷酶。參見 Chiba, "Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase," 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); 及 Hesselink 等人, "Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II," 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003)。

【0122】 「alpha-半乳糖苷酶 A」（或「α-半乳糖苷酶 A」）、「α-半乳糖苷酶 A 活性」、「α-半乳糖苷酶」、「α-半乳糖苷酶活性」、「GLA」及「GLA 活性」係可交換使用並且指可促進末端 α-半乳糖部分從醣脂及醣蛋白上水解，並且水解 α-D-岩藻糖苷。尤其是亦已知 GLA 為 EC 3.2.1.22、蜜二糖酶、α-D-半乳糖苷酶、α-半乳糖苷酶 A、α-半乳糖苷半乳糖水解酶、α-D-半乳糖苷半乳糖水解酶。GLA 為一種由 X 性聯 GLA 基因編碼的溶酶體酶。GLA 的缺陷會導致法布瑞氏症，其中已知醣脂為球形三醯神經醯胺（又名 Gb3、GL-3 或神經醯胺三己糖苷）且堆積在血管內（即顯著的血管

病變），導致腎臟、心臟、皮膚及/或腦血管組織、及其他組織與器官功能的疼痛及損害。參見(例如) Prabakaran 等人, "Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of α-galactosidase A in kidney endothelial cells," 7(6) PLoS One e39975 pp. 1-9 (2012)。

【0123】 於一態樣中，本發明提供一種藉由將「多結構域治療性蛋白質」施與該患者而治療罹患溶酶體儲積症的患者（或個體）之方法。該多結構域治療性蛋白質進入到患者的細胞並將酶、或取代該酶的酶活性（即「替代酶」）、或與 LSD 聯結的酶活性遞送到溶酶體。於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質係經由一含有編碼該多結構域治療性蛋白質之多核苷酸的基因治療載體而遞送給患者。

【0124】 LSD 包含神經鞘脂質過多症、黏多醣儲積症及的肝醣儲積症。於一些實施例中，LSD 為以下之任一者或多者：法布瑞氏症、第 I 型高雪氏症、第 II 型高雪氏症、第 III 型高雪氏症、A 型尼曼匹克症、B 型尼曼匹克症、GM1-神經節苷脂儲積症、山德霍夫症、泰-歇克斯症、GM2-活化體缺乏症、GM3-神經節苷脂儲積症、異染性白質退化症、神經鞘脂質活化體缺乏症、賀勒氏症、賀勒-施艾氏症、施艾氏症、韓特氏症、聖菲利柏氏症 A 型、聖菲利柏氏症 B 型、聖菲利柏氏症 C 型、聖菲利柏氏症 D 型、莫奎歐氏症 A 型、莫奎歐氏症 B 型、馬洛托-拉米氏症、史萊氏症、MPS IX 及龐貝氏症。於一特定實施例中，LSD 為法布瑞氏症。於另一實施例中，LSD 為龐貝氏症。

【0125】 於一些實施例中，該多結構域治療性蛋白質係包含(a)替代酶，以及(b)結合內化效應子（遞送結構域）之分子實體。於一些例子中，該替代酶為以下之任一者或多者：α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、Saposin-C 活化體、神經醯胺酶、神經鞘磷脂酶、β-己

醣胺酶、GM2 活化體、GM3 合成酶、芳基硫酸脂酶、神經鞘脂質活化體、α-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸酶-2-硫酸脂酶、乙醯肝素 *N*-硫酸脂酶、*N*-乙醯基-α-葡萄胺糖苷酶、α-葡萄糖胺 *N*-乙醯基移轉酶、*N*-乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶、*N*-乙醯半乳胺糖-6-硫酸鹽硫酸酯酶、*N*-乙醯半乳胺糖-4-硫酸酯酶、β-葡萄糖醛酸苷酶、及玻糖醛酸酶。

【0126】 於一些例子中，患者可能無法製造出足夠的蛋白質，使得替代酶被患者辨識成「非自體的」且在施用替代酶之後接著發生免疫反應。這是不被期望的。因此，於一些實施例中，替代酶係以避免在個體中誘導免疫反應的方式設計或產生。一個這類的解決方案為使用「同功異構酶」來做為替代酶。同功異構酶係非常接近於患者「自體的」蛋白質，但具有足以減緩 LSD 症狀的替代酶活性。

【0127】 於 LSD 為龐貝氏症且內源性酶為 α-醣苷酶(GAA)之特定實施例中，該同功異構酶係可為以下之任一者：α-醣苷酶、蔗糖酶-異麥芽糖酶(SI)、麥芽糖酶-葡萄糖澱粉酶(MGAM)、醣苷酶 II (GANAB)及中性 α-醣苷酶(C GNAC)。於 LSD 為法布瑞氏症且內源性酶為 α-半乳糖苷酶 A (GLA)之另一特定實施例中，該同功異構酶係可為經工程改造使具有 GLA 活性之 α-*N*-乙醯基半乳糖胺糖苷酶。

【0128】 本文中所提供的是，除了同功異構酶之外，降低抗替代酶之交叉反應免疫物質(CRIM)的方法。如圖 5 及圖 6 中所顯示，當與施用對照治療性蛋白質（缺少內化效應子結構域且包括有酶結構域）相比時，施用包括有內化效應子結合結構域及酶結構域之多結構域治療性蛋白質（例如，經由基因治療載體）會降低抗替代酶的 CRIM 程度。照此，於一實施例中，在患有酶缺乏症之患者中降低抗酶的 CRIM 係包括將一多結構域治療性蛋白質（或編碼其之核酸，例如，含有編碼該多結構域治療性蛋白質之基因

的基因治療載體）施與該患者，其中該多結構域治療性蛋白質包括一遞送結構域（例如，內化效應子結合蛋白）及一酶結構域。

【0129】 該多結構域治療性蛋白質具有一內化效應子結合蛋白組分，其使替代酶可被攝入細胞內。因此，於一些實施例中，該內化效應子可為CD63、MHC-I、Kremen-1、Kremen-2、LRP5、LRP6、LRP8、運鐵蛋白受體、LDL-受體、LDL 相關蛋白 1 受體、ASGR1、ASGR2、類澱粉蛋白前驅蛋白樣蛋白-2 (APLP2)、apelin 受體(APLNR)、PRLR (泌乳素受體)、MAL (髓鞘質及淋巴細胞蛋白，又名 VIP17)、IGF2R、液胞型 H+ ATP 酶、白喉毒素受體、葉酸受體、麩胺酸受體、麩胱甘肽受體、瘦蛋白受體、清道夫受體 SCARA1-5、SCARB1-3 及 CD36。於某些實施例中，該內化效應子為腎特異性內化子，諸如 CDH16 (Cadheri-16)、CLDN16 (Claudn-16)、KL (Klotho)、PTH1R (副甲狀腺素受體)、SLC22A13 (溶質載體家族 22 成員 13)、SLC5A2 (鈉/葡萄糖協同轉運蛋白 2)及 UMOD (尿調理素)。於其它某些實施例中，該內化效應子為肌肉腎特異性內化子，諸如 BMPR1A (骨成形性蛋白質受體 1A)、m-黏附蛋白、CD9、MuSK (肌肉特異性激酶)、LGR4/GPR48 (G 蛋白耦聯受體 48)、乙醯膽鹼受體(菸鹼) α 1、CDH15 (Cadheri-15)、ITGA7 (整聯蛋白 α-7)、CACNG1 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-1)、CACNA1S (L 型鈣離子通道亞單元 α-15)、CACNG6 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-6)、SCN1B (鈉離子通道亞單元 β-1)、CHRNA1 (ACh 受體亞單元 α)、CHRND (ACh 受體亞單元 δ)、LRRC14B (含富集重複白胺酸之蛋白 14B)、肌營養不良蛋白聚醣(DAG1)及 POPDC3 (含 Popeye 結構域之蛋白 3)。於一些具體實施例中，該內化效應子為 ITGA7、CD9、CD63、ALPL2、ASGR1、ASGR2 或 PRLR。

【0130】 於一些實施例中，該內化效應子結合蛋白係包括一抗原結合蛋白，其包含受體-融合分子、trap 分子、受體-Fc 融合分子、抗體、Fab 片段、F(ab')2 片段、Fd 片段、Fv 片段、單鏈 Fv (scFv)分子、dAb 片段、分離的互補決定區(CDR)、CDR3 肽、限制型 FR3-CDR3-FR4 肽、結構域特異性抗體、單結構域抗體、經刪除結構域的抗體、嵌合抗體、CDR-接枝型抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、微型抗體、奈米抗體、單價奈米抗體、雙價奈米抗體、小模組免疫藥物(SMIP)、駱駝抗體(VHH 重鏈同型二聚合抗體)及鯊魚可變 IgNAR 結構域。

【0131】 於一實施例中，結合該內化效應子的分子實體為抗體、抗體片段或其他抗原結合蛋白。例如，該分子實體可以是雙特異性抗體，其一臂係結合該內化效應子（例如，ITGA7、CD9、CD63、PRLR、APLP2、ASGR1、ASGR2），而另一臂係結合該替代酶。於此例中，該多結構域治療性蛋白質包括雙特異性抗體及替代酶（圖 1A）。於一具體實施例中，所治療的疾病為法布瑞氏症，且該多結構域治療性蛋白質包括 GLA 及一結合 GLA 及 CD63 的雙特異性抗體。於一具體實施例中，所治療的疾病為法布瑞氏症，且該多結構域治療性蛋白質包括 GLA 及一結合 GLA 及 ITGA7 的雙特異性抗體。於另一具體實施例中，所治療的疾病為龐貝氏症，且該多結構域治療性蛋白質包括 GAA 及一結合 GAA 及 CD63 的雙特異性抗體。於另一具體實施例中，所治療的疾病為法布瑞氏症，而該多結構域治療性蛋白質包括 GAA 及一結合 GAA 及 ITGA7 的雙特異性抗體。

【0132】 於另一實施例中，結合該內化效應子的分子實體為半抗體，且該替代酶含有 Fc 結構域（酶-Fc 融合多肽）。於一實施例中，該酶-Fc 融合多肽之 Fc 結構域係與所述內化效應子特異性的半體之 Fc 結構域聯結而形成該多結構域治療性蛋白質（圖 1B）。

【0133】 於其他實施例中，替代酶係以共價方式連接內化效應子結合蛋白。前段所述之酶-Fc 融合:半體實施例（也參見圖 1B）係落入此類別中，因為 Fc 二聚體可經由一或多個雙硫鍵來固定。酶活性結構域(或多肽)與該內化結合結構域(或多肽)之間的共價鍵係可為任何型式的共價鍵，即任何涉及電子共用的鍵結。於一些例子中，該共價鍵為兩個胺基酸之間的肽鍵，使得替代酶及內化效應子結合蛋白全部或部分形成連續的多肽鏈，如同在融合蛋白中般。於一些例子中，該替代酶部分及內化效應子結合蛋白部分係直接連接。於其他例子中，連接子係用以栓鏈兩個部分。參見 Chen 等人, "Fusion protein linkers: property, design and functionality," 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013)。

【0134】 於一特定實施例中，該替代酶係以共價方式連接一抗內化效應子抗體的重鏈 C 端（參見圖 1C）或輕鏈 C 端（圖 1E）。於另一特定實施例中，該替代酶係以共價方式連接至一抗內化效應子抗體的重鏈 N 端（參見圖 1D）或輕鏈 N 端（圖 1F）。於另一特定實施例中，酶係連接一抗內化效應子 scFv 結構域的 C 端（圖 1G）。

【0135】 於一些例子中，尤其於替代酶並非正常在溶酶體中進行蛋白水解加工，將一可切斷型連接子添加至所述包括有抗體-酶融合作用之多結構域治療型蛋白質的那些實施例中。於一些實施例中，可切斷型細胞自溶酶連接子係插入至抗體及替代酶之間，以促進溶酶體中的抗體移除，以使得：a)藉由去除立體空間大的抗體而可能有助於保持酶活性，及 b)可能會增加溶酶體之酶衰退期。

【0136】 於一特定實施例中，該多結構域治療型蛋白質係在一個含有編碼該多結構域治療型蛋白質的多核苷酸之基因治療載體中遞送給患者或細胞。於一實施例中，該多結構域治療型蛋白質包含一遞送結構域及一酶結

構域。於一具體實施例中，該遞送結構域係結合一內化效應子，諸如 CD63、MHC-I、Kremen-1、Kremen-2、LRP5、LRP6、LRP8、運鐵蛋白受體、LDL 受體、LDL-相關蛋白 1 受體、ASGR1、ASGR2、類澱粉前驅蛋白樣蛋白-2 (APLP2)、apelin 受體(APLNR)、MAL（髓鞘質及淋巴細胞蛋白 MAL）、IGF2R、液胞型 H+ ATP 酶、白喉毒素受體、葉酸受體、麩胺酸受體、麩胱甘肽受體、瘦蛋白受體、清道夫受體 A1-5 (SCARA1-5)、SCARB1-3 或 CD36。於一實施例中，該遞送結構域為結合 CD63 之單鏈可變片段(scFv)（即抗 CD63 scFv）。於另一實施例中，該遞送結構域為一結合 ITGA7 之單鏈可變片段(scFv)（即抗 ITGA7 scFv）。

【0137】 於一特定實施例中，該多結構域治療型蛋白質之酶結構域係包含水解酶。於一具體實施例中，該酶結構域包含一為醣基化酶之水解酶。於一更具體的實施例中，該酶結構域包含一為醣苷酶之醣基化酶。於一更具體的實施例中，該酶結構域係為 α-醣苷酶之醣苷酶。

【0138】 一般而言，本文中所揭露的是包括有多核苷酸之組成物及其治療溶酶體儲積症之用途，該多核苷酸例如為(m)RNA、DNA 及其修飾形式，且其係編碼一包括有內化效應子結構域及酶結構域之多結構域治療型蛋白質，用於在患有龐貝氏症患者中降低肝醣及/或增強對 GAA 的免疫耐受性。

【0139】 術語「多核苷酸」包含編碼至少一多肽之核苷酸聚合體（例如，RNA 或 DNA），該多肽包含融合多肽，例如一包含內化效應子結構域及酶結構域之多結構域治療性多肽。如本文中所使用，多核苷酸係涵蓋皆包括有經修飾與未經修飾的核苷酸之聚合體。多核苷酸可含有一或多個編碼或非編碼區域。多核苷酸可由自然來源來純化，使用重組表現系統產生，及可選擇地以化學合成方式純化等。在適當的情況下，例如在化學合成分子的情況下，多核苷酸可包括核苷類似物，諸如具有經化學修飾的鹼或糖

以及主鏈修飾等之類似物。除非另有所指，多核苷酸序列係以 5'到 3'方向展現。於一些實施例中，多核苷酸係為或包括天然核苷酸（例如，腺核苷、鳥嘌呤核苷、胞苷、尿核苷）；核苷類似物（例如，2-胺基腺核苷、2-硫代胸腺嘧啶、肌核苷、吡咯嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5 丙炔基-胞苷、C-5 丙炔基-尿核苷、2-胺基腺核苷、C5-溴尿核苷、C5-氟尿核苷、C5-碘尿核苷、C5-丙炔基-尿核苷、C5-丙炔基 l-胞苷、C5-甲基胞苷、2-胺基胞苷、7-脫氮腺核苷、7-脫氮鳥嘌呤核苷、8-側氧基腺核苷、8-側氧基鳥嘌呤核苷、O(6)-甲基鳥嘌呤及 2-硫代胞苷）；化學修飾的鹼；生物修飾的鹼（例如，經甲基化的鹼）；嵌入的鹼；經修飾的糖（例如，2'-氟核糖、核糖、2'-去氧核醣、阿拉伯糖及己醣）；及/或經修飾的磷酸基（例如，硫代磷酸酯及 5'-N-亞磷醯胺的連接）。

【0140】 於一些實施例中，多核苷酸包含一或多個非標準的核苷酸殘基。所述非標準的核苷酸殘基可包含(例如) 5-甲基-胞苷("5mC")、假尿核苷(".psi.U")及/或 2-硫代-尿核苷("2sU")。參見(例如)美國專利 第 8,278,036 號或 WO2011012316，關於這類殘基及其併入到多核苷酸的討論，其每一者係以全文引用方式併入本文中。非標準的核苷酸殘基的存在可致使多核苷酸比具有相同序列但僅含有標準殘基之對照組多核苷酸更穩定及/或免疫原性較低。於進一步的實施例中，多核苷酸可包括一或多個非標準的核苷酸殘基，其係選自異胞嘧啶、假異胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-胺基嘌呤、2-胺基嘌呤、肌苷、二胺基嘌呤及 2-氯-6-胺基嘌呤胞嘧啶，以及這些修飾與其他核苷鹼基修飾的組合。某些實施例可進一步包含另外對於呋喃醣環或核苷鹼基的修飾。另外的修飾可包含(例如)糖的修飾或取代（例如，一或多個 2'-O-烷基的修飾、鎖核酸 ***LNA***）。於一些實施例中，該多核苷酸可與另外的多核苷酸及/或肽多核苷酸(***PNA***)複合或雜合。於糖

的修飾為 2'-O-烷基的修飾之實施例中，這類修飾可包含（但不限於）2'-去氧基-2'-氟修飾、2'-O-甲基修飾、2'-O-甲氧基乙基修飾及 2'-去氧基修飾。於某些實施例中，這些修飾中之任一者係可以 0-100%的核苷酸存在--例如，大於 0%、1%、10%、25%、50%、75%、85%、90%、95%或 100%之單獨的或組合的核苷酸成分。 於一些實施例中，多核苷酸包括訊息 RNA (mRNA)分子，其可以被修飾或不被修飾，例如，其可包括或不包括經修飾的核苷酸，藉由熟知的方法增加其穩定性及/或減少其免疫原性。於一些實施例中，多核苷酸包括 DNA 分子，其可以被修飾或不被修飾，例如，其可包括或不包括經修飾的核苷酸，藉由熟知的方法增加其穩定性及/或減少其免疫原性。

【0141】 於一些實施例中，該多核苷酸亦包含一「基因座靶向核酸序列」。該基因座靶向序列使該多結構域治療性蛋白質編碼多核苷酸能夠整合到接受宿主細胞的基因組內。於一些實施例中，該基因座靶向核酸序列係包含能夠進行同源重組的旁側同源臂。於一些實施例中，該基因座靶向序列係包含嚮導 RNA 序列及一第 II 型 Cas 酶以促進整合（即 CRISPR-Cas9 方法）。於一些實施例中，該基因座靶向序列係包含嚮導鋅指核酸酶(ZFN)識別序列以促進整合。於一些實施例中，該基因座靶向序列係包含轉錄活化子樣效應子核酸酶(TALEN)識別序列以促進整合。又在其他實施例中，該基因座靶向序列係包含 BuD 衍生的核酸酶所使用之單個殘基對核苷酸的編碼，以促進整合。

【0142】 於一些實施例中，該多結構域治療性蛋白質編碼多核苷酸所整合入的基因體基因座係為「安全港基因座」。於一實施例中，「安全港基因座」能夠使該多結構域治療性蛋白質高度表現，同時不干擾必需基因的表現或促進致癌基因或其他有害基因的表現。於一實施例中，該基因體基

因座是在或接近肝所表現的白蛋白(Alb)基因座、EESYR 基因座、SARS 基因座、人類染色體 1 的位置 188,083,272 或其非人類哺乳動物直系同源基因、人類染色體 10 的位置 3,046,320 或其非人類哺乳動物直系同源基因、人類染色體 17 的位置 67, 328,980 或其非人類哺乳動物直系同源基因、染色體上的腺相關病毒位置 1 (AAVS1)、人類染色體 19 上自然發生的 AAV 病毒整合位置或其非人類哺乳動物直系同源基因、趨化介素受體 5 (CCR5) 基因、編碼 HIV-1 共受體之趨化介素受體基因、或小鼠 Rosa26 基因座或其非人類哺乳動物直系同源基因。於一實施例中，該基因體基因座為腺相關病毒位置。於一實施例中，整合用的基因體基因座係根據 Papapetrou 及 Schambach, J. Molecular Therapy, vol. 24 (4):678-684, April 2016 之方法來選擇，其對於用於整合基因治療載體之逐步選擇安全港基因體基因座的部分係以引用方式併入本文中；也請參見 Barzel 等人, Nature, vol. 517:360-364，其對於無啟動子的基因靶向方式到表現肝白蛋白(*Alb*)的基因座之部分係以引用的方式整體併入本文中。

【0143】 於一實施例中，該多核苷酸（例如 DNA）也含有一可操作地連接至該多結構域至療性蛋白質編碼核酸序列之啟動子。於一具體實施例中，該啟動子為一個在特定組織中驅動基因表現的組織特異性啟動子。於一實施例中，該組織特異性啟動子為一個衍生自 serpina1（例如，SEQ ID NO:9）之肝特異性增強子/啟動子，且為一個 TTR 啟動子(SEQ ID NO:8)。於其他實施例中，該啟動子為 CMV 啟動子。於其它實施例中，該啟動子為泛蛋白 C 啟動子。

【0144】 於一實施例中，編碼「基因治療載體」之多結構域治療性蛋白質係為任何能夠遞送該多核苷酸至宿主（例如患者）之載體。於一些實施例中，該基因治療載體係靶向一特異性宿主細胞或器官，例如局部遞送，

例如組織特異性遞送。一般而言，局部遞送需要一個由主要在器官（例如，肝臟）中及/或藉該器官轉譯或表現之 mRNA 所編碼的蛋白質（例如，多結構域治療性蛋白質），藉以於該處形成一個貯庫，例如用於該蛋白質的產生（及分泌）之肝臟貯庫。於一些實施例中，基因治療載體係遞送一多結構域治療性蛋白質多核苷酸至患者肝臟以形成肝臟貯庫。參見(例如) DeRosa 等人, *Gene Therapy*, vol. 10:699-707，其全文係以引用方式併入本文中。於一些實施例中，基因治療載體係遞送一個編碼多結構域治療性蛋白質之多核苷酸至患者的肌肉組織。於一些實施例中，基因治療載體遞送一個編碼多結構域治療性蛋白質之多核苷酸至患者的腦部。

【0145】 任何現在已知的或未來發展的基因治療遞送載體，不論是天然的或經工程改造的，係可使用於實施本發明。於一些實施例中，該基因治療載體為病毒載體，例如包括病毒、病毒殼體、病毒基因體等。於一些實施例中，該基因治療載體為裸多核苷酸，例如游離基因體。於一些實施例中，該基因治療載體包括一多核苷酸複合體。供使用為基因治療載體之例示性但非限制性多核苷酸複合體係包含微脂體、聚合體囊胞、聚合複體、樹枝狀聚合物、無機奈米粒子（例如，覆有金、二氧化矽、氧化鐵、磷酸鈣等之多核苷酸）。於一些實施例中，本文中所述之基因治療載體係包括病毒載體、裸多核苷酸及多核苷酸複合體之組合。

【0146】 於一實施例中，該基因治療載體為病毒，包含反轉錄病毒、腺病毒、單純皰疹病毒、痘病毒、痘瘡病毒、慢病毒或腺相關病毒。於一實施例中，該基因治療載體為腺相關病毒(AAV)，包含血清型 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10 及 AAV11，或經工程改造的或其自然選擇的變異體。

【0147】 於一實施例中，該多核苷酸亦含有腺相關病毒(AAV)核酸序列。於一實施例中，該基因治療載體為一種含有取自二或多個血清型之基因元件的嵌合型腺相關病毒。例如，具有取自 AAV1 的 rep 基因及取自 AAV2 的 cap 基因（指定為 AAV1/2 或 AAV RC1/2）之 AAV 載體係可做為基因治療載體使用，以將該多結構域治療形蛋白質多核苷酸遞送到細胞或有需求之患者的細胞。於一實施例中，該基因治療載體為 AAV1/2、AAV1/3、AAV1/4、AAV1/5、AAV1/6、AAV1/7、AAV1/8、AAV1/9、AAV1/10、AAV1/11、AAV2/1、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV2/10、AAV2/11、AAV3/1、AAV3/2、AAV3/4、AAV3/5、AAV3/6、AAV3/7、AAV3/8、AAV3/9、AAV3/10、AAV3/10、AAV4/1、AAV4/2、AAV4/3、AAV4/5、AAV4/6、AAV4/7、AAV4/8、AAV4/9、AAV4/10、AAV4/11、AAV5/1、AAV5/2、AAV5/3、AAV5/4、AAV5/6、AAV5/7、AAV5/8、AAV5/9、AAV5/10、AAV5/11、AAV6/1、AAV6/2、AAV6/3、AAV6/4、AAV6/5、AAV6/7、AAV6/8、AAV6/9、AAV6/10、AAV6/10、AAV7/1、AAV7/2、AAV7/3、AAV7/4、AAV7/5、AAV7/6、AAV7/8、AAV7/9、AAV7/10、AAV7/11、AAV8/1、AAV8/2、AAV8/3、AAV8/4、AAV8/5、AAV8/6、AAV8/7、AAV8/9、AAV8/10、AAV8/11、AAV9/1、AAV9/2、AAV9/3、AAV9/4、AAV9/5、AAV9/6、AAV9/7、AAV9/8、AAV9/10、AAV9/11、AAV10/1、AAV10/2、AAV10/3、AAV10/4、AAV10/5、AAV10/6、AAV10/7、AAV10/8、AAV10/9、AAV10/11、AAV11/1、AAV11/2、AAV11/3、AAV11/4、AAV11/5、AAV11/6、AAV11/7、AAV11/8、AAV11/9、AAV11/10、嵌合病毒顆粒或其衍生物。Gao 等人, “Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy,” PNAS 99(18): 11854–

