(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118488972 A
(43)申请公布日 2024.08.13

(21)申请号 202280077822.2
(22)申请日 2022.10.14
(30)优先权数据
63/256,566 2021.10.16 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2022/051516 2022.10.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/060358 EN 2023.04.20
(71)申请人 儿童医院
地址 加拿大安大略省
(72)发明人 J-P·朱利安 A·杰塔 C·伯恩阿什纳 K·穆图拉曼
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 秦剑
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
A61K 39/44(2006.01)
A61K 47/64(2006.01)
A61K 47/69(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)

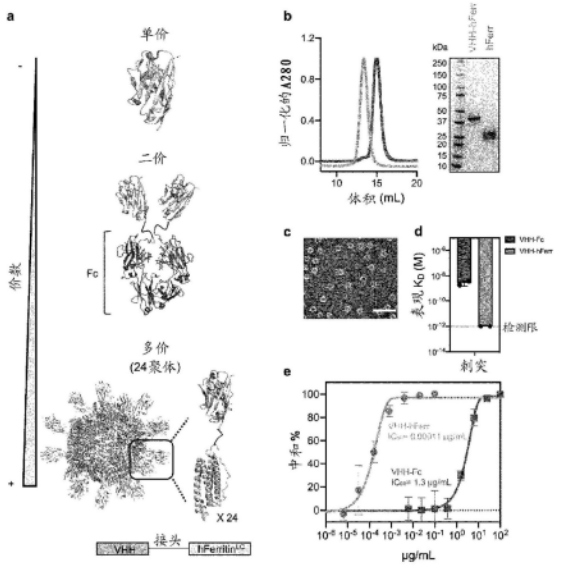
权利要求书4页 说明书99页 附图51页

(54)发明名称

经修饰的多抗体构建体、组合物和方法

(57)摘要

一种融合蛋白包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基,其中所述Fc多肽包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处具有突变的IgG4Fc链,并且其中多个所述融合蛋白自组装形成纳米笼。



CN 118488972 A

1.一种融合蛋白,所述融合蛋白包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基,

其中所述Fc多肽包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处具有突变的IgG4 Fc链,并且

其中多个所述融合蛋白自组装形成纳米笼。

2.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含位置234和235处的突变。

3.如权利要求2所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含F234A突变和L235A突变。

4.如权利要求1至3中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG4Fc链包含位置228处的突变。

5.如权利要求4所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含S228P突变。

6.如权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白,其中所述IgG4Fc链包含位置237和238处的突变。

7.如权利要求6所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含G237A突变和P238S突变。

8.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变和L235A突变。

9.如权利要求8所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链不包含G237或P238处的突变。

10.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

11.如权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链包含F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

12.如权利要求11所述的融合蛋白,其中所述IgG4 Fc链不包含S228处的突变。

13.如权利要求1至12中任一项所述的融合多肽,其中所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

14.如权利要求13所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

15.如权利要求13或14所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

16.如权利要求13至15中任一项所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白单体亚基。

17.如权利要求16所述的融合多肽,其中所述铁蛋白单体亚基是C-半铁蛋白。

18.如权利要求17所述的融合多肽,其中所述Fc多肽连接至所述C-半铁蛋白的N端。

19.如权利要求18所述的融合多肽,其中所述Fc多肽经由氨基酸接头连接至所述C-半铁蛋白的N端。

20.如权利要求19所述的融合多肽,其中所述氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

21.如权利要求20所述的融合多肽,其中所述$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

22.如权利要求1至21中任一项所述的融合多肽,其中所述Fc多肽包含单链Fc(scFc),所述单链Fc包含两条Fc链,其中所述两条Fc链经由氨基酸接头连接。

23.如权利要求22所述的融合多肽,其中连接所述两条Fc链的所述氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

24.如权利要求23所述的融合多肽,其中所述$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

25.一种自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包含:

(a)一个或多个第一融合多肽,每个第一融合多肽是权利要求1至24中任一项所述的融合多肽,以及

(b)一个或多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含连接至纳米笼单体或其亚基的抗原结合部分。

26.如权利要求25所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽的所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

27.如权利要求26所述的自组装多肽复合物,其中所述铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

28.如权利要求26或27所述的自组装多肽复合物,其中所述铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

29.如权利要求27或28所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。

30.如权利要求25至29中任一项所述的自组装多肽复合物,其中在每个第二融合多肽内,所述抗原结合部分经由氨基酸接头连接至所述纳米笼单体或其亚基。

31.如权利要求30所述的自组装多肽复合物,其中所述氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

32.如权利要求31所述的自组装多肽复合物,其中所述$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

33.如权利要求25至32中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽的所述抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基的N端。

34.如权利要求25至33中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽的所述抗原结合部分是Fab片段。

35.如权利要求25至34中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第二融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

36.如权利要求25至35中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含连接至纳米笼单体或其亚基的抗原结合部分,其中所述第三融合多肽与所述第二融合多肽不同。

37.如权利要求36所述的自组装多肽复合物,其中每个第三融合多肽的所述抗原结合部分是Fab片段。

38.如权利要求37所述的自组装多肽复合物,其中每个第三融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

39.如权利要求25至38中任一项所述的自组装多肽复合物,其中每个第一融合多肽和每个第二融合多肽的所述纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,并且

a.每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者

b.每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。

40.如权利要求25至39中任一项所述的自组装多肽复合物,其中所述自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。

41.如权利要求25至40中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包含总共24至48个融合多肽。

42.如权利要求25至40中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包

含总共至少24个融合多肽。

43.如权利要求42所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包含总共至少32个融合多肽。

44.如权利要求39所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物具有总共约32个融合多肽。

45.如权利要求25至44中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物展现与hFcRn的结合。

46.如权利要求45所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物所展现的与hFcRn的结合基本上类似于IgG与hFcRn的结合,所述IgG诸如IgG1或IgG4。

47.如权利要求25至46中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物不展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

48.如权利要求47所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物不展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

49.如权利要求48所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物不展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

50.如权利要求47至49中任一项所述的自组装多肽,所述自组装多肽基本上不展现IgG4效应功能。

51.如权利要求25至46中任一项所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

52.如权利要求51所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

53.如权利要求52所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

54.如权利要求44至53中任一项所述的自组装多肽,所述自组装多肽展现抗体效应功能,诸如IgG效应功能。

55.如权利要求51至54中任一项所述的自组装多肽,所述自组装多肽展现IgG4效应功能。

56.一种组合物,所述组合物包含多个权利要求25至55中任一项所述的自组装多肽复合物。

57.如权利要求56所述的组合物,所述组合物包含不同的自组装多肽复合物的混合物。

58.一种方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用包含权利要求25至55中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物。

59.如权利要求58所述的方法,其中所述受试者是人类。

60.如权利要求58或59所述的方法,其中所述受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

61.如权利要求58或59所述的方法,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

62.如权利要求58或59所述的方法,其中所述受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

63.如权利要求58或59所述的方法,其中所述受试者患有代谢紊乱或处于发展成代谢紊乱的风险中。

64.如权利要求58至63中任一项所述的方法,所述方法包括通过全身途径施用。

65.如权利要求64所述的方法,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

66.一种包含权利要求25至55中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物的用途,所述用途是用于向哺乳动物受试者施用。

67.如权利要求66所述的用途,其中所述受试者是人类。

68.如权利要求66或67所述的用途,其中所述受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

69.如权利要求66或67所述的用途,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

70.如权利要求66或67所述的用途,其中所述受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

71.如权利要求66至67中任一项所述的用途,所述用途是用于通过全身途径施用。

72.如权利要求71所述的用途,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

73.一种包含权利要求25至55中任一项所述的自组装多肽复合物的组合物,所述组合物是用于向哺乳动物受试者施用。

74.如权利要求73所述使用的组合物,其中所述受试者是人类。

75.如权利要求73或74所述使用的组合物,其中所述受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

76.如权利要求73或74所述使用的组合物,其中所述受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

77.如权利要求73或74所述使用的组合物,其中所述受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

78.如权利要求73至77中任一项所述使用的组合物,所述组合物是用于通过全身途径施用。

79.如权利要求78所述使用的组合物,其中所述全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

经修饰的多抗体构建体、组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年10月16日提交的美国临时申请号63/256,566的权益和优先权，所述临时申请的全部内容特此出于所有目的通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及多肽。具体来说，本发明涉及经修饰的多抗体(multabody)构建体、组合物和方法。

背景技术

[0004] 基于抗体或抗体片段的治疗剂正在开发用于多种用途，例如用于治疗各种疾病或疾患。

[0005] 然而，基于抗体的治疗剂可能需要进行调整，使得它们在向受试者施用后具有期望的特征(例如，期望的生物分布、半衰期等)。一些基于抗体的治疗剂具有与天然免疫球蛋白分子不同的形式。举例来说，在一些治疗剂中，抗体或抗体片段与另一种多肽融合；在一些治疗剂中，一种或多种抗体或抗体片段处于自然界中未发现的构型或具有自然界中未发现的化合价。这些基于抗体的治疗剂可能也需要调整。

[0006] 因此，仍然需要优化的基于抗体的治疗剂。

发明内容

[0007] 根据一个方面，提供了一种融合蛋白，所述融合蛋白包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基，

[0008] 其中所述Fc多肽包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处具有突变的IgG4 Fc链，并且

[0009] 其中多个所述融合蛋白自组装形成纳米笼。

[0010] 在一个方面，IgG4 Fc链包含位置234和235处的突变。

[0011] 在一个方面，IgG4 Fc链包含F234A突变和L235A突变。

[0012] 在一个方面，IgG4 Fc链包含位置228处的突变。

[0013] 在一个方面，IgG4 Fc链包含S228P突变。

[0014] 在一个方面，IgG4 Fc链包含位置237和238处的突变。

[0015] 在一个方面，IgG4 Fc链包含G237A突变和P238S突变。

[0016] 在一个方面，IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变和L235A突变。

[0017] 在一个方面，IgG4 Fc链不包含G237或P238处的突变。

[0018] 在一个方面，IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

[0019] 在一个方面，IgG4 Fc链包含F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

[0020] 在一个方面，IgG4 Fc链不包含S228处的突变。

[0021] 在一个方面,纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

[0022] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

[0023] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

[0024] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白单体亚基。

[0025] 在一个方面,铁蛋白单体亚基是C-半铁蛋白。

[0026] 在一个方面,Fc多肽连接至C-半铁蛋白的N端。

[0027] 在一个方面,Fc多肽经由氨基酸接头连接至C-半铁蛋白的N端。

[0028] 在一个方面,氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

[0029] 在一个方面,$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

[0030] 在一个方面,Fc多肽包含单链Fc(scFc),所述单链Fc包含两条Fc链,其中所述两条Fc链经由氨基酸接头连接。

[0031] 在一个方面,连接两条Fc链的氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

[0032] 在一个方面,$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

[0033] 根据一个方面,提供了一种自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包含:

[0034] (a)一个或多个第一融合多肽,每个第一融合多肽是权利要求1-22中任一项所述的融合多肽,以及

[0035] (b)一个或多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含连接至纳米笼单体或其亚基的抗原结合部分。

[0036] 在一个方面,每个第二融合多肽的纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

[0037] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

[0038] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

[0039] 在一个方面,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。

[0040] 在一个方面,在每个第二融合多肽内,抗原结合部分经由氨基酸接头连接至纳米笼单体或其亚基。

[0041] 在一个方面,氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

[0042] 在一个方面,$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

[0043] 在一个方面,每个第二融合多肽的抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基的N端。

[0044] 在一个方面,每个第二融合多肽的抗原结合部分是Fab片段。

[0045] 在一个方面,每个第二融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

[0046] 在一个方面,自组装多肽复合物还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽包含连接至纳米笼单体或其亚基的抗原结合部分,其中所述第三融合多肽与第二融合多肽不同。

[0047] 在一个方面,每个第三融合多肽的抗原结合部分是Fab片段。

[0048] 在一个方面,每个第三融合多肽不包含任何抗体CH2或CH3结构域。

[0049] 在一些实施方案中,每个第一融合多肽和每个第二融合多肽的纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体亚基,并且

[0050] a.每个第一融合多肽包含C-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含N-半铁蛋白;或者

[0051] b.每个第一融合多肽包含N-半铁蛋白,并且每个第二融合多肽包含C-半铁蛋白。

[0052] 在一个方面,自组装多肽复合物的特征在于第一融合多肽与第二融合多肽的1:1比率。

[0053] 在一个方面,自组装多肽复合物包含总共24至48个融合多肽。

[0054] 在一个方面,自组装多肽复合物包含总共至少24个融合多肽。

[0055] 在一个方面,自组装多肽复合物包含总共至少32个融合多肽。

[0056] 在一个方面,自组装多肽复合物具有总共约32个融合多肽。

[0057] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与hFcRn的结合。

[0058] 在一个方面,自组装多肽复合物所展现的与hFcRn的结合基本上类似于IgG与hFcRn的结合,所述IgG诸如IgG1或IgG4。

[0059] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0060] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0061] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

[0062] 在一个方面,自组装多肽复合物基本上不展现IgG4效应功能。

[0063] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0064] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0065] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

[0066] 在一个方面,自组装多肽复合物展现抗体效应功能,诸如IgG效应功能。

[0067] 在一个方面,自组装多肽复合物展现IgG4效应功能。

[0068] 根据一个方面,提供了一种组合物,所述组合物包含多种本文所描述的自组装多肽复合物。

[0069] 在一个方面,组合物包含不同自组装多肽复合物的混合物。

[0070] 根据一个方面,提供了一种方法,所述方法包括向哺乳动物受试者施用包含本文所描述的自组装多肽复合物的组合物。

[0071] 在一个方面,受试者是人类。

[0072] 在一个方面,受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

[0073] 在一个方面,受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

[0074] 在一个方面,受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

[0075] 在一个方面,受试者患有代谢紊乱或处于发展成代谢紊乱的风险中。

[0076] 在一个方面,方法包括通过全身途径施用。

[0077] 在一个方面,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

[0078] 根据一个方面,提供了一种包含本文所描述的自组装多肽复合物的组合物的用途,所述用途是用于向哺乳动物受试者施用。

[0079] 在一个方面,受试者是人类。

[0080] 在一个方面,受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

[0081] 在一个方面,受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

[0082] 在一个方面,受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

[0083] 在一个方面,用途是用于通过全身途径施用。

[0084] 在一个方面,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

[0085] 根据一个方面,提供了一种包含本文所描述的自组装多肽复合物的组合物,所述组合物是用于向哺乳动物受试者施用。

[0086] 在一个方面,受试者是人类。

[0087] 在一个方面,受试者患有癌症或处于发展成癌症的风险中。

[0088] 在一个方面,受试者患有自身免疫性病症或处于发展成自身免疫性病症的风险中。

[0089] 在一个方面,受试者患有传染病或处于发展成传染病的风险中。

[0090] 在一个方面,组合物是用于通过全身途径施用。

[0091] 在一个方面,全身途径包括皮下、静脉内或肌内注射、吸入或鼻内施用。

[0092] 根据一个方面,提供了一种自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物包含:

[0093] (a)一个或多个融合蛋白,所述融合蛋白包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基,其中所述Fc多肽包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处具有突变的IgG4 Fc链,以及

[0094] (b)一个或多个融合蛋白,所述融合蛋白包含连接至SARS-CoV-2结合部分的纳米笼单体或其亚基;

[0095] 其中多个所述融合蛋白自组装形成纳米笼。

[0096] 在一个方面,IgG4 Fc链包含位置234和235处的突变。

[0097] 在一个方面,IgG4 Fc链包含F234A突变和L235A突变。

[0098] 在一个方面,IgG4 Fc链包含位置228处的突变。

[0099] 在一个方面,IgG4 Fc链包含S228P突变。

[0100] 在一个方面,IgG4 Fc链包含位置237和238处的突变。

[0101] 在一个方面,IgG4 Fc链包含G237A突变和P238S突变。

[0102] 在一个方面,IgG4 Fc链不包含G237或P238处的突变。

[0103] 在一个方面,IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变和L235A突变。

[0104] 在一个方面,IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

[0105] 在一个方面,IgG4 Fc链包含F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。

[0106] 在一个方面,IgG4 Fc链不包含S228处的突变。

[0107] 在一个方面,纳米笼单体或其亚基是铁蛋白单体或其亚基。

[0108] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白轻链或其亚基。

[0109] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是人铁蛋白或其亚基。

[0110] 在一个方面,铁蛋白单体或其亚基是铁蛋白单体亚基。

[0111] 在一个方面,铁蛋白单体亚基是C-半铁蛋白。

[0112] 在一个方面,Fc多肽连接至C-半铁蛋白的N端。

[0113] 在一个方面,Fc多肽经由氨基酸接头连接至C-半铁蛋白的N端。

[0114] 在一个方面,氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

[0115] 在一个方面,$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

[0116] 在一个方面,Fc多肽包含单链Fc(scFc),所述单链Fc包含两条Fc链,其中所述两条Fc链经由氨基酸接头连接。

[0117] 在一个方面,连接两条Fc链的氨基酸接头包括$(G_nS)_m$接头。

[0118] 在一个方面,$(G_nS)_m$接头是$(GGGGS)_m$接头。

[0119] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分靶向SARS-CoV-2 S糖蛋白。

[0120] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,优选外表面。

[0121] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分包括抗体或其片段。

[0122] 在一个方面,抗体或其片段包括Fab片段。

[0123] 在一个方面,抗体或其片段包括scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH结构域或它们的组合。

[0124] 在一个方面,抗体或其片段包括Fab片段的重链和/或轻链。

[0125] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分包括单链可变结构域VHH-72、BD23和/或4A8。

[0126] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分包括表4中列出的mAb。

[0127] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分包括表4中的mAb 298、324、46、80、52、82或236,或其变体。

[0128] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分包括表4中的mAb 298、80和52,或其变体。

[0129] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分在纳米笼单体的N端或C端连接,或者其中第一SARS-CoV-2结合部分在纳米笼单体的N端连接并且第二SARS-CoV-2结合部分在纳米笼单体的C端连接,其中第一和第二SARS-CoV-2结合部分是相同或不同的。

[0130] 在一个方面,纳米笼单体包括连接至SARS-CoV-2结合部分的第一纳米笼单体亚基;其中第一纳米笼单体亚基与第二纳米笼单体亚基自组装形成纳米笼单体。

[0131] 在一个方面,SARS-CoV-2结合部分在第一纳米笼单体的N端或C端连接,或者其中第一SARS-CoV-2结合部分在纳米笼单体亚基的N端连接并且第二SARS-CoV-2结合部分在第一纳米笼单体亚基的C端连接,其中第一和第二SARS-CoV-2结合部分是相同或不同的。

[0132] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与hFcRn的结合。

[0133] 在一个方面,自组装多肽复合物所展现的与hFcRn的结合基本上类似于IgG与hFcRn的结合,所述IgG诸如IgG1或IgG4。

[0134] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0135] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、

hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0136] 在一个方面,自组装多肽复合物不展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

[0137] 在一个方面,自组装多肽复合物基本上不展现IgG4效应功能。

[0138] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与至少一种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0139] 在一个方面,如权利要求42所述的自组装多肽复合物,所述自组装多肽复合物展现与选自由hFcγRI、hFcγRIIa、hFcγRIIb、hFcγRIIIa、hFcγRIIIb和它们的组合组成的组的一种或多种人类Fcγ受体的结合,如在体外测定中所确定。

[0140] 在一个方面,自组装多肽复合物展现与hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合,如在体外测定中所确定。

[0141] 在一个方面,自组装多肽复合物展现抗体效应功能,诸如IgG效应功能。

[0142] 在一个方面,自组装多肽复合物展现IgG4效应功能。

[0143] 根据一个方面,提供了一种组合物,所述组合物包含多种本文所描述的自组装多肽复合物。

[0144] 在一个方面,组合物包含不同自组装多肽复合物的混合物。

[0145] 根据一个方面,提供了一种SARS-CoV-2治疗性或预防性组合物,所述组合物包含本文所描述的自组装多肽复合物。

[0146] 根据一个方面,提供了一种用于治疗和/或预防SARS-CoV-2的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所描述的自组装多肽复合物。

[0147] 根据一个方面,提供了一种本文所描述的自组装多肽复合物的用途,所述用途是用于治疗和/或预防SARS-CoV-2。

[0148] 在一个方面,自组装多肽复合物用于治疗和/或预防SARS-CoV-2。

[0149] 通过审查本发明的以下详细描述,本发明的新颖特征将为本领域技术人员显而易见。然而,应理解,虽然本发明的详细描述和所呈现的具体实施例指示本发明的某些方面,但它们仅出于说明的目的而提供,这是因为通过本发明的详细描述和所附权利要求书,本发明的精神和范围内的各种变化和修改将为本领域技术人员显而易见。

附图说明

[0150] 通过以下参考附图的描述,将进一步理解本发明,其中:

[0151] 图1.亲合力增强了VHH对SARS-CoV-2的结合和中和。a单体VHH结构域及其使用常规Fc(深红色)支架或人脱铁铁蛋白(灰色)的多聚化的示意图。b单独的脱铁铁蛋白(灰色)和VHH-72脱铁铁蛋白粒子(金色)的尺寸排阻色谱和SDS-PAGE。c VHH-72脱铁铁蛋白粒子的负染色电子显微镜检查。(比例尺50nm,代表两个独立实验)。d当以二价(深红色)或24聚体(金色)形式展示时,VHH-72与SARS-CoV-2 S蛋白的结合亲合力(表观K_D)的比较。尺条指示n＝2个生物学独立实验的平均值。低于10^{-12}M(虚线)的表观K_D超出仪器检测限。e对SARS-CoV-2 PsV的中和效力(颜色编码如(d)中所示)。显示了具有类似结果的两个生物学独立重复中的一个代表。图中表示了两个技术重复的平均值±SD。显示了两个生物学独立重复的

中位IC_{50}值。

[0152] 图2.Fab 52和298与RBD的结合界面。Fab 298(a)和52(b)与RBD(浅绿色和深绿色分别代表核心区域和RBM区域)的相互作用由互补决定区(CDR)重链(H)1(黄色)、H2(橙色)、H3(红色)、κ轻链(K)1(浅蓝色)和K3(紫色)介导。关键结合残基以棒(插图)显示。H键和盐桥以黑色虚线描绘。Fab的L链和H链分别以褐色和白色显示。c)结合至RBD的ACE2(左)和Fab 298(右)的底视图和侧视图。作为ACE2-RBD和Fab 298-RBD复合物的结合界面的一部分的RBD侧链以粉色描绘,而给定界面所特有的RBD侧链以黄色显示。ACE2的表面、Fab 298HC和Fab 298KC的可变区分别以白色、灰色和褐色显示。RBD颜色如(a)中所示。d)当结合至RBD(绿色)时,Fab 46(浅粉色)和52(深粉色)的叠加揭示出对于两种mAb不同的接近角。在e)298-RBD和f)52-RBD的界面处,在1.3σ处标示等高线的复合略图电子密度的立体图像。

[0153] 图3.小鼠替代性多抗体的生物利用度、生物分布和免疫原性。a与亲本IgG相比,WT和Fc修饰的(LALAP突变)MB在内体(中)和生理(右)pH下与小鼠Fcγ RI(左)和小鼠FcRn的结合动力学。使用从100至3nM(IgG)和10至0.3nM(MB)的两倍稀释系列。红线代表原始数据;黑线代表全局拟合。b每组使用五只雄性C57BL/6小鼠,以在皮下施用5mg/kg之后评估替代性小鼠MB、Fc修饰的MB(LALAP突变)和亲本小鼠IgG(IgG1和IgG2a亚型)的血清浓度。c用Alexa-647标记MB和IgG2a样品,以经由实时非侵入性2D全身成像可视化它们在皮下注射至三只雄性BALB/c小鼠/组中之后的生物分布。具有与多抗体类似的Rh值的15nm荧光标记的金纳米粒子(GNP)作为比较物显示。d每组使用五只雄性C57BL/6小鼠,以通过与亲本IgG和融合至幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)铁蛋白(HpFerr)的物种错配的疟疾PfCSP肽进行比较来评估小鼠替代性多抗体诱导的任何抗药抗体反应。(b)和(d)中显示了n=5只小鼠的平均值±SD。

[0154] 图4.替代性小鼠多抗体的3D生物分布与其亲本IgG相当。经由实时非侵入性3D全身成像可视化15nm金纳米粒子(GNP)、MB和用Alexa-647标记的IgG样品在皮下注射至BALB/c小鼠之后的生物分布。a)代表性3D渲染荧光图像与PBS注射的对照的CT扫描的叠加。b)与CT扫描叠加的小鼠主要器官的定位描绘。c)在皮下注射金纳米粒子(顶部)、MB(中间三幅图)或IgG(底部图)之后1小时(1H)、两天(D2)、八天(D8)和11天(D11)的3D渲染荧光图像与CT扫描的叠加。展示了每个3D图像集,其显示与CT扫描(右)叠加的背视图,以及基于信号定位的所选正面(左上)、内侧(中间)和横向(左下)平面。3D荧光图像映射至彩虹查找表(LUT),其中色标最小值设置为背景并且最大值设置为50pmol $M^{-1}cm^{-1}$(GNP)或1000pmol $M^{-1}cm^{-1}$(MB和IgG)。

[0155] 图5.蛋白质工程改造以多聚化针对SARS-CoV-2的类IgG粒子。a人脱铁铁蛋白分裂设计的示意图。b MB的负染色电子显微照片。(比例尺50nm,代表两个独立实验)。c MB的流体动力学半径(Rh)。d对4A8(紫色)和BD23(灰色)与SARS-CoV-2刺突结合(表观K_D)的亲合力影响。e具有不同Fc序列变体的BD23 IgG和MB与Fcγ RI(顶行)、内体pH下的FcRn(中行)和生理pH下的FcRn(底行)结合的传感图。红线代表原始数据,而黑线代表全局拟合。f 4A8和BD23 IgG和MB对SARS-CoV-2 PsV的中和。三个生物学独立样品的代表性数据。每个中和图中显示了两个技术重复的平均值±SD。指示了三个生物学独立重复的中位IC_{50}值。

[0156] 图6.多抗体增强了来自噬菌体展示的人类mAb的效力。a使用MB技术鉴定强效抗SARS-CoV-2中和剂的工作流程。使用Biorender创建。b展现来源于噬菌体展示的相同人类

Fab序列的IgG(青色)和MB(粉色)之间的中和效力的比较。c多聚化之后IC_{50}值的倍数增加。d最强效的中和MB(粉色)与它们的IgG对应物(青色)相比对于结合SARS-CoV-2 S蛋白的表观亲和力(K_D)、缔合(k_{on})和解离(k_{off})速率。(b)和(c)中对于IC_{50}值显示了三个生物学重复及其平均值。

[0157] 图7.SARS-CoV-2 RBD靶向多抗体及其亲本IgG的中和。a)当以IgG(黑色)和MB(深红色)展示时,20种针对SARS-CoV-2 PsV的抗体的代表性中和滴定曲线。显示了三个生物学重复的平均IC_{50}值以供比较。每个中和图中显示了两个技术重复的平均值±SD。b)所选IgG和MB针对靶向293T-ACE2(黑色)和HeLa-ACE2(灰色)靶细胞的SARS-CoV-2 PsV的中和型态。分别显示了293T-ACE2和HeLa-ACE2细胞的三个和两个生物学重复的平均IC_{50}值和个别IC_{50}值。c)三个生物学重复(不同灰度)针对真正的SARS-CoV-2/SB2-P4-PB毒株的中和滴定曲线。指示了平均IC_{50}。(a)和(c)中包括了重组mAb REGN10933(红色)和REGN10987(蓝色)的中和效力,作为比较的基准。

[0158] 图8.SARS-CoV-2 RBD靶向多抗体的表达产量和均质性。a)七种最强效的IgG(白色)及其各自的MB(深红色)的产量(mg/L)。两个生物学独立样品的平均值±SD。b)聚集温度(Tagg,℃)比较如(a)中所示。实线表示两个生物学独立样品的平均Tagg值。c)来自三个独立表达和纯化的298IgG(顶行,黑色)和298MB(底行,深红色)的SEC色谱图。在SEC之前,在两种情况下,使用蛋白A亲和色谱来纯化样品。箭头指示了每个批次中进行PsV中和检定所用的峰值。标注了IC_{50}值(μg/mL)。每个中和图中显示了两个技术重复的平均值±SD。

[0159] 图9.IgG和MB的结合型态。IgG和MB与固定至Ni-NTA生物传感器上的SARS-CoV-2的RBD(左)和S蛋白(右)结合的传感图。使用从125至4nM(IgG)和16至0.5nM(MB)的2倍稀释系列。红线代表原始数据,而黑线代表全局拟合。

[0160] 图10.最强效的mAb特异性的表位划分。a RBD(浅绿色代表核心并且深绿色代表RBM)和ACE2[66](浅棕色)结合的表面和动画表示。热图显示结合竞争实验。高信号响应(红色)代表低竞争,而低信号响应(白色)对应于高竞争。表位仓以虚线框突出显示。b刺突(灰色)与Fab 80(黄色)、298(橙色)和324(红色)复合的15.0 Å滤波cryo-EM重建。RBD和NTD分别以绿色和蓝色显示。c Fab 46(粉色)和RBD(绿色)复合物的Cryo-EM重建。将RBD[66]二级结构动画与RBD观察到的部分密度相拟合。d由Fab 52(紫色)、Fab 298(橙色)和RBD(绿色)形成的三元复合物的晶体结构。e描绘具有可用的PDB或EMD条目的未配位(PDB 6XM4)和抗体结合的SARS-CoV-2刺突的侧视图和顶视图的复合图像。插图:靶向RBD上的不同抗原位点的抗体的近视图。选择针对SARS-CoV-2 PsV的具有最低报告IC_{50}值的mAb作为所述仓的代表性抗体(以粗体突出显示),并且具有类似结合表位的那些抗体以相同颜色列于下方(刺突、NTD和RBD的颜色编码如(b)中所示)。未配位刺突中的个别原聚体以白色、粉色和紫色显示。

[0161] 图11.表位分仓。通过生物层干涉法(BLI)测量的mAb与His标记的RBD的结合竞争实验。将50μg/ml mAb 1孵育3分钟,随后与50μg/ml mAb 2一起孵育5分钟。

[0162] 图12.Fab-刺突和Fab-RBD复合物的Cryo-EM分析。显示了Fab 80-刺突复合物(a)、Fab 298-刺突复合物(b)、Fab 324-刺突复合物(c)和Fab 46-RBD复合物(d)的代表性cryo-EM显微照片(比例尺50nm,左上)、所选2D类别平均值(右上)、最终3D非均匀细化的傅里叶壳层相关曲线(Fourier shell correlation curve)(左下)和在cryo-EM图的表面上绘制的局部分辨率(Å)(右下)。

[0163] 图13.多抗体克服了SARS-CoV-2序列多样性。a以球体显示四个天然发生的突变的RBD的动画表示。mAb 52(浅粉色)和298(黄色)的表位显示为每个仓的代表性表位。分别在WT与突变RBD和PsV之间进行的b亲和力和c IC_{50}倍数变化比较。d与WT PsV相比,IgG(灰色尺条)对比MB(深红色尺条)对SARS-CoV-2 PsV变体的中和效力。e两种IgG混合液(三种IgG)、单特异性MB混合液(三种MB)和三特异性MB对WT SARS-CoV-2 PsV和变体的中和效力比较。选择对一种或多种PsV变体敏感的mAb(d)以生成混合液和三特异性MB。f三特异性298-80-52MB对SARS-CoV-2B.1.351PsV变体的中和效力。gPsV(y轴)和具有复制能力的SARS-CoV-2病毒(SB2-P4-PB:x轴)中的IC_{50}值,其展示三特异性MB(红色)增强广泛mAb特征(蓝色和黑色)中的效力的能力。h多聚化之后IC_{50}值的倍数增加。(b-h)中显示了三个生物学重复的平均值。

[0164] 图14.MB强有力地克服了SARS-CoV-2序列变异性。a)所选的IgG和MB对WT PsV(深红色)和传染性更强的D614G PsV(灰色)的中和效力的比较。b)使用MB分裂设计组合三种Fab特异性和Fc片段生成的三特异性MB的示意图。c)生成了组合mAb 298、80和52或298、324和46的特异性的混合液和三特异性MB,并且针对WT PsV进行测试。每个代表性中和图中表示了两个技术重复的平均值±SD。源数据以源数据文件的形式提供。d)与WT PsV相比,混合液和三特异性MB对假型SARS-CoV-2变体的中和效力变化。选择了对混合液内的个别抗体敏感的PsV变体。虚线内的区域代表IC50值的3倍变化。这个阈值被确立为敏感性增加(上条尺)或抗性增加(下条尺)的截止值。e)显示针对真正的SARS-CoV-2/SB2-P4-PB毒株的混合液和三特异性MB的三个生物学重复的中和滴定曲线。显示了三个生物学独立重复的平均IC50值。

[0165] 图15.mAb 52的VL中的N92T突变不会影响在WT假病毒中和测定中作为IgG或单特异性MB两者的效力。

[0166] 图16.在P.1PsV中和测定中筛选了mAb 52的VL中含有N92T突变的298-80-52三特异性MB(T10 MB),并且结果确认了与亲本三特异性MB相比,没有观察到效力损失。

[0167] 图17.三特异性MB(298-80-52)在假病毒中和测定中对所关注变体展示优越的效力。

[0168] 图18.T10 MB在假病毒和真病毒测定中显示相当的中和。

[0169] 图19.在SARS-CoV-2攻击研究中使用T10 MB进行的体内保护。对于MB命名,参见表17。(a)与相应的混合液IgG相比,三特异性MB*展现的效力增加了>1000倍。(b-c)结合研究揭示,三特异性MB*和IgG4*抗体混合液两者展现与小鼠和人类FcRn的pH依赖性结合,并且不与人类和小鼠Fcγ受体(FcγR)结合,而对于相应的IgG1抗体混合液对照则观察到FcγR结合。(d)使用经SARS-CoV-2刺突蛋白包被的荧光标记珠粒进行的抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)实验进一步确认了三特异性MB*和IgG4*混合液无法与Fc受体啮合,而IgG1抗体混合液显示对SARS-CoV-2刺突包被的珠粒的大量吸收。(e)与IgG4*混合液相比,三特异性MB*提供了显著更好的保护(60%存活率)。(f)保护作用的提高与肺病毒滴度的显著降低相关,特别是在经受住攻击的动物中。(g)当以3μg(0.15mg/kg)递送三特异性MB*并以90mg(4.5mg/kg)递送IgG4*混合液时,达成相当的体内保护。(h)在攻击后D2时,可以在所施用分子的循环血清浓度中观察到剂量差异。(i)还评价了肺中的MB和IgG滴度,并且在终点时在肺中检测到三特异性MB*,从而突显MB进入肺中的能力。

[0170] 图20.(a)IgG4 Fc MB变体显示与hFcRn的结合相当,但与hFcγR的结合型态不同。(b)对于食蟹猴FcRn和FcγRI,观察到T10.A、T10.B和T10.G与人类FcRn和FcγRI结合的类似趋势。(c)T10.A、T10.B和T10.G全部未显示与小鼠FcγRI的可检测的结合。

[0171] 图21.(a)与阴性IgG对照相比,T10.B和T10.G MB两者均能够在D12时使存活率达75%。(b)在整个实验过程中,存活小鼠中的体内保护伴随有体重损失的减少。(c)在D12时,存活小鼠的体内保护伴随有在测定的检测限下肺部病毒滴度的降低。

[0172] 图22.(a)与纯合hFcRn/hACE2转基因小鼠中的阴性对照IgG组相比,T10.G MB能够提供75%的保护作用。(b)在整个实验过程中,存活小鼠中的体内保护伴随有体重损失的减少。

[0173] 图23.T10.B MB达到预期最大血清浓度(Cmax)并且在NHP给药后数周内在循环中可检测到。

[0174] 图24.(a)使用工程改造的脱铁铁蛋白分裂设计生成三特异性MB分子。(b)对cryoEM显微照片的分析揭示了高度装饰和均匀的类纳米笼粒子的形成。与将scFab和scFc组分连接至脱铁铁蛋白支架的柔性$(GGS)_x$接头的存在一致,(c)这些抗体片段的密度在2D类别中难以分辨,以及(d)三特异性MB的3D重建。

[0175] 图25.为了获得对多抗体设计组装的分子见解,通过低温电子显微镜检查(cryoEM)来表征这种三特异性MB。

[0176] 图26.(a)-(i)确认Fab和Fc组分在MB上适当组装达到约7 Å分辨率。

[0177] 图27.当(a)-(d)不应用对称性(C1)或(e)-(h)应用八面体对称性(O)时,MB的脱铁铁蛋白支架的3D重建分别达到2.4 Å和2.1 Å分辨率。

[0178] 图28.在3.1 Å分辨率下80 Fab与RBD复合的晶体结构。

[0179] 图29.(a)mAb 80通过受体阻断而抑制SARS-CoV-2感染,从而阻止ACE2与受体结合基序相互作用。(b)-(c)RBD的残基S477和T478与抗体的Y92和D^{100D}形成氢键,从而掩埋其124 $Å^2$的表面积并且占RBD总掩埋表面积(BSA)的15%。(d)-(e)这些残基在数种VOC中发生突变,包括Omicron(BA.1、BA.2),这显著降低了抗体与Omicron BA.1RBD的结合亲和力。80MB与突变的Omicron BA.1RBD的相互作用具有高表观结合亲和力并且没有可检测的解离速率,(g)这可能有助于恢复对Omicron BA.1的中和效力。(f)使用具有复制能力的病毒另外确认了80MB对Omicron BA.2的效力:正如预期,对于80mAb观察到对Omicron BA.2活病毒的效力大大降低,但MB形式保留了高中和效力。

[0180] 图30.(a)-(b)mAb 80的重链主要负责与RBD的相互作用,从而贡献了结合界面中发现的十一个氢键中的十个。(c)抗体重链的F54与RBD的Y489相互作用使得在RBD结构内在残基Y473、F456和Y421之间形成新的三重π-堆积。

具体实施方式

[0181] 定义

[0182] 除非另有解释,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。分子生物学中常用术语的定义可以在以下文献中找到:Benjamin Lewin,Genes V,Oxford University Press出版,1994(ISBN 0-19-

854287-9);Kendrew等人(编),The Encyclopedia of Molecular Biology,Blackwell Science Ltd.出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);以及Robert A.Meyers(编),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)。尽管类似于或等效于本文所描述的那些的任何方法和材料都可以用于本发明的测试实践,但本文描述了典型材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0183] 还应理解,本文所用的术语仅仅是为了描述特定方面的目的并且不旨在具有限制性。本文参考了许多专利申请、专利和出版物以帮助理解所描述的方面。这些参考文献中的每一者通过引用整体并入本文。

[0184] 在理解本申请的范围时,冠词“一个”、“一种”、“这种”和“所述”旨在意指存在一个或多个要素。另外,如本文所用,术语“包含”及其衍生词意指开放式术语,其指定所陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在,但不排除其它未陈述的特征、要素、组分、组、整数和/或步骤的存在。前述内容也适用于具有类似含义的词语,诸如“包括”、“具有”及其衍生词等术语。

[0185] 将理解,描述为“包含”某些组分的任何方面也可以是“由……组成”或“基本上由……组成”,其中“由……组成”具有封闭式或限制性含义,并且“基本上由……组成”意味着包括指定的组分,但排除除了作为杂质存在的材料、由于用于提供组分的工艺而不可避免的材料以及为了达成除本发明的技术效果以外的目的而添加的组分之外的其它组分。举例来说,使用短语“基本由……组成”定义的组合物涵盖任何已知可接受的添加剂、赋形剂、稀释剂、载体等。通常,基本上由一组组分组成的组合物将包含少于5重量%、通常少于3重量%、更通常少于1重量%并且甚至更通常少于0.1重量%的一种或多种非指定组分。

[0186] 将理解,本文中定义为包括的任何组分可以通过附带条件或负面限制的方式明确地从要求保护的发明内容中排除。举例来说,在一些方面,本文所描述的纳米笼和/或融合蛋白可以排除铁蛋白重链和/或可以排除铁结合组分。

[0187] 另外,本文所给出的所有范围包括范围的端点以及任何中间范围点,无论是否明确陈述。

[0188] 如本文所用,诸如“基本上”、“约”和“大约”等程度术语是指所修饰术语的合理偏差量,以使最终结果不会发生显著改变。这些程度术语应解释为包括所修饰术语至多并包括至少±5%的偏差,条件是这种偏差不会否定其所修饰的词语的含义。举例来说,术语“约”可以涵盖处于所提及值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小以内的值的范围。

