



(21) 申請案號：109115984

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 14 日

(51) Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)
A61K48/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30) 優先權：2019/05/16 美國 62/848,659
2019/10/08 歐洲專利局 19306310.4(71) 申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國

(72) 發明人：艾爾默 布拉福德 ELMER, BRADFORD (US)；楊 志勇 YANG, ZHI-YONG (US)；納貝爾 蓋瑞 NABEL, GARY (US)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：5 共 46 頁

(54) 名稱

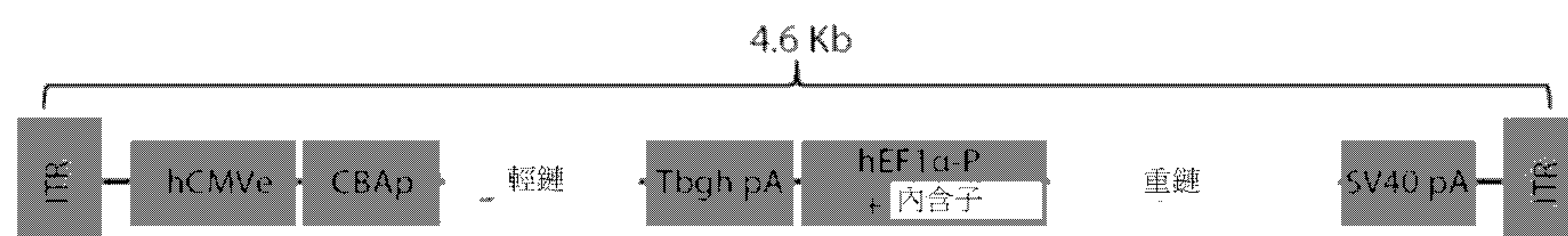
在神經系統中表現抗原結合蛋白

(57) 摘要

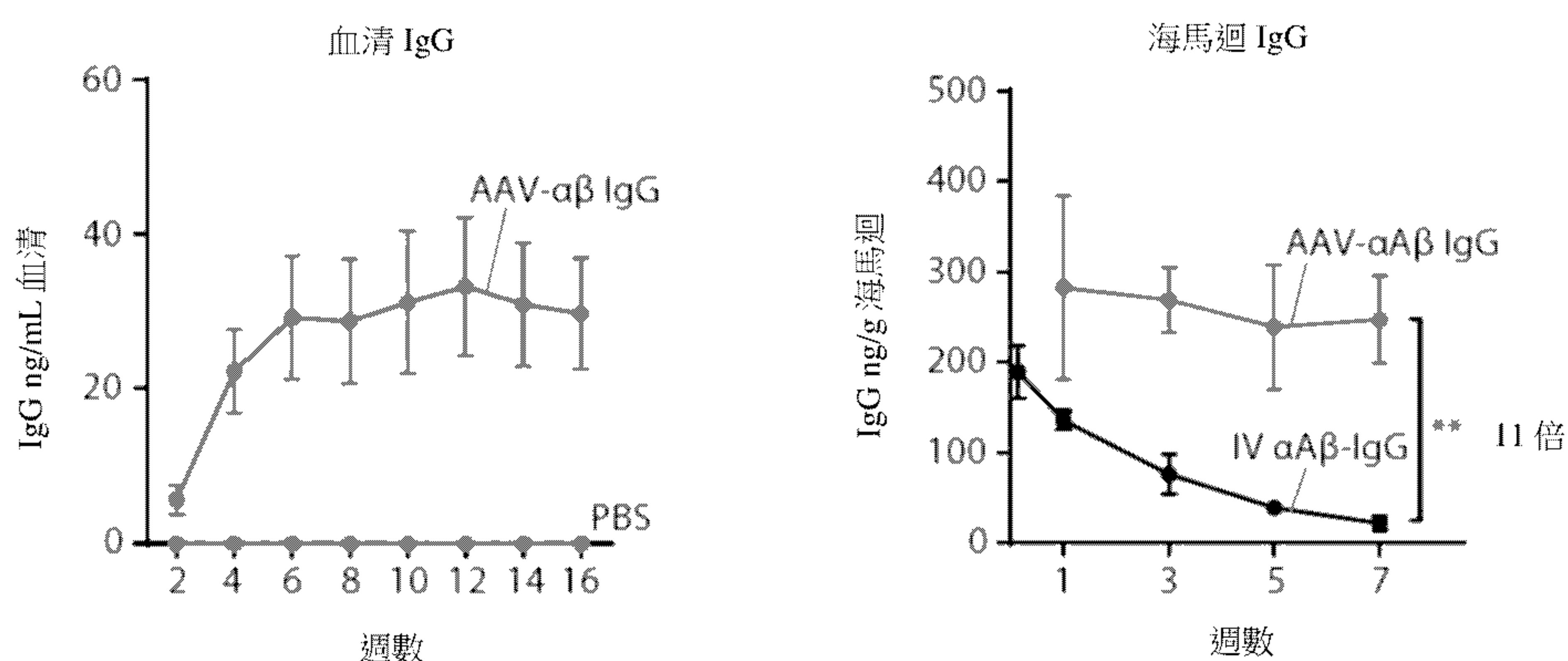
本發明提供表現二價結合成員的重組載體；以及使用該等載體來修飾神經系統之細胞，以在帶有諸如神經退化性疾病的患者腦部中表現該等結合成員的方法。

Provided herein are recombinant vectors that express bivalent binding members and methods of using the vectors to modify cells of the nervous system to express the binding members in the brain of patients having a neurological disease such as a neurodegenerative disease.