11859, Sep. 3, 2002 之關於做為基因治療載體有用之 AAV 載體及嵌合病毒顆粒，以及其構築及用途，係以引用方式併入本文中。

【0148】 於一更具體的實施例中，該基因治療載體係為一具有血清型 2 rep 基因序列及血清型 8 cap 序列("AAV2/8" or "AAV RC2/8)之嵌合 AAV 載體。

【0149】 於一些實施例中，該基因治療載體為一個已經假型化（例如，經工程改造）以靶向特定細胞（例如，肝細胞）之病毒載體。使用病毒載體進行靶向基因治療的許多進展係已匯總成病毒載體之非重組性（非基因的）或重組性（基因的）修飾，其導致病毒載體天生向性的假型化、擴增及/或再靶向。（綜述於 Nicklin 及 Baker (2002) *Curr. Gene Ther.* 2:273-93; Verheiji and Rottier (2012) *Advances Virol* 2012:1-15）。非基因方法一般係利用一個會辨識野生型（非經修飾）病毒表面蛋白與標靶細胞兩者之轉接子。可溶性的偽受體（用於野生型病毒）、諸如聚乙烯乙二醇之聚合物、及抗體或其部分，係已做為轉接子的病毒結合結構域使用，同時，天然的肽及維生素配位體，以及抗體或其部分，係已做為上述轉接子的細胞結合結構域使用。例如，病毒載體對於標靶細胞的再靶向係可於載體:轉接子複合體結合到該標靶細胞表面上所表面的蛋白質（例如，細胞表面蛋白）時完成。這類方法已使用於 AAV（Bartlett 等人 (1999) *Nat. Biotechnol.* 74: 2777-2785）、腺病毒（Hemminki 等人 (2001) *Cancer Res.* 61: 6377–81; van Beusechem 等人 (2003) *Gene Therapy* 10:1982–1991; Einfeld 等人 (2001) *J. Virol.* 75:11284–91; Glasgow 等人 (2009) *PLOS One* 4:e8355）、疱疹病毒（Nakano 等人 (2005) *Mol. Ther.* 11:617-24）及副黏液病毒（Bian 等人 (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:295-303; Bian 等人 (2005) *Int. J. Oncol.* 29:1359-69）、冠狀病毒（Haijema 等人 (2003) *J. Virol.* 77:4528–4538; Wurdinger 等

人 (2005) *Gene Therapy* 12:1394–1404）。

【0150】 更流行的方法為病毒殼蛋白的重組基因修飾，及因而的病毒殼體表面修飾。於間接的重組性方法中，係用一個會接著連接到轉接子的異源「支架」來修飾病毒殼體。轉接子係結合到支架及標靶細胞。（Arnold 等人 (2006) *Mol. Ther.* 5:125-132; Ponnazhagen 等人 (2002) *J. Virol.* 76:12900–907; *亦參見* WO 97/05266）。諸如以下的支架係已整合到 Ad 內：(1) Fc 結合分子(例如 Fc 受體、蛋白質 A 等)，其結合到抗體轉接子的 Fc；(2) (鏈黴)親合素，其結合到生物素化轉接子；(3)生物素，其結合到會與(鏈黴)親合素融合的轉接子；及(4)蛋白:蛋白結合對，其形成諸如結合 SpyTagged 轉接子之 SpyCatcher 的全對稱肽鍵（Pereboeva 等人 (2007) *Gene Therapy* 14: 627–637; Park 等人 (2008) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 769–774; Henning 等人 (2002) *Human Gene Therapy* 13:1427–1439; Banerjee 等人 (2011) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:4985–4988), AAV (Gigout 等人 (2005) *Molecular Therapy* 11:856–865; Stachler 等人 (2008) *Molecular Therapy* 16:1467–1473), and togavirus (Quetglas 等人 (2010) *Virus Research* 153:179–196; Ohno 等人 (1997) *Nature Biotechnology* 15:763–767; Klimstra 等人 (2005) *Virology* 338:9–21）。

【0151】 於直接的重組性靶向方法中，係直接將靶向配位體插入到、或耦合到病毒殼體中，即蛋白病毒殼體經過修飾以表現一異源性配位體。該配位體接著將標靶細胞上優先表現或單獨表現的受體或標記物重新導向（例如，結合）。（Stachler 等人 (2006) *Gene Ther.* 13:926–931; White 等人 (2004) *Circulation* 109:513–519）。直接重組性方法係已使用於 AAV（Park 等人 (2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653–59; Girod 等人 (1999) *Nature*

Medicine 5:1052–56; Grifman 等人 (2001) *Molecular Therapy* 3:964–75; Shi 等人 (2001) *Human Gene Therapy* 12:1697–1711; Shi 及 Bartlett (2003) *Molecular Therapy* 7:515–525）、反轉錄病毒（Dalba 等人 *Current Gene Therapy* 5:655–667; Tai 及 Kasahara (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:3083 3095; Russell 及 Cosset (1999) *Journal of Gene Medicine* 1:300–311; Erlwein 等人 (2002) *Virology* 302:333–341; Chadwick 等人 (1999) *Journal of Molecular Biology* 285:485–494; Pizzato 等人 (2001) *Gene Therapy* 8:1088–1096）、痘病毒（Guse 等人 (2011) *Expert Opinion on Biological Therapy* 11:595–608; Galmiche 等人 (1997) *Journal of General Virology* 78:3019–3027; Paul 等人 (2007) *Viral Immunology* 20:664–671）、副黏液病毒（Nakamura 及 Russell (2004) *Expert Opinion on Biological Therapy* 4:1685–1692; Hammond 等人 (2001) *Journal of Virology* 75:2087–2096; Galanis (2010) *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 88:620–625; Blechacz 及 Russell (2008) *Current Gene Therapy* 8:162–175; Russell 及 Peng (2009) *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330:213–241）及疱疹病毒（Shah 及 Breakefield (2006) *Current Gene Therapy* 6:361 370; Campadelli-Fiume 等人 (2011) *Reviews in Medical Virology* 21:213–226）。

【0152】 於一些實施例中，如本文中所述之基因治療載體對於那些特別適宜生成調控反應（例如，對於(例如)替代酶具耐受性）的組織是偽型的。這類組織包含（但不限於）例如腸相關淋巴組織(GALT)、造血幹細胞及肝臟。於一些實施例中，該基因治療載體，或編碼如本文中所述之多結構域治療性蛋白質的基因，係於對那些組織具特異性的啟動子（例如，肝特異性啟動子）受控制的情況下表現。

【0153】 於一些實施例中，如本文中所述之基因治療載體係包括一裸多

核苷酸。例如，於一些實施例中，編碼多結構域治療性多肽之多核苷酸係可直接通過(例如)肌肉注射到器官內供形成貯庫，或例如靜脈注射等。另外對於增強裸多核苷酸的遞送之熟知方法包含(但不限於)電穿孔、聲波穿孔、使用基因槍射擊覆有多核苷酸的金顆粒、磁力轉染及流體動力遞送。

【0154】 於一些實施例中，如本文中所述之基因治療載體係包括裸多核苷酸複合體，諸如(但不限於)奈米顆粒（例如，多核苷酸自組裝的奈米顆粒、基於聚合物的自組裝奈米顆粒、無機奈米顆粒、脂質奈米顆粒、半導體/金屬奈米顆粒）、凝膠及水凝膠、具有陽離子與陰離子的多核苷酸複合物、微粒、或其任何組合。

【0155】 於一些實施例中，本文中所揭露之多核苷酸係可配置成自組裝的奈米顆粒。於一非限制性實例中，多核苷酸可用來製做使用在多核苷酸遞送系統中的奈米顆粒（參見(例如)國際公開案第 WO2012125987 號；其係以全文引用方式併入本文中）。於一些實施例中，該多核苷酸自組裝的奈米顆粒係包括一由本文中所揭露之多核苷酸組成的核，及一聚合物殼。該聚合物殼係可為本文所述之聚合物或本領域中已知的之中之任一者。於一另外的實施例中，該聚合物殼係可用以保護於核中的多核苷酸。

【0156】 於一些實施例中，這些自組裝的奈米顆粒係可為由含有多核苷酸髮夾的長聚合物形成之微海綿體，所述長聚合物在自組裝到微海綿體之前會形成結晶狀「褶疊」片。這些微海綿體為密集壓積的海綿樣微粒，其可用作有效的載體並且可能夠將貨物遞送至細胞。微海綿體的直徑可為 1 μm 至 300 nm。微海綿體可與本領域中已知的其它試劑複合以形成更大的微海綿體。在一個非限制性實例中，微海綿體可與一試劑複合以形成一促進細胞攝入的外層，諸如聚陽離子聚乙烯亞胺(PEI)。此複合物可形成在高溫(150 °C)下能保持穩定的 250-nm 直徑的顆粒。（Grabow and Jaegar,

Nature Materials 2012, 11:269-269；其以全文引用的方式併入本文中）。另外，這些微海綿能夠展現出保護不受核糖核酸酶降解的非比尋常程度。在另一個實施例中，基於聚合物的自組裝奈米顆粒，諸如(但不限於)微海綿體，係可為完全可程式設計的奈米顆粒。可精確控制奈米顆粒的幾何學、大小及化學計量學，以產生用於遞送貨物（諸如(但不限於)多核苷酸）的最佳奈米顆粒。

【0157】 於一些實施例中，多核苷酸可配製在無機奈米顆粒中（美國專利第 8,257,745 號，其係以全文引用的方式併入本文中）。無機奈米顆粒可包含(但不限於)遇水膨脹的黏土物質。於一個非限制性實例中，無機奈米顆粒可包含由簡單矽酸鹽製得的合成膨潤石黏土（參見(例如)美國專利第 5,585,108 及 8,257,745 號，其各自均以全文引用的方式併入本文中）。

【0158】 於一些實施例中，多核苷酸可配製在包括有半導電材料或金屬材料之水可分散奈米顆粒中（美國公開第 20120228565 號；其係以全文引用的方式併入本文中）或在磁性奈米顆粒中形成（美國公開第 20120265001 及 20120283503 號；其各自均以全文引用的方式併入本文中）。水可分散奈米顆粒可為疏水奈米顆粒或親水奈米顆粒。

【0159】 於一些實施例中，本文所揭露之多核苷酸係可包封到本領域中已知的任何水凝膠中，當注射到一個體中時所述水凝膠可形成凝膠。水凝膠為親水聚合物鏈網絡，且有時以其中的水為分散介質之膠態體凝膠存在。水凝膠為高度吸收性(其可含有超過 99%的水）的天然或合成聚合物。水凝膠由於其顯著的含水量還擁有非常類似於天然組織的柔軟度。本文中所述的水凝膠可用來包封可生物相容、可生物降解及/或多孔的脂質奈米顆粒。

【0160】 於一個非限制性實例中，水凝膠可為適體功能化的水凝膠。適體功能化的水凝膠可使用核酸雜交方式來程式設計以釋放一或多個多核苷

酸。（Battig等人, J. Am. Chem. Society. 2012 134:12410-12413；其係以全文引用的方式併入本文中）。 於一些實施例中，該多核苷酸可包封到脂質奈米顆粒中且接著將該脂質奈米顆粒包封到水凝膠之內。

【0161】 於一些實施例中，本文中所揭露之多核苷酸係可包封到纖維蛋白凝膠、纖維蛋白水凝膠或纖維蛋白膠中。於另一實施例中，多核苷酸可在包封到纖維蛋白凝膠、纖維蛋白水凝膠或纖維蛋白膠中之前配製在脂質奈米顆粒或快速消除型脂質奈米顆粒中。於又另一實施例中，多核苷酸可在包封到纖維蛋白凝膠、水凝膠或纖維蛋白膠中之前配製為脂質複合物。纖維蛋白凝膠、水凝膠和膠包括兩種成分，即纖維蛋白原溶液及富含鈣的凝血酶溶液（參見(例如)，Spicer 及 Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd等人,Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85；其各自均以全文引用的方式併入本文中）。可改變纖維蛋白凝膠、水凝膠及/或膠的成分濃度以改變所述凝膠、水凝膠及/或膠的特性、網絡篩孔大小及/或降解特性，諸如(但不限於)改變纖維蛋白凝膠、水凝膠及/或膠的釋放特性。（參見(例如)，Spicer及Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd等人, Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas等人, Tissue Engineering 2008. 14:119-128；其各自均以全文引用的方式併入本文中）。此特徵在用來遞送本文中所揭露之多核苷酸時是有利的。（參見(例如)，Kidd 等人, Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas等人, Tissue Engineering 2008. 14:119-128；其各自均以全文引用的方式併入本文中）。

【0162】 於一些實施例中，本文中所揭露之多核苷酸可包含陽離子或陰離子。於一實施例中，製劑包含金屬陽離子，諸如(但不限於) Zn2+、Ca2+、Cu2+、Mg+及其組合。於一個非限制性實例中，製劑可包含聚合物以及與

金屬陽離子複合的多核苷酸（參見(例如)美國專利第 6,265,389 及 6,555,525 號,其各自均以全文引用的方式併入本文中）。

【0163】 於一些實施例中，多核苷酸係可配製在奈米顆粒及/或微粒中。這些奈米顆粒及/或微粒可模製成任何大小形狀和化學性質。於一實例中，可使用 LIQUIDA TECHNOLOGIES.RTM. 公司 (Morrisville, N.C.) 的 PRINT® 技術製得奈米顆粒及/或微粒（參見(例如)國際公開第 WO2007024323;號；其以引用的方式全文併入本文中）。

【0164】 於一些實施例中，本文中所揭露之多核苷酸係可配製在 Keystone Nano 公司 (State College, Pa.)的奈米夾克(NanoJacket)與奈米脂質體(NanoLiposome)中。NanoJacket 係由天然存在於身體中的化合物（包含鈣、磷酸鹽）製成，且還可包含少量的矽酸鹽。NanoJacket 的大小可在 5 nm 至 50 nm 範圍內，且可用來遞送親水性及疏水性化合物，諸如(但不限於)多核苷酸、初級構築體及/或多核苷酸。 NanoLiposome 係由脂質製成，諸如(但不限於)天然存在於身體中的脂質。NanoLiposome 的大小可在 60 nm 至 80 nm 範圍內，且可用來遞送親水性及疏水性化合物，諸如(但不限於)多核苷酸、初級構築體及/或多核苷酸。於一態樣中，本文中所揭露之多核苷酸係配製在 NanoLiposome（諸如(但不限於)神經醯胺奈米脂質體）中。

【0165】 於一實施例中，該多結構域治療性蛋白質為抗 CD63 scFv-GAA 融合蛋白或抗 ITGA7 scFv-GAA 融合蛋白。經由 AAV 的遞送來施用抗 CD63 scFv-GAA 融合蛋白或抗 ITGA7 scFv-GAA 融合蛋白，在施用具有多結構域治療性蛋白質安全港的基因治療載體之後可在患者血清中提供長期穩定產生的 GAA。於一實施例中，在施用具有多結構域治療性蛋白質安全港的基因治療載體 1 個月、3 個月、4 個月、5 個月或 6 個月之後，

接受患者血清中之 GAA 濃度係比接受了未連接至遞送結構域之 GAA 的患者血清中的 GAA 濃度，高了≥ 1.5 倍至 100 倍、≥ 1.5 倍至 10 倍、≥ 2.5 倍、2.5 倍至 3 倍、2.5 倍、2.6 倍、2.7 倍、2.8 倍、2.9 倍、3.0 倍、3.1 倍、3.2 倍 、3.3 倍、3.4 倍、3.5 倍、3.6 倍、 3.7 倍、 3.8 倍、 3.9 倍、 4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍。

【0166】 於一實施例中，經由 AAV 的遞送來施用抗 CD63 scFv-GAA 融合蛋白或抗 ITGA7 scFv-GAA 融合蛋白，可在患有龐貝氏症的患者中提供長期穩定降低的肝醣儲存程度。於一實施例中，在患者心臟、骨骼肌及肝組織中的肝糖程度係降低至野生型（非患病）程度。於一實施例中，在施用具有多結構域治療性蛋白質安全港的基因治療載體 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月或 6 個月之後，在患者心臟、骨骼肌及肝組織中的肝糖程度係維持在野生型程度。

【0167】 於一實施例中，經由 AAV 的遞送來施用抗 CD63 scFv-GAA 融合蛋白或抗 ITGA7 scFv-GAA 融合蛋白，可在患有龐貝氏症的患者中提供長期穩定恢復的肌肉強度。於一實施例中，在施用具有多結構域治療性蛋白質安全港的基因治療載體 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月或 6 個月之後，由抓緊強度所測得的患者強度係恢復至正常（即非患病的正常程度）。

【0168】 於另一態樣中，本發明提供一種包括有酶活性及抗原結合蛋白之組成物，其中該酶係與酶缺乏症(LSD)及內化效應子結合蛋白相關。與溶酶體儲積症相關的酶（其包含本身無催化性的蛋白質）包含(例如)水解酶、α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-醣苷酶、β-醣苷酶、Saposin-C 活化體、神經醯胺酶、神經鞘磷脂酶、β-己醣胺酶、GM2 活化體、GM3 合成酶、芳基硫酸脂酶、神經鞘脂質活化體、α-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸酶-

2-硫酸酯酶、乙醯肝素 *N*--硫酸脂酶、*N*-乙醯基-α-葡萄胺糖苷酶、α-葡萄糖胺 *N*--乙醯基移轉酶、*N*--乙醯葡萄糖胺-6-硫酸酯酶、*N*--乙醯半乳胺糖-6-硫酸鹽硫酸酯酶、*N*--乙醯半乳胺糖-4-硫酸酯酶、β-葡萄糖醛酸苷酶及玻糖醛酸酶等之中的任一者或全部。

【0169】 內化效應子結合蛋白(例如)包含受體-融合分子、trap 分子、受體-Fc 融合分子、抗體、Fab 片段、F(ab')2 片段、Fd 片段、Fv 片段、單鏈 Fv (scFv)分子、dAb 片段、分離的互補決定區(CDR)、CDR3 肽、限制型 FR3-CDR3-FR4 肽、結構域特異性抗體、單結構域抗體、經刪除結構域的抗體、嵌合抗體、CDR-接枝型抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、微型抗體、奈米抗體、單價奈米抗體、雙價奈米抗體、小模組免疫藥物(SMIP)、駱駝抗體(VHH 重鏈同型二聚合抗體)、鯊魚可變 IgNAR 結構域及其他抗原結合蛋白等。

【0170】 內化效應子包含(例如)CD63、MHC-I、Kremen-1、Kremen-2、LRP5、LRP6、LRP8、運鐵蛋白受體、LDL-受體、LDL 相關蛋白 1 受體、ASGR1、ASGR2、類澱粉蛋白前驅蛋白樣蛋白-2 (APLP2)、apelin 受體(APLNR)、PRLR (泌乳素受體)、MAL (髓鞘質及淋巴細胞蛋白，又名 VIP17)、IGF2R、液胞型 H+ ATP 酶、白喉毒素受體、葉酸受體、麩胺酸受體、麩胱甘肽受體、瘦蛋白受體、清道夫受體 SCARA1-5、SCARB1-3 及 CD36。於某些實施例中，該內化效應子為腎特異性內化子，諸如 CDH16 (Cadheri-16)、CLDN16 (Claudn-16)、KL (Klotho)、PTH1R (副甲狀腺素受體)、SLC22A13 (溶質載體家族 22 成員 13)、SLC5A2 (鈉/葡萄糖協同轉運蛋白 2)及 UMOD (尿調理素)。於其它某些實施例中，該內化效應子為肌肉腎特異性內化子，諸如 BMPR1A (骨成形性蛋白質受體 1A)、m-黏附蛋白、CD9、MuSK (肌肉特異性激酶)、LGR4/GPR48 (G 蛋白耦聯受體

48)、乙醯膽鹼受體(菸鹼) α 1、CDH15 (Cadheri-15)、ITGA7 (整聯蛋白 α-7)、CACNG1 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-1)、CACNAlS (L 型鈣離子通道亞單元 α-15)、CACNG6 (L 型鈣離子通道亞單元 γ-6)、SCN1B (鈉離子通道亞單元 β-1)、CHRNA1 (ACh 受體亞單元 α)、CHRND (ACh 受體亞單元 δ)、LRRC14B (含富集重複白胺酸之蛋白 14B)、肌營養不良蛋白聚醣(DAG1)及 POPDC3 (含 Popeye 結構域之蛋白 3)。於一些具體實施例中，該內化效應子為 ITGA7、CD9、CD63、ALPL2、ASGR1、ASGR2 或 PRLR。

【0171】 於一些實施例中，酶係以共價方式連接（即原子間共享電子）該抗原結合蛋白。於一特定實施例中，內化效應子結合蛋白係由半體所組成或含有半體；酶係融合至 Fc 融合結構域（即在 C 端）；共價連接到酶的 Fc 結構域係與該抗原結合蛋白的 Fc 結構域聯結，使得其聯結含有一或多個雙硫鍵。此特定實施例係繪示於圖 1A,區塊 B。

【0172】 於另一特定實施例中，該內化效應子結合蛋白（遞送結構域）係由抗體或抗體片段所組成，或含有抗體或抗體片段，且酶係以共價方式連接該抗體或抗體片段。於一具體實施例中，該遞送結構域為抗體，該酶係以共價方式連接（直接通過肽鍵，或間接經由連接子）到該抗體重鏈或輕鏈的 C 端（分別在圖 1A,區塊 C 或 E）。於另一具體實施例中，該遞送結構域為抗體，該酶係以共價方式連接（直接通過肽鍵，或間接經由連接子）到該抗體重鏈或輕鏈的 N 端（分別在圖 1A,區塊 D 或 F）。

【0173】 於一些實施例中，該酶及遞送結構域並未共價連接，但結合成混合物。該酶及遞送結構域可通過非共價力聯結而形成複合體。例如，於一特定實施例中，該遞送結構域為雙特異性抗體，抗體的一臂係結合該內化效應子，而另一臂係結合酶。此實施例係繪示於圖 1A,區塊 A。

【0174】 於一些實施例中，該酶為 GAA 或包括 GAA 活性（即具有

GAA 活性的同功異構酶），且該內化效應子為 ITGA7、CDH15、CD9、CD63、APLP2、ASGR1、ASGR2 或 PRLR。於一特定實施例中，該酶為 GAA 或包括 GAA 活性，該內化結構域為 CD63，且該遞送結構域為具有 CD63 及 GAA 特異性之雙特異性抗體。於一特定實施例中，該酶為 GAA 或包括 GAA 活性，該內化結構域為 ITGA7，且該遞送結構域為具有 ITGA7 及 GAA 特異性之雙特異性抗體。

【0175】 於一些實施例中，該酶為 GLA 或包括 GLA 活性（即具有 GLA 活性的同功異構酶），且該內化效應子為 ITGA7、CD9、CD63、APLP2、ASGR1、ASGR2 或 PRLR。於一特定實施例中，該酶為 GLA 或包括 GLA 活性，該內化結構域為 CD63，且該遞送結構域為具有 CD63 及 GLA 特異性之雙特異性抗體。於一特定實施例中，該酶為 GLA 或包括 GLA 活性，該內化結構域為 ITGA7，且該遞送結構域為具有 ITGA7 及 GLA 特異性之雙特異性抗體。

醫藥組成物及其施用

【0176】 藥物製劑可另外包含藥學上可接受的賦形劑，如本文所使用的賦形劑包括適合於所希望的具體劑型的任何和所有溶劑、分散介質、稀釋劑或其它液體媒介物、分散或懸浮助 劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、固體黏合劑、潤滑劑等。Remington 的 The Science and Practice of Pharmacy,第 21 版，A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006;其以全文引用的方式併入本文）公開了用於配製藥物組成物的各種賦形劑和用於其製備的已知技術。除了如通過產生任何不希望的生物作用或另外以有害的方式與藥物組成物的任何其它組分相互作用而與物質或其衍生物不相容的任何常規賦形劑介質以外，所述賦形劑的使用被涵蓋在本發明的範圍內。

【0177】 在一些實施例中，藥學上可接受的賦形劑為至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%純淨。在一些實施例中，賦形劑被批准用於人和用於獸醫使用。在一些實施例中，賦形劑由美國食品藥品管理局批准。在一些實施例中，賦形劑為藥用級。在一些實施例中，賦形劑滿足美國藥典（USP)、歐洲藥典（EP)、英國藥典及/或國際藥典的標準。

【0178】 在藥物組成物的製造中使用的藥學上可接受的賦形劑包括但不限於惰性稀釋劑、分散劑及/或成粒劑、表面活性劑及/或乳化劑、崩解劑、黏合劑、防腐劑、緩衝劑、潤滑劑及/或油。此類賦形劑可任選包括在藥物組成物中。

【0179】 例示性稀釋劑包括但不限於碳酸鈣、碳酸鈉、磷酸鈣、磷酸二鈣、硫酸鈣、磷酸氫鈣、磷酸鈉、乳糖、蔗糖、纖維素、微晶纖維素、高嶺土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化鈉、乾澱粉、玉米澱粉、糖粉等及/或其組合。

【0180】 例示性成粒劑及/或分散劑包括但不限於土豆澱粉、玉米澱粉、木薯澱粉、羥乙酸澱粉鈉、黏土、海藻酸、瓜爾膠、柑橘漿、瓊脂、膨潤土、纖維素和木材產品、天然海綿、陽離子交換樹脂、碳酸鈣、矽酸鹽、碳酸鈉、交聯聚（乙烯吡咯烷酮）（交聚維酮）、羧甲基澱粉鈉（羥乙酸澱粉鈉）、羥甲基纖維素、交聯羥甲基纖維素鈉（交聯羧甲纖維素）、甲基纖維素、預膠凝澱粉（澱粉 1500)、微晶澱粉、水不可溶澱粉、羧甲基纖維素鈣、矽酸鎂鋁(VEEGUM®)、月桂硫酸鈉、季銨化合物等及/或其組合。