[0189] 缩写“例如(eg)”来源于拉丁语exempli gratia,并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(eg)”与术语“例如(for example)”或“诸如(such as)”同义。除非上下文另有明确指示,否则词语“或”旨在包括“和”。

[0190] 如本文所用,术语“受试者”是指动物界的任何成员,通常是哺乳动物。术语“哺乳动物”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人类、其它高等灵长类动物、家养动物和农场动物以及动物园、运动或宠物动物,诸如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。通常,哺乳动物是人类。

[0191] 术语“蛋白质纳米粒子”、“纳米笼”和“多抗体”在本文中可互换使用,并且是指多

亚基、基于蛋白质的多面体形结构。亚基或纳米笼单体各自由蛋白质或多肽(例如糖基化多肽)组成,并且任选地由以下单个或多个特征组成:核酸、辅基、有机和无机化合物。蛋白质纳米粒子的非限制性实例包括铁蛋白纳米粒子(参见例如Zhang,Y.Int.J.Mol.Sci.,12:5406-5421,2011,通过引用并入本文)、包封蛋白(encapsulin)纳米粒子(参见例如Sutter等人,Nature Struct,and Mol.Biol.,15:939-947,2008,通过引用并入本文)、硫加氧酶还原酶(SOR)纳米粒子(参见例如Urich等人,Science,311:996-1000,2006,通过引用并入本文)、二氧四氢喋啶合酶(lumazine synthase)纳米粒子(参见例如Zhang等人,J.Mol.Biol.,306:1099-1114,2001)或丙酮酸脱氢酶纳米粒子(参见例如Izard等人,PNAS 96:1240-1245,1999,通过引用并入本文)。铁蛋白、脱铁铁蛋白、包封蛋白、SOR、二氧四氢喋啶合酶和丙酮酸脱氢酶是单体蛋白,它们自组装成球状蛋白质复合物,在一些情况下分别由24、60、24、60和60个蛋白质亚基组成。铁蛋白和脱铁铁蛋白在本文中一般可互换地提及并且应理解为均适用于本文所描述的融合蛋白、纳米笼和方法。羧酶体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P和MS2外壳蛋白也产生预期用于本文中的纳米笼。另外,完全或部分合成的自组装单体也预期用于本文中。

[0192] 将理解,每个纳米笼单体可以分为两个或更多个亚基,这些亚基将自组装成功能性纳米笼单体。举例来说,铁蛋白或脱铁铁蛋白可以分为N亚基和C亚基,例如,通过将全长铁蛋白基本上分成两半而获得的N亚基和C亚基,使得每个亚基可以独立地结合至不同的结合部分,诸如抗原结合部分或生物活性部分,以随后自组装成纳米笼单体,然后自组装成纳米笼。在各方面,每个亚基可以在两端结合相同或不同的结合部分和/或生物活性部分。“功能性纳米笼单体”意指纳米笼单体能够与其它此类单体自组装成如本文所描述的纳米笼。

[0193] 术语“铁蛋白”和“脱铁铁蛋白”在本文中可互换使用,并且一般是指能够组装成铁蛋白复合物的多肽(例如,铁蛋白链),所述铁蛋白复合物通常包含24个蛋白质亚基。将理解,铁蛋白可以来自任何物种。通常,铁蛋白是人铁蛋白。在一些实施方案中,铁蛋白是野生型铁蛋白。举例来说,铁蛋白可以是野生型人铁蛋白。在一些实施方案中,铁蛋白轻链用作纳米笼单体,并且/或者铁蛋白轻链的亚基用作纳米笼单体亚基。在一些实施方案中,组装的纳米笼不包括任何铁蛋白重链或能够与铁结合的其它铁蛋白组分。

[0194] 如本文所用,术语“多特异性”是指具有至少两个结合位点的特征,至少两个不同的结合配偶体(例如,抗原或受体(例如,Fc受体))可以在所述结合位点处结合。举例来说,包含至少两个Fab片段的纳米笼(其中两个Fab片段中的每一者结合至不同抗原)是“多特异性的”。作为另一个实例,包含Fc片段(能够结合至Fc受体)和Fab片段(能够结合至抗原)的纳米笼是“多特异性的”。

[0195] 如本文所用,术语“多价”是指具有至少两个结合位点的特征,结合配偶体(例如,抗原或受体(例如,Fc受体))可以在所述结合位点处结合。可以结合至至少两个结合位点的结合配偶体可以相同或不同。

[0196] 术语“抗体”,在本领域中也称为“免疫球蛋白”(Ig),在本文中用于指由成对的重链和轻链多肽构成的蛋白质;存在各种Ig同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG(诸如IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4)和IgM。将理解,抗体可以来自任何物种,包括人类、小鼠、大鼠、猴、骆驼或鲨鱼。当抗体正确折叠时,每条链折叠成由更多线性多肽序列连接的多个不同的球状结构域。举例来说,在IgG的情况下,免疫球蛋白轻链折叠成可变结构域(V_L)和恒定结构域(CL),而重

链折叠成可变结构域(V_H)和三个恒定结构域(C_H、C_{H2}、C_{H3})。重链和轻链可变结构域(V_H和V_L)的相互作用得以形成抗原结合区(Fv)。每个结构域具有本领域技术人员所熟悉的完善结构。

[0197] 轻链和重链可变区负责结合靶抗原,并且因此抗体之间显示显著的序列多样性。恒定区显示较少的序列多样性,并且负责结合多种天然蛋白质以引发重要的免疫事件。抗体的可变区含有分子的抗原结合决定簇,并且因此决定了抗体对其靶抗原的特异性。大多数序列变异性在六个高变区中发生,每个可变重链和轻链各有三个;高变区组合形成抗原结合位点,并且有助于抗原决定簇的结合和识别。抗体对其抗原的特异性和亲和力由高变区的结构以及它们呈递给抗原的表面的大小、形状和化学性质。

[0198] 如本文所提及的"抗体片段"可以包括本领域中已知的任何适合的抗原结合抗体片段。抗体片段可以是天然存在的抗体片段,或可以通过对天然存在的抗体进行操作或通过使用重组方法来获得。举例来说,抗体片段可以包括但不限于Fv、单链Fv(scFv;由通过肽接头连接的V_L和V_H组成的分子)、Fc、单链Fc、Fab、单链Fab、$F(ab')_2$、单结构域抗体(sdAb;由单个V_L或V_H组成的片段)以及其中任一者的多价呈现形式。

[0199] 如本文所用,术语"合成抗体"意指使用重组DNA技术生成的抗体。所述术语还应解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子(并且所述DNA分子表达抗体蛋白)或指定抗体的氨基酸序列而生成的抗体,其中DNA或氨基酸序列已使用本领域中可用和众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术而获得。

[0200] 术语"表位"是指抗原决定簇。表位是分子上具有抗原性(即,引发特异性免疫反应)的特定化学基团或肽序列。抗体特异性地结合特定抗原表位,例如,多肽上的表位。表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括具有独特空间构象的至少3个并且更通常至少5个、约9个、约11个或约8个至约12个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x射线晶体学和二维核磁共振。参见例如"Epitope Mapping Protocols"Methods in Molecular Biology,第66卷,Glenn E.Morris编(1996)。

[0201] 如本文所用,术语"抗原"定义为激发免疫反应的分子。这种免疫反应可以涉及抗体的产生或特定免疫活性细胞的激活,或两者。技术人员将理解,包括几乎所有蛋白质或肽在内的任何大分子都可以充当抗原。此外,抗原可以来源于重组或基因组DNA。技术人员将理解,包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因而编码"抗原",正如所述术语在本文所用的含义那样。此外,本领域技术人员将理解,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本文所描述的方面包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列可以按各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由"基因"编码。显而易见的是,抗原可以合成得到或者可以来源于生物样品。此种生物样品可以包括但不限于组织样品、细胞或生物流体。

[0202] "编码"是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中的核苷酸的特定序列充当在生物过程中合成具有限定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列的其它聚合物和大分子的模板的固有特性和由此产生的生物特性。因此,基因编码蛋白质,条件是

对应于所述基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生所述蛋白质。其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供的编码链以及用作基因或cDNA的转录模板的非编码链均可以被称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0203] 如本文所用,术语“表达”定义为特定核苷酸序列由其启动子驱动的转录和/或翻译。

[0204] “分离的”意指从天然状态改变或去除。举例来说,在活动物体内天然存在的核酸或肽不是“分离的”,但部分地或完全地从其天然状态的共存物质分离出的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以呈基本上纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境(诸如宿主细胞)中。

[0205] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并型式并且编码同一氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子至编码蛋白质的核苷酸序列在一些型式中可以含有一个或多个内含子的程度。

[0206] 如本文所用,术语“调节”意指与不存在治疗或化合物的情况下受试者的反应水平相比,和/或与其它方面相同但未经治疗的受试者的反应水平相比,介导受试者的反应水平可检测的增加或减少。所述术语涵盖扰乱和/或影响天然信号或反应,从而介导受试者(通常是人类)的有益治疗反应。

[0207] 术语“可操作地连接”是指调控序列与异源核酸序列之间的功能性连接,从而促成后者的表达。举例来说,当第一核酸序列与第二核酸序列呈功能性关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。举例来说,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子可操作地连接至编码序列。一般来说,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且必要时连接同一个阅读框中的两个蛋白质编码区。

[0208] 组合物的“胃肠外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。还包括吸入和鼻内施用。

[0209] 如本文所用,术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,如本文所用,核酸和多核苷酸可互换。本领域技术人员一般知晓,核酸是多核苷酸,其可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文所用,多核苷酸包括但不限于通过本领域中可用的任何方式获得的所有核酸序列,包括但不限于重组方式,即,使用普通克隆技术和PCR等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列,以及合成方式。

[0210] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两种氨基酸,并且对于可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目没有设限。多肽包括由两个或更多个氨基酸通过肽键彼此连接的任何肽或蛋白质。如本文所用,所述术语是指短链,所述短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物;和长链,所述长链在本领域中一般称为蛋白质,所述蛋白质具有许多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或它们的组合。

[0211] 如本文关于抗体所用,术语“特异性地结合”是指识别特定抗原,但基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。举例来说,特异性地结合至来自一种物种的抗原的抗体也可以结合至来自一种或多种物种的所述抗原。但是,此种物种交叉反应性本身不会改变

抗体的特定分类。在另一个实例中,特异性地结合至抗原的抗体也可以结合至所述抗原的不同等位基因形式。然而,此种交叉反应性本身不会改变抗体的特定分类。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以关于抗体、蛋白质或具有第二化学物质的肽的相互作用被用来意指所述相互作用依赖于所述化学物质上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合至特定的蛋白质结构,而不是广泛地结合至蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含有标记的“A”和抗体的反应中,含有表位A(或游离的未标记A)的分子的存在将降低结合至所述抗体的标记的A的量。

[0212] 如本文所用,两个实体之间的短语“不结合”、“非结合”或“无结合”或类似短语是指1)缺乏可检测的结合,或2)结合低于对应于适当测定(例如,体外结合测定,诸如生物层干涉法)中的无结合的设定阈值。举例来说,在一些实施方案中,在体外生物层干涉法测定中,当测试制品以20nM的浓度存在时,180秒后对加载有0.8nm靶标的生物传感器的小于0.1nm的最大缔合结合反应被归类为“非结合”。

[0213] 术语“治疗有效量”、“有效量”或“足量”意指当向受试者(包括哺乳动物,例如人类)施用时足以达成所需结果的量,例如,有效引起保护性免疫反应的量。本文所描述的化合物的有效量可能根据诸如分子、受试者的年龄、性别、物种和体重等因素而变化。如技术人员应理解,可以调整给药或治疗方案以提供最佳治疗反应。举例来说,在各方面,施用治疗有效量的本文所描述的融合蛋白足以治疗和/或预防COVID-19。

[0214] 此外,使用治疗有效量对受试者的治疗方案可以由单次施用组成,或者包括一系列应用。治疗周期的频率和时长取决于多种因素,诸如分子、个体的年龄、剂的浓度、患者对剂的响应性或它们的组合。还将了解,在特定治疗方案的过程中用于治疗的活性剂的有效剂量可以增加或减少。剂量的变化可能会发生,并且通过本领域中已知的标准诊断测定变得显而易见。在各方面,本文所描述的融合蛋白可以在针对所讨论的疾病或病症的常规疗法治疗之前、期间或之后施用。举例来说,本文所描述的融合蛋白可以与针对病毒感染的常规治疗相结合具有特定用途。

[0215] 如本文所用,术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源核酸转移至或引入宿主细胞中的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是已用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代受试者细胞及其子代。

[0216] 如本文所用,短语“在转录控制下”或“操作性地连接”意指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0217] “载体”是包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域中已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。所述术语还应解释为包括有利于核酸转移至细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0218] 与一种或多种其它治疗剂“组合”施用包括以任何顺序同时(并行)和连续施用。

[0219] 术语“药学上可接受的”意指化合物或化合物组合与药用制剂的其余成分相容,并且根据既定的政府标准(包括美国食品和药物管理局(United States Food and Drug Administration)颁布的标准)一般安全地施用于人类。

[0220] 术语“药学上可接受的载体”包括但不限于溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂、抗真

菌剂、等渗剂和/或吸收延迟剂等。药学上可接受的载体的用途是众所周知的。

[0221] “变体”是由于在比较序列内插入、缺失、修饰和/或取代一个或多个氨基酸残基而具有与比较序列不同的氨基酸序列的生物活性融合蛋白、抗体或其片段。变体一般与比较序列具有小于100％的序列同一性。然而,生物活性变体通常将具有与比较序列具有至少约70％氨基酸序列同一性,诸如至少约71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的氨基酸序列。变体包括至少10个氨基酸的肽片段,所述肽片段保留了比较序列的一定程度的生物活性。变体还包括在比较序列的N端或C端或内部添加一个或多个氨基酸残基的多肽。变体还包括其中许多氨基酸残基缺失和/或任选地被一个或多个氨基酸残基取代的多肽。还可以对变体进行共价修饰,例如,通过用除天然存在的氨基酸以外的部分取代或者通过修饰氨基酸残基以产生非天然存在的氨基酸。

[0222] “氨基酸序列同一性百分比”定义为在比对序列并引入空位(如有必要)以达成最大序列同一性百分比之后,并且在不将任何保守取代视为序列同一性的一部分的情况下,候选序列中与所关注序列(诸如本发明多肽)中的残基相同的氨基酸残基的百分比。候选序列的N端、C端或内部的延伸、缺失或插入中无一者应解释为影响序列同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序是本领域中众所周知的,诸如“BLAST”。

[0223] 出于本文的目的,“活性的”或“活性”是指本文所描述的融合蛋白的生物和/或免疫活性,其中“生物”活性是指融合蛋白引起的生物功能(抑制或刺激)。

[0224] 本文所描述的融合蛋白可以包括修饰。此类修饰包括但不限于与效应分子缀合。修饰还包括但不限于与可检测的报告部分缀合。还包括延长半衰期的修饰(例如,聚乙二醇化)。还包括针对脱免疫的修饰。蛋白质和非蛋白剂可以通过本领域中已知的方法与融合蛋白缀合。缀合方法包括直接连接、经由共价连接的接头连接和特异性结合对成员(例如,亲和素-生物素)。此类方法包括例如Greenfield等人,Cancer Research 50,6600-6607(1990)(其通过引用并入本文)中描述的方法以及Amon等人,Adv.Exp.Med.Biol.303,79-90(1991)和Kiseleva等人,MoI.Biol.(USSR)25,508-514(1991)(这两篇文献均通过引用并入本文)描述的那些方法。

[0225] 融合蛋白

[0226] 本文描述了融合蛋白。融合蛋白包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基。多个融合蛋白自组装形成纳米笼。以这种方式,Fc多肽可以装饰组装的纳米笼的内表面、组装的纳米笼的外表面或两者。Fc多肽通常包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处具有突变的IgG4 Fc链。

[0227] 在某些方面,本文所描述的纳米笼单体可以分裂成亚基,从而允许更多的Fc多肽或其它部分以各种比率与其连接。举例来说,在各方面,纳米笼单体包含连接至Fc多肽的第一纳米笼单体亚基。在使用时,第一个纳米笼单体亚基与第二个纳米笼单体亚基自组装形成纳米笼单体。如上文所描述,多个纳米笼单体自组装形成纳米笼。纳米笼单体亚基可以单独或组合提供,并且可以具有相同或不同的与其融合的Fc多肽。

[0228] 由本文所描述的纳米笼单体和/或纳米笼单体亚基制成的纳米笼可以具有生物活性部分,诸如结合部分,诸如除一个或多个Fc多肽以外还包括的抗原结合部分。生物活性部分可以是任何部分。通常,它们是抗原结合部分,并且从而靶向特定疾病或疾患,诸如癌症、

自身免疫性病症、传染病或代谢紊乱。受试者可能患有所讨论的疾病或疾患,或者可能处于发展成疾病或疾患的风险中。

[0229] 举例来说,Fc多肽可以包含例如Fc片段的一条或两条链。如将理解,Fc片段可以来源于任何类型的抗体,但通常是IgG4 Fc片段。Fc片段还可以包含一个或多个突变,诸如根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处的突变,所述突变调节融合蛋白和/或所得到的包含融合蛋白的组装纳米笼的半衰期和/或效应功能。举例来说,半衰期可能是数分钟、数天、数周或甚至数月的量级。

[0230] 此外,考虑了本文所描述的融合蛋白和纳米笼中的其它取代,包括Fc序列修饰和添加其它剂(例如,人血清白蛋白肽序列),这允许改变生物利用度并且将为技术人员所理解。此外,本文所描述的融合蛋白和纳米笼可以在序列中或通过添加减弱免疫原性和抗药反应的其它剂来调节(例如将序列与宿主匹配的治疗剂,或添加免疫抑制疗法[例如,当施用英夫利昔单抗(infliximab)治疗类风湿性关节炎或诱导新生儿耐受时使用甲氨蝶呤(methotrexate),这是降低FVIII抑制剂的发病率的主要策略(综述于:DiMichele DM,Hoots WK,Pipe SW,Rivard GE,Santagostino E.International workshop on immune tolerance induction:consensus recommendations.Haemophilia.2007;13:1-22,通过引用整体并入本文])。

[0231] 举例来说,本文公开了包含连接至Fc多肽的纳米笼单体或其亚基的融合蛋白。在一些实施方案中,Fc多肽包含一条或多条人类IgG4Fc链,即,除了本文指出的突变之外,Fc多肽包含与野生型人类IgG4内的Fc链基本上类似的Fc链。

[0232] 在一些实施方案中,野生型IgG4 Fc是人类IgG4 Fc,其中每条Fc链具有SEQ ID NO:66的氨基酸序列。

[0233] 举例来说,Fc多肽可以包含Fc链,所述Fc链具有与野生型IgG4Fc内的Fc链的氨基酸序列具有至少85%、至少87.5%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链包含针对所述Fc链具体描述的某个或某些位置处的一个或多个特定残基,但具有除此以外与野生型Fc链(例如,野生型IgG4 Fc链)内的对应Fc链具有100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链具有与SEQ ID NO:66的序列有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个氨基酸残基不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链具有与SEQ ID NO:66的序列有不多于十个、不多于九个、不多于八个、不多于七个、不多于六个、不多于五个或不多于四个氨基酸残基不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,Fc多肽包含Fc链,所述Fc链与SEQ ID NO:66的序列有三个、四个或五个氨基酸残基不同。

[0234] 在一些实施方案中,Fc多肽是单链Fc(scFc),所述单链Fc包含通过共价接头(例如,经由氨基酸接头)连接在一起的两条Fc链。

[0235] 在某些实施方案中,片段可结晶(Fc)区,诸如IgG4 Fc链,包含根据EU编号在位置228、234、235、237和238中的一处或多处的突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含位置234和235处的突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含F234A突变和L235A突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含位置228处的突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含S228P突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含位置237和238处的突变。在一些实施方案中,IgG4

Fc链包含G237A突变和P238S突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链不包含G237或P238处的突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变和L235A突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含S228P突变、F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链包含F234A突变、L235A突变、G237A突变和P238S突变。在一些实施方案中,IgG4 Fc链不包含S228处的突变。除非另外指出,否则本公开通篇的突变编号是根据EU索引。

[0236] 在一些实施方案中,Fc区是IgG4 Fc区(例如,人类IgG4 Fc区),即,除了本文指出的突变之外,Fc区还包含各自具有与野生型IgG4Fc内的链基本上类似的氨基酸序列的Fc链。在一些实施方案中,野生型参考IgG4 Fc是人类IgG4 Fc,其中每条Fc链具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0237] 举例来说,IgG4 Fc区可以包含Fc链,所述Fc链具有与野生型IgG4 Fc内的Fc链的氨基酸序列具有至少85%、至少87.5%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,IgG4 Fc区包含Fc链,所述Fc链包含针对所述IgG4 Fc区具体描述的Fc突变,但具有除此以外与野生型IgG4 Fc内的Fc链具有100%同一性的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,Fc区是单链Fc(scFc),所述单链Fc包含通过共价接头(例如,经由氨基酸接头)连接在一起的两条Fc链。在一些实施方案中,Fc区是Fc单体,所述Fc单体包含单个Fc链。

[0239] 如果抗体或其片段包含两条链,诸如在Fc片段的情况下的第一条链和第二条链,或者重链和轻链,则这两条链任选地由接头分隔。接头可以是柔性的或刚性的,但它通常是柔性的,以允许链适当地折叠。接头一般足够长以赋予融合蛋白一定的柔性,但将理解,接头长度将取决于纳米笼单体和生物活性部分序列以及融合蛋白的三维构象而变化。因此,接头通常为约1个至约130个氨基酸残基,诸如约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120或125个至约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125或130个氨基酸残基,诸如约50个至约90个氨基酸残基,诸如70个氨基酸残基。

[0240] 接头可以具有任何氨基酸序列,并且在一个典型实例中,接头包含GGS重复,并且接头更通常包含约2、3、4、5或6个GGS重复,诸如约4个GGS重复。在特定方面,接头包含与以下序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0241] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS。

[0242] 在某些实施方案中,接头用于融合多肽内和/或单链分子(诸如scFc)内。在一些实施方案中,接头是氨基酸接头。举例来说,如本文所采用的接头可以包含约1个至约100个氨基酸残基,例如,约1个至约70个、约2个至约70个、约1个至约30个或约2个至约30个氨基酸残基。在一些实施方案中,接头包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个氨基酸残基。

[0243] 在某些实施方案中,接头包含甘氨酸-丝氨酸序列,例如,$(G_nS)_m$序列(例如,GGS、

GGGS或GGGGS序列),其存在于接头内的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个或至少14个拷贝中。

[0244] 在典型的方面,抗体或其片段特异性地结合至与SARS-CoV-2相关的抗原。通常,抗原与SARS-CoV-2相关,并且抗体或其片段包含例如来自表4的结合结构域,诸如结合结构域298、52、46、80、82、236、324或它们的组合。

[0245] 在一些实施方案中,结合部分是包含重链可变区(例如,V_H或V_HH)的抗原结合抗体片段。在某些实施方案中,抗原结合抗体片段包含重链可变结构域(例如,V_H)和轻链可变结构域(例如,V_L或V_K)。在某些实施方案中,抗原结合抗体片段包含Fab,所述Fab包含重链可变结构域(例如,V_H)和轻链可变结构域(例如,V_L或V_K)。

[0246] 在一些实施方案中,抗原结合抗体片段包含V_H重链可变结构域和V_K轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗原结合抗体片段包含Fab,所述Fab包含V_H重链可变结构域和V_K轻链可变结构域。

[0247] 在具体实例中,抗体或其片段包含与以下一个或多个序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0248] Fc链1:

[0249] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQK SLSLSPGK;

[0250] Fc链2:

[0251] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP

[0252] PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQK SLSLSPGK;

[0253] Fc链3-T10.G

[0254] PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0255] Fc链4-T10.A

[0256] PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0257] Fc链5-T10.B

[0258] PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0259] 298轻链

[0260] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0261] 298 Fab重链

[0262] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASDPRDDIAGGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0263] 52轻链

[0264] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0265] 52轻链N92T变体

[0266] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGTGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0267] 52 Fab重链

[0268] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRGDTIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0269] 46轻链

[0270] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0271] 46 Fab重链

EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR

[0272] AEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0273] 80轻链

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY
QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED

[0274] VAVYYCQQYYSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0275] 80 Fab重链

[0276] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAP
GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARSTRELPEVVDWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGP

[0277] SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

[0278] 82轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVISNYLAWYQQKPGK
APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0279] QSFSPPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0280] 82 Fab重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGSFSTSAFYWVRQAP
GQGLEWMGWINPYTGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS
SLRSEDTAVYYCARSRALYGSGSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGP

[0281] SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

[0282] 236轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

[0283] VYYCMQALQTPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0284] 236 Fab重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFTSYGINWVRQAP GQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL

[0285] SSLRSEDTAVYYCASRGIQLLPRGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC

[0286] 324轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0287] QSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0288] 324 Fab重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAP GQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL

[0289] SSLRSEDTAVYYCARVGDYGDYIVSPFDLWGRGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC

[0290] 或它们的组合。

[0291] 在进一步的方面,抗体或其片段与另一部分(诸如可检测部分(例如,小分子、荧光分子、放射性同位素或磁性粒子)、药剂、诊断剂或它们的组合)缀合或缔合,并且可以包括例如抗体-药物缀合物。

[0292] 在生物活性部分是可检测部分的方面,可检测部分可以包括荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄碱(Ametrine),和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV蛋白,诸如iLOV。

[0293] 在生物活性部分是药剂的方面,所述药剂可以包括例如小分子、肽、脂质、碳水化

合物或毒素。

[0294] 在典型的方面,由本文所描述的融合蛋白组装的纳米笼包含约3个至约100个纳米笼单体,诸如约3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96或98个至约4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98或100个纳米笼单体,诸如24、32或60个单体。纳米笼单体可以是任何已知的纳米笼单体、天然的、合成的或部分合成的,并且在各方面选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、包封蛋白、SOR、二氧四氢喋啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧酶体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。通常,纳米笼单体是铁蛋白或脱铁铁蛋白。

[0295] 当选择脱铁铁蛋白作为纳米笼单体时,通常第一和第二纳米笼单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区域。将理解,其它纳米笼单体可以分成二部分亚基,就如本文所描述的脱铁铁蛋白一样,使得亚基自组装并且各自适合与生物活性部分融合。

[0296] 在一些实施方案中,纳米笼单体是铁蛋白单体。术语“铁蛋白单体”在本文中用于指铁蛋白的单链,所述单链在其它铁蛋白链的存在下能够自组装成包含多条铁蛋白链的多肽复合物。在一些实施方案中,铁蛋白链自组装成包含24条或更多条铁蛋白链的多肽复合物。在一些实施方案中,铁蛋白单体是铁蛋白轻链。在一些实施方案中,铁蛋白单体不包括铁蛋白重链或能够与铁结合的其它铁蛋白组分。

[0297] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物内的每个融合多肽包含铁蛋白轻链或铁蛋白轻链的亚基。在这些实施方案中,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链或铁蛋白重链的亚基。

[0298] 在一些实施方案中,铁蛋白单体是人铁蛋白链,例如,人铁蛋白轻链,例如,具有SEQ ID NO:1的至少残基2-175的序列的人铁蛋白轻链。在一些实施方案中,铁蛋白单体是小鼠铁蛋白链。

[0299] 铁蛋白单体的“亚基”是指铁蛋白单体的一部分,其能够自发地与铁蛋白单体的另一个不同的亚基缔合,使得所述亚基一起形成铁蛋白单体,所述铁蛋白单体进而能够与其它铁蛋白单体自组装以形成多肽复合物。

[0300] 在一些实施方案中,铁蛋白单体亚基包含铁蛋白单体的大约一半。如本文所用,术语“N-半铁蛋白”是指铁蛋白链的大约一半,所述一半包含铁蛋白链的N端。如本文所用,术语“C-半铁蛋白”是指铁蛋白链的大约一半,所述一半包含铁蛋白链的C端。铁蛋白链可以分开以形成N-半铁蛋白和C-半铁蛋白的确切点可能取决于实施方案而变化。在基于人铁蛋白轻链的铁蛋白单体亚基的情形中,例如,这两半可以在对应于SEQ ID NO:1的约位置75至约位置100之间的位置的点处分开。举例来说,在一些实施方案中,基于人铁蛋白轻链的N-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基1-95(或其大部分)的氨基酸序列,并且基于人铁蛋白轻链的C-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基96-175(或其大部分)的氨基酸序列。

[0301] 在一些实施方案中,这两半在对应于SEQ ID NO:1的约位置85至约位置92之间的位置的点处分开。举例来说,在一些实施方案中,基于人铁蛋白轻链的N-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基1-90(或其大部分)的氨基酸序列,并且基于人铁蛋白轻链的C-半铁蛋白具有对应于SEQ ID NO:1的残基91-175(或其大部分)的氨基酸序列。

[0302] 通常,脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0303] MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRD DVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKP AEDEW。

[0304] 通常,脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0305] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFL ETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

[0306] 或

[0307] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFL ETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD。

[0308] 在各方面,本文所描述的融合蛋白还包含纳米笼单体亚基与生物活性部分之间的接头,就如上文所描述的接头一样。同样,接头可以是柔性的或刚性的,但它通常是柔性的,以允许生物活性部分保留活性,并且允许纳米笼单体亚基对保留自组装特性。接头一般足够长以赋予融合蛋白一定的柔性,但将理解,接头长度将取决于纳米笼单体和生物活性部分序列以及融合蛋白的三维构象而变化。因此,接头通常为约1个至约30个氨基酸残基,诸如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个至约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基,诸如约8个至约16个氨基酸残基,诸如8、10或12个氨基酸残基。

[0309] 接头可以具有任何氨基酸序列,并且在一个典型实例中,接头包含GGS重复,并且接头更通常包含约2、3、4、5或6个GGS重复,诸如约4个GGS重复。在特定方面,接头包含与以下序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0310] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

[0311] 类似地,融合蛋白还可以包含C端接头,用于改善融合蛋白的一种或多种属性。在各方面,包含GGS重复,并且接头更通常包含约2、3、4、5或6个GGS重复,诸如约4个GGS重复。在特定方面,C端接头包含与以下序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成:

[0312] GGSGGSGGSGGSGGGSGGSGGSGGSG

[0313] 本文还描述了一对上文所描述的融合蛋白,其中所述对自组装形成纳米笼单体,其中第一和第二纳米笼单体亚基融合至相同或不同的部分,诸如不同的抗原结合部分或不同的Fc多肽,或它们的不同组合。这为由一对亚基组装而成的单个纳米笼单体提供多价性和/或多特异性。

[0314] 基本上相同的序列可以包含一个或多个保守氨基酸突变。本领域中已知,对参考序列进行一个或多个保守氨基酸突变可以产生与参考序列相比在生理、化学或功能特性方

面没有实质性变化的突变肽;在这种情况下,参考序列和突变序列将被视为“基本上相同的”多肽。保守氨基酸突变可以包括氨基酸的添加、缺失或取代;保守氨基酸取代在本文中定义为用一个氨基酸残基取代具有类似化学特性(例如,大小、电荷或极性)的另一个氨基酸残基。

[0315] 在非限制性实例中,保守突变可以是氨基酸取代。此种保守氨基酸取代可以用碱性、中性、疏水性或酸性氨基酸取代同一组中的另一个氨基酸。术语“碱性氨基酸”意指侧链pK值大于7的亲水性氨基酸,所述氨基酸在生理pH下通常带正电荷。碱性氨基酸包括组氨酸(His或H)、精氨酸(Arg或R)和赖氨酸(Lys或K)。术语“中性氨基酸”(也是“极性氨基酸”)意指具有侧链的亲水性氨基酸,所述侧链在生理pH下不带电荷,但具有至少一个键,其中两个原子共用的电子对被其中一个原子更紧密地保持在一起。极性氨基酸包括丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、半胱氨酸(Cys或C)、酪氨酸(Tyr或Y)、天冬酰胺(Asn或N)和谷氨酰胺(Gln或Q)。术语“疏水性氨基酸”(也是“非极性氨基酸”)旨在包括根据Eisenberg(1984)的归一化共有疏水性量表(normalized consensus hydrophobicity scale)展现疏水性大于零的氨基酸。疏水性氨基酸包括脯氨酸(Pro或P)、异亮氨酸(Ile或I)、苯丙氨酸(Phe或F)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、色氨酸(Trp或W)、蛋氨酸(Met或M)、丙氨酸(Ala或A)和甘氨酸(Gly或G)。

[0316] “酸性氨基酸”是指侧链pK值小于7的亲水性氨基酸,所述氨基酸在生理pH下通常带负电荷。酸性氨基酸包括谷氨酸(Glu或E)和天冬氨酸(Asp或D)。

[0317] 序列同一性用于评价两个序列的相似性;它是通过计算当比对两个序列以达成残基位置之间的最大对应性时相同残基的百分比来确定。可以使用任何已知的方法来计算序列同一性;例如,可使用计算机软件来计算序列同一性。不希望受限制,序列同一性可以通过软件来计算,诸如由瑞士生物信息学研究所(Swiss Institute of Bioinform atics)维护的NCBI BLAST2服务(并且在ca.expasy.org/tools/blast/上找到)、BLAST-P、Blast-N或FASTA-N,或本领域中已知的任何其它适当软件。

[0318] 本发明的基本上相同的序列可以具有至少85%同一性;在另一个实例中,基本上相同的序列在氨基酸水平上可以与本文所描述的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或其间的任何百分比)同一性。在特定方面,基本上相同的序列保留参考序列的活性和特异性。在非限制性实施方案中,序列同一性的差异可能归因于一个或多个保守氨基酸突变。

[0319] 本发明的多肽或融合蛋白还可以包含额外的序列以辅助其表达、检测或纯化。可以使用本领域技术人员已知的任何此类序列或标签。举例来说并且不希望受限制,融合蛋白可以包含靶向或信号序列(例如但不限于ompA)、检测标签、示例性标签盒(包括Strep标签或其任何变体;参见例如美国专利号7,981,632)、His标签、具有序列基序DYKDDDDK的Flag标签、Xpress标签、Avi标签、钙调蛋白标签、聚谷氨酸标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、CREB结合蛋白(CBP)、谷胱甘肽S转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、绿色荧光蛋白(GFP)、硫氧还蛋白标签或它们的任何组合;纯化标签(例如但不限于His_5或His_6),或它们的组合。

[0320] 在另一个实例中,额外的序列可以是生物素识别位点,诸如Cronan等人在WO 95/04069中或Voges等人在WO/2004/076670中描述的生物素识别位点。如本领域技术人员也已

知,接头序列可以与额外序列或标签相结合使用。

[0321] 更具体来说,标签盒可以包含能够以高亲和力或亲合力特异性地结合至抗体的细胞外组分。在单链融合蛋白结构内,标签盒可以位于(a)连接区的氨基端紧邻处,(b)间插于接头模块之间并将其连接,(c)结合结构域的羧基端紧邻处,(d)间插于结合结构域(例如,scFv或scFab)与效应结构域之间并将其连接,(e)间插于结合结构域的亚基之间并将其连接,或(f)单链融合蛋白的氨基端。在某些实施方案中,一个或多个连接氨基酸可以安置于标签盒与疏水部分之间并将其连接,或安置于标签盒与连接区之间并将其连接,或安置于标签盒与接头模块之间并将其连接,或安置于标签盒与结合结构域之间并将其连接。

[0322] 本文还涵盖了使用各种方法固定至表面上的分离或纯化的融合蛋白、多肽或其片段;举例来说并且不希望受限制,多肽可以经由His标签偶联、生物素结合、共价结合、吸附等连接或偶联至表面。固体表面可以是任何适合的表面,例如但不限于微量滴定板的孔表面、表面等离子体共振(SPR)传感器芯片的通道、膜、珠粒(例如,基于磁性或基于琼脂糖的珠粒或其它色谱树脂)、玻璃、薄膜或任何其它有用的表面。

[0323] 在其它方面,融合蛋白可以连接至货物分子;融合蛋白可以将货物分子递送至所需位点并且可以使用本领域中已知的任何方法(重组技术、化学缀合、螯合等)连接至货物分子。货物分子可以是任何类型的分子,诸如治疗剂或诊断剂。

[0324] 在一些方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子包含于纳米笼内部。在其它方面,货物分子不融合至融合蛋白并且包含于纳米笼内部。货物分子通常是蛋白质、小分子、放射性同位素或磁性粒子。

[0325] 本文所描述的融合蛋白特异性地结合至它们的靶标。本文所描述的抗体或片段的抗体特异性是指抗体对抗原的特定表位的选择性识别,所述抗体特异性可以基于亲和力和/或亲合力来确定。以抗原与抗体解离的平衡常数(K_D)表示的亲和力测量了抗原决定簇(表位)与抗体结合位点之间的结合强度。亲合力是抗体与其抗原之间的结合强度的量度。抗体通常以10^{-5}至10^{-11}M的K_D进行结合。任何大于10^{-4}M的K_D一般被认为指示非特异性结合。K_D值越小,抗原决定簇与抗体结合位点之间的结合强度越强。在各方面,本文所描述的抗体具有小于10^{-4}M、10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M、10^{-13}M、10^{-14}M或10^{-15}M的K_D。

[0326] 本文还描述了包含至少一种本文所描述的融合蛋白和至少一种第二纳米笼单体亚基的纳米笼,所述第二纳米笼单体亚基与融合蛋白自组装形成纳米笼单体。此外,本文描述了融合蛋白对,其中所述对自组装形成纳米笼单体,并且其中第一和第二纳米笼单体亚基融合至不同的生物活性部分。

[0327] 将理解,纳米笼可以由多个相同的融合蛋白、多个不同的融合蛋白(并且因此是多价的和/或多特异性的)、融合蛋白和野生型蛋白的组合以及它们的任何组合自组装而成。举例来说,纳米笼可以在内部和/或外部用至少一种本文所描述的融合蛋白与至少一种结合部分组合进行装饰。在典型的方面,约20%至约80%的纳米笼单体包含本文所描述的融合蛋白。鉴于本文所描述的模块化解决方案,纳米笼理论上可以包含多达纳米笼中的单体两倍的生物活性部分,这是因为每个纳米笼单体可以分成两个亚基,每个亚基可以独立地结合至不同的生物活性部分。将理解,可以利用这种模块化来达成任何所需的生物活性部分的比率,如本文在具体实例中所描述的四种不同生物活性部分的比率为4:2:1:1。举例来

说,本文所描述的纳米笼可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分。通过这种方式,纳米笼可以是多价的和/或多特异性的,并且可以相对容易地控制其程度。

[0328] 在各方面,本文所描述的纳米笼还可以包含至少一个完整的纳米笼单体,所述纳米笼单体任选地融合至生物活性部分,所述生物活性部分可以与本文所描述的连接至纳米笼单体亚基的生物活性部分相同或不同。

[0329] 在典型的方面,本文所描述的纳米笼包含融合至亚基或单体的第一、第二和第三融合蛋白,并且任选地包含至少一个完整的纳米笼单体,所述纳米笼单体任选地融合至生物活性部分,其中第一、第二和第三融合蛋白的生物活性部分和完整的纳米笼单体的生物活性部分全部彼此不同。

[0330] 更通常地,第一、第二和第三融合蛋白各自包含融合至N-半铁蛋白或C-半铁蛋白的抗体或其Fc片段,其中第一、第二和第三融合蛋白中的至少一者融合至N-半铁蛋白,并且第一、第二和第三融合蛋白中的至少一者融合至C-半铁蛋白。举例来说,第一融合蛋白的抗体或其片段通常是Fc片段;第二和第三融合蛋白通常各自包含对不同抗原具有特异性的抗体或其片段,并且完整的纳米笼单体融合至对另一种不同抗原具有特异性的生物活性部分。

[0331] 在各方面,第二融合蛋白的抗体或其片段是46或52;并且第三融合蛋白的抗体或其片段是324或80。在典型的方面,本文所描述的纳米笼包含以下四个融合蛋白,任选地以4:2:1:1的比率:

[0332] a.融合至全长铁蛋白的298(任选sc298);

[0333] b.融合至N-铁蛋白或C-铁蛋白的Fc(任选scFc);