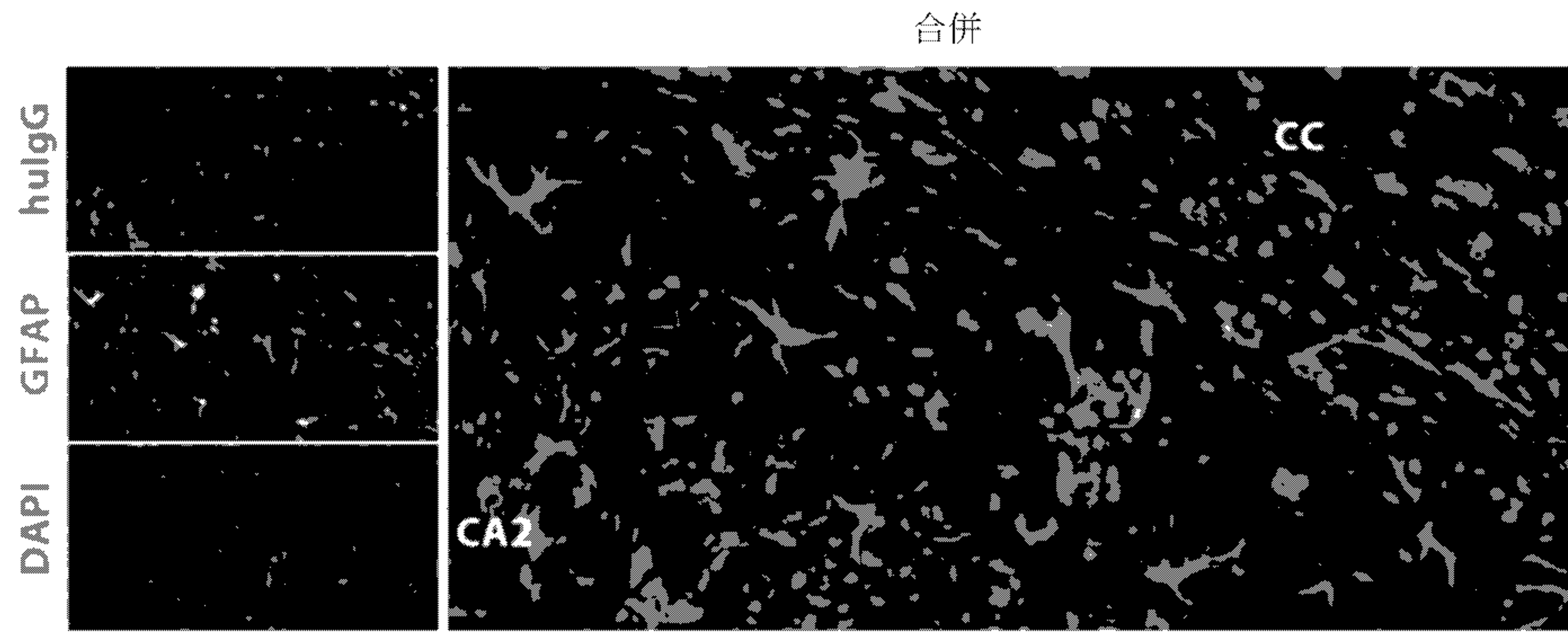
指定代表圖：



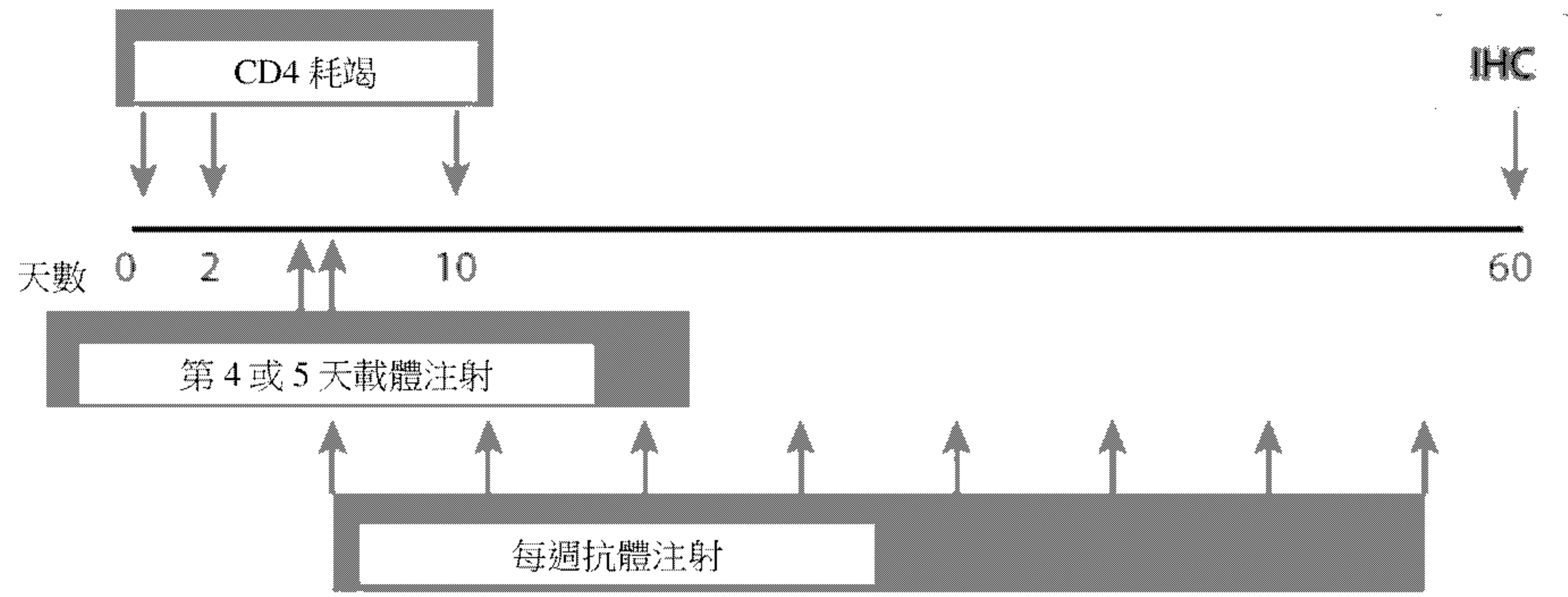
【圖1A】



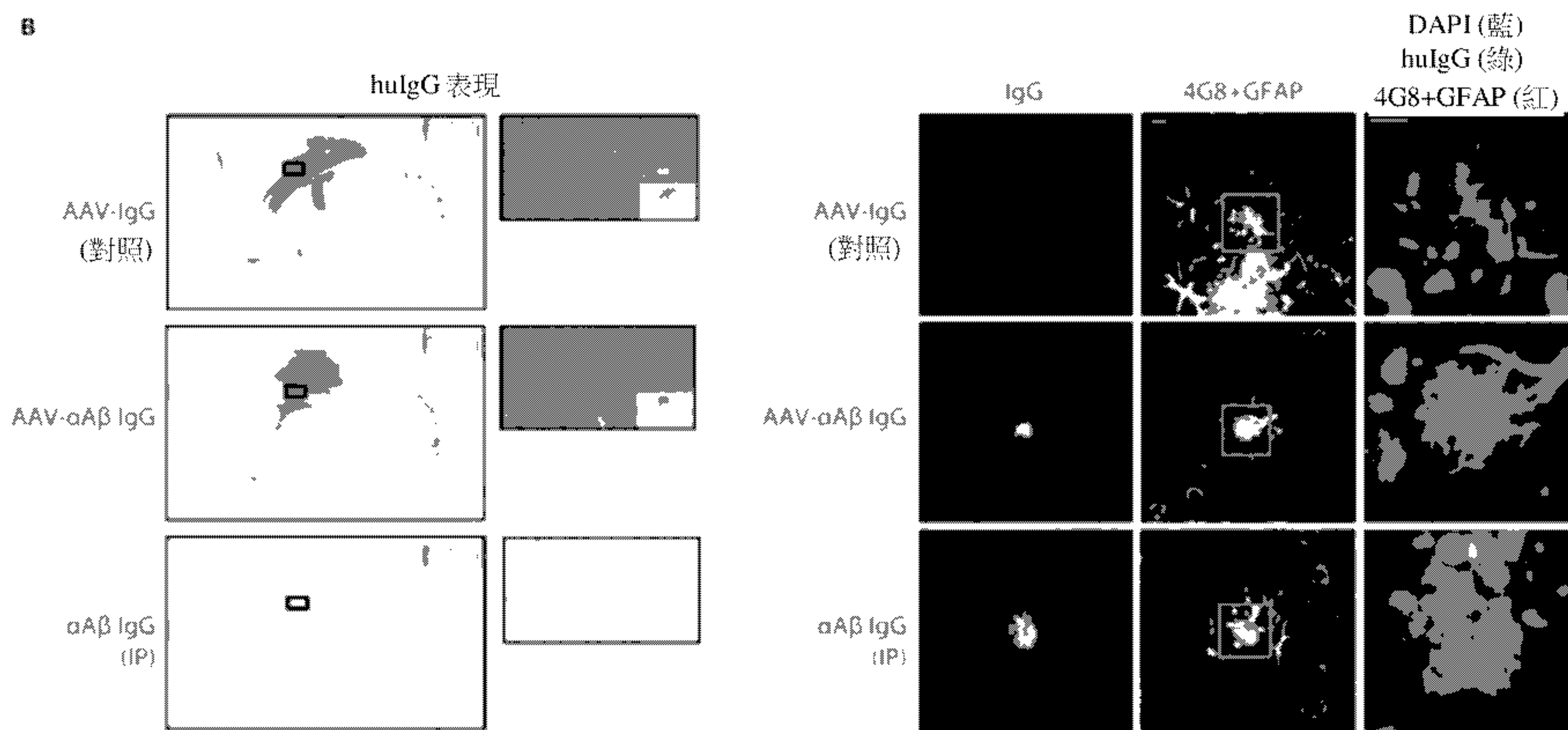
【圖1B】



【圖1C】

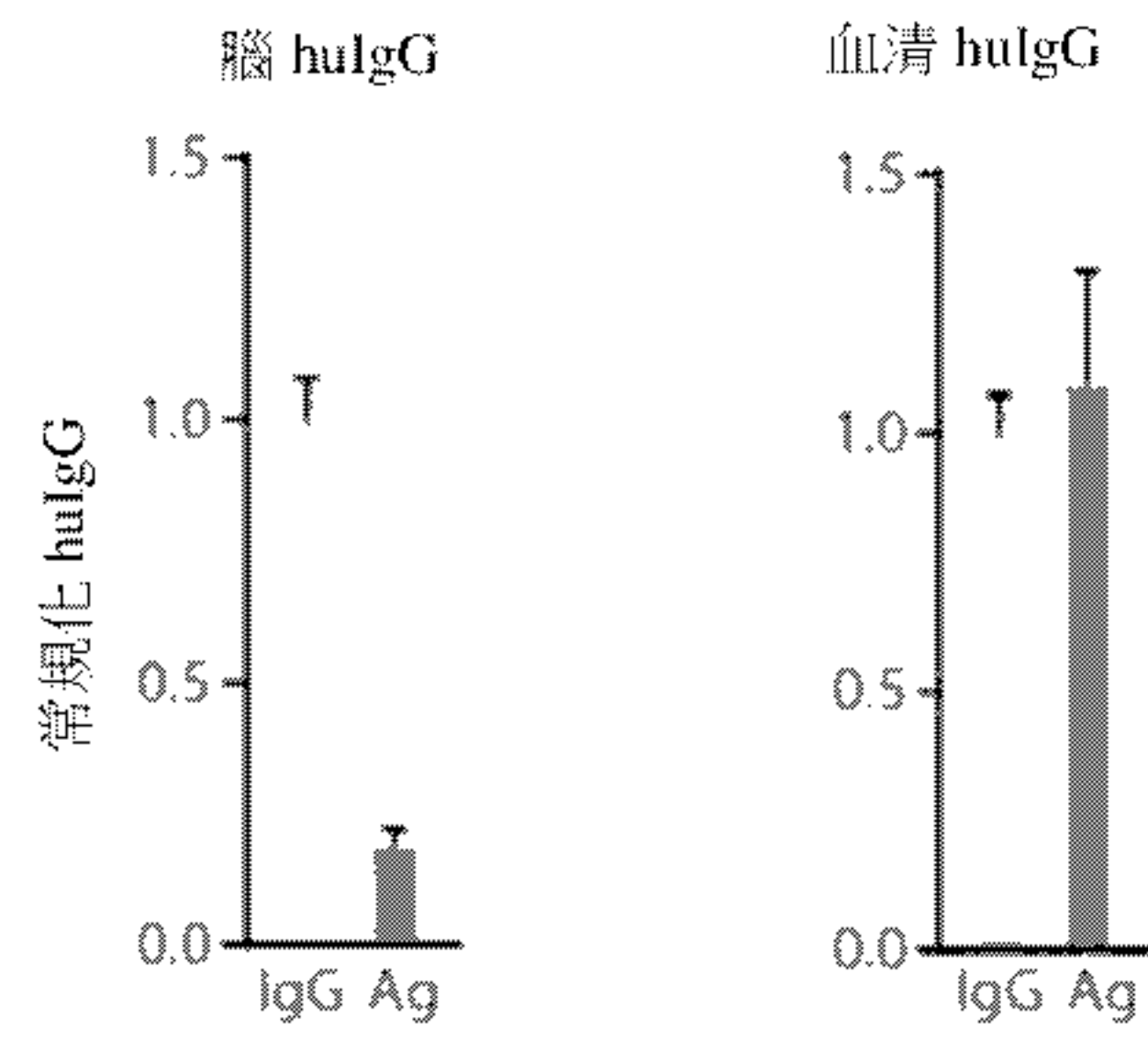


【圖2A】

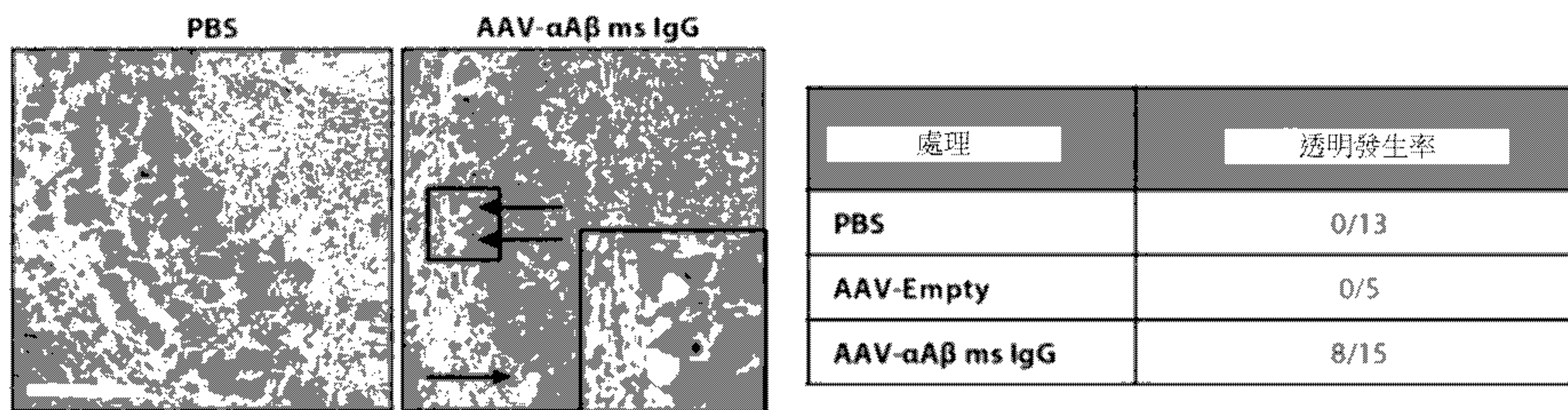


【圖2B】

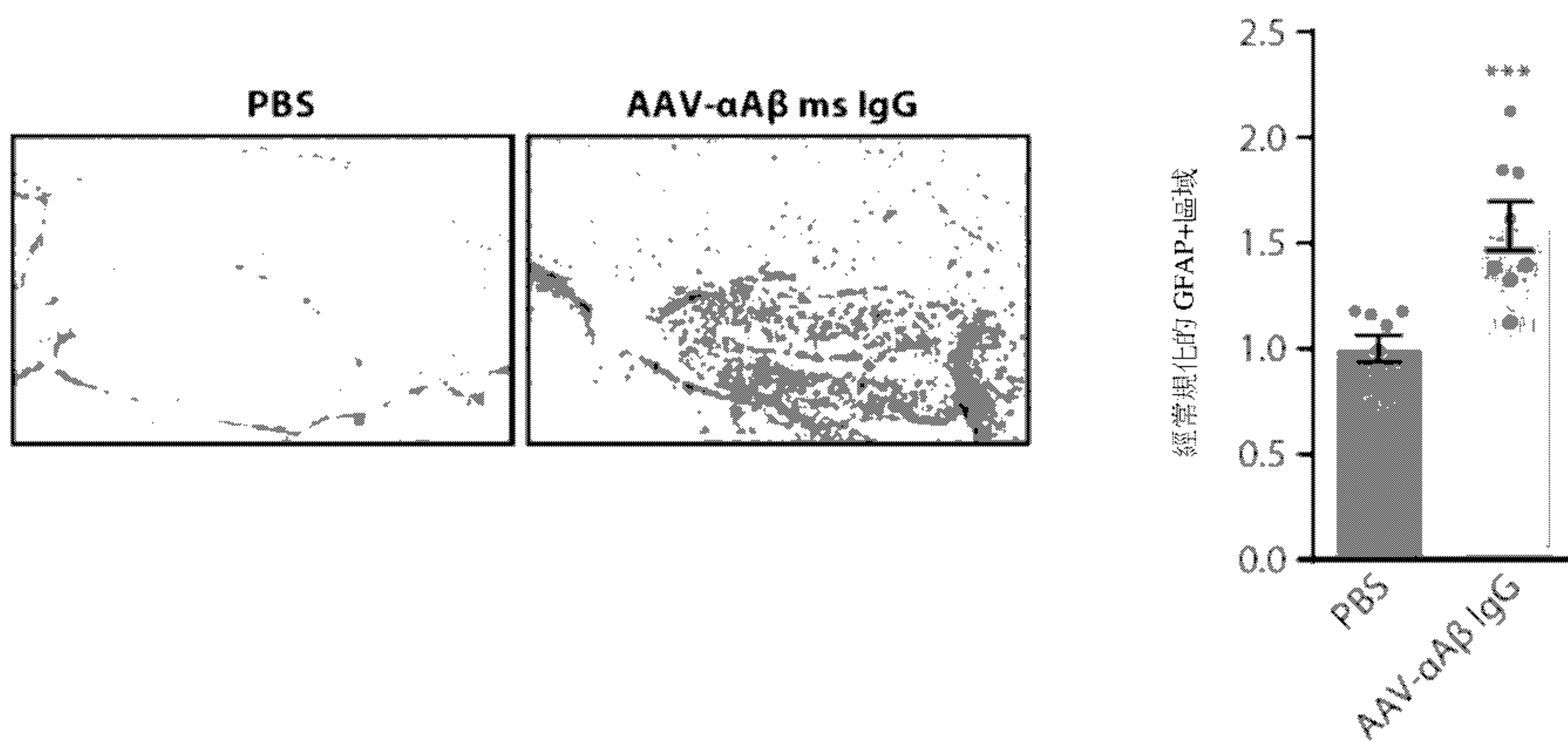
hulG 鏈	肽 經修飾序列	假	假+摻台的 $\alpha\beta$ IgG蛋白	AAV- $\alpha\beta$ -IgG
重 重	ASDSAIYYC(+57)AR	0	1.1E+09	1.48E+09
	VVSVLT~NGK	0	8.4E+06	3.03E+09
	NQVSLTC(+57)LVK	0	2.7E+09	7.86E+09
輕 輕 輕 輕 輕 輕	LLIYTVSNR	0	4.9E+08	0
	FSGSGSGSDFLTISR	0	1.7E+08	0
	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	0	2.4E+09	0
	SGTASVVC(+57)LLNMFYPR	0	2.8E+09	2.54E+08
	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	0	1.8E+07	0
	DSTYLSLSTLTSK	0	4.7E+08	0
	VYAC(+57)EVTHQGLSSPVTK	0	7.1E+07	0



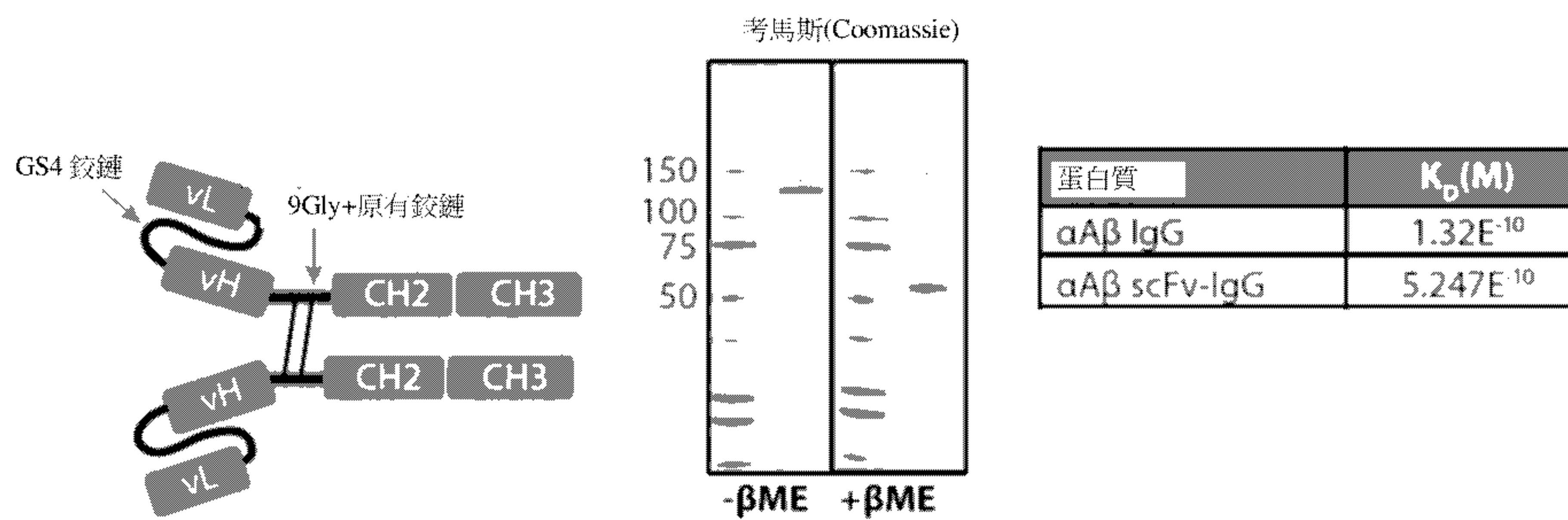
【圖 3A】



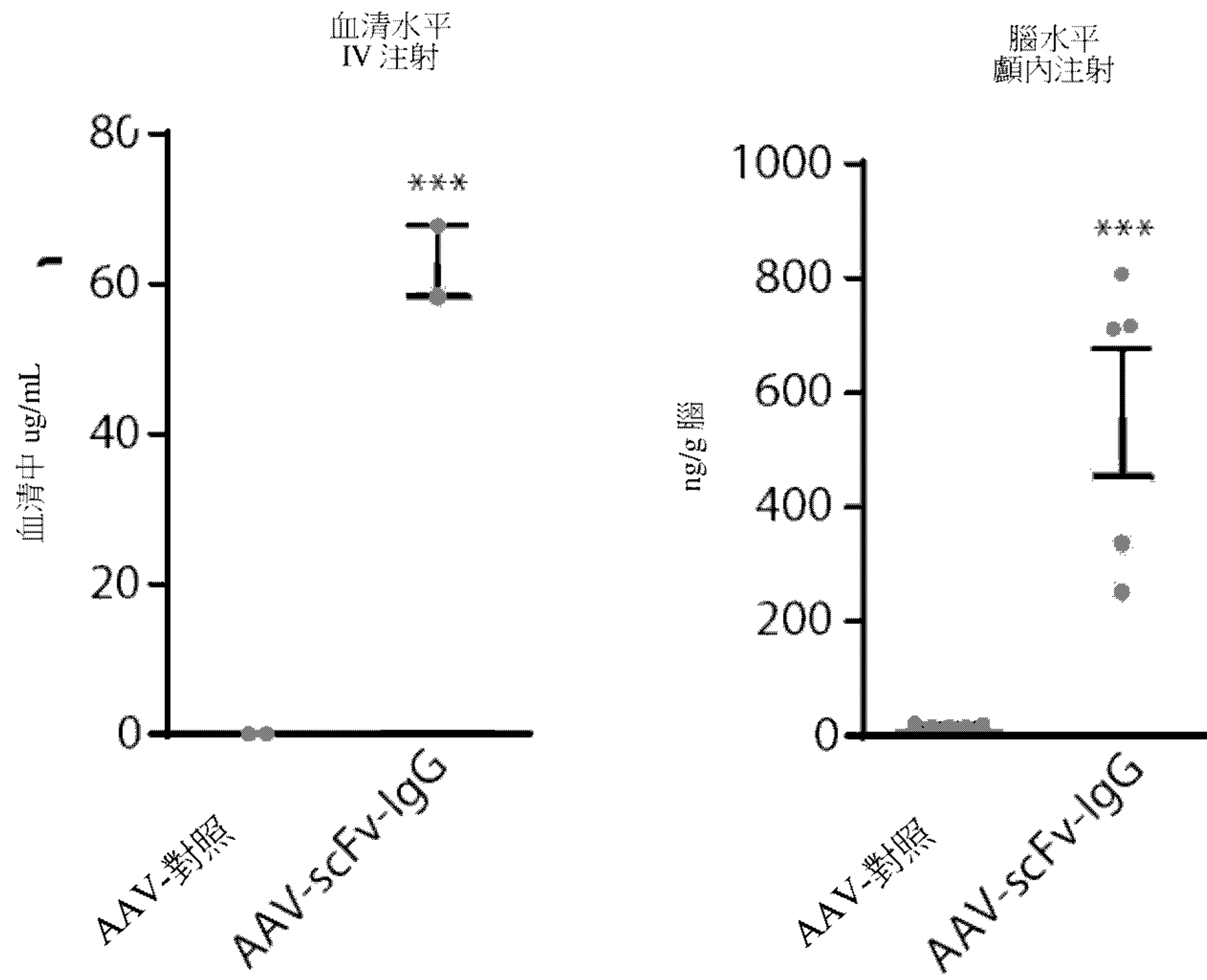
【圖 3B】



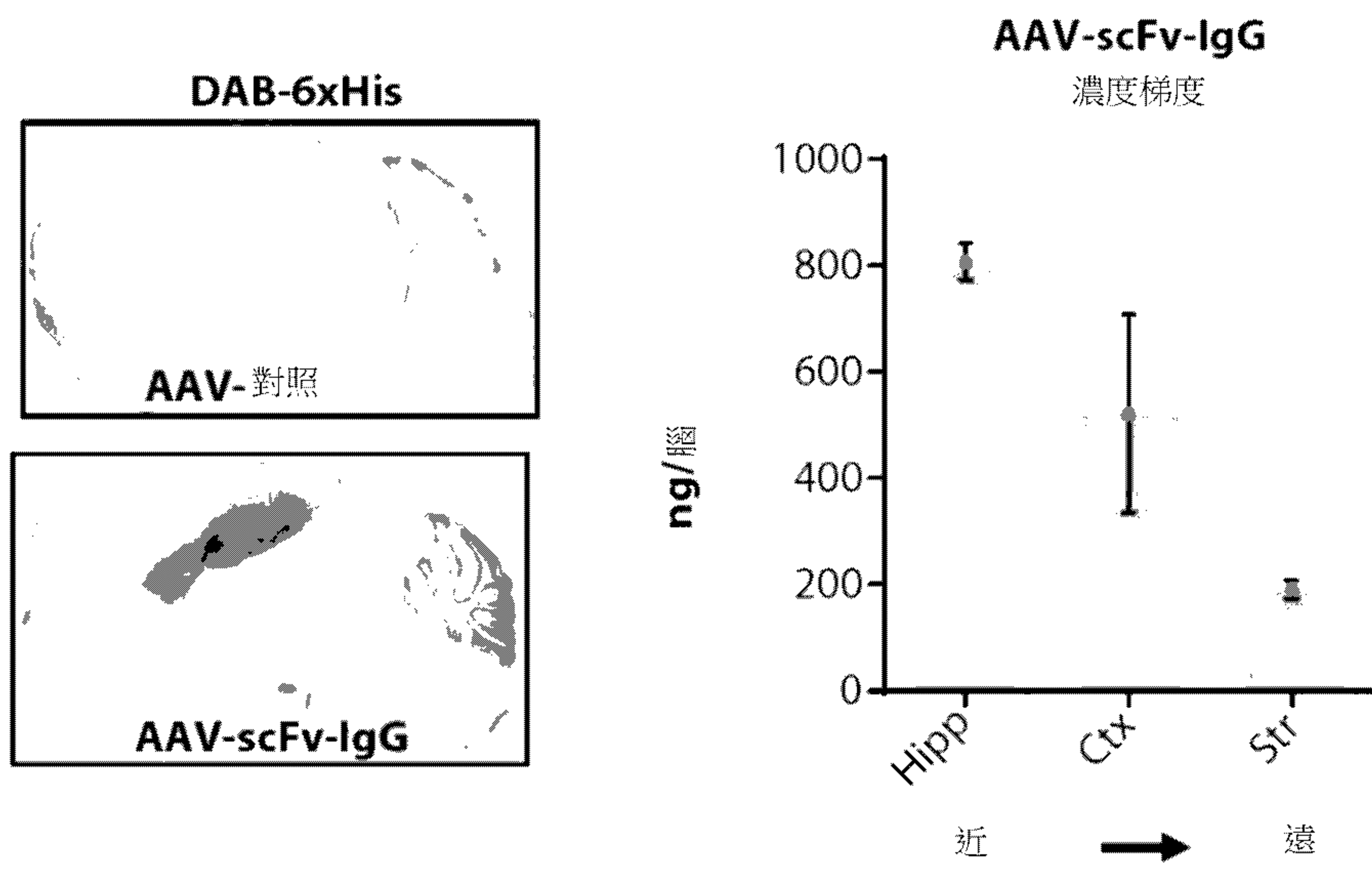
【圖 3C】



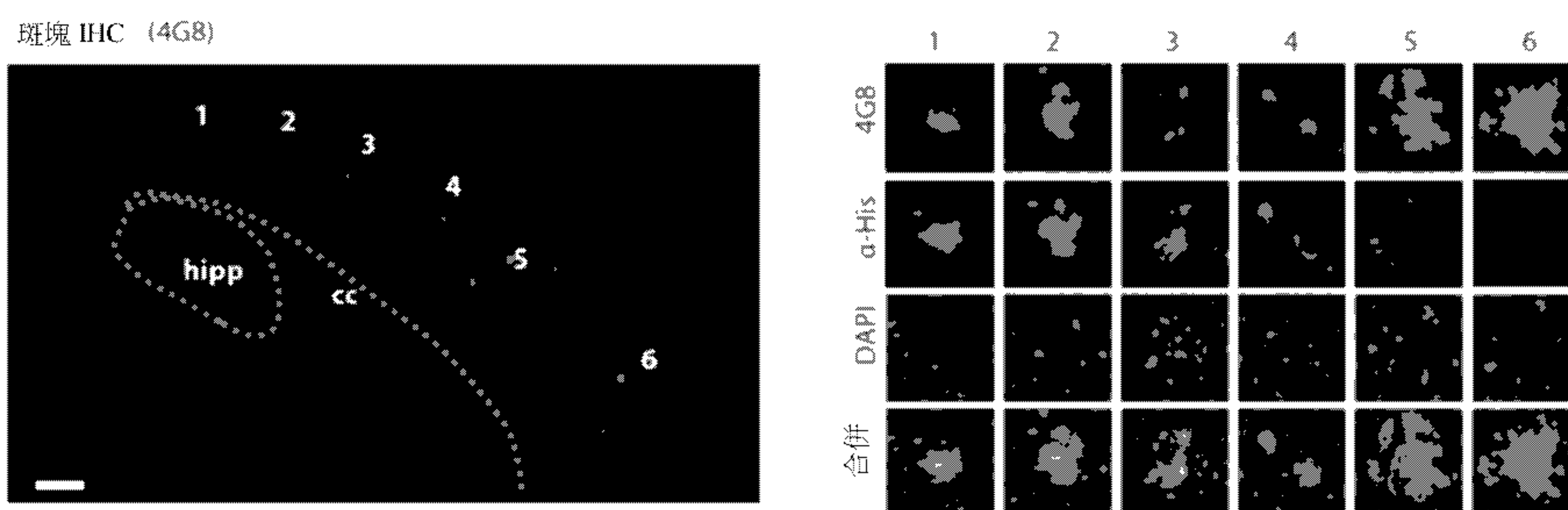
【圖 4A】



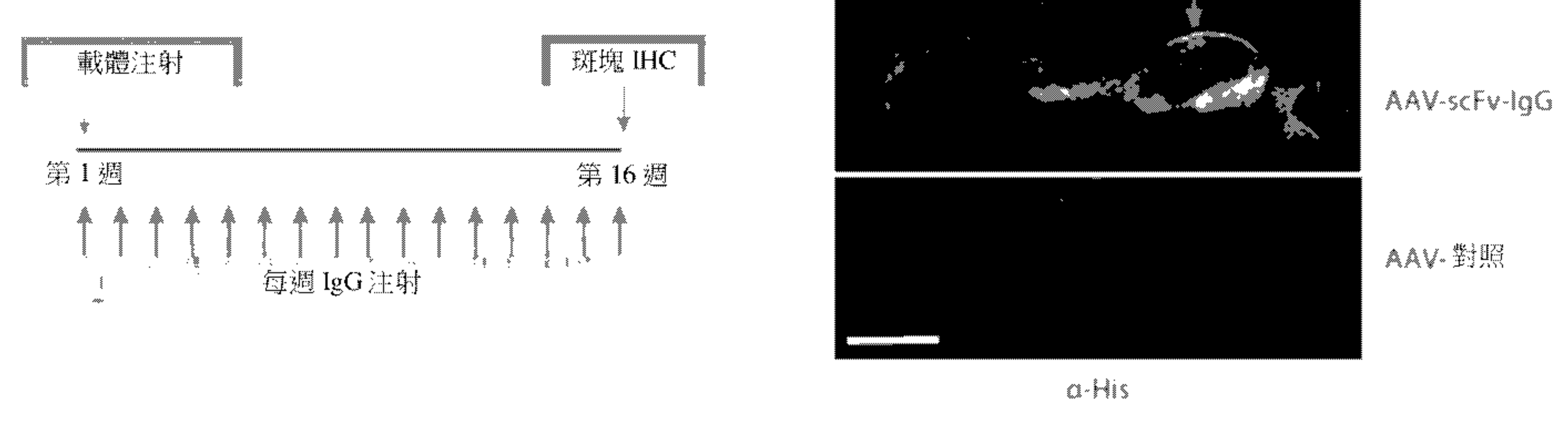
【圖 4B】



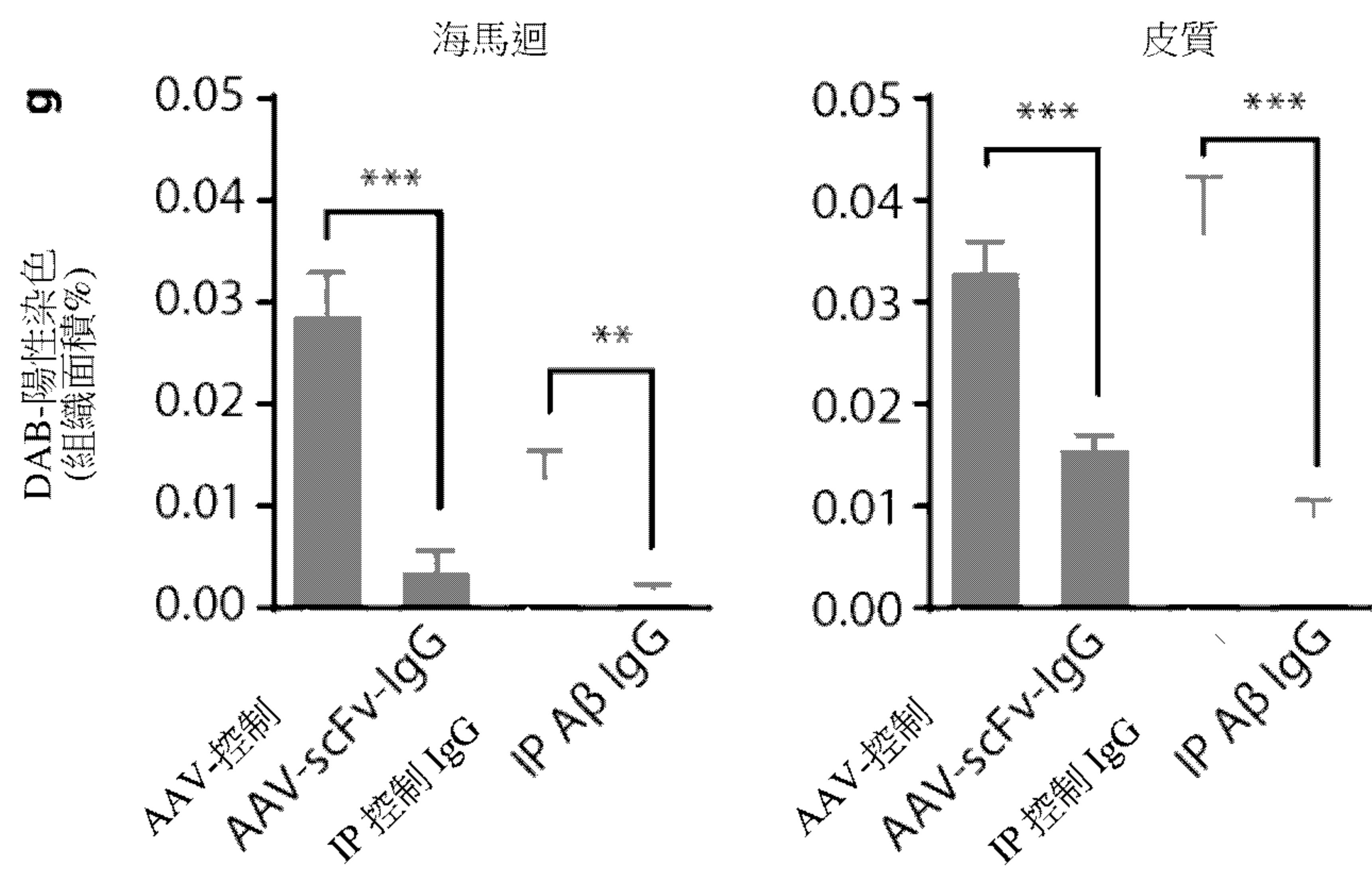
【圖 4C】



【圖 5A】



【圖 5B】



【圖 5C】



202110878

【發明摘要】

【中文發明名稱】 在神經系統中表現抗原結合蛋白

【英文發明名稱】 EXPRESSION OF ANTIGEN-BINDING PROTEINS IN
THE NERVOUS SYSTEM

【中文】

本發明提供表現二價結合成員的重組載體；以及使用該等載體來修飾神經系統之細胞，以在帶有諸如神經退化性疾病的神經疾病的患者腦部中表現該等結合成員的方法。

【英文】

Provided herein are recombinant vectors that express bivalent binding members and methods of using the vectors to modify cells of the nervous system to express the binding members in the brain of patients having a neurological disease such as a neurodegenerative disease.