【0181】 例示性表面活性劑及/或乳化劑包括但不限於天然乳化劑（例如阿拉伯樹膠、瓊脂、海藻酸、海藻酸鈉、黃蓍膠、軟骨膠、膽固醇、黃

原膠、果膠、明膠、蛋黃、酪蛋白、羊毛脂、膽固醇、蠟以及卵磷脂）、膠體黏土（例如膨潤土[矽酸鋁]和 VEEGUM® [矽酸鎂鋁])、長鏈胺基酸衍生物、高分子量醇（例如硬脂醇、鯨蠟醇、油醇、單硬脂酸三乙酸甘油酯、二硬脂酸乙二醇酯、單硬脂酸甘油酯和單硬脂酸丙二醇酯、聚乙烯醇）、卡波姆（carbomer) (例如羧基聚亞甲基、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物以及羧乙烯基聚合物）、角叉菜膠、纖維素衍生物（例如羧甲基纖維素鈉、粉狀纖維素、羥甲基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、甲基纖維素）、脫水山梨糖醇脂肪酸酯（例如聚氧乙烯脫水山梨糖醇單月桂酸酯[TWEEN® 20]、聚氧乙烯脫水山梨糖醇[TWEEN® 60]、聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯[TWEEN® 80]、脫水山梨糖醇單棕櫚酸酯[SPAN® 40]、脫水山梨糖醇單硬脂酸酯[SPAN® 60]、脫水山梨糖醇三硬脂酸酯[SPAN® 65]、單油酸甘油酯、脫水山梨糖醇單油酸酯[SPAN® 80]、聚氧乙烯酯（例如聚氧乙烯單硬脂酸酯[MYRJ® 45]、聚氧乙烯氫化蓖麻油、聚氧乙烯化蓖麻油、聚氧亞甲基硬脂酸酯以及 SOLUTOL®)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯（例如 CREMOPHOR®)、聚氧乙烯醚（例如聚氧乙烯月桂基醚[BRIJ® 30])、聚(乙烯吡咯烷酮)、二乙二醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸鈉、油酸鉀、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂硫酸鈉、PLUORINC® F 68、POLOXAMER® 188、十六烷基三甲基溴化銨、氯化十六烷基吡啶、苯扎氯銨、多庫酯鈉等及/或其組合。

【0182】 例示性黏合劑包括但不限於澱粉（例如玉米澱粉和澱粉糊）；明膠；糖（例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇）；天然和合成的樹膠（例如阿拉伯樹膠、海藻酸鈉、角叉菜提取物、panwar 樹膠、印度樹膠、isapol 皮的粘液質、羧甲基纖維素、甲基纖維素、乙基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、微晶纖

維素、乙酸纖維素、聚(乙烯吡咯烷酮)、矽酸鎂鋁(Veegum®)、以及落葉松阿拉伯半乳聚糖）；海藻酸鹽；聚環氧乙烷；聚乙二醇；無機鈣鹽；矽酸；聚甲基丙烯酸酯；蠟；水；醇等；及其組合。

【0183】 例示性防腐劑可包括但不限於抗氧化劑、螯合劑、抗微生物防腐劑、抗真菌防腐劑、醇防腐劑、酸性防腐劑及/或其它防腐劑。例示性抗氧化劑包括但不限於 α 生育酚、抗壞血酸、棕櫚酸抗壞血酸酯、丁羥茴醚、丁羥甲苯、單硫代甘油、焦亞硫酸鉀、丙酸、沒食子酸丙酯、抗壞血酸鈉、亞硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉及/或亞硫酸鈉。例示性螯合劑包括乙二胺四乙酸（EDTA)、檸檬酸單水合物、依地酸二鈉、依地酸二鉀、依地酸、富馬酸、蘋果酸、磷酸、依地酸鈉、酒石酸及/或依地酸三鈉。例示性抗微生物防腐劑包括但不限於苯扎氯銨、苯索氯銨、苯甲醇、溴硝丙二醇、西曲溴銨、氯化十六烷基吡啶、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇及/或硫柳汞。例示性抗真菌防腐劑包括但不限於對羥基苯甲酸丁酯、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羥基苯甲酸、苯甲酸鉀、山梨酸鉀、苯甲酸鈉、丙酸鈉及/或山梨酸。例示性醇防腐劑包括但不限於乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚類化合物、雙酚、氯丁醇、羥基苯甲酸酯及/或苯乙醇。例示性酸性防腐劑包括但不限於維生素 A、維生素 C、維生素 E、β-胡蘿蔔素、檸檬酸、乙酸、脫氫乙酸、抗壞血酸、山梨酸及/或植酸。其它防腐劑包括但不限於生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸去鐵胺、西曲溴銨、丁羥茴醚（BHA)、丁羥甲苯（BHT)、乙二胺、月桂基硫酸鈉（SLS)、月桂基乙醚硫酸鈉（SLES)、亞硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉、亞硫酸鉀、焦亞硫酸鉀、GLYDANT PLUS®、PHENONIP®、對羥基苯甲

酸甲酯、GERMALL® 115、GERMABEN® II、NEOLONE.TM.、KATHON.TM.及/或EUXYL®。

【0184】 例示性緩衝劑包括但不限於檸檬酸鹽緩衝溶液、乙酸鹽緩衝溶液、磷酸鹽緩衝溶液、氯化銨、碳酸鈣、氯化鈣、檸檬酸鈣、葡乳醛酸鈣、葡庚糖酸鈣、葡糖酸鈣、D-葡糖酸、甘油磷酸鈣、乳酸鈣、丙酸、乙醯丙酸鈣、戊酸、磷酸氫鈣、磷酸、磷酸三鈣、羥基磷酸鈣、乙酸鉀、氯化鉀、葡糖酸鉀、鉀混合物、磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、磷酸鉀混合物、乙酸鈉、碳酸氫鈉、氯化鈉、檸檬酸鈉、乳酸鈉、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、磷酸鈉混合物、氨基丁三醇、氫氧化鎂、氫氧化鋁、海藻酸、無熱原水、等滲鹽水、林格氏液、乙醇等及/或其組合。

【0185】 例示性潤滑劑包括但不限於硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸、二氧化矽、滑石、麥芽、山嵛酸甘油酯、氫化植物油、聚乙二醇、苯甲酸鈉、乙酸鈉、氯化鈉、亮胺酸、月桂基硫酸鎂、月桂基硫酸鈉等以及其組合。

【0186】 例示性的油包括但不限於扁桃、杏仁、鱷梨、巴巴蘇椰子、佛手柑、黑加侖籽、琉璃苣、杜松、洋甘菊、芥花、葛縷子、棕櫚賭、蓖麻、肉桂、可哥脂、椰子、魚肝、咖啡、玉米、棉籽、鴯鶓、桉樹、月見草、魚、亞麻籽、香茅醇、萌蘆、葡萄籽、榛子、海索草、肉豆蔻酸異丙酯、西蒙德木、夏威夷核果、雜薰衣草、薰衣草、檸檬、山蒼子、澳洲堅果、錦葵、芒果籽、白芒花籽、水貂、肉豆蔻、橄欖、柑橘、橙連鰭鮭、棕櫚、棕櫚仁、桃仁、花生、罌粟籽、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、紅花、檀香木、山茶花、塔花、沙棘、芝麻、牛油樹脂、矽酮、大豆、向日葵、茶樹、薊、椿、岩蘭草、胡桃以及小麥胚芽油。例示性的油包括但不限於硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、環甲矽油、癸二酸二乙酯、

聚二甲基矽氧烷 360、肉豆蔻酸異丙酯、礦物油、辛基十二烷醇、油醇、矽油及/或其組合。

【0187】 根據配製者的判斷，諸如可可脂及栓劑蠟、著色劑、塗覆劑、甜味劑、調味劑及/或芳香劑之賦形劑可存在於組成物中。

【0188】 遞送

【0189】 本發明涵蓋了藉由考量可能推進藥物遞送科學之任何適當途徑來遞送該基因治療載體（例如，多核苷酸）。遞送可為裸露的或配製的。

【0190】 裸露的遞送

【0191】 本發明的多核苷酸係可裸露遞送至細胞。如本文中所使用，「裸露的」是指遞送不含促進轉染的試劑之多核苷酸。例如，遞送至細胞的多核苷酸可不含有修飾。可使用本領域中已知的及本文中所述的施用途徑將裸露的多核苷酸遞送至細胞。

【0192】 配製的遞送

【0193】 可使用本文中所述的方法配製多核苷酸。製劑可含有多核苷酸且可進一步包含(但不限於)細胞穿透劑、藥學上可接受的載劑、遞送劑、生物可侵蝕或生物相容的聚合物、溶劑以及持續釋放型遞送貯庫。可使用本領域中已知的及本文中所述的施用途徑將配製的多核苷酸 mRNA 遞送至細胞。

【0194】 施用

【0195】 可通過產生治療有效結果的任何途徑施用本發明的多核苷酸。這些包括但不限於腸內、胃腸、硬膜外、經口、透皮、硬膜外(epidural)(硬膜外 (peridural))、腦內（進入大腦）、腦室內（進入腦室）、皮外（塗敷在皮膚上）、皮內（進入皮膚本身）、皮下（在皮膚下）、鼻施用（通過鼻子）、靜脈內（進入靜脈）、動脈內（進入動脈）、肌內（進入肌肉）、

心臟內（進入心臟）、骨內輸注（進入骨髓）、鞘內（進入椎管）、腹膜內（輸注或注射到腹膜中）、膀胱內輸注、玻璃體內（通過眼睛）、海綿體內注射（進入陰莖底部）、陰道內施用、子宮內、羊膜外施用、透皮（擴散穿過完好的皮膚用於系統分佈）、透粘膜（擴散穿過粘膜）、吹入（嗅吸）、舌下、唇下、灌腸、滴眼液（滴在結膜上）或用滴耳液。在具體的實施例中，組成物可以允許其穿過血腦屏障、血管屏障或其它上皮屏障的方式施用。用於本發明的多核苷酸、初級構建體或 mRNA 的施用的非限制性途徑在以下描述。

【0196】 腸胃外施用及注射施用

【0197】 用於腸胃外施用的液體劑型包括但不限於藥學上可接受的乳劑、微乳劑、溶液、混懸液、糖漿劑及/或酏劑。除了活性成分以外，液體劑型可包含在本領域中通常使用的惰性稀釋劑，例如像水或其它溶劑、溶解劑和乳化劑如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油（特別為棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇和脫水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。除了惰性稀釋劑以外，經口組成物可包括佐劑如潤濕劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、調味劑及/或芳香劑。在用於腸胃外施用的某些實施例中，組成物與溶解劑如 CREMOPHOR®、醇、油、改性油、二醇類、聚山梨醋、環糊精、聚合物及/或其組合混合。

【0198】 可注射製劑，例如無菌可注射水性或油性混懸液可根據已知技術使用合適的分散劑、潤濕劑及/或懸浮劑配製。無菌可注射製劑可為非毒性腸胃外可接受的稀釋劑及/或溶劑中的無菌可注射溶液、混懸液及/或乳劑，如在 1,3-丁二醇中的溶液。可採用的可接受的媒介物和溶劑為水、林格氏液、U.S.P.和等滲氯化鈉溶液。無菌不揮發油常規用作溶劑或懸浮介

質。出於此目的可採用任何溫和的不揮發油，包括合成的甘油單酯或甘油二酯。脂肪酸如油酸可用於可注射劑的製備中。

【0199】 可注射製劑可例如通過濾過細菌滯留篩檢程式及/或通過在使用之前可溶解或分散於無菌水或其它無菌可注射介質中的無菌固體組成物中加入滅菌劑來滅菌。

【0200】 為了延長活性成分的作用，常常希望減緩對來自皮下注射或肌內注射的活性成分的吸收。這可通過使用水溶性差的結晶或非定形材料的液體混懸液來實現。藥物的吸收速率則取決於其溶解速率，而溶解速率又可取決於晶體大小和晶形。或者，通過將藥物溶解或懸浮於油媒介物中來完成腸胃外施用的藥物形式的延遲吸收。可注射貯庫形式通過在生物可降解聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成藥物的微膠囊基質來製得。取決於藥物與聚合物的比率和所採用的具體聚合物的性質，可控制藥物釋放的速率。其它生物可降解聚合物的實例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。貯庫可注射製劑通過將藥物包埋在與身體組織相容的脂質體或微乳劑中來製備。

【0201】 貯庫施用

【0202】 如本文中所述，在一些實施例中，組成物配製在用於延長釋放的貯庫中。通常，特定器官或組織（「標靶組織」）被靶向用於施用。

【0203】 在本發明的一些態樣中，多核苷酸在空間上保留於靶組織內或鄰近靶組織。提供了通過在使得組成物（具體為組成物的核酸組分）大致上保留在靶組織中，意味著至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99. 9%、99. 99%或大於 99. 99%的組成物保留在靶組織中的條件下使靶組織（其含有一個或多個靶細胞）與組成物接觸來向哺乳動物受試者的靶組織提供組成物的方法。有利地，通過測量存在於進入一個或多個靶細胞的組成物中的

核酸的量來確定保留。例如，在施用之後的一段時間裡，至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%或大於 99.99%的施用至受試者的核酸存在於細胞內。例如，使用含多核苷酸和轉染試劑的水性組成物進行向哺乳動物受試者肌內注射，並且通過測量存在於肌細胞中的核糖核酸的量來確定組成物的保留。

【0204】 本發明的態樣涉及通過在使得組成物大致上保留在靶組織中的條件下使靶組織(含有一個或多個靶細胞）與組成物接觸來向哺乳動物受試者的靶組織提供組成物的方法。組成物含有有效量的多核苷酸以使得目標多肽在至少一個靶細胞中產生。組成物通常含有細胞穿透劑，雖然也涵蓋「裸露的」核酸（如不具有細胞穿透劑或其它試劑的核酸），以及藥學上可接受的載劑。

【0205】 在一些情況下，由組織中的細胞產生的蛋白質的量按希望地增加。較佳地，蛋白質產生的這種增加在空間上局限於靶組織內的細胞。因此，提供了增加哺乳動物受試者的組織中目標蛋白質的產生的方法。提供含有多核苷酸的組成物，其特徵在於已確定單位量的組成物在包含於預先確定體積的靶組織內的很大百分比的細胞中產生目標多肽。

【0206】 在一些實施例中，組成物包括多種不同的多核苷酸，其中一種或多於一種多核苷酸係編碼目標多肽。可選擇地，組成物還含有細胞穿透劑以說明組成物的細胞內遞送。對包含在預先確定體積的靶組織內的很大百分比的細胞中產生目標多肽所需要的組成物的劑量進行確定（通常，在接近預先預定的體積或在靶組織遠端的組織中不誘導目標多肽的顯著產生）。在此確定之後，將確定的劑量直接引入到哺乳動物受試者的組織中。

【0207】 在一個實施例中，本發明提供待以多於一次注射或通過分次劑

量注射遞送的多核苷酸。

【0208】 在一個實施例中，本發明可使用小的一次性藥物儲器、貼片泵或滲透泵而保留在靶組織附近。貼片泵的非限制性實例包括由 BD® 公司(Franklin Lakes, N.J.)、Insulet 公司(Bedford, Mass.)、SteadyMed Therapeutics 公司(San Francisco, Calif.)、Medtronic 公司(Minneapolis, Minn.)(例如，MiniMed)、UniLife 公司(York, Pa.)、Valeritas 公司(Bridgewater, N.J.)及 SpringLeaf Therapeutics 公司(Boston, Mass.)製造及/或銷售的那些。滲透泵的一個非限制性實例包括由 DURECT®公司 (Cupertino, Calif.) 製造的那些(例如，DUROS®及 ALZET®)。

【0209】 給藥

【0210】 本發明係提供包括施用一包括有編碼多結構域治療性多肽的多核苷酸之基因治療載體的方法，且可選擇性地隨後將該多結構域治療性多肽施與一有需要的個體。於一些實施例中，方法係包括將一治療有效量之包括有編碼多結構域治療性多肽的多核苷酸之基因治療載體施與有需要之患者，其中該治療有效量係足以避免隨後施用該多結構域治療性多肽。因此，於一些實施例中，治療缺少酶之有需要的患者的方法，例如在患有龐貝氏症的患者中降低肝醣濃度及/或將 CRIM 還原成 GAA，係包括將一治療有效量之包含編碼多結構域治療性蛋白質（包括替代酶）之多核苷酸的基因治療載體施與該患者，該多結構域治療性蛋白質例如為抗 CD63 scFv::GAA 融合蛋白、例如為包含如 SEQ ID NO:11 所示序列之多結構域治療性蛋白質，其中該治療有效量否定了後續對該患者施與替代酶（例如，GAA 或其衍生物）的必要性。於一些實施例中，治療缺少酶且有需求的患者之方法，例如在患有龐貝氏症的患者中降低肝醣濃度及/或將 CRIM 還原成 GAA，係包括將一治療有效量之包含編碼多結構域治療性蛋白質（包

括替代酶）之多核苷酸的基因治療載體施與該患者，該多結構域治療性蛋白質例如為抗 CD63 scFv::GAA 融合蛋白、例如為包含如 SEQ ID NO:11 所示序列之多結構域治療性蛋白質，且進一步包括將一治療有效量之替代酶施與該患者。可使用有效用於預防、治療、診斷或成像出疾病、病症及/或病狀（例如，與工作記憶缺失相關的疾病、病症及/或病狀）之任何量及任何施用途徑對一個體施用核酸、蛋白質或複合物、或其藥物組成物、成像組成物、診斷組成物或預防組成物。所需要的精確量可取決於該個體的物種、年齡及一般狀況、疾病的嚴重性、特定組成物、其施用模式、其活性模式等在個體與個體之間有所不同。根據本發明之組成物一般配製成便於施用和劑量均勻的劑量單位形式。然而，應理解，本發明之組成物的總每日用量可由主治醫師在合理醫學判斷範圍內決定。任何特定患者的具體治療有效、預防有效或適合成像的劑量濃度將取決於各種因素，包含所治療的病症及病症的嚴重性；所採用的具體化合物活性；所採用的具體組成物；患者年齡、體重、一般健康狀況、性別和飲食；所採用的具體化合物的施用時間、施用途徑及排泄速率；治療持續時間；與所採用的具體化合物組合或同時使用的藥物；以及醫學領域中熟知的類似因素。

【0211】　以下實例係供以進一步說明本發明之方法。這些實例僅為說明性的且非意欲以任何形式限制本發明的範疇。

實例

實例 1：構築抗 hCD63 ScFv::GAA 多核苷酸及基因治療載體

【0212】　為表現人類 GAA（hGAA; SEQ ID NO: 1; 由 SEQ ID NO:12 所代表的核酸序列）或以其 C 端融合人類 GAA 之抗人類 CD63 單鏈可變片段(ScFv)（抗 hCD63 ScFv-hGAA; SEQ ID NO: 10; 由 SEQ ID NO:11 所代表

的核酸序列）而編碼的 AAV2/8 病毒係使用標準三重轉染操作程序來生成（Gray 等人, 2011; 亦參見"Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in vitro and in vivo administration", Current Protocols in Neuroscience, John Wiley & Sons, New York (1999), 頁數 4.17.1–4.17.25, 冊 1）。對於產生部分，將 1×10^7 HEK293 細胞平盤培養在 15 公分的培養盤上。第二天用以下各物轉染細胞：(A)包括有肝特異性 serpina1 增強子並編碼 TTR 驅動之人類 GAA 的 8 μg 對照 pAAV 載體(SEQ ID NO:9)，或包括有肝特異性 serpina 1 增強子(SEQ ID NO:9)並編碼 TTR 驅動之 hCD63 ScFv-hGAA 的試驗 pAAV（參見**圖 1B**）；以及(B)使用 PEIpro (Polyplus transfection 公司, New York, NY catalog# 115-100)介導的轉染（比例為 1:1 (1ul PEIpro : 1μg DNA)）之 pAAV RC2/8 驅動的載體(Gao, 2002)及 16 μg 的 pHelper (Agilent 公司, Cat #240074)。轉染 72 小時之後，收集細胞並用凍融方式溶解於一由 20mM Tris-HCl、1mM MgCl2、2.5mM KCl, 100mM NaCl 所組成的緩衝液中。接著，以最終濃度 0.5 U/μL 將核酸酶 benzonase (Sigma 公司, Cat# E1014-25KU)添加到樣本中，接著將其培養在 37°C 下 60 分鐘。接著使用碘克沙醇梯度超高速離心（如 Zolotukhin 等人, 1999, Gene Ther 1999;6:973–985 中所述）純化病毒並隨後用 qPCR 滴定分析。

【0213】 AAV 樣本係在 37°C 下用 DNaseI (Thermofisher Scientific 公司, Cat #EN0525)處理 1 小時，並使用 DNA extract All Reagents (Thermofisher Scientific 公司, Cat# 4403319)進行溶解。用殼體包裹的病毒基因體係使用 QuantStudio 3 即時 PCR 系統(Thermofisher Scientific 公司)及使用引導向 AAV2 ITR 之引子進行定量。AAV2 ITR 引子序列為 5′-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3′（正向 ITR; SEQ ID NO:3）及 5′-CGGCCTCAGTGAGCGA-3′ (反向 ITR; SEQ ID NO:4) (Aurnhammer 等人,

2012)，分別從 AAV (SEQ ID NO:6)推導左邊的內部逆向重複(ITR)序列且從 AAV (SEQ ID NO:7)推導右邊的內部逆向重複(ITR)序列。AAV2 ITR 探針序列為 5′-6-FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-TAMRA-3′ (SEQ ID NO:5) (Aurnhammer C., Haase M., Muether N.等人, 2012, Hum. Gene Ther. Methods 23, 18–28)。在 10 分鐘的 95°C 活化步驟後，進行兩步驟的 PCR 循環，以 95°C 15 秒及 60°C 30 秒進行 40 個循環。在 qPCR 中使用 TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermofisher Scientific 公司, Cat #4304437)。以 DNA 質體(Agilent 公司, Cat #240074)為標準度量來判定絕對效價。

【0214】 抗人類 CD63 抗體及其融合係使用 H5C6 小鼠抗人類 CD63 可變結構域（SEQ ID NO:10 的胺基酸 1-119 提供該 H5C6 抗體的重鏈可變結構域(V_H)的胺基酸序列，而 SEQ ID NO:10 的胺基酸 135-245 提供該 H5C6 抗體的輕鏈可變結構域(V_L)的胺基酸序列）。於此使用的抗 hCD63 ScFv (SEQ ID NO:2)係推導自 H5C6 殖株，其為小鼠抗 hCD63 單株 IgG1, κ 輕鏈抗體（H5C6 係由 August, J.T. / Hildreth, J.E.K.存放在愛荷華大學的發育研究融合瘤庫(DSHB 融合瘤產物 H5C6; DSHB Cat# h5c6, RRID:AB_528158)）。抗體的 ScFv 版本係用重鏈-輕鏈的順序之間有甘胺酸-絲胺酸連接子的可變結構域(5'-VH-Gly-Ser-VL-3')來選殖。

實例 2：注射 AAV 後在鼠類龐貝氏症模型中之肝醣含量

【0215】 為判定 AAV 遞送的抗 hCD63 ScFv-GAA 融合體與 AAV 遞送的 GAA 相比之效果，在相關的肝醣儲存活體內模型中，兩種療法都被送到龐貝氏症小鼠模型中，其中小鼠是以同型結合方式刪除小鼠 GAA 基因，且以同型結合方式表現人類 CD63 替代小鼠 CD63，並具有相同的品系背景(75% C57BL/6; 25% 129SvJ)。這些小鼠在本文中被稱為 CD63 HumIn GAA KO 小鼠或者是 CD63hu/hu; $GAA^{-/-}$小鼠。

【0216】 關於實驗部分，2 月齡 CD63 HumIn GAA KO 小鼠係經由尾靜脈注射，施與含有帶 TTR 肝特異性啟動子驅動的人類 GAA (AAV-hGAA; 於實例 1 中所述)或是帶有在 C 端與人類 GAA 融合之 TTR 肝特異性啟動子驅動的抗人類 CD63 ScFv (AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA; 於實例 1 中所述)之基因體的 AAV2/8 病毒。兩種 AAV2/8 病毒係以 1e10 vg/小鼠或 1e11 vg/小鼠兩種劑量中之一者遞送。於對照組中，未經治療的 CD63 HumIn GAA KO 小鼠及帶有完整的小鼠 GAA 基因之未經治療的 CD63 HumIn 小鼠係包含在測定之中。治療後將小鼠飼養 3 個月並在這段期間逐漸放血（每月），以用於 GAA 濃度及抗 GAA 抗體的血清量測。在 3 個月之後，所有的小鼠都被犧牲掉並獲取個別組織以用於肝醣的量測、PAS-H 染色、中心核的量化、溶酶體增生的量測及 LC3b 表現的量測。對於小鼠群組的實驗給藥與治療操作程序係顯示於表 4 中。

表 4：小鼠群組的實驗給藥與治療操作程序

群組	小鼠	小鼠數量	治療方式	劑量
1	CD63 HumIn GAA KO	4	無	N/A
2	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e10 vg/小鼠
3	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e11 vg/小鼠
4	CD63 HumIn GAA KO	5	AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA	1e10 vg/小鼠
5	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA	1e11 vg/小鼠
6	CD63 HumIn GAA WT	2	無	N/A

【0217】 結果係亦繪示在圖 2 中，其顯示抗 hCD63scFv::GAA 在骨骼肌中將肝醣降低至野生型程度，與單僅有 GAA 不同。以具有兩個結構域之抗 hCD63scFv::GAA 多結構域治療性蛋白質治療時，與單結構域的 GAA 替代酶相比下，會導致儲存的肝醣降低更多。藉由針對個別小鼠的三個月 GAA 或 scfv-GAA 的總血清表現量繪製四頭肌的肝醣程度（圖 3）或心臟