[0334] c.融合至N-铁蛋白或C-铁蛋白的46或52(任选sc46或sc52);以及

[0335] d.融合至N-铁蛋白或C-铁蛋白的324或80(任选sc324或sc80)。

[0336] 在各方面,本文所描述的纳米笼包含与以下一个或多个序列具有至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的序列或由其组成,其中铁蛋白亚基以粗体表示,接头加下划线,轻链以斜体表示,并且重链以小写字母表示:

[0337] a.298-hFerr:

[0338] **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY**
QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED
VAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**SQVQLVQSGAEVKKPGASVK**

VSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQK
FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASDPRDDIAGG
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGGGSGGG

[0339] GSGGGGSGG**MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSL**
GFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGG
RALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGP
EAGLGEYLFERLTLRHD

[0340] 或

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY
QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED
VAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQK

[0341] FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASDPRDDIAGG
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLG**
FYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGR
ALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPE
AGLGEYLFERLTLRHD

[0342] b.Fc-N-ferr(PAAAS突变)(包含于T10.A内)

PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPSCPAPEAAG

[0343] ASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR
GGRALFQDIKKPAEDEW

[0344] 或

[0345] Fc-N-ferr(AAAS突变)(包含于T10.G内)

PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

[0346] DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPSCPAPEAAG
ASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

[0347] NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR
GGRALFQDIKKPAEDEW

[0348] 或

[0349] Fc-N-ferr(PAA突变)(包含于T10.B内)

[0350] PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR
GGRALFQDIKKPAEDEW

[0351] 或

[0352] Fc-C-ferr(PAAAS突变)(包含于T10.A内)

[0353] PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
[0354] VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0355] 或

[0356] Fc-C-ferr(AAAS突变)(包含于T10.G内)

PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
[0357] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
[0358] LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0359] 或

[0360] Fc-C-ferr(PAA突变)(包含于T10.B内)

PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG

[0361] GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0362] c1.52-C-hFerr

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGK
APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QGNGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL

[0363] LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS
GYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVTI
TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRGDTIDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

[0364] GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG**G**
KTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLET
HFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRH
D

[0365] c2.46-C-hFerr

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK
APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSYSTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASG

[0366] FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG**G**
KTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLET
HFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRH
D

[0367] d1.324-C-hFerr

[0368] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGK

APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
GGTFNNYGISWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGR
[0369] VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGDYGDYIVSPFDL
WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGG**GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTD**
PHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEY
LFERLTLRHD

[0370] d2.80-C-hFerr

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY
QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED
VAVYYCQQYYSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSV
[0371] KVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRELPEVV
DWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGG**GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHAL**
GSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPE
[0372] **AGLGEYLFERLTLRHD**

[0373] 在一个方面,提供了包含多个如本文所公开的融合多肽的自组装多肽复合物。在

许多实施方案中,自组装多肽复合物包含(1)多个第一融合多肽,每个第一融合多肽包含连接至如本文所公开的纳米笼单体(例如铁蛋白单体,例如人铁蛋白单体)或其亚基的Fc区;以及(2)多个第二融合多肽,每个第二融合多肽包含抗原结合抗体片段(例如,能够结合至蛋白质的抗体的Fab片段),所述抗原结合抗体片段连接至纳米笼单体(例如铁蛋白单体,例如人铁蛋白单体)或其亚基。在一些实施方案中,自组装多肽复合物还包含多个第三融合多肽,每个第三融合多肽不同于第二融合多肽并且各自包含(1)纳米笼单体(例如铁蛋白单体,例如人铁蛋白单体),所述纳米笼单体连接至(2)抗原结合抗体片段(例如,能够结合至蛋白质的抗体的Fab片段)。

[0374] 在一些实施方案中,融合多肽之一(例如,第一融合多肽或第二融合多肽)包含N-半纳米笼单体(例如,N-半铁蛋白)(但不是全长纳米笼(例如,铁蛋白)单体),并且其它融合多肽之一包含C-半纳米笼单体(例如,C-半铁蛋白)(但不是全长纳米笼(例如,铁蛋白)单体)。在许多这些实施方案中,自组装多肽复合物内包含N-半纳米笼单体(例如,N-半铁蛋白)的融合多肽与包含C-半纳米笼单体(例如,C-半铁蛋白)的融合多肽的比率约为1:1。

[0375] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含24个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含多于24个融合多肽,例如,至少26个、至少28个、至少30个、至少32个融合多肽、至少34个融合多肽、至少36个融合多肽、至少38个融合多肽、至少40个融合多肽、至少42个融合多肽、至少44个融合多肽、至少46个融合多肽或至少48个融合多肽。在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含32个融合多肽。

[0376] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个第一融合多肽。

[0377] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个第二融合多肽。

[0378] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物还包含至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个第三融合多肽。

[0379] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物包含比率约为1:1、1:2、1:3或1:4的第一融合多肽与所有其它融合多肽。

[0380] 在一些实施方案中,自组装多肽复合物内的每个融合多肽包含铁蛋白轻链或铁蛋白轻链的亚基。在这些实施方案中,自组装多肽复合物不包含任何铁蛋白重链、铁蛋白重链的亚基或能够与铁结合的其它铁蛋白组分。

[0381] 本文还描述了包含纳米笼的组合物,诸如治疗性或预防性组合物。还描述了用于治疗和/或预防COVID-19的相关方法和用途,其中所述方法或用途包括向有需要的受试者施用本文所描述的纳米笼或组合物。

[0382] 本文还描述了编码本文所描述的融合蛋白和多肽的核酸分子,以及包含所述核酸分子的载体和包含所述载体的宿主细胞。

[0383] 编码本文所描述的融合蛋白的多核苷酸包括核酸序列与本发明多核苷酸的核酸序列基本上相同的多核苷酸。“基本上相同的”核酸序列在本文中定义为当两个序列最佳比对(具有适当的核苷酸插入或缺失)并进行比较以确定两个序列之间的核苷酸的精确匹配时,与另一个核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、

至少92％、至少93％、至少94％、至少95％同一性的序列。

[0384] 编码抗体片段的多核苷酸的适合来源包括表达全长抗体的任何细胞,诸如杂交瘤和脾细胞。片段本身可以用作抗体等效物,或者可以重组为等效物,如上文所描述。本章节中描述的DNA缺失和重组可以通过已知方法进行,诸如上文题为“抗体的功能等效物”章节中列出的已发表专利申请中所描述的方法和/或其它标准重组DNA技术,诸如下文所描述的技术。如本领域中已知,DNA的另一种来源是从噬菌体展示文库产生的单链抗体。

[0385] 另外,提供了表达载体,所述表达载体含有先前所描述的可操作地连接至表达序列、启动子和增强子序列的多核苷酸序列。已开发了多种用于在原核系统(诸如细菌)和真核系统(包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养系统)中有效合成抗体多肽的表达载体。本发明的载体可以包含染色体、非染色体和合成DNA序列的区段。

[0386] 可以使用任何适合的表达载体。举例来说,原核克隆载体包括来自大肠杆菌的质粒,诸如colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM和RP4。原核载体还包括噬菌体DNA的衍生物,诸如M13和其它丝状单链DNA噬菌体。在酵母中有用的载体的实例是2μ质粒。适用于在哺乳动物细胞中表达的载体包括众所周知的SV-40衍生物、腺病毒、逆转录病毒源性DNA序列和来源于功能性哺乳动物载体(诸如上文所描述的载体)和功能性质粒与噬菌体DNA的组合的穿梭载体。

[0387] 额外的真核表达载体是本领域中已知的(例如,P J.Southern和P.Berg,J.Mol.Appl.Genet,1:327-341(1982);Subramani等人,Mol.Cell.Biol,1:854-864(1981);Kaufinann和Sharp,"Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene",J.Mol.Biol,159:601-621(1982);Kaufhiann和Sharp,Mol.Cell.Biol,159:601-664(1982);Scahill等人,"Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells",Proc.Nat'l Acad.Sci USA,80:4654-4659(1983);Urlaub和Chasin,Proc.Nat'lAcad.Sci USA,77:4216-4220,(1980),所有这些文献都通过引用并入本文)。

[0388] 表达载体通常含有至少一个操作性地连接至待表达的DNA序列或片段的表达控制序列。将控制序列插入载体中以控制和调控克隆的DNA序列的表达。有用的表达控制序列的实例是lac系统、trp系统、tac系统、trc系统、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、酵母的糖酵解启动子(例如,3-磷酸甘油酸激酶的启动子)、酵母酸性磷酸酶的启动子(例如,Pho5)、酵母α交配因子的启动子,和来源于多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒和猿猴病毒的启动子(例如,早期和晚期启动子或SV40),以及已知控制原核或真核细胞及其病毒的基因表达的其它序列,或它们的组合。

[0389] 本文还描述了含有先前所描述的表达载体的重组宿主细胞。本文所描述的融合蛋白可以在杂交瘤以外的细胞系中表达。包含编码根据本发明的多肽的序列的核酸可以用于转化适合的哺乳动物宿主细胞。

[0390] 特别优选的细胞系是基于高水平表达、所关注蛋白质的组成性表达和宿主蛋白质的最小污染来选择。可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域中众所周知的,并且包括许多永生化细胞系,诸如但不限于HEK 293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞和许多其它细胞系。适合的额外真核细胞包括酵母和其它真菌。有用的原核宿主包括

例如大肠杆菌,诸如大肠杆菌SG-936、大肠杆菌HB101、大肠杆菌W3110、大肠杆菌X1776、大肠杆菌X2282、大肠杆菌DHI和大肠杆菌MRC1;假单胞菌;芽孢杆菌,诸如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis);和链霉菌。

[0391] 这些本发明重组宿主细胞可以用于通过在允许多肽表达的条件下培养细胞并且从宿主细胞或宿主细胞周围的培养基中纯化多肽来产生融合蛋白。可以通过在所关注的抗体编码基因的5'端插入信号或分泌前导肽编码序列(参见Shokri等人,(2003)Appl MicrobiolBiotechnol.60(6):654-664;Nielsen等人,Prot.Eng.,10:1-6(1997);von Heinje等人,Nucl.Acids Res.,14:4683-4690(1986),所有这些文献都通过引用并入本文)来促进表达的多肽在重组宿主细胞中分泌的靶向性。这些分泌前导肽元件可以来源于原核或真核序列。因此,适当地使用分泌前导肽,其为连接至多肽N端的氨基酸,以指导多肽从宿主细胞胞质溶胶中移出并分泌至培养基中。

[0392] 本文所描述的融合蛋白可以融合至额外的氨基酸残基。举例来说,此类氨基酸残基可以是肽标签,以有助于分离。还考虑了用于将抗体归巢至特定器官或组织的其它氨基酸残基。

[0393] 将理解,Fab-纳米笼可以通过HC-铁蛋白和LC的共转染来生成。或者,可以使用仅需要转染一个质粒的单链Fab-铁蛋白纳米笼。这可以通过LC与HC之间不同长度(例如,60或70个氨基酸)的接头来完成。当使用单链Fab时,可以确保重链和轻链配对。还可以在构建体N端或接头内添加标签(例如,Flag、HA、myc、His6x、Strep等),以便于如上文所描述进行纯化。此外,当不同的Fab-纳米粒子质粒共转染时,可以使用标签系统以使用串联/累加亲和色谱步骤来确保同一纳米粒子上存在许多不同的Fab。这为纳米粒子提供了多重特异性。如果需要,则可以在表达和/或纯化后插入蛋白酶位点(例如,TEV、3C等)来切割接头和标签。

[0394] 可以使用任何适合的方法或途径来施用本文所描述的融合蛋白。施用途径包括例如口服、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用。

[0395] 应理解,在用于哺乳动物中以达成预防或治疗目的的情况下,本文所描述的融合蛋白将以另外包含药学上可接受的载体的组合物形式施用。适合的药学上可接受的载体包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等中一者或多者以及它们的组合。药学上可接受的载体还可以包含少量辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,从而提高结合蛋白的保质期或有效性。如本领域中众所周知,注射的组合物可以被配制为在向哺乳动物施用后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0396] 尽管人类抗体特别可用于向人类施用,但它们也可以向其它哺乳动物施用。如本文所用,术语"哺乳动物"旨在包括但不限于人类、实验动物、家养宠物和农场动物。

[0397] 在一个方面,提供了可用于治疗、改善或预防疾病或疾患(诸如癌症、自身免疫性病症、传染病或代谢紊乱)的方法,所述方法一般包括向受试者施用包含本公开的自组装多肽复合物的组合物的步骤。

[0398] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人类。

[0399] 用于向受试者施用的组合物一般包含如本文所公开的自组装多肽复合物。在一些实施方案中,此类组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0400] 组合物可以被配制用于多种施用途径中的任一者的施用,所述施用途径包括全身途径(例如,口服、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用)。

[0401] 上述公开内容总体上描述了本发明。参考以下具体实施例可以获得更全面的理解。除非另有说明,否则这些实施例仅出于说明的目的而提供,并且不旨在进行限制。因此,本发明决不应解释为限于以下实施例,而应解释为涵盖由于本文所提供的教示而变得明显的任何和所有变化。

[0402] 以下实施例不包括常规方法的详细描述,诸如构建载体和质粒、将编码多肽的基因插入此类载体和质粒中、或将质粒引入宿主细胞中所采用的方法。此类方法对于本领域普通技术人员来说是众所周知的,并且在许多出版物中描述,包括Sambrook,J.,Fritsch,E.F.和Maniatis,T.(1989),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,所述出版物通过引用并入本文。

[0403] 无需进一步描述,相信本领域普通技术人员可以使用前述描述和以下说明性实施例来制备和利用本发明的化合物并实践要求保护的方法。因此,以下工作实施例特别指出本发明的典型方面,并且不应解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0404] 实施例

[0405] 实施例1:多价性将SARS-CoV-2抗体转化为超强效中和剂

[0406] 本实施例描述了与脱铁铁蛋白的融合蛋白的设计、表达、纯化和表征。脱铁铁蛋白原聚体自组装成由24个相同多肽组成的八面体对称结构,其流体动力学半径(R_h)约为6nm。每个脱铁铁蛋白亚基的N端指向球形纳米笼的外部,并且因此可进行所关注的蛋白质的基因融合。融合蛋白的设计使得在折叠后,脱铁铁蛋白原聚体用作构建块,所述构建块驱动融合至脱铁铁蛋白末端的24个蛋白质的多聚化。

[0407] 概要

[0408] 导致COVID-19的病毒SARS-CoV-2已引起全球大流行。抗体可以成为对抗病毒感染的强有力的生物治疗剂。此处,我们使用人脱铁铁蛋白原聚体作为模块化亚基来驱动抗体片段的寡聚化,并且将靶向SARS-CoV-2的抗体转化为极强效中和剂。使用这个平台,与相应的IgG相比,由于效力增强至多10,000倍而达成低至9×10^{-14}M的半数最大抑制浓度(IC_{50})值。单个多价分子上三种不同抗体特异性和片段可结晶(Fc)结构域的组合赋予了克服病毒序列变异性的能力以及出色的效力和类IgG生物利用度。因此,多特异性、多亲和力抗体(多抗体或MB)平台独特地利用结合亲合力和多特异性来递送针对SARS-CoV-2的超强效和广泛的中和剂。所述平台的模块化也使其适用于对其它具有全球卫生重要性的传染病进行快速评价。中和抗体是一种有前景的SARS-CoV-2治疗剂。

[0409] 简介

[0410] 诸如新型SARS-CoV-2等呼吸道病毒对公共卫生的持续威胁突显了迅速开发和部署预防性和治疗性干预以抗击流行病的迫切需要。单克隆抗体(mAb)已有效用于治疗传染病,如用于预防高危婴儿呼吸道合胞病毒的帕利珠单抗(palivizumab)[1]或用于治疗埃博拉病毒(Ebola)的Zmapp、mAb114和REGN-EB3[2]所例示。因此,靶向SARS-CoV-2的刺突(S)蛋白的mAb已成为开发针对COVID-19的生物医学对策的重点。迄今为止,已鉴定出若干靶向S蛋白的抗体[3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19],其中巴尼韦单抗(bamlanivimab)是美国食品和药物管理局(FDA)于2020年11月批准用于SARS-CoV-2的紧急治疗的首个抗体。干扰与血管紧张素转换酶2(ACE2)(细胞进入受体[20])的结合的受体结合结构域(RBD)导向的mAb通常具有最高中和效力[6,18,19]。

[0411] 可以通过从受感染的供体或免疫动物中进行B细胞分选,或通过鉴定预组装文库中的结合剂来分离mAb。尽管这些方法对于发现病毒特异性mAb来说是稳健和可靠的,但最佳抗体克隆体的鉴定通常与耗费时间成本相关联。另外,RNA病毒的突变率高于DNA病毒,并且此类突变可以显著改变中和抗体的效力。事实上,已有多项研究显示,恢复期血清的中和效力降低,并且某些mAb[21,22,23]对SARS-CoV-2的较新B.1.1.7[24]、B.1.351[25]和B.1.1.28[26,27]变体产生抗性。因此,对开发关联抗体发现和不易受病毒序列变异性影响的高效中和剂的快速鉴定和部署的平台存在未满足的需求。

[0412] 抗体的效力在很大程度上受其与表位同时发生多次相互作用的能力所影响[28,29,30]。先前已有报道,这种增强的表观亲和力(称为亲合力)会增加纳米抗体[31,32]和IgG相对于Fab[8,10,16]对SARS-CoV-2的中和效力。为了充分利用结合亲合力,我们已开发了一种抗体支架技术,所述技术使用人脱铁铁蛋白原聚体作为模块化亚基,以使抗体片段多聚化并驱使mAb成为针对SARS-CoV-2的超强效中和剂。事实上,所得多抗体分子的效力比相应的IgG增加多达四个数量级。另外,我们展示了这种技术组合三种不同Fab特异性的能力,以更好地克服刺突中的点突变。多抗体提供了一个通用的类IgG“即插即用”平台,以增强针对SARS-CoV-2的mAb的抗病毒特性,并且展示了亲合力作为对抗病毒病原体所利用的机制的强大作用。

[0413] 材料和方法

[0414] 蛋白质表达和纯化

[0415] 编码VHH-人脱铁铁蛋白融合体、Fc融合体、Fab、IgG和RBD突变体的基因由GeneArt(Life Technologies)合成并克隆至pcDNA3.4表达载体中。除非另有说明,否则使用FectoPRO(Polyplus Transfections)以1:1的比率在密度为0.8×10^6个细胞/mL的HEK293F细胞(Thermo Fisher Scientific)中瞬时表达所有构建体,每200mL细胞含50μg DNA。在37℃、8% CO_2和70%湿度下于Multitron Pro振荡器(Infors HT)中以125rpm振荡孵育6-7天后,以5000×g离心15分钟来收获细胞悬浮液,并且通过0.22μmSteritop过滤器(EMD Millipore)过滤上清液。通过以1:2的比率共转染90μg LC和HC来瞬时表达Fab和IgG,并且分别使用KappaSelect亲和柱(GE Healthcare)和HiTrap蛋白A HP柱(GE Healthcare)进行纯化,以100mM甘氨酸pH 2.2作为洗脱缓冲液。立即用1M Tris-HCl(pH 9.0)中和洗脱的级分,并且使用Superdex 200Increase尺寸排阻柱(GE Healthcare)进一步纯化。以与IgG相同的方式纯化ACE2和VHH-72的Fc融合体。使用HiTrap Phenyl HP柱通过疏水相互作用色谱来纯化VHH-72脱铁铁蛋白融合蛋白,并且将洗脱的级分于20mM磷酸钠pH 8.0、150mM NaCl中加载至Superose 6 10/300GL尺寸排阻柱(GE Heathcare)上。使用HisTrap Ni-NTA柱(GE Healthcare)纯化来自小鼠和人类的野生型(BEI NR52309)和突变型RBD、融合前S胞外域(BEI NR52394)和Fc受体(FcRn和Fcγ RI)。Ni-NTA纯化后,在S三聚体的情况下使用Superose 6,并且在RBD和Fc受体的情况下使用Superdex 200Increase尺寸排阻柱(GE Heathcare),在所有情况下都在20mM磷酸盐pH 8.0、150mM NaCl缓冲液中进行。

[0416] 多抗体的设计、表达和纯化

[0417] 本文中以多抗体提及的所有分子都含有scFab和scFc片段。使用70个氨基酸的柔性接头[$(GGGGS)_{x14}$]生成scFab和scFc多肽构建体,以分别生成异二聚体和同二聚体片段。具体来说,Fab轻链的C端通过接头融合至Fab重链的N端。在scFc的情况下,形成功能性同二

聚体Fc的两个单Fc链串联融合。个别结构域通过以下25个氨基酸的接头融合至脱铁铁蛋白单体:$(GGGGS)_{x5}$。通过缺失人脱铁铁蛋白轻链的残基1至90(C-铁蛋白)和91至175(N-铁蛋白)来生成编码连接至半脱铁铁蛋白的scFab和scFc片段的基因。通过将66μg的质粒scFab-人脱铁铁蛋白:scFc-人类N-铁蛋白:scFab-C-铁蛋白以2:1:1的比率混合来获得HEK 293F细胞中多抗体的瞬时转染。添加scFab-人脱铁铁蛋白允许进行有效的多抗体组装,并且增加了最终分子中与Fc相比的Fab的数目,由此使得Fab亲合力优于Fc亲合力。在多特异性多抗体的情况下,使用比率为4:2:1:1的scFab1-人脱铁铁蛋白:scFc-人类N-铁蛋白:scFab2-C-铁蛋白:scFab3-C-铁蛋白。过滤DNA混合物并且在室温(RT)下与66μl的FectoPRO一起孵育,随后添加至细胞培养物中。使用HiTrap蛋白A HP柱(GE Healthcare)以20mM Tris pH 8.0、3M $MgCl_2$和10%甘油洗脱缓冲液通过亲和色谱来纯化裂解的多抗体。浓缩含有蛋白质的级分,并且在Superose 6 10/300GL柱(GE Healthcare)上通过凝胶过滤来进一步纯化。

[0418] 负染色电子显微镜检查

[0419] 将3微升的浓度约为0.02mg/mL的多抗体置于碳包覆的铜网格的表面上,所述铜网格先前已在空气中辉光放电15秒,允许吸附30秒,并且用3μL 2%甲酸双氧铀染色。立即使用Whatman 1号滤纸从网格中去除过量的染料,并且再添加3μl 2%甲酸双氧铀,持续20秒。使用在200kV下操作并配备有Orius电荷耦合器件(CCD)相机(Gatan Inc)的FEI Tecnai T20电子显微镜对网格进行成像。

[0420] 生物层干涉法

[0421] 在25℃下于PBS pH 7.4、0.01% BSA和0.002% Tween中使用Octet RED96 BLI系统(Sartorius ForteBio)进行直接结合动力学测量。将His标记的RBD、SARS-CoV-2刺突加载至Ni-NTA(NTA)生物传感器(Sartorius ForteBio)上,以达到0.8nm的BLI信号响应。通过将加载的生物传感器转移至含有两倍稀释系列(从250至8nM(Fab)、125至4nM(IgG)以及16至0.5nM(MB))的孔中来测量缔合速率。通过将生物传感器浸入含有缓冲液的孔中来测量解离速率。每个步骤的持续时间为180秒。通过按照上文所指示的实验条件和浓度范围测量与加载至Ni-NTA(NTA)生物传感器上的hFcγRI和hFcRn的结合来评估分裂多抗体设计中的Fc表征。为了探究多抗体经历内体再循环的理论能力,在生理pH(7.4)和内体pH(5.6)下测量了与hFcRnβ2-微球蛋白复合物的结合。类似地,通过测量与预固定至Ni-NTA(NTA)生物传感器上的mFcγRI和mFcRn的结合来评估小鼠替代性MB的Fc表征。使用从100至3nM(IgG)和10至0.3nM(MB)的两倍稀释系列。使用Octet软件以1:1拟合模型对传感图进行分析。在两步结合过程中进行竞争测定。首先将预加载有His标记的RBD的Ni-NTA生物传感器浸入含有50μg/mL一级抗体的孔中,持续180秒。30秒的基线期后,将传感器浸入含有50μg/ml二级抗体的孔中,再持续300秒。在25℃下于PBS pH 7.4、0.01% BSA和0.002% Tween中进行所有孵育步骤。使用ACE2-Fc来绘制mAb与受体结合位点的结合。

[0422] 动态光散射

[0423] 使用DynaPro板读取器III(Wyatt Technology)通过动态光散射(DLS)来确定多抗体的Rh。将约20μL的浓度为1mg/mL的多抗体添加至384孔黑色透明底板(Corning)中,并且在25℃的固定温度下进行测量,每次读取持续时间为5秒。使用Dynamics软件(Wyatt Technology)从累积五次读数获得粒度确定和多分散性。

[0424] 聚集温度

[0425] 使用UNit仪器(Unchained Labs)确定多抗体和亲本IgG的聚集温度(T_{agg})。将样品浓缩至1.0mg/mL,并且以1℃的增量从25℃升温至95℃。将T_{agg}确定为在266nm波长下观察到静态光散射相对于基线增加50%时的温度(即,差分曲线的最大值)。使用UNit分析软件计算两次独立测量的平均值和标准误差。

[0426] 药代动力学和免疫原性

[0427] 本研究使用了由小鼠HD37(抗hCD19)IgG2a的scFab和scFc片段融合至小鼠脱铁铁蛋白(mFerritin)轻链的N端所组成的替代性多抗体。按照上文所描述的程序转染和纯化比率为2:1:1的HD37 scFab-mFerritin:Fc-mFerritin:mFerritin。在小鼠IgG2a Fc构建体中引入L234A、L235A和P329G(LALAP)突变,以使多抗体的效应功能沉默[48]。使用购自Charles River的12周龄雄性C57BL/6小鼠(品系代码:027)进行体内研究,所述小鼠在21-23℃温度和40-55%湿度下于12小时光照/黑暗周期(早上7点/晚上7点)下圈养于单独通风的笼中。所有程序都经过多伦多大学士嘉堡校区(University of Toronto Scarborough)当地动物护理委员会批准。皮下注射约5mg/kg多抗体或对照样品(HD37单链IgG-IgG1或IgG2a亚型)和幽门螺杆菌铁蛋白(HpFerritin)-PfCSP疟疾肽于200μL PBS(pH 7.5)中的单次注射液。在多个时间点收集血液样品,并且通过ELISA评估血清样品的循环抗体和抗药抗体的水平。简单来说,将96孔Pierce镍包覆板(Thermo Fisher)涂覆50μL 0.5μg/ml His_{6x}标记的抗原hCD19,以使用IgG和多抗体的试剂特异性标准曲线来确定循环HD37特异性浓度。使用HRP-蛋白A(Invitrogen)检测结合的IgG/MB(稀释度1:10,000)的水平。为了进行抗药抗体确定,将Nunc MaxiSorp板(Biolegend)涂覆12聚体HD37 scFab-mFerritin或涂覆HpFerritin-PfCSP疟疾肽。将1:100血清稀释液在室温下孵育1小时,并且使用HRP-蛋白A(Invitrogen)作为二级分子(稀释度1:10,000)进一步显影。使用Synergy Neo2多模式测定微孔板读取器(Biotek Instruments)对450nm处的化学发光信号进行定量。

[0428] 生物分布

[0429] 八周龄雄性BALB/c小鼠购自杰克逊实验室(The Jackson Laboratory),并且圈养于单独通风的笼中。将小鼠在20-21℃温度和40-60%湿度下于14小时光照/10小时黑暗中圈养,光照强度从黎明到黄昏逐渐变化,中午时分光照强度最大。所有程序都经过多伦多大学(University of Toronto)当地动物护理委员会批准。本研究使用了由小鼠HD 37IgG2a的scFab和scFc片段融合至小鼠脱铁铁蛋白轻链的N端所组成的多抗体。按照制造商的说明书,使用Alexa Fluor™ 647抗体标记试剂盒(Invitrogen)将HD37 IgG2a多抗体或对照样品(HD37单链IgG2a)与Alexa-647进行荧光缀合。经Alexa Fluor™ 647标记的15nm金纳米粒子购自Creative Diagnostics(GFLV-15)。使用PerkinElmer IVIS Spectrum(PerkinElmer)进行非侵入性生物分布实验。将含约5mg/kg的MB、HD37 IgG2a或金纳米粒子的200μL PBS(pH7.5)皮下注射至BALB/c小鼠肩部的松弛皮肤中,并且在注射后0、1小时、6小时、24小时、2、3、4、8和11天进行成像。成像前,将小鼠置于含有异氟烷和氧气的混合物的麻醉诱导室中1分钟。然后将麻醉的小鼠以俯卧姿势置于IVIS成像系统内的内置加热对接系统的中心(维持于37℃下并且供应异氟烷和氧气的混合物)。对于全身2D成像,将小鼠在成像系统内进行1-2秒成像(激发640nm和发射680nm)。使用IVIS软件(IVIS实时图像软件)进行数据分析。从2D落射照明图像确认荧光信号后,使用3×3或3×4透射照明位置的内置扫描场对所关注的区域进行3D透射照明荧光成像断层扫描(FLIT)。使用640nm激发和680nm发射,在各个透射

照明位置获取一系列2D荧光表面辐射图像。在相应位置还进行了一系列CT扫描。通过组合荧光信号和CT扫描,重建了荧光信号的3D分布图。基于在相应身体位置获取的PBS注射小鼠的3D图像,对所得3D荧光图像进行阈值处理。将图像映射至IVIS软件中的彩虹LUT,对于注射金纳米粒子的小鼠,色标上端设置为50pmol $M^{-1}cm^{-1}$,并且对于注射MB和IgG2a的小鼠,色标上端设置为1000pmol $M^{-1}cm^{-1}$,以允许更好地可视化随时间推移的生物分布。IVIS软件的小鼠器官登记特征用作从3D图像评估样品身体位置的一般准则。

[0430] 针对SARS-CoV-2的RBD的噬菌体文库的淘选

[0431] 商业SuperHuman 2.0噬菌体文库(Distributed Bio/Charles River Laboratories)用于鉴定针对SARS-CoV-2 RBD的单克隆抗体结合剂。出于此目的,在EXPi-293哺乳动物表达系统中表达SARS-CoV-2的RBD-Fc-Avi标签构建体。随后通过蛋白G Dynabeads纯化这种蛋白质,进行生物素化并且对生物素化和与ACE2重组蛋白(Sino Biologics Inc)的结合进行质量控制。将SuperHuman 2.0噬菌体文库(5×10^{12})在72℃下加热10分钟,并且针对蛋白G Dynabeads™(Invitrogen)、M-280链霉抗生物素蛋白Dynabeads™(Invitrogen)、小牛胸腺组蛋白(Sigma)、人类IgG(Sigma)以及来自Integrated DNA Technologies的ssDNA-生物素NNK和来自Integrated DNA Technologies的DNA-生物素NNK进行淘汰。接下来,使用Kingfisher FLEX(Thermofisher)上的自动化方案将所述文库针对M-280链霉抗生物素蛋白Dynabeads™捕获的RBD进行淘选。从珠粒中用酸洗脱所选的噬菌体,并且使用Tris-HCl pH 7.9(Teknova)中和。用OD_{600}=0.5的中和噬菌体库以1:10的比率感染ER2738细胞,并且在37℃和100rpm下孵育40分钟后,将噬菌体库离心并且在琼脂上孵育并在30℃下进行抗生素选择过夜。通过PEG使挽救的噬菌体沉淀,并且经过另外三轮可溶相自动化淘选。在淘汰、洗涤和选择轮次中使用PBST/1% BSA缓冲液和/或PBS/1% BSA。

[0432] 用SARS-CoV-2 RBD筛选细菌PPE中的抗SARS-CoV-2 scFv

[0433] 在25℃下于配备有HC200M传感器芯片(Carterra)的Carterra LSA阵列SPR仪器(Carterra)上使用高通量表面等离子体共振(SPR)来表达和筛选从噬菌体展示中选择的抗SARS-CoV-2 RBD scFv。将V5表位标签添加至scFv中,以能够经由固定化的抗V5抗体(Abcam,Cambridge,MA)进行捕获,所述抗体通过标准胺偶联预固定于芯片表面上。简单来说:首先通过10分钟注射0.4M 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、0.1M N-羟基磺化琥珀酰亚胺(sNHS)和0.1M 2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)pH 5.5的1:1:1(v/v/v)混合物来激活芯片表面。然后,将于10mM乙酸钠pH 4.3中制备的50μg/ml抗V5标签抗体偶联14分钟,并且在10分钟注射期间用1M乙醇胺HCl pH 8.5封闭过量的反应性酯。为了进行筛选,制备了由含有scFv(每个scFv一个点)的粗细菌周质提取物(PPE)组成的384配体阵列。在运行缓冲液(10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA和0.01%(v/v)Tween-20(HBSTE))中两倍稀释来制备每种提取物,并且印记于抗V5表面上15分钟。然后在补充有0.5mg/ml BSA的10mM HEPES pH 7.4、150mM NaCl和0.01%(v/v)Tween-20(HBST)中以0、3.7、11.1、33.3、100、37和300nM制备His标记的SARS-CoV-2 RBD Avi Tev,并且作为分析物注射5分钟,解离时间为15分钟。以递增的浓度注射样品而无需任何再生步骤。来自局部参考点的结合数据用于减去来自活性点的信号,并且减去最近的缓冲液空白分析物响应以对数据进行双重参考。在Carterra的动力学检查工具(2019年10月版本)中,将双重参考数据

与简单的1:1朗缪尔结合模型(Langmuir binding model)进行拟合。从噬菌体展示筛选中选择二十种中等亲和力的结合剂用于本研究。

[0434] 假病毒的产生和中和

[0435] 使用稍作修改的基于HIV的慢病毒系统[49]生成SARS-CoV-2假型病毒(PsV)。简单来说,使用BioT转染试剂(Bioland Scientific)并按照制造商的说明书,将293T细胞与编码荧光素酶报告基因的慢病毒骨架(BEI NR52516)、表达刺突的质粒(BEI NR52310)以及编码HIV结构和调控蛋白Tat(BEI NR52518)、Gag-pol(BEI NR52517)和Rev(BEI NR52519)的质粒共转染。在37℃下转染后24小时,向培养基中添加5mM丁酸钠,并且将细胞在30℃下再孵育24-30小时。SARS-CoV-2刺突突变体D614G由D.R.Burton(斯克里普斯研究所(The Scripps Research Institute))友情提供,SARS-COV-2 PsV变体B.1.351由D.D.Ho(哥伦比亚大学(Columbia University))友情提供,并且使用KOD-Plus诱变试剂盒(Toyobo,Osaka,Japan)使用表1中描述的引物生成其余的PsV突变体。收获PsV粒子,通过0.45μm孔径无菌过滤器,并且最后使用100K Amicon(Merck Millipore Amicon-Ultra 2.0离心过滤单元)浓缩。

[0436] 表1.引物序列

[0437]

引物名称	引物
N234Q_fwd	CAGATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCC
N234Q_rev	GATGCCGATGGGCAGATCCACCAGGGG
L452R_fwd	CGGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTG
L452_rev	GTAATTGTAGTTGCCGCCGACTTTGG
A475V_fwd	GTGGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAG
A475V_rev	CTGATAGATCTCGGTGGAGATGTCCC
V483A_fwd	GCCGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGC
V483A_rev	GCCGTTACAAGGGGTGCTGCCGGCC
N439K_fwd	AAGAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTAC
N439K_rev	GCTGTTCCAGGCAATCACACAGCCGGTG

[0438] 使用293T-ACE2细胞(BEI NR52511)和HeLa-ACE2细胞(由D.R.Burton友情提供;斯克里普斯研究所)在单循环中和测定中确定中和作用。实验前一天将细胞以10,000个细胞/孔的密度接种于100μl体积中。在293T细胞的情况下,将板预涂覆聚-L-赖氨酸(Sigma-Aldrich)。实验当天,将50μl连续稀释的IgG和MB样品与50μlPsV在37℃下孵育1小时。孵育1小时后,将孵育体积添加至细胞中并且孵育48小时。通过向50μl细胞中添加50μlBritelite plus试剂(Per kinElmer)来监测PsV中和,并且孵育2分钟后,将体积转移至96孔白色板(Sigma-Aldrich)中,并且使用Synergy Neo2多模式测定微孔板读取器(Biotek Instruments)测量相对光单位(RLU)的发光。进行两次至三次生物学重复,各有两次技术重复。IC_{50}倍数增加计算如下:

[0439] IgG IC_{50}(μg/mL)/MB IC_{50}(μg/mL)

[0440] 真病毒中和

[0441] 将VeroE6细胞在补充有100U青霉素、100U链霉素和10% FBS的DMEM中以30,000/孔的浓度接种于96 F板中。使细胞粘附于板上并静置过夜。24小时后,在96 R板中一式四份(25μL/孔)于补充有100U青霉素和100U链霉素的DMEM中制备IgG和MB样品的五倍连续稀释

液。将约25μL SARS-CoV-2/SB2-P4-PB[50]克隆体1以100TCID/孔添加至每孔中,并且在37℃下孵育1小时,每15分钟振荡一次。共培养后,从VeroE6板中移出培养基,并且使用50μL抗体-病毒样品以在37℃、5% CO_2下一式四份接种VeroE6细胞1小时,每15分钟振荡一次。接种1小时后,移出接种物,并且将200μL补充有100U青霉素、100U链霉素和2% FBS的新鲜DMEM添加至每孔中。将板进一步孵育5天。监测细胞病变效应(CPE)并且使用PRISM计算IC_{50}值。进行三次生物学重复,各有四次技术重复。

[0442] 刺突蛋白与Fab 80、298和324的交联

[0443] 将约100μg刺突三聚体与2倍摩尔过量的Fab 80、298或324在20mM HEPES pH 7.0和150mM NaCl中混合。通过添加0.075%(v/v)戊二醛(Sigma Aldrich)使蛋白质交联,并且在室温下孵育120分钟。经由尺寸排阻色谱(Superose6 Increase 10/300GL,GE Healthcare)纯化复合物,浓缩至0.5mg/mL并且直接用于cryo-EM网格制备。

[0444] Fab 46-RBD复合物的交联

[0445] 将约100μg Fab 46与2倍摩尔过量的RBD在20mM HEPES pH 7.0和150mM NaCl中混合。通过添加0.05%(v/v)戊二醛(Sigma Aldrich)使复合物交联,并且在室温下孵育45分钟。经由尺寸排阻色谱(Superdex 200Increase 10/300GL,GE Healthcare)纯化交联的复合物,浓缩至2.0mg/ml并且直接用于cryo-EM网格制备。

[0446] Cryo-EM数据收集和图像处理

[0447] 将3微升样品沉积于内部准备的多孔金网格[51]上,所述多孔金网格在使用前用PELCO easiGlow(Ted Pella)在空气中辉光放电15秒。用改进的FEI Mark III Vitrobot(维持于4℃和100%湿度下)以偏移量-5将样品点渍6秒,随后在液态乙烷和丙烷的混合物中速冻。在300kV下用Thermo Fisher Scientific Titan Krios G3电子显微镜和原型Falcon 4相机以250帧/秒的电子计数模式操作来获取数据。收集9.6秒影片,曝光次数为29次,相机曝光率为约5e^-/像素/秒,并且总样本曝光量为约44 $e^-/Å^2$。没有使用物镜光阑。根据金衍射标准将像素大小校准为1.03 Å/像素。用EPU软件包对显微镜进行自动化操作,并且用cryoSPARC Live[52]监测数据收集。

[0448] 为了克服一些样品所遭遇的优先取向,采用倾斜数据收集[53]。对于刺突-Fab 80复合物,收集820个0°倾斜影片和2790个40°倾斜影片。对于刺突-Fab 298复合物,收集4259个0°倾斜影片和3513个40°倾斜影片。对于刺突-Fab 324复合物,收集1098个0°倾斜影片和3380个40°倾斜影片。对于RBD-Fab 46复合物,收集4722个0°倾斜影片。对于0°倾斜影片,进行cryoSPARC分块运动校正。对于40°倾斜影片,使用Relion MotionCorr[54,55]。然后将显微照片导入cryoSPARC中并且进行分块CTF估计。在cryoSPARC Live会话期间,使用2D分类生成的模板来选择粒子的模板。2D分类用于删除垃圾粒子图像,得到刺突-Fab 80复合物的80,951个粒子图像、刺突-Fab298复合物的203,138个粒子图像、刺突-Fab 324复合物的64,365个粒子图像和RBD-Fab 46复合物的2,143,629个粒子图像的数据集。使用多轮多类从头计算细化来清理粒子图像堆栈,并且使用均质细化来获得一致结构。对于倾斜粒子,这个阶段在Relion内完成粒子抛光,然后重新导入cryoSPARC中。对于刺突-Fab复合物,观察到广泛的灵活性。进行3D变异性分析[56],并且与异质细化一起用于对存在的不同状态进行分类。然后对最后一组粒子图像进行非均匀细化[57]。对于RBD-Fab 46复合物,迭代使用具有三类的cryoSPARC从头计算细化来清理粒子图像堆栈。此后,将具有细化的欧拉角(Euler angle)

的粒子图像堆栈带入cisTEM中进行重建[58],以产生4.0 Å分辨率图。用pyem[59]完成Relion与cryoSPARC之间的数据传输。

[0449] 结晶和结构确定

[0450] 将200μg RBD与2倍摩尔过量的每种Fab于20mM Tris pH 8.0、150mM NaCl中混合来获得52 Fab-298 Fab-RBD的三元复合物,随后经由尺寸排阻色谱(Superdex 200Increase 10/300GL,GE Healthcare)进行纯化。将含有复合物的级分浓缩至7.3mg/ml,并且以1:1的比率与20%(w/v)2-丙醇、20%(w/v)PEG 4000和0.1M柠檬酸钠pH 5.6混合。晶体在约1天后出现,并且在10%(v/v)乙二醇中冷冻保护,随后在液氮中快速冷冻。

[0451] 在阿贡国家实验室先进光子源(Argonne National Laboratory Advanced Photon Source)的23-ID-D光束线上收集数据。使用XDS[60]和XPREP处理数据集。使用Phaser[61]通过分子置换确定相位,其中CNTO88 Fab作为52 Fab(PDB ID:4DN3)的模型,20358 Fab作为298Fab(PDB ID:5CZX)的模型,并且PDB ID:6XDG作为RBD的搜索模型。使用phenix.refine[62]和Coot[63]中的手动构建迭代对结构进行细化。PyMOL用于结构分析和图形渲染[64]。通过SBGrid[65]支持所有软件的访问。两个Fab-RBD界面的代表性电子密度示于图2e、f中。

[0452] 材料可用性

[0453] 电子显微镜图已存入电子显微镜检查数据库(EMDB)中,登录代码为EMD-22738、EMD-22739、EMD-22740和EMD-22741(表2)。298-52-RBD复合物的晶体结构(表3)可从蛋白质数据库以登录PDBID:7K9Z获取。本文件提供了所用的单克隆抗体的序列(表4)。在整个手稿中使用了额外的PDB/EMDB条目以对mAb靶向的不同表位仓进行比较分析。本分析中使用的条目为:REGN10933(PDB ID:6XDG)、CV30(PDB ID:6XE1)、C105(PDB ID:6XCM)、COVA2-04(PDB ID:7JMO)、COVA2-39(PDB ID:7JMP)、CC12.1(PDB ID:6XC2)、BD23(PDB ID:7BYR)、B38(PDB ID:7BZ5)、P2C-1F11(PDB ID:7BWJ)、2-4(PDB ID:6XEY)、CB6(PDB ID:7C01)、REGN10987(PDBID:6XDG)、S309(PDB ID:6WPS,6WPT)、EY6A(PDB ID:6ZCZ)、CR3022(PDB ID:6YLA)、H014(PDB ID:7CAH)、4-8(EMDB ID:22159)、4A8(PDB ID:7C2L)和2-43(EMDB ID:22275)。

[0454] 表2.Cryo-EM数据收集和图像处理

[0455]

	Fab 80-刺突	Fab 298-刺突	Fab 324-刺突	Fab 46-RBD
EMDB ID	EMD-22739	EMD-22740	EMD-22741	EMD-22738
数据收集				
电子显微镜	Titan Krios G3	Titan Krios G3	Titan Krios G3	Titan Krios G3
相机	Falcon 4EC	Falcon 4EC	Falcon 4EC	Falcon 4EC
电压(kV)	300	300	300	300
标称放大率	75,000	75,000	75,000	75,000
校准的物理像素大小(Å)	1.03	1.03	1.03	1.03
总曝光量(e-/Å^2)	44	44	44	44
帧数	29	29	29	29
图像处理				
运动校正软件	*cryoSPARC v2, RelionMotion Corr*	*cryoSPARC v2, RelionMotion Corr*	*cryoSPARC v2, RelionMotion Corr*	*cryoSPARCv2*
CTF 估算软件	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*
粒子选择软件	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*
3D 图分类和细化软件	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cryoSPARCv2*	*cisTEM*
使用的显微照片(总计)	3610	7772	4478	4722
0°倾斜	820	4259	1098	4722
40°倾斜	2790	3513	3380	0
全局分辨率(Å)	6.2	6.2	6	4
最终图中的粒子	7,525	26,972	18,595	32,283

[0456]

[0457] 表3.X射线晶体学数据收集和细化统计

[0458]

	Fab 52- Fab 298- SARS-CoV-2 RBD
PDB ID	7K9Z
数据收集	
波长(Å)	1.03317
空间群	P 3_2 2 1
晶胞尺寸	
a,b,c (Å)	87.6, 87.6, 325.1
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0
分辨率(Å)	39.66-2.95 (3.05-2.95)
ASU 中的分子数	1
总观察次数	496,550 (43,958)
独特观察次数	31,545 (3,060)
多重性	15.7 (14.3)
$R_{合并}$ (%)	16.8 (74.2)
R_{pim} (%)	4.3 (20.1)
<I/σI>	12.3 (1.4)
$CC_{1/2}$	99.8 (86.3)
完整性(%)	99.9 (99.9)
细化	
非氢原子	8061
大分子	8047
聚糖	14
$R_{工作}/R_{自由}$	0.259/0.286
Rms 偏差	
键长(Å)	0.002
键角(°)	0.53
拉马钱德兰图 (Ramachandran plot)	
偏好区(%)	95.6
允许区(%)	4.1
离群值(%)	0.3
旋转异构体离群值(%)	2.6
B 因子(Å^2)	
威尔逊 B 因子(Wilson B-factor)	78.6
平均 B 因子	103.9
平均大分子	103.9
平均聚糖	114.3

[0459]

[0460] 表4.