【指定代表圖】 圖1A至圖5C

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 在神經系統中表現抗原結合蛋白

【英文發明名稱】 EXPRESSION OF ANTIGEN-BINDING PROTEINS IN
THE NERVOUS SYSTEM

【技術領域】

【0001】 本發明提供表現二價結合成員的重組載體；以及使用該等載體來修飾神經系統之細胞，以在帶有諸如神經退化性疾病的神經疾病的患者腦部中表現該等結合成員的方法。

【先前技術】

【0002】 阿茲海默症(AD)的特徵在於進行性神經退化，導致記憶喪失與認知功能衰退。其病理學特徵包括細胞外類澱粉斑塊和神經元內tau原纖維的累積。已經積極研究靶向類澱粉 β ($A\beta$)的療法多年，因為其在遺傳和病理學上介入AD (Tcw and Goate, *Cold Spring Harb Perspect Med.* (2017) 7(6): pii a024539)。雖然類澱粉前體蛋白(APP)和 $A\beta$ 的含量升高與AD的發病機制有關，但 $A\beta$ 肽以不同的構形和原纖維狀態存在，且就治療益處來說尚不清楚應靶向哪種物質(Benilova et al., *Nat Neurosci.* (2012) 15:349-57)。

【0003】 儘管存在著這種不確定性，在臨床上已針對不同形式的 $A\beta$ 來廣泛測試被動免疫療法；然而，這些方法已經受到其他問題所阻礙。首先，血腦障壁(BBB)限制了生物大分子的運輸，必須在周邊注射高劑量才能在腦中達到治療相關水平。在高劑量下，幾個抗 $A\beta$ 抗體在臨床試驗中引起了不良反應，代表為類澱粉相關成像異常(ARIA)；這些不良反應被認為是由抗體積累在血管類澱粉位點處所引起，經由Fc依賴性效應子功能觸發局部發炎(Mo et al., *Ann Clin Transl Neu.* (2017) 4:931-42)。其次，有需要將含量維持在最小治療劑量之上，這需要長期被動免疫療法，需要患者參與和順應性以及大量的商品成本。

【0004】 將基因轉移到中樞神經系統(CNS)允許在神經元細胞內產生治療性蛋白，因此可以避開BBB。已經試圖在CNS中以AAV媒介完整免疫球蛋白(IgG)或單鏈可變片段(scFv)的表現，但是這兩種方法都具有與生俱來的局限性(Sudol et al., *Mol Ther.* (2009) 17:2031-40； Ryan et al., *Mol Ther.* (2010) 18:1471-81； Levites et al., *J Neurosci.* (2006) 26:11923-28； Levites et al., *J Neurosci.* (2015) 35:6265-76； Kou et al., *JAD.* (2011) 27:23-38； Fukuchi et al., *Neurobio Dis.* (2006) 23:502-11； Liu et al., *J Neurosci.* (2016) 36:12425-35)。在CNS中表現IgG的重鏈和輕鏈只有使用自我裂解F2A序列來完成，而自單啟動子匣生成兩條鏈。F2A肽維持附接至重鏈或輕鏈，而且具有潛在的免疫原性(Saunders et al., *J Vir.* (2015) 89:8334-45)。另一方面，以基因為基礎遞送scFV蛋白往往伴隨著親和力明顯喪失，因為失去了效價。移除Fc區也會導致FcRn結合喪失，從而導致周邊半衰期更短並且降低抗原(Ag)結合的scFv經由逆向胞吞轉送從腦中流出(Deane et al., *J Neurosci.* (2005) 25:11495-503； Boado, et al., *Bioconjug Chem.* (2007) 18:447-55； Zhang et al., *J Neuroimm.* (2001) 114:168-72； Schlachetzki et al., *J Neurochem.* (2002) 81:203-6)。因此，對於CNS疾病(諸如阿茲海默症)來說，抗體療法具有希望，但受到將治療性蛋白質引入罹病腦的難題所圍限。是以，就基於抗體的療法來說，有需要改善中樞神經系統通道(access)。

【發明內容】

【0005】 本發明提供一種在神經系統的細胞中表現二價結合成員的方法，包含將編碼包含抗體重鏈可變域(V_H)，抗體輕鏈可變域(V_L)和IgG Fc區之多肽的表現匣引入細胞，其中V_H和V_L形成特異地結合至目標蛋白的抗原結合位點，並且在細胞中表現後，多肽的兩個分子形成對目標蛋白具有特異性的二硫鍵結同源二聚二價結合成員。

【0006】 在一些具體例中，神經系統的細胞是神經元、神經膠細胞，室管膜細胞或腦上皮細胞。在進一步的具體例中，神經膠細胞選自寡樹突細胞、星形細

胞、外被細胞，許旺氏細胞和微膠細胞。在一些具體例中，細胞是人類細胞，諸如人類患者腦中的細胞。

【0007】 在一些具體例中，目標蛋白是在腦中表現的蛋白，並且可以是類澱粉 β 肽(A β)、tau、SOD-1、TDP-43，ApoE或 α -突觸核蛋白。

【0008】 在一些具體例中，該多肽自N端至C端包含，(i) V_H、肽連接子，以及V_L；或V_L，肽連接子和V_H；和(ii) IgG Fc區。在進一步的具體例中，肽連接子包含序列GGGGS (SEQ ID NO: 3)；例如，肽連接子具有[G₄S]₃的序列(SEQ ID NO: 2)。

【0009】 在一些具體例中，本發明的二價結合成員結合至新生兒Fc受體(FcRn)，但是由於IgG Fc區中的一或多個突變，它不結合至Fc γ 受體。

【0010】 在一些具體例中，本發明方法包含投與含有表現匣的病毒載體。病毒載體可以是重組病毒。在進一步的具體例中，重組病毒經由顱內注射，鞘內腔注射或大池內注射而被引入患者的腦部。其他重組病毒可以是，例如重組腺相關病毒(rAAV)，例如，rAAV血清型1或2。

【0011】 在一些具體例中，多肽的表現是受到持續性活化啟動子或可誘導型啟動子的轉錄控制。

【0012】 本發明方法可用於治療患有下列的患者：神經退化性疾病，例如阿茲海默症、類澱粉腦血管病變、突觸核蛋白病、tau蛋白病，或肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)。

【0013】 在另一個態樣中，本發明提供一種治療神經退化性疾病的方法，包含向有需要的患者投與治療有效量之組成物，該組成物包含本文所揭示的病毒載體，該病毒載體表現本發明的二價結合成員。

【0014】 在另一個態樣中，本發明提供了一種二價結合成員，用於治療有需要的患者；以及一種二價結合成員供製造用於治療有需要之患者的藥物的用途，其中該患者患有例如神經退化性疾病，例如阿茲海默症、類澱粉腦血管病變、突觸核蛋白病、tau蛋白病，或ALS。

【0015】 在以下的詳細說明中，本發明的其他特徵，目的和優點是顯而易見的。然而，應當理解，詳細說明雖然指出了本發明的具體例和態樣，但是僅以例示而非限制的方式提供。根據詳細說明，本發明範圍內的各種改變和修改對於那些習於技藝者來說將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0016】 圖1A-C顯示AAV-IgG載體的構建和特徵鑑定。

【0017】 圖1A顯示關於完全重鏈和輕鏈表現的載體設計。標出了基因體的大小。

【0018】 圖1B，左圖顯示相較於注射PBS之對照小鼠所測量的huIgG，AAV- α A β IgG從腦持續表現和分泌。標繪點表示平均值 \pm SEM，n=每組8隻小鼠。右圖顯示AAV在腦中媒介的AAV- α A β IgG表現相對於習知周邊投予 α A β IgG的動力學。圖式顯示平均值 \pm SEM。**p<0.01，注射後第7週的單因子ANOVA，每個時間點n=5隻小鼠。

【0019】 圖1C顯示神經元的有色顯微照片，神經元在整個海馬迴(CA2詳細示出)表現huIgG轉基因，其中一些GFAP+星形細胞附近也表現huIgG。Cc=胼胝體。綠色：人類IgG (huIgG)。紅色：膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)。藍色：DAPI。

【0020】 圖2A和2B顯示在阿茲海默症的小鼠模型中，AAV- α A β IgG的抗原結合。

【0021】 圖2A顯示顱內(AAV- α A β IgG或AAV-IgG Control)以及周邊給藥(α A β IgG)的研究設計。

【0022】 圖2B顯示AAV- α A β IgG或AAV-IgG Control在海馬迴和上皮質的表現。右圖的影像顯示在額葉皮質中結合至斑塊的IgG。比例尺=10 μ m。藍色：DAPI。綠色：huIgG。紅色：4G8 + GFAP。

【0023】 圖3A-C顯示AAV- α A β IgG神經元表現和神經毒性的評估。

【0024】 圖3A，左圖顯示與注射PBS (假)的動物或如同在AAV- α A β IgG組中摻有同等水平huIgG的假腦均質物相比，從注射AAV- α A β IgG的SCID小鼠的半腦溶解產物中偵測到huIgG重鏈和輕鏈的肽。右圖顯示與在SCID小鼠體內中央或周邊表現的總huIgG相比，功能性huIgG的定量。數據表示為平均值 \pm SEM。
** $p < 0.01$ ，不成對司徒頓t檢定。

【0025】 圖3B，左圖顯示與PBS對照相比，在海馬迴內AAV- α A β msIgG表現持續16週後，C57BL/6小鼠腦海馬迴的H&E染色。插圖顯示細節，箭頭指向代表性透明包涵體。比例尺=100 μ m。結果在右圖中彙整為評比有或沒有這種病理學的動物數目。

【0026】 圖3C顯示相對於PBS，依據免疫組織化學(IHC)膠質原纖維酸性蛋白(GFAP)分析的神經發炎證據。左圖顯示GFAP+區域的定量(IHC)。在右圖，每個圓圈代表一隻小鼠。槓表示相對於PBS常規化之GFAP+區域的組別平均值 \pm SEM。
*** $p < 0.001$ ，不成對司徒頓t檢定， n =每組8隻小鼠。

【0027】 圖4A-C顯示AAV-scFv-IgG載體的構建和特徵鑑定。

【0028】 圖4A，左圖顯示scFv-IgG設計的示意圖。中圖顯示經純化scFv-IgG的還原或非還原SDS-PAGE分析證明蛋白質的純度和正確二硫依賴性二聚化。右圖表比較scFv-IgG相對於IgG形式的抗原結合親和力(M)。

【0029】 圖4B，左圖顯示在將AAV周邊IV注射入C57BL/6小鼠後1個月，藉由抗原酶聯免疫吸附分析(ELISA)測量的AAV-scFv-IgG的血清表現。右圖顯示AAV-scFv-IgG的腦表現。
*** $p < 0.001$ ，不成對司徒頓t檢定， n =每組5隻小鼠用於顱內注射，每組2隻小鼠用於IV注射。

【0030】 圖4C，左圖顯示載體的海馬迴靶向，以及在對取自與圖4B，右圖相同動物之小鼠腦的矢狀切片進行IHC之後，整個海馬迴形成的轉導。右圖顯示在雙側海馬迴注射AAV-scFv-IgG之後，不同腦區域切片中基於ELISA的scFv-IgG量化。Hipp=海馬迴。Ctx=上皮質區域。Str=紋狀體。

【0031】 圖5A-C顯示抗A β scFv-IgG的表現，擴散和斑塊結合。

【0032】圖5A顯示在注射抗A β AAV-scFv-IgG後一個月，成鼠的海馬迴與上皮質的完整掃描。就A β 斑塊(4G8，紅色)和6xHis (SEQ ID NO：9)(綠色)對切片進行免疫染色。比例尺=300 μ m。Cc=胼胝體。右圖的影像顯示距注射部位從近(1)到遠(6)的個別斑塊ROI (以A編號)。觀察到在整個皮質(左圖)有大量斑塊形成，且抗His抗體的染色與斑塊共定位(右圖)。感興趣的區域(ROI)的直徑為150 μ m。紅色：4G8。綠色：抗HIS抗體。藍色：DAPI。

【0033】圖5B，左圖顯示研究設計的概略。右圖的影像顯示來自經注射AAV的小鼠的冠狀切片的海馬迴。IHC揭示了在注射側的整個海馬迴有標記(紅色箭頭)，其中對側海馬迴額外有轉導。注射AAV-empty的腦未顯示任何抗His標記。比例尺=1 mm。

【0034】圖5C顯示在每一個別組別之動物的皮質與海馬迴中，斑塊沉積的量化。N=每組10-13隻動物，每隻動物3個切片。***p<0.001單因子ANOVA加上多重比較。誤差槓代表平均值的標準差(SEM)。

【實施方式】

【0035】本發明提供一種在沒有利用現存表現方法所見之副作用的情況下，於神經系統的細胞中表現二價結合成員的方法。神經系統的細胞天然不表現抗體。先前的研究已證明，在腦中表現完全抗體會引起神經毒性。與在腦細胞中表現野生型IgG的常規方法相比，本發明的表現方法出乎意料得到更高的產率(例如，高兩倍或更多倍)與更低的毒性(例如，如由缺乏可偵測到神經元內透明蛋白累積在注射部位所指明)。在不受到理論束縛的情況下，發明人設想神經系統中的細胞不具備有效表現並裝配天然抗體的能力，且非成對抗體鏈形成對細胞有毒的包涵體；然而，本發明的表現方法藉由將欲表現的多肽鏈數目從兩條減少到一條來克服這個問題。本發明的表現方法也優於在腦中表現scFv的先前方法，因為本發明方法允許表現結合性更高且藥物動力學概況更好(例如半衰期)的結合分子。

神經系統的細胞

【0036】 本發明提供一種神經系統的細胞表現(例如，包括分泌)二價分子的方法，該二價分子對表現在神經系統(諸如中樞神經系統，包括腦還有脊髓)中之目標蛋白具有特異性。用於表現本發明之結合成員的神經系統的細胞可以是在神經系統中的任何細胞類型，諸如在腦部中的任何細胞類型。例如，本發明方法可在下列中表現表現結合成員：神經元細胞(例如，神經元間、運動神經元、感覺神經元、腦神經元、多巴胺神經元、膽鹼神經元、麩胺酸神經元、GABA神經元，或血清素神經元)；神經膠細胞(例如寡樹突細胞、星形細胞、外被細胞，許旺氏細胞或微膠細胞)；室管膜細胞；或腦上皮細胞。在一些具體例中，這些細胞是人類細胞。該等細胞還可以是那些位於人類腦部的任何目標區域內者，諸如海馬迴、皮質、基底神經節，中腦或在後腦。

二價結合成員

【0037】 本發明提供一種二價結合成員，其表現於神經系統的細胞中，且結合表現於神經系統(諸如腦)中的目標抗原。目標抗原可以是例如媒介神經疾病(諸如神經退化性疾病)的蛋白質。感興趣的抗原包括但不限於類澱粉 β 肽(A β)、tau、SOD-1、TDP-43，ApoE和 α -突觸核蛋白。

【0038】 二價結合成員是多肽鏈的同源二聚體，其中多肽鏈包含抗體的抗原結合域和恆定區(例如IgG，諸如人類IgG的鉸鏈區，CH2域和CH3域)。因此，同源二聚體包含抗體的兩個抗原結合位點與Fc域。

【0039】 在一些具體例中，多肽鏈的抗原結合域是單鏈Fv (scFv)域。scFv域包含抗體重鏈可變區(VH)和抗體輕鏈可變區(VL)，其中VH和VL視情況被肽連結子隔開並交互作用而形成抗原結合位點。獲得針對感興趣抗原的scFv多肽的方法是本技藝中已知的。例如，可以篩選噬菌體展示庫來獲得VH和VL組合，其以高親和力結合至抗原；或者可從特異地結合至抗原之現有抗體推導出VH和VL序列。

【0040】 可以在有或沒有肽連接子的情況下將抗原結合域，諸如scFv域(例如，諸如本文所例舉的那些，包括9-Gly重複序列連接子(SEQ ID NO：7))融合至抗體

的恆定區，其中兩條多肽鏈的恆定區透過一或多個二硫鍵而形成抗體Fc域。如本文中所使用的，術語「Fc區」或「Fc域」是指天然免疫球蛋白的一個部分，其是由免疫球蛋白的一或多個恆定域二聚締合所形成。

【0041】 在一些具體例中，Fc域的各個多肽序列可以包括單一免疫球蛋白(Ig)重鏈的一部分，始於木瓜酶切割位點上游的鉸鏈區內，並止於Ig重鏈的C端處。Fc域可包含免疫球蛋白的鉸鏈區，CH2和CH3。取決於Fc域是由哪一種Ig同型衍生而來，Fc域可以包括其他恆定域(例如，IgE或IgM的CH4域)。Fc域可相對於野生型序列含有突變，例如以提高融合二聚體蛋白的穩定性(例如，半衰期)及/或以修改融合二聚體蛋白的效應子功能。突變可以是一或多個胺基酸的添加、缺失，或取代。

【0042】 在一些具體例中，Fc域是衍生自IgG (諸如人類IgG)，並且可以是任何IgG亞型，諸如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型。在這種情況下，本發明的scFv-Fc也稱為scFv-IgG。Fc域可包含IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4鉸鏈區)的整個鉸鏈區或僅只其一部分。在一些具體例中，Fc域是衍生自人類IgG1，並且包含突變L234A和L235A (「LALA」)(EU編號)，使得Fc域不結合至高親和力Fcγ受體且ADCC/CDC效應子功能降低。可以引入人類IgG1的其他Fc突變包括，但不限於 N297Q、N297A、N297G、C220S/C226S/C229S/P238S、C226S/C229S/E233P/L234V/L235A，以及L234F/L235E/P331S (EU編號)。參見，例如Wang et al., *Protein Cell*. (2018) 9(1):63-73；Strohl, *Curr Opin Biotechnol*. (2009) 20(6):685-91；Johnson et al., *Nat Med*. (2009) 15(8):901-6。在一些具體例中，結合成員具有來自人類IgG4的鉸鏈區，其中該鉸鏈區含有S228P突變(EU編號)，以減少結合成員的兩條多肽鏈解離。在某些具體例中，該Fc域是衍生自人類IgG4，且包含突變S228P和L235E (EU編號；對應於Kabat編號的S241P和L248E)，其分別降低Fcγ半分子交換和效應子功能(Reddy et al., *J Imm*. (2000) 164:1925-33)。喪失或降低ADCC/CDC效應子功能會使得結合成員結合至目標抗原，而不會造成細胞毒性或引起神經系統中不樂見到的發炎。在進一步的具體

例中，經修飾的Fc域保有結合至FcRn的能力，FcRn為新生兒Fc受體。保有FcRn結合能力允許受到抗原結合的結合成員透過FcRn媒介的逆向胞吞轉送作用從神經系統(諸如腦)中被移除。

【0043】 在一些具體例中，scFv-Fc結合成員的VH和VL域，及/或結合成員的scFv域和Fc域，經由肽連接子而連接。合適的肽連接子是本技藝中眾所周知的。參見，例如Bird et al., *Science* (1988) 242:423-26；以及Huston et al., *PNAS*. (1988) 85:5879-83。肽連接子可能富含甘胺酸及/或絲胺酸。肽連接子的實例是G、GG、G₃S (SEQ ID NO: 1)、G₄S (SEQ ID NO: 3)和[G₄S]_n (n = 1、2、3或4；SEQ ID NO: 4)。在一些具體例中，使用9-Gly重複序列連接子(SEQ ID NO: 7)將scFv連接至本發明scFv-IgG形式的IgG部分。

【0044】 在特定的具體例中，本發明的scFv-IgG被設計成具有經由肽連接子(使用[G₄S]₃型肽連接子(SEQ ID NO: 2))而連接的可變域。[G₄S]₃型連接子(SEQ ID NO: 2)在scFv結構中已被廣泛用於連接可變域(Huston, 上文)。如本文所用，[G₄S]₃型連接子(SEQ ID NO: 2)是指[G₄S]₃ (SEQ ID NO: 2)或其功能性變體(例如，相對於[G₄S]₃ (SEQ ID NO: 2)具有至多四個胺基酸修飾(例如，插入，缺失及/或取代)的肽連接子)。舉例來說，[G₄S]₃ (SEQ ID NO: 2)的功能性變體可以是胺基酸序列 SGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5) 或胺基酸序列 GGGGSGGGGXGGGGYGGGGGS (X = S, A或N, 並且Y = A或N；SEQ ID NO: 6)。

【0045】 在一些具體例中，連接子的胺基酸序列可以經過修飾。修飾可包括改變連接子長度(例如，以調節靈活性)的缺失或插入，或胺基酸取代(包括例如從Gly到Ser，反之亦然)。

【0046】 下面顯示針對Aβ的scFv-Fc多肽，僅用於說明scFv-Fc多肽的一種形式。以下序列，從N端至C端含有信號肽(斜體)、VL、[G₄S]₃ 連接子(SEQ ID NO: 2)(底線)、VH、G₉ (SEQ ID NO: 7)(框線)，IgG1鉸鏈和Fc域，以及附接至6xHis 標籤(SEQ ID NO: 9)的短連接子(粗體)。