的肝醣程度（圖 4），觀察到抗 hCD63scFv::GAA 融合蛋白會比單僅有 GAA 酶去除掉更多的肝醣，即使在相似的血清濃度下（圖 3 及圖 4）。

實例 3：對 GAA 的免疫反應

【0218】 為測量抗人類 GAA 抗體血清濃度，取自所有治療組的血清係於末端採血期間按照製造商的說明書使用血清分離管(BD Biosciences 公司, Cat#365967)所收集的血液分離出。分別在 96 孔的高蛋白結合培養盤(ThermoFisher 公司, Cat#15041)塗覆 20 μg 之用 PBS 稀釋的 hGAA (R&D Systems 公司, Cat#8329-GH-025)置放過夜。用 PBS + 0.05% Tween (PBS-T) 洗滌培養盤 3 次。用 0.5% BSA 之 PBS-T 溶液對培養盤進行阻斷，並添加連續稀釋之範圍在 1:300 至 1:5.1e7 的小鼠血清到培養盤中過夜。使用 HRP 共軛的山羊抗小鼠 IgG 抗體(Jackson Immuno Research 公司, Cat# 115-035-164)及 BD Opt EIA 受質套組對全部的抗小鼠 IgG (亞類 1 + 2a + 2b + 3)進行測量。呈色反應係使用 1 N 磷酸終止。接著在 Spectramax i3 平盤讀取器(Molecular Devices 公司)上讀取 450 nm 的吸光值。稀釋曲線係符合反曲型曲線，且由該等曲線計算效價。效價係以表 5 中所示的平均總 IgG 效價+/- SD 來表現。

【0219】 如表 5 中所示，未接受治療的小鼠顯示出平均濃度為 1.1E+03 之平均背景效價。以低劑量病毒(1e10 vg/小鼠)之 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 或 AAV-hGAA 治療的小鼠係展現出高效價，而在以高劑量病毒(1e11 vg/小鼠)治療之小鼠中的效價較低。以 1e11 vg 的 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 治療的小鼠血清中有最高濃度的 GAA，其效價係落入未經治療之小鼠的範圍內。

表 5：血清抗 GAA 抗體濃度

	總 IgG 抗-GAA 效價				
	CD63 HumIn GAA	CD63	CD63	CD63 HumIn	CD63 HumIn

	KO + 未治療	HumIn GAA KO + AAV-hGAA (1e10 vg)	HumIn GAA KO + AAV-hGAA (1e11 vg)	GAA KO + AAV- 抗 - hCD63 ScFv-hGAA (1e10 vg)	GAA KO + AAV- 抗 - hCD63 ScFv-hGAA (1e11 vg)
平均值	1.1E+03	7.6E+06	2.4E+04	5.5E+04	4.0E+03
SD	1.3E+03	1.0E+07	2.5E+04	1.9E+04	4.9E+03

【0220】 於施與 AAV 之後的較高濃度 GAA 或抗 hCD63scFv::GAA 係與較低的抗 GAA 效價一致。經以高效價或低效價之 AAV-抗-hCD63scFv::GAA 或 AAV-GA 所治療的 GAA 缺失小鼠的血清係經評估其在注射後 3 個月的過程中之抗 GAA 抗體。**圖 5** 係描繪個別小鼠中之血清抗 GAA 抗體效價相對於 GAA 暴露量（即經過 3 個月的 GAA 或 scfc-GAA 之後的總血清表現）之點陣圖，其展現出在抗體效價與 GAA 的血清暴露量之間有負相關性，且展現出具有高 GAA 暴露量的小鼠可耐受 GAA。同樣地，**圖 6** 繪製了用編碼 GAA 或抗 hCD63scFv::GAA 蛋白之 AAV 感染的不同群組中的抗 GAA 抗體效價，展現出較高劑量的構築體會導致較低效價的抗 GAA。

實例 4：血清 GAA

【0221】 為測量在實驗過程期間的人類 GAA 血清濃度，在每月的時間點經由尾部採血方式採集樣本。血清係從按照製造商的說明書使用血清分離管(BD Biosciences 公司, Cat#365967)所收集的血液分離出。接著將 1μL 的分離血清裝填到 4-20% Novex wedgewell 預製凝膠上，以電壓 220V 運行 45 分鐘並使用標準程序以 200mA 移轉到硝化纖維素膜運行 1 小時。接著以 12 mL 之稀釋度為 1:2000 的抗 GAA 初級抗體(Abcam 公司, #ab137068)及稀釋度為 1:1000 的抗 GAPDH 抗體(Abcam 公司, #AB9484)，對該硝化纖維素膜用探針探測，並培養在 4°C 下過夜。在初級抗體培養後，該膜係以 1 x TBST 洗滌 3 次每次 5 分鐘。接著將以 12 mL 之稀釋度為 1:15000 的抗

兔子 IgG (LiCor 公司, 926-32211)與抗小鼠 IgG (LiCor 公司, 925-68070) (LiCor 公司, Lincoln, NE)二級抗體添加至膜上並在室溫下培養 1 小時。在二級抗體培養後，該膜係以 1 x TBST 洗滌 2 次每次 5 分鐘並用 1 x TBS 洗滌 1 次 5 分鐘。接著使用 LiCor Odyssey 儀器(LI-COR Biotechnology 公司)對該膜進行成像及量化。血清 GAA 濃度係以表 6 中所示之任意單位的平均值+/-標準差(SD)來表現。

【0222】 如表 6 中所示，用高劑量(10^{11} vg/小鼠)的 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 或 AAV-hGAA 治療的 CD63 HumIn GAA KO 小鼠展現出在實驗過程中血清有持續不變的 GAA 濃度，且在經 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 治療之小鼠中的 GAA 血清濃度係比經 AAV-hGAA 治療之小鼠中的稍微較高。在以低劑量(10^{10} vg/小鼠)的 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 或 AAV-hGAA 治療之小鼠中，GAA 的濃度在實驗過程中下降，在 12 週的時間點前，一些小鼠中的程度可忽略不計。

表 6：血清 GAA 濃度

	AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA (10^{10}vg)		**AAV-hGAA (10^{10}vg)**		**AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA (10^{11}vg)**		**AAV-hGAA (10^{11}vg)**	
週數	**平均值**	**SD**	**平均值**	**SD**	**平均值**	**SD**	**平均值**	**SD**
1	0.21	0.17	0.04	0.03	2.36	1.78	0.77	0.53
2	0.19	0.16	0.07	0.07	2.02	1.18	1.15	0.56
4	0.17	0.15	0.01	0.02	2.80	1.16	1.22	0.75
8	0.29	0.33	0.03	0.05	2.58	1.18	0.62	0.60
12	0.12	0.19	0.00	0.01	2.61	1.53	0.77	0.86
曲線下的面積	2.27	2.23	0.27	0.36	28.13	13.73	9.80	7.22

【0223】 在接受高劑量 AAV (10^{11} vg/小鼠)之小鼠中隨著時間係維持表現 GAA 或抗-hCD63scfv::GAA，但在接受較低劑量(10^{10} vg/小鼠)的小鼠中是跌落的。圖 7A 係描繪一繪製 GAA 血清濃度之曲線圖，其係由西方墨點

法探測用編碼 GAA 或融合 GAA 之抗 hCD63 scfv 的 AAV 感染之不同群組隨著時間之 GAA 血清濃度。該融合蛋白(scFv::GAA)係比不具有遞送結構域之 GAA 酶展現出持續較高的血清 GAA 濃度（例如，2.5 至 3 倍）（圖 7A）。

【0224】 在注射 3 個月後於肝臟、心臟及四頭肌溶胞產物中的表現的即時 PCR 量化分析係顯示於圖 7B 中。所有 AAV 構築體的注射均偵測其在肝的表現，而 AAV-hGAA 及 AAV-抗-hCD63::hGAA (皆由肝特異性啟動子 LSP 驅動)則偵測最高濃度的 1e11 vg/小鼠注射。亦做出血清 GAA 濃度與 GAA 的 RNA 表現量之比較（圖 7C），結果顯示出接受編碼該融合蛋白的 AAV 之小鼠於 3 個月後在肝臟中呈現出較低的 GAA RNA 表現，然而在該特定小鼠中有高 GAA 血清濃度。AAV-LSP-hGAA 的注射於肝臟中的 RNA 量低的時候並未呈現高 GAA 血清濃度。參見圖 7C。此數據暗示了編碼該融合蛋白的 AAV（且其表現係由肝特異性啟動子驅動）可獲得改善的 GAA 分泌曲線。

【0225】 也觀察到在 Huh-7 肝細胞中的抗體::hGAA 與單獨 hGAA 的細胞內分泌比例較高。在一實驗中，Huh-7 人類肝細胞係以肝特異性啟動子驅動之編碼 hGAA、抗-hCD63 scFv::GAA 融合體、或非結合性 scFv::GAA 融合對照組的構築體進行短暫轉染。於轉染 3 天之後，兩種 scFv::GAA 融合構築體在分泌的上清液中係皆比單僅以 hGAA 轉染的有較高的蛋白質比例（統計上的顯著性為 $p< 0.05$, $n=3$）。在實驗期間添加 M6P 到上清液內來緩和 CI-MPR 介導的攝入時，並未影響到所述比例。

實例 5：組織的肝醣量測及肌肉組織的組織學特徵

【0226】 **組織的肝醣量測**：為測量個別組織中的肝醣含量，在 CO_2 窒息後立即從所有群組的小鼠中解剖出心臟、四頭肌、腓腸肌、橫隔膜、比目

魚肌及 EDL 組織，接著在液態氮中快速冷凍，並儲存在-80°C 下。將約 50 mg 的每種組織在台式均質機上用不銹鋼珠在蒸餾水中以 1 mg 對至 25 µL 水之比例溶解以用於肝醣測量。將肝醣分析溶解產物在 105°C 下加熱 15 分鐘，並以 21000 x g 離心以清除殘渣。根據製造商的螢光測定法說明書，使用肝醣測定套組(Sigma-Aldrich 公司, #MAK016)進行肝醣測量。在螢光平盤讀數器(Molecular Devices 公司, Spectramax i3)上在 535 nm 激發及 587 nm 發光下測量每個樣品的螢光。使用製造商提供的下列公式計算肝醣的計算量。接著將每個治療組中每個組織的肝醣計算量取平均值，並在表 7 中表示成平均值+/-標準差(SD)。

【0227】 如表 7 中所示，與 GAA WT 小鼠相比，喪失 *Gaa* 會導致所測量的所有組織中的平均肝醣濃度大幅增加。在所有經測試的組織中使用 10^{11} vg/小鼠之 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 的治療係將肝醣降低至 WT-或接近-WT 程度，不同於使用 AAV-GAA 的治療僅部分地降低所儲存的肝醣量。低劑量的任一種病毒也會降低肝醣，但只到高劑量的較低程度。10^{10} vg/小鼠的 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 劑量係以與 10^{11} vg/小鼠的 AAV-GAA 劑量相似的方式降低肝醣濃度。

表 7：在心臟、四頭肌、、腓腸肌、橫隔膜、比目魚肌及 EDL 中所測得之平均值+/-標準差肝醣濃度

	無治療		AAV-hGAA (10^{10} vg)		AAV-hGAA (10^{11} vg)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
心臟	27.798	3.013	17.246	4.375	1.770	2.279
四頭肌	14.650	1.783	11.012	0.528	5.878	3.504
腓腸肌	14.295	0.480	10.990	0.868	6.073	3.080
橫隔膜	15.463	1.173	11.446	1.237	3.995	3.395
比目魚肌	17.260	2.262	13.684	2.506	6.533	5.201
EDL	13.588	0.498	11.178	1.760	6.275	3.159
	AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA		AAV-抗-hCD63 ScFv-		CD63 HumIn GAA WT 小鼠	

	(10^{10} vg)		hGAA (10^{11} vg)		(對照組)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
心臟	2.190	2.678	0.058	0.010	0.085	0.007
四頭肌	4.485	3.147	0.798	0.251	0.440	0.042
腓腸肌	5.198	2.516	0.825	0.461	0.790	0.014
橫隔膜	3.083	2.968	0.388	0.121	0.385	0.007
比目魚肌	5.268	2.786	1.040	0.896	0.545	0.049
EDL	2.495	1.750	0.313	0.099	0.260	0.141

【0228】 **四頭肌採集物的組織病理學及量化**：除了低劑量(1e10 vg/小鼠)治療組外，來自各群組小鼠的四頭肌組織樣本係在解剖後立即快速冷凍於液態氮中並儲存在-80°C 下以供量化 LC3b 的表現或置於含有 O.C.T 培養基的塊體(Tissue-Tek 公司, #4583)上。

【0229】 O.C.T 培養基中的組織樣本係送至 Histoserv 公司(Germantown, MD)進行切片及過點酸希夫(PAS)染色以偵測多醣體。製備另外的切片並送回以供中心核及溶酶體增生的染色。

【0230】 **PAS 染色**：PAS 染色切片係使用 Leica 切片掃描器以 20x 放大倍數成像。取自每個治療組的代表性小鼠之所得影像係顯示於圖 8 中。

【0231】 如圖 8 中所示，與未治療的 CD63 HumIn GAA KO 小鼠及用 AAV-hGAA 治療的 CD63 HumIn GAA KO 小鼠相比，用 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 治療的 CD63 HumIn GAA KO 小鼠在 3 個月時的染色中展現出明顯的減少。這進一步表明用 AAV-anti-hCD63 ScFv-hGAA 治療可降低 CD63 HumIn GAA KO 小鼠中的多醣堆積，且可以以一樣方式在肌肉纖維上進行。

【0232】 **中心核及溶酶體的增生之量化**：將來自 Histoserv 公司的未染色切片移出冰箱並接著在染色室中用 4%三聚甲醛之 PBS 溶液固化 15 分鐘。接著在 PBS 中洗滌固化的切片兩次每次 5 分鐘，隨後用阻斷緩衝液(eBiosciences 公司, 00-4953-54)在室溫下培養 1 小時。接著於加濕染色室中

用在阻斷緩衝液中以 1:50 稀釋的大鼠抗 Lamp-1 抗體(Abcam, #AB25245)、在阻斷緩衝液中以 1:1000 稀釋的兔子抗 Laminin 抗體(Sigma, #L9393)、或未添加抗體之阻斷緩衝液將切片染色，並接著移轉到 4℃ 過夜培養。第二天接著在 PBS 中將切片洗滌兩次每次 5 分鐘，隨後在染色室中用與 Alexa Fluor 647 (Life Tech Thermo 公司, #A27040)共軛的山羊抗兔子 IgG (H+L)超選殖二級抗體、或與 Alexa Fluor 555 (Life Tech Thermo 公司, #A21434)共軛的山羊抗大鼠 IgG (H+L)交叉吸附型二級抗體染色，接著使其在室溫下培養 1 小時。接著在用具有 DAPI 的 Fluoromount-G (Life Tech Thermo 公司, #00-4959-52)包埋及在 Zeiss LSM710 儀器(Carl Zeiss Microscopy 有限責任公司)上成像之前，在 PBS 中將染色切片洗滌兩次每次 5 分鐘。使用 Halo 軟體(Indica Labs 公司, NM)定量集中後的核的數量，並以纖維的百分比來表示而顯示出中心核+/-標準差，如表 8 所示。溶酶體的增生係如圖 8 所繪示。

表 8：中心核的量化

	無治療		AAV-hGAA (1e11vg)		AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA (1e11 vg)		CD63 HumIn GAA WT 小鼠(對照組)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
具有中心核的纖維%	22.00	10.10	33.00	4.36	12.75	6.29	8.50	7.78

【0233】 **LC3b 表現的量化**：關於 LC3b 表現的量化，將快速冷凍的樣本解凍、均質化、並接著在 1 mg 組織對 25 µL RIPA 緩衝液比例(150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5%脫氧膽酸鈉, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, Sigma Aldrich 公司, R0278)的 RIPA 緩衝液中藉由珠粒衝擊(MP Biomedical 公司) 45 秒而溶解。溶解產物係藉由在 21,000 x 下離心而除去不溶物質，接著將在 RIPA 緩衝液中的 300 µg 溶解產物裝填到 4-20%

Novex wedgewell 預製凝膠上，移轉到硝酸纖維素膜上，並使用與前述關於血清 GAA 濃度的分析相似的操作程序藉由西方墨點法進行分析，代替辨識小鼠 LC3b-I 及 LC3b-II (Sigma 公司, #L7543)之初級抗體的使用而取代針對 GAA 的初級抗體。接著使用 LiCor Odyssey 儀器(LI-COR Biotechnology 公司)對該膜進行成像及量化。所表現的 LC3b-I 及 LC3b-II 濃度係以表 9 中所示之任意單位的(平均值+/-標準差)來表現。

【0234】 如表 9 中所示，在與 CD63 HumIn GAA WT 小鼠相比時，在缺少 GAA 的小鼠中之平均 LC3b-I 及 LC3b-II 濃度皆有顯著的增加。使用 AAV-anti-hCD63 ScFv-hGAA 的治療會減少 CD63 HumIn GAA KO 小鼠中的平均 LC3b-I 及 LC3b-II 濃度至野生型或接近野生型的程度。與 CD63 HumIn GAA KO 小鼠相比時，以 AAV-hGAA 治療會將 CD63 HumIn GAA KO 小鼠中之平均 LC3b-I 及 LC3b-II 濃度稍微減少，但減少的並不像用 AAV-抗-hCD63 ScFv-hGAA 治療那樣明顯。

表 9：小鼠四頭肌中的 LC3b-I 及 LC3b-II 濃度

LC3b-I 濃度(任意單位)				
治療方式	未治療	AAV-hGAA	AAV- 抗 -hCD63 ScFv-hGAA	CD63 HumIn GAA WT (對照組)
平均值	833	628	403	282
SD	109	139	33	49
LC3b-II 濃度(任意單位)				
治療方式	未治療	AAV-hGAA	AAV- 抗 -hCD63 ScFv-hGAA	CD63 HumIn GAA WT (對照組)
平均值	3308	2888	445	369
SD	582	1282	398	33

實例 6：在肌肉強度及協調性的測試中 AAV 抗-hCD63::GAA 的治療導致顯著的增加

【0235】 以 AAV-LSP hGAA 或 AAV-LSP 抗-hCD63::hGAA 治療（參見上文）之小鼠的抓緊強度及 Rotarod 測試表現。野生型 GAA 小鼠、未經治

療的對照組、AAV-LSP-hGAA (1e11 vg/小鼠)或 AAV-LSP-抗-hCD63::hGAA 治療(1e11 vg/小鼠)之加速轉棒儀的測量（圖 9A）及前肢抓緊強度的測量（圖 9B）係以每月一次的間隔進行 6 個月。誤差槓為+/- SD。所有群組的 N=8-10。

實例 7：其他膜蛋白做為將 GAA 導引向組織的「導引物」

【0236】 已測試其他膜蛋白（諸如抗 ITGA7 (整聯蛋白 α-7)融合蛋白）來將 GAA 導引向組織以在缺乏酶的小鼠中取代 GAA。於存在有 5mM M6P 或沒有的情況下，C2C12 小鼠肌原細胞係與抗 mCD63-GAA 或抗 ITGA7-GAA 過夜培養。這兩種融合蛋白隨著時間皆在肌原細胞溶解產物中偵測到具活性的 GAA 酶（圖 10A）。於進一步的實驗中，已對 CD63 (GAA-/-;CD63hu/hu)人源化的 GAA KO 小鼠係藉由流體動力傳遞方式(HDD)給予其編碼 scFv::GAA 形式之抗 hCD63::GAA 的質體或編碼全長 IgG4::GAA 形式之抗整聯蛋白 α-7 的質體，小鼠係於 HDD 後的 3 週犧牲。在心臟、四頭肌、腓腸肌及橫隔膜中測量組織肝醣濃度。未經治療的對照組小鼠 $GAA^{-/-}$xCD63hu/hu，及未經治療的野生型 GAA 對照組小鼠 GAA+/+;CD63hu/hu (4)，也在相同條件下進行試驗。在抗 hCD63::GAA 治療的小鼠及抗 ITGA7::GAA 治療的小鼠群組中，肝醣濃度皆在非常低的程度，如在野生型小鼠中般。**參見圖 10B**。

實例 8：在相當的血清濃度下，AAV 抗 CD63::GAA 的治療係比帶有最佳化 GAA 構築體之 AAV 更為有效

【0237】 以含有肝特異性增強子(serpina 1; SEQ ID NO:9)及驅動抗 hCD63::GAA 多結構域治療性(SEQ ID NO:10)的表現之肝特異性啟動子(LSP; TTR; SEQ ID NO:8)（其使用胰凝乳蛋白酶原 B2 訊息肽(SP7)並含有人類 GAA (Δ8GAA; SEQ ID NO:78)胺基酸 36-952）的 AAV 所感染的

CD63 HumIn GAA KO 小鼠($GAA^{-/-}$ x $CD63^{hu/hu}$)，在肌肉強度及協調性的試驗中係展現出顯著的增加。每種病毒係給予三個不同劑量：5e11 vg/kg、2e12 vg/kg 及 4e12 vg/kg。血清係通過頜下腺採血定期收集。AAV 感染一個月後將小鼠犧牲。收集心臟和骨骼肌組織樣本並快速冷凍在液態氮中並保持在-80°C 下儲存。組織中的肝醣係藉由在蒸餾水中通過珠粒衝擊以使組織均質化而測量。將樣本煮沸並離心，並將上清液使用於市售肝醣測定套組中。如先前的實例中所述，使用西方墨點法以抗人類 GAA 的抗體來定量血清。對於每隻小鼠，在 1 個月時將每種組織中肝醣濃度相對於構築體的血清濃度作圖。使用 4-參數曲線擬合來判定每種組織中兩種治療的 EC50。

【0238】 以含有編碼抗 hCD63::GAA 或 sp7-Δ8GAA 之肝特異性啟動子(LSP)的 AAV 的感染，可在每個感染劑量下提供相當的 GAA 血清濃度。**圖 11**。然而，當使用抗 hCD63::GAA 與 sp7-Δ8GAA 時，在每一個經測定的肌肉組織中，觀察到 EC50 降低約 2.2 倍，展現出在相等的血清濃度下，與不與抗體融合之經修飾的 GAA 表現構築體相比，抗 CD63::GAA 更有效地去除了肝醣。**參見圖 12** 及**表 10**。

表 10：於心臟、橫隔膜、四頭肌及三頭肌中 AAV 抗-hCD63::GAA 及 AAV sp7-Δ8GAA 的 EC_{50} (95%信賴區間)

組織	**構築體**	**肝醣除去率的 EC_{50}** (任意單位)	**EC_{50} 的 95%信賴區間**
心臟	sp7-Δ8GAA	0.038	0.00036 – 0.064
	抗-hCD63::GAA	0.017	0.0061 – 0.029
橫隔膜	sp7-Δ8GAA	0.135	較寬
	抗-hCD63::GAA	0.057	0.034 – 0.080
四頭肌	sp7-Δ8GAA	0.187	0.14-0.31
	抗-hCD63::GAA	0.080	較寬
三頭肌	sp7-Δ8GAA	0.19	0.13 - 0.41
	抗-hCD63::GAA	0.083	0.069 to 0.11

實例 9：例示性 CD63 抗體

【0239】 *抗人類 CD63 抗體的生成*

【0240】 抗人類 CD63 抗體係藉由用人類 CD63 對小鼠（例如，包含編碼人類免疫球蛋白重鏈及 κ 輕鏈可變區之 DNA 的經工程改造的小鼠）進行免疫接種而獲得。

【0241】 免疫接種後，從各小鼠獲取脾細胞，且(1)與小鼠骨髓瘤細胞融合以維持其存活力並形成融合瘤細胞且針對人類 CD63 特異性進行篩選，或者(2)使用任一人類 CD63 片段做為結合及辨識反應抗體（抗原陽性 B 細胞）之分選試劑，進行 B 細胞分選（如 US 2007/0280945A1 中所描述）。

【0242】 對於人類 CD63 之嵌合抗體係使用如美國專利第 7,105,348、8,642,835 及 9,622,459 號所述之 VELOCIMMUNE 技術，一開始分離出具有人類可變區及小鼠恆定區，該等專利案之每一者係以引用方式併入本文中。

【0243】 於一些抗體中，為試驗目的係將小鼠恆定區用一所要的人類恆定區取代，例如野生型人類 CH 或經修飾的人類 CH（例如，IgG1、IgG2 或 IgG4 同型），以及輕鏈恆定區(CL)，以產生完全人類抗 hCD63 抗體，包含一包含抗 hCD63 抗體或其抗原結合部分之完全人類雙特異性抗體。 雖然所選擇之恆定區可根據特定用途改變，但高親和性抗原結合及靶向特異性特徵存在於可變區中。

【0244】 根據此實例之方法產生之包括有抗人類 CD63 結合臂的例示性雙特異性抗體的某些生物特性係詳細描述於以下陳述之實例中。

【0245】 *抗 CD63 抗體的重鏈及輕鏈可變域的胺基酸及核酸序列*

【0246】 表 11 係陳述一核酸(NA)序列編碼的序列識別碼，在括號中為重鏈或輕鏈可變區(分別為 HCVR 或 LCVR)的胺基酸(AA)序列識別碼，或

所選定之用以產生本文中揭露之多結構域治療性抗 CD63::GAA 蛋白之抗 CD63 抗體的重鏈 CDR 或輕鏈 CDR (分別為 HCDR 或 LCDR) 的胺基酸(AA)序列識別碼。