[0461]

mAb ID	VH	VK	RBD K_D (nM)	IC_{50} SARS-CoV2 PsV (μg/mL) MB	IC_{50} SARS-CoV2 PsV (μg/mL) IgG	IC_{50} SARS-CoV2/SB2-P4-PB (μg/mL) MB	IC_{50} SARS-CoV2/SB2-P4-PB (μg/mL) IgG	可变重链序列	可变轻链序列
56	IGHV1-46	IGKV1-39	23	>50	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDIGPIDYWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPSTFGQGTKVEIKR
349	IGHV3-23	IGKV1-39	74	>50	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISSAGSITNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGNHAGTTVTSEYFQHWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQGTRLEIKR
178	IGHV1-46	IGKV3-15	72	1.7	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDISSWYEITKFDPWGQGTLVTVSS	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSGTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCLQTHSYPPTFGQGTKVEIKR
108	IGHV1-46	IGKV1-39	72	0/37	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVITNN

[0462]

	128	IGHV1-46	IGKV1-39	57	3.5	>50	n.d.	n.d.	YAIHWVRQAPGQGLEWMGWMNPISGNTDYAPNFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKDGSQLAYLVEYFQHWGQGTLVTVSS LAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTFPYTFGQGTKVEIKR
	160	IGHV3-23	IGKV1-39	7.7	0.22	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGHDMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARANSLRYYYGMDVWGQGTMVTVSS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTTPYTFGQGTKLEIKR
	368	IGHV1-69	IGKV2-28	nb	0.073	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGAIMPMFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSSGYYYGWGQGTLVTVSS DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPATFGPGTKVDIKR
	192	IGHV1-69	IGKV2-28	nb	0.79	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSSGYYYGWGQGTLVTVSS DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYYAASSLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM

[0463]

								VYYCSTYYYD SSGYSTDYWG QGTLVTVSS	QALQTPYTFG QGTKLEIKR
								QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQ APGQGLEWM GWINPLNGGT	DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQSISRYL NWYQQKPGK APKLLIYDASN LESGVPSRFSG
	158	IGHV 1-46	IGKV1 -39	172	0.1	>50	n.d.	n.d.	NFAPKFQGRV TMTRDTSTST VYMELSSLRSE DTAVYYCARD PGGSYSNDAF DIWGQGTLVT VSS	SGSGTDFTLTI SSLQPEDFATY YCQQANSFPL TFGGGTKVDI KR
								QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFTS YAMHWVRQA PGQGLEWMG RISPRSGGTKY	DIVMTQSPLSL PVTPGEPASIS CRSSQSLLHSN GYNYLDWYL QKPGQSPQLLI YAASSLQSGV
	180	IGHV 1-69	IGKV2 -28	nb	0.89	>50	n.d.	n.d.	AQRFQGRVTIT ADESTSTAYM ELSSLRSEDTA VYYCAREAVA GTHPQAGDFD LWGRGTLVTV SS	PDRFSGSGSGT DFTLKISRVEA EDVGVYYCQ QYYSSPYTFG QGTKLEIKR
								EVQLLESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSS AMHWVRQAP GKGLEWVSAI	DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQGISSYL AWYQQKPGK APKLLIYDASS
	254	IGHV 3-23	IGKV1 -39	127	9.3	>50	n.d.	n.d.	GTGGDTYYAD SVKGRFTISRD NSKNTLYLQM NSLRAEDTAV YYCAREGDGY NFYFDYWGQG TLVTVSS	LQIGVPSRFSG SGSGTDFTLTI SSLQPEDFATY YCLQSYSTPP WTFGQGTKVE IKR
								QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFTS YDINWVRQAP GQGLEWMGM	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS CRASQSVSSR YLAWYQQKP GQAPRLLIYG
	120	IGHV 1-46	IGKV3 -15	24	7.2	>50	n.d.	n.d.	IDPSGGSTSYA QKFQGRVTMT RDTSTSTVYM ELSSLRSEDTA VYYCAKDFGG GTRYDYWYFD LWGRGTLVTV SS	ASTRATGIPAR FSGSGSGTEFT LTISSLQSEDF AVYYCQQYY TTPRTFGQGT RLEIKR
								EVQLLESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFPFSQH	DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQGISSHL

[0464]

	298	IGHV1-46	IGKV4-1	24	0.00011	2.8	0.00057	2.2	GMHWVRQAPGKGLEWVSAIDRSGSYIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYGGKVTYFDYWGQGTLVTVSS	AWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKVEIKR
	82	IGHV1-46	IGKV1-39	206	0.0022	1.6	0.21	19	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGSFSTSAFYWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRALYGSGSYFDYWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSPPPTFGQGTRLEIKR
	46	IGHV3-23	IGKV1-39	83	0.0024	2.1	0.027	19	EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKR
	324	IGHV1-69	IGKV1-39	111	0.0009	0.78	0.024	21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGDYGDYIVSPF	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKR

[0465]

								DLWGRGTLVTVSS	
	236	IGHV1-69	IGKV2-28	145	0.00047	0.057	0.028	5.5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASRGIQLLPRGMDVWGQGTTVTVSS	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGQGTRLEIKR
	52	IGHV1-69	IGKV1-39	12	0.00002	0.55	0.27	6.2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRGDTIDYWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNGFPLTFGPGTKVDIKR
	80	IGHV1-69	IGKV4-1	142	0.00013	0.1	0.32	12.7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRELPEVVDWYFDLWGRGTLVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSAPLTFGGGTKVEIKR

[0466] 结果

[0467] 亲和力增强中和效力

[0468] 我们使用人脱铁铁蛋白轻链的自组装来多聚化靶向SARS-CoV-2 S糖蛋白的抗原结合部分。脱铁铁蛋白原聚体自组装成由24个相同多肽组成的八面体对称结构,其流体动力学半径(Rh)约为6nm[33]。每个脱铁铁蛋白亚基的N端指向球形纳米笼的外部,并且因此可进行所关注的蛋白质的基因融合。折叠后,脱铁铁蛋白原聚体用作构建块,所述构建块驱动融合至其N端的24个蛋白质的多聚化(图1a)。

[0469] 首先,我们研究了多价性对单链可变结构域VHH-72阻断病毒感染的能力的影响。先前已描述了VHH-72当融合至Fc结构域时中和SARS-CoV-2,但呈其单价形式时则不能中和[31]。展示24个VHH-72拷贝的人脱铁铁蛋白轻链组装成单分散、形状良好的球形粒子(图1b、c),并且与二价VHH-72-Fc相比,显示对S糖蛋白增强的结合亲合力(图1d)。令人惊讶的是,

与传统的Fc融合相比,在人脱铁铁蛋白轻链上展示VHH-72使得对SARS-CoV-2假病毒(PsV)的中和效力增加约10,000倍(图1e),证明了亲合力将结合部分转化为强效中和剂的强大作用。

[0470] 多抗体具有类IgG特性

[0471] Fc通过分别与新生儿Fc受体(FcRn)和Fcγ受体(FcγR)相互作用而赋予IgG体内半衰期和效应功能。为了将这些类IgG特性赋予我们的多聚支架,我们接下来寻求将结合部分和Fc结构域两者合在一起。由于Fab是由轻链和重链组成的异二聚体,并且Fc是同二聚体,因此我们创建了单链Fab(scFab)和单链Fc(scFc)多肽构建体。scFab和scFc结构域直接融合至脱铁铁蛋白原聚体的N端。对于体内原理验证实验,我们生成了由小鼠轻链脱铁铁蛋白与小鼠scFab和小鼠scFc(IgG2a亚型)融合所组成的物种匹配替代性分子。结合动力学显示,所得MB分子以pH依赖性方式结合小鼠FcRn-在内体pH(5.6)下结合并且在生理pH(7.4)下不结合-类似于亲本IgG(图3a)。正如预期,与亲本IgG相比,与高亲和力小鼠FcγR1的结合通过亲合力效应而得到增强。因此,我们生成了改良的小鼠scFc型式,其中包括FcγR沉默突变LALAP以降低多聚情形中的Fc结合(图3a)。在C57BL/6或BALB/c小鼠中皮下施用MB耐受性良好,没有体重下降或明显的不良事件。MB显示良好的类IgG血清半衰期(图3b),与WT MB相比较少的FcγR结合MB(LALAP Fc序列)在血清中的可检测滴度延长,从而指示Fc在决定体内生物利用度方面的作用。实时2D和3D成像揭示,荧光标记的MB与相应的IgG一样生物分布于全身,而不会在任何特定组织中积累(图3c和图4)。相比之下,具有与MB类似的Rh的15nm金纳米粒子(GNP)从注射部位迅速扩散(图3c和图4)。据推测因为所有序列都来源于宿主,所以替代性小鼠MB不会在小鼠体内诱导抗药抗体反应(图3d),由此进一步突显了MB平台的类IgG特性。

[0472] 蛋白质工程改造以达成较高价数

[0473] 鉴于小鼠MB替代品的这些有利结果,我们旨在生成来源于先前报道的分别靶向SARS-CoV-2刺突RBD和N端结构域(NTD)的IgG BD23[12]和IgG 4A8[13]的完全人类MB。将scFc添加至MB中会减少可以多聚化的scFab的数目。为了向MB平台赋予Fc而不损害Fab亲合力并且因此不损害中和效力,我们对脱铁铁蛋白原聚体进行工程改造,以使每个粒子容纳超过24个组件。根据其四螺旋束折叠,人脱铁铁蛋白原聚体被分成两半:两个N端α螺旋(N-铁蛋白)和两个C端α螺旋(C-铁蛋白)。在这种构型中,人类IgG1的scFc片段和抗SARS-CoV-2IgG的scFab分别在每个脱铁铁蛋白一半的N端进行基因融合。分裂的脱铁铁蛋白互补导致两半发生异二聚化,并且因此导致融合的蛋白质发生非常有效的异二聚化过程。scFab-C-铁蛋白和scFc-N-铁蛋白基因与过量的scFab-铁蛋白基因的共表达产生了在纳米笼外周展示大量的scFab和少量的scFc的完全脱铁铁蛋白自组装(图5a以及材料和方法)。方便的是,这种设计允许使用类似于IgG纯化的蛋白A直接纯化MB。

[0474] 这种分裂的MB设计形成16nm Rh球形粒子,所述球形粒子具有不间断的密度环和规则间距的突出scFab和scFc(图5b、c)。因此,MB的尺寸范围低于天然IgM[34],但在相似尺寸上堆积更多重量,以达成高度多价性。结合动力学实验证明,添加Fc片段后,MB对刺突的高结合亲和力得以保留(图5d和表5)。在pH 5.6和7.4下与人类FcγRI和FcRn的结合确认了scFc在分裂MB设计中正确折叠(表6和表7)。另外,scFc中的LALAP突变降低了与人类FcγRI的结合亲和力(图5e),如先前用替代性小鼠MB所观察到的那样(图3a)。使用分裂设计MB进

行的SARS-CoV-2 PsV中和测定显示,与它们的IgG对应物相比,对刺突的结合亲和力增强意味着中和效力提高,BD23和4A8的中和效力分别增加约1600倍和>2000倍(图5f)。综合来说,这些数据支持进一步探索MB作为类IgG平台,所述平台赋予了在不同刺突结构域上的表位之间高超的结合亲合力和PsV中和作用。

[0475] 表5.通过BLI确定的多抗体的动力学常数和对SARS-CoV-2刺突抗原的亲和力。

[0476]

多抗体	SARS-CoV-2 刺突		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
4A8 MB	1.08E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
4A8 IgG	1.33E+05	1.91E-04	1.42E-09
BD23 MB	9.57E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
BD23 IgG	2.17E+05	9.37E-04	4.33E-09

[0477] 表6.来源于靶向SARS-CoV-2的BD23抗体(IgG1)的人铁蛋白多抗体的动力学常数和对人类FcRn的亲和力。

[0478]

多抗体	FcRn, pH 5.6			FcRn, pH 7.5		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
IgG1 对照	5.03E+05	3.86E-03	7.67E-09	-	-	无结合
WT MB	2.18E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合
LALAP MB	2.69E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合
I253A MB	2.00E+05	4.28E-04	2.15E-09	-	-	无结合
LALAP +I253A MB	4.34E+05	6.10E-04	1.41E-09	-	-	无结合

[0479] 表7.来源于靶向SARS-CoV-2的BD23抗体(IgG1)的人铁蛋白多抗体的动力学常数和对人类Fc γ RI的亲和力

[0480]

多抗体	FcγRI		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
IgG1 对照	1.27E+05	1.34E-04	1.06E-09
WT MB	7.21E+05	<1.0E-07	<1.0E-12

[0481]

LALAP MB	-	-	无结合
I253A MB	5.01E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
LALAP I253A MB	-	-	无结合

[0482] 在多抗体中评价的IgG1骨架的Fc突变包括:降低抗体与Fc γ R的结合的LALAP(L234A、L235A和P329G)和I235A,以及它们的组合。(编号是根据EU编号方案。)

[0483] 对于多抗体的k_{on}、k_{off}和所得平衡解离常数(K_D)的值汇总于表6-10中。结合动力学显示,所得小鼠MB分子以pH依赖性方式结合小鼠FcRn-在内体pH(5.6)下结合并且在生理pH(7.4)下不结合-类似于亲本IgG(图3A)。与亲本IgG相比,与高亲和力小鼠Fc γ R1的结合通过亲合力效应而得到增强。在内体pH下,人类MB与人类Fc γ RI和FcRn的结合确认了scFc在分裂MB设计中正确折叠,并且LALAP和I253A突变分别降低了对Fc γ RI和FcRn的结合亲和力。

[0484] 表8.通过BLI确定的来源于靶向CD19的HD37抗体(IgG2a)的小鼠铁蛋白多抗体的动力学常数和对小鼠FcRn的亲和力。

[0485]

多抗体	mFcRn，pH 5.6			mFcRn，pH 7.4		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
mIgG2a 对照	1.16E+05	1.23E-04	1.06E-09	-	-	无结合
mWT MB	6.82E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合
mLALAP MB	2.40E+06	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合

[0486] 表9.通过BLI确定的来源于靶向CD19的HD37抗体(IgG2)的小鼠铁蛋白多抗体的动力学常数和对小鼠Fc γ RI的亲和力。

[0487]

多抗体	mFcγRI		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
mIgG2a 对照	5.22E+04	4.51E-04	8.63E-09
mWT MB	9.39E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
mLALAP MB	-	-	无结合

[0488] 表10.来源于靶向SARS-CoV-2的BD23抗体(IgG1)的人铁蛋白多抗体的动力学常数和对人类FcRn的亲和力。

[0489]

多抗体	FcRn，pH 5.6			FcRn，pH 7.5		
	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
IgG1 对照	5.03E+05	3.86E-03	7.67E-09	-	-	无结合
WT MB	2.18E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合
LALAP MB	2.69E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	无结合
I253A MB	2.00E+05	4.28E-04	2.15E-09	-	-	无结合
LALAP +I253A MB	4.34E+05	6.10E-04	1.41E-09	-	-	无结合

[0490] 从抗体发现到超强效中和剂

[0491] 我们接下来评估了MB平台将初始噬菌体展示筛选中鉴定的mAb结合剂转化为针对SARS-CoV-2的强效中和剂的能力(图6a)。按照针对SARS-CoV-2的RBD的标准生物淘选方案，选择了20种具有在10^{-6}至10^{-8}M范围内的中等亲和力的人类mAb结合剂(表4;表11)。这些mAb以全长IgG和MB形式产生,并且在针对SARS-CoV-2 PsV的中和测定中比较了它们阻断病毒感染的能力(图6b和图7a)。值得注意的是,MB的表达产量、均质性和热稳定性类似于亲本IgG(图8和表12),并且MB将20种IgG中的18种(90％)的效力提高了多达四个数量级(表13)。对于mAb 298观察到最大增量,其平均IC_{50}从IgG的约0.3μg/mL至MB的0.0001μg/mL。令人惊讶的是,在测试的浓度范围内,11种mAb从非中和IgG转化为中和MB。使用两种不同的靶细胞(293T-ACE2和HeLa-ACE2细胞;图6b和图7b),七种MB展示针对SARS-CoV-2 PsV的极佳效力,其IC_{50}值在0.2-2ng/mL之间。使用重组mAb REGN10933和REGN10987作为基准的PsV中和测定显示与先前报道的那些[8]类似的IC_{50}值(分别为0.0044和0.030μg/mL),并且因此确认了我们的测定中观察到的MB的极佳效力。对于效力最高的mAb,MB对真正的SARS-CoV-2病毒的中和效力增强得到进一步确认(图6c和图7c),用两种重组REGN mAb也进行了基准评测。与PsV相

比,我们观察到针对真病毒的中和表型敏感性较低,这也与先前的报道[5,6,9,12]一致。

[0492] 表11.SARS-CoV-2 RBD的人类mAb结合剂。

[0493]

mAb ID		VH	VK	RBD KD(nM)
56		IGHV1-46	IGKV1-39	23
349		IGHV3-23	IGKV1-39	74
178		IGHV1-46	IGKV3-15	72
108		IGHV1-46	IGKV1-39	72
128		IGHV1-46	IGKV1-39	57
160		IGHV3-23	IGKV1-39	7.7
368		IGHV1-69	IGKV2-28	nb
192		IGHV1-69	IGKV2-28	nb
158		IGHV1-46	IGKV1-39	172
180		IGHV1-69	IGKV2-28	nb
254		IGHV3-23	IGKV1-39	127
120		IGHV1-46	IGKV3-15	24
64		IGHV3-23	IGKV1-39	97
298		IGHV1-46	IGKV4-1	24
82		IGHV1-46	IGKV1-39	206
46		IGHV3-23	IGKV1-39	83
324		IGHV1-69	IGKV1-39	111
236		IGHV1-69	IGKV2-28	145
52		IGHV1-69	IGKV1-39	12
80		IGHV1-69	IGKV4-1	142

[0494] nb=结合低于检测限

[0495] 表12.多抗体和相关抗体的聚集温度(T_{agg})。

[0496]

多抗体/抗体	T_{agg}[℃]
MB 298	73
MB 82	81
MB 46	69
MB 324	71
MB 236	71
MB 52	74
MB 80	85
IgG 298	74
IgG 82	75
IgG 46	75
IgG 324	70
IgG 236	70
IgG 52	73

IgG 80	81

[0497] 表13.RBD靶向多抗体对SARS-CoV-2的中和

多抗体	中位 IC_{50}
MB 178	1.7 μg/mL (0.74 nM)
IgG 178	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 108	0.37μg/mL (161 pM)
IgG 108	> 50 μg/mL (>333 nM)
MB 128	3.5 μg/mL (1.5 nM)
IgG 128	> 50 μg/mL (>333 nM)
MB 160	0.22 μg/mL (96 pM)
IgG 160	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 368	0.073 μg/mL (32 pM)
IgG 368	> 50 μg/mL (> 0333 nM)
MB 192	0.79 μg/mL (343 pM)
IgG 192	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 158	0.10 μg/mL (43 pM)
IgG 158	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 180	0.89 μg/mL (387 pM)
IgG 180	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 254	9.3 μg/mL (4.0 nM)
IgG 254	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 120	7.2 μg/mL (3.1 nM)
IgG 120	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 64	14 μg/mL (6.1 nM)
IgG 64	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 56	> 50 μg/mL (> 0.33 μM)
IgG 56	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 349	> 50 μg/mL (> 0.33 μM)
IgG 349	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 298	0.00011 μg/mL (0.048 pM)
IgG 298	0.28 μg/mL (1.9 nM)
MB 82	0.0022 μg/mL (0.95 pM)
IgG 82	1.6 μg/mL (11 nM)
MB 46	0.0024 μg/mL (1.0 pM)
IgG 46	2.1 μg/mL (14 nM)
MB 324	0.0009 μg/mL (0.39 pM)
IgG 324	0.78 μg/mL (5.2 nM)
MB 236	0.00047 μg/mL (0.20 pM)
IgG 236	0.057 μg/mL (0.38 nM)

[0498]

[0499]

MB 52	0.0002 μg/mL (0.087 pM)
IgG 52	0.61 μg/mL (4.1 nM)
MB 80	0.0013 μg/mL (0.56 pM)
IgG 80	0.1 μg/mL (0.67 nM)
参考 IgG (REGN 10933)	0.0044 μg/mL (29 pM)
参考 IgG (REGN 10987)	0.030 μg/mL (0.20 nM)

[0500] 回顾性地,测试了所有IgG和MB结合至SARS-CoV-2的刺突糖蛋白和RBD的能力(图9)。亲合力的增加产生更高的表观结合亲和力,并且没有可检测到的针对刺突糖蛋白的解离速率,这很可能是由于刺突间交联转化为高中和效力(图6b-d和图9)。总体来说,数据显示,即使从具有适度中和特征的mAb开始时,MB平台也能兼容超强效类IgG分子的快速递送。

[0501] 表位定位

[0502] 基于它们的中和效力,选择了七种mAb进行进一步表征:298(IGHV1-46/IGKV4-1)、82(IGHV1-46/IGKV1-39)、46(IGHV3-23/IGKV1-39)、324(IGHV1-69/IGKV1-39)、236(IGHV1-69/IGKV2-28)、52(IGHV1-69/IGKV1-39)和80(IGHV1-69/IGKV4-1)(图6b和表4)。表位分仓实验显示,这些mAb靶向RBD上的两个主要位点,这些仓中的一者与ACE2结合位点重叠(图10a和图11)。在约6-7 Å的全局分辨率下Fab-SARS-CoV-2 S复合物的Cryo-EM结构确认了mAb 324、298和80结合重叠的表位(图10b、图12a-c和表2)。为了深入了解靶向另一个仓的mAb的结合,我们获得了在4.0 Å的全局分辨率下Fab 46与RBD复合的cryo-EM结构(图10c、图12d和表2),以及在2.95 Å的分辨率下Fab 298和52与RBD的三元复合物的晶体结构(图10d、图2和表3)。

[0503] 晶体结构显示,Fab 298几乎只结合至RBD(残基438-506)的ACE2受体结合基序(RBM)。事实上,在参与结合Fab 298的16个RBD残基中,有12个也参与ACE2-RBD结合(图2a-c和表14)。RBM由Fab 298的重链和轻链残基的11个氢键稳定。另外,RBM Phe486与11个Fab 298残基接触,埋藏约170 $Å^2$(占RBD上总埋藏表面积的24%),并且因此对抗体-抗原相互作用至关重要(图2a和表14)。

[0504] RBD-52 Fab界面的详细分析揭示,mAb 52的表位向RBD的核心移位,所述RBD涵盖RBM的20个残基和核心结构域中的七个残基(图10c、图2b和表14)。与竞争数据一致,抗体52和抗体46共享类似的结合位点,但它们接近RBD的角度略有不同(图10c、d和图2d)。检查先前报道的RBD-抗体复合物的结构揭示,抗体46和52靶向SARS-CoV-2刺突上先前未描述过的易感位点(图10e)。这些抗体靶向的表位由呈S“闭合”构象的NTD部分遮挡,从而表明这类抗体的作用机制可能涉及刺突不稳定化。总之,这些数据证明,通过亲合力观察到的MB平台的中和效力增强与可以靶向RBD上的不同表位仓的mAb相关。

[0505] 表14.通过PISA鉴定的RBD-298和RBD-52接触残基

[0506]

RBD	残基	BSA ($Å^2$)	相互作用	Fab 298 (H-IIC、K-KC)
453	Tyr	2	vdW	H-Thr31, H-Ile100
455	Leu	20	vdW	H-Thr31, H-Ile100
456	Phe	30	vdW	H-Thr31, H-Tyr32
458	Lys	1	vdW	K-Ser27F
474	Gln	12	vdW	K-Tyr27D
	Gln^{NE2}		HB	$K\text{-}Tyr27D^{OH}$
475	Ala	45	vdW	K-Tyr27D, H-Tyr32, K-Tyr32, H-Arg97
	Ala^{O}		HB	$K\text{-}Tyr32^{OH}$
476	Gly	23	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr32, K-Tyr91, K-Tyr92, K-Ser93, H-Arg97
477	Ser	75	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr92, K-Ser93, K-Thr94
	Ser^{N}		HB	$K\text{-}Tyr92^{O}$
	Ser^{OG}		HB	$K\text{-}Tyr92^{O}$
478	Thr	41	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr92, K-Ser93, K-Thr94
	Thr^{OG1}		HB	$K\text{-}Thr94^{OG1}$
484	Glu	74	vdW	H-Trp50, H-Ser52, H-Ser54, H-Gly55, H-Gly56, H-Thr57, H-Asp58
	Glu^{OE2}		HB	$H\text{-}Ser54^{OG}$
485	Gly	28	vdW	H-Trp50, H-Thr57, H-Asp58
486	Phe	169	vdW	K-Gln89, K-Tyr91, K-Ser93, K-Thr94, K-Pro96, H-Ser35, H-Trp47, H-Trp50, H-Asp58, H-Asp95, H-Arg97
	Phe^{N}		HB	$H\text{-}Asp58^{OD2}$
	Phe^{O}		HB	$K\text{-}Thr94^{OG1}$
487	Asn	41	vdW	K-Tyr32, K-Tyr91, K-Ser93, K-Thr94, H-Asp95, H-Arg97
	Asn^{OD1}		HB	$H\text{-}Arg97^{NH2}$
	Asn^{ND2}		HB	$K\text{-}Tyr91^{O}$, $K\text{-}Tyr92^{O}$
488	Cys	1	vdW	H-Trp50

489	Tyr	84	vdW	H-Ser30, H-Thr31, H-Tyr32, H-Trp50, H-Asp95, H-Arg97,
	Tyr^{OH}		HB	$H\text{-}Arg97^{NH2}$, $H\text{-}Asp95^{OD2}$
493	Gln	45	vdW	H-Ser30, H-Thr31, H-Ile100
总 BSA ($Å^2$):		691		

[0507]

RBD	残基	BSA ($Å^2$)	相互作用	Fab 52 (H-HC, K-KC)
346	Arg	45	vdW	H-Gln64
351	Tyr	29	vdW	K-Phe94, H-Ile52, H-Thr56, H-Asn58
352	Ala	19	vdW	K-Gly93, K-Phe94
354	Asn	6	vdW	K-Phe94
355	Arg	36	vdW	K-Ser0, K-Gln27
	Arg^{O}		HB	$K\text{-}Ser0^{OG}$
356	Lys	13	vdW	K-Ser0
357	Arg	66	vdW	K-Ser0, K-Gln27
	Arg^{N}		HB	$K\text{-}Ser0^{OG}$
	Arg^{NH2}		HB	$K\text{-}Gln27^{OE1}$
449	Tyr	13	vdW	H-Phe554, H-Thr56
450	Asn	38	vdW	H-Phe554, H-Thr56
452	Leu	47	vdW	H-Ile52, H-Phe554, H-Gly55, H-Thr56
462	Lys	1	vdW	K-Ser30
465	Glu	28	vdW	K-Ser30, K-Asn31, K-Asn32, K-Asn92
	Glu^{OE2}		HB	$K\text{-}Ser30^{OG}$
466	Arg	70	vdW	K-Asn32, K-Asn92, K-93Gly, K-Phe94
	Arg^{O}		HB	$K\text{-}Asn32^{ND2}$
	Arg^{NH1}		HB	$K\text{-}Asn92^{O}$
467	Asp	12	vdW	K-Asn32, K-Asn92, H-Asp98
468	Ile	102	vdW	K-Asn32, K-Gly91, K-Asn92, K-93Gly, K-Phe94, K-Leu96, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
469	Ser	37	vdW	K-Asn32, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
	Ser^{OG}		HB	$H\text{-}Asp98^{OD1}$
470	Thr	67	vdW	H-Ser31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Ile52, H-Asp95, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98

	Thr^{OG1}		HB	H-$Gly97^{N}$
471	Glu	39	vdW	H-Tyr32, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
	Glu^{OE1}		SB	H-$Arg96^{NH2}$
	Glu^{OE2}		SB	H-$Arg96^{NH2}$
472	Ile	7	vdW	H-Ser31, H-Tyr32, H-Arg96
481	Asn	1	vdW	H-Tyr32
482	Gly	42	vdW	H-Ser31, H-Tyr32
	Gly^{O}		HB	H-$Tyr32^{OH}$
483	Val	12	vdW	H-Thr28, H-Ser31, H-Tyr32
484	Glu	53	vdW	H-Thr28, H-Phe29, H-Thr30, H-Ser31, H-Met54
490	Phe	87	vdW	H-Thr30, H-Ser31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Ile52, H-Met54, H-Phe554
492	Leu	13	vdW	H-Ile52, H-Met54, H-Phe554
493	Gln	8	vdW	H-Phe554
494	Ser	17	vdW	H-Phe554
总 BSA ($Å^2$):		904		

[0508]

Fab 298	残基链	BSA ($Å^2$)	相互作用	RBD
30	Ser-H	9	vdW	Tyr489, Gln493
31	Thr-H	68	vdW	Tyr453, Leu455, Phe456, Tyr489, Gln493
32	Tyr-H	57	vdW	Phe456, Ala475, Tyr489
35	Ser-H	8	vdW	Phe486
47	Trp-H	23	vdW	Phe486
50	Trp-H	79	vdW	Glu484, Gly485, Phe486, Cys488, Tyr489
52	Ser-H	8	vdW	Glu484
54	Ser-H	17	vdW	Glu484
	Ser^{OG}-H		HB	$Glu484^{OE2}$
55	Gly-H	7	vdW	Glu484
56	Gly-H	7	vdW	Glu484
57	Thr-H	10	vdW	Glu484, Gly485
58	Asp-H	28	vdW	Glu484, Gly485, Phe486

[0509]

	Asp^{OD2}-H		HB	$Phe486^{N}$
95	Asp-H	15	vdW	Phe486, Asn487, Tyr489
	Asp^{OD2}-H		HB	$Tyr489^{OH}$
97	Arg-H	61	vdW	Asn487, Tyr489
	Arg^{NH2}-H		HB	$Asn487^{OD1}$, $Tyr489^{OH}$
100	Ile-H	7	vdW	Tyr453, Leu455, Gln493
27D	Tyr-K	59	vdW	Gln474, Ala475, Gly476, Ser477, Thr478
	Tyr^{OH}-K		HB	$Gln474^{NE2}$
27F	Ser-K	1	vdW	Lys458
32	Tyr-K	28	vdW	Ala475, Gly476, Asn487
	Tyr^{OH}-K		HB	$Ala475^{O}$
89	Gln-K	1	vdW	Phe486
91	Tyr-K	30	vdW	Gly476, Phe486, Asn487
	Tyr^{O}-K		HB	$Asn487^{ND2}$
92	Tyr-K	40	vdW	Gly476, Ser477, Thr478
	Tyr^{O}-K		HB	$Asn487^{ND2}$
	Tyr^{O}-K		HB	$Ser477^{N}$, $Ser477^{OG}$
93	Ser-K	26	vdW	Gly476, Ser477, Thr478, Phe486, Ser487
94	Thr-K	57	vdW	Ser477, Thr478, Phe486, Asn487
	Thr^{OG1}-K		HB	$Thr478^{OG1}$, $Phe486^{O}$
96	Pro-K	23	vdW	Phe486
总 BSA ($Å^2$):			669	

Fab 52	残基链	BSA ($Å^2$)	相互作用	RBD
28	Thr-H	24	vdW	Val483, Glu484
30	Thr-H	3	vdW	Glu484, Phe490
31	Ser-H	66	vdW	Glu471, Gly482, Val483, Glu484, Phe490
32	Tyr-H	51	vdW	Thr470, Glu471, Ile472, Asn481, Gly482, Val483, Phe490
	Tyr^{OH}-H		HB	$Gly482^{O}$

[0510]

33	Gly-H	7	vdW	Thr470, Phe490
52	Ile-H	62	vdW	Tyr351, Leu452, Thr470, Phe490, Leu492
53	Met-H	38	vdW	Glu484, Phe490, Leu492
54	Phe-H	110	vdW	Tyr449, Asn450, Leu452, Phe490, Leu492, Gln493, Ser494
55	Gly-H	4	vdW	Leu452
56	Thr-H	57	vdW	Tyr351, Tyr449, Asn450, Leu452
58	Asn-H	10	vdW	Tyr351
64	Gln-H	43	vdW	Arg346
95	Asp-H	2	vdW	Thr470
96	Arg-H	64	vdW	Ile468, Ser469, Thr470, Glu471, Ile472
	Arg^{NH2}-H		SB	$Glu471^{OE1}$, $Glu471^{OE2}$
97	Gly-H	64	vdW	Ile468, Ser469, Thr470, Glu471
	Gly^{N}-H		HB	$Thr470^{OG1}$
98	Asp-H	28	vdW	Asp467, Ile468, Ser469, Thr470, Glu471
	Asp^{OD1}-H		HB	$Ser469^{OG}$
0	Ser-K	77	vdW	Arg355, Lys356, Arg357
	Ser^{OG}-K		HB	$Arg355^{O}$, $Arg357^{N}$
27	Gln-K	60	vdW	Arg355, Arg357
	Gln^{OE1}-K		HB	$Arg357^{NH2}$
30	Ser-K	28	vdW	Lys462, Glu465
	Ser^{OG}-K		HB	$Glu465^{OE2}$
32	Asn-K	19	vdW	Glu465, Arg466, Asp467, Ile468, Ser469
	Asn^{ND2}-K		HB	$Arg466^{O}$
91	Gly-K	18	vdW	Ile468
92	Asn-K	56	vdW	Glu465, Arg466, Asp467, Ile468
	Asn^{O}-K		HB	$Arg466^{NH1}$
93	Gly-K	22	vdW	Ala352, Arg466, Ile468
94	Phe-K	56	vdW	Tyr351, Ala352, Asn354, Arg466, Ile468
96	Leu-K	5	vdW	Ile468
总 BSA ($Å^2$):			974	

[0511] vdW:范德华相互作用(5.0 Å截止值)

[0512] HB:氢键(3.8 Å截止值)

[0513] SB:盐桥(4.0 Å截止值)

[0514] 多抗体克服刺突序列变异性

[0515] 为了探索MB是否可以经由增强的结合亲和力潜在地抵抗病毒逃逸,我们测试了四种天然存在的RBD突变[35]对七种最高效力的人类mAb的结合和中和的影响:L452R-位于抗体46和52(仓1)的表位内,A475V和V483A-位于ACE2结合位点(仓2)内),以及循环RBD变体N439K[36](图13a-c)。另外,还评估了将Asn234(N连接糖基化位点)突变为Gln的影响,这是因为先前有报道称,在这个位点处缺乏糖基化会降低对靶向RBD[35]的中和抗体的敏感性。传染性更强的PsV变体D614G[37]也被纳入组中。正如预期,突变L452R显著降低了mAb 52和46的结合和效力,而抗体298对突变A475V敏感(图13b、c)。在位置Asn234处N连接聚糖的缺失会增