MDSKGSSQKG SRLLLLLLVVS NLLLPQGVLA SEIVMTQTPL SLPVSLGDRA
 SISCRSGQSL VHSNGNTYLH WYLQKPGQSP KLLIYTVSNR FSGVPDRFSG
 SGSGSDFTLT ISRVEAEDLG VYFCSQNTFV PWTFGGGTKL EIKRTSSGGG
GSGGGGSGGG GSEVQLQQSG PEVVKPGVSV KISCKGSGYT
 FTDYAMHWVK QSPGKSLEWI GVISTKYGKT NYNPSFQGQA TMTVDKSSST
 AYMELASLKA SDSAIYYCAR GDDGYSWGQG TSVTVSSAST
GGGGGGGGGS GVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD VLTITLTPKV
 TCVVVDISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT QPREEQFAST FRSVSELPIM
 HQDWLNGKEF KCRVNSAAFP APIEKTISK T KGRPKAPQVY TIPPPKEQMA
 KDKVSLTCMI TDFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMD TDGSYFVYSK
 LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHTEK SLSHSPGSGS
GSGSHHHHH (SEQ ID NO: 8)

在神經系統中表現結合成員

【0047】 可以藉由已知方法將含有結合成員之表現匣的表現構建體引入神經系統的細胞。例如，就活體內或離體遞送來說，可以使用病毒載體。在一些具體例中，表現載體以穩定的游離基因體(episome)形式存在於細胞中。在其他具體例中，表現載體被併入到細胞的基因體中。表現載體可以包括表現控制序列，諸如啟動子、增強子，轉錄訊號序列和轉錄終止序列，其等允許在神經系統的細胞中表現結合成員的編碼序列。合適的啟動子包括但不限於，逆轉錄病毒RSV LTR啟動子(視情況加上RSV增強子)、CMV啟動子(視情況加上CMV增強子)、CMV立即早期啟動子、SV40啟動子、二氫葉酸還原酶(DHFR)啟動子、β肌動蛋白啟動子、磷酸甘油酯激酶(PGK)啟動子、EF1α啟動子、MoMLV LTR、CK6啟動子、轉甲狀腺素蛋白啟動子(TTR)、TK啟動子、四環素反應啟動子(TRE)、HBV啟動子、hAAT啟動子、LSP啟動子、嵌合肝特異性啟動子(LSP)、E2F啟動子、端粒酶(hTERT)啟動子，和CMV增強子/雞β-肌動蛋白/兔β-球蛋白啟動子(CAG啟動子；Niwa et al., *Gene* (1991) 108(2):193-9)。在一些具體例中，啟動子包含人

類 β -葡萄糖醛酸糖苷酶啟動子或連接至雞 β -肌動蛋白(CBA)啟動子的CMV增強子。啟動子可以是組成型，誘導型或阻遏型啟動子。

【0048】 可以採用任何將核苷酸序列引入細胞的方法，包括但不限於電穿孔、磷酸鈣沉澱、顯微注射、陽離子或陰離子脂質體、結合核定位信號的脂質體，天然脂質體(例如，胞外體)或病毒轉導。

【0049】 就活體內遞送結合成員的表現匣來說，可以使用病毒轉導。本技藝中已知各種病毒載體可以經過習於技藝者改造供用於本發明中，例如重組腺相關病毒(rAAV)、重組腺病毒、重組逆轉錄病毒、重組痘病毒、重組慢病毒等。在一些具體例中，本文中所用的病毒載體是rAAV載體。AAV載體尤其適於CNS基因遞送，因為它們既感染分裂中的細胞，也感染非分裂中的細胞，並以穩定的游離基因體結構存在以進行長期表現，且免疫原性極低(Hadaczek et al., *Mol Ther.* (2010) 18:1458-61 ; Zaiss, et al., *Gene Ther.* (2008) 15:808-16)。可以使用任何合適的AAV血清型。例如，可以使用AAV血清型1、2或9。可以對AAV進行改造，使其衣殼蛋白在人類體內的免疫原性降低。在一些具體例中，使用AAV1是因為這個血清型表現出優異的實質擴散(parenchymal spread)，而且儘管以神經元轉導為主(像大多數AAV載體一樣)，但是這個血清型也會轉導星形細胞，其可能特別適合於高水平的蛋白表現和分泌。

【0050】 本文所述的病毒載體可以使用本技藝已知的方法來生產。可以採用任何合適的容許病毒感染(permissive)或包裝細胞來生產病毒顆粒。例如，哺乳動物細胞或昆蟲細胞可以用作包裝細胞株。

【0051】 可以經由顱內注射，鞘內腔注射或大池內注射來將諸如重組AAV病毒的表現構建體引入患者的腦部。

應用

【0052】 本發明的表現方法可以用於將治療性結合成員遞送至患者的神經系統。然後，將由神經系統中受到轉染/轉導的細胞表現並分泌，且在諸如腦部的神經系統中局部發揮其治療活性。這些方法可用於靶向神經退化性疾病的致病

性抗原，神經退化性疾病為諸如阿茲海默症(例如， $A\beta$ 和ApoE)、類澱粉腦血管病變、突觸核蛋白病(例如， α -突觸核蛋白)、tau蛋白病(例如，tau)，或ALS (例如，SOD-1和TDP-43 (Pozzi et al., *JCI* (2019) doi:10.1172/JCI123931))、帕金森氏症(例如， α -突觸核蛋白)、癡呆(例如，tau蛋白(Sigurdsson, *J Alzheimers Dis.* (2018) 66(2):855-6))、路易氏體症候群(例如 α -突觸核蛋白(Games et al., *J Neurosci.* (2014) 34(28):9441-54))、杭丁頓氏舞蹈症(例如Huntingtin (WO2016016278))，和多系統萎縮(例如，P25 α 和 α -突觸核蛋白(Games，上文))。在一個特定的具體例中，神經退化性疾病是阿茲海默症。在神經系統中局部表現的結合成員將靶向神經系統(諸如腦部)的致病性抗原並予以清除。

【0053】 因此，本發明提供一種在有需要的個體(諸如人類患者)體內治療神經疾病(諸如神經退化性疾病)的方法，包含：將治療有效量(例如，允許結合成員充分表現以引起所需治療效果的量)的病毒載體(例如rAAV)引入該個體的神經系統，該病毒載體包含針對目標抗原之結合成員的編碼序列，該編碼序列可操作地連接至在神經系統的細胞中具有活性的轉錄調控元。

醫藥組成物

【0054】 在一些具體例中，本發明提供一種包含病毒載體(諸如重組rAAV)的醫藥組成物，該病毒載體的重組基因體包含scFv-Fc結合成員的表現匣。醫藥組成物可進一步包含藥學上可接受的載體(carrier)，例如水、鹽水(例如磷酸鹽緩衝鹽水)、右旋糖、甘油、蔗糖、乳糖、明膠、聚葡糖，白蛋白或果膠。此外，組成物可以包含輔助物質，諸如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑，或增強醫藥組成物效力的其他藥劑。醫藥組成物可含有遞送載體(vehicle)，諸如脂質體、奈米膠囊、微粒、微球，脂質顆粒和囊泡。

【0055】 可以例如藉由靜脈內施用來完成向個體遞送rAAV。在某些情況下，期望將rAAV局部遞送到腦組織、脊髓、腦脊髓液(CSF)、神經元細胞、神經膠細胞、腦膜、星形細胞，寡樹突細胞，間質空間與類似者。在一些情況下，可以藉由注射入腦室區域以及紋狀體，和神經肌肉交接處或小腦小葉而將重組AAV

直接遞送至CNS。可以使用本技藝已知的神經外科技術(例如藉由立體定位注射)，利用針，導管或相關裝置來遞送AAV (參見，例如Stein et al., *J Vir.* (1999) 73:3424-9；Davidson et al., *PNAS.* (2000) 97:3428-32；Davidson et al., *Nat Genet.* (1993) 3:219-23；與Alisky and Davidson, *Hum. Gene Ther.* (2000) 11:2315-29)。

【0056】 投藥途徑包括，但不限於腦內、鞘內腔、顱內、腦內、腦室內、鞘內腔、大池內、靜脈內，鼻內或眼內投予。在一些具體例中，在直接投予到腦脊髓液(CSF)中之後(例如，經由鞘內腔及/或腦內注射，或大池內注射)，病毒載體擴散在整個CNS組織內。在其它具體例中，病毒載體在靜脈內投予之後穿過血腦障壁，並實現廣泛擴散分佈在個體的整個CNS組織內。在一些態樣中，該病毒載體具有靶向明確CNS組織的能力(例如，CNS組織向性)，其以高效率實現穩定且無毒的基因轉移。

【0057】 舉例來說，醫藥組成物可以透過腦室內投予(例如至患者前腦的腦室區域，諸如右側腦室、左側腦室、第三腦室或第四腦室中)被提供給患者。醫藥組成物可以透過腦內投予被提供給患者，例如，將組成物注射至或接近腦部的大腦、延腦、橋腦、小腦、顱內腔、腦膜、硬腦膜、蛛網膜或腦軟膜。在一些情況下，腦內投予可包括將試劑投予至腦周圍蛛網膜下腔的腦脊髓液(CSF)中。

【0058】 在一些情況下，腦內投予涉及使用立體定位程序進行注射。立體定位程序在本技藝中是眾所周知的，且通常涉及使用電腦與3維掃描裝置，它們一起用於導引注射至特定腦內區域(例如心室區域)。也可以使用顯微注射泵(例如，來自World Precision Instruments)。在一些情況下，使用顯微注射泵來遞送包含病毒載體的組成物。在一些情況下，組成物的輸注速率在1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 至100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的範圍內。如習於技藝者所理解的，輸注速率將取決於多種因素，包括例如個體的種族、個體的年齡、個體的體重/身材、AAV的血清型，所需的劑量和靶向的腦內區域。因此，在某些情況下，其他輸注速率也會被習於技藝者認為是合適的。

【0059】 除非本文另有定義，否則與本發明結合使用的科學和技術術語應具有那些在本技藝中具有通常技術者一般理解的含義。下面說明例示性方法和材

料，儘管與本文描述的方法和材料類似或等同的方法和材料也可以用於實施或測試本發明。在相衝突的情況下，以本說明書(包括定義)為準。一般來說，本文所述與細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、合成有機化學、醫學和藥物化學，以及蛋白質和核酸化學和雜交的技術相關的命名是那些在本技藝中周知且常用者。酶促反應和純化技術是根據製造商的說明書進行，如本技藝通常完成的或如本文所述。此外，除非上下文另有要求，否則單數術語應包括複數而複數術語應包括單數。在本篇說明書和具體例中，詞語「具有」和「包含」或變體將被理解為暗示包括所述整數或整數組，但不排除任何其他整數或整數組。「大約」可以理解為在指定值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之內。除非上下文另有明確說明，否則本文提供的所有數值均由術語「大約」修飾。應理解，本文所述的發明態樣和變化形式包括「由態樣和變化形式組成」及/或「基本上由態樣和變化形式組成」。本文提及的出版物和其它參考文獻均以全文引用的方式併入本文。儘管本文引用了許多文件，但是這樣的引用並不意味著承認這些文件中的任何一者構成了本技藝先前技術的一部分。在相衝突的情況下，以本說明書(包括定義)為準。另外，材料，方法和具體例僅是說明性的，並不希望是限制性的。

【0060】 為了更充分理解本發明，闡述以下實例。這些實例僅出於說明目的，而不應以任何方式解釋為限制本發明的範圍。

實例

【0061】 在以下的工作實例中，吾人證明：融合至Fc域(保有FcRn結合但缺乏Fcγ受體(FcγR)結合)的單鏈抗體(Ab)，又稱為沉默scFv-IgG，在用AAV基因轉移後可以表現並釋放到CNS中。藉由將Fc併入scFv-IgG設計中，該分子可重新獲得典型IgG的雙價，從而對多聚體目標(如聚集的類澱粉)提供更高的結合性，並在必要時提供調節Fc依賴性信號傳導的能力。在先前使用單獨scFv經由FcRn媒介從腦部流出而進行的抗體-抗原清除所觀察到的類澱粉病理學降低，可以在血腦障

壁處保留Fc與FcRn的結合。雖然腦中的典型IgG表現會導致神經毒性的跡象，但這種經修飾抗體(Ab)從神經元細胞中有效分泌並保有靶標特異性。腦中的穩態水平超過了靜脈內注射Ab所達到的峰值水平。在進行性類澱粉斑塊積聚的轉基因ThyAPPmut小鼠模型中，與對照相比，這個scFv-IgG的AAV表現降低了皮質和海馬迴斑塊負荷。這些發現暗示著，沉默的抗A β scFv-IgG的CNS基因遞送在相關疾病模型中具有良好的耐受性，持久地表現且具功能性，證明了這個方法在治療阿茲海默症和其他神經疾病中的潛力。

【0062】 下面描述在以下實例中描述的研究中所使用的材料和方法。

研究設計

【0063】 這項研究開始是設計用於AAV媒介遞送抗A β IgG至腦部，以供治療阿茲海默症。設計這些IgG構建體，並開始在活體外進行2-4次測試，以在活體內實驗之前確認正確的表現，裝配和抗原結合活性。C57BL/6或SCID動物研究的樣品大小是根據先前實驗觀察到的變異性所設定的，先前實驗是使用立體定位遞送AAV而在活體內表現轉基因，並針對每個實驗進行了定義。測試活體內表現的研究進行了2-3次。設定ThyAPPmut小鼠用於類澱粉斑塊負荷量化的樣品大小，以說明在斑塊形成時的預期動物間變異性。根據先前使用這個品系的先前研究，每組n \geq 10進行一次功效研究。在所有研究中將動物隨機分配到各組。由不知道(blind to)實驗條件的研究人員進行自動影像分析的ROI識別。所有動物研究均根據相關指南進行。

AAV-IgG設計

【0064】 可變區是源於來自原有13C3鼠類(AAV- α A β mIgG)或人類化序列(用於AAV- α A β IgG)之抗A β 抗體區(Schupf et al., *PNAS* (2008) 105:14052-7)，分別如在專利申請案WO2009/065054和WO2010/130946中所述。藉由將含有兩個胺基酸取代的人類IgG4重鏈(據描述會減少半分子(S241P)和效應子功能(L248E)(Reddy et al., *J Imm.* (2000) 164:1925-33)，以及 κ 輕鏈之編碼序列插入雙啟動子匣(不需要圖1A中所示的2A肽裂解序列)來生成huIgG表現載體。關於需要小鼠IgG1框架的

實驗，使用原有13C3抗體(Vandenberghe et al., *Sci Rep.* (2016) 6:20958)，並在重鏈中添加了N297A突變以降低效應子功能。AAV-Control IgG載體編碼靶向非哺乳動物抗原的huIgG4 PE同型對照抗體。

ScFv-IgG設計

【0065】 顯示scFv-IgG的設計(圖4A；SEQ ID NO：8)。簡而言之，親本13C3抗類澱粉 β 抗體的可變輕鏈區和可變重鏈區是由3個重複序列的撓性G₄S連接子(SEQ ID NO：2)所連接，形成VL-VH scFv。scFv序列之後是又9-重複序列甘胺酸連接子(SEQ ID NO：7)(Balazs et al., *Nature* (2011) 481:81-4)，其包括天然鼠類IgG1鉸鏈和CH2與CH3域，以包含scFv-IgG的Fc區。與AAV- α A β msIgG一樣，Fc的天冬醯胺酸297突變成丙胺酸(N297A)以削弱效應子功能(Chao et al., *Immunol Invest.* (2009) 38:76-92；Jefferis et al., *Immunol Rev.* (1998) 163:59-76)。納入C端6xHis表位標籤(SEQ ID NO：9)有助於在小鼠中進行活體外純化與活體內偵測。scFv-IgG的表現是受到帶有Tbgh polyA的hCMV/hEF1a啟動子表現匣所驅動。

免疫耐受性

【0066】 為了誘導免疫耐受性，在第0、2和10天對小鼠IP注射7.5 mg/kg GK1.5抗CD4單克隆抗體(Bioxcell)。為了確認CD4 T細胞耗竭，在第12天藉由眼眶後採樣將血液採入塗覆肝素的試管中。在BD Fortessa上藉著CD45-FITC (純系104 BD Pharmigen™)，CD3e-AlexaFluor 647 (純系17A2，eBioscience)和CD4-PE (RM4-4純系，BioLegend)抗體利用標準方案，使用FACS分析來定量CD4+ T淋巴球。經GK1.5處理的動物的CD4減少，這是從CD4+淋巴球/總CD3+淋巴球的比率為0.04 +/- 0.008 (平均值+/- SEM)，相較於未經處理的小鼠為0.47 +/- 0.003獲得證實。

細胞培養，蛋白質表現及純化

【0067】 使Expi293™細胞(Life Tech)在Expi293T™無血清培養基(Life Tech)中繼代並用於蛋白質表現。經由脂質轉染(Fectopro, Polyplus)將表現質體轉染到Expi293™細胞中，並在4天後收集含有分泌蛋白的細胞培養基。無菌過濾後，經由固定型金屬親和層析法(IMAC)純化經6xHis (SEQ ID NO：9)標記的蛋白。簡

言之，在4°C下將蛋白批次吸附到鈷樹脂(Thermo Scientific™)過夜，用10倍管柱體積的磷酸鹽緩衝鹽水洗滌，然後用500 mM咪唑溶析。蛋白質透析到HEPES緩衝鹽水中過夜，濃縮(Centricon®)，並冷凍在-80°C下直到使用。

ELISA

【0068】 在25°C下，將96孔Immulon™ IIHB (Thermo)盤塗覆用於抗原ELISA的1 µg/mL Aβ₁₋₄₂ (Bachem H-1368)，或1 µg/mL小鼠抗huIgG多株Ab (Jackson 209-005-088)過夜，以捕獲碳酸鹽緩衝液中的總huIgG。將孔在TBS-0.5% tween (TBST)中洗滌5次，並在TBSTB (TBST+1.5%BSA)中阻斷1小時。使用經純化蛋白的標準曲線與血清或腦均質物同步運行，以便定量結合的scFv-IgG或huIgG。將樣品培育2.5小時，在TBST中洗滌3次，然後與結合有HRP的二級一起培育1小時。在TBST洗滌5次後，將孔與TMB受質一起培育5分鐘，然後用0.5M H₂SO₄淬滅。盤結合訊號是透過在450nm下的吸光度(Spectramax M5)定量。所有樣品均重複三次。

LC-MS/MS

【0069】 LC/MS/MS 實驗是在與NanoAcQuity LC系統(Waters)偶接的Q Exactive™質譜儀(Thermo Scientific™)上進行。用CaptureSelect™ HuIgG親和樹脂(Thermo Fisher)特異性富集並分離來自組織勻質物的IgG。DTT還原和烷基化後，藉由與胰蛋白酶/Lys-C (1 : 100 w/w)培育過夜來消化富集的IgG。透過添加1%甲酸(FA)終止消化。將所得的胰蛋白酶肽混合物上樣並分離至微毛細管柱(內徑75 µm，15 cm HSST3，1.8 µm，Waters)上。在PRM模式下以70,000的解析度(m/z 200)，AGC目標5×10⁶和最大注射時間500 ms來採集數據。計劃的納入清單是根據對照IgG的設定數據而產生。PRM方法透過2 Da隔離窗口對目標離子進行隔離，並以25的常規化碰撞能(NCE)進行碎片化。MS/MS掃描是用起始質量範圍為100 m/z來擷取，並取得作為設定質譜數據類型。使用Skyline (MacCoss Lab軟體)對前體離子和碎片離子進行定量。

表面電漿共振

【0070】 在600rpm下振盪，A β ₁₋₄₂肽(Bachem H-1368)在37°C下於10 mM HCl中以1 mg/mL培育過夜。使用胺偶合將所得的原纖維溶液直接固定在CM5感測晶片(GE Healthcare)上。以相對高的流速(50 μ L/min)將所產生的抗體或scFv-IgG溶液以50、30、20、10和5 nM於PBS-+P緩衝液(GE Healthcare)中注射以限制結合性影響。使用Biacore™ T200評估軟體處理數據，並透過扣除空白表面和僅注射緩衝液進行雙重引用，然後整體擬合至1：1結合模型。

AAV ITR質體和腺相關病毒載體製備

【0071】 將IgG或scFv-IgG的表現匣次選殖到含有AAV2-ITR的質體中，並根據需要保留A1AT填充序列DNA以維持AAV基因體大小以便正確包裝。在雙啟動子IgG ITR質體的情況下，不包含填充序列DNA，因為該匣已經是有效包裝所能允許的最大尺寸。AAV-Empty載體由CBA啟動子，Tbgh polyA和A1AT填充序列DNA組成。AAV2/1病毒是經由瞬時轉染產生的。簡而言之，使用PEI (聚乙烯亞胺)將三種質體(含ITR，AAV rep/cap和Ad輔助質體)以1：1：1：1的比例轉染HEK293細胞。Ad輔助質體(pHelper)得自Stratagene/Agilent Technologies (Santa Clara, CA)。如先前所述(Burnham et al., *Hum Gene Ther Methods* (2015) 26:228-42)，使用管柱層析法進行純化。病毒使用qPCR針對polyA序列滴定，而AAV在-80°C下存放於180 mM氯化鈉、10 mM磷酸鈉(5 mM磷酸二氫鈉+5 mM磷酸氫二鈉)，0.001% F68，pH為7.3直到使用。

動物

【0072】 除非另有說明，否則使用的動物是在2個月大時獲自Jackson Labs (Bar Harbor, USA)的C57BL/6雄鼠。在2個月大時從Jackson Labs獲得SCID成鼠(B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ)。與C57BL/6回交的ThyAPPmut轉基因小鼠描述於Blanchard et al., *Exp Neurol.* (2003) 184:247-6中。手術組被單獨豢養，以能使從腦手術適當恢復。將小鼠維持在12小時光/暗週期下，食物和水任食。將動物隨機分為不同組別，並由對治療組不知情的操作人員進行分析。