表 11：抗 CD63 序列識別碼

	SEQ ID NOs:							
抗體名稱	HCVR NA (AA)	HCDR1 NA (AA)	HCDR2 NA (AA)	HCDR3 NA (AA)	LCVR NA (AA)	LCDR1 NA (AA)	LCDR2 NA (AA)	LCDR3 NA (AA)
H1M12451N	13 (14)	15 (16)	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)
H2M12395N	29 (30)	31 (32)	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)
H4H12450N	45 (46)	47 (48)	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)
H2M12450N	61 (62)	63 (64)	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	74 (76)

【0247】 *親本抗人類 CD63 抗體的結合*

【0248】 抗 CD63 抗體對人類 CD63 表現細胞之相關表面結合係經由流動式細胞測量術使用會內源性地表現人類 CD63 之 CD63 陽性 HEK293 (ATCC 公司, Cat # CRL-1573)及 CD63 陰性 HEK293/CD63 剔除細胞來評估。於測定時，係於 96 孔 V 底型培養盤(Axygen Scientific 公司, Cat# P-96-450-V-C-S)中將細胞係培養在不具有鈣與鎂、含有 2% FBS (Saradigm 公司, Cat# 1500-500) (染色緩衝液)的 PBS (VWR 公司, Cat# 45000-446)中。細胞接著與濃度範圍為 100 nM 至 1.7 pM 之抗 CD63 抗體或同型對照抗體於冰上一起培養 30 分鐘。未含有抗體的孔係用作為對照組。只對有抗體最高濃度(100 nM)的 HEK293/CD63KO 細胞進行染色。接著用染色緩衝液洗滌細胞一次，並與 100 nM 之 PE 共軛的抗小鼠 Fc 二級抗體(Jackson ImmunoResearch 公司, Cat# 115-115-164)在 4°C 下一起培養 30 分鐘。接著洗滌細胞並使用稀釋於 PBS 中的 50% Cytofix 溶液(BD Biosciences, Cat# 554655)固定。使樣本在 Intellicyte Hypercyt 流式細胞儀上運行，並在

ForeCyt 軟體(Intellicyte 公司)中分析結果，以計算平均螢光強度(MFI)。使用四參數邏輯方程式於 12 點反應曲線中使用 GraphPad Prism 分析所測得的數值，並報告所得的 EC_{50} 數值（表 12）。信號雜訊比(S/N)係藉由計算抗 CD63 抗體或對照組抗體 MFI 相對於未含有抗體的孔之比率而判定（表 12）。

【0249】 如表 12 中所示，本發明的三個抗 CD63 抗體展現出其結合到 HEK293 細胞時的 S/N 數值範圍 21.0 至 31.6，而 EC_{50} 數值範圍為 0.5 nM 至 1.9 nM。未結合的對照組並未展現其與 HEK293 細胞結合(S/N ≤ 1.5)。抗 CD63 抗體及其同型對照抗體皆展現弱到很少結合 HEK293/CD63KO 細胞(S/N ≤ 4.4)。

表 12：由流式細胞儀所測得之抗 CD63 抗體與 HEK293 和 HEK293/CD63 KO 細胞的結合結果

抗體	HEK293 EC_{50} (nM)	HEK293 (S/N)	HEK293/CD63 KO (S/N)
H2M12450N	0.5	26.7	2.9
H1M12451N	1.8	31.6	4.1
H2M12395N	1.9	21.0	2.9
同型對照組 1	ND	1.4	4.4
同型對照組 2	ND	1.5	1.6

ND =未判定

【0250】 本發明之抗 CD63 單株抗體之與表現人類 CD63 的細胞之結合能力係亦使用基於電致化學發光(ECL)的檢測試驗法來判定。

【0251】 為產生過度表現的細胞，小鼠胚胎纖維母細胞 NIH3T3 細胞(ATCC, Cat# CRL-1658)係經轉染以形成會穩定表現人類 CD63（hCD63; 登錄號 NP_001771 的胺基酸 M1-M238; SEQ ID NO:77）的細胞株「NIH3T3/hCD63」。使用 Quantum™ Alexa Fluor® 647 MESF (Bangs Laboratories 公司, Cat# 647B)及 Simply Cellular® anti-小鼠 IgG (Bangs

Laboratories Inc 公司, Cat# 815)而按照製造商的說明書分析內源性表現細胞（人類雄激素敏感型前列腺腺癌細胞株 LNCAP (ATCC, Cat# CRL-1740)），及人類原發性神經膠質母細胞瘤細胞株（U87MG (ATCC, Cat# HTB-14)）中的人類 CD63 表現程度。LNCAP 細胞被判定出其人類 CD63 複本數係比 U87MG 細胞低。由螢光活化細胞分選(FACS)未發現可偵測到的人類 CD63 表現之非轉染的 NIH3T3 細胞係亦包含在內做為陰性對照組。

【0252】 簡言之，以不含有 Ca^{2+}/Mg^{2+}的 PBS 緩衝液將細胞株淋洗一次並在 37°C 下與不含酶的細胞解離溶液(Millipore 公司, Cat# S-004-C)一起培養 10 分鐘以使細胞脫離。接著以含有 Ca^{2+}/Mg^{2+}的 PBS 將細胞株洗滌一次並用 Cellometer™ Auto T4 細胞計數器(Nexcelom Bioscience 公司, LLC)計數。將約 $2.0x10^4$個 NIH3T3/hCD63、LNCAP、U87MG 或 NIH3T3 細胞分別種在 96 孔碳電極盤(Meso Scale Discovery 公司, Cat# L15XB-6)上，並接著在 37°C 下培養 1 小時。在室溫(RT)下用溶於含有 Ca^{2+}/Mg^{2+}的 PBS 中之 2% BSA (w/v)阻斷非特異性結合位置 1 小時。接著將在含有 Ca^{2+}/Mg^{2+}的 0.5% BSA (w/v) PBS 溶液中之一濃度範圍(1.7pM 至 100nM)的含有抗 CD63 抗體或同型對照抗體的溶液，以及單獨的對照緩衝液，以二重複添加到結合於培養盤上的 NIH3T3/hCD63、LNCAP、U87MG 或 NIH3T3 細胞中並在室溫下培養 1 小時。隨後使用具有細胞洗滌頭的 AquaMax2000 培養盤洗滌器(MDS Analytical Technologies 公司)使用洗滌該等培養盤以移除未結合的抗體。以 1μg/mL 之對 Fcγ片段具特異性的 SULFO-TAG™ 共軛山羊多株抗人類 IgG 抗體(Jackson Immunoresearch 公司, Cat# 109-005-098)或對 Fcγ片段具特異性的 SULFO-TAG™ 共軛山羊多株抗小鼠 IgG 抗體(Jackson Immunoresearch 公司, Cat# 115-005-164)在室溫下培養 1 小時以偵測結合於培養盤上的抗體。將培養盤洗滌並按照製造商的說明書與 Read 緩衝液

(MSD 公司, Cat# R92TD-2)一起培養。使用 SECTOR 成像儀(MSD 公司)測量螢光訊號。記錄以相對光單位(RLU)所測得的螢光強度而表明各抗體在所測試濃度範圍下的結合強度。以 3.7 nM 抗體結合到表現人類 CD63 的細胞所偵測到的訊號與以相同濃度的抗體結合到陰性細胞所偵測到的訊號相比下之比率係報告做為 CD63 結合特異性的指標。結合比率大於 3 的抗體係被分類為具特異性的結合物，而結合比率小於或等於 3 的抗體係被分類為非結合物並在表 13 中標示成 NB。此外，直接結合訊號（以 RLU 為單位）係使用 GraphPad Prism™軟體以抗體濃度的函數來分析，且數據符合反曲型（四參數邏輯）劑量反應模型。結合到表現人類 CD63 的細胞之 EC_{50} 數值的定義為偵測到最大結合訊號的 50%之抗體濃度，其係判定來表明各抗體的效價並只將具特異性的結合物報告在表 13 中。

【0253】 如表 13 中所示，四個所產生的抗 CD63 抗體係已在實例 9 中描述，且有一個比較抗體（比較物 1）特異性地結合到經工程改造 NIH3T3/hCD63 細胞上所表現的人類 CD63 以及 LNCAP 與 U87MG 細胞株上內源性表現的人類 CD63。實例 9 中所述的四個抗 CD63 抗體結合 NIH3T3/hCD63 細胞之 EC_{50} 值的範圍為 280 pM 至 970 pM，而其在陰性細胞株上的結合比率範圍為 91 至 281 倍。本發明的這四個抗 CD63 抗體結合 U87MG 細胞之 EC_{50} 值的範圍為 500 pM 至 1.4 nM，而其在陰性細胞株上的結合比率範圍為 52 至 272 倍。如實例 9 中描述而產生的四個抗 CD63 抗體結合 LNCAP 細胞之 EC_{50} 值的範圍為 210 pM 至 1.7 nM，而其在陰性細胞株上的結合比率範圍為 7 至 20 倍。與 U87MG 細胞相比，在 LNCAP 細胞上的較低結合比率係與在這些細胞上的較低 CD63 複本數結果一致。同型對照抗體如所期望的為非結合物，其細胞結合比率係小於或等於 3。

表 13：以基於電致化學發光的檢測測量結合到表現人類 CD63 的細胞之抗 CD63 抗體

抗體	細胞結合效價, EC_{50} (M)			在 3.7 nM 抗體濃度下相對於陰性 NIH3T3 之對人類 CD63 細胞的直接結合訊號比率		
	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP
H1M12451N	5.7E-10	9.5E-10	1.7E-09	91	52	7
H2M12395N	2.9E-10	7.9E-10	3.5E-10	256	171	18
H4H12450N	9.7E-10	1.4E-09	1.4E-09	281	272	20
H2M12450N	2.8E-10	5.0E-10	2.1E-10	230	175	20
對照組						
比較物 Ab 1	5.7E-10	6.7E-10	2.0E-09	253	271	16
人類 IgG4 同型對照組	NB	NB	NB	1	1	1
小鼠 IgG2 同型對照組	NB	NB	NB	3	2	2

NB – 非結合物，結合比率小於或等於 3 之抗體係被分類為非結合物。

【0254】 *由親本抗人類 CD63 抗體所介導的細胞毒性*

【0255】 為評估本文中所述抗 CD63 抗體內化於表現 CD63 的細胞中之能力，進行活體外的間接細胞毒性測定。將人類 CD63 陽性 T47D 細胞 (ATCC 公司, Cat #HTB-133)及人類 CD63 陰性 NIH3T3 細胞(ATCC 公司, Cat #CRL-1658)分別種在塗覆有 PDL 的 96 孔培養盤(BD Biocoat 公司, Cat #356461)，每孔種 6,000 個細胞於 RPMI 中 (Irvine Scientific, Cat #9160)，或是每孔種 2,000 個細胞於高葡萄糖 DME 中(Irvine Scientific 公司, Cat #9033)，並且在 37°C 下以 5% CO_2 的條件過夜生長；其中所述 RPMI 含有 10% FBS (ATCC 公司, Cat# 30-2020)、盤尼西林/鏈黴素/L-麩胺酸 (Gibco 公司, Cat #10378-016)、50 uM β-巰乙醇(Sigma 公司, Cat #M7522) (生長培養基)、丙酮酸鈉 100 mM (Millipore 公司, Cat #TMS-005-C)、HEPES 1M (Irvine Scientific 公司, Cat #9319)及牛胰島素 10 ug/mL (Gemini BioProducts

公司, Cat #700-912P)，而所述 DME 含有 10%小牛血清(Hyclone 公司, Cat #SH30072.03)，並添加有盤尼西林/鏈黴素/L-麩胺酸(Gibco 公司, Cat #10378-016)）。對於細胞存活曲線，將細胞與連續稀釋的抗 CD63 抗體(H2M12450N)或濃度範圍為 3.0 pM 至 2.2 nM 之非結合性同型對照抗體一起在 37°C 下培養 5 分鐘。接著將 20 nM 之共軛到細胞毒性藥物 MMAF (Moradec, Cat #AM-201AF-50)的 Fab 抗 mFc 二級抗體添加到每一孔中。將培養基單獨做為陰性對造組，且使用 33 μM 的毛地黃皂苷(Promega 公司, Cat #G9441)來判定最大的細胞毒性。培養 72 小時之後，使用 Cell 計數套組 8 (Dojindo 公司, Cat #CK04)按照製造商的操作程序以 1 至 3 小時的培養時間來測量細胞存活率。在 Envision 平盤讀取儀(PerkinElmer 公司)上測量 450 nm 的吸光度(OD_{450})。從所有孔中減去經毛地黃皂苷處理的細胞之背景 OD_{450} 量，並將存活率以未經處理對照組的百分比來表示（%存活率）。由四參數邏輯方程式於 8 點反應曲線(GraphPad Prism)來判定 IC_{50} 數值。所有的 IC_{50} 數值係以 nM 濃度來表示，並報告了於處理後剩餘的最低存活細胞百分比。

【0256】 如表 14 中所匯整，該抗 CD63 抗體 H2M12450N 係將 T47D 的存活率降低到 21%，其 IC_{50} 數值為 0.24 nM，其中該同型對照組將存活率降低至僅 64%。該等抗體對於 NIH3T3 細胞株存活率的衝擊性很低甚至沒有。

表 14：在 T47D 及 NIH3T3 細胞中由間接細胞毒性測定法所測量之抗 CD63 抗體內化情形

抗體	**T47D (nM) IC_{50}**	**T47D 存活率 %**	**NIH3T3 (nM) IC_{50}**	**NIH3T3 存活率%**
H2M12450N	0.24	21	ND	83
同型對照組	ND	64	ND	91

ND =未判定

【0257】 *結合到 CD63 (EC2)環化試劑之抗 CD63 單株抗體於 25℃ 及 37℃ 下測量之 Biacore 結合動力學*

【0258】 不同 CD63 環化試劑結合到純化抗-CD63 單株抗體之平衡解離常數(K_D)係使用基於即時表面電漿子共振的 Biacore T200 生物感測器或 Biacore 2000 生物感測器來判定。所有的結合研究係在 25°C 及 37°C 下於含有 10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA 及 0.05% v/v 界面活性劑 Tween-20 之 pH 7.4 (HBS-ET)的運行緩衝液中進行。Biacore CM5 感測晶片表面係先以偶聯兔子抗小鼠 Fc 特異性多株抗體(GE Healthcare 公司, Cat# BR100838)或抗人類 Fab 套組(GE Healthcare 公司, Cat# 28958325)的胺類衍生化，以捕捉抗 CD63 單株抗體。結合研究是在表現有 C 端 Myc-Myc-六組胺酸的重組人類 CD63 細胞外環 2 (hCD63 EC loop 2-MMH; SEQ ID NO:80)上進行，或在表現有 C 端人類 Fc 標籤的重組人類 CD63 細胞外環 2 (hCD63 EC loop 2-hFc; SEQ ID NO:81)上進行。不同濃度的 hCD63 EC loop 2-MMH 或 hCD63 EC loop 2-hFc（在 50nM – 12.5nM 下以 4 倍稀釋率或在 90nM-0.37 nM 下以 3 倍連續稀釋率試驗）係先製備於 HBS-ET 運行緩衝液中，並以 35 μL/分鐘或 50 μL/分鐘的流速注射於捕捉抗小鼠 Fc 的抗 CD63 單株抗體表現上 4 分鐘，同時在 HBS-ET 運行緩衝液中監測結合單株抗體的 CD63 試劑 8 或 10 分鐘。締合速率(k_a)及解離速率(k_d)係藉由使用 Scrubber 2.0c 曲線擬合軟體將即時結合感測圖以質量運輸限制與 1：1 結合模型擬合來判定。結合解離平衡常數(K_D)及解離半衰期($t_{1/2}$)由動力學速率計算為：

$$K_D\ (M) = \frac{kd}{ka}, \quad 及 \quad t_{1/2}\ (分) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

【0259】 在 25°C 和 37°C 下就人類 CD63 EC 外環 2 蛋白，與不同的本發明抗 CD63 單株抗體結合之結合動力學參數係如表 15 至 18 所示。

【0260】 如表 15 所示，在 25°C 下，本發明全部的抗 CD63 單株抗體係以 530 pM 至 11.0 nM 之 K_D 值範圍與 hCD63 EC loop 2-MMH 結合。如表 16 所示，在 37°C 下，本發明全部的抗 CD63 單株抗體係以 1.15 nM 至 56.4 nM 之 K_D 值範圍與 hCD63 EC loop 2-MMH 結合。

【0261】 如表 17 所示，在 25°C 下，本發明全部的抗 CD63 單株抗體係以 150 pM 至 753 pM 之 K_D 值範圍與 hCD63 EC loop 2-hFc 結合。 如表 18 所示，在 37°C 下，本發明全部的抗 CD63 單株抗體係以 119 pM 至 3.38 nM 之 K_D 值範圍與 hCD63 EC loop 2-hFc 結合。

表 15：在 25°C 下人類 CD63 EC loop2-MMH 結合抗 CD63 單株抗體之結合動力學參數

抗體	mAb 捕捉程度 (RU)	50nM 或 90 nM Ag 結合 (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (分)
H2M12450N	592	65	2.27E+05	2.79E-04	1.23E-09	41
H2M12395N	472	42	1.66E+05	1.82E-03	1.10E-08	6
H1M12451N	525	52	8.59E+04	4.30E-04	5.00E-09	27
H4H12450N	296	24	1.39E+05	7.37E-05	5.30E-10	156.7

表 16：在 37°C 下人類 CD63 EC loop2-MMH 結合抗 CD63 單株抗體之結合動力學參數

抗體	mAb 捕捉程度 (RU)	50nM Ag 結合(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (分)
H2M12450N	617	58	1.75E+05	2.01E-04	1.15E-09	57
H2M12395N	535	31	1.65E+05	9.32E-03	5.64E-08	1
H1M12451N	597	44	8.89E+04	1.90E-03	2.14E-08	6

表 17：在 25°C 下人類 CD63 EC loop2-hFC 結合抗 CD63 單株抗體之結合動力學參數

抗體	mAb 捕捉程度 (RU)	50nM Ag 結合 (RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (分)
H2M12450N	592	134	3.20E+05	4.66E-05	1.50E-10	248
H2M12395N	472	117	6.77E+05	5.10E-04	7.53E-10	23
H1M12451N	525	107	1.19E+05	8.40E-05	7.04E-10	138

表 18：在 37°C 下人類 CD63 EC loop2-hFC 結合抗 CD63 單株抗體之結合動力學參數

抗體	mAb 捕捉程度 (RU)	50nM Ag 結合(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (分)
H2M12450N	617	138	4.11E+05	4.89E-05	1.19E-10	236
H2M12395N	535	123	5.29E+05	1.79E-03	3.38E-09	6
H1M12451N	597	118	6.51E+05	3.31E-04	5.09E-10	35

【0262】 *產生雙特異性抗體以判定具有抗 CD63 結合臂之雙特異性複合體的內化情形*

【0263】 為評估此實例中所描述產生的抗 CD63 抗體內化為雙特異性抗原結合分子的一部分之能力，該等抗體係重新構築為雙特異性形式，其中一結合臂為抗 CD63 抗體的 VH/VL 對（參見表 11 的親本抗體）且另一臂為不相關的結合臂。使用標準的雙特異性抗體製做方法，例示性的方法係描述於(例如)美國申請公開第 2010/0331527 號及美國專利第 5731168 號，其每一者係以引用方式併入本文中。使用表現人類 CD63 的細胞來測試該等雙特異性抗體的內化能力。在該測定中，內源性表現人類 CD63 的 HEK293 細胞係於塗覆有多-D-離胺酸的透明底 96 孔培養盤(Greiner 公司, Cat# 655946)中，以每孔 10,000 個細胞的密度培養在含有 10% FBS 及盤尼西林/鏈黴素/L-麩胺酸(Gibco, Cat# 10378016)的 DMEM 內。兩天後，用含有以 2 倍連續稀釋（從 10 μg/mL 開始至 0.157 μg/mL）的抗 CD63 雙特異性抗體及陰性對照抗體之新鮮培養液，以及單僅有對照組之培養液，來替

換原培養液。接著在 37°C 下培養細胞 3 小時以允許可進行抗體的內化。於培養之後，細胞係以 PBS 洗滌，在室溫下於 4%三聚甲醛(Thermo Scientific 公司, Cat# 28908)中固定 20 分鐘，隨後在室溫下用在 5%正常山羊血清(NGS) (Gibco 公司, Cat# PCN5000)中的 0.2% Triton X-100 (Spectrum Chemical 公司, Cat# TR135)滲透化 20 分鐘。接著在室溫下與在 5% NGS 中之 2 μg/mL 的驢抗小鼠 IgG Alexa Fluor-647 Fab (Manufacture 公司, Cat#115-606-006)或 2 μg/mL 的山羊抗人類 IgG Alexa Fluor-647 Fab (Jackson ImmunoResearch 公司, Cat#115-606-006)一起培養 1 小時。移除二級抗體溶液，接著用 PBS 洗滌細胞，並隨後添加含有 2 滴/mL 的 NucBlue (Invitrogen 公司, CAT# R37605)的新鮮 PBS 以對活細胞核染色。在 ImageXpress High-Content Imaging System (Molecular Devices 公司)上以 40 倍對抗體內化及細胞核成像，並使用 MetaXpress Software Transfluor Application Module (Molecular Devices)量化抗體的內化。抗體的內化係以每個細胞之凹陷整體強度±標準差(SD)報告。

【0264】 如表 15 中所示，合併有一個結合人類 CD63 的單臂(衍生自 H1M12451、H2M12450 或 H2M12395)及一個不相關的非結合性臂之雙特異性抗體皆可展現出有效內化到 HEK293 細胞內。而併入 mAb12450 的一個結合臂之雙特異性抗體係比其它已測試的雙特異性抗體展現出更高的內化量。

表 15：HEK293 細胞內化的抗 CD63 雙特異性抗體

	抗體的內化(凹陷整體強度) ± SD			
抗體濃度 (μg/mL)	**H2M12395N 雙特異性**	**H2M12450N 雙特異性**	**H1M12451N 雙特異性**	**陰性對照組 Ab**
10	1.05E+06 ± 4.56E+05	4.34E+06 ± 8.77E+05	8.26E+05 ± 2.67E+05	4.58E+03 ± 6.50E+03
5	1.07E+06 ± 4.06E+05	4.31E+06 ± 5.48E+05	5.45E+05 ± 5.20E+04	1.23E+03 ± 8.85E+02

2.5	2.73E+05 6.01E+04	±	3.92E+06 5.80E+05	±	3.27E+05 1.06E+05	±	7.70E+02 6.09E+02	±
1.25	1.89E+05 6.61E+04	±	2.72E+06 2.63E+05	±	1.20E+05 3.91E+04	±	1.43E+03 1.19E+03	±
0.625	2.03E+05 9.37E+04	±	1.75E+06 1.39E+05	±	7.87E+04 1.07E+04	±	3.37E+03 5.22E+03	±
0.3125	3.95E+04 8.23E+03	±	8.57E+05 1.60E+05	±	3.77E+04 1.22E+04	±	1.99E+03 2.19E+03	±
0.15625	2.81E+04 1.30E+04	±	2.42E+05 2.54E+04	±	7.23E+03 6.09E+03	±	1.87E+03 1.16E+03	±
0	3.72E+03 1.66E+03	±	8.21E+03 3.47E+03	±	1.66E+04 1.80E+04	±	1.10E+03 1.56E+03	±

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> 美商再生元醫藥公司(REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 用於使酶內化之組成物及方法

<130> 009108.361TW1/10361TW01

<150> US 62/673,098
<151> 2018-05-17

<150> US 62/574,719
<151> 2017-10-19

<150> US 62/516,656
<151> 2017-06-07

<160> 81

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 952
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu

20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile

325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400

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

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro

625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly

930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
130 135 140

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu
180 185 190

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
195 200 205

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 3
ggaaccccta gtgatggagt t 21

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 4
cggcctcagt gagcga 16

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 5

cactccctct ctgcgcgctc g 21

<210> 6
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 6
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc t 141

<210> 7
<211> 141
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 7
aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag ctgcctgcag g 141

<210> 8
<211> 224
<212> DNA

<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 8
gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaaggtt 60

catatttgtg taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120

ggtttggagt cagcttggca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ctga 224

<210> 9
<211> 72
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 9
gggggaggct gctggtgaat attaaccaag gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg 60

ggctaagtcc ac 72

<210> 10
<211> 1133
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 10

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
130 135 140

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser

145 150 155 160

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu
180 185 190

Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
195 200 205

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Ala His Pro Gly Arg Pro
245 250 255

Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp
260 265 270

Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly
275 280 285

Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly
290 295 300

Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu
305 310 315 320

Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr
325 330 335

Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val
340 345 350

Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala
355 360 365

Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg
370 375 380

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

Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr
405 410 415

Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser
420 425 430

Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu
435 440 445

Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu

450 455 460

Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu
465 470 475 480

Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser
485 490 495

Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg
500 505 510

Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro
515 520 525

Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met
530 535 540

Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser
545 550 555 560

Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His
565 570 575

Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg
580 585 590

Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met
595 600 605

Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp
610 615 620

Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp
625 630 635 640

Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro
645 650 655

Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr
660 665 670

Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His
675 680 685

Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser
690 695 700

Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu
705 710 715 720

Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala
725 730 735

Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu
740 745 750

His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu

755 760 765

Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe
770 775 780

Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser
785 790 795 800

Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn
805 810 815

Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly
820 825 830

Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe
835 840 845

Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu
850 855 860

Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu
865 870 875 880

Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln
885 890 895

Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe
900 905 910

Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly
915 920 925

Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val
930 935 940

Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro
945 950 955 960

Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu
965 970 975

Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu
980 985 990

Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln
995 1000 1005

Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala
1010 1015 1020

Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu
1025 1030 1035

Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
1040 1045 1050

Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn

1055 1060 1065

Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln
1070 1075 1080

Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
1085 1090 1095

Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr
1100 1105 1110

Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe
1115 1120 1125

Leu Val Ser Trp Cys
1130

<210> 11
<211> 3489
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的

<400> 11
atgcacagac ctagacgtcg tggaactcgt ccacctccac tggcactgct cgctgctctc 60

ctcctggctg cacgtggtgc tgatgcagaa gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta 120

gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac 180

tattacatgt cttgggttcg ccagactcca gagaagaggc tggagtgggt cgcatatatt 240

agtagtagtg gtggtagcac ctattattca gacactgtaa agggccaatt caccatctcc 300

agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca 360

gccatgtatt actgtgcaag acgagaagat tacgacggaa gacttactta ctggggccaa 420

gggactctgg tcaccatctc tgcaggagga agtggtggag gcgggtcagg aggtggcggg 480

agcggcggtg acattgtgct gacacagtct cctgcttcct tagctgtatc tctggggcag 540

agggccacca tctcctgcag ggccagcaaa agtgtcagta catctggtta tagttatatg 600

aactggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaagtcc tcatctatct tgcatccaaa 660

ctagaatctg gggtccctgc caggttcagt ggcagtgggt cagggacaga cttcaccctc 720

aacatccatc ctgtggagga ggaggatgct gcaacctatt actgtcagca cagtagggag 780

cttccgtaca cgttcggagg ggggaccaaa ctggaaataa aaggtggtgg cggttcagca 840

caccccggcc gtcccagagc agtgcccaca cagtgcgacg tccccccaa cagccgcttc 900

gattgcgccc ctgacaaggc catcacccag gaacagtgcg aggcccgcgg ctgttgctac 960

atccctgcaa agcaggggct gcagggagcc cagatggggc agccctggtg cttcttccca 1020

cccagctacc ccagctacaa gctggagaac ctgagctcct ctgaaatggg ctacacggcc 1080

accctgaccc gtaccacccc caccttcttc cccaaggaca tcctgaccct gcggctggac 1140

gtgatgatgg agactgagaa ccgcctccac ttcacgatca aagatccagc taacaggcgc 1200

tacgaggtgc ccttggagac cccgcatgtc cacagccggg caccgtcccc actctacagc 1260

gtggagttct ccgaggagcc cttcggggtg atcgtgcgcc ggcagctgga cggccgcgtg 1320

ctgctgaaca cgacggtggc gcccctgttc tttgcggacc agttccttca gctgtccacc 1380

tcgctgccct cgcagtatat cacaggcctc gccgagcacc tcagtcccct gatgctcagc 1440

accagctgga ccaggatcac cctgtggaac cgggaccttg cgcccacgcc cggtgcgaac 1500

ctctacgggt ctcacccttt ctacctggcg ctggaggacg gcgggtcggc acacggggtg 1560

ttcctgctaa acagcaatgc catggatgtg gtcctgcagc cgagccctgc ccttagctgg 1620

aggtcgacag gtgggatcct ggatgtctac atcttcctgg gcccagagcc caagagcgtg 1680

gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac ccgttcatgc cgccatactg gggcctgggc 1740

ttccacctgt gccgctgggg ctactcctcc accgctatca cccgccaggt ggtggagaac 1800

atgaccaggg cccacttccc cctggacgtc cagtggaacg acctggacta catggactcc 1860

cggagggact tcacgttcaa caaggatggc ttccgggact tcccggccat ggtgcaggag 1920

ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg atcgtggatc ctgccatcag cagctcgggc 1980

cctgccggga gctacaggcc ctacgacgag ggtctgcgga ggggggtttt catcaccaac 2040

gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta tggcccgggt ccactgcctt ccccgacttc 2100

accaacccca cagccctggc ctggtgggag gacatggtgg ctgagttcca tgaccaggtg 2160

cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac gagccttcca acttcatcag gggctctgag 2220

gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac ccaccctacg tgcctggggt ggttgggggg 2280

accctccagg cggccaccat ctgtgcctcc agccaccagt ttctctccac acactacaac 2340

ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc atcgcctccc acagggcgct ggtgaaggct 2400

cgggggacac gcccatttgt gatctcccgc tcgacctttg ctggccacgg ccgatacgcc 2460

ggccactgga cgggggacgt gtggagctcc tgggagcagc tcgcctcctc cgtgccagaa 2520

atcctgcagt ttaacctgct gggggtgcct ctggtcgggg ccgacgtctg cggcttcctg 2580

ggcaacacct cagaggagct gtgtgtgcgc tggacccagc tgggggcctt ctaccccttc 2640

atgcggaacc acaacagcct gctcagtctg ccccaggagc cgtacagctt cagcgagccg 2700

gcccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc ctgcgctacg cactcctccc ccacctctac 2760

acactgttcc accaggccca cgtcgcgggg gagaccgtgg cccggcccct cttcctggag 2820

ttccccaagg actctagcac ctggactgtg gaccaccagc tcctgtgggg ggaggccctg 2880

ctcatcaccc cagtgctcca ggccgggaag gccgaagtga ctggctactt cccccttgggc 2940

acatggtacg acctgcagac ggtgccagta gaggcccttg gcagcctccc acccccacct 3000

gcagctcccc gtgagccagc catccacagc gaggggcagt gggtgacgct gccggccccc 3060

ctggacacca tcaacgtcca cctccgggct gggtacatca tccccctgca gggccctggc 3120

ctcacaacca cagagtcccg ccagcagccc atggccctgg ctgtggccct gaccaagggt 3180

ggggaggccc gaggggagct gttctgggac gatggagaga gcctggaagt gctggagcga 3240

ggggcctaca cacaggtcat cttcctggcc aggaataaca cgatcgtgaa tgagctggta 3300

cgtgtgacca gtgagggagc tggcctgcag ctgcagaagg tgactgtcct gggcgtggcc 3360

acggcgcccc agcaggtcct ctccaacggt gtccctgtct ccaacttcac ctacagcccc 3420

gacaccaagg tcctggacat ctgtgtctcg ctgttgatgg gagagcagtt tctcgtcagc 3480

tggtgttag 3489

<210> 12

<211> 2859
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12

atgggagtga ggcacccgcc ctgctcccac cggctcctgg ccgtctgcgc cctcgtgtcc 60

ttggcaaccg ctgcactcct ggggcacatc ctactccatg atttcctgct ggttccccga 120

gagctgagtg gctcctcccc agtcctggag gagactcacc cagctcacca gcagggagcc 180

agcagaccag ggccccggga tgcccaggca cacccccggcc gtcccagagc agtgcccaca 240

cagtgcgacg tccccccccaa cagccgcttc gattgcgccc ctgacaaggc catcacccag 300

gaacagtgcg aggcccgcgg ctgttgctac atccctgcaa agcaggggct gcagggagcc 360

cagatggggc agccctggtg cttcttccca cccagctacc ccagctacaa gctggagaac 420

ctgagctcct ctgaaatggg ctacacggcc accctgaccc gtaccacccc caccttcttc 480

cccaaggaca tcctgaccct gcggctggac gtgatgatgg agactgagaa ccgcctccac 540

ttcacgatca aagatccagc taacaggcgc tacgaggtgc ccttggagac cccgcatgtc 600

cacagccggg caccgtcccc actctacagc gtggagttct ccgaggagcc cttcggggtg 660

atcgtgcgcc ggcagctgga cggccgcgtg ctgctgaaca cgacggtggc gcccctgttc 720

tttgcggacc agttccttca gctgtccacc tcgctgccct cgcagtatat cacaggcctc 780

gccgagcacc tcagtccccct gatgctcagc accagctgga ccaggatcac cctgtggaac 840

cgggaccttg cgcccacgcc cggtgcgaac ctctacgggt ctcacccttt ctacctggcg 900

ctggaggacg gcgggtcggc acacggggtg ttcctgctaa acagcaatgc catggatgtg 960

gtcctgcagc cgagccctgc ccttagctgg aggtcgacag gtgggatcct ggatgtctac 1020

atcttcctgg gcccagagcc caagagcgtg gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac 1080

ccgttcatgc cgccatactg gggcctgggc ttccacctgt gccgctgggg ctactcctcc 1140

accgctatca cccgccaggt ggtggagaac atgaccaggg cccacttccc cctggacgtc 1200

cagtggaacg acctggacta catggactcc cggagggact tcacgttcaa caaggatggc 1260

ttccgggact tcccggccat ggtgcaggag ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg 1320

atcgtggatc ctgccatcag cagctcgggc cctgccggga gctacaggcc ctacgacgag 1380

ggtctgcgga ggggggtttt catcaccaac gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta 1440

tggcccgggt ccactgcctt ccccgacttc accaacccca cagccctggc ctggtgggag 1500

gacatggtgg ctgagttcca tgaccaggtg cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac 1560

gagccttcca acttcatcag gggctctgag gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac 1620

ccaccctacg tgcctggggt ggttgggggg accctccagg cggccaccat ctgtgcctcc 1680

agccaccagt ttctctccac acactacaac ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc 1740

atcgcctccc acagggcgct ggtgaaggct cgggggacac gcccatttgt gatctcccgc 1800

tcgacctttg ctggccacgg ccgatacgcc ggccactgga cgggggacgt gtggagctcc 1860

tgggagcagc tcgcctcctc cgtgccagaa atcctgcagt ttaacctgct gggggtgcct 1920

ctggtcgggg ccgacgtctg cggcttcctg ggcaacacct cagaggagct gtgtgtgcgc 1980

tggacccagc tgggggcctt ctacccctte atgcggaacc acaacagcct gctcagtctg 2040

ccccaggagc cgtacagctt cagcgagccg gcccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc 2100

ctgcgctacg cactcctccc ccacctctac acactgttcc accaggccca cgtcgcgggg 2160

gagaccgtgg cccggcccct cttcctggag ttccccaagg actctagcac ctggactgtg 2220

gaccaccagc tcctgtgggg ggaggccctg ctcatcaccc cagtgctcca ggccgggaag 2280

gccgaagtga ctggctactt ccccttgggc acatggtacg acctgcagac ggtgccagta 2340

gaggcccttg gcagcctccc acccccacct gcagctcccc gtgagccagc catccacagc 2400

gaggggcagt gggtgacgct gccggccccc ctggacacca tcaacgtcca cctccgggct 2460

gggtacatca tccccctgca gggccctggc ctcacaacca cagagtcccg ccagcagccc 2520

atggccctgg ctgtggccct gaccaagggt ggggaggccc gaggggagct gttctgggac 2580

gatggagaga gcctggaagt gctggagcga ggggcctaca cacaggtcat cttcctggcc 2640

aggaataaca cgatcgtgaa tgagctggta cgtgtgacca gtgagggagc tggcctgcag 2700

ctgcagaagg tgactgtcct gggcgtggcc acggcgcccc agcaggtcct ctccaacggt 2760

gtccctgtct ccaacttcac ctacagcccc gacaccaagg tcctggacat ctgtgtctcg 2820

ctgttgatgg gagagcagtt tctcgtcagc tggtgttag 2859

<210> 13
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
caggtgcagc tgcaggagtc gggccccgga ctgatgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccttcagc agttactatt ggaactggat ccggcagtcc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atccgttata gtggggacac caactacaag 180

ccctccctca agagtcgatt caccatatca attgacacgt ccaagaacct tttctccctg 240

aggctgaaat ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gatgggactg 300

gggagtgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Met Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Leu Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Lys Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Met Gly Leu Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 15
ggtggctcct tcagcagtta ctat 24

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 17
atccgttata gtggggacac c 21

<210> 18

<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Ile Arg Tyr Ser Gly Asp Thr
1 5

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> 智人

<400> 19
gcgaggatgg gactggggag tgatgctttt gatatc 36

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Ala Arg Met Gly Leu Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 21
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 21
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac aacaattatt tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtattca acagggccac taacatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Val Phe Asn Arg Ala Thr Asn Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 23
cagagtgtta acaacaatta t 21

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Gln Ser Val Asn Asn Asn Tyr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> DNA
<213> 智人

<400> 25
ggtgtattc 9

<210> 26

<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Gly Val Phe
1

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
cagcagtatg gtagttcacc ttggacg 27

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 29
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcattg tctctggtgg ctccatcagt aatttctact ggaactggat ccggcagtcc 120

ccagggaagg gactggaatg gattggatat ttcttttaca ctgggactat cgactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca ctggacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aacctgcgtc ttctgaccgc cgcagacgcg gccgtttatt attgtgcgag gatggggctg 300

ggggctaatg cttttgacat ctggggccac gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Phe Phe Tyr Thr Gly Thr Ile Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ala Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Met Gly Leu Gly Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly His Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 31
ggtggctcca tcagtaattt ctac 24

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Gly Gly Ser Ile Ser Asn Phe Tyr
1 5

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 33

ttcttttaca ctgggactat c 21

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Phe Phe Tyr Thr Gly Thr Ile
1 5

<210> 35
<211> 36
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35
gcgaggatgg ggctgggggc taatgctttt gacatc 36

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Ala Arg Met Gly Leu Gly Ala Asn Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 37
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctcctggaga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gcatgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtggatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgcagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta actcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat gaaa 324

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln His Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Ala Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Met Lys
100 105

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39
cagcatgtta gcagcaacta c 21

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Gln His Val Ser Ser Asn Tyr
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41

ggtggatcc 9

<210> 42
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Gly Gly Ser
1

<210> 43
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人

<400> 43
cagcagtatg gtaactcacc ttggacg 27

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 45
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 45
caggtgcaac tacaggagtc gggcccaaag gtggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggaattggat ccgccagtcc 120

ccagggaagg gactggagtg gattggatat accaaaagag ggtataccga ctacaacccc 180

tccctcagga gtcgcgtcac tatatcagaa gacacgtcca agaaccagtt ctccctgagg 240

atcagctctg tgaccgccgc agacacggcc gtatattact gtgcacaaat ggggtgggga 300

tcccatgctt ttgacatgtg gggccaaggg acaatggtcg ccgtctcttc a 351

<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Lys Val Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
85 90 95

Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Ala Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 47
ggtggctcca tcagtagtta ctac 24

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 49
<211> 18

<212> DNA
<213> 智人

<400> 49
accaaaagag ggtatacc 18

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Thr Lys Arg Gly Tyr Thr
1 5

<210> 51
<211> 36
<212> DNA
<213> 智人

<400> 51
gcacaaatgg ggtggggatc ccatgctttt gacatg 36

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Ala Gln Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met
1 5 10

<210> 53
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 53
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 54
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 55
cagagtgtta gcagcagcta c 21

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 57
<211> 9

<212> DNA
<213> 智人

<400> 57
ggtgcatcc 9

<210> 58
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Gly Ala Ser
1

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人

<400> 59
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg 27

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 61
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 61
caggtgcaac tacaggagtc gggcccaaag gtggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggaattggat ccgccagtcc 120

ccagggaagg gactggagtg gattggatat accaaaagag ggtataccga ctacaacccc 180

tccctcagga gtcgcgtcac tatatcagaa gacacgtcca agaaccagtt ctccctgagg 240

atcagctctg tgaccgccgc agacacggcc gtatattact gtgcacaaat ggggtgggga 300

tcccatgctt ttgacatgtg gggccaaggg acaatggtcg ccgtctcttc a 351

<210> 62
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Lys Val Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
85 90 95

Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Ala Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 63
ggtggctcca tcagtagtta ctac 24

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 65
<211> 18
<212> DNA
<213> 智人

<400> 65
accaaaagag ggtatacc 18

<210> 66
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66

Thr Lys Arg Gly Tyr Thr
1 5

<210> 67
<211> 36
<212> DNA
<213> 智人

<400> 67
gcacaaatgg ggtggggatc ccatgctttt gacatg 36

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

Ala Gln Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met
1 5 10

<210> 69
<211> 324
<212> DNA
<213> 智人

<400> 69
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttaat agtaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggtgca gtggcagtgg gtccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300

caggggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 70
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Cys Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 71
cagagtgtta atagtaggta c 21

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Gln Ser Val Asn Ser Arg Tyr
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> DNA
<213> 智人

<400> 73
ggtgcatcc 9

<210> 74
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

Gly Ala Ser
1

<210> 75
<211> 27
<212> DNA
<213> 智人

<400> 75
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg 27

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 77
<211> 238
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77

Met Ala Val Glu Gly Gly Met Lys Cys Val Lys Phe Leu Leu Tyr Val
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Phe Cys Ala Cys Ala Val Gly Leu Ile Ala Val Gly
20 25 30

Val Gly Ala Gln Leu Val Leu Ser Gln Thr Ile Ile Gln Gly Ala Thr
35 40 45

Pro Gly Ser Leu Leu Pro Val Val Ile Ile Ala Val Gly Val Phe Leu
50 55 60

Phe Leu Val Ala Phe Val Gly Cys Cys Gly Ala Cys Lys Glu Asn Tyr
65 70 75 80

Cys Leu Met Ile Thr Phe Ala Ile Phe Leu Ser Leu Ile Met Leu Val
85 90 95

Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly Tyr Val Phe Arg Asp Lys Val Met
100 105 110

Ser Glu Phe Asn Asn Asn Phe Arg Gln Gln Met Glu Asn Tyr Pro Lys
115 120 125

Asn Asn His Thr Ala Ser Ile Leu Asp Arg Met Gln Ala Asp Phe Lys
130 135 140

Cys Cys Gly Ala Ala Asn Tyr Thr Asp Trp Glu Lys Ile Pro Ser Met
145 150 155 160

Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile Asn Val Thr Val Gly
165 170 175

Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His Lys Glu Gly Cys Val
180 185 190

Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val Leu Val Val Ala Ala
195 200 205

Ala Ala Leu Gly Ile Ala Phe Val Glu Val Leu Gly Ile Val Phe Ala
210 215 220

Cys Cys Leu Val Lys Ser Ile Arg Ser Gly Tyr Glu Val Met
225 230 235

<210> 78
<211> 917
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu
1 5 10 15

Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp
20 25 30

Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp
35 40 45

Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr
50 55 60

Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln
65 70 75 80

Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro
85 90 95

Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly
100 105 110

Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp
115 120 125

Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu
130 135 140

His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu
145 150 155 160

Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val
165 170 175

Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp
180 185 190

Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp
195 200 205

Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly
210 215 220

Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg
225 230 235 240

Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu
245 250 255

Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala
260 265 270

His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln
275 280 285

Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val
290 295 300

Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu
305 310 315 320

Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe
325 330 335

His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val
340 345 350

Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn
355 360 365

Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp
370 375 380

Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly
385 390 395 400

Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro
405 410 415

Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe
420 425 430

Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly
435 440 445

Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp
450 455 460

Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met
465 470 475 480

Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp
485 490 495

Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val
500 505 510

Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln
515 520 525

Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu
530 535 540

Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro
545 550 555 560

Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly
565 570 575

His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser
580 585 590

Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly
595 600 605

Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val
610 615 620

Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn
625 630 635 640

Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala
645 650 655

Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro
660 665 670

His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val
675 680 685

Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr
690 695 700

Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val
705 710 715 720

Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr
725 730 735

Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro
740 745 750

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln
755 760 765

Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg
770 775 780

Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu
785 790 795 800

Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly
805 810 815

Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val
820 825 830

Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn
835 840 845

Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu
850 855 860

Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln
865 870 875 880

Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp
885 890 895

Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe
900 905 910

Leu Val Ser Trp Cys
915

<210> 79
<211> 1128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> scFv_H4H123450(VH-連接子-VL)_連接子_GAA

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Lys Val Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
85 90 95

Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Ala Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
180 185 190

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
210 215 220

Gly Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
245 250 255

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
260 265 270

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
275 280 285

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
290 295 300

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
305 310 315 320

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
325 330 335

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
340 345 350

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
355 360 365

Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
370 375 380

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
385 390 395 400

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
405 410 415

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
420 425 430

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
435 440 445

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
450 455 460

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
465 470 475 480

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
485 490 495

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
500 505 510

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
515 520 525

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
530 535 540

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
545 550 555 560

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
565 570 575

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
580 585 590

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
595 600 605

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
610 615 620

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
625 630 635 640

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
645 650 655

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
660 665 670

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
675 680 685

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
690 695 700

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
705 710 715 720

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
725 730 735

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
740 745 750

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
755 760 765

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
770 775 780

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
805 810 815

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
820 825 830

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
835 840 845

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
850 855 860

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
865 870 875 880

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
885 890 895

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
900 905 910

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
915 920 925

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
930 935 940

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly
945 950 955 960

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
965 970 975

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
980 985 990

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
995 1000 1005

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu
1010 1015 1020

Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly
1025 1030 1035

Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile
1040 1045 1050

Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val
1055 1060 1065

Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu
1070 1075 1080

Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro
1085 1090 1095

Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile
1100 1105 1110

Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
1115 1120 1125

<210> 80
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD63 EC loop 2 MMH

<400> 80

Arg Asp Lys Val Met Ser Glu Phe Asn Asn Asn Phe Arg Gln Gln Met
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Pro Lys Asn Asn His Thr Ala Ser Ile Leu Asp Arg Met
20 25 30

Gln Ala Asp Phe Lys Cys Cys Gly Ala Ala Asn Tyr Thr Asp Trp Glu
35 40 45

Lys Ile Pro Ser Met Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile
50 55 60

Asn Val Thr Val Gly Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His
65 70 75 80

Lys Glu Gly Cys Val Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val
85 90 95

Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys
100 105 110

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
115 120 125

<210> 81
<211> 324
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD63 EC loop 2 hFC

<400> 81

```
Arg Asp Lys Val Met Ser Glu Phe Asn Asn Asn Phe Arg Gln Gln Met
1               5                  10                  15

Glu Asn Tyr Pro Lys Asn Asn His Thr Ala Ser Ile Leu Asp Arg Met
            20                  25                  30

Gln Ala Asp Phe Lys Cys Cys Gly Ala Ala Asn Tyr Thr Asp Trp Glu
        35                  40                  45

Lys Ile Pro Ser Met Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile
    50                  55                  60

Asn Val Thr Val Gly Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His
65                  70                  75                  80

Lys Glu Gly Cys Val Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val
                85                  90                  95

Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
            100                 105                 110

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        115                 120                 125

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    130                 135                 140

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
145                 150                 155                 160

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
            180                 185                 190
```

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
210 215 220

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
245 250 255

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
260 265 270

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
275 280 285

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

申請專利範圍

1. 一種編碼多結構域治療性蛋白質之多核苷酸，該多結構域治療性蛋白質包含遞送結構域及酶結構域，

其中該遞送結構域係結合至人類 CD63 且包含：

(a) 由 SEQ ID NO:2 所示的胺基酸序列，

(b) 選自由以下組成之群組的 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 胺基酸序列： SEQ ID NOs:16-18-20-24-26-28、SEQ ID NOs: 32-34-36-40-42-44、SEQ ID NOs:48-50-52-56-58-60 及 SEQ ID NOs: 64-66-68-72-74-76，及/或

(c) 如以下所示之 HCVR/LCVR 對：SEQ ID NOs: 14/22、SEQ ID NOs: 30/38、SEQ ID NOs: 46/54 或 SEQ ID NOs: 62/70，並且

其中該酶結構域包含人類 α-醣苷酶(GAA)或其生物活性部分。

2. 如請求項 1 之多核苷酸，其中該遞送結構域包含如 SEQ ID NOs: 48-50-52-56-58-60 所示的該 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 胺基酸序列。

3. 如請求項 1 之多核苷酸，其中該遞送結構域包含如 SEQ ID NOs: 46/54 所示的 HCVR/LCVR 胺基酸序列對。

4. 如請求項 1 之多核苷酸，其中該遞送結構域為單鏈可變片段(scFv)。

5. 如請求項 1 之多核苷酸，其中該多結構域治療性蛋白質包含如 SEQ ID NO:79 所示之胺基酸序列。

6. 如請求項 1 之多核苷酸，其進一步包含一包含如 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或此二者所示之序列的組織特異性調控因子。

7. 一種包含如請求項 1 至 6 中任一項之多核苷酸的基因治療載體，其中該基因治療載體係選自由以下組成之群組：

一病毒載體；

一裸多核苷酸；以及

一多核苷酸複合體，其中該多核苷酸複合體為脂質奈米粒子，其包含該多核苷酸及脂質。

8. 如請求項 7 之基因治療載體，其中該基因治療載體為一選自由以下組成之群組的病毒載體：反轉錄病毒、腺病毒、單純疱疹病毒、痘病毒、痘瘡病毒、慢病毒或腺相關病毒(AAV)。

9. 如請求項 8 之基因治療載體，其中該基因治療載體為肝的假型 AAV。

10. 如請求項 8 之基因治療載體，其中該基因治療載體為 AAV2/8 嵌合體。

11. 一種包含一遞送結構域及一酶結構域之重組多結構域治療性蛋白質，其中該重組多結構域治療性蛋白質係由根據請求項 1 至 6 中任一項之多核苷酸編碼。

12. 一種在離體的細胞中表現一重組多結構域治療性蛋白質的方法，該方法包括：

(a) 使細胞與一如請求項 7 之基因治療載體接觸；

(b) 使該多核苷酸整合入該細胞的基因體基因座內；以及

(c) 使該細胞產生該重組多結構域治療性蛋白質。

13. 如請求項 12 之方法，其中該基因治療載體為腺相關病毒(AAV)載體。

14. 如請求項 12 之方法，其中該細胞的該基因體基因座為安全港基因座，或其中該基因體基因座係位於或接近選自由以下組成之群組的基因座：EESYR 基因座、SARS 基因座、人類染色體 1 的位置 188,083,272 或其非人類哺乳動物直系同源基因、人類染色體 10 的位置 3,046,320 或其非人類