加对大多数抗体,尤其mAb 46、80和324的病毒抗性,从而强调了聚糖在病毒抗原性方面的重要性(图13c)。令人惊讶的是,MB形式中的以下抗体特异性在其极佳的中和效力方面受到任何S突变的影响最小:298、80、324和236(图13d)。突变L452R降低了46-MB和52-MB的敏感性,但与它们的亲本IgG形成对比,它们仍然对这种PsV变体具有中和作用(图13d)。传染性更强的SARS-CoV-2 PsV变体D614G的中和效力类似于WT PsV对IgG和MB两者的中和效力(图13c和图14a)。

[0516] 由三种单特异性MB组成的MB混合物在所有PsV变体中实现泛中和,而效力没有显著损失,并且因此与相应的IgG混合液相比,效力提高100-1000倍(图13e和图14c、d)。为了在单个分子内实现广度,我们接下来通过在同一MB组装中组合展示三个不同Fab的多聚化亚基来生成三特异性MB(图14b)。值得注意的是,所得三特异性MB展现泛中和,同时保留单特异性型式(包括针对B.1.351PsV变体)的极佳中和效力(图13e、f和图14c、d)。对于298-324-46组合观察到最高效力(图14c、e),其中三特异性MB达成极佳效力,超过了迄今为止所报道的以及我们从可用序列重组生成的一些最强效IgG所观察到的效力(图13g)。另外,MB形式能够将这些先前报道的高效IgG对抗PsV和活体复制SARS-CoV-2病毒的效力进一步提高一至两个数量级(图13h),由此突显了MB的即插即用形式和多价性增强各种效力的mAb的中和能力的能力。

[0517] 对于中和的中位IC_{50}确定的值汇总于表13和表15中。

[0518] 表15.多抗体的SARS-CoV-2中和

[0519]

多抗体	中位IC_{50}
VHH-hFerr	0.00011μg/mL(0.13pM)
VHH-Fc	1.3μg/mL(16nM)
BD23MB	0.008μg/mL(3.5pM)
BD23IgG	13μg/mL(87nM)
4A8 MB	0.052μg/mL(23pM)
4A8 IgG	>100μg/mL(>0.66μM)

[0520] 讨论

[0521] 在本研究中,我们揭示了可以如何利用结合亲合力作为一种有效的机制来推进抗体的中和效力和对病毒突变的抗性。为此,我们使用了蛋白质工程改造来开发提高靶向SARS-CoV-2的mAb的亲合力的即插即用抗体多聚化平台。七种最强效的MB对SARS-CoV-2 PsV的IC_{50}值为0.2至2ng/mL(9×10^{-14}至9×10^{-13}M),并且因此据我们所知,它们是迄今为止报道的针对SARS-CoV-2的最强效类抗体分子。

[0522] MB平台被设计为包括从可开发性角度来说关键的有利属性。首先,增强抗体效力的能力与抗体序列、形式或靶向的表位无关。所述平台的模块化和灵活性由增强VHH和多个Fab的效力所例示,这些Fab靶向两个SARS-CoV-2 S子域(RBD和NTD)上的非重叠区域。使用MB来增强VHH结构域的效力可以为这类分子提供特殊的价值,因为其小尺寸允许高效的多聚化。其次,与通过单链可变片段[38,39]的串联融合来增强亲合力的其它方法形成对比,MB不会受到低稳定性的影响,并且事实上自组装成高度稳定的粒子,这些粒子的聚集温度类似于其亲本IgG。第三,诸如链霉抗生物素蛋白[40]、维罗毒素B亚基支架[41]或类病毒纳米粒子[42]等替代性多聚化策略,由于缺乏Fc片段并且因此无法进行FcRn介导的再循环,而面临免疫原

性挑战和/或较差生物利用度。脱铁铁蛋白的轻链是完全人类的、生物学上无活性的,已被工程改造为包括Fc结构域,并且尽管>24个Fab/Fc片段多聚化,但其Rh类似于IgM。因此,替代性小鼠MB不会在小鼠体内引发抗药抗体,并且在一周内可在血清中检测到类似于其亲本IgG的抗体。然而,MB的体内生物利用度取决于其与Fc γR的结合亲和力,这表明需要仔细微调Fc亲合力以将MB有效转化为临床。另外,将需要进一步研究来评价MB在所关注的解剖部位如何分布(诸如在SARS-CoV-2感染情况下的肺部)。如果生物利用度是唯一需要的特性而缺乏效应功能,则多抗体的即插即用性质本身也有助于探索除Fc之外的替代半衰期延长部分,例如,人血清白蛋白[43],或结合人血清白蛋白的结合部分[44,45]。

[0523] 对于在MB上测试的针对SARS-CoV-2的不同mAb序列,观察到中和效力的不同增加。这表明MB增强效力的能力可能取决于刺突上的表位位置或Fab与抗原啮合以达成中和的几何形状。事实上,MB平台未能挽救20种SARS-CoV-2 RBD结合剂中的两者的中和,这表明仅基于mAb序列和结合特性存在局限性。尽管如此,MB能够将亲合力转化为针对SARS-CoV-2刺突上的一系列表位特异性的中和效力,这突显了广泛使用这种技术的潜力。探索MB平台对表面刺突密度较低的病毒(如HIV-1[46])或对肿瘤坏死因子受体超家族等其它靶标的效力增强能力将引人关注,因为传统抗体的二价性限制了它们的有效激活[47]。

[0524] 病毒逃逸可能是由于治疗或在自然选择期间的选择压力而发生。对抗逃逸突变体的传统方法是使用靶向不同表位的抗体混合液。与它们的亲本IgG相比,MB对S突变的敏感性较低,大概是因为亲和力的损失由增强的结合亲合力所补偿。因此,当在混合液中使用时,MB以极佳的效力克服了病毒序列变异性。另外,分裂MB设计允许在单个多聚化分子内组合多种抗体特异性,从而产生类似于MB混合液的效力和广度。重要的是,可以逃避数种mAb[21,22,23]的中和的所关注的B.1.351变体由三特异性多抗体高效中和,由此进一步突显了这些分子抵抗病毒逃逸的能力。同一粒子内的多特异性可以提供额外的优势,诸如S内亲合力和mAb正确组合的协同作用,从而为进一步研究MB上的不同mAb特异性组合奠定基础。还可以利用亲合力和多特异性来递送跨越病毒属有效中和的单个分子。

[0525] 总体来说,MB平台提供了一种超越抗体亲和力限制并生成广泛而有效的中和分子的工具,同时避开了大量的抗体发现或工程改造工作。这个平台是可以如何利用结合亲合力来加速发现针对具有全球卫生重要性的传染病的最有效生物剂的时间线的一个实例。

[0526] 实施例2

[0527] 概要

[0528] SARS-CoV-2是COVID-19的病原体,已造成全球大流行。单克隆抗体已用作抗病毒治疗剂,但由于新出现的所关注变体(VOC)中的病毒序列变异性以及在部署时需要高剂量而导致其功效受到限制。在本研究中,我们利用了来源于人脱铁铁蛋白原聚体的多特异性、多亲和力抗体(多抗体,MB)平台来驱动抗体片段的多聚化并生成极强效和广泛的SARS-CoV-2中和剂。CryoEM在2.1 Å分辨率下揭示了这些工程改造的类抗体分子的核心的高度同质性。我们证明,MB相对于相应IgG的中和效力改善转化为优越的体内保护:在SARS-CoV-2小鼠攻击模型中,与相应IgG相比,以低30倍剂量递送的MB达成了相当的体内保护。此外,我们显示了MB如何利用增强的亲合力来强效中和SARS-CoV-2VOC,即使相应的IgG失去强效中和的能力。我们的工作证明了如何利用组合的亲合力和多特异性来赋予超过传统单克隆抗体疗法的保护和对病毒多样性的恢复力。

[0529] 简介

[0530] 包括诸如SARS-CoV-2等病毒在内的新出现的传染源由于人群缺乏预先存在的免疫力,而对全球公共卫生构成了巨大挑战。尽管针对SARS-CoV-2疾病(COVID-19)的疫苗可用,但全球疫苗覆盖率仍然很低,低收入国家中只有19.9%的人口已接受至少一剂。疫苗介导的保护作用相对较短以及新的病毒变体出现,进一步突显了有效预防和治疗选项的必要性。单克隆抗体(mAb)已有效治疗包括呼吸道合胞病毒(RSV)和埃博拉病毒的传染病,是一个有前景的选项。一些mAb,包括一起递送的巴尼韦单抗和埃特司韦单抗(Etesevimab),以及卡瑞维单抗(Casirivimab)和伊德维单抗(Imdevimab)的REGEN-COV混合液,已获美国食品和药物管理局(FDA)授权用于治疗COVID-19,但仍难以克服病毒多样性,并且受到高剂量和静脉内施用要求的限制。在Omicron BA.1VOC出现后,对两种组合的授权均被撤销,所述VOC在刺突结构域内具有37个突变并且在受体结合结构域(RBD)内具有15个突变,所述受体结合结构域(RBD)是大多数针对SARS-CoV-2的临床抗体的靶标。迄今为止,只有一种mAb,贝特洛韦单抗(Bebtelovimab),对循环Omicron亚变体保留足够的体外活性并获FDA授权用于对抗SARS-CoV-2。授权也已更新,以允许增加替沙格韦单抗(Tixagevimab)和西加韦单抗(Cilgavimab)的混合液的剂量,预期所述混合液尽管在原始剂量下效力有损失,但仍维持对亚变体的活性。尽管授权有限,但已鉴定了许多靶向SARS-CoV-2刺突表位的额外抗体。然而,mAb广度的此类增加通常与效力的降低相关,从而突显了鉴定组合效力和广度的治疗剂的必要性。

[0531] 增加抗体价数是一种有前途的方法,以增强表观结合亲和力,潜在地降低治疗剂量,提高广度,并且允许通过诸如皮下或肌内递送等替代途径进行施用。为了利用亲合力来增强抗体的功能反应,已描述了多种抗体工程改造策略。其中,与传统的mAb形式相比,基于IgM、合成纳米笼和微型结合剂(Minibinder)形式组装的生物剂已展示对SARS-CoV-2优越的中和特性。另外,亲合分子GEN3009、INBRX-106(Inhibrx)和IGM-8444正在I/II期临床试验中进行治疗血液肿瘤和实体肿瘤的测试,从而突显了多价抗体呈递形式的临床益处。按照类似的原理,但使用人类轻链脱铁铁蛋白原聚体来驱动抗体片段的寡聚化,我们开发了一个名为多抗体(MB)的平台,以增加靶向SARS-CoV-2和HIV-1的抗体的中和效力。使用这个平台,增强的亲和力可以与多特异性相结合-包括数个识别不同表位的抗体片段-从而产生更能抵抗病毒突变的抗原识别。鉴于免疫压力导致SARS-CoV-2新变体不断出现,包括现有疫苗和药物不太有效的那些变体,这点尤其重要。

[0532] 在此,我们探索了多抗体增强的体外SARS-CoV-2中和作用是否可以转化为低剂量下的体内保护。另外,我们评估了MB是否可以挽救传统的mAb针对不同所关注变体(VOC)的中和效力损失。我们的数据提供了概念证明,即MB是一个易处理的平台,所述平台利用亲合力来提高针对SARS-CoV-2的基于抗体的分子的体外和体内效力和广度。

[0533] 方法

[0534] 生物层干涉法

[0535] 使用Octet RED96 BLI系统(Sartorius ForteBio)在25℃下于PBS pH 7.4、0.01% BSA和0.002% Tween中进行直接结合动力学测量。将His标记的RBD或SARS-CoV-2刺突蛋白加载至Ni-NTA(NTA)生物传感器(Sartorius ForteBio)上,以达到0.8nm的BLI信号响应。通过将加载的生物传感器转移至含有2倍稀释系列(从250至16nM(Fab)、125至4nM

(IgG)以及16至0.5nM(MB))的孔中来测量缔合速率。通过将生物传感器浸入含有缓冲液的孔中来测量解离速率。这两个步骤中每一者的持续时间为180秒。通过测量与hFcγRI和hFcRn的结合来评估分裂多抗体设计中的Fc表征。为了探究多抗体进行内体再循环的理论能力,在生理pH(7.5)和内体pH(5.6)下测量了与hFcRnβ2-微球蛋白复合物的结合。在一些情况下,多抗体与hFcRnβ2-微球蛋白复合物的缔合在pH5.6下完成,并且解离在pH 7.4下完成。在两步结合过程中进行竞争测定。首先将预加载有His标记的RBD的Ni-NTA生物传感器浸入含有50μg/mL一级抗体的孔中,持续180秒。30秒的基线期后,将传感器浸入含有50μg/ml二级抗体的孔中,再持续300秒。

[0536] 病毒产生和假病毒中和测定

[0537] 使用稍作修改的如先前所描述的基于HIV的慢病毒系统生成SARS-CoV-2假型病毒(PsV)。简单来说,将293T细胞与编码荧光素酶报告基因的慢病毒骨架(BEI NR52516)、表达刺突的质粒(BEI NR52310)以及编码HIV结构和调控蛋白Tat(BEI NR52518)、Gag-pol(BEI NR52517)和Rev(BEI NR52519)的质粒共转染。在37℃下转染后24小时,向培养基中添加5mM丁酸钠,并且将细胞在30℃下再孵育24-30小时。SARS-CoV-2刺突突变体D614G由D.R.Burton(斯克里普斯研究所)友情提供,并且使用KOD-Plus诱变试剂盒(Toyobo,Osaka,Japan)生成其余的PsV突变体。所关注的SARS-CoV-2刺突变体B.1.117、B.1.351、P.1和B.1.617.2由David Ho(Columbia)友情提供。使用293T-ACE2细胞(BEI NR52511)和HeLa-ACE2细胞(由D.R.Burton友情提供;斯克里普斯研究所)在单循环中和测定中确定中和作用。通过向细胞中添加Britelite plus试剂(PerkinElmer)并且使用Synergy Neo2多功能测定微孔板读取器(Biotek Instruments)测量相对光单位(RLU)的发光来监测PsV中和。IC_{50}倍数增加计算如下:IgG_{IC50}(μg/mL)/MB_{IC50}(μg/mL)。进行两次至三次生物学重复,各有两次技术重复。

[0538] 真病毒中和测定

[0539] 将VeroE6细胞在补充有100U青霉素、100U链霉素和10% FBS的DMEM中以30,000/孔的浓度接种于96F板中。使细胞粘附于板上并静置过夜。24小时后,一式四份(25uL/孔)在96R板中于补充有100U青霉素和100U链霉素的DMEM中制备IgG和MB样品的5倍连续稀释液。将25uL SARS-CoV-2/SB2-P4-PB克隆体1以100TCID/孔添加至每孔中,并且在37℃下孵育1小时,每15分钟振荡一次。共培养后,从VeroE6板中移出培养基,并且使用50uL抗体-病毒样品以在37℃、5% CO_2下一式四份接种VeroE6细胞1小时,每15分钟振荡一次。接种1小时后,移出接种物,并且将200uL补充有100U青霉素、100U链霉素和2% FBS的新鲜DMEM添加至每孔中。将板进一步孵育3天。监测细胞病变效应(CPE),并且使用PRISM计算IC_{50}值。进行三次生物学重复,各有四次技术重复。

[0540] 抗体依赖性细胞介导的吞噬作用测定

[0541] 通过将SARS-CoV-2刺突涂覆的荧光珠粒与稀释的MB或IgG制剂在37℃+5% CO_2下孵育2小时(10μL珠粒和10μL 1mg/mL抗体样品)来形成免疫复合物。将THP-1细胞(ATCC,TIB-202)维持在少于5×10^5个细胞/mL,并且在37℃+5% CO_2下将200μL中的5×10^4个细胞/孔添加至免疫复合物中持续1小时。根据所提供的方案,洗涤细胞并且用活/死可固定紫色染料(Invitrogen,L34995)染色,随后在室温下洗涤并且用1% PFA固定20分钟。用FACS缓冲液(PBS+10% FBS,0.5mM EDTA)洗涤固定的细胞,并且在LSRII流式细胞仪(BD

Biosciences)上收集。在FlowJo(BD Biosciences,Ashland,OR)中分析数据,并且将吞噬作用定量为已吞噬红色荧光SARS-CoV-2刺突珠粒的活THP-1细胞的百分比。

[0542] SARS-CoV-2攻击研究

[0543] 6-8周龄雌性hFcRn/hACE2双转基因小鼠购自杰克逊实验室(Jackson laboratories)(库存编号034902)。所有程序都经过多伦多大学当地动物护理委员会批准。取决于实验情况,在感染前一天通过腹膜内(i.p.)注射施用三特异性298-80-52(T10)MB或PGDM1400阴性对照IgG,总计6-60μg MB或60-180μg IgG。24小时后,用SARS-CoV-2/SB2-P4-PB克隆体1以1×10^{4}-1×10^{5}PFU/小鼠的剂量对小鼠进行感染。每天监测小鼠的体重,直至感染后12天。在终点时,即描述为小鼠因体重减轻>20%而被处死或存活至第12天的时间,收获肺脏以进行肺病毒滴度分析和MB/IgG定量。图19中表示的数据是n=2-6个独立实验的累积结果,而图21和图22中表示的数据代表n=1个实验。

[0544] 终点时肺中病毒滴度和MB/IgG的定量

[0545] 在终点时从小鼠收获肺脏,称重,然后在1mL不完全DMEM中均质化。将样品旋转离心,并且收集上清液并冷冻直至进行样品分析。为了定量肺病毒滴度,将样品以1:10的连续稀释度添加至VeroE6细胞中并且在37℃下感染1小时。感染后,去除上清液,并且用100μL新鲜培养基补充细胞并孵育5天。监测细胞病变效应(CPE),并且使用PRISM计算ID_{50}值。各进行三次技术重复。为了定量肺中的MB/IgG水平,将96孔Pierce镍包覆板(Thermo Fisher)涂覆50μL 0.5μg/ml His_{6x}标记的RBD抗原或His_{6x}标记的BG505,以分别确定T10 MB和PGDM1400 IgG水平。使用HRP-蛋白A(Invitrogen)作为二级分子,并且使用Synergy Neo2多模式分析微孔板读取器(Biotek Instruments)对化学发光信号进行定量。

[0546] 激发后D2时肺中T10 MB的定量

[0547] 如先前所描述,对感染后D2时肺中的T10 MB水平的定量进行了SARS-CoV-2攻击研究,其中n=3只小鼠/组。简单来说,将96孔Pierce镍包覆板(Thermo Fisher)涂覆50μL 0.5μg/ml His_{6x}标记的RBD抗原。使用抗人类Fab IgG(Jackson ImmunoResearch)作为二级分子,并且使用Synergy Neo2多模式分析微孔板读取器(Biotek Instruments)对化学发光信号进行定量。

[0548] CryoEM数据收集和图像处理

[0549] 将三特异性MB(298-52-80)样品浓缩至2.0mg/mL,并且将3.0μl样品沉积于自制的多孔金网格上,使用前在空气中辉光放电15秒。将样品点渍3.0秒,随后使用Leica EM GP2自动插入式冷冻机于液态乙烷中速冻(维持于4℃和100%湿度下)。在300kV下操作并配有通过EPU软件自动化的Falcon 4i相机的Thermo Fisher Scientific Titan Krios G3上进行数据收集。数据收集所使用的标称放大率为75,000×并且离焦范围在0.5μm与2.0μm之间。收集8.3秒的曝光量作为30帧的影片,相机曝光率约为每秒每像素6.3e^{-},并且总曝光量为49.6个电子/$Å^{2}$。共获得4,385个原始影片。

[0550] 在cryoSPARC v3中进行图像处理。使用基于分块的算法进行初始样本运动校正、曝光加权和CTF参数估计。基于CTF拟合分辨率对显微照片进行分选,并且只有拟合度优于5.0 Å的显微照片才被接受用于进一步处理。通过手动挑选来创建基于模板的挑选的模板,从而选择955,995个粒子图像。经由数轮2D分类对粒子图像进行分选,从而选择358,036个粒子图像。从头计算获得了初步3D模型,而没有应用对称性。为了进一步选择最高质量的粒

子图像,从显微照片中再提取151,443个CTF拟合分辨率优于3.0 Å的粒子图像,并且进行非均匀细化[75]而没有应用对称性,从而得到三特异性MB的2.4 Å分辨率图。从显微照片中提取65,478个CTF拟合分辨率优于2.7 Å的粒子图像,并且应用八面体对称性进行非均匀细化,从而得到2.1 Å分辨率图。通过每组CTF参数的散焦细化和优化进行非均匀细化。通过拟合人脱铁铁蛋白轻链(PDB ID:2FFX)的结构,将像素大小校准为每像素1.04 Å。

[0551] 为了获得三特异性MB表面上的Fab和Fc分子的3D重建,进行了手动挑选,并且创建了基于模板的挑选的模板,从而选择6,692,141个粒子图像。经由数轮2D分类对粒子图像进行分选,从而选择668,214个粒子图像。从头计算获得了初步3D图,而没有应用对称性。经由数轮异质细化对数据集进行进一步清理,并且得到73,163个Fab粒子图像和13,328个Fc粒子图像。使用自定义软掩模的局部细化工作获得Fab的6.7 Å分辨率和Fc的7.1 Å分辨率下的最终cryoEM图。

[0552] 为了评估所获图的质量,使用UCSF Chimera[79]将人脱铁铁蛋白轻链(PDB ID:6WX6)、人类IgG1 Fc(PDB ID:6CJX)[78]和Fab 298(PDB ID:7K9Z)的模型手动对接于cryoEM图中。用Pymol、UCSF Chimera和UCSF ChimeraX制作图形。

[0553] 结晶和结构确定

[0554] 通过以2:1的摩尔比混合Fab:RBD,获得纯化的80 Fab-RBD的二元复合物。在4℃下孵育30分钟后,通过尺寸排阻色谱(Superdex 200 Increase尺寸排阻柱;GE Healthcare,Chicago,IL)于20mM Tris pH 8.0、150mM NaCl缓冲液中纯化复合物。然后将所关注的级分浓缩至10mg/mL,并且使用沉滴蒸气扩散法和JCSG Top 96筛选以1:1的蛋白质:储层比率来设置结晶试验。在含有0.2M酒石酸二铵和20%(w/v)PEG 3350的条件下,第70天出现晶体。将晶体在10%(v/v)乙二醇中冷冻保护,并且在液氮中快速冷冻。在阿贡国家实验室先进光子源的23-ID-D光束线上收集X射线衍射数据。使用XDS和XPREP处理数据集。使用Phaser以ABodyBuilder预测的80 Fab和SARS-CoV-2RBD(PDB ID:7LM8)作为搜索模型来确定相位。使用Phenix Refine进行迭代细化,并且在Coot中完成手动构建。通过SBGrid访问所有软件。

[0555] 结果

[0556] mAb 52中序列责任的鉴定

[0557] 对主要VH/VL序列的计算机模拟分析在mAb52的CDRL3中的位置N92处鉴定了脱酰胺位点。mAb中的脱酰胺位点可能会导致结合动力学的变化和药物产品的异质性。为了避免这种潜在影响,我们生成了天冬酰胺残基突变为苏氨酸(N92T)的变体。图15显示,在WT假病毒中和测定中,这种突变对IgG或单特异性MB两者的效力没有任何影响。随后在P.1PsV中和测定中筛选了mAb 52的VL中含有N92T突变的298-80-52三特异性MB,并且结果确认了与亲本三特异性MB相比,没有观察到效力损失(图16)。

[0558] 所关注变体中T10 MB的中和作用

[0559] 在假病毒和真实病毒中和测定中,评估了T10 MB对WT SARS-CoV-2和所关注变体(VOC)的效力。如表16和图17中所示,与相应的IgG混合液相比,T10 MB对WT SARS-CoV-2所展现的效力提高>1000倍,并且在α、β、γ、δ和o(BA.1)PsV中保留活性。在真病毒中和测定中进一步评价T10 MB的广度和效力,所述测定确认了T10 MB在所测试的VOC中具有极强效的

性质(图18)。综合起来,PsV和真病毒中和测定突显了三特异性T10 MB以极佳的效力克服SARS-CoV-2病毒逃逸的能力。

[0560] 表16.

[0561]

PsV	T10 MB	IgG混合液	T10 MB	IgG混合液
	IC50 (ug/ml)		IC50 (pM)	
WT	1.57E-04	1.72E-01	7.14E-02	1.15E+03
α	1.75E-04	7.41E-02	7.60E-02	4.94E+02
β	1.66E-04	6.37E-01	7.20E-02	4.25E+03
γ	2.35E-04	7.89E-02	1.00E-01	5.26E+02
δ	1.00E-04	1.91E-02	4.30E-02	1.28E+02
o (BA.1)	9.86E-03	8.83E-01	4.20E+00	5.89E+03

[0562] 在SARS-CoV-2攻击研究中使用T10 MB进行的体内保护

[0563] 在PsV中鉴定超强效的T10 MB并且进行真病毒中和测定后,我们在使用hFcRn/hACE2双转基因小鼠的SARS-CoV-2攻击研究中探索了这种MB提供保护的能力。如下文所讨论的T10 MB命名在表17中列出。

[0564] 表17.T10多抗体命名

[0565]

MB	SARS-CoV-2 结合 Fab 片段	Fc
T10.A MB (也称为 T10 MB* 或三特异性 MB*)	三特异性: 298-80-52	IgG4 (S228P、F234A、L235A、G237A 和 P238S)
T10.B MB	三特异性: 298-80-52	IgG4 (S228P、F234A 和 L235A)
T10.G MB	三特异性: 298-80-52	IgG4 (F234A、L235A、G237A 和 P238S)

[0566] 为了具体评估中和效力对体内防御致命性SARS-CoV-2攻击的影响,生成了T10 MB和相应的IgG混合液,其中IgG4 Fc含有突变,以消除与Fc γ 受体(S228P、F234A、L235A、G237A、P238S)的结合,在下文中分别称为MB*(或T10.A MB)和IgG4*。正如预期,将Fc亚型从IgG1替换为IgG4*不会影响IgG或MB的中和效力,并且如先前所报道。与相应的混合液IgG相比,三特异性MB*所展现的效力增加>1000倍(图19a)。结合动力学研究揭示,三特异性MB*和IgG4*抗体混合液均展现与小鼠和人类FcRn的pH依赖性结合,并且不与人类和小鼠Fc γ 受体结合(图19b-c)。这与相应的IgG1抗体混合液对照中观察到的Fc γ R结合形成对比(图19c)。使用SARS-CoV-2刺突蛋白涂覆的荧光标记珠粒进行的抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)实验进一步确认了三特异性MB*和IgG4*混合液无法与Fc受体啮合,而IgG1抗体混合液显示对SARS-CoV-2刺突涂覆的珠粒的大量吸收(图19d)。

[0567] 为了评估MB所达成的中和效力增加是否引起针对SARS-CoV-2的体内保护的改善,在感染前一天,用30μg(1.5mg/kg)Fc γ R结合缺陷型IgG4*和MB*分子治疗hACE2和hFcRn双转基因小鼠,并且用高剂量(1×10^5TCID50)的SARS-CoV-2进行鼻内攻击。与所有混合液接受动物都在D6-7时因攻击而死亡的IgG4*混合液相比,三特异性MB*提供了显著更好的保护(60%存活率)(图19e)。改善的保护作用与显著较低的肺病毒滴度相关,特别是在攻击后存

活的动物中(空心圆,图19f)。在后续研究中发现,当以3μg(0.15mg/kg)递送三特异性MB*并且以90mg(4.5mg/kg)递送IgG4*混合液时,达成了相当的体内保护作用(图19g)。可以在攻击后D2时施用的分子的循环血清浓度中观察到剂量差异(图19h)。这个数据不仅首次提供了体内防御MB介导的致命性攻击的证据,而且说明了与相应的IgG混合物相比,三特异性MB*形式赋予的增加的中和效力提供了增强的针对SARS-CoV-2攻击的保护。在一个特定实验中,还评价了肺中的MB和IgG滴度,并且在终点时在肺中检测到三特异性MB*,从而突显MB进入肺中的能力(图19i)。

[0568] IgG4 MB变体的生成

[0569] 为了向MB赋予一系列推定的体内效应功能特性,使用三组突变生成了基于IgG4的变体,其与人类Fcγ R具有一系列结合型态。第1组使用了S228P、F234A和L235A突变(T10.B MB);第2组使用了F234A、L235A、G237A和P238S突变(T10.G MB);并且第3组使用了S228P、F234A、L235A、G237A和P238S突变(T10.A MB)。图20a显示了这些MB与hFcRn、hFcγRI、hFcγRIIa和hFcγRIIb的结合型态。虽然这些MB变体与hFcRn的结合基本上不变,但与Fcγ R的结合观察到显著差异。T10.A与所测试的任何Fcγ R都未检测到结合,并且T10.G即使在最高测试浓度下也显示可忽略不计的结合。令人感兴趣的是,去除T10.A MB中的G237A和P238S突变以生成T10.BMB恢复了对所有三种测试的hFcγ R的结合。对于食蟹猴FcRn和Fcγ RI,观察到T10.A、T10.B和T10.G与人类FcRn和Fcγ RI结合的类似趋势(图20b)。然而,与观察到的对人类和食蟹猴Fcγ RI的结合模式形成对比,T10.A、T10.B和T10.G都未显示可检测到的与小鼠Fcγ RI的结合(图20c)。

[0570] 在SARS-CoV-2攻击研究中使用T10.B和T10.G MB进行的体内保护

[0571] 在生成T10.B和T10.G MB之后,探索了这些MB在SARS-CoV-2攻击研究中提供保护的能力。用总共60μg的T10.B MB、T10.G MB或阴性对照IgG治疗hACE2/hFcRn转基因小鼠(n=8只小鼠/组),并且用5×10^4PFU/小鼠的SARS-CoV-2进行鼻内攻击。本研究的结果显示,与截至d7时所有小鼠都死亡的阴性IgG对照相比,T10.B和T10.G MB两者均能够在d12时达到75%存活率(图21a)。体内保护作用伴随有整个实验过程中存活小鼠的体重损失的减少(图21b),以及在d12时存活小鼠的测定检测限下肺病毒滴度的降低(图21c)。

[0572] 随后对T10.G MB在hFcRn转基因纯合型hACE2/hFcRn双转基因小鼠(JAX编号037043)中提供保护的能力进行测试。在本研究中,用30μg(1.5mg/kg)T10.G MB或阴性对照IgG治疗小鼠(n=4/组),随后用1×10^4PFU/小鼠的SARS-CoV-2进行鼻内攻击。本研究的结果显示,与截至d8时所有小鼠都因感染而死亡的阴性IgG对照组相比,T10.G MB能够提供75%的保护(图22a)。体内保护伴随有整个实验过程中存活小鼠的体重损失的减少(图22b)。

[0573] T10.B MB在非人类灵长类动物(NHP)中的药代动力学评价

[0574] 为了确定NHP中的MB暴露量,以1.5mg/kg向雄性和雌性食蟹猴(每组n=3)皮下施用T10.B MB。图23显示,T10.B MB达到预期最大血清浓度(Cmax)并且在给药后数周内在循环中可检测到。

[0575] 以原子分辨率定义的三特异性298-52-80多抗体的组装

[0576] 我们先前已报道了使用工程改造的脱铁铁蛋白分裂设计生成三特异性MB分子(图24A),借以人脱铁铁蛋白原聚体基于其四螺旋束折叠分成两半:两个N端α螺旋(N-Ferr)和

两个C端α螺旋(C-Ferr)。对每个脱铁铁蛋白半部分和完整脱铁铁蛋白的N端的单链(sc)Fab或scFc进行基因融合并转染至哺乳动物细胞表达系统中会引起具有超强效中和能力的自组装寡聚分子的分泌。具体来说,与相应的IgG混合液相比,合并抗体特异性298、52和80的三特异性MB使中和效力增加约1000倍。这种三特异性MB被描述为具有类抗体的生物化学特性,如在纯化后和加速热应力下的生物物理表征中所评估。为了获得对多抗体设计组装的分子见解,我们接下来通过低温电子显微镜检查(cryoEM)来表征这种三特异性MB(图25)。

[0577] 对cryoEM显微照片的分析揭示了形成高度装饰和均匀的类纳米笼粒子(图24B)。与将scFab和scFc组分连接至脱铁铁蛋白支架的柔性$(GGS)_x$接头的存在一致,这些抗体片段的密度在2D类别中难以分辨(图24C),以及三特异性MB的3D重建(图24D)。然而,手动挑选scFab和scFc粒子,接着进行基于模板的粒子挑选,随后对这些分子进行细化,确认了Fab和Fc组分在MB上正确组装至约7 Å分辨率(图24B-D、图25和图26)。

[0578] 当不应用对称性(C1;图24D、图27A-D)或应用八面体对称性(O;图27E-H)时,MB的脱铁铁蛋白支架的3D重建分别达到2.4 Å和2.1 Å分辨率。三特异性MB中的脱铁铁蛋白支架与人脱铁铁蛋白轻链(PDB ID:6WX6)几乎相同,在图之间所测量的互相关(cc)系数为0.97(C1)和0.92(O)。核心MB支架的N端和C端与天然人脱铁铁蛋白轻链类似地安置于3重和4重对称轴上(图24D),从而指示scFab和scFc基因融合的影响最小。此外,cryoEM图显示,在分裂设计位点(残基Trp93与Gly94之间;图24D,右下图)的结构元素没有偏离脱铁铁蛋白折叠的证据。总之,我们对三特异性298-52-80 MB的cryoEM分析提供了原子级细节,从而证明建立在脱铁铁蛋白分裂设计支架上的MB采用其预期的结构配置。

[0579] Fab 80与SARS-CoV-2 RBD结合的分子基础

[0580] 接下来,我们试图了解mAb 80结合的分子基础,因为它的结构仍然难以捉摸。threshold我们以3.1 Å分辨率解析了80 Fab与RBD复合的晶体结构(图28)。表位识别由与RBD形成界面的20个残基介导,其中14个参与ACE2结合(表18)。这说明了mAb 80如何通过受体阻断来抑制SARS-CoV-2感染,从而阻止ACE2与受体结合基序的相互作用(图29A)。mAb 80的重链主要负责与RBD的相互作用,贡献了结合界面中发现的十一个氢键中的十个(图30A-B,表18)。另外,抗体重链的F54与RBD的Y489相互作用使得在RBD结构内在残基Y473、F456和Y421之间形成新的三重π-堆积(图30C)。

[0581] 表18.通过PISA鉴定的Fab80-RBD接触残基。

[0582]

RBD	残基	相互作用	BSA ($Å^2$)	Fab 80 (B-HC、C-KC)
417	Lys	vdW	25	B-Ile53
421	Tyr	vdW	18	B-Arg31
455	Leu	vdW	49	B-Ile53、Phe54
456	Phe	vdW	94	B-Phe54、Pro100

[0583]

473	Tyr^{OH}	HB	35	B-$Leu99^{O}$
	Tyr	vdW		Pro100
475	Ala^{O}	HB	60	B-$VAL100C^{N}$
	Ala	vdW		B-Glu100A
476	Gly	vdW	18	B-Val100B
477	Ser^{N}	HB	107	B-$Asp100D^{OD1}$
	Ser^{OG}	HB		B-$Asp100D^{OD1}$
	Ser^{OG}	HB		B-$Asp100D^{OD2}$
	Ser	vdW		B-Val100B、C-Tyr32
478	Thr^{OG1}	HB	47	C-$Tyr92^{O}$
479	Pro	vdW	31	C-Tyr27D
485	Gly^{O}	HB	13	B-$Asn58^{ND2}$
	Gly	vdW		C-Ala94
486	Phe	vdW	154	B-Trp47
487	Asn^{OD1}	HB	34	B-$Trp100E^{NE1}$
	Asn^{N}	HB		B-$Asn58^{OD1}$
	Asn^{ND2}	HB		B-$Val100C^{O}$
	Asn	vdW		B-Ile52
489	Tyr^{OH}	HB	118	B-$Asn58^{OD1}$
	Tyr	vdW		B-Ile52、Phe54、Thr56
490	Phe	vdW	2	B-Phe54
总 BSA ($Å^2$)			830	

[0584] vDW:范德华相互作用(4.0 Å截止值)

[0585] HB:氢键(3.7 Å截止值)

[0586] 对RBD-80 Fab界面的详细分析揭示,RBD的残基S477和T478与抗体的Y92和D^{100D}形成氢键,从而掩埋其124 $Å^2$的表面积并且占RBD总掩埋表面积(BSA)的15%(图29B-C,表18)。这些残基在数种VOC中发生突变,包括Omicron(BA.1、BA.2),这显著降低了抗体与Omicron BA.1RBD的结合亲和力(图29D-E);然而,用MB形式达成的亲合力增加补偿了这种较弱的结合。因此,80MB与突变的Omicron BA.1RBD的相互作用具有高表观结合亲和力并且没有可检测的解离速率(图29D-E),这可能有助于恢复对Omicron BA.1的中和效力(图29G)。使用具有复制能力的病毒另外确认了80MB对Omicron BA.2的效力:正如预期,对于80mAb观察到对OmicronBA.2活病毒的效力大大降低,但MB形式保留了高中和效力(图29F)。

[0587] 讨论

[0588] 新的SARS-CoV-2VOC的迅速出现使mAb治疗剂受阻,并且推动了集中于扩大单个抗体识别的病毒序列广度的抗体发现工作。有证据表明,数种FDA授权的mAb疗法对Omicron VOC失去功效,这说明迫切需要具有改善的广度的新治疗干预。另外,提高此类mAb的效力的策略有可能降低治疗剂量并且实现更实用的施用途径,这可以降低制造成本并实现全球可用性。我们先前已描述了一种能够在体外递送高效且作用广泛的分子的多抗体平台。事实上,据我们所知,在鉴定来源于三种中等效力的mAb的三特异性298-52-80MB之后的两年,尚未描述超过这种分子对WT SARS-CoV-2(IC_{50}为0.0002μg/mL)的体外中和效力的mAb。此处,

我们已证明了强效的体外中和作用转化为低剂量的体内SARS-CoV-2保护,并且亲合力和多特异性的组合可以产生针对SARS-CoV-2具有广泛中和覆盖范围的分子。

[0589] MB平台作为下一代多价生物剂具有多种优势,包括高稳定性、有效组装、易于生产和纯化以及所选抗体的即插即用基因融合。此处,我们进一步通过cryoEM确认了三特异性MB的适当组装。这种结构技术可用于表征大型和复杂的生物设计,诸如亚基疫苗,包括呈现流感和RSV病毒糖蛋白三聚体的胞外域的自组装蛋白质纳米粒子、展示稳定的HIV-1Env三聚体的双组分蛋白质纳米粒子,或利用SARS-CoV-2刺突蛋白RBD的SpyCatcher多聚化的COVID-19疫苗候选纳米粒子。尽管由于连接接头的柔性,同时可视化纳米粒子支架和其外周展示的分子可能具有挑战性,但cryoEM数据处理方面的最新进展允许独立分析不同的纳米粒子组分。通过采用这种策略,我们能够确认MB外周的scFab和scFc的适当折叠。此外,我们在2.1 Å分辨率下确认了在工程改造的分裂设计情形中MB的人类轻链脱铁铁蛋白支架的适当组装,并且在此基础上构建了多特异性抗体组分的组装。这些分析非常重要,因为它们进一步支持了结构引导的蛋白质工程改造在新型生物剂的合理设计中的核心作用,并且证实了MB是统一的生物剂。

[0590] 接下来,我们研究了MB在体内防御致命性攻击的能力。用表达Fcg受体结合缺陷的突变IgG4 Fc的三特异性MB*分子来评估增加的中和效力在介导体内保护方面的具体作用。为了保留如先前所描述的类IgG生物利用度,我们维持了MB Fc与FcRn(一种与抗体再循环和半衰期延长相关的受体)相互作用的能力。在体内,三特异性MB的中和效力相对于IgG4*混合液的急剧增加显著提高了对致命性SARS-CoV-2攻击的保护并且有助于减少保护所需的剂量。先前的研究已显示,一些靶向SARS-CoV-2的mAb需要Fc介导的效应功能以达到最佳功效。我们的数据说明,即使在没有效应功能的情况下,中和效力的提高也足以提供对致命性攻击的保护,并且支持使用基于亲合力的效力增加来有助于节约基于抗体的治疗剂的剂量。我们先前已显示,MB形式能够在体外触发ADCP,从而指示这种形式本身并不排除将效应功能并入分子中。