立體定位注射

【0073】 根據經動物護理和使用委員會批准的程序進行手術。小鼠利用腹膜內注射下列混合物(體積：10 ml/kg)而被深度麻醉：克他明(ketamine) (100 mg/kg；Imalgene；Merial, France)以及甲苯噻嗪(xylazine) (10 mg/kg；Rompun；Bayer, France)。在將動物置於立體定位框架(Kopf Instruments, USA)之前，先將小鼠頭皮剃毛並用維提定(Vetidine) (Vetoquinol, France)消毒，將局部麻醉劑布比卡因(bupivacaine)(2 mg/kg，體積為5 ml/kg；Aguettant, France)皮下注射到頭骨的皮膚上，且Emla (Lidocaine, Astrazeneca)被施加到耳朵。在手術期間，維生素A Dulcis可以保護眼睛免受光照，並用加熱毯將體溫保持在37°C恆定。

【0074】 以每分鐘0.5微升的速率注射樣品。將針頭留置2分鐘，以防止樣品流回針道，然後緩慢上提離開腦。對ThyAPPmut小鼠進行單側海馬迴注射或對所有其他小鼠進行雙側注射。海馬迴注射的坐標為：AP -2.0, DV -2.0，與ML +/-1.5。手術後，使小鼠保持溫暖並皮下注射卡洛芬(carprofen)(5 mg/kg，體積為5 ml/kg，Rimadyl®，Zoetis)，並持續觀察直至恢復。在研究結束時，小鼠用過量麻醉劑Euthasol® (USA)或克他明/甲苯噻嗪(France)安樂死。過量給藥後，小鼠保持溫暖，直到灌注冰冷PBS。

免疫組織化學

【0075】 在用冷PBS灌注後，將腦組織固定在10%中性緩衝福馬林(NBF)中。將經福馬林固定的組織包埋在石蠟中，然後在矢狀或冠狀面上以5 μm來切片。使用Leica BOND RX自動染色機對所有組織進行染色。關於免疫螢光染色，使用表位擷取溶液1 (ER1；檸檬酸鹽緩衝液，pH 6.0)進行熱媒介的抗原擷取歷時10分鐘。然後組織在山羊血清+ 0.25% triton X-100中阻斷/通透，接著與一級抗體在室溫下培育1小時，在TBST中洗滌，然後與二級抗體一起培育30分鐘。使用Spectral DAPI (Life)檢測細胞核。關於斑塊量化，經與生物素接合的4G8抗體(4G8純系，BioLegend 800701)免疫染色的組織使用Vectastain® ABC (PK-7100)套組，依照製造商的說明，而沒有抗原擷取或甲酸萃取。

抗體

【0076】 6xHis (SEQ ID NO : 9)(Abcam Ab9108, 1:1000 IHC, Invitrogen™ R931-25, 1:1000 Western, ELISA) GFAP (Ebiosciences, 41-9892-82, 1:200或Abcam Ab4674, 1:500 IHC) 4G8 (BioLegend 800701, 1:500 IHC)。二級抗體來自Life Technologies：Cy3山羊抗小鼠，Alexa Fluor®647山羊抗兔，Alexa Fluor®488山羊抗雞；全部為1:500。用於類澱粉DAB：4G8-生物素(BioLegend 800705 1:250)。影像分析

【0077】 免疫組織化學玻片以20X放大率使用Scanscope® XT亮視野影像掃描器(Aperio, Vista, CA)或AxioScanZ1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany)進行掃描。使用HALO™ 影像分析軟體(Indica Labs, Corrales, NM, USA)查看並分析GFAP IHC的整個玻片影像(WSI)。對於每個WSI，手動標註海馬迴區域，並使用HALO的自動面積定量演算法對GFAP免疫陽性區域進行分析。就每個樣品來說，將GFAP陽性面積除以所選ROI的總組織面積，以獲得免疫陽性面積百分比。關於斑塊分析，從六個月大的ThyAPPmut小鼠以三個不同的水平(相距50 μm)收集5 μm冠狀腦切片。手動標註皮質和海馬回的ROI。使用ZEN 2軟體(Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany)開發的訂做影像分析演算法，將類澱粉斑塊負荷定量為%DAB+組織面積。使用GraphPad Prism第6版(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)繪製數據。

統計學

【0078】 就超過兩組的實驗來說，使用Graphpad Prism (v6和v7)，利用單因子ANOVA與多重比較(Dunnett)進行統計分析。不成對司徒頓t檢定用於比較兩組。 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ ， $***p < 0.001$ 。樣品大小各不相同，並依據每個實驗來指定。

實例1：構建並特徵鑑定靶向β-類澱粉的AAV-IgG載體

【0079】 為了開發出基於基因表現的抗體，吾人使用雙啟動子表現匣來表現人類化形式的13C3抗體，其結合原原纖維(protofibrillar)和原纖維Aβ，但對單體形式不具親和力，如Schupf，上文中所述。IgG4重鏈包括S228P和L248E突變，該

等突變降低Fc γ 效應子功能和半分子交換(Yang et al., *Curr Opin Biotechnol.* (2014) 30:225-9 ; Reddy et al., *J Imm.* (2000) 164:1925-33)。

【0080】重鏈和輕鏈是由不同啟動子表現，而整個匣被設計成恰好在AAV基因體包裝極限(packaging limit)內(圖1A)。此處使用的雙啟動子設計避免了其他使用單啟動子，可是需要使用F2A裂解序列或內部核糖體進入位點以供雙順反子表現之設計所引起的潛在免疫原性或表現不穩定性(Saunders，上文；Mizuguchi et al., *Mol Ther.* (2000) 1:376-82)。將此匣包裝到AAV1衣殼(AAV- α A β IgG)中，以便直接注射至腦中，因為這個血清型表現出優異的實質擴散，同時以神經元轉導為主(像大多數AAV載體一樣)，這個血清型還會轉導星形細胞，可能更適合達到高水平的蛋白質表現和分泌。為了測試AAV- α A β IgG表現，使用了C57BL/6-SCID (SCID)小鼠來預防可能會干擾轉基因表現的抗huIgG免疫反應。抗體經由逆向胞吞轉送被主動運出腦。因此，吾人兩週一次收集血清來監控AAV- α A β IgG的腦表現。在將AAV- α A β IgG雙側注射至SCID小鼠的海馬迴(每側2E10 GC)後，以2週為間隔抽取血清，持續16週。在雙側海馬迴注射2E10 GC的AAV- α A β IgG後，使用A β ₁₋₄₂原纖維結合免疫分析來測量所表現的功能性抗體水平。

【0081】載體證明穩定表現至多16週(圖1B，左)。為深入了解AAV媒介的抗體如何在腦中表現，與在標準被動免疫治療方法之後所觀察到的水平進行比較，在不同時間點測量SCID小鼠海馬迴中的huIgG水平，還有接受單次靜脈內(IV)推注20 mg/kg α A β IgG的不同組別。向SCID小鼠的海馬迴雙側注射2E10 GC的AAV- α A β IgG一次，或在指定時間收集組織之前向其IV注射20 mg/kg經純化IgG，以產生腦暴露於IgG的時間過程。將同側海馬迴予以勻質並藉由抗原ELISA分析huIgG。AAV- α A β IgG載體於海馬迴中持續表現幾乎300 ng/g歷時整個時間過程，如由抗原ELISA所測量(圖1B，右)。在IV注射後24小時，海馬迴中的IgG水平接近200 ng/g，但這些水平因為IgG抗體被腦被清除而下降(與已知血清半衰期相符)，從而相較於AAV- α A β IgG在7週前減少11倍。

【0082】圖1C顯示在海馬迴中可偵測到神經元內和神經膠質的AAV-IgG表現。具體而言，透過針對huIgG表現產物的IHC，還有經由在海馬迴CA2中的形態學可簡單識別的神經，以及指出星形細胞表現的與GFAP共定位，證實在神經元和星形細胞中有表現(圖1C)。

【0083】這些數據顯示，在腦中AAV- α A β IgG載體可以比透過傳統被動免疫治療規程所能達到者有明顯更高的抗體穩態水平。

實例2：在阿茲海默症的小鼠模型中，AAV- α A β IgG的抗原結合

【0084】吾人接下來在類澱粉斑塊小鼠模型(這個模型表現突變型類澱粉前體蛋白)(ThyAPPmut)中表現AAV- α A β IgG，以評估腦轉導的程度並確定抗體是否分泌到細胞外空間中而在活體內結合斑塊。此模型在大約2-3個月大時開始在皮質中顯示出漸進性類澱粉斑塊積累(Blanchard et al., *Exp Neurol.* (2003) 184:247-63)。為了防止抗-huIgG抗體反應，在投予載體之前與之後，用消耗CD4的抗體對動物進行免疫耐受(圖2A)。簡言之，為了容易偵測到小鼠體內的IgG，吾人對2個月大雄性ThyAPPmut小鼠海馬迴內注射AAV- α A β IgG或表現同型對照IgG的AAV (AAV-IgG Control)。在第2-10天之間，藉由CD4 T細胞耗竭對ThyAPPmut小鼠進行免疫耐受。在第4-5天，將AAV- α A β IgG或同型對照載體AAV-IgG Control雙側注射到海馬迴中(每次注射2E10 GC)。單獨一組每週IP注射10 mg/kg的經純化 α A β huIgG歷時研究的持續時間，作為斑塊結合活性的陽性對照。8週後，收集5 μ m矢狀腦切片並進行免疫染色。先前已證明這個 α A β IgG劑量和IP遞送範例在ThyAPPmut動物活體內導致斑塊結合(Pradier et al., *Alzheimer's & Dementia* (2013) 9(4):P808-P809)。

【0085】注射後兩個月，在這些動物於額葉皮質中展現出斑塊沉積的年齡之時，對腦的矢狀切片進行處理用於IHC。具體而言，huIgG IHC染色揭示了整個海馬迴和針道周圍上皮質的表現。感興趣的放大區域(ROI)(500 μ m寬度)顯示huIgG在神經元中和海馬迴神經纖維網中表現的細節。相反的，經IP注射 α A β IgG組別的染色僅限於類澱粉斑塊，在細胞體中未展現出任何表現(圖2B，左)。關於

huIgG的螢光IHC，A β 斑塊和GFAP顯示huIgG與皮質斑塊共定位於AAV- α A β IgG和IV α A β IgG兩組中，而非AAV-IgG對照組中。特別地，AAV- α A β IgG和周邊遞送的 α A β IgG展現明確結合至4G8+類澱粉沉積物，而AAV-IgG對照沒有展現出可偵測到的結合(圖2B，右)。

【0086】 這些數據顯示，AAV- α A β IgG被分泌到細胞外空間，並且可以在注射部位遠端的腦區域中與A β 斑塊結合。

實例3：評估AAV- α A β IgG神經元表現以及神經毒性

【0087】 神經元細胞高度特化為分泌與神經傳遞有關的因子，而不是諸如IgG的大分子。在這些細胞中是否能有效進行IgG加工和分泌是未知的。為了確定神經元表現的IgG是否受到不當加工，我們進行了質譜分析以測量SCID小鼠中AAV- α A β IgG表現1個月後腦重鏈和輕鏈的總體水平。海馬迴的AAV- α A β IgG表現與重鏈的預期水平有關-類似於摻有經純化 α A β IgG的經鹽水注射的腦溶解產物，但相較於摻合對照有出乎意料低量的同源輕鏈(圖3A)。這個發現暗示，腦細胞的AAV- α A β IgG表現使得輕鏈生產不足，導致重鏈和輕鏈的比例失衡。

【0088】 吾人還使用ELISA來定量總IgG (H鏈+L鏈)相對於可結合抗原(Ag)的群體百分比。具體來說，依據抗原ELISA對表現AAV- α A β IgG之SCID小鼠的腦萃取物中的功能性A β 抗體水平進行定量，並與pan-huIgG ELISA進行比較。我們觀察到，由腦部所表現之總IgG的~20% (被注射至海馬迴的2E10總GC)具有功能性，而經IV注射載體(IV注射的1E12總GC)由周邊組織所表現之AAV- α A β IgG不具有失衡的總IgG/功能性IgG。具體而言，結合至抗原的huIgG水平僅占由腦所表現時之總huIgG的21%，而這種差異是在周邊表現載體後一個月沒有於血清中偵測到的(圖3A，右)。

【0089】 接下來，我們調查了是否由於IgG表現而導致神經毒性的證據。就我們初步特徵鑑定的AAV- α A β IgG載體來說，我們使用這個抗體的huIgG形式，其對人類來說更有直接轉譯的潛力，並允許在小鼠中進行明確偵測。然而，為了測試可能與腦IgG表現有關但沒有異種huIgG暴露的混淆變量的任何毒性或神經發

炎，我們使用的AAV載體稱為AAV- α A β mIgG，其表現 α A β IgG的原始小鼠形式(Schupf，上文；Pradier，上文；Vandenberghe et al., *Sci Rep.* (2016) 6:20958)。這個載體被注射到C57BL/6小鼠的海馬迴，並在一個月後處理腦組織用於組織學。組織病理學分析揭示，透明/嗜酸性細胞質沉澱在海馬迴的神經元細胞中的發生率高，令人聯想起糖蛋白過度表現(圖3B)。僅在注射抗體表現載體的腦中觀察到神經元、嗜酸性至透明樣包涵體，使人聯想到糖蛋白積累。在注射AAV-IgG Control的小鼠海馬迴(6/12小鼠)中也觀察到這些結構，指出這種毒性對 α A β IgG表現不具特異性。在注射AAV1-Empty載體或單獨PBS的小鼠海馬迴中從未觀察到這些透明沉澱物(圖3B)。

【0090】 相對於PBS，我們還依據免疫組織化學GFAP分析觀察到神經發炎的證據。在這個實驗中，C57BL/6小鼠注射PBS或AAV- α A β mIgG (2E10 GC到海馬迴)，且16週後收集5 μ m矢狀腦切片(圖3C)。相對於PBS，AAV1-Empty載體也未引起明顯的神經膠樣變性(1.11+/-0.12，5隻小鼠，將平均值+/-SEM相對於PBS GFAP+區域標準化)，暗示著神經發炎是由於IgG表現所致。

【0091】 這些數據指出，儘管腦細胞能夠表現並分泌IgG，但只有一個子集(約20%)的此IgG具功能性並且可以結合抗原，而這種表現誘導整個轉導區域內可偵測到的神經發炎。

實例4：構建以及特徵鑑定AAV-scFv-IgG載體

【0092】 雖然由我們的載體所遞送之IgG被分泌並且在活體內結合類澱粉斑塊，但我們假設一個替代的Ig形式可以盡量減少錯配和由AAV-IgG引起的神經毒性。基於相同的小鼠 α A β 抗體(Schupf，上文)，我們合成了一個經修飾的單鏈Fv，其中IgG輕鏈的可變區融合至重鏈可變區，其是藉由COOH端(C端)連接至鼠類IgG1鉸鏈，CH2和CH3域接(圖4A；scFv-IgG)。為了使Fc區的促發炎作用降至最低，使小鼠IgG1 Fc域突變以消除天冬醯胺酸297 (N297A)處的糖基化，這避免結合至所有Fc γ R (Johnson，上文；Chao，上文)。具體而言，將scFv-IgG設計成經由撓性GGGGS (SEQ ID NO：3)連接子序列的3個重複序列使鼠類抗A β IgG的可

變區連接。scFv經由9-Gly重複序列連接子(SEQ ID NO:7)連接至小鼠IgG1 N297A Fc。將6xHis標籤(SEQ ID NO:9)添加至C端。scFv-IgG在Expi293細胞中表現，並使用C端組胺酸(His)標籤序列藉由固定型金屬親和層析法(IMAC)進行純化。

【0093】 透過SDS-PAGE的分析證實了這個蛋白質有效地組裝成二硫鍵連接的二聚體(圖4A)。根據表面電漿共振(SPR)，此scFv-IgG展示結合至原纖維A β ₁₋₄₂，與親本抗體可相比擬。藉由使scFv-IgG或IgG在不同莫耳濃度下流過固定型A β ₁₋₄₂原纖維以分析結合動力學，經由SPR來測定親和力(M)。親本IgG展現出 1.3×10^{-10} M的表觀解離常數(K_D)，而相較之下scFv-IgG的結合親和力略低(5.2×10^{-10})(圖4A，表)。

【0094】 將這個表現匣插入AAV1載體中，以確定經修飾的IgG是否可以在活體內合成。IV注射AAV用作為我們病毒活性的陽性對照，因為周邊組織已充分驗證IgG分子的表現和分泌(Saunders，上文；Shimada et al., *PloS ONE* (2013) 8:e57606；Hicks et al., *Sci Transl Med.* (2012) 4:140ra187；Chen et al., *Sci Rep.* (2017) 7:46301；Balazs et al., *Nature* (2011) 481:81-4；Balazs et al., *Nat Biotech.* (2013) 31:647-52；Balazs et al., *Nat Med.* (2014) 20:296-300)。IV注射AAV-scFv-IgG (1E12總GC)後一個月，血清水平達到63 μ g/mL，表示周邊組織中的AAV載體活性很穩定(圖4B，左)。

【0095】 為了評估載體的腦表現，在將2E10總GC的AAV海馬迴注射至C57BL6小鼠後一個月，由得自半個矢狀腦的萃取物定量scFv-IgG水平，這個半個矢狀腦稱為半腦(hemibrain)。表現水平達到平均值為 ~ 600 ng/g (圖4B，右)。值得注意的是，此濃度比IV注射20 mg/kg IgG之後24小時所觀察到者高 >3 倍，且比AAV- α A β IgG觀察到者高2.5倍(圖1B)。組織學分析揭示，儘管在腦中的表現水平高於AAV- α A β IgG載體，但AAV-scFv-IgG轉導在經過注射的海馬迴(0/5小鼠)中並不會引起任何可偵測到的神經元內透明蛋白累積，這暗示與IgG相比，scFv-IgG更有效地受到神經元細胞加工。

【0096】 為了確定經scFv-IgG轉導細胞的腦分佈，於海馬迴注射後一個月，使用針對His標籤的抗體對矢狀切片進行DAB-6xHis IHC (「6xHis」如SEQ ID NO：9所揭示)。經AAV-scFv-IgG載體轉導的整個海馬迴，有稀少轉導在覆蓋海馬迴的皮質區，圍繞著針道和海馬下腳(subiculum)(圖4C)。用經陰性對照，空AAV (AAV-Control)轉導的腦，載體沒有顯示出可偵測到的抗His免疫染色(圖4C)。應該注意的是，抗His IHC在C57BL6小鼠中只偵測到細胞內表現，因為任何被分泌的細胞外scFv-IgG很可能因為缺乏可用的抗原而被沖走。

【0097】 在注射部位近處和遠處的同側腦區中以生物化學的方式來評估細胞內和細胞外scFv-IgG表現。AAV注射後一個月，解剖3隻小鼠的腦區域，並藉由抗原ELISA定量每個腦區域所表現的蛋白，並用PBS注射的腦均質物扣除背景訊號。具體來說，將海馬迴，上皮質和紋狀體解剖並均質化用於經由抗原ELISA來定量scFv-IgG (圖4C，右)。觀察到的濃度梯度，其中最高水平在注射部位(海馬迴)偵測到，並且在更遠的腦區觀察到水平逐漸降低(圖4C，右)。儘管比注射部位有更低的水平，但紋狀體組織中的scFv-IgG濃度保持近200 ng/g-在腦中通常藉由被動IgG輸注未能達到的穩態水平。

實例5：在β-類澱粉沉積症(β-amyloidosis)的小鼠模型中，scFv-IgG的抗原結合

【0098】 我們接下來要確定AAV遞送的scFv-IgG是否被分泌到細胞外空間，並能在活體內結合至抗原。將AAV-scFv-IgG載體注射到5個月大雌性ThyAPPmut小鼠的海馬迴(Blanchard，上文)，這是牠們已經在整個新皮質發育出斑塊的年齡。在單側注射1 μL (1E10總GC)的AAV-scFv-IgG載體之後一個月，處理腦部的5 μm矢狀切片用於IHC，並且針對His標籤反應性和Aβ斑塊進行染色。右圖顯示了距注射部位從近(1)至遠(6)的個別斑塊ROI (以A編號)。用6xHis (SEQ ID NO：9)免疫染色(綠色)和DAPI(藍色)覆蓋影像(圖5A)。一如預期，觀察到在整個皮質有大量斑塊形成(圖5A，左)，且抗His抗體的染色與斑塊共定位(圖5A，右)。要注意到，在離AAV-scFv-IgG表現之海馬迴和枕皮質區域更遠的斑塊上所標記的6xHis (SEQ ID NO：9)強度逐漸降低，但卻很廣泛，指明結合斑塊的scFv-IgG有

明顯的濃度梯度，其中離海馬迴遠的斑塊比更接近注射部位之斑塊顯示出結合的scFv-IgG水平更為逐漸降低。這些數據表明，抗A β scFv-IgG被表現並從海馬迴中的細胞分泌，允許其結合至離注射部位遠的斑塊

【0099】 數據提供證明，病毒載體遞送的scFv-IgG在活體內接合其生理學相關目標。我們繼而要確定，在這個類澱粉沉積症的小鼠模型中長期表現是否會減少斑塊形成。研究設計大綱。將AAV-scFv-IgG，AAV-Control載體，A β IgG或對照同型IgG單側注射到四組2個月大ThyAPPmut雄性小鼠(斑塊開始形成時的約略年齡)的海馬迴中。將這些組別與經每週以10 mg/kg IP注射抗A β 抗體(A β IgG)或同型對照抗體的被動免疫療法處理的小鼠進行比較(圖5B，左)。處理16週(4個月)後收集腦，並對冠狀切片進行類澱粉斑塊或6xHis (SEQ ID NO：9)的免疫染色，且分析轉基因表現。該AAV-scFv-IgG在整個注射的海馬迴中表現，也有載體明確輸送至對側海馬下腳中，正如細胞體的 α His染色所證明(圖5B，右)。透過抗His IHC在冠狀腦切片中定量皮質和海馬迴的A β 斑塊負荷。合併兩個半球的ROI進行定量，斑塊負荷表示為DAB陽性染色佔組織ROI面積的百分比。與它們各自的對照相比，單次注射AAV-scFv IgG在海馬迴中引起與 α A β IgG基準同等大小的斑塊減少，儘管在對照組之間的斑塊負荷有差異(圖5C)。皮質中的斑塊減少也顯著降低(圖5C)，這與scFv-IgG從表現部位擴散而結合至遠端斑塊的證據相吻合。