哺乳動物直系同源基因、人類染色體 17 的位置 67,328,980 或其非人類哺乳動物直系同源基因、染色體上的腺相關病毒位置 1 (AAVS1)、人類染色體 19 上自然發生的 AAV 病毒整合位置或其非人類哺乳動物直系同源基因、趨化介素受體 5 (CCR5)基因、編碼 HIV-1 共受體之趨化介素受體基因、小鼠 Rosa26 基因座或其非鼠類哺乳動物直系同源基因、及白蛋白(*alb*)基因座。

15. 如請求項 12 之方法，其中該細胞為人類細胞或為小鼠細胞。

16. 如請求項 12 之方法，其中該細胞為肝細胞。

17. 根據請求項 7 之基因治療載體，係用於在活體內的細胞中表現一重組多結構域治療性蛋白質的方法，該方法包括：

(a) 使細胞與該基因治療載體接觸；

(b) 使該多核苷酸整合入該細胞的基因體基因座內；以及

(c) 使該細胞產生該重組多結構域治療性蛋白質。

18. 如請求項 17 使用之基因治療載體，其中該基因治療載體為腺相關病毒(AAV)載體。

19. 如請求項 17 使用之基因治療載體，其中該細胞的該基因體基因座為安全港基因座，或其中該基因體基因座係位於或接近選自由以下組成之群組的基因座：EESYR 基因座、SARS 基因座、人類染色體 1 的位置 188,083,272 或其非人類哺乳動物直系同源基因、人類染色體 10 的位置 3,046,320 或其非人類哺乳動物直系同源基因、人類染色體 17 的位置 67,328,980 或其非人類哺乳動物直系同源基因、染色體上的腺相關病毒位置 1 (AAVS1)、人類染色體 19 上自然發生的 AAV 病毒整合位置或其非人類哺乳動物直系同源基因、趨化介素受體 5 (CCR5)基因、編碼 HIV-1 共受體之趨化介素受體基因、小鼠 Rosa26 基因座或其非鼠類哺乳動物直系同源基因、及白蛋白(*alb*)基因座。

20. 如請求項 17 使用之基因治療載體，其中該細胞為人類細胞或為小鼠細胞。

21. 如請求項 17 使用之基因治療載體，其中該細胞為肝細胞。

22. 如請求項 7 使用之基因治療載體，其係用於在有需要之患者的組織中降低肝醣堆積之方法，該方法包括向該患者施與該基因治療載體。

23. 如請求項 22 使用之基因治療載體，其中：

(i) 該組織係選自由心臟、肝臟及骨骼肌所組成之群組；

(ii) 該多結構域治療性蛋白質包括抗 CD63 scFv-GAA；

(iii) 高血清濃度的 GAA 係被維持至少 12 週，或與經施予包含編碼不含遞送結構域的 GAA 之多核苷酸之基因治療載體的個體中的 GAA 血清濃度相比，在 12 週的 GAA 血清濃度係高約 2.5 至 3 倍；

(iv) 在心臟、骨骼肌及肝組織中的肝醣濃度係降低至野生型濃度；及/或

(v) 於施予該基因治療載體後在組織中的肝醣濃度係維持在野生型濃度 3 個月。

24. 如請求項 7 使用之基因治療載體，其係用於在有需要之患者中治療酶缺乏症及/或使患者耐受其所缺乏的酶之方法，包括向該患者施與該基因治療載體。

25. 如請求項 24 使用之基因治療載體，其中：

(i) 該多結構域治療性蛋白質包含抗 CD63 scFv-GAA；

(ii) 在施予該基因治療載體後係於患者中維持高血清濃度的 GAA 至少 12 週；

(iii) 與經施予包含編碼不含遞送結構域的 GAA 之多核苷酸之基因治療載體的個體中的 GAA 血清濃度相比，在施予該基因治療載體後 12 週的患者中之 GAA 血清濃度係高約 2.5 至 3 倍；

(iv) 在患者心臟、骨骼肌及肝組織中的肝醣濃度係降低至野生型濃度；

(v) 於施與該基因治療載體後在患者心臟、骨骼肌及肝組織中的肝醣濃度係維持在野生型濃度 3 個月；

(vi) 於治療後該患者的肌肉力量係恢復至野生型程度；

(vii) 該患者患有龐貝氏症；

(viii)與在沒有遞送結構域的情況下接受酶結構域之對照組患者相比，該患者對於該酶的抗體減少；

(ix) 該方法進一步包括以一或多種免疫抑制劑而免疫抑制該患者；

(x) 該方法進一步包括向患者施與其缺乏的酶以做為最後步驟；及/或

(xi) 該患者係經施予治療有效量之多核苷酸而不必要向該患者再施予任何 GAA、GAA 的一部分、或包含 GAA 或其部分之多結構域治療性蛋白質。

26. 一種醫藥組成物，其包含如請求項 7 之基因治療載體以及醫藥學上可接受的載劑。

圖式

圖 1A

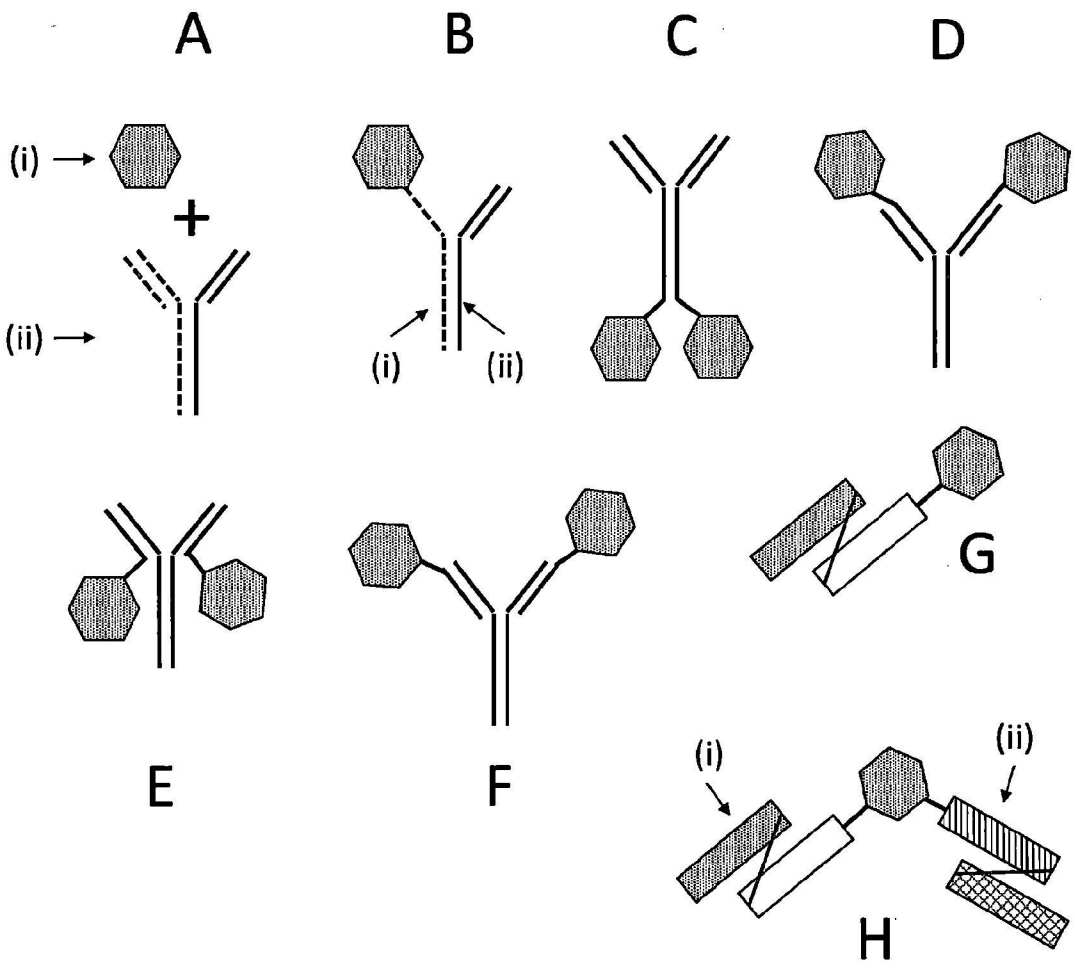


圖 1B

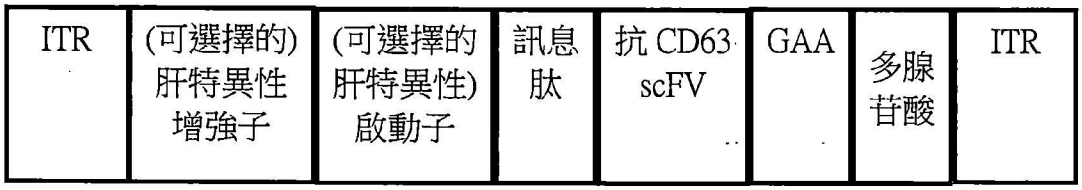


圖 2

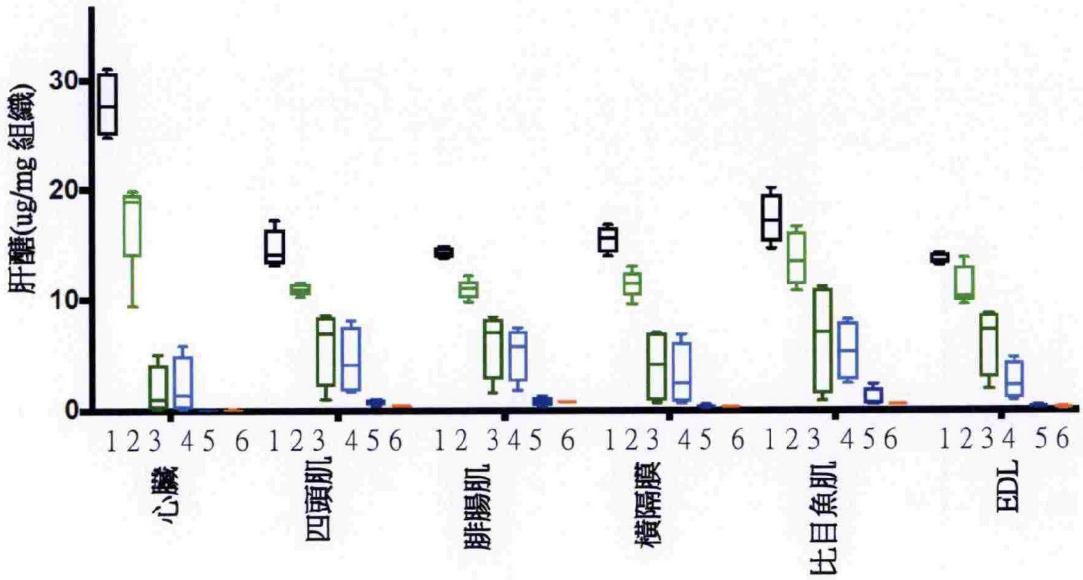

肝醣(ug/mg 組織)
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6
心臟
四頭肌
腓腸肌
橫隔膜
比目魚肌
EDL

圖 3

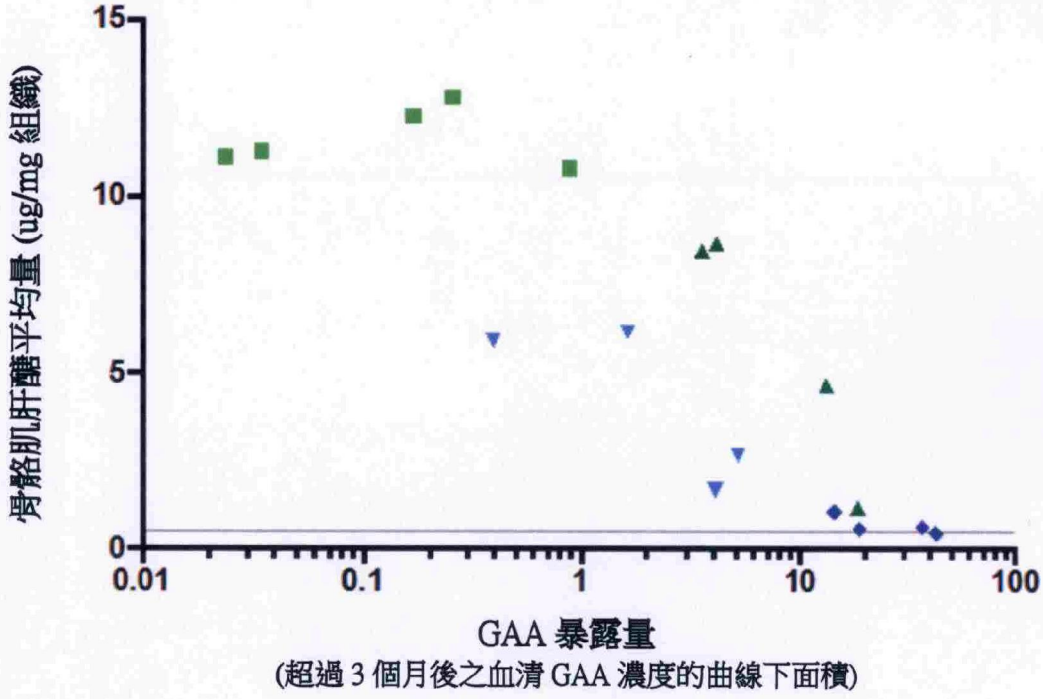

15
10
5
0
0.01
0.1
1
10
100
骨骼肌肝醣平均量 (ug/mg 組織)
GAA 暴露量
(超過 3 個月後之血清 GAA 濃度的曲線下面積)

圖 4

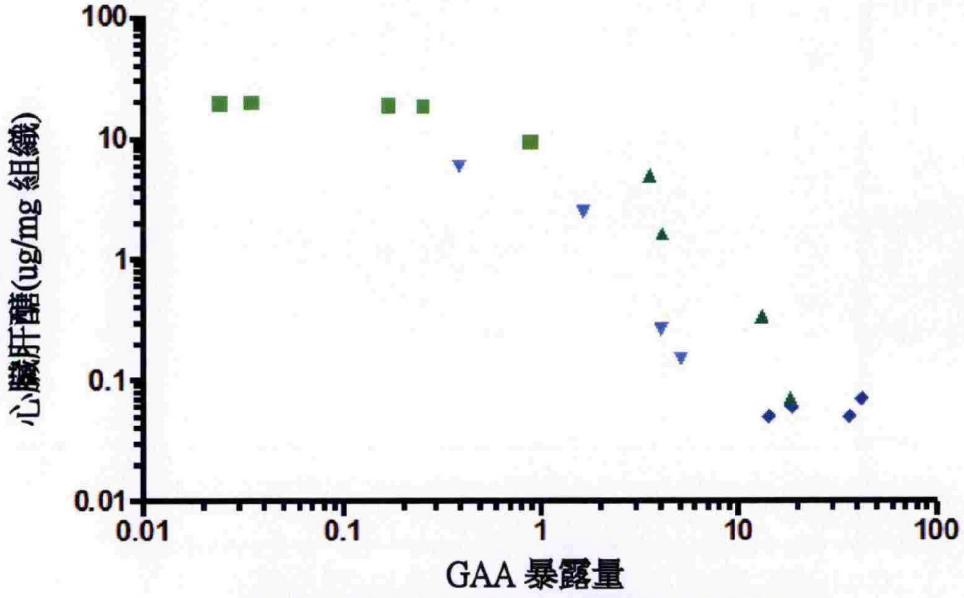

100
10
1
0.1
0.01
心臟肝醣(ug/mg 組織)
0.01
0.1
1
10
100
GAA 暴露量
(超過 3 個月後之血清 GAA 濃度的曲線下面積)

圖 5

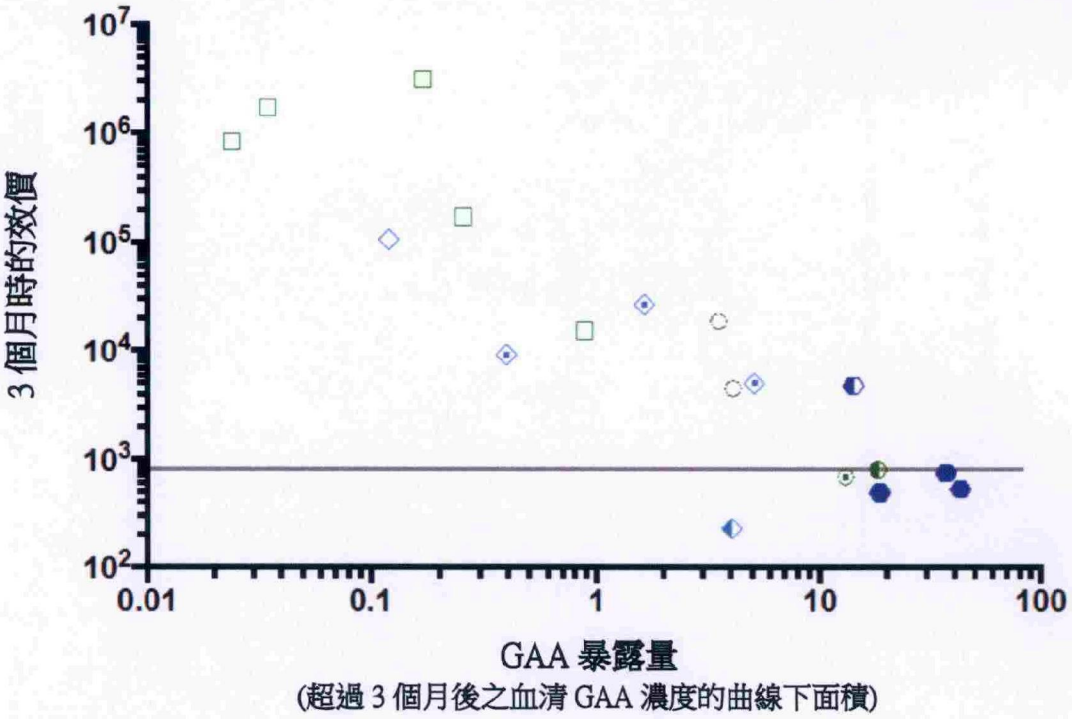

3 個月時的效價
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0.01
0.1
1
10
100
GAA 暴露量
(超過 3 個月後之血清 GAA 濃度的曲線下面積)

圖 6

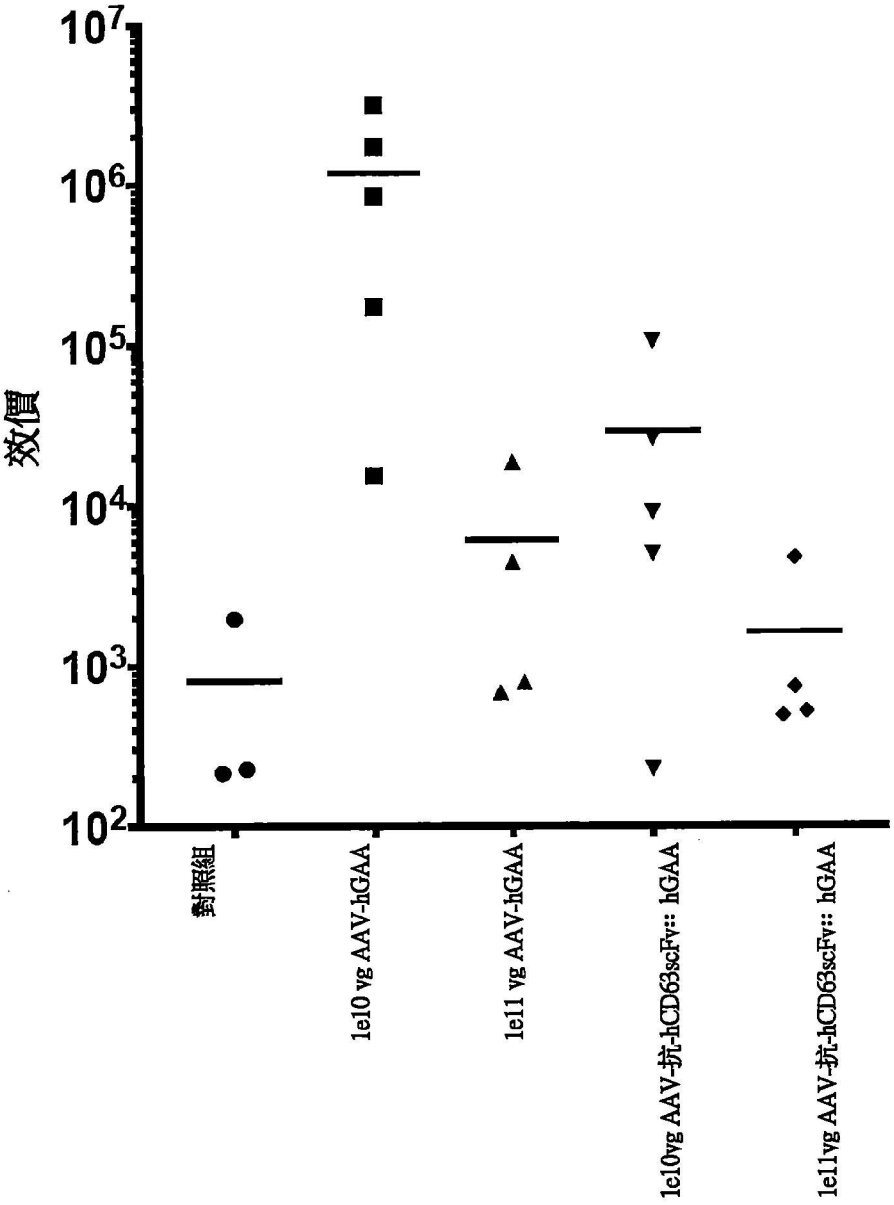

效價
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
對照組
1e10 vg AAV-hGAA
1e11 vg AAV-hGAA
1e10vg AAV-抗-hCD63scFv:: hGAA
1e11vg AAV-抗-hCD63scFv:: hGAA

圖 7A

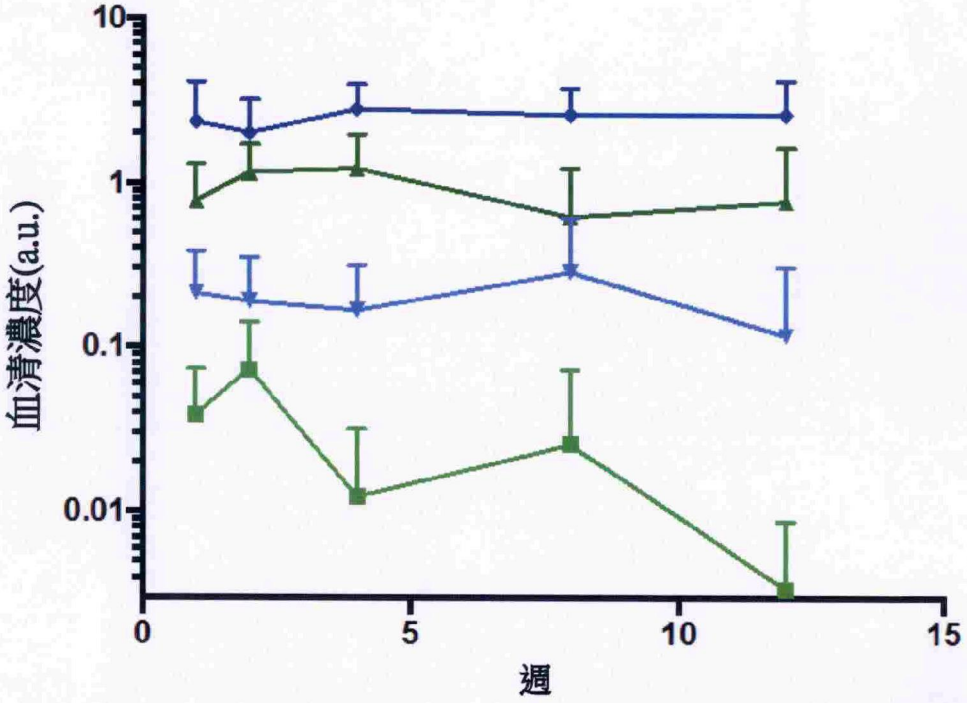


圖 7B

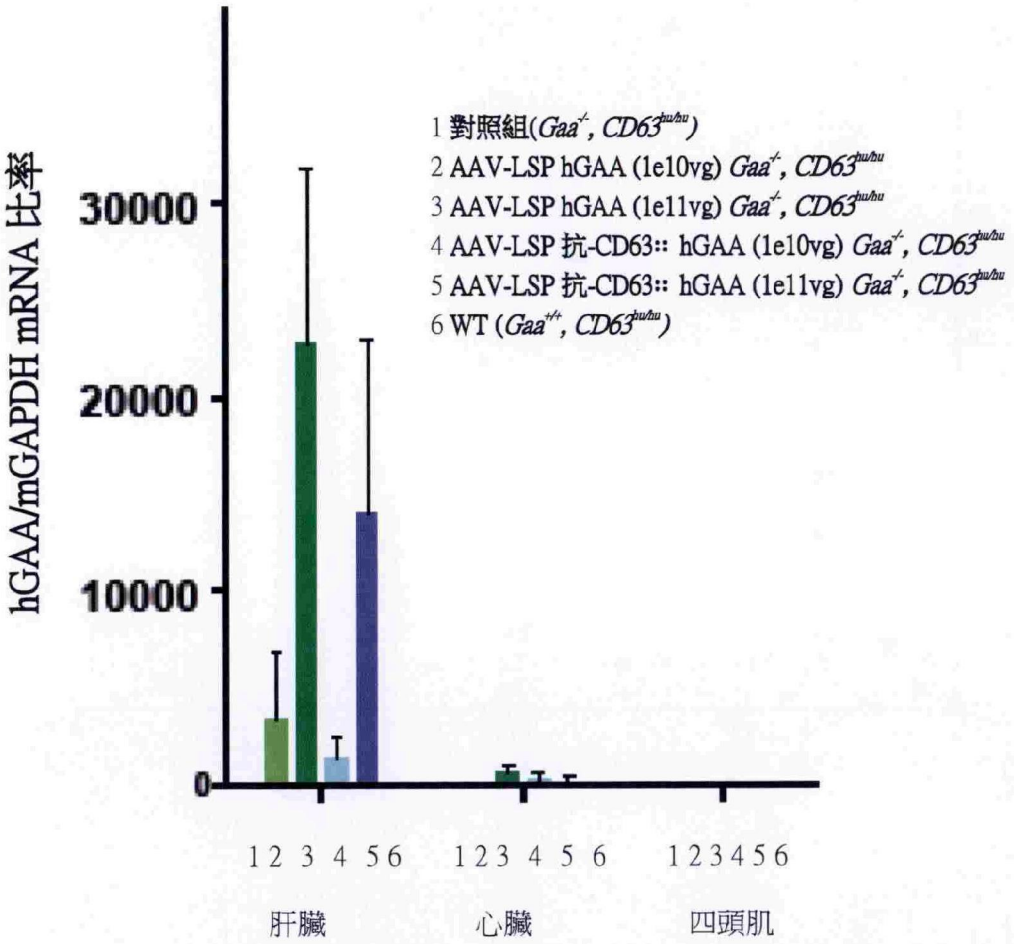

hGAA/mGAPDH mRNA 比率
30000
20000
10000
0
1 對照組(Gaa-/-, CD63hu/hu)
2 AAV-LSP hGAA (1e10vg) Gaa-/-, CD63hu/hu
3 AAV-LSP hGAA (1e11vg) Gaa-/-, CD63hu/hu
4 AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA (1e10vg) Gaa-/-, CD63hu/hu
5 AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA (1e11vg) Gaa-/-, CD63hu/hu
6 WT (Gaa+/+, CD63hu/hu)
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
肝臟
心臟
四頭肌