[0591] 与IgG相比,单特异性MB通过其表观结合亲和力的改善而显示对病毒序列变异性的恢复力程度提高,使得这些分子即使在mAb失去效力时仍保留中和能力。在mAb 80的情况下,VOC中发现的RBD表位内的突变导致mAb的效力损失。相比之下,当MB上展示80的特异性时,VOC中存在的突变会最低限度地改变这个分子的高结合亲和力和强效中和型态。MB更好地耐受序列变异性的能力大概源于降低的解离速率,从而驱动亲合力增加,而病毒体表面上的高刺突密度可能有利于增加亲合力。亲合抗体技术耐受序列变异性的潜力可以通过延长早期鉴定的能够中和新出现的VOC的mAb的寿命来为抗体发现时间线带来益处。

[0592] 鉴定强效的bnAb可能需要数年甚至数十年的抗体发现和工程改造工作,如在HIV-1和流感的情况下所例示。将需要对新出现的变体进行持续监测和筛选,以确认中和的持久性;然而,与传统的mAb相比,三特异性MB覆盖的RBD的足迹更大,与单独的mAb相比为MB在保持对未来VOC的恢复力方面提供了独特的优势。此外,将多种特异性组合至单个分子中的能力可能提供额外的潜在益处,即确保整个疗法过程中所有组分的生物利用度,而这是mAb混合液组合的限制特征。

[0593] 序列表

[0594] SEQ ID NO:1 hFerritinLC

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRD DVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKP

[0595] AEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCD FLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLR HD

[0596] SEQ ID NO:2 接头1

[0597] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

[0598] SEQ ID NO:3 VHH-hFerr

[0599] (下划线指示接头序列;粗体指示hFerritinLC)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEYAMGWFRQAP GKEREFVATISWSGGSTYYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPDDTAVYYCAAAGLGTVVSEWDYDYDYWGQGTQVTVSGGGG

[0600] SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSL VNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREG YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMA LEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKK MGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD**

[0601] SEQ ID NO:4 VHH-Fc

[0602] (下划线指示接头序列)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEYAMGWFRQAP GKEREFVATISWSGGSTYYTDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPDDTAVYYCAAAGLGTVVSEWDYDYDYWGQGTQVTVSSGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

[0603] HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

[0604] SEQ ID NO:5 N-hFerritinLC

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRD

[0605] DVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKP AEDEW

[0606] SEQ ID NO:6 C-hFerritinLC

[0607] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFL
ETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

[0608] SEQ ID NO:7 信号序列

[0609] MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVAE

[0610] SEQ ID NO:8 接头1

[0611] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0612] SEQ ID NO:9 接头2

[0613] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

[0614] SEQ ID NO:10 BD23-scFab-hFerritinLC

[0615] (下划线指示接头序列;粗体指示hFerritinLC)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK
APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ
QYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS
GYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRF

[0616] VFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARPQGGSSWYRDYYYG
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSL**
GFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGG
RALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGP
EAGLGEYLFERLTLRHD

[0617] SEQ ID NO:11 BD23的V_K

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK

[0618] APKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ

QYNSYPYTFGQGTKLEIK

[0619] SEQ ID NO:12 BD23的V_H

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQA

[0620] PGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISS

[0621] LKAEDTAVYYCARPQGGSSWYRDYYYGMDVWGQGTTVTVSS

[0622] SEQ ID NO:13 BD23-scFab-C_hFerritinLC

[0623] (下划线指示接头序列;粗体指示C_hFerritinLC)

LEDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP

GKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYY

CQQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS

TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGG

GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCK

[0624] ASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFT

GRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARPQGGSSWYRDYY

YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL

VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS

SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSGGGG

SGGGGSGGGGSGG**GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALG**

SARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEA

GLGEYLFERLTLRHD

[0625] SEQ ID NO:14 scFc-N_hFerritinLC

[0626] (下划线指示接头序列;粗体指示hFerritinLC)

[0627] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN

[0628] QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNS LVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKRE GYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW**

[0629] SEQ ID NO:15 scFc(LALAP)

[0630] (相对于野生型Fc发生突变的一个或多个残基用方框标出。)

[0631] DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[0632] SEQ ID NO:16 4A8-scFab-hFerritinLC

[0633] (下划线指示接头序列;粗体指示hFerritinLC)

EIVMTQSPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQ
RPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCTQATQFPYTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA

[0634] SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGAEVKKPGASVKV
SCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETMYAQ
KFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATSTAVAGTP
DLFDYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGG

[0635] GSGGGGSGGGGSGGGGSGG**SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYL**
QASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLL
KMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKL
NQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHL
TNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

[0636] SEQ ID NO:17 4A8的V_K

EIVMTQSPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQ

[0637] RPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCTQATQFPYTFGQGTKVDIK

[0638] SEQ ID NO:18 4A8的V_H

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQA

[0639] PGKGLEWMGGFDPEDGETMYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMEL
SSLRSEDTAVYYCATSTAVAGTPDLFDYYYGMDVWGQGTTVTV
SS

[0640] SEQ ID NO:19 4A8-scFab C_hFerritinLC

[0641] (下划线指示接头序列;粗体指示C_hFerritinLC)

EIVMTQSPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQ
RPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVG

[0642] VYYCTQATQFPYTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<u>GGGGS</u>
<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG</u>
<u>GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u>EVQLVESGAEVKKPGASVKV
SCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETMYAQ
KFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATSTAVAGTP
DLFDYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

[0643] AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC<u>GGGGSGGG</u>
<u>GSGGGGSGGGGSGGGGSGG</u>**GKTPDAMKAAMALEKKLNQALL**
DLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHR
LGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

[0644] SEQ ID NO:20 mFerritin

MTSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLHLRASYTYLSLGFFFDRDD
VALEGVGHFFRELAEEKREGAERLLEFQNDRGGRALFQDVQKPS

[0645] QDEWGKTQEAMEAALAMEKNLNQALLDLHALGSARTDPHLCDF
LESHYLDKEVKLIKKMGNHLTNLRRVAGPQPAQTGAPQGSLGEY
LFERLTLKHD

[0646] SEQ ID NO:21 HD37-scIgG

[0647] (下划线指示接头序列)

DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQ
IPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAT
YHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS
VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM

[0648] SSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC<u>GGSSGSG</u>
<u>SGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGGGGSAGGTA</u>
<u>TAGASSGSGSSGSSSSGGTGTG</u>QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCK
ASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFK
GKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYY
AMDYWGQGTSVTVSSSQSFPNVFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLA
RDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGIRTFPTLRTGGKYLATSQVLLSP
KSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIPSKPCPPCKCPAPNLLGG

[0649] PSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEV
HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKD
LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF
MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN
WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0650] SEQ ID NO:22 IgG2a Fc_mFerr

[0651] (下划线指示接头序列;粗体指示mFerritin)

KPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVD
VSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH
QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPE
EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL
DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFS
RTPGKGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGG
SGGGGSAGGTATAGASSGSGSSGSSSSGGTGKPCPPCKCPAPNLL
GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN

[0652] VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVN
NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMV
TDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVE
KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKSRASTASSASS
GGGGGGSGGSGGSGGS**MTSQIRQNYSTEVEAAVNRLVNLHLR**
ASYTYLSLGFFFDRDDVALEGVGHFFRELAEEKREGAERLLEF
QNDRGGRALFQDVQKPSQDEWGKTQEAMEAALAMEKNLNQ
ALLDLHALGSARTDPHLCDFLESHYLDKEVKLIKKMGNHLTN
LRRVAGPQPAQTGAPQGSLGEYLFERLTLKHD

[0653] SEQ ID NO:23 scFc-N-hFerr LALAP I253A

[0654] (下划线指示接头序列;粗体指示hFerritinLC;方框指示相对于野生型IgG1 Fc发生突变的残基)

DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLM**A**SRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCP

[0655] PCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLM**A**SRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG**SSQIRQNYSTDVEAAVN**
SLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKRE
GYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW

[0656] SEQ ID NO:24 野生型人类IgG1 Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

[0657] LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

[0658] SEQ ID NO:25 抗体56轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGK
APKLLIYDASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0659] QANSFPSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0660] SEQ ID NO:26 抗体56重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAP
GQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTSTVYMELS

[0661] SLRSEDTAVYYCARDIGPIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0662] SEQ ID NO:27 抗体349轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGK
APKLLIYDTSNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0663] QSYTTPWTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0664] SEQ ID NO:28 抗体349重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAP
GKGLEWVSGISSAGSITNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL

[0665] RAEDTAVYYCAGNHAGTTVTSEYFQHWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

[0666] SEQ ID NO:29 抗体178轻链

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSGTYLAWYQQKPG
QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC

[0667] LQTHSYPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0668] SEQ ID NO:30 抗体178重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHMHWVRQ
APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME

[0669] LSSLRSEDTAVYYCARDISSWYEITKFDPWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSC

[0670] SEQ ID NO:31 抗体108轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVITNNLAWYQQKPGK
APKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0671] QSYTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0672] SEQ ID NO:32 抗体108重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSRYAIHWVRQAP
GQGLEWMGWMNPISGNTDYAPNFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS

[0673] SLRSEDTAVYYCAKDGSQLAYLVEYFQHWGQGTLVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSC

[0674] SEQ ID NO:33 抗体128轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISRYLNWYQQKPGK
APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0675] QANGFPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0676] SEQ ID NO:34 抗体128重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYYMHWVRQ
APGQGLEWMGIINPSSSSASYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS

[0677] SLRSEDTAVYYCARDGRYGSGSYPFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

[0678] SEQ ID NO:35 抗体160轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSWLAWYQQKPGK
APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0679] QGYTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0680] SEQ ID NO:36 抗体160重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGHDMHWVRQ
APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL
SSLRSEDTAVYYCARANSLRYYYGMDVWGQGTMVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSC

[0682] SEQ ID NO:37 抗体368轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ
KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQALQTPATFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0684] SEQ ID NO:38 抗体368重链

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAP
GQGLEWMGAIMPMFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS
LRSEDTAVYYCARGSSGYYYGWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0686] SEQ ID NO:39 抗体192轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ
KPGQSPQLLIYAASSLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0688] SEQ ID NO:40 抗体192重链

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAP
GQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS
LRSEDTAVYYCSTYYYDSSGYSTDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSC

[0690] SEQ ID NO:41 抗体158轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0691] QANSFPLTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0692] SEQ ID NO:42 抗体158重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQ APGQGLEWMGWINPLNGGTNFAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYME

[0693] LSSLRSEDTAVYYCARDPGGSYSNDAFDIWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC

[0694] SEQ ID NO:43 抗体180轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYAASSLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

[0695] VYYCQQYYSSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0696] SEQ ID NO:44 抗体180重链

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQA PGQGLEWMGRISPRSGGTKYAQRFQGRVTITADESTSTAYMELSS

[0697] LRSEDTAVYYCAREAVAGTHPQAGDFDLWGRGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC

[0698] SEQ ID NO:45 抗体254轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGK APKLLIYDASSLQIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL

[0699] QSYSTPPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0700] SEQ ID NO:46 抗体254重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMHWVRQAP GKGLEWVSAIGTGGDTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL

[0701] RAEDTAVYYCAREGDGYNFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSC

[0702] SEQ ID NO:47 抗体120轻链

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC

[0703] QQYYTTPRTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0704] SEQ ID NO:48 抗体120重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAP GQGLEWMGMIDPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS

[0705] LRSEDTAVYYCAKDFGGGTRYDYWYFDLWGRGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSC

[0706] SEQ ID NO:49 抗体64轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSHLAWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0707] QTYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0708] SEQ ID NO:50 抗体64重链

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSQHGMHWVRQAP

[0709] GKGLEWVSAIDRSGSYIYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCARDTYGGKVTYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSC

[0710] SEQ ID NO:51 抗体298轻链

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY

[0711] QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED
VAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0712] SEQ ID NO:52 抗体298重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAP

[0713] GQGLEWMGWISPNSGGTDLAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS
LRSEDTAVYYCASDPRDDIAGGYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
C

[0714] SEQ ID NO:53 抗体82轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVISNYLAWYQQKPGK

[0715] APKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSFSPPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0716] SEQ ID NO:54 抗体82重链

[0717] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGSFSTSAFYWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRALYGSGSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0718] SEQ ID NO:55 抗体46轻链

[0719] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0720] SEQ ID NO:56 抗体46重链

[0721] EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0722] SEQ ID NO:57 抗体324轻链

[0723] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0724] SEQ ID NO:58 抗体324重链

[0725] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGDYGDYIVSPFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0726] SEQ ID NO:59 抗体236轻链

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG

[0727] VYYCMQALQTPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0728] SEQ ID NO:60 抗体236重链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFTSYGINWVRQAP GQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL

[0729] SSLRSEDTAVYYCASRGIQLLPRGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSC

[0730] SEQ ID NO:61 抗体52轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0731] QGNGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0732] SEQ ID NO:62 抗体52轻链N92T

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

[0733] QGTGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0734] SEQ ID NO:63 抗体52重链

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAP GQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSL

[0735] RSEDTAVYYCARDRGDTIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

[0736] SEQ ID NO:64 抗体80轻链

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWY
QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED

[0737] VAVYYCQQYYSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0738] SEQ ID NO:65 抗体80重链

[0739] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAP
GQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARSTRELPEVVDWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGP

[0740] SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSC

[0741] SEQ ID NO:66 野生型人类IgG4 Fc

PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH

[0742] QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK

[0743] SEQ ID NO:67 Fc链3-T10.G

PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH

[0744] QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK

[0745] SEQ ID NO:68 Fc链4-T10.A

PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK

[0746] SEQ ID NO:69 Fc链5-T10.B

PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
[0747] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGK

[0748] SEQ ID NO:70 52轻链N92T变体

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGK
APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
[0749] QGTGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0750] SEQ ID NO:71 Nferr-Fc(PAAAS突变)(包含于T10.A内)

PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0751] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPSCPAPEAAG
ASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR

[0752] GGRALFQDIKKPAEDEW

[0753] SEQ ID NO:72 Nferr-Fc(AAAS突变)(包含于T10.G内)

PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPSCPAPEAAG

[0754] ASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR
GGRALFQDIKKPAEDEW

[0755] SEQ ID NO:73 Nferr-Fc(PAA突变)(包含于T10.B内)

PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

[0756] DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS

[0757] RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY
TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQR
GGRALFQDIKKPAEDEW

[0758] SEQ ID NO:74 Cferr-Fc(PAAAS突变)(包含于T10.A内)

PPCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG

[0759] GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0760] SEQ ID NO:75 Cferr-Fc(AAAS突变)(包含于T10.G内)

PPCPSCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV

[0761] SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ

EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
[0762] NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0763] SEQ ID NO:76 Cferr-Fc(PAA突变)(包含于T10.B内)

PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
LGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGPPCPPCPAPEAAG
[0764] GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA
LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAG
LGEYLFERLTLRHD

[0765] 等效方案/其它实施方案

[0766] 尽管已结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但将理解,能够对本发明进行进一步修改,并且本申请旨在涵盖大体上符合本发明的原理并且包括虽然偏离本公开的范围但属于本发明所属领域的已知或常用的手段并可以应用于上文所阐述的必要特征中的

任何变型、用途或变更。

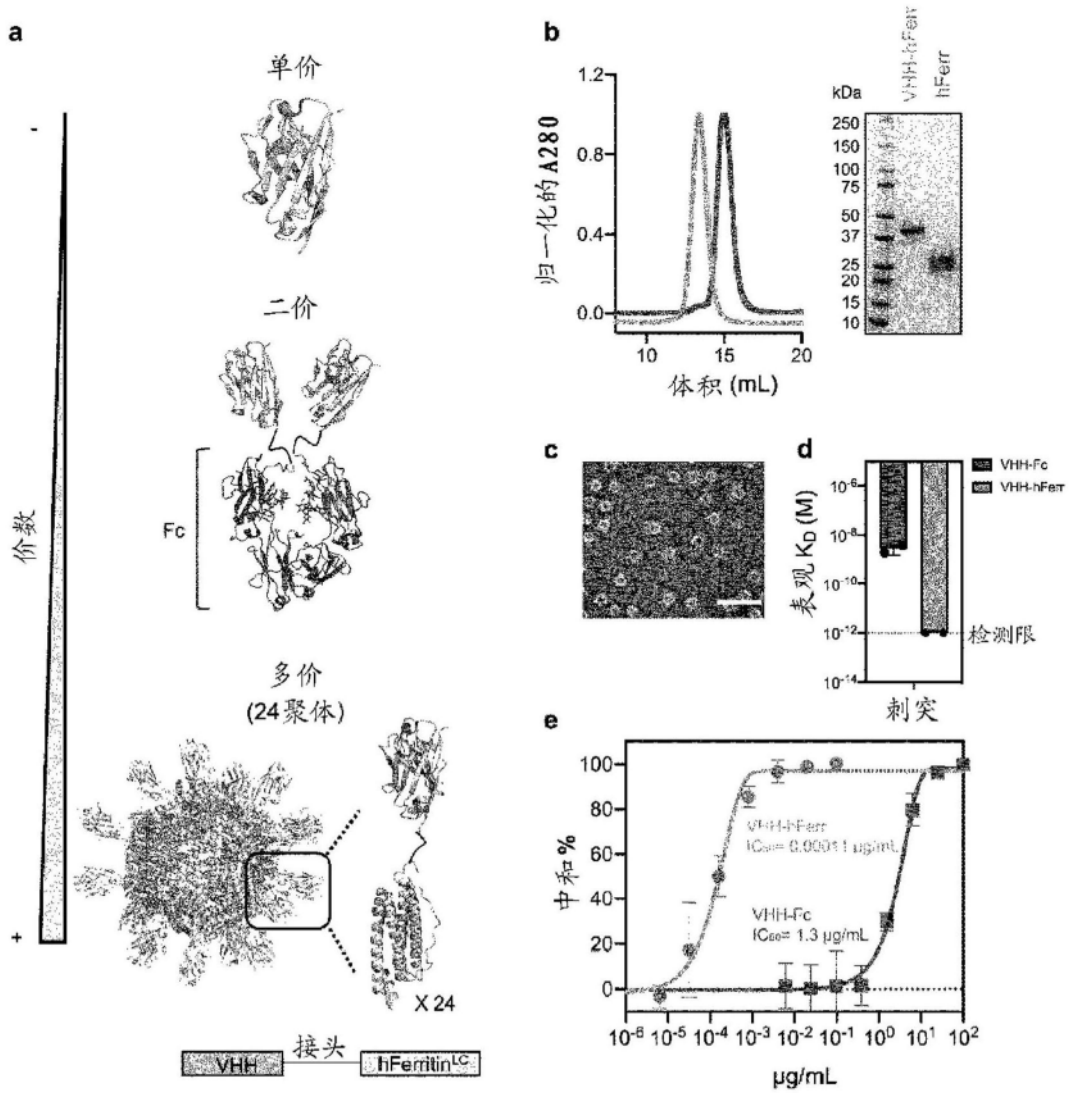

a
单价
二价
Fc
多价
(24聚体)
价数
-
+
X 24
接头
VHH
hFerritin LC
b
归一化的A280
体积 (mL)
kDa
VHH-hFerr
hFerr
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
c
d
VHH-Fc
VHH-hFerr
表观 KD (M)
检测限
刺突
e
中和 %
VHH-hFerr
VHH-Fc
IC50= 1.3 μg/mL
μg/mL

图1

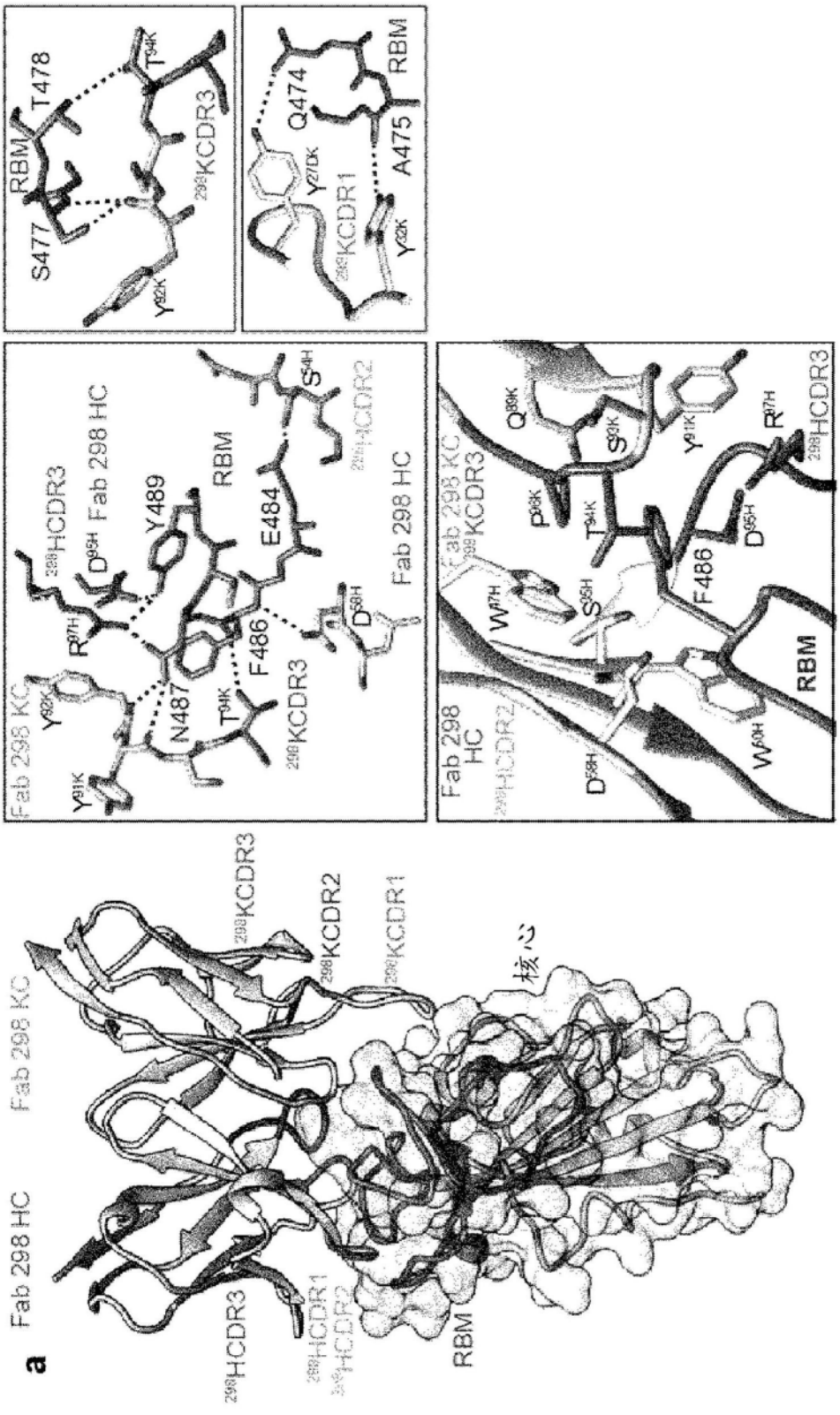

a
Fab 298 HC
Fab 298 KC
298HCDR3
298HCDR1
298HCDR2
RBM
298KCDR3
298KCDR2
298KCDR1
核心
Fab 298 KC
Fab 298 HC
298HCDR3
Y489
RBM
E484
F486
N487
298KCDR3
298HCDR2
Fab 298 HC
S477
RBM
T478
298KCDR3
298KCDR1
Q474
A475
RBM
Fab 298 KC
298KCDR3
Fab 298 HC
298HCDR2
RBM
F486
298HCDR3

图2a

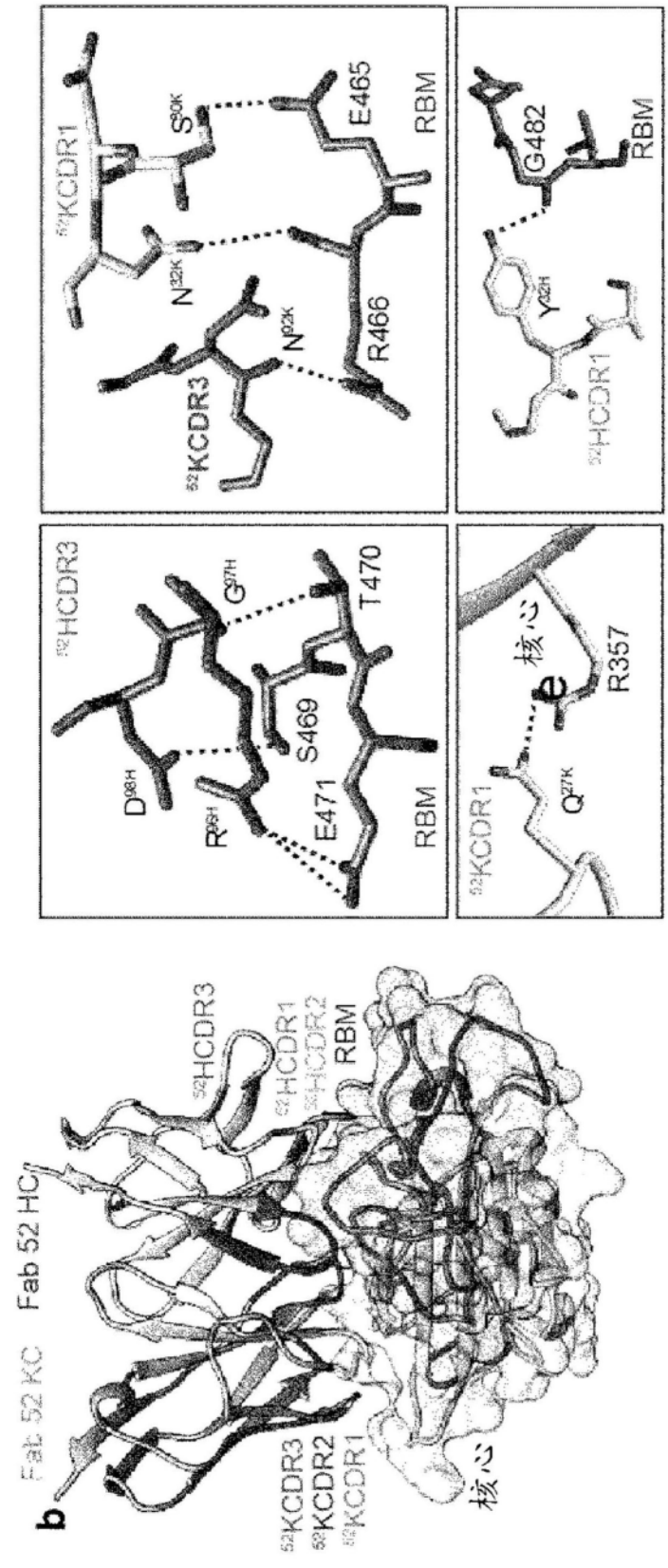

b
Fab 52 KC
Fab 52 HC
52KCDR3
52KCDR2
52KCDR1
52HCDR3
52HCDR1
52HCDR2
RBM
核心
52HCDR3
D98H
R99H
G97H
S469
E471
T470
RBM
52KCDR1
N32K
N92K
S30K
R466
E465
RBM
52KCDR1
Q27K
核心
R357
52HCDR1
Y32H
G482
RBM

图2b

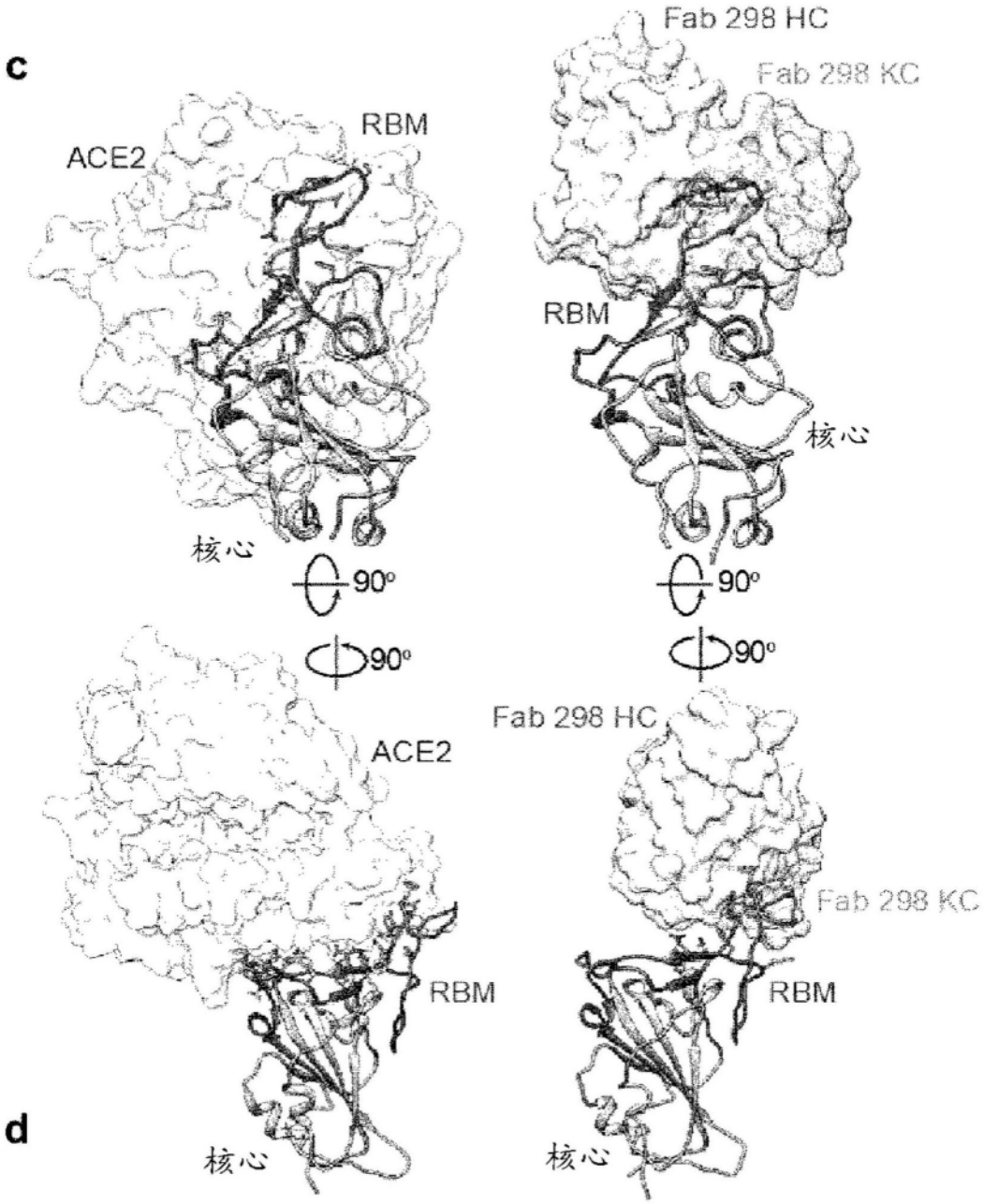

c
ACE2
RBM
核心
90°
90°
Fab 298 HC
Fab 298 KC
RBM
核心
90°
90°
d
ACE2
RBM
核心
Fab 298 HC
Fab 298 KC
RBM
核心

图2c和图2d

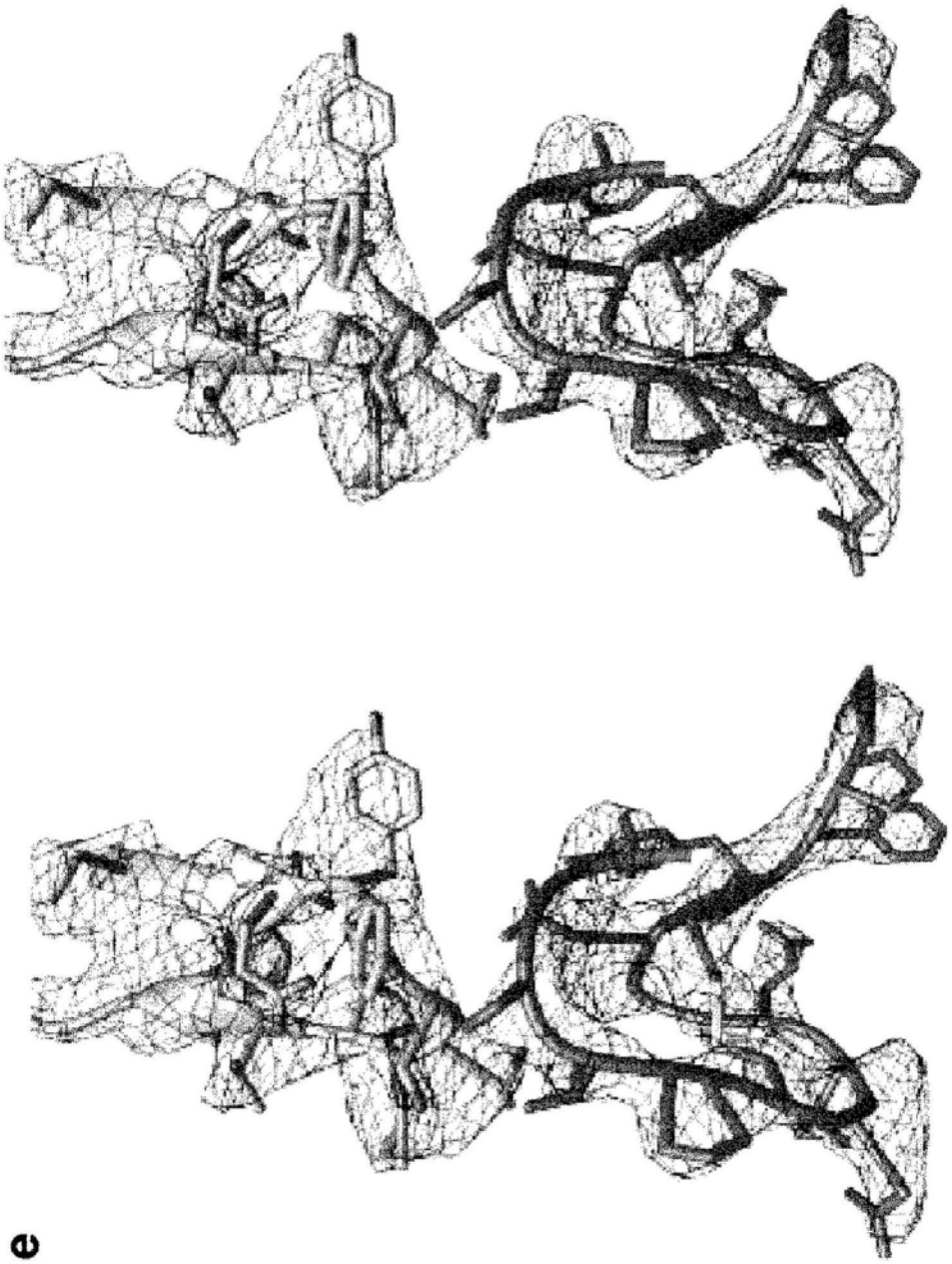


图2e

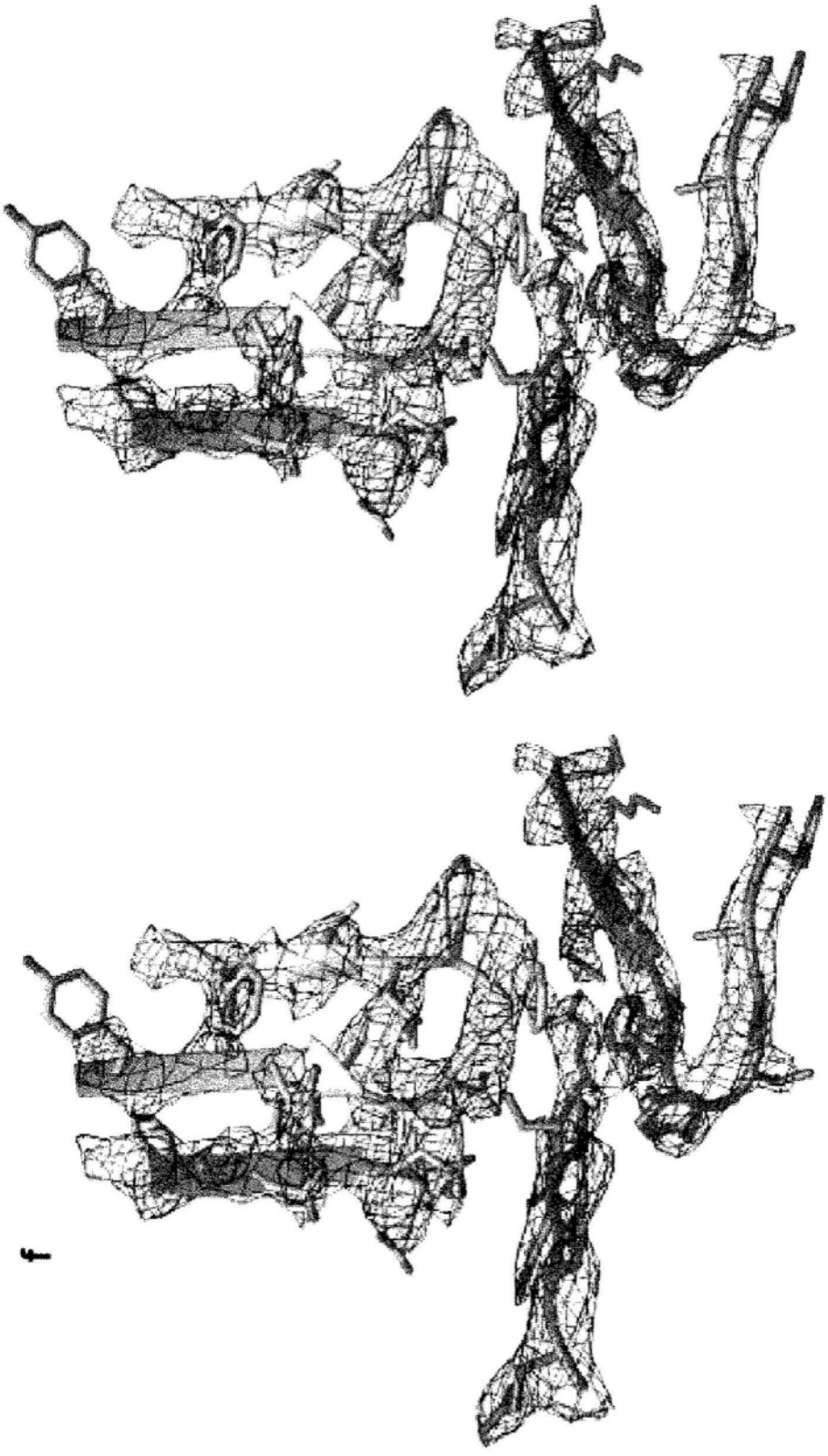


图2f

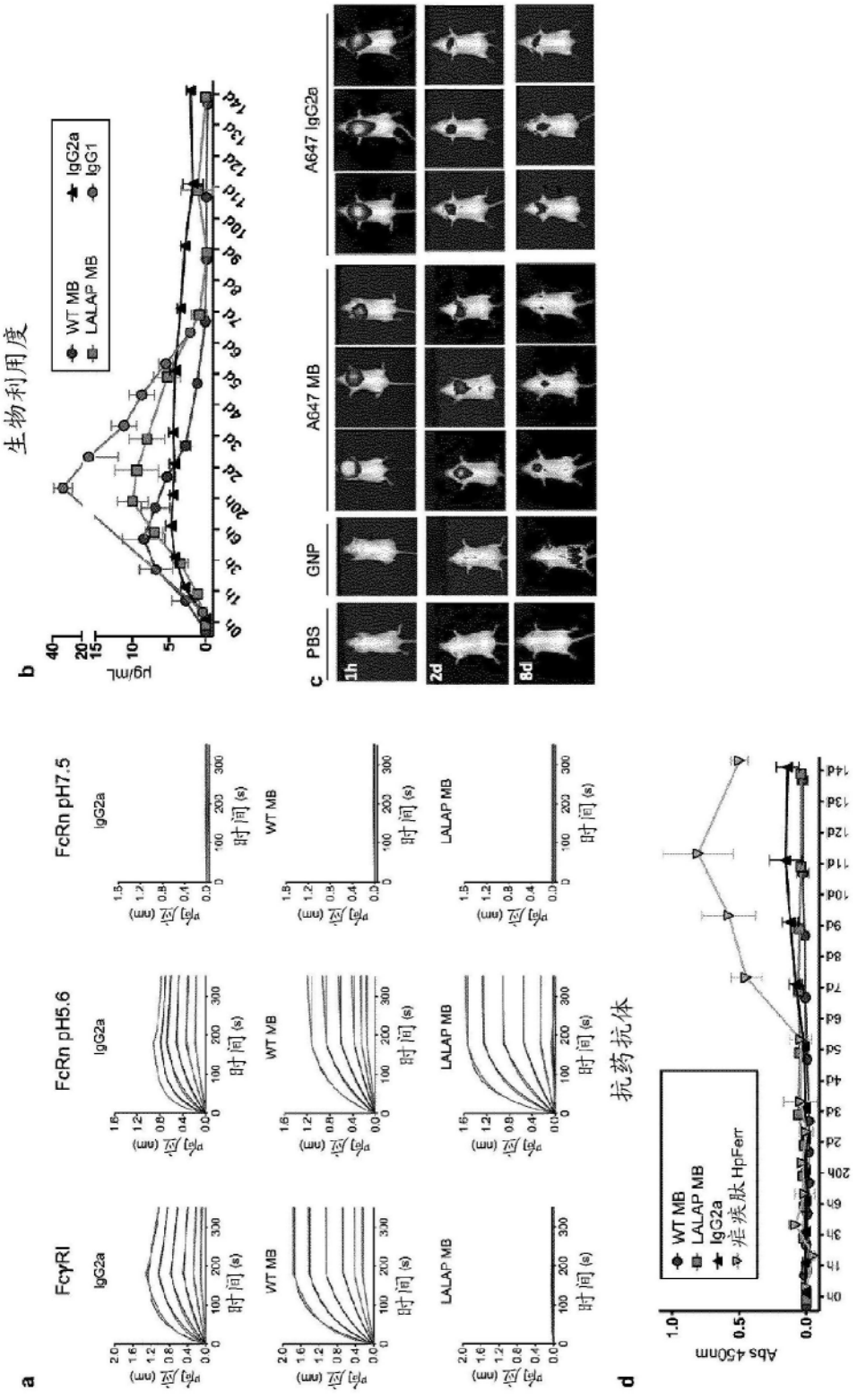

a
FcγRI
FcRn pH5.6
FcRn pH7.5
IgG2a
WT MB
LALAP MB
时间 (s)
b
生物利用度
μg/mL
WT MB
LALAP MB
IgG2a
IgG1
c
PBS
GNP
A647 MB
A647 IgG2a
1h
2d
8d
d
抗药抗体
Abs 450nm
WT MB
LALAP MB
IgG2a
疟疾肽 HpFerr