【0100】 這些結果證實，單次注射AAV-scFv-IgG在類澱粉小鼠模型中持久地表現，且從注射部位分泌而結合到整個腦部的斑塊。每週一次10 mg/kg抗A β IgG的典型被動免疫治療方案持續16週，可導致ThyAPPmut動物的類澱粉斑塊形成明顯減少。相反地，在表現4個月後，單次顱內注射AAV-scFv-IgG產生可相比擬的功效。

【0101】 總之，在以上研究中，scFv-IgG從對原原纖維和原纖維A β 物質具特異性的抗體衍生而來，其可在活體內降低類澱粉斑塊負荷。我們的scFv-IgG在活體外表現良好，允許純化和隨後藉由SPR分析抗原結合親和力。與IgG形式相比，scFv-IgG結合抗原的程度相似。選擇AAV1作為這個適應症的血清型，因為它的

衣殼有助於實質注射後載體在CNS中散布。該血清型主要感染神經元細胞，但確實轉導某些非神經元細胞類型，從而擴大了可用於轉基因表現的細胞的潛在組成。在使用相對高劑量(1E10 GC在海馬迴)的情況下，在注射部位處的穩態水平比我們選擇用來比較的被動IgG基準所達到的最大者(在IV注射20 mg/kg經純化IgG後24小時，腦中的抗體水平)還高3-4倍。為達到AAV-scFv-IgG載體所達到的水平，需要在周邊IV投予約60 mg/kg。

【0102】單次注射後，海馬迴中的表現持續至少4個月，在距注射部位數毫米的腦部區域中，蛋白質濃度甚至超過被動免疫治療基準。經轉導的細胞不太可能從注射部位遷移到遠離海馬迴的區域來分泌蛋白，因為在距注射部位更遠處或針道並未發現6xHis (SEQ ID NO:9)陽性細胞(數據未顯示)。此載體在ThyAPPmut小鼠中的長期表現導致皮質(減少52%)和海馬迴(減少87%)中的斑塊減少。這比透過利用scFv的其他研究所觀察到者更有效地減少，其中斑塊減少範圍介於0-60% (Levites, 2006, 上文; Levites, 2015, 上文; Kou, 上文; Fukuchi, 上文; 以及Wang et al., *Brain, Behavior, and Immunity* (2010) 24:1281-93)。在單次顱內注射AAV-scFv-IgG進行治療的動物中觀察到的斑塊減少程度與每週IV注射10 mg/kg抗A β 抗體治療持續4個月的動物相似，突顯出基因遞送用於長期治療範例的價值。

序列

SEQ ID NO	序列
1	GGGS
2	GGGSGGGSGGGGS
3	GGGS
4	[GGGS] _n (n = 1、2、3 或 4)
5	SGGSGGGSGGGGS
6	GGGSGGGGXGGGYGGGS (X = S, A 或 N, 而 Y = A 或 N)
7	GGGGGGGG
8	MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNLLL PQGVLASEIVMTQTPLSLP VSLGDRASISCRSGQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY TVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTISRVEAEDLG VYFCSQNT FVPWTFGGGTKLEIKRTSSGGGGSGGGGGSGGGGSEVQLQQSG PEVVKPGVSVKISCKGSGYTF TDYAMHWVKQSPGKSLEWIG

VISTKYGKTNYNPSFQQATMTVDKSSSTAYMELASLKASDS AIYYCARGDDGYSWGQGTSVTVSSASTGGGGGGGGGGSGVPR DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFASTFRSVSELPIM HQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPAPQVYTIP PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKN TQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN HHTEKSLSHSPGSGSGSGSHHHHHH
--

【符號說明】

【0103】 無

【生物材料寄存】

【0104】 無

序列表

<110> 法商賽諾菲公司(SANOFI)

<120> 在神經系統中表現抗原結合蛋白

<130> 022548.TW060

<140>

<141>

<150> EP 19306310.4

<151> 2019-10-08

<150> 62/848,659

<151> 2019-05-16

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 1

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> 這個序列可含括1-4個「Gly Gly Gly Gly Ser」重複單元

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成肽

<400> 5

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

Leu Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Pro Gln Gly Val Leu Ala Ser Glu
20 25 30

Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
35 40 45

Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ser Asn
50 55 60

Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
65 70 75 80

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp
85 90 95

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
100 105 110

Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn Thr
115 120 125

Phe Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
130 135 140

Thr Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro
165 170 175

Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
180 185 190

Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu
195 200 205

Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Lys Tyr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro

210

215

220

Ser Phe Gln Gly Gln Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 225 230 235 240

Ala Tyr Met Glu Leu Ala Ser Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Ile Tyr
 245 250 255

Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Asp Gly Tyr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 275 280 285

Gly Ser Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 290 295 300

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 305 310 315 320

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
 325 330 335

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
 340 345 350

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala
 355 360 365

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp
 370 375 380

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
 385 390 395 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
 405 410 415

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
420 425 430

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
435 440 445

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
450 455 460

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
465 470 475 480

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
485 490 495

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
500 505 510

Ser His Ser Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser His His His His
515 520 525

His His
530

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的說明：合成6xHis標籤

<400> 9

His His His His His His

1 5

8

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種在神經系統的細胞中表現二價結合成員的方法，包含將編碼包含抗體重鏈可變域(V_H)，抗體輕鏈可變域(V_L)和IgG Fc區之多肽的表現匣引入細胞，其中 V_H 和 V_L 形成特異地結合至目標蛋白的抗原結合位點，並且在細胞中表現後，多肽的兩個分子形成對目標蛋白具有特異性的二硫鍵結同源二聚二價結合成員。

【請求項2】 如請求項1之方法，其中該神經系統的細胞是神經元；神經膠細胞，視情況選自寡樹突細胞、星形細胞、外被細胞，許旺氏細胞和微膠細胞；室管膜細胞；以及腦上皮細胞。

【請求項3】 如請求項2之方法，其中該細胞為人類細胞。

【請求項4】 如請求項3之方法，其中該細胞在患者的腦中。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之方法，其中該目標蛋白是在腦中表現的蛋白。

【請求項6】 如請求項5之方法，其中該蛋白是類澱粉 β 肽(A β)、tau、SOD-1、TDP-43，ApoE或 α -突觸核蛋白。

【請求項7】 如請求項1至6中任一項之方法，其中該多肽自N端至C端包含，

(i) V_H 、肽連接子及 V_L ；或 V_L 、肽連接子及 V_H ；和

(ii) IgG Fc區。

【請求項8】 如請求項7之方法，其中該肽連接子包含序列GGGGS (SEQ ID NO: 3)。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項之方法，其中該二價結合成員結合至新生兒Fc受體(FcRn)，但是由於IgG Fc區中的一或多個突變，它不結合至Fc γ 受體。

【請求項10】 如請求項1至9中任一項之方法，其中該引入步驟包含投與其基因體含有表現匣的重組病毒。

【請求項11】 如請求項10之方法，其中該重組病毒經由顱內注射，鞘內腔注射或大池內注射而被引入患者的腦部。

【請求項12】 如請求項10或11之方法，其中該重組病毒為重組腺相關病毒(rAAV)。

【請求項13】 如請求項12之方法，其中該重組AAV為血清型1或2。

【請求項14】 如請求項1至13中任一項之方法，其中多肽的表現是受到持續性活化啟動子或可誘導型啟動子的轉錄控制。

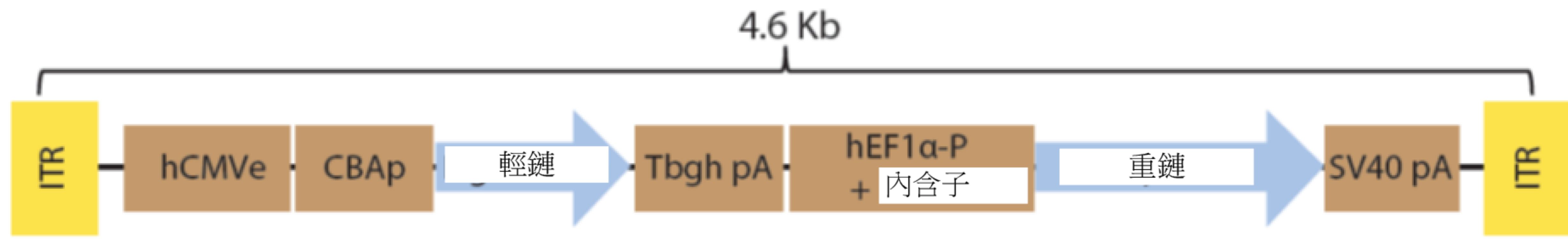
【請求項15】 如請求項4至14中任一項之方法，其中該患者具有神經退化性疾病。

【請求項16】 如請求項15之方法，其中該患者具有阿茲海默症、類澱粉腦血管病變、突觸核蛋白病、tau蛋白病，或肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)。

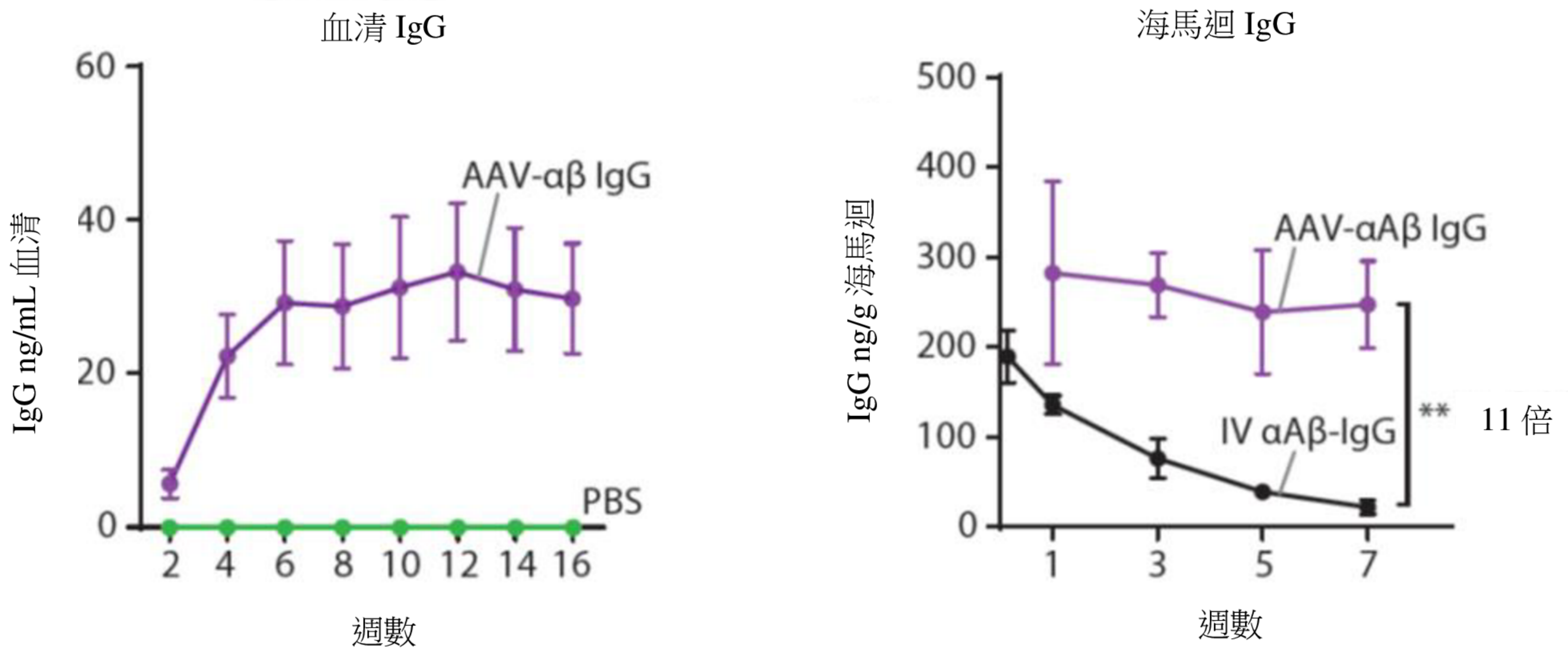
【請求項17】 一種用於治療如請求項4至16中任一項之方法中有其需要之患者的二價結合成員。