圖 7C

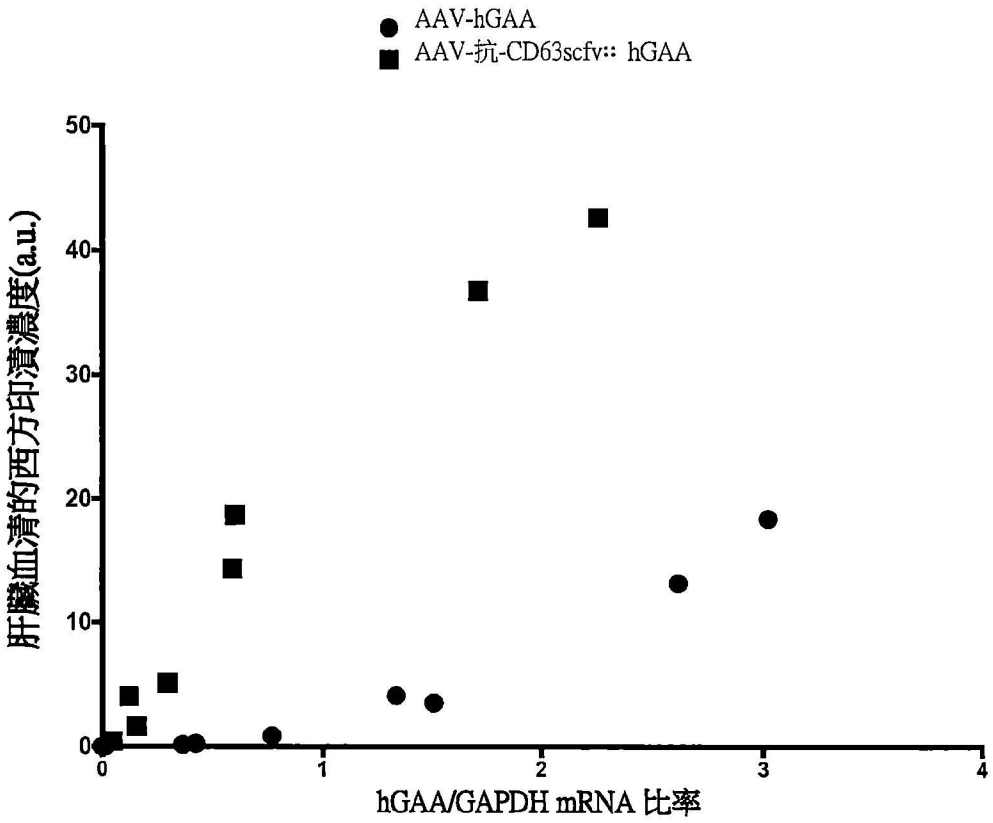

AAV-hGAA
AAV-抗-CD63scfv:: hGAA
肝臟血清的西方印漬濃度(a.u.)
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
hGAA/GAPDH mRNA 比率

圖 7D

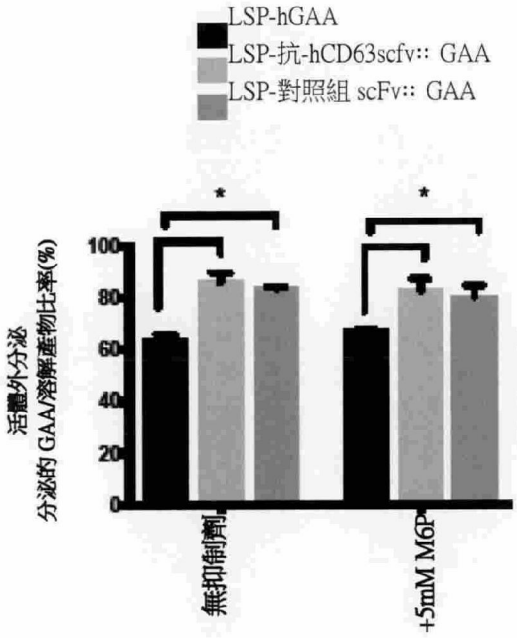

LSP-hGAA
LSP-抗-hCD63scfv:: GAA
LSP-對照組 scFv:: GAA
活體外分泌
分泌的 GAA/溶解產物比率(%)
100
80
60
40
20
0
*
*
無抑制劑
+5mM M6P

圖 8, 區塊 A-B1

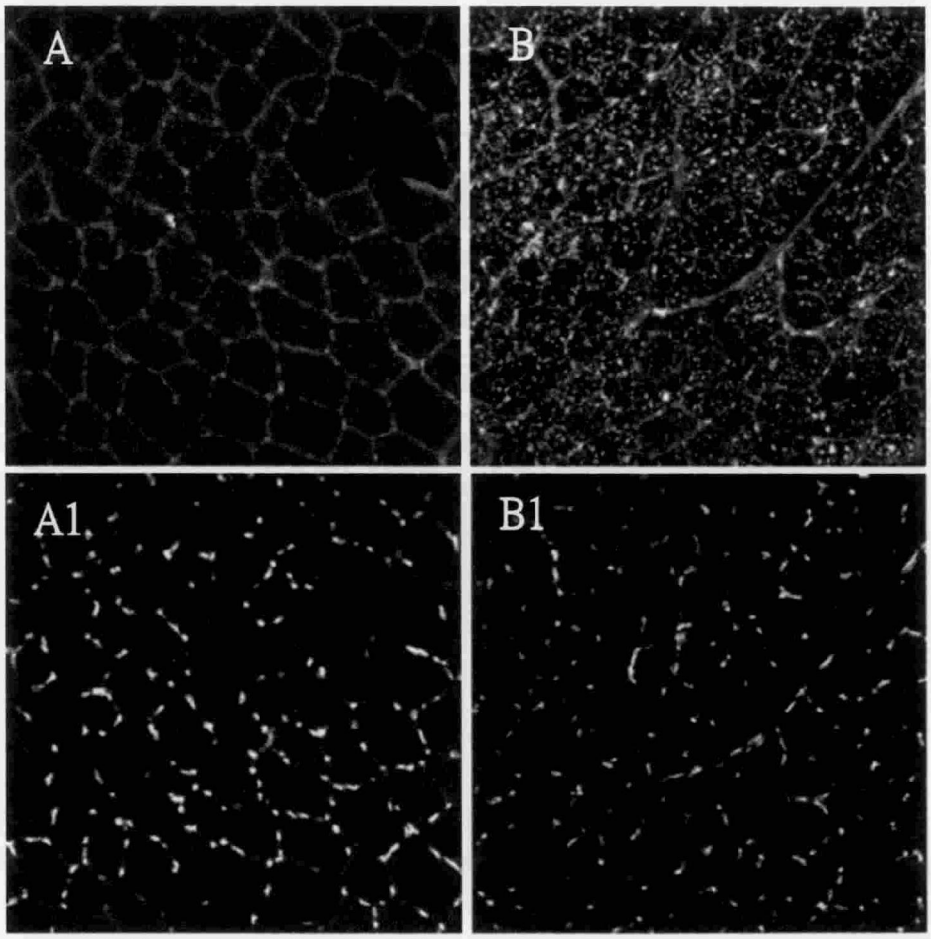


圖 8, 區塊 C-D1

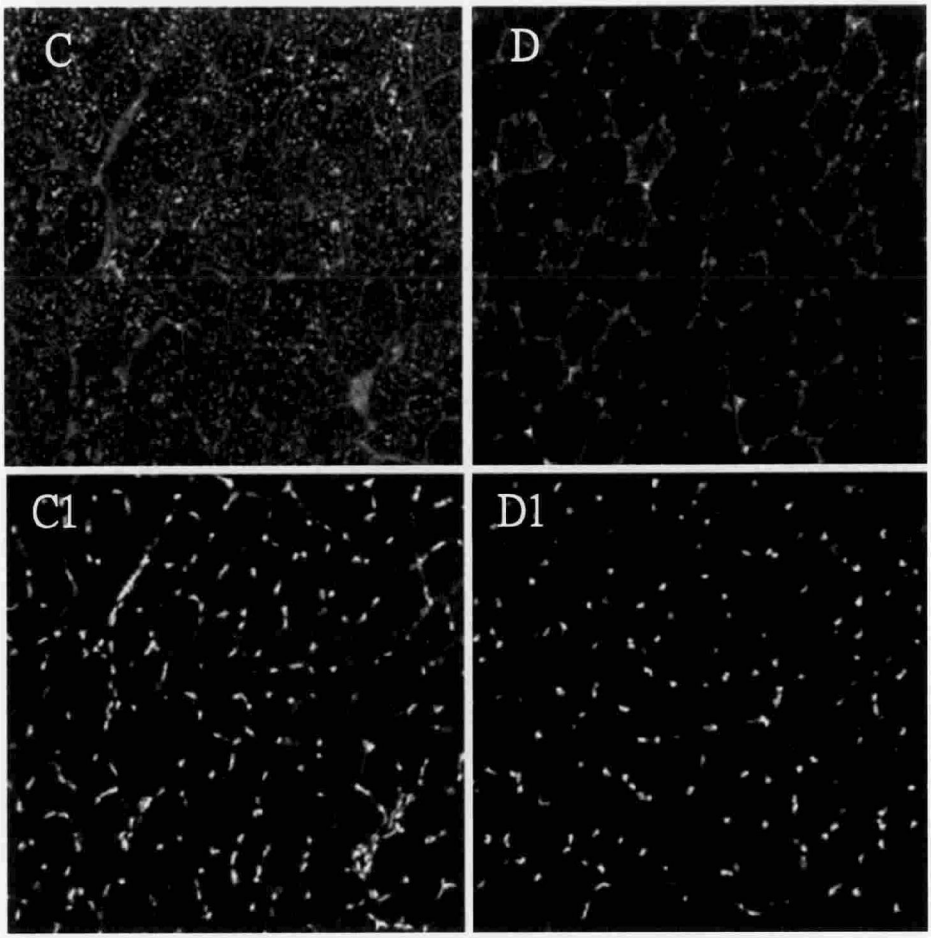


圖 9

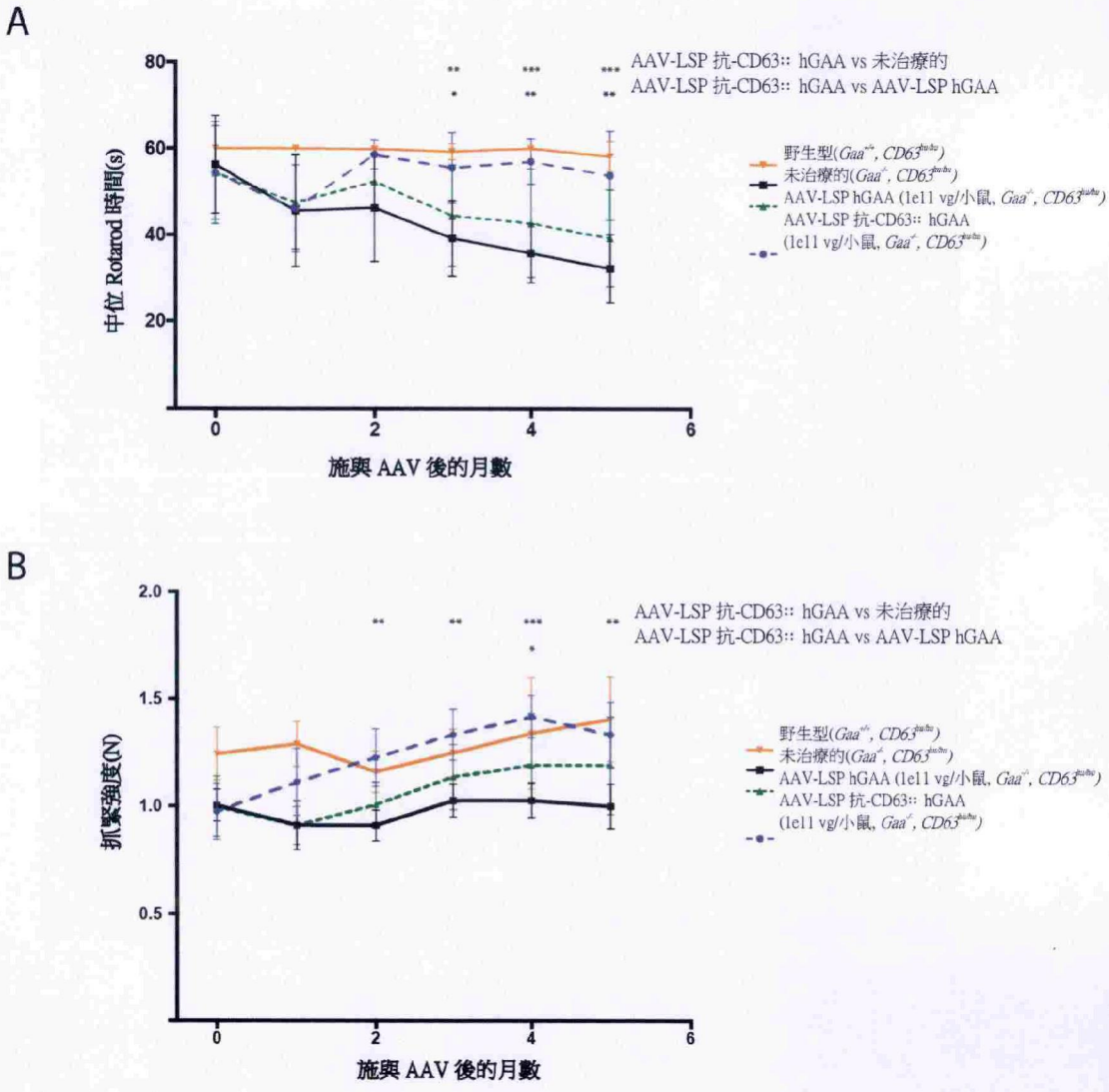

A
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA vs 未治療的
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA vs AAV-LSP hGAA
中位 Rotarod 時間(s)
施與 AAV 後的月數
野生型(Gaa+/+, CD63hu/hu)
未治療的(Gaa-/-, CD63hu/hu)
AAV-LSP hGAA (1e11 vg/小鼠, Gaa-/-, CD63hu/hu)
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA (1e11 vg/小鼠, Gaa-/-, CD63hu/hu)
B
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA vs 未治療的
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA vs AAV-LSP hGAA
抓緊強度(N)
施與 AAV 後的月數
野生型(Gaa+/+, CD63hu/hu)
未治療的(Gaa-/-, CD63hu/hu)
AAV-LSP hGAA (1e11 vg/小鼠, Gaa-/-, CD63hu/hu)
AAV-LSP 抗-CD63:: hGAA (1e11 vg/小鼠, Gaa-/-, CD63hu/hu)

圖 10A

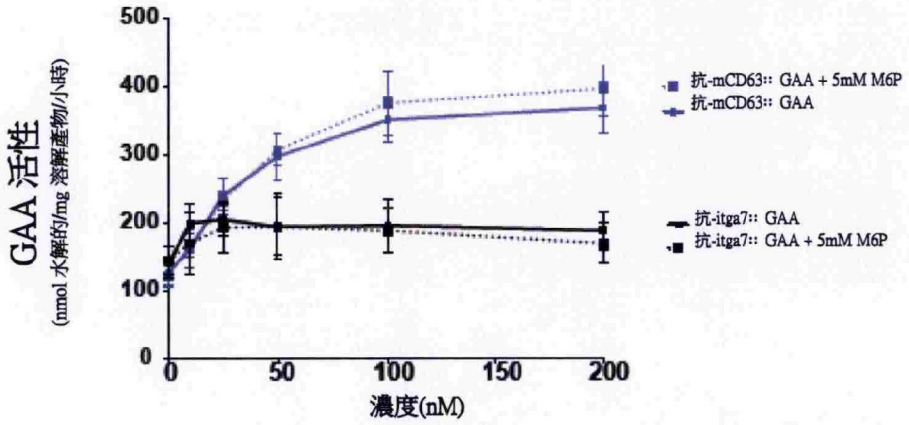
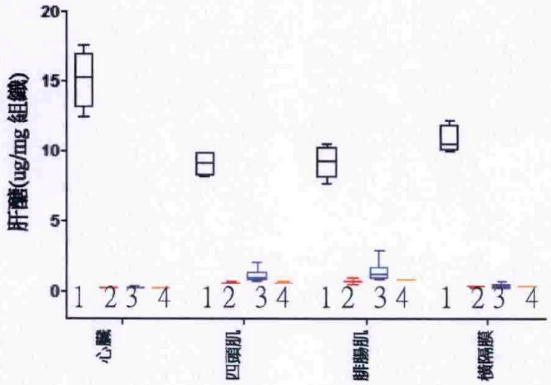

GAA 活性
(nmol 水解的/mg 溶解產物/小時)
500
400
300
200
100
0
0
50
100
150
200
濃度(nM)
抗-mCD63:: GAA + 5mM M6P
抗-mCD63:: GAA
抗-itga7:: GAA
抗-itga7:: GAA + 5mM M6P

圖 10B



1 未治療的對照組(GAA$^{-/-}$, CD63$^{hu/hu}$)
2 抗-hCD63scfv:: GAA (GAA$^{-/-}$, CD63$^{hu/hu}$)
3 抗-itga7:: GAA (GAA$^{-/-}$, CD63$^{hu/hu}$)
4 未治療的野生型(GAA$^{+/+}$, CD63$^{hu/hu}$)

圖 11

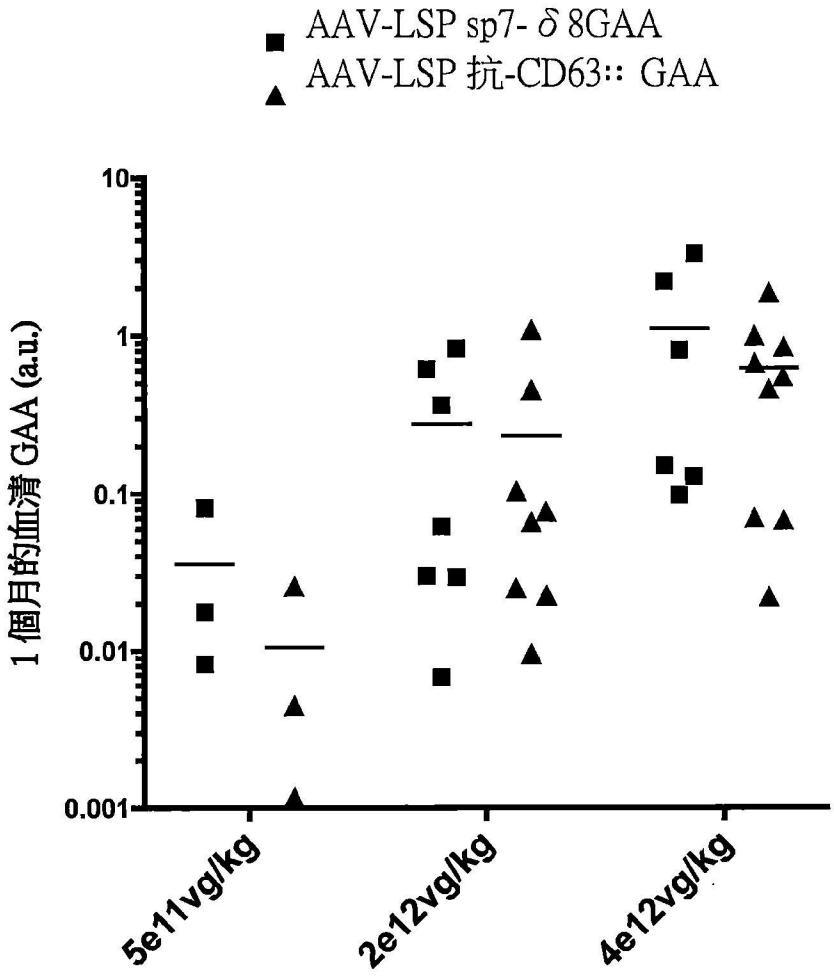
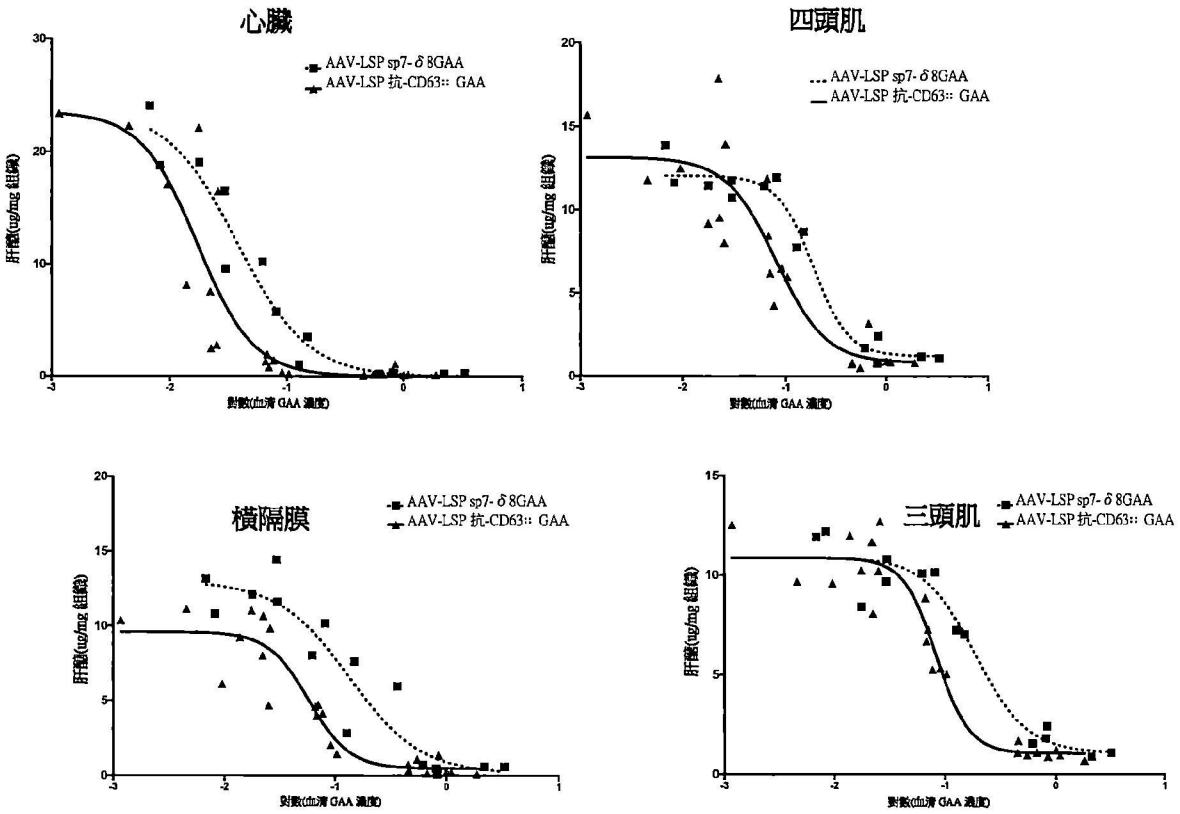

AAV-LSP sp7- δ 8GAA
AAV-LSP 抗-CD63:: GAA
1 個月的血清 GAA (a.u.)
10
1
0.1
0.01
0.001
5e11vg/kg
2e12vg/kg
4e12vg/kg

圖 12


心臟
AAV-LSP sp7-δ8GAA
AAV-LSP 抗-CD63:: GAA
肝糖(ug/mg 組織)
對數(血清 GAA 濃度)
四頭肌
AAV-LSP sp7-δ8GAA
AAV-LSP 抗-CD63:: GAA
肝糖(ug/mg 組織)
對數(血清 GAA 濃度)
橫隔膜
AAV-LSP sp7-δ8GAA
AAV-LSP 抗-CD63:: GAA
肝糖(ug/mg 組織)
對數(血清 GAA 濃度)
三頭肌
AAV-LSP sp7-δ8GAA
AAV-LSP 抗-CD63:: GAA
肝糖(ug/mg 組織)
對數(血清 GAA 濃度)