图3

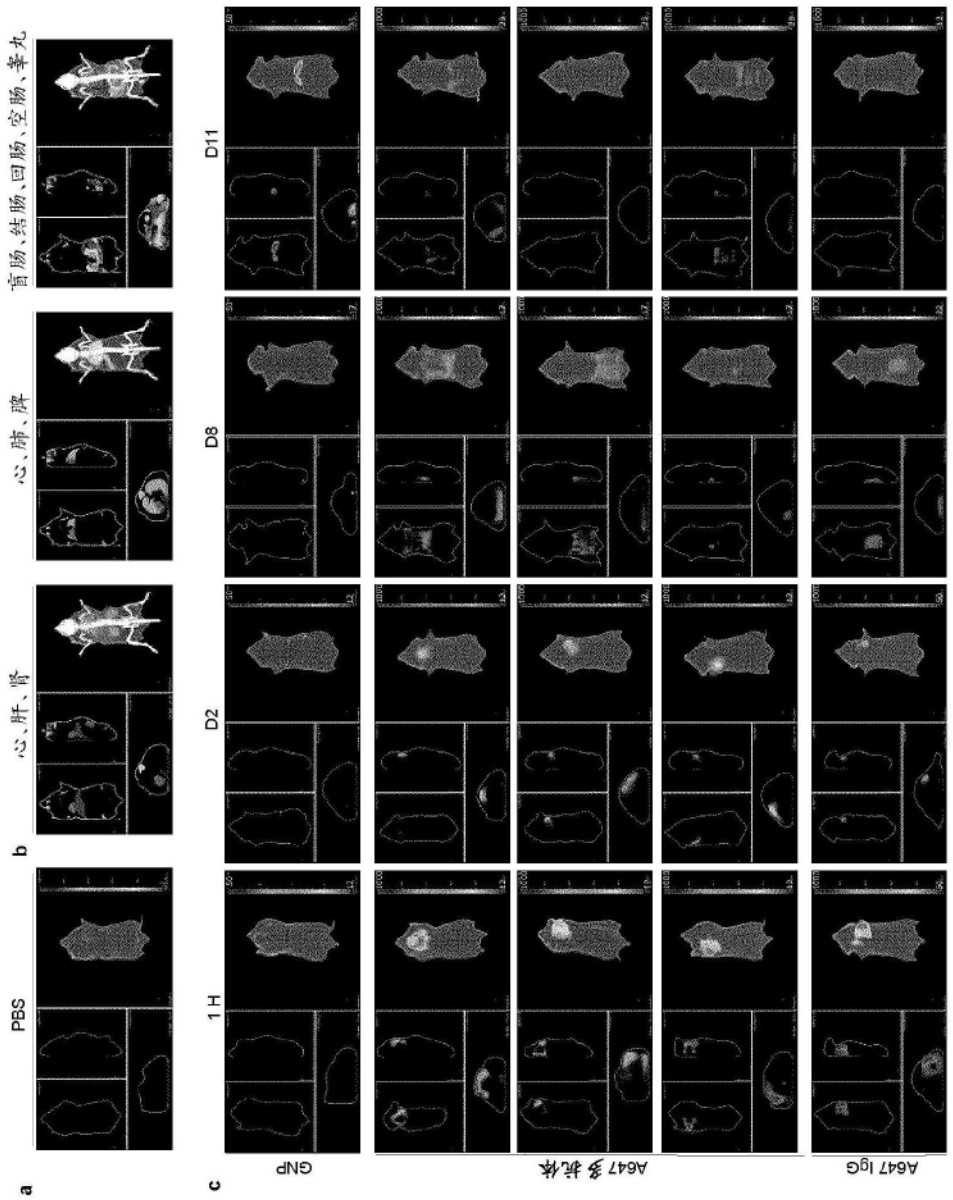


图4

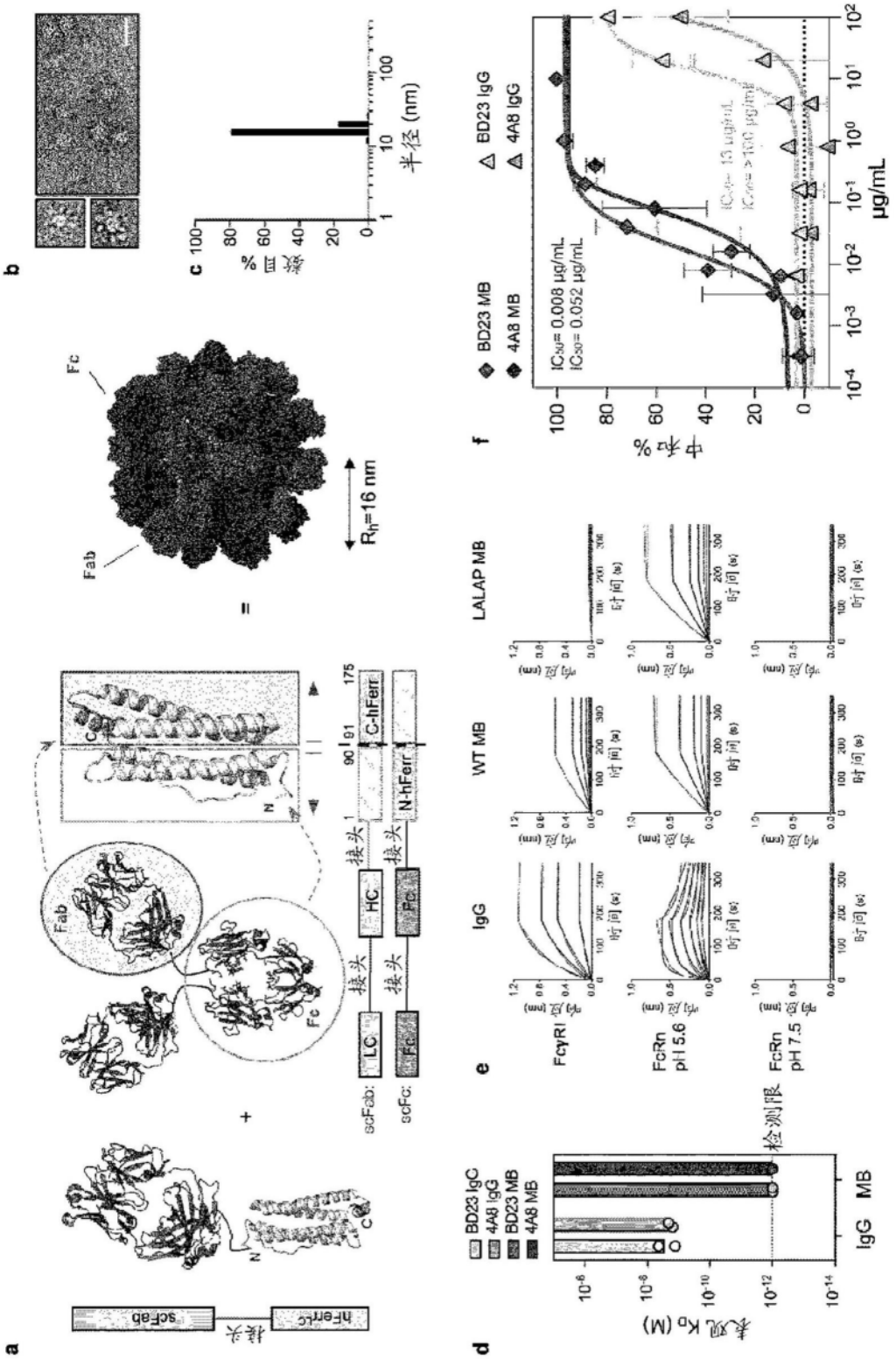

a
hFerrLC
scFab
接头
N
C
Fab
Fc
+
scFab:
LC
接头
HC
接头
1
90
91
175
C-hFerr
scFc:
Fc
接头
Fc
N-hFerr
b
c
%
半径 (nm)
Fc
Fab
=
Rh=16 nm
d
BD23 IgC
4A8 IgG
BD23 MB
4A8 MB
检测限
IgG
MB
e
IgG
WT MB
LALAP MB
FcγRI
FcRn pH 5.6
FcRn pH 7.5
f
BD23 MB
4A8 MB
BD23 IgG
4A8 IgG
IC50= 0.008 μg/mL
IC50= 0.052 μg/mL
μg/mL

图5

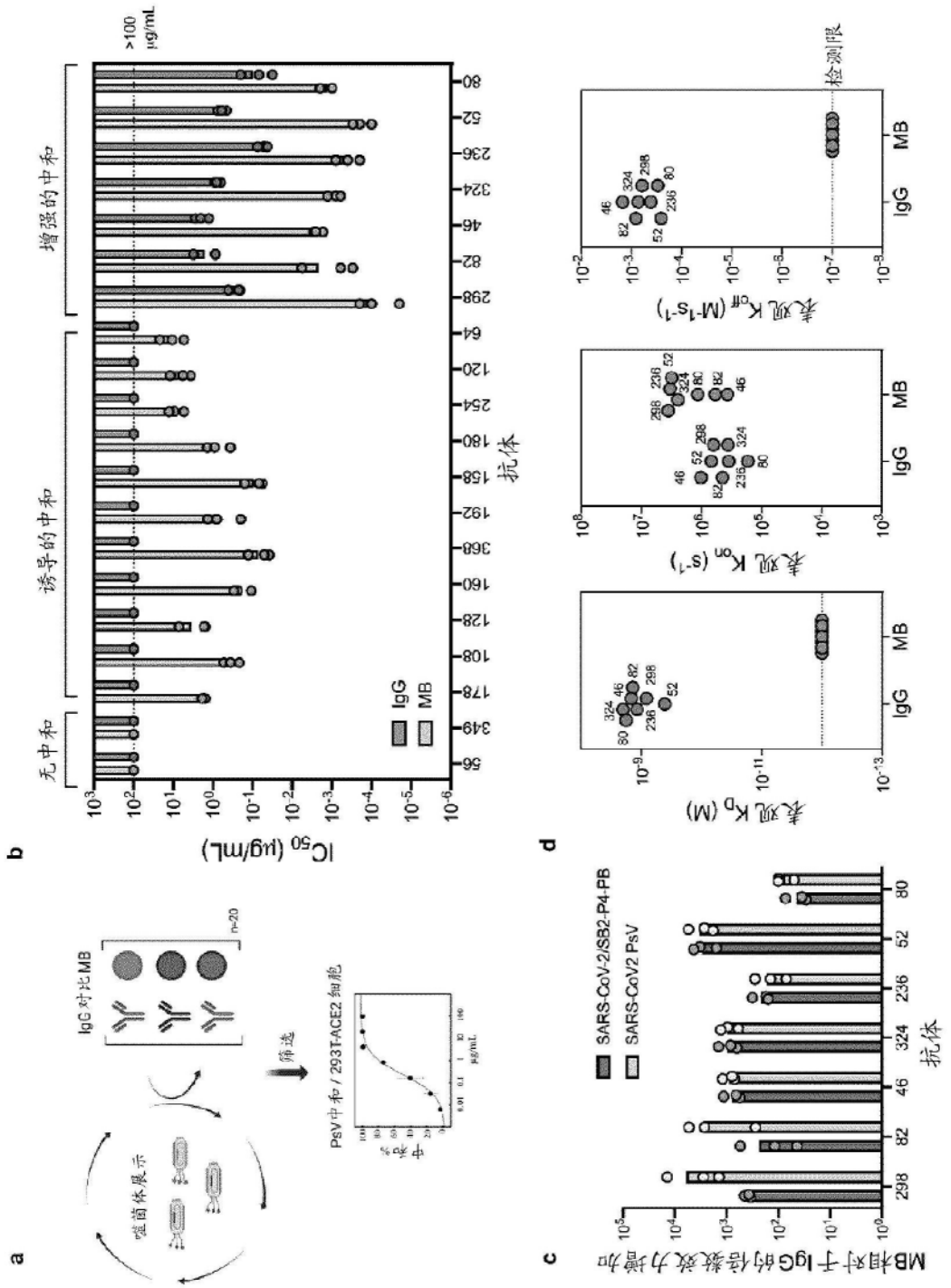

a
噬菌体展示
筛选
IgG 对比 MB
n=20
PsV中和 / 293T-ACE2 细胞
b
无中和
诱导的中和
增强的中和
>100 μg/mL
IgG
MB
抗体
IC50 (μg/mL)
c
SARS-CoV-2/SB2-P4-PB
SARS-CoV2 PsV
抗体
MB相对于IgG的结合效应力增加
d
检测限
IgG
MB

图6

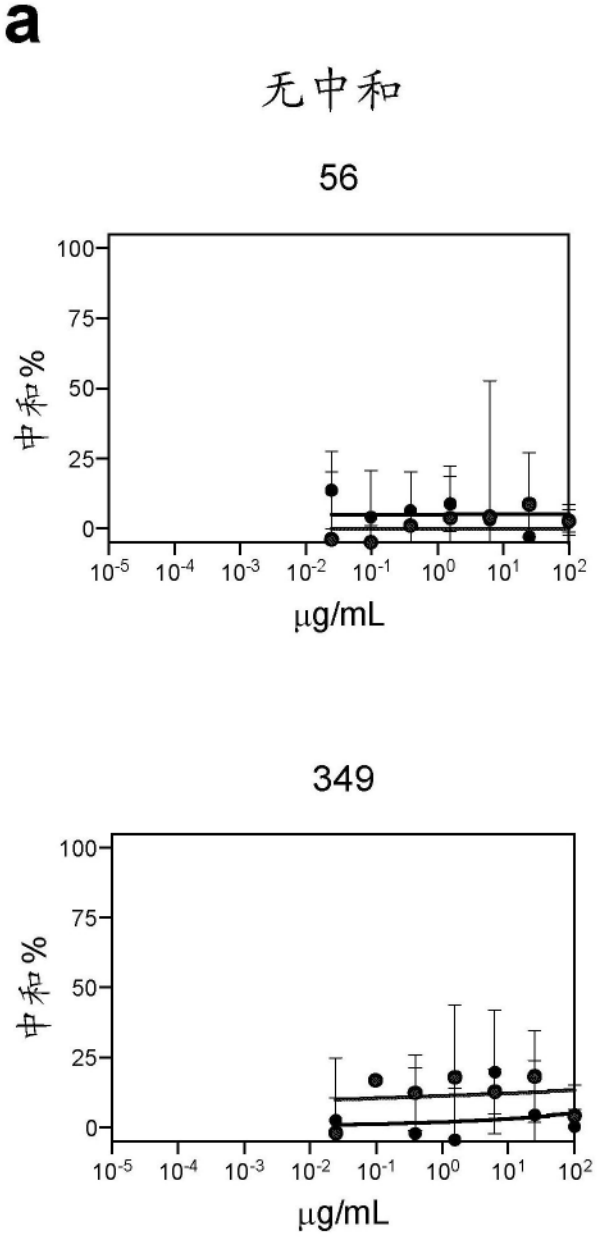

a
无中和
56
100
75
50
25
0
中和%
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102
μg/mL
349
100
75
50
25
0
中和%
10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102
μg/mL

图7a(第1部分)

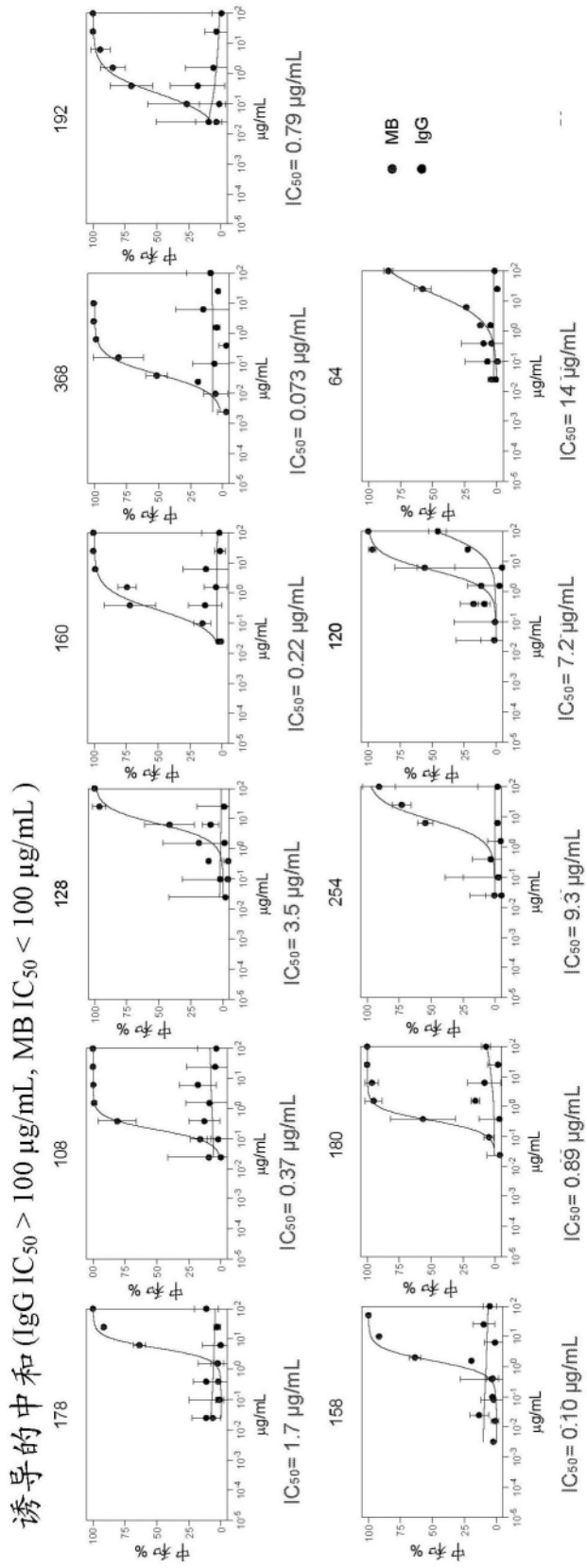

诱导的中和 (IgG IC50 > 100 µg/mL, MB IC50 < 100 µg/mL)
MB
IgG
178
IC50= 1.7 µg/mL
108
IC50= 0.37 µg/mL
128
IC50= 3.5 µg/mL
160
IC50= 0.22 µg/mL
368
IC50= 0.073 µg/mL
192
IC50= 0.79 µg/mL
158
IC50= 0.10 µg/mL
180
IC50= 0.89 µg/mL
254
IC50= 9.3 µg/mL
120
IC50= 7.2 µg/mL
64
IC50= 14 µg/mL
% 中和
µg/mL

图7a(第2部分)

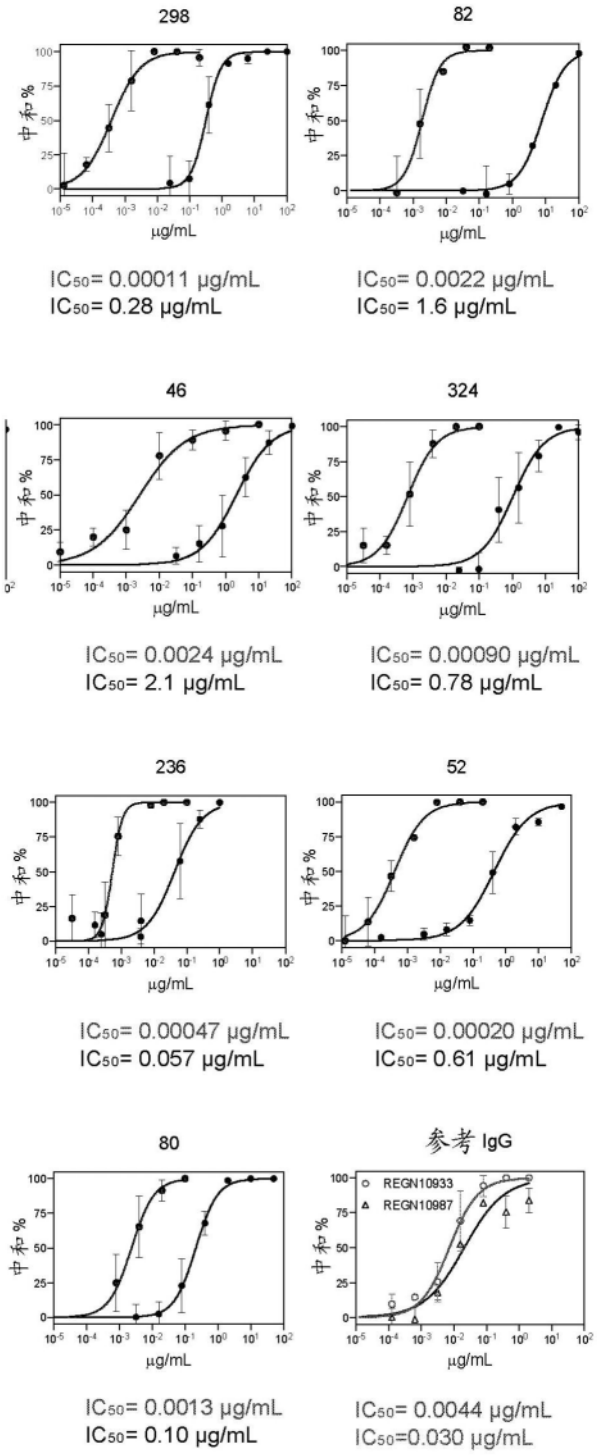

298
82
中和 %
μg/mL
IC50= 0.00011 μg/mL
IC50= 0.28 μg/mL
IC50= 0.0022 μg/mL
IC50= 1.6 μg/mL
46
324
IC50= 0.0024 μg/mL
IC50= 2.1 μg/mL
IC50= 0.00090 μg/mL
IC50= 0.78 μg/mL
236
52
IC50= 0.00047 μg/mL
IC50= 0.057 μg/mL
IC50= 0.00020 μg/mL
IC50= 0.61 μg/mL
80
参考 IgG
REGN10933
REGN10987
IC50= 0.0013 μg/mL
IC50= 0.10 μg/mL
IC50= 0.0044 μg/mL
IC50=0.030 μg/mL

图7a(第3部分)

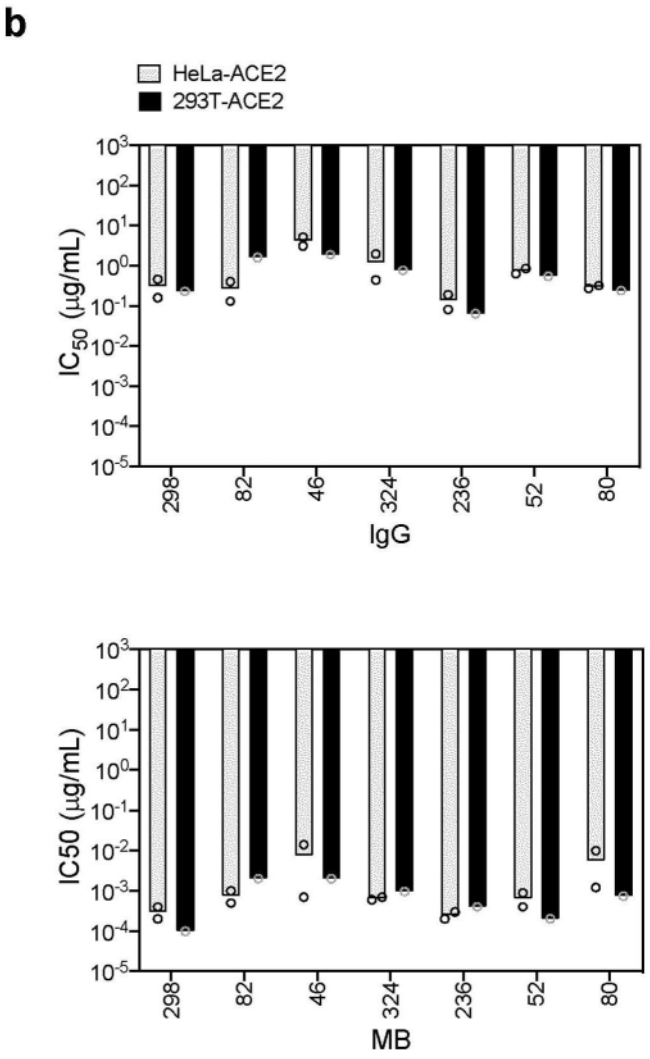

b
HeLa-ACE2
293T-ACE2
IC50 (μg/mL)
298
82
46
324
236
52
80
IgG
IC50 (μg/mL)
298
82
46
324
236
52
80
MB

图7b

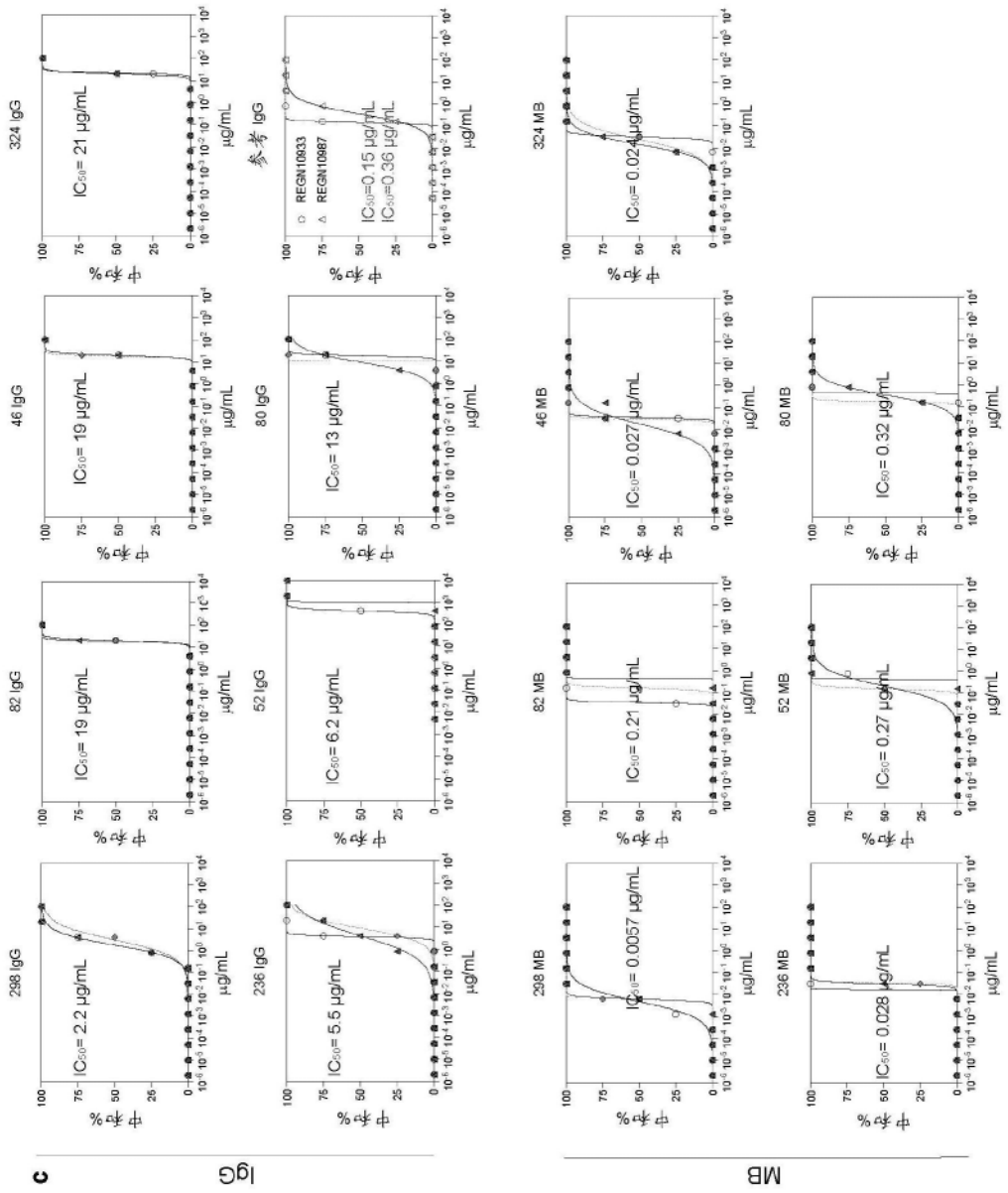

c
IgG
MB
324 IgG
IC50= 21 μg/mL
参考 IgG
REGN10933
REGN10987
IC50=0.15 μg/mL
IC50=0.36 μg/mL
324 MB
IC50= 0.024 μg/mL
46 IgG
IC50= 19 μg/mL
80 IgG
IC50= 13 μg/mL
46 MB
IC50= 0.027 μg/mL
80 MB
IC50= 0.32 μg/mL
82 IgG
IC50= 19 μg/mL
52 IgG
IC50= 6.2 μg/mL
82 MB
IC50= 0.21 μg/mL
52 MB
IC50= 0.27 μg/mL
298 IgG
IC50= 2.2 μg/mL
236 IgG
IC50= 5.5 μg/mL
298 MB
IC50= 0.0057 μg/mL
236 MB
IC50= 0.028 μg/mL
中和%
μg/mL

图7c

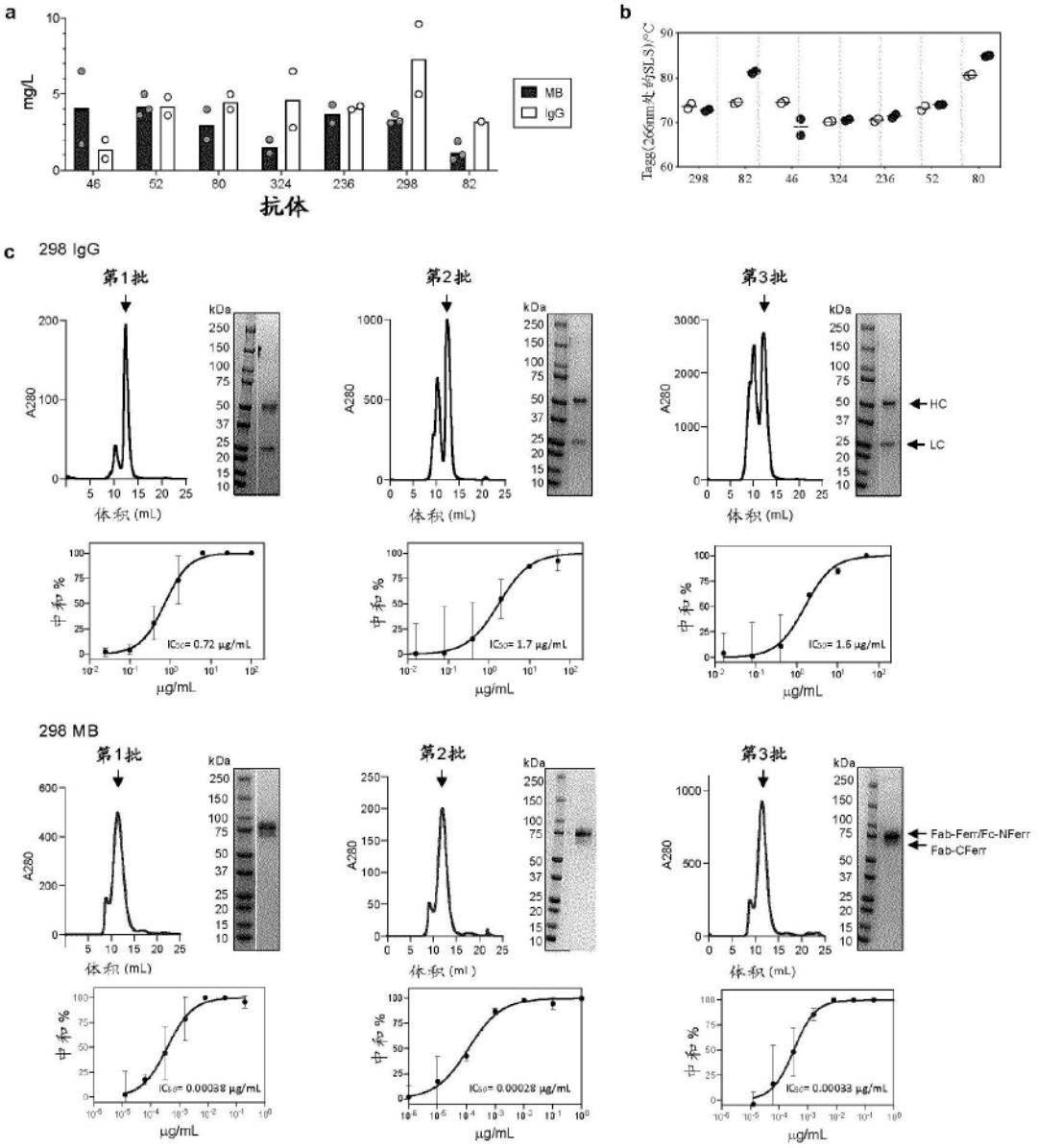

a
mg/L
MB
IgG
46
52
80
324
236
298
82
抗体
b
298
82
46
324
236
52
80
c
298 IgG
第1批
第2批
第3批
A280
体积 (mL)
kDa
HC
LC
中和 %
μg/mL
IC50= 0.72 μg/mL
IC50= 1.7 μg/mL
IC50= 1.6 μg/mL
298 MB
Fab-Fem/Fc-NFem
Fab-CFem
IC50= 0.00038 μg/mL
IC50= 0.00028 μg/mL
IC50= 0.00033 μg/mL

图8

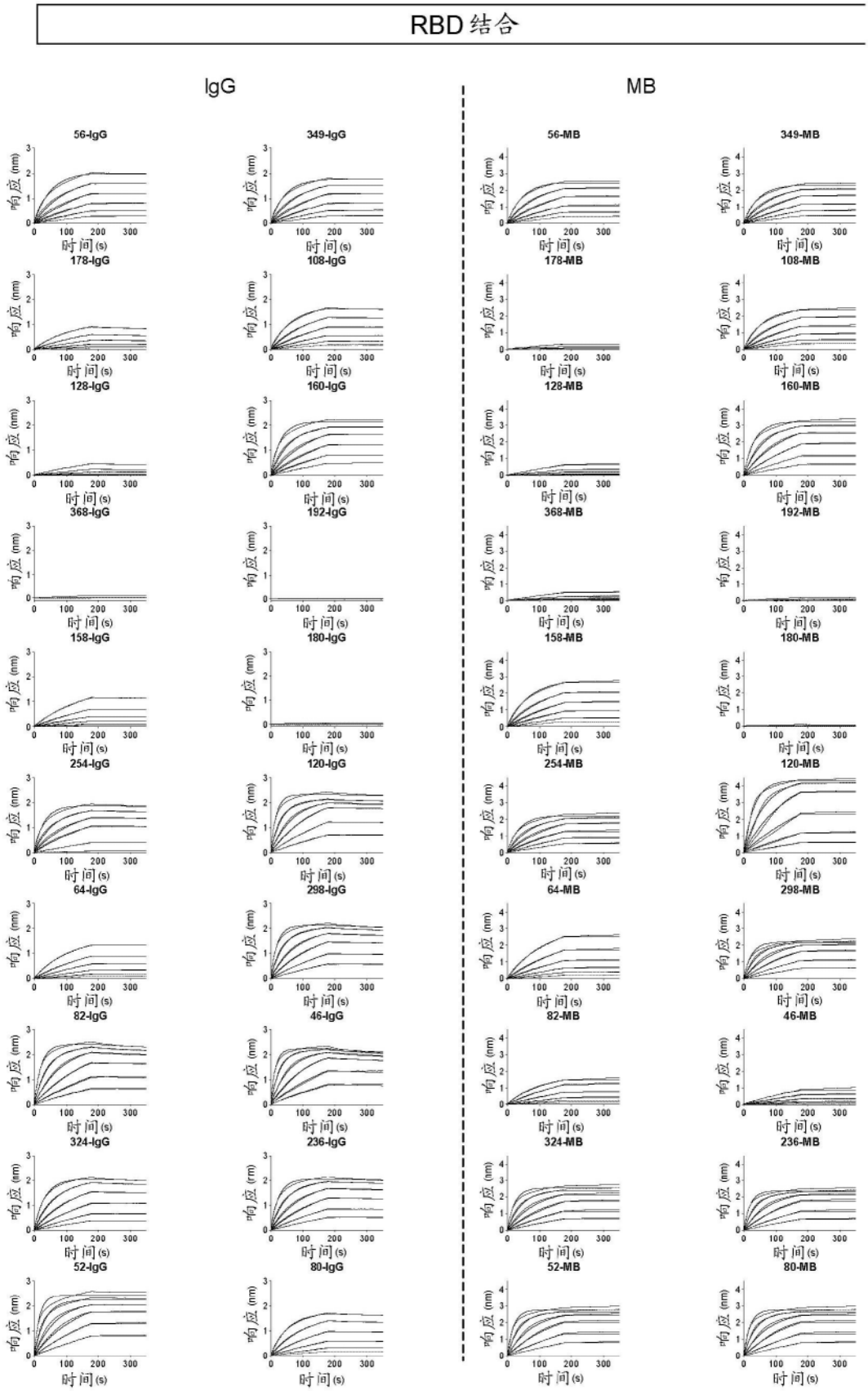

RBD结合
IgG
MB
56-IgG
349-IgG
178-IgG
108-IgG
128-IgG
160-IgG
368-IgG
192-IgG
158-IgG
180-IgG
254-IgG
120-IgG
64-IgG
298-IgG
82-IgG
46-IgG
324-IgG
236-IgG
52-IgG
80-IgG
56-MB
349-MB
178-MB
108-MB
128-MB
160-MB
368-MB
192-MB
158-MB
180-MB
254-MB
120-MB
64-MB
298-MB
82-MB
46-MB
324-MB
236-MB
52-MB
80-MB
响应 (nm)
时间 (s)

图9(第1部分)