【請求項18】 一種二價結合成員於製造治療在如請求項4至16中任一項之方法中有其需要之患者之藥物的用途。

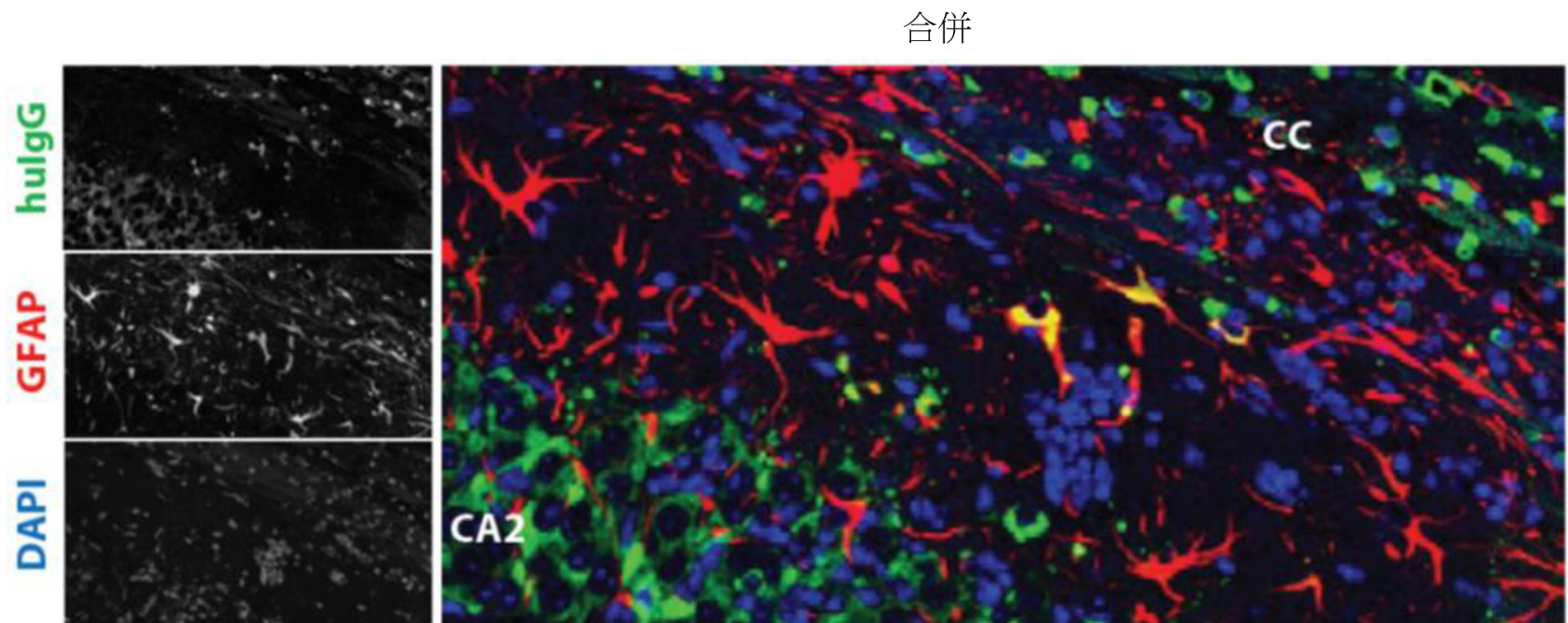
【發明圖式】



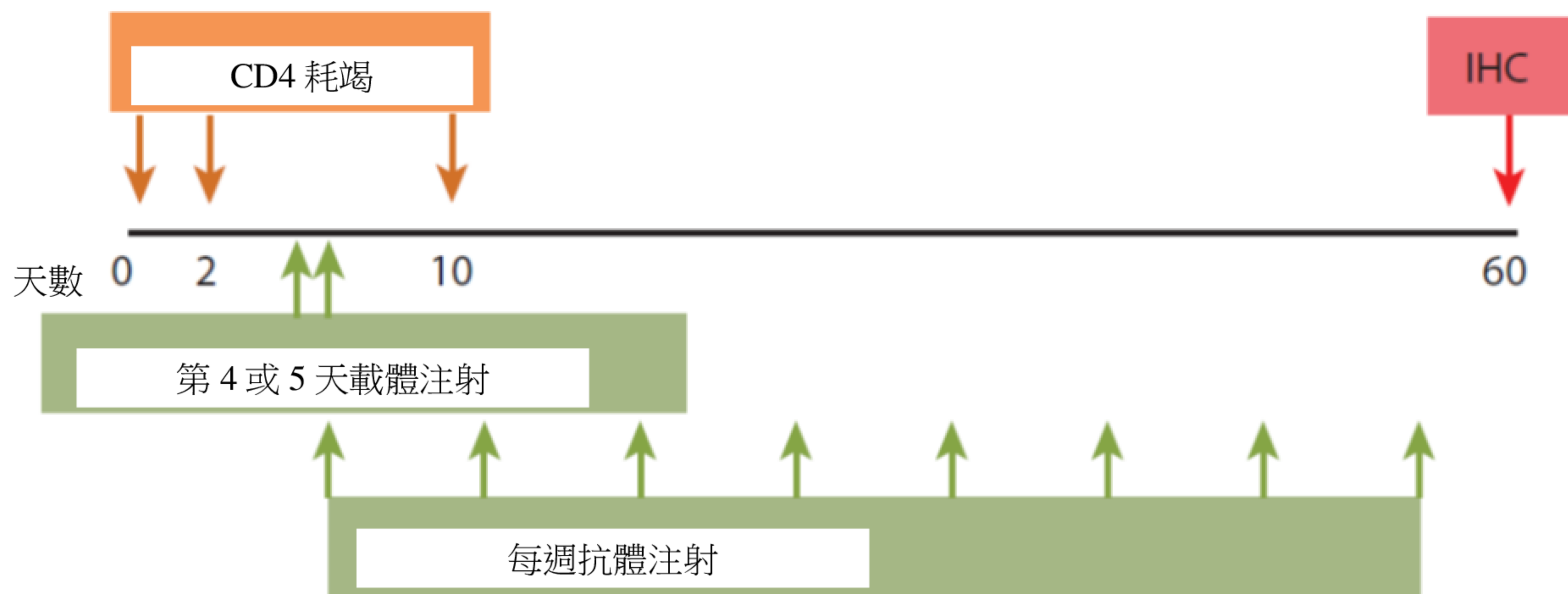
【圖1A】



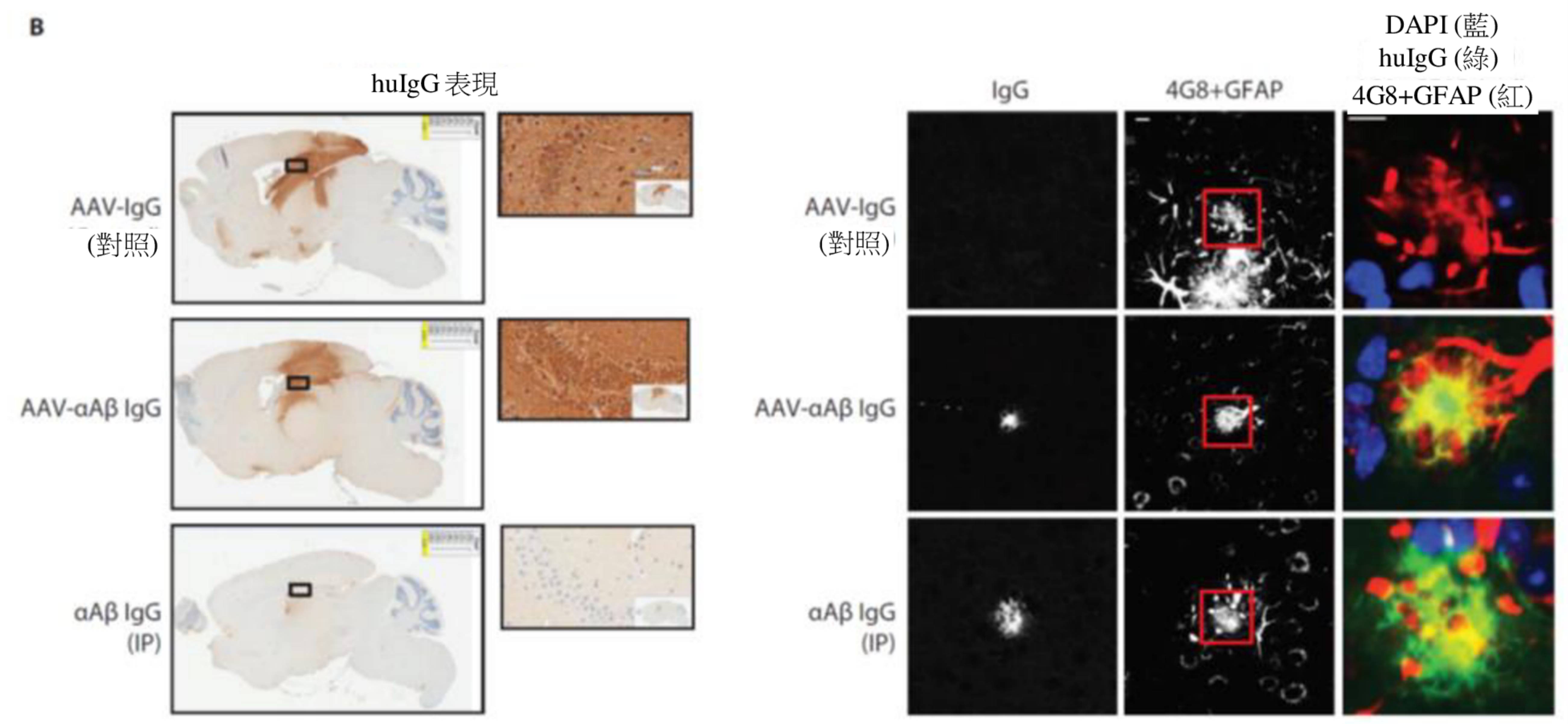
【圖1B】



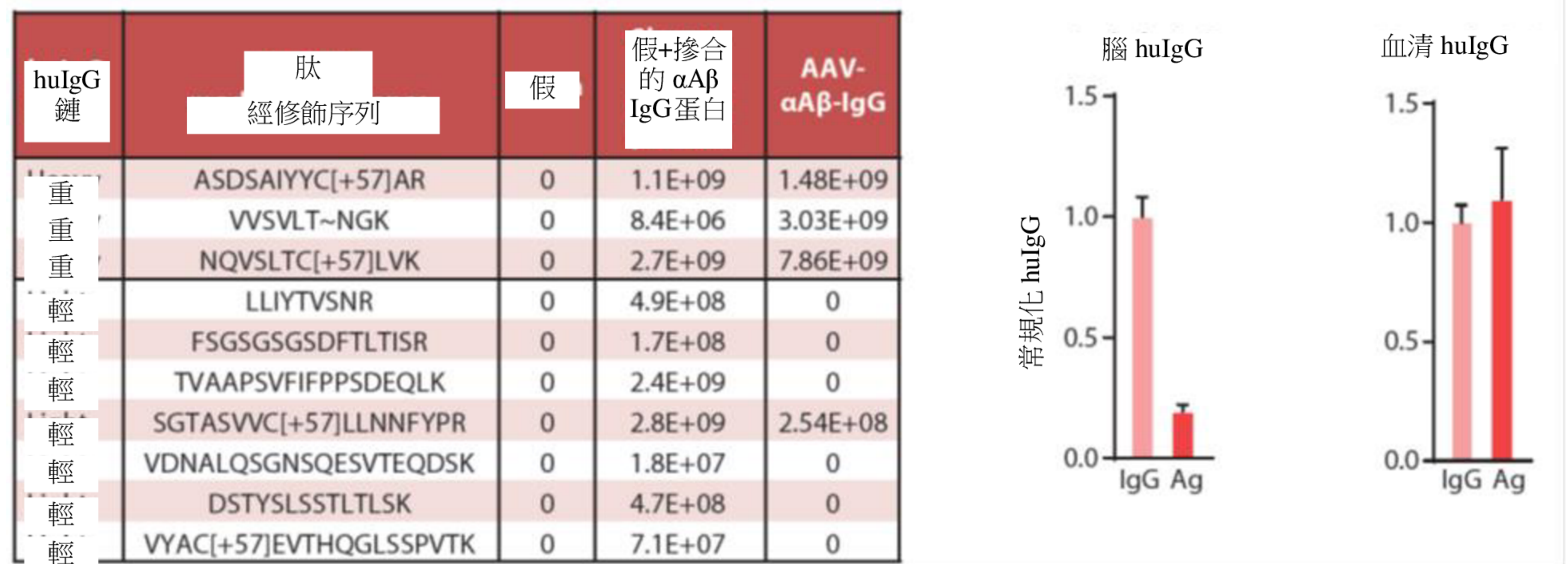
【圖1C】



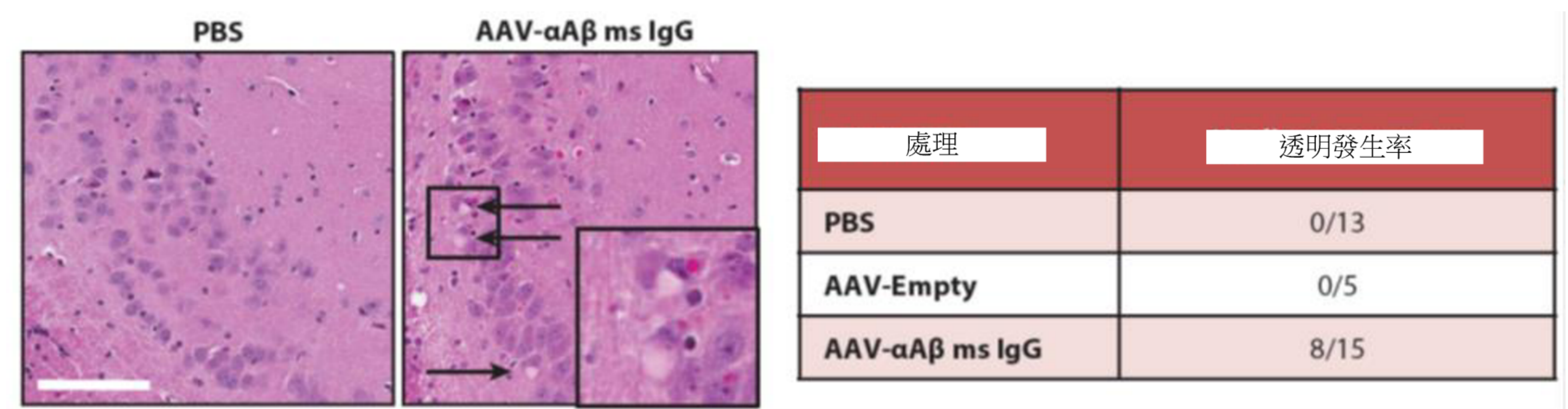
【圖2A】



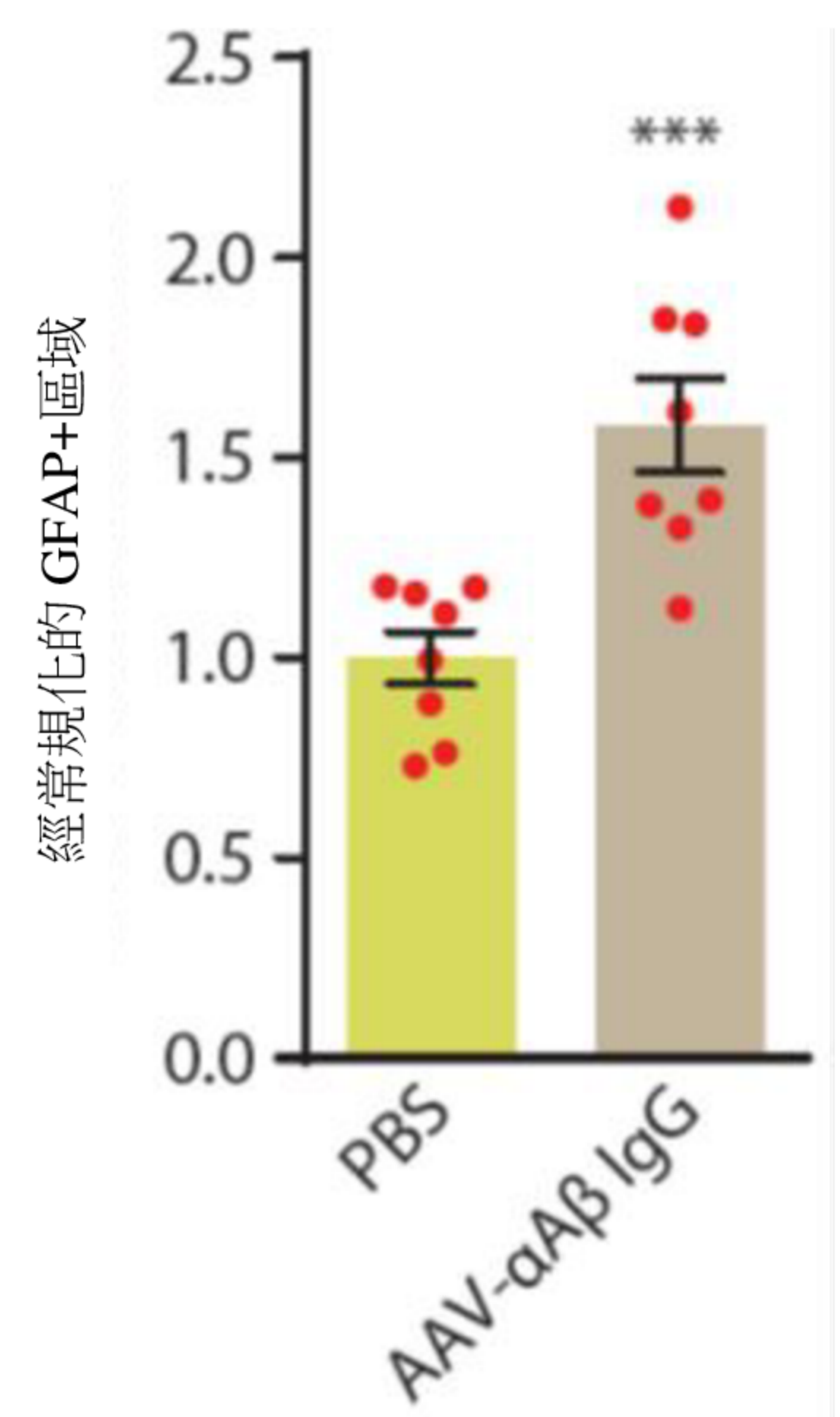
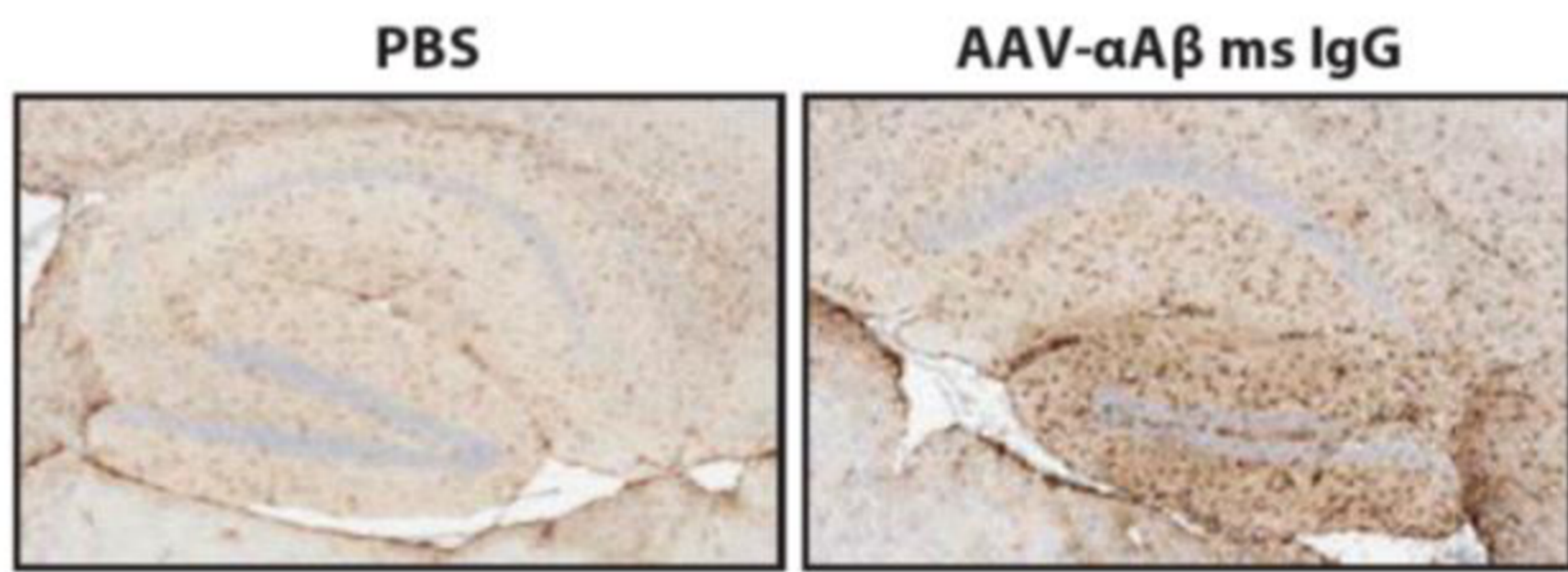
【圖2B】



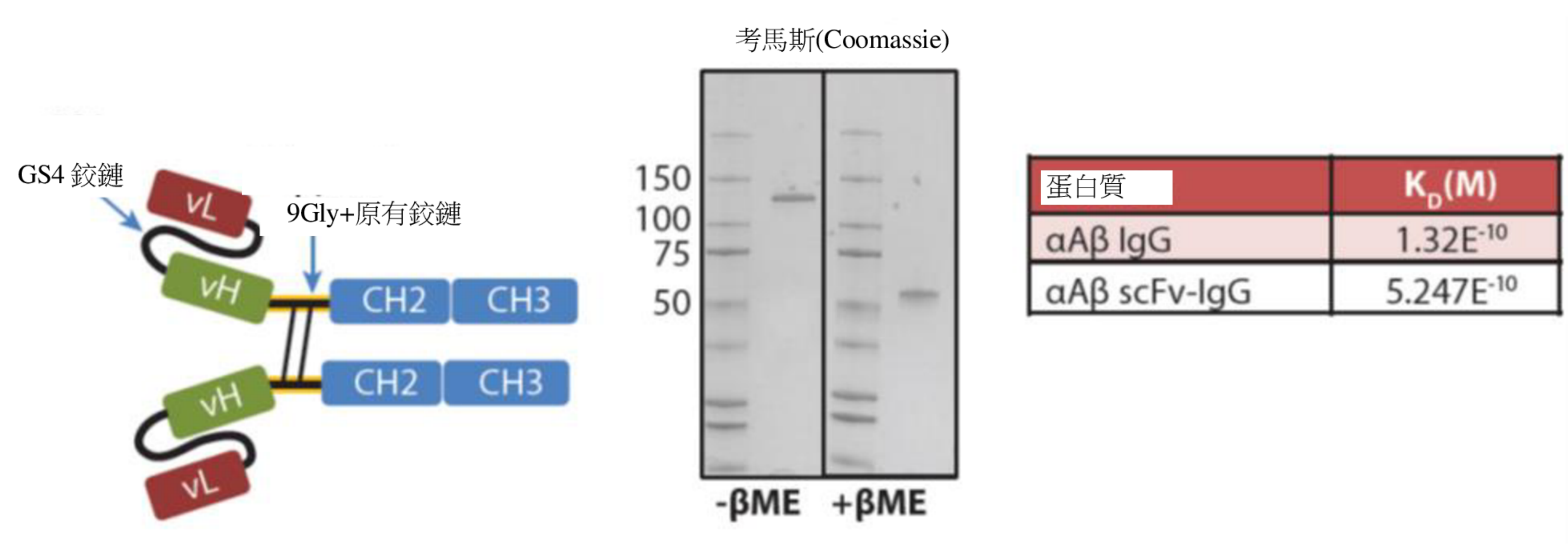
【圖 3A】



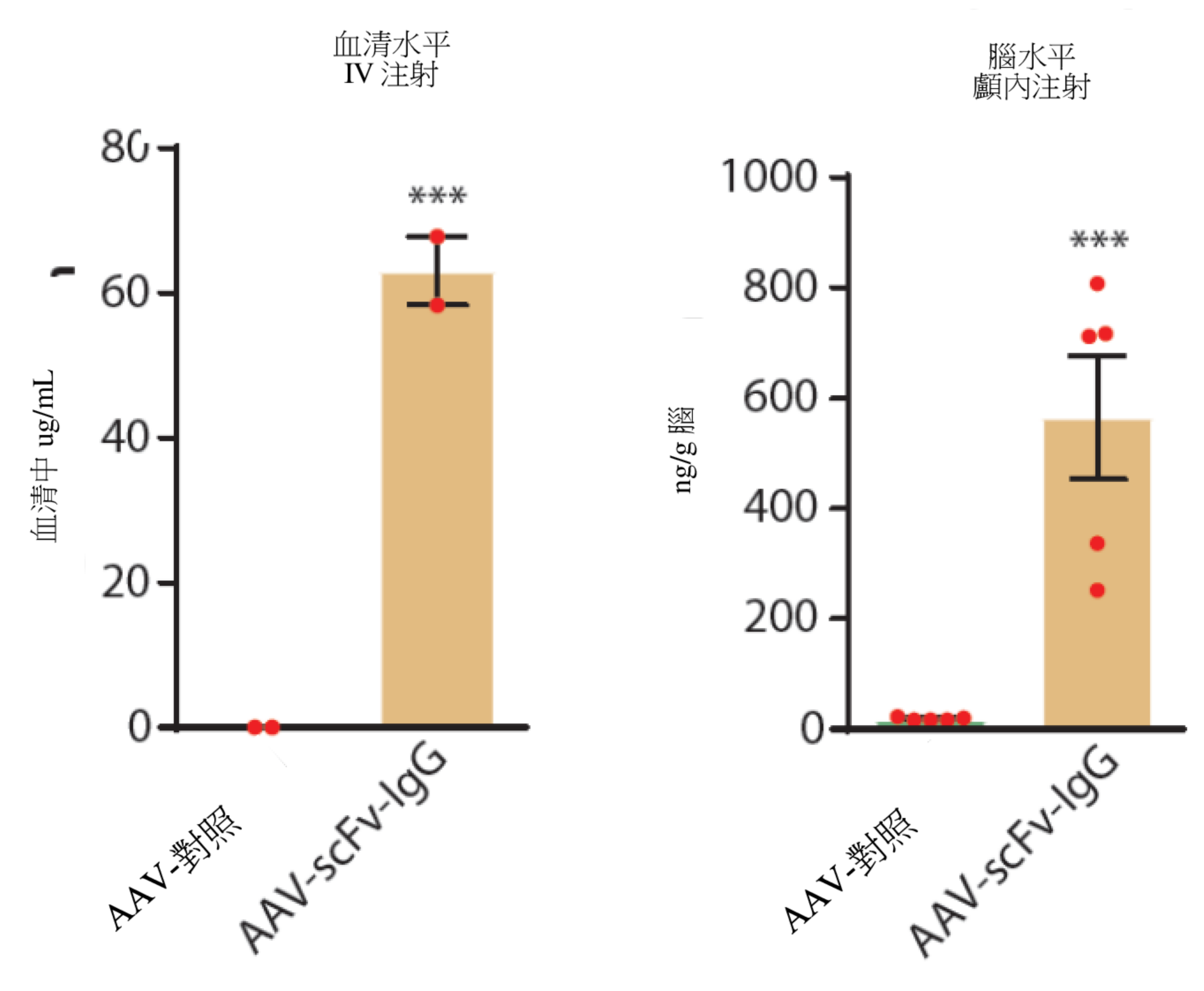
【圖 3B】



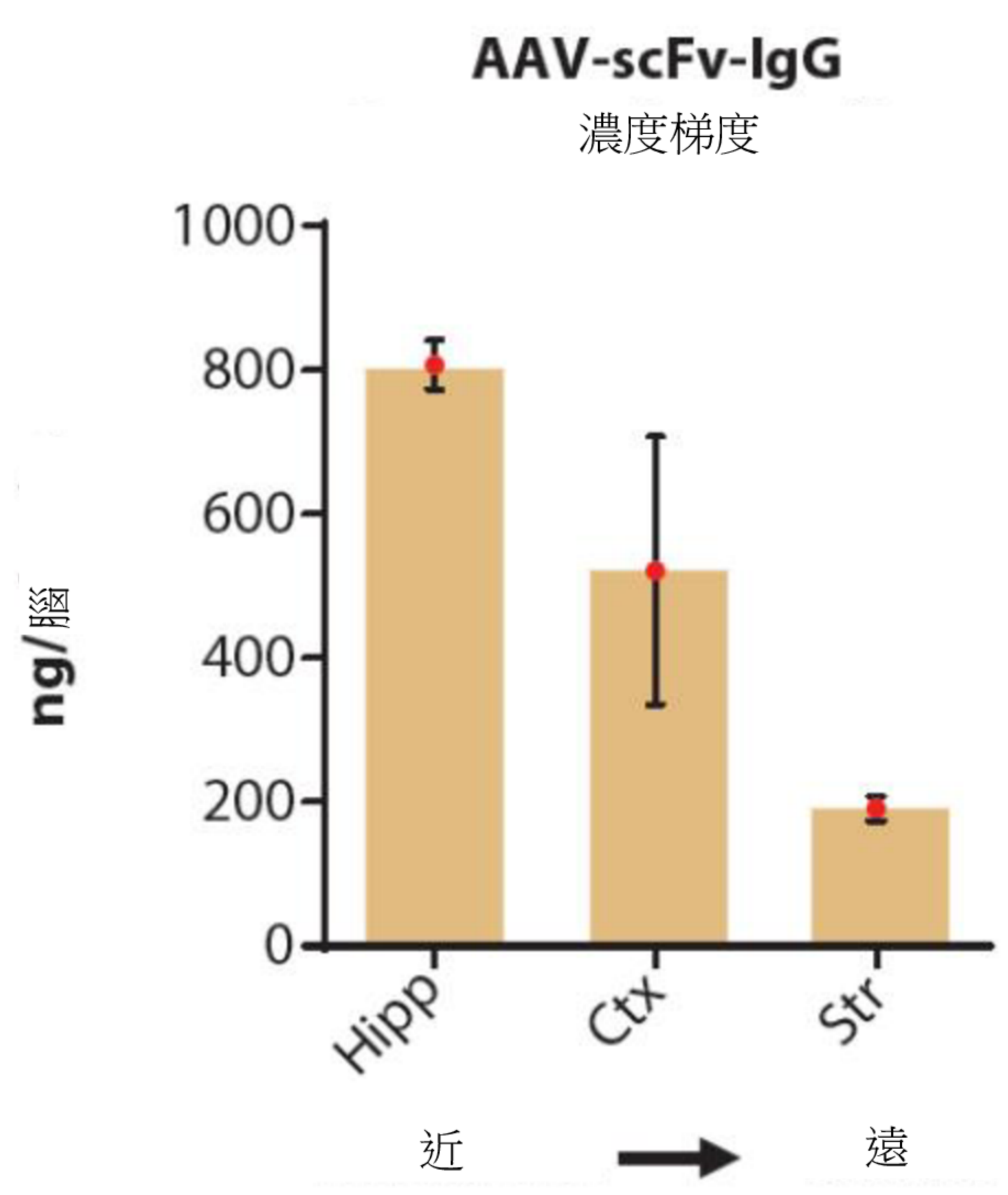
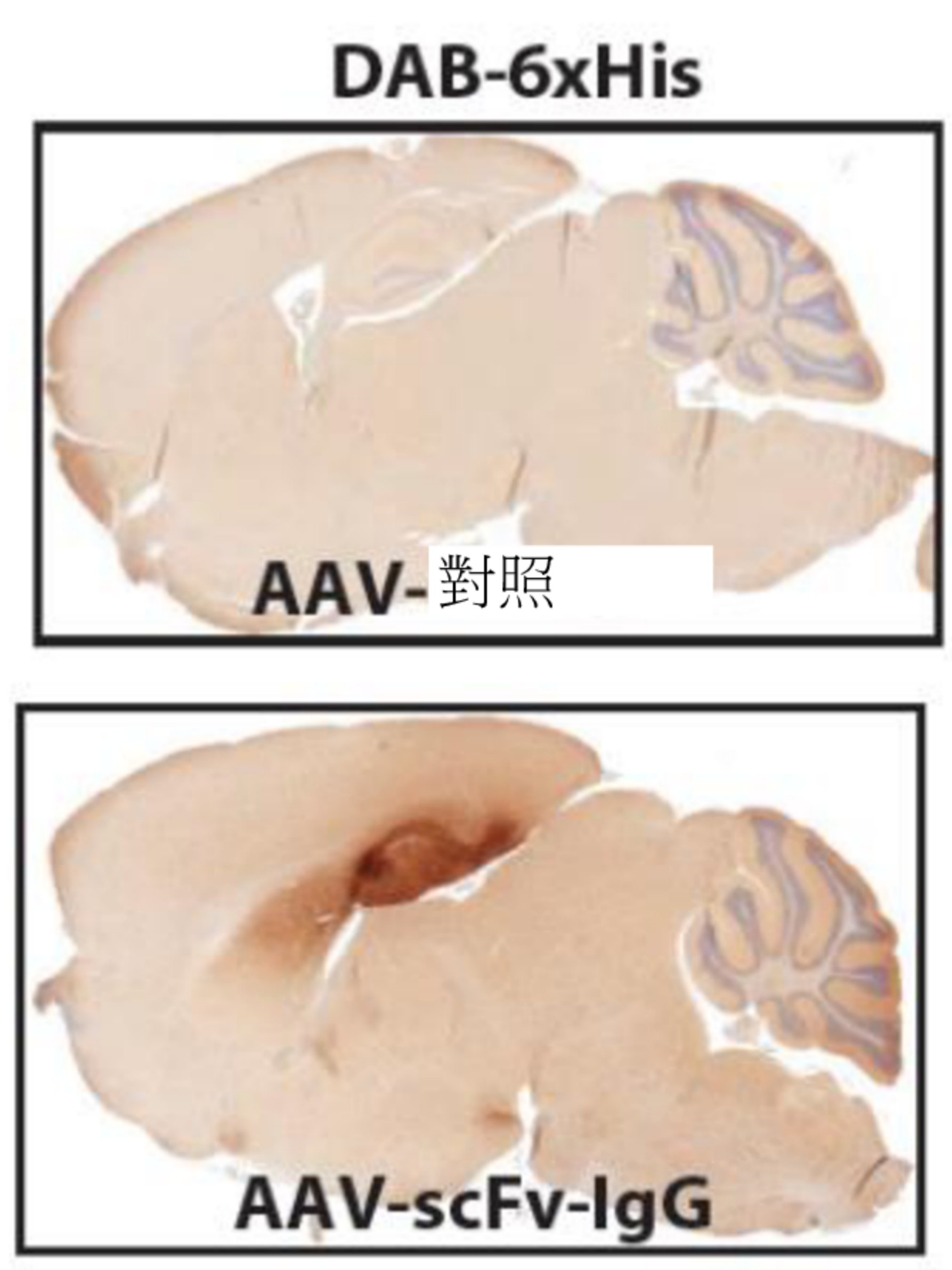
【圖 3C】



【圖 4A】

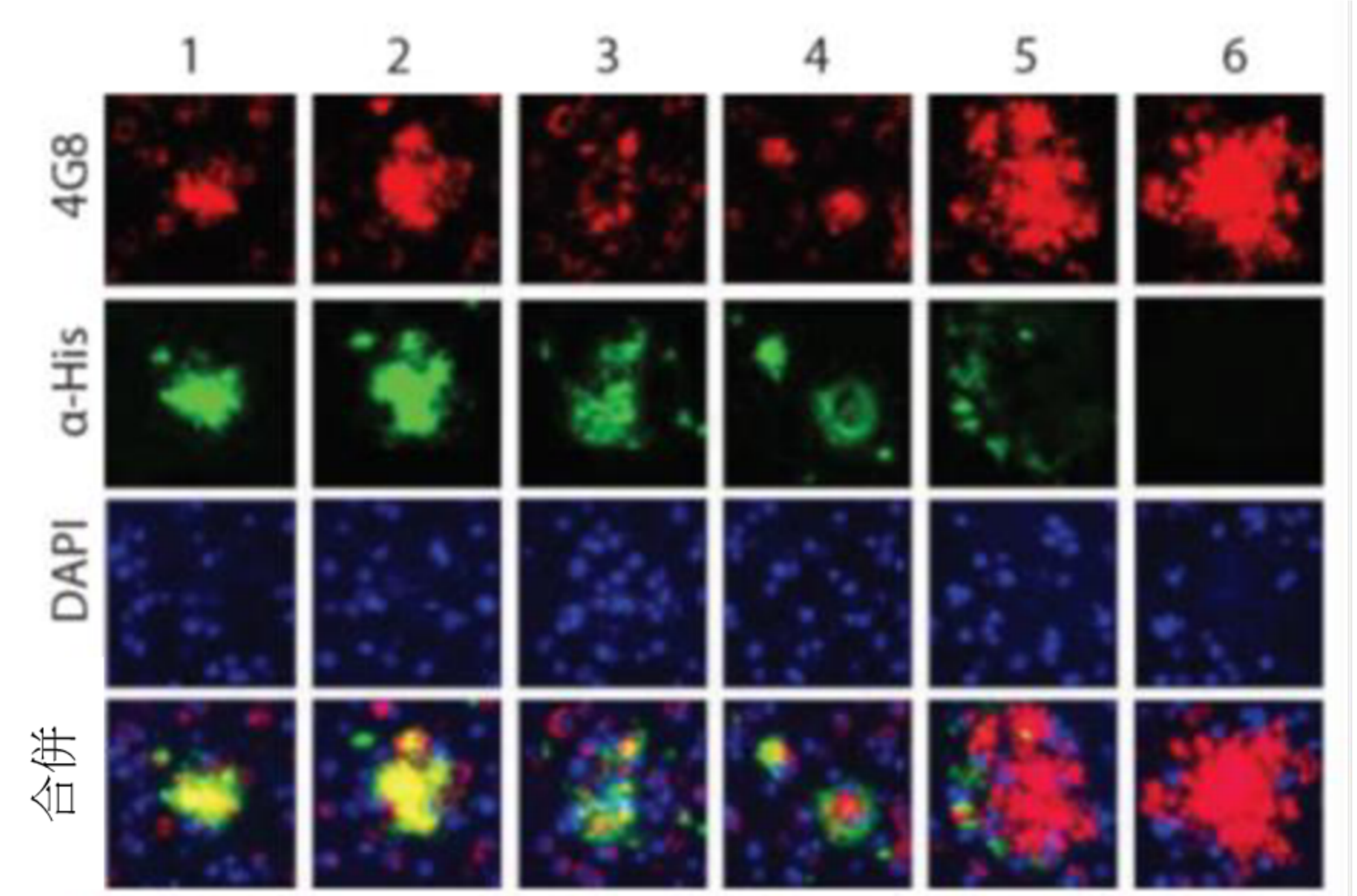
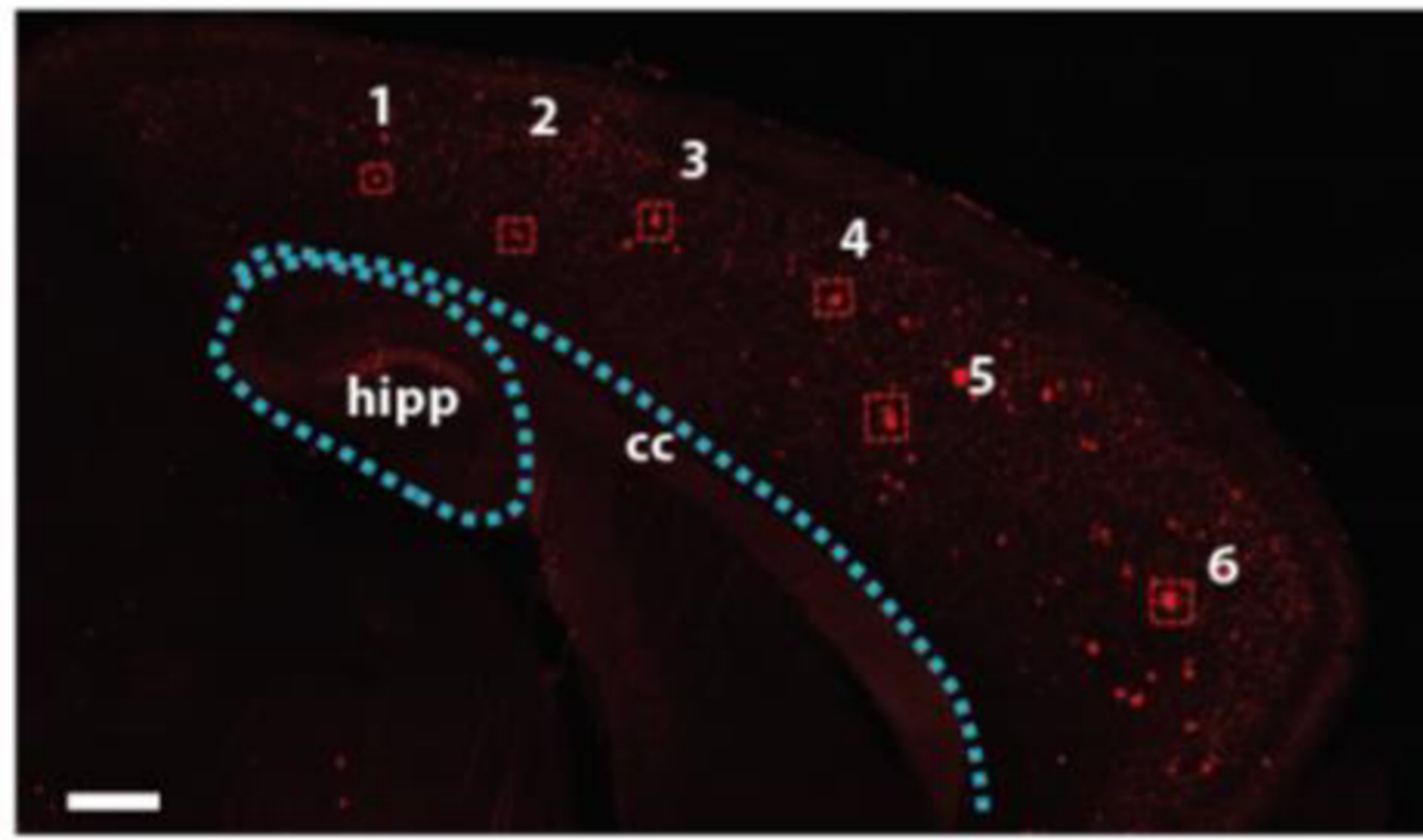


【圖 4B】

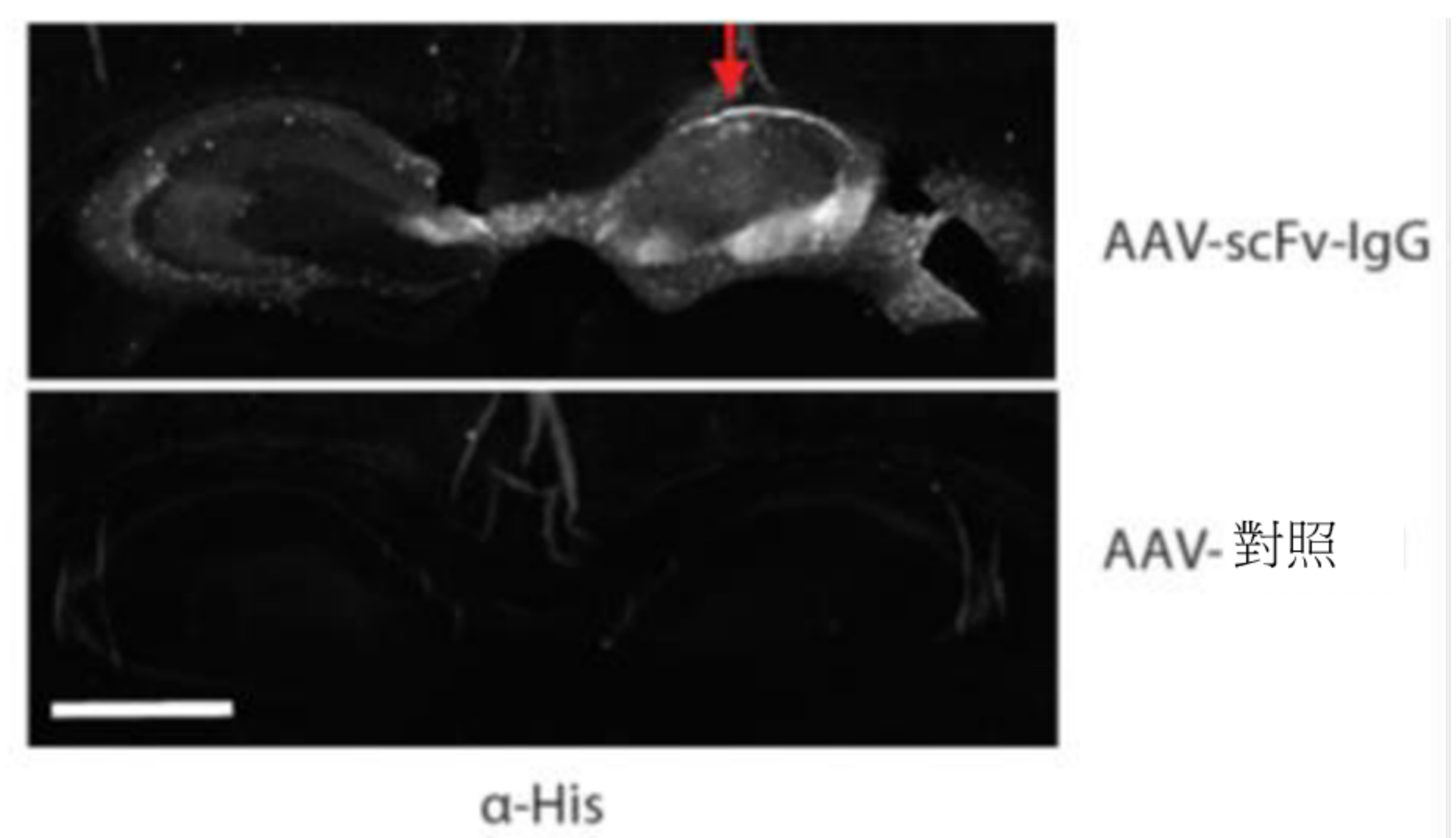
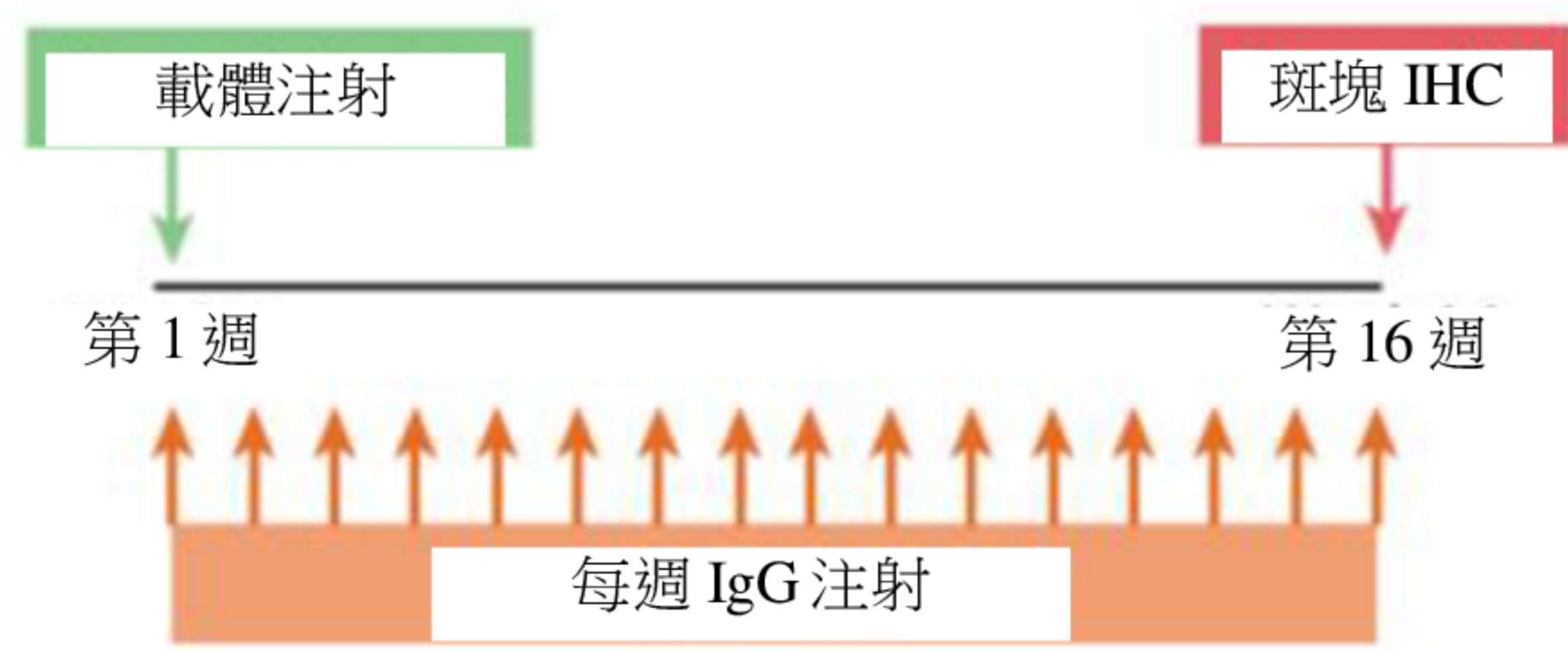


【圖 4C】

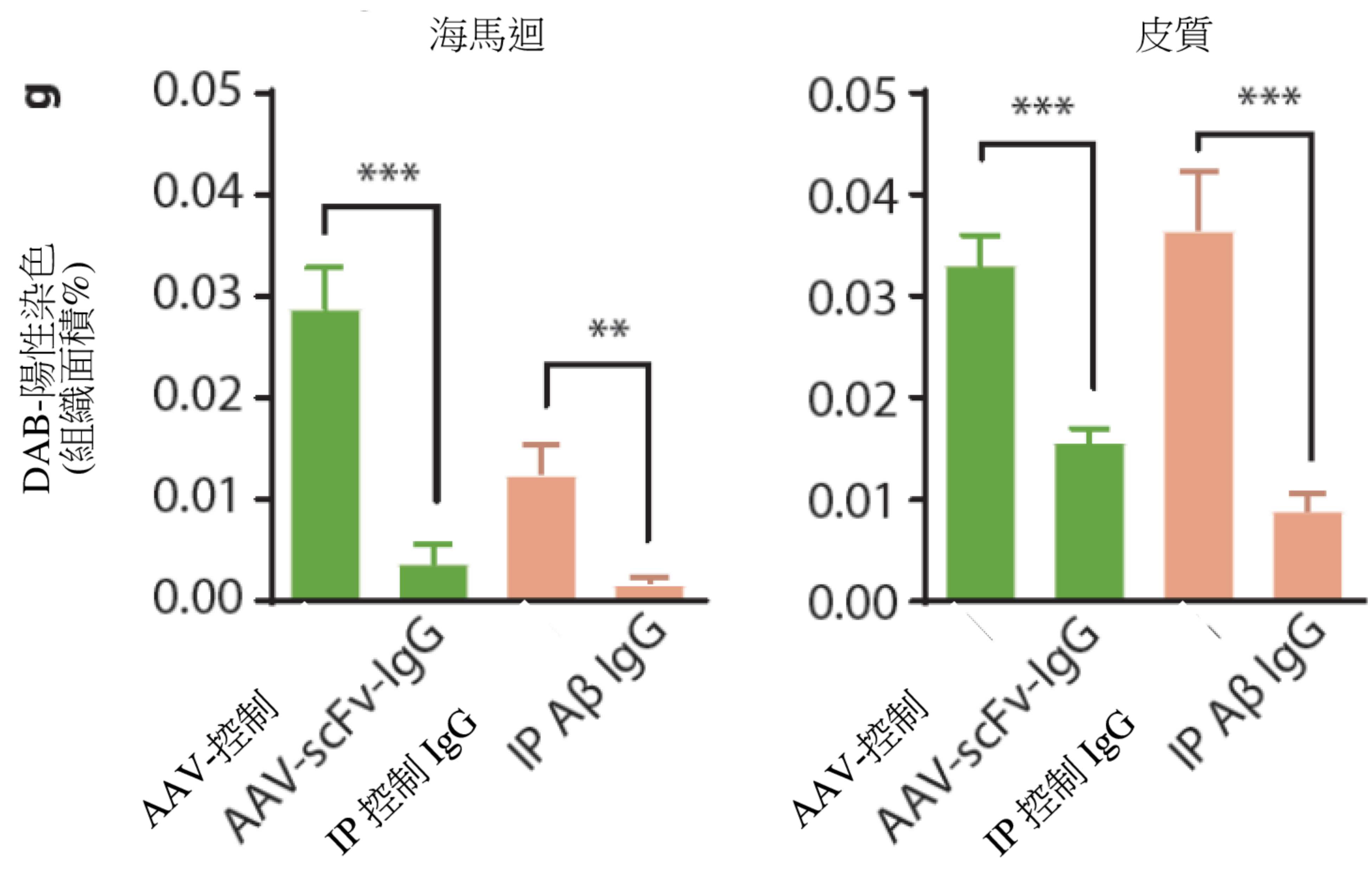
斑塊 IHC (4G8)



【圖 5A】



【圖 5B】



【圖5C】