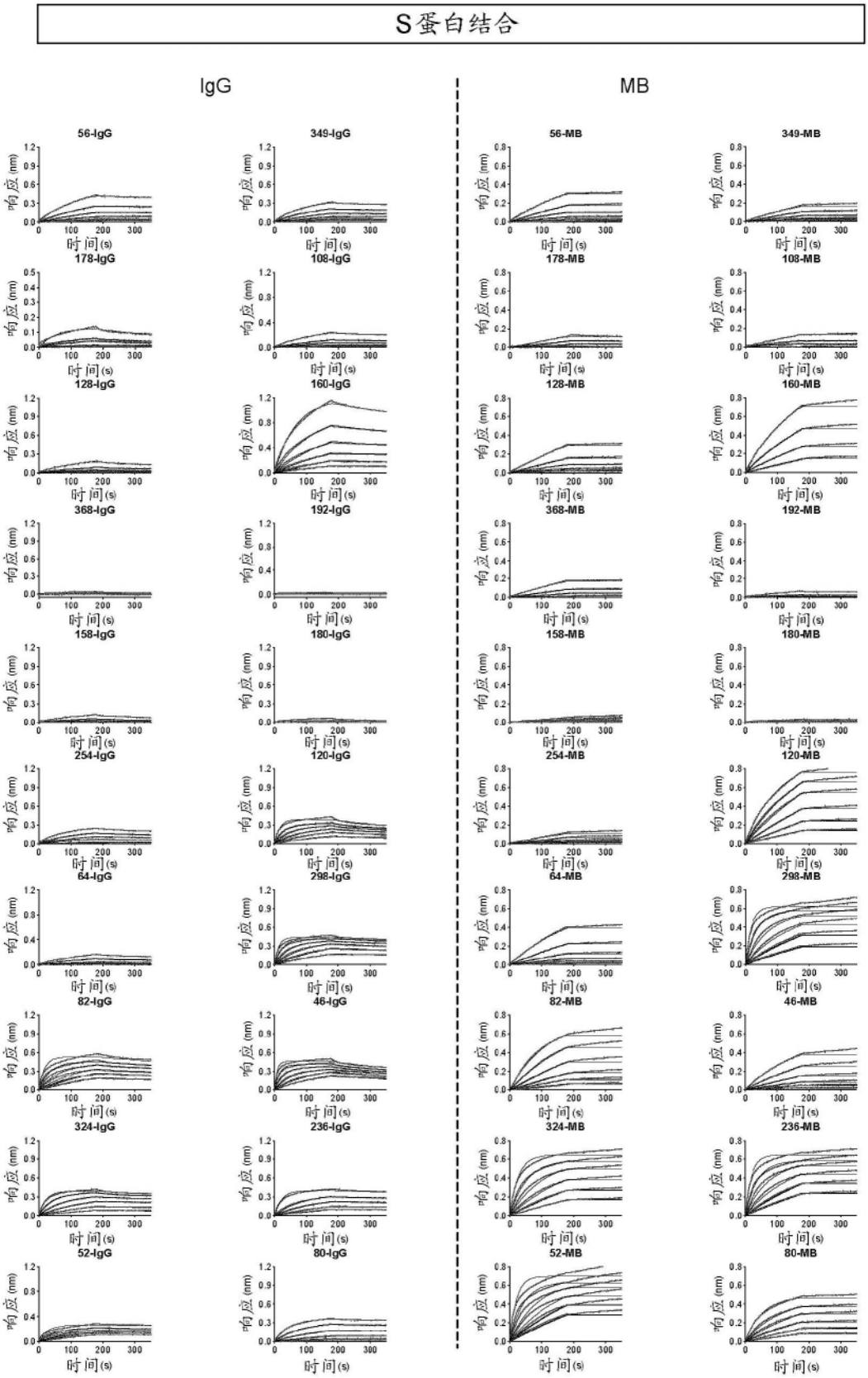

S蛋白结合
IgG
MB
56-IgG
349-IgG
178-IgG
108-IgG
128-IgG
160-IgG
368-IgG
192-IgG
158-IgG
180-IgG
254-IgG
120-IgG
64-IgG
298-IgG
82-IgG
46-IgG
324-IgG
236-IgG
52-IgG
80-IgG
56-MB
349-MB
178-MB
108-MB
128-MB
160-MB
368-MB
192-MB
158-MB
180-MB
254-MB
120-MB
64-MB
298-MB
82-MB
46-MB
324-MB
236-MB
52-MB
80-MB
响应 (nm)
时间 (s)

图9(第2部分)

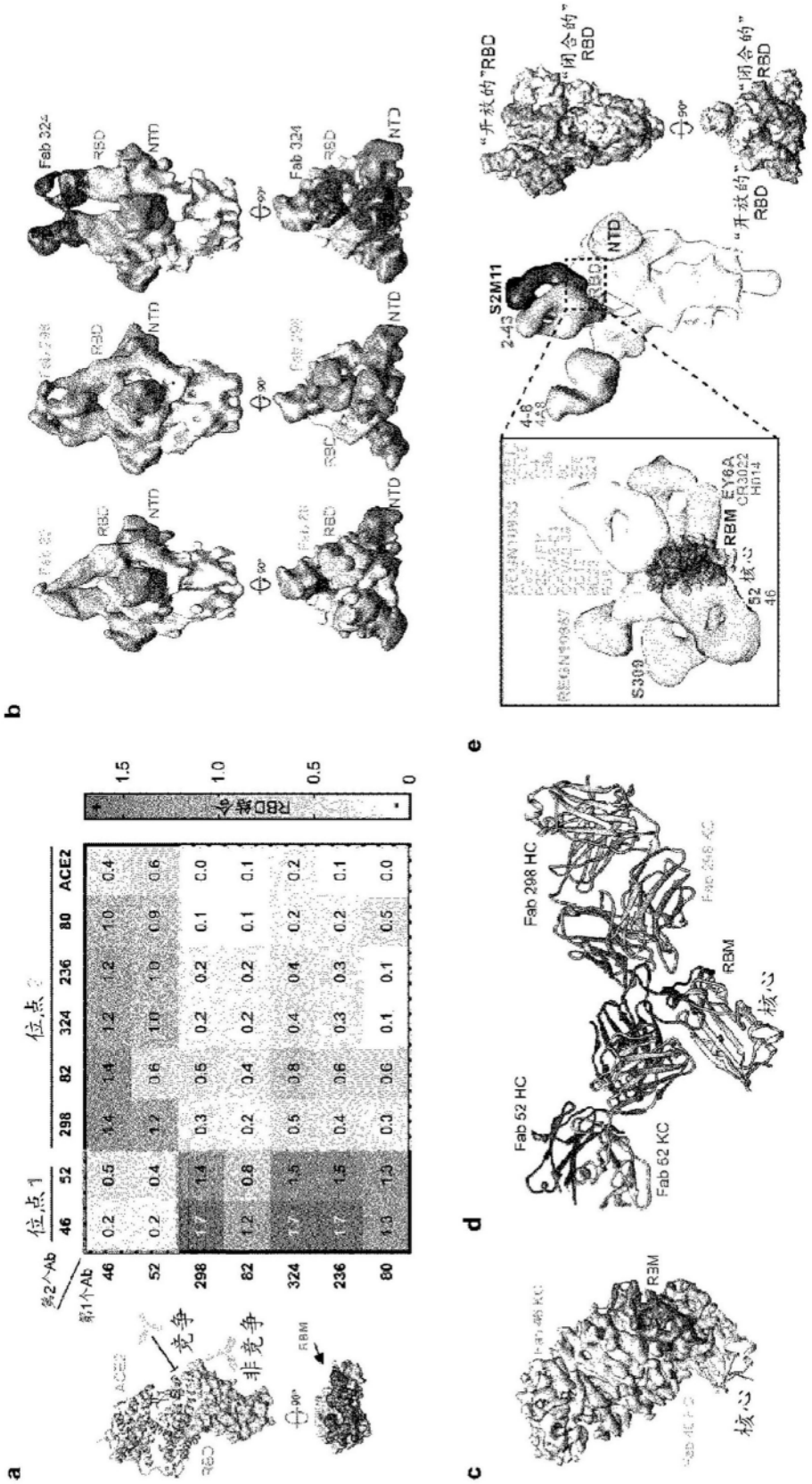

a
位点1
第2个Ab
第1个Ab
46
52
298
82
324
236
80
ACE2
竞争
非竞争
RBM
RBD
RBD结合
b
Fab 324
RBD
NTD
c
RBM
核心
d
Fab 52 HC
Fab 52 KC
Fab 298 HC
RBM
核心
e
S2M11
2-43
4-8
4A8
RBD
NTD
"开放的"RBD
"闭合的"RBD
S309
RBM
52
46
核心

图10

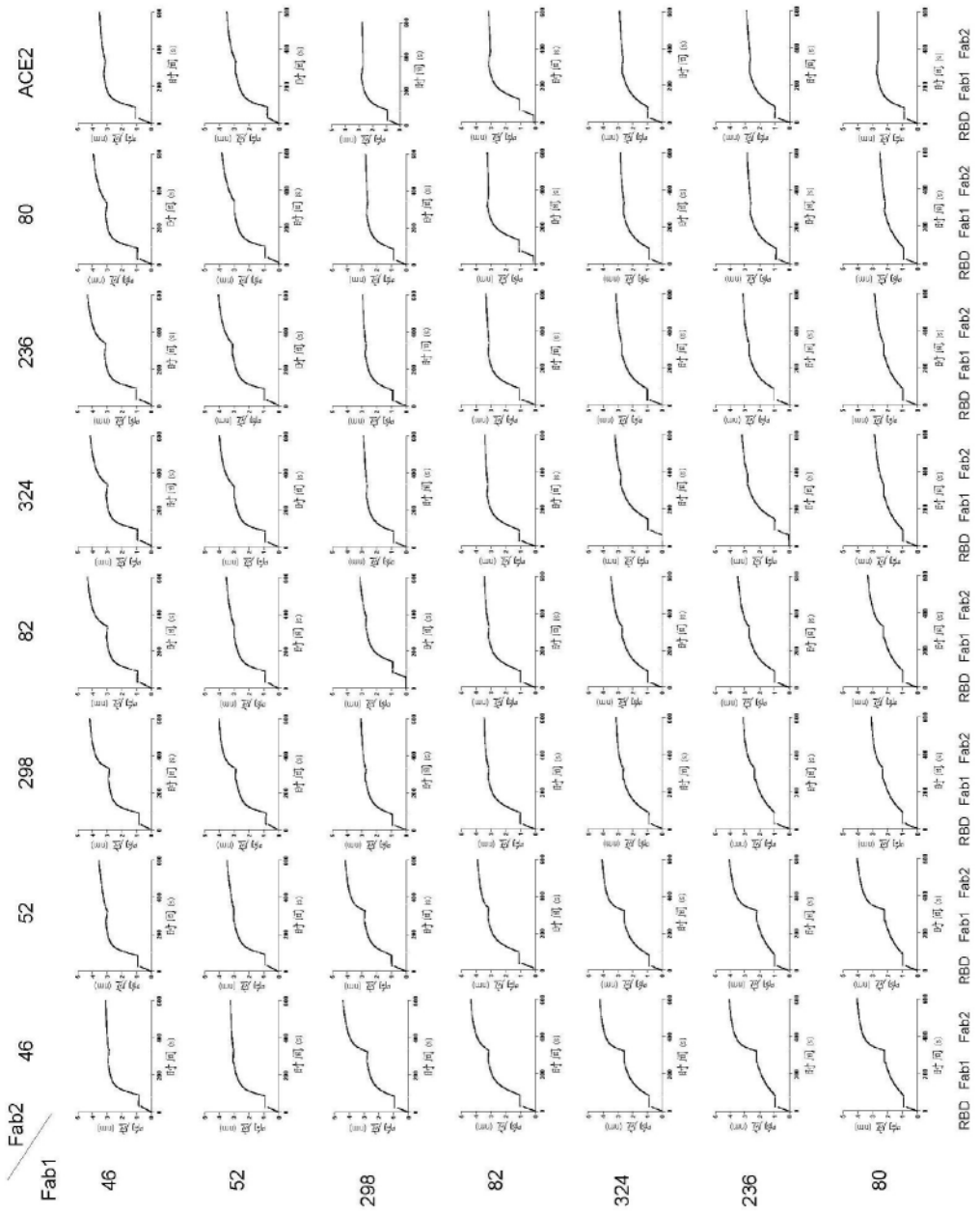


图11

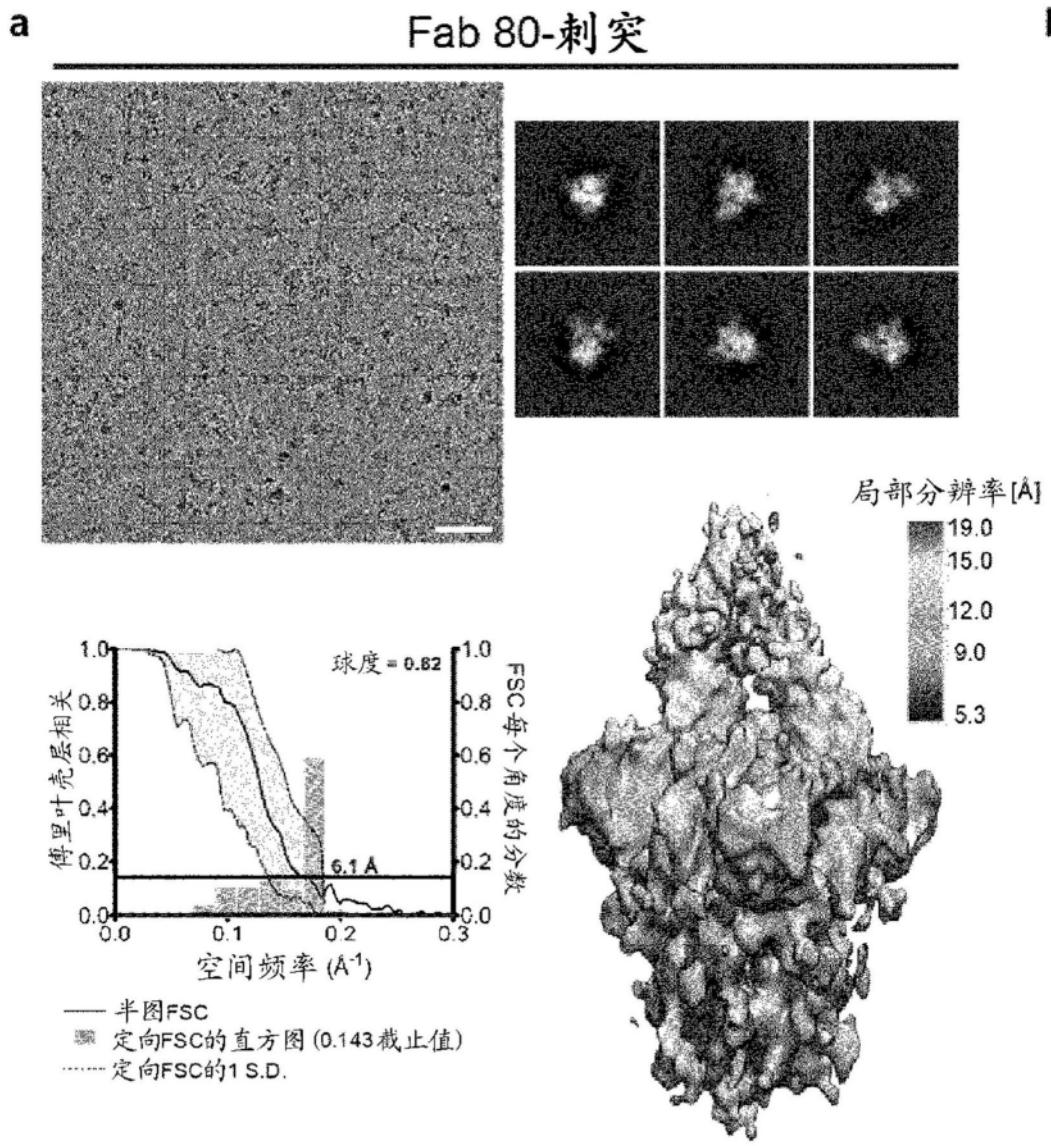

a
Fab 80-刺突
b
局部分辨率[Å]
19.0
15.0
12.0
9.0
5.3
球度 = 0.82
6.1 Å
傅里叶壳层相关
FSC每个角度的分数
空间频率 (Å-1)
半图FSC
定向FSC的直方图 (0.143截止值)
定向FSC的1 S.D.

图12a

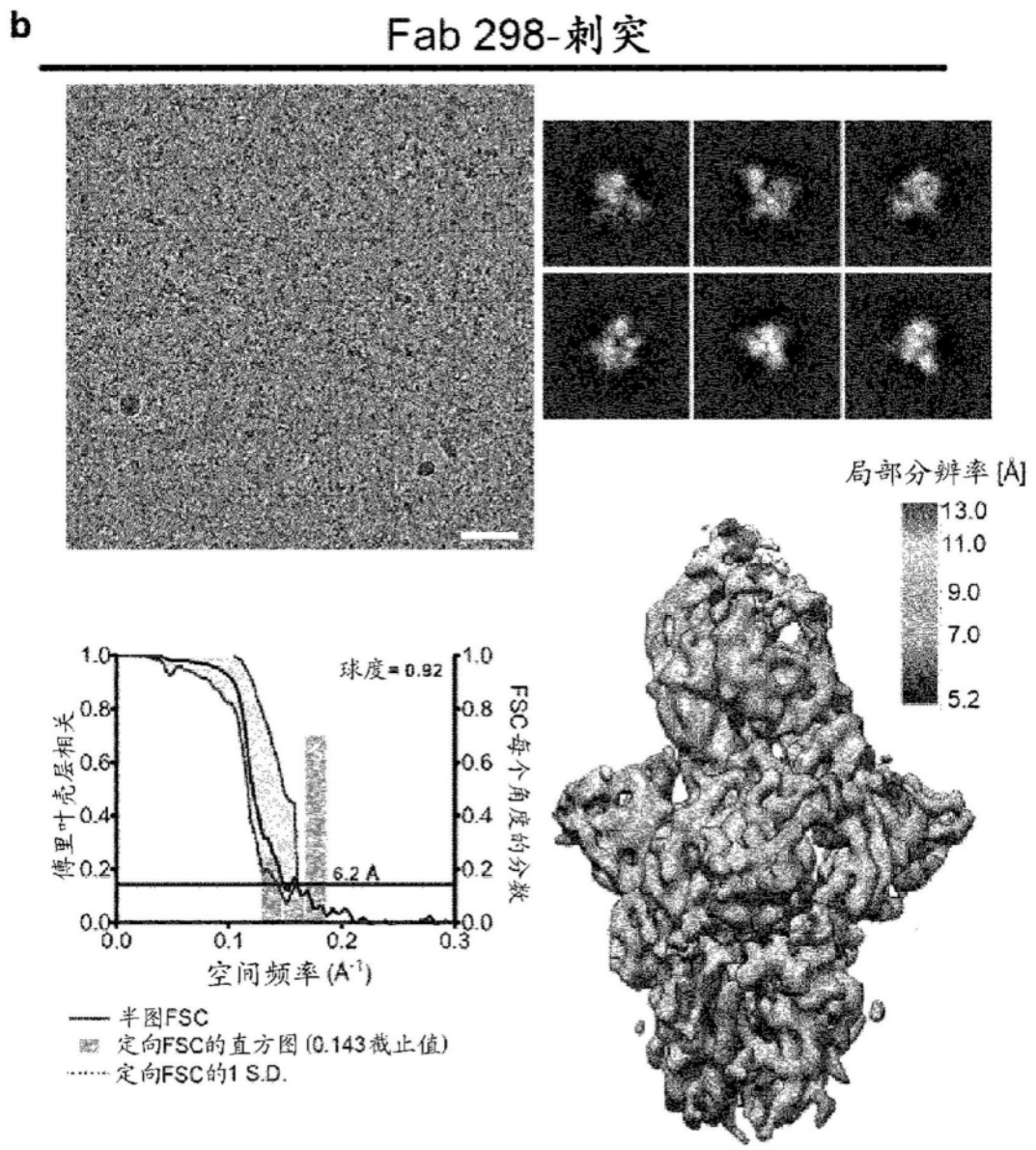

b
Fab 298-刺突
局部分辨率 [Å]
13.0
11.0
9.0
7.0
5.2
球度 = 0.92
6.2 Å
傅里叶壳层相关
FSC每个角度的分数
空间频率 (Å⁻¹)
半图FSC
定向FSC的直方图 (0.143截止值)
定向FSC的1 S.D.

图12b

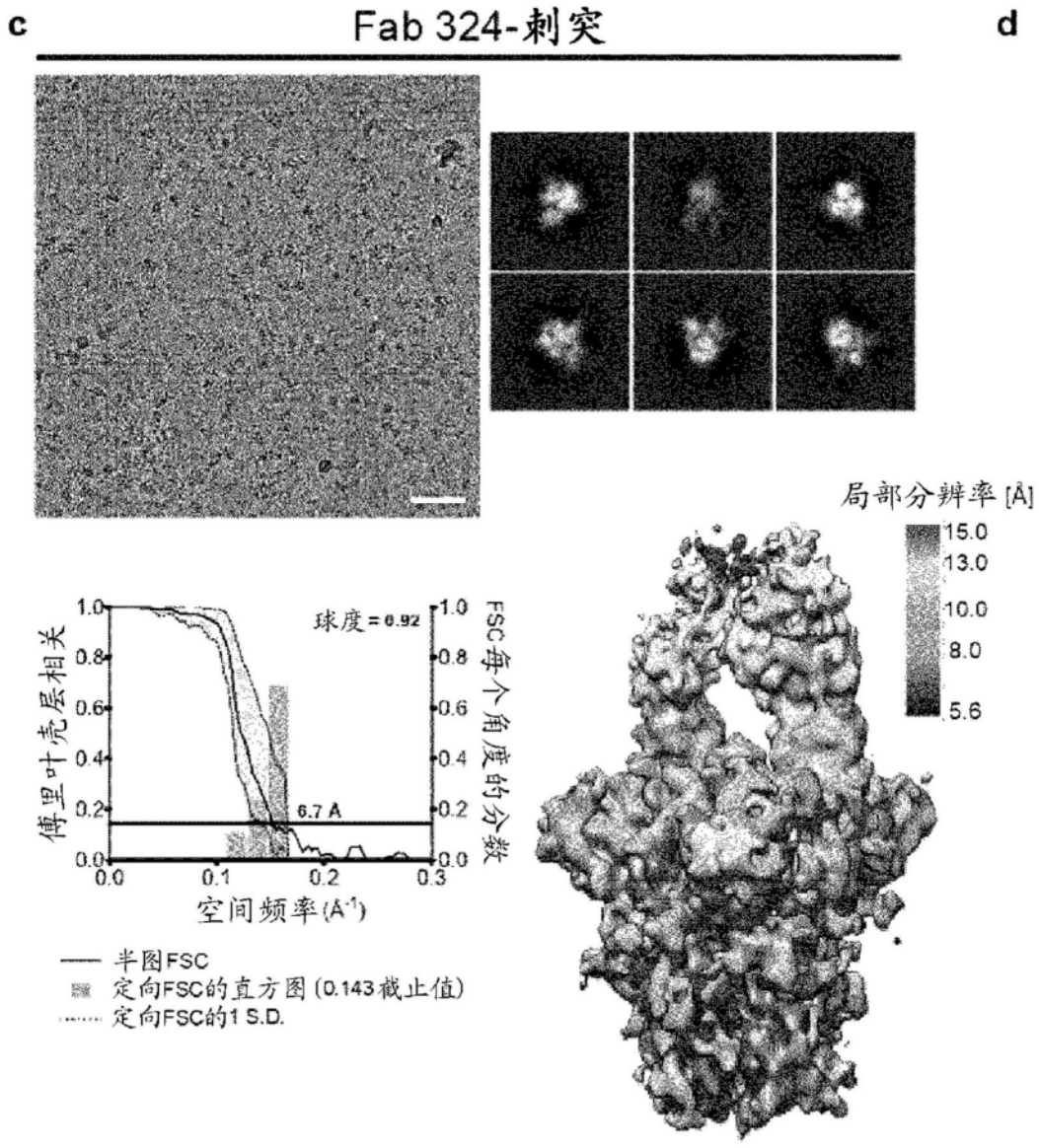

c
Fab 324-刺突
d
局部分辨率 [Å]
15.0
13.0
10.0
8.0
5.6
球度 = 0.92
6.7 Å
傅里叶壳层相关
FSC每个角度的分数
空间频率 (Å⁻¹)
半图FSC
定向FSC的直方图 (0.143截止值)
定向FSC的1 S.D.

图12c

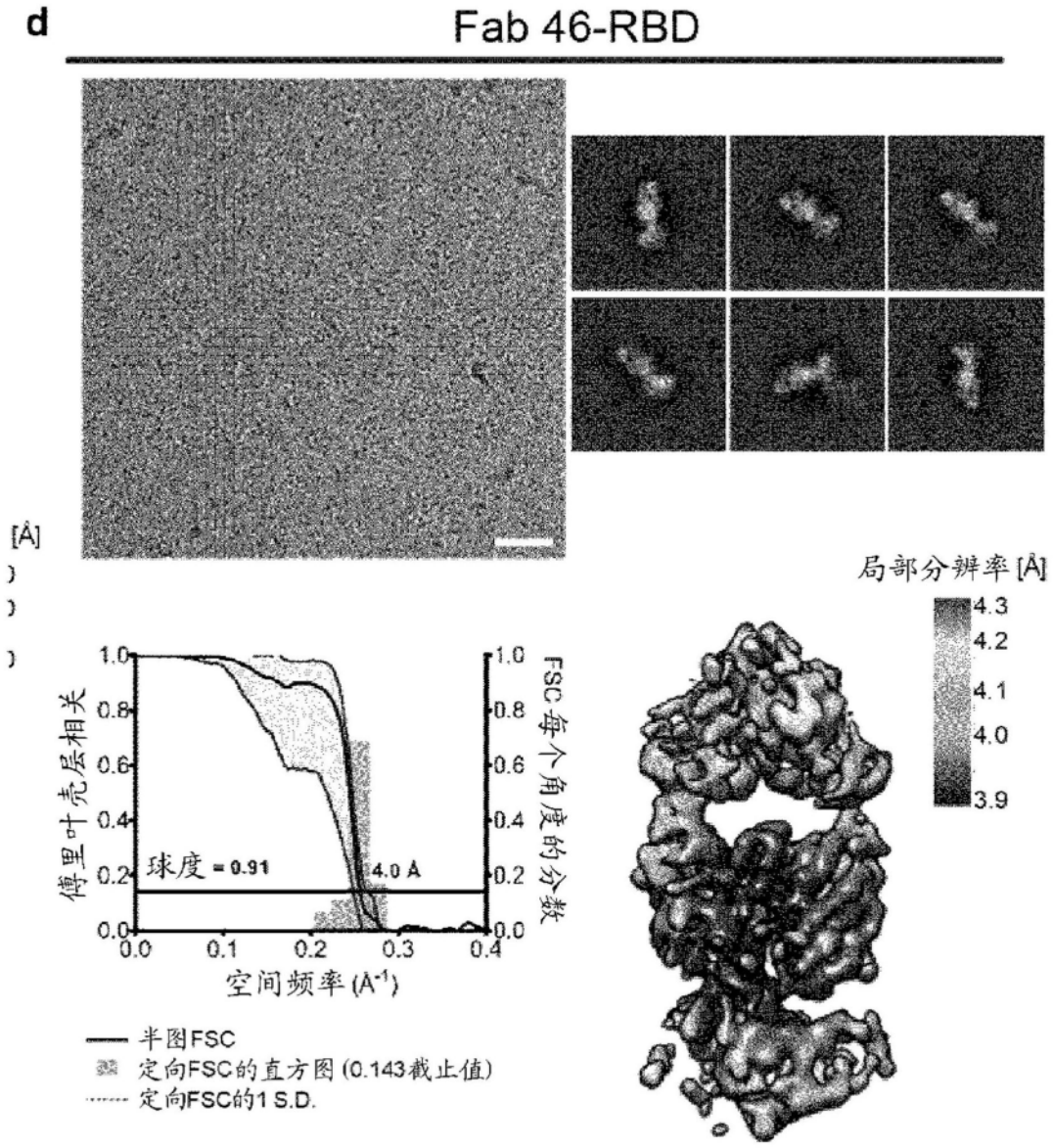

d
Fab 46-RBD
[Å]
局部分辨率 [Å]
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
傅里叶壳层相关
FSC 每个角度的分数
球度 = 0.91
4.0 Å
空间频率 (Å-1)
半图FSC
定向FSC的直方图 (0.143截止值)
定向FSC的1 S.D.

图12d

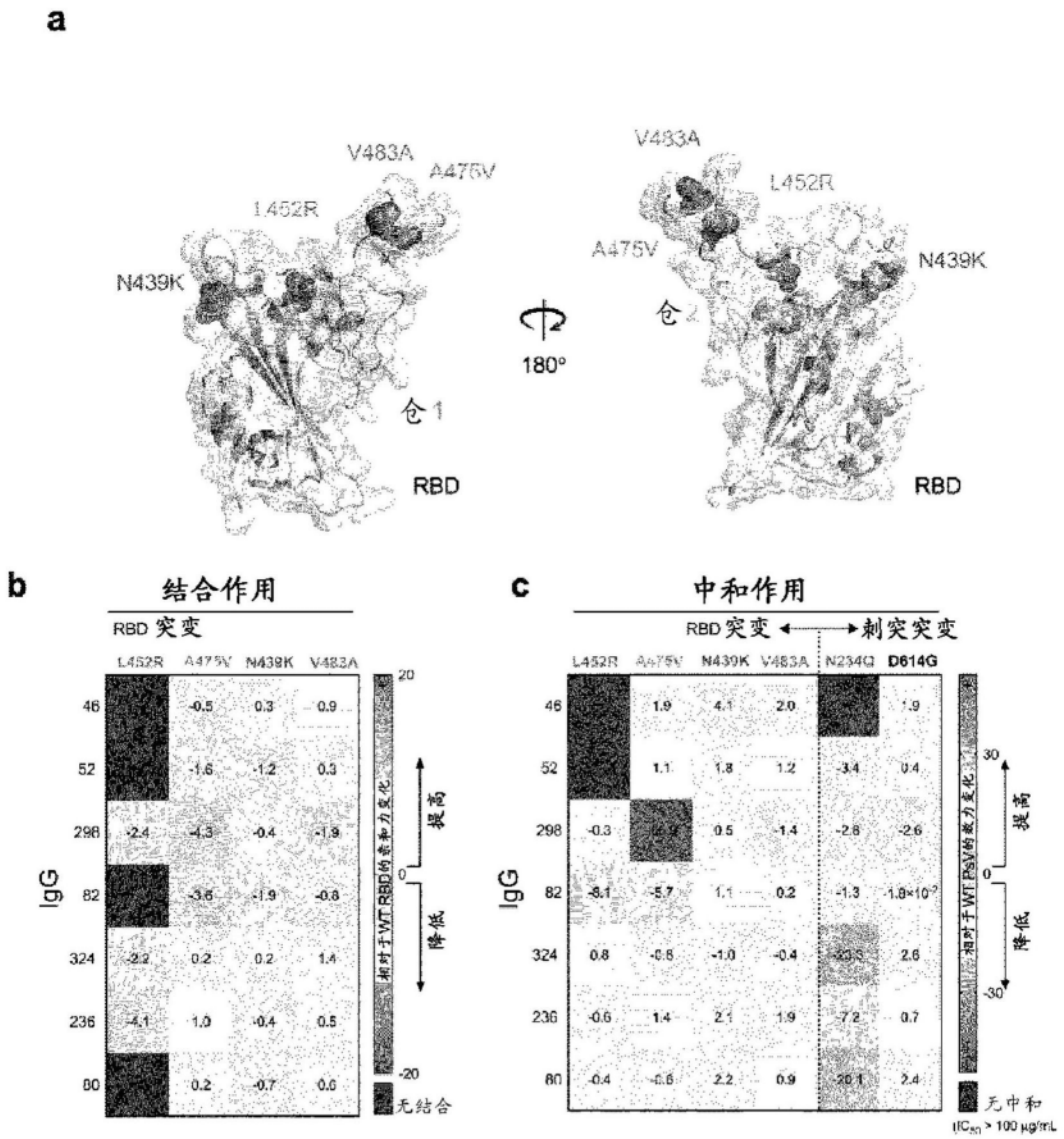


图13a、图13b、图13c

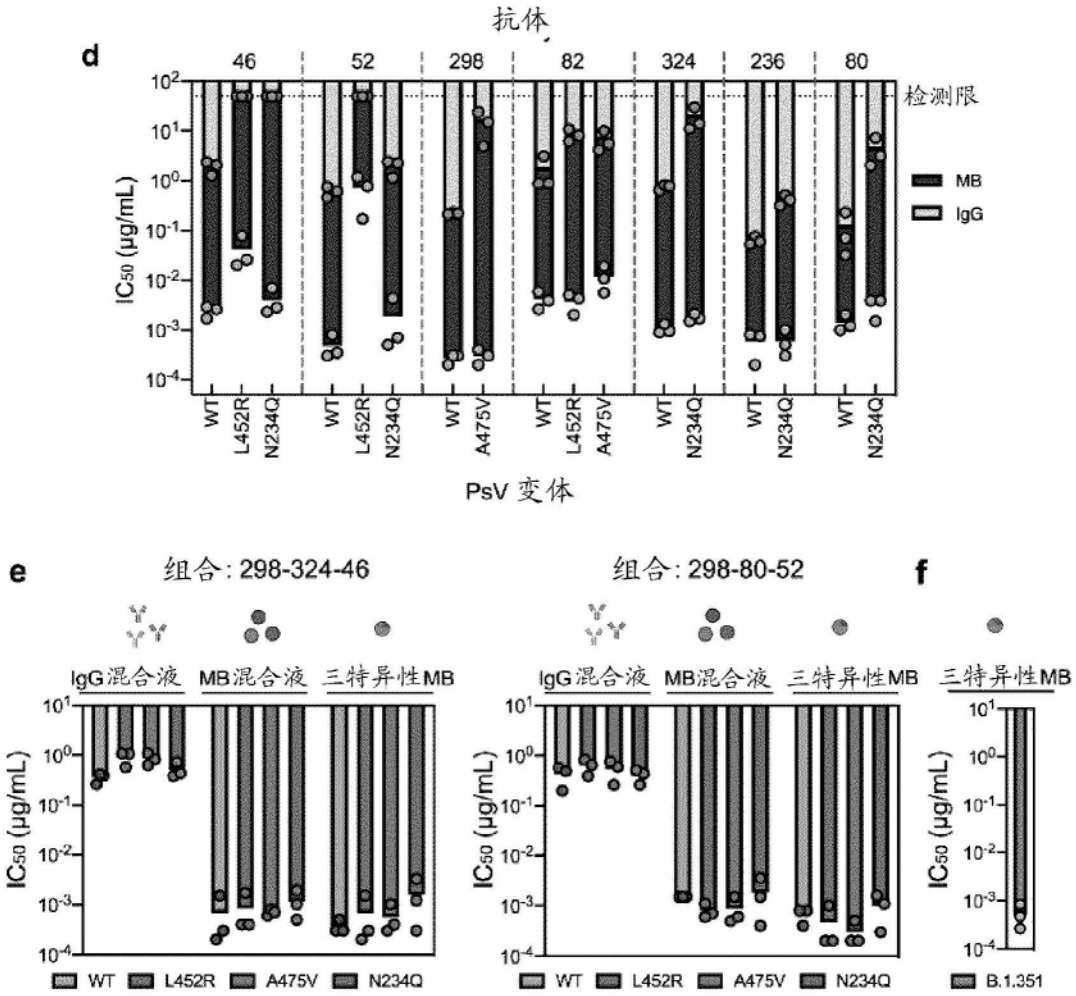


图13d、图13e、图13f

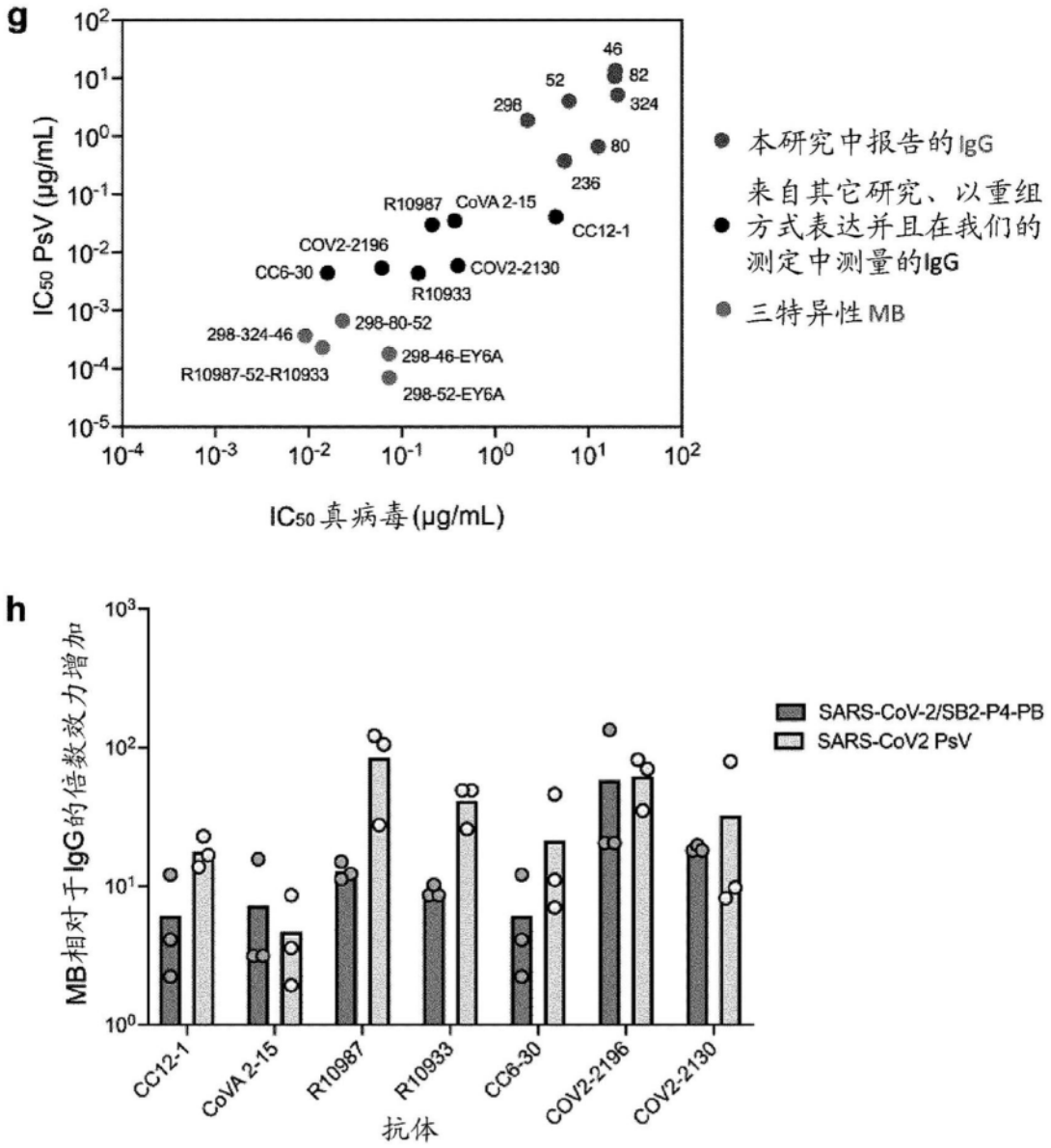

g
IC50 PsV (μg/mL)
IC50 真病毒 (μg/mL)
46
82
52
324
298
80
236
R10987
CoVA 2-15
CC12-1
COV2-2196
CC6-30
COV2-2130
R10933
298-80-52
298-324-46
298-46-EY6A
R10987-52-R10933
298-52-EY6A
本研究中报告的IgG
来自其它研究、以重组方式表达并且在我们的测定中测量的IgG
三特异性 MB
h
MB相对于IgG的倍数效力增加
SARS-CoV-2/SB2-P4-PB
SARS-CoV2 PsV
CC12-1
CoVA 2-15
R10987
R10933
CC6-30
COV2-2196
COV2-2130
抗体

图13g、图13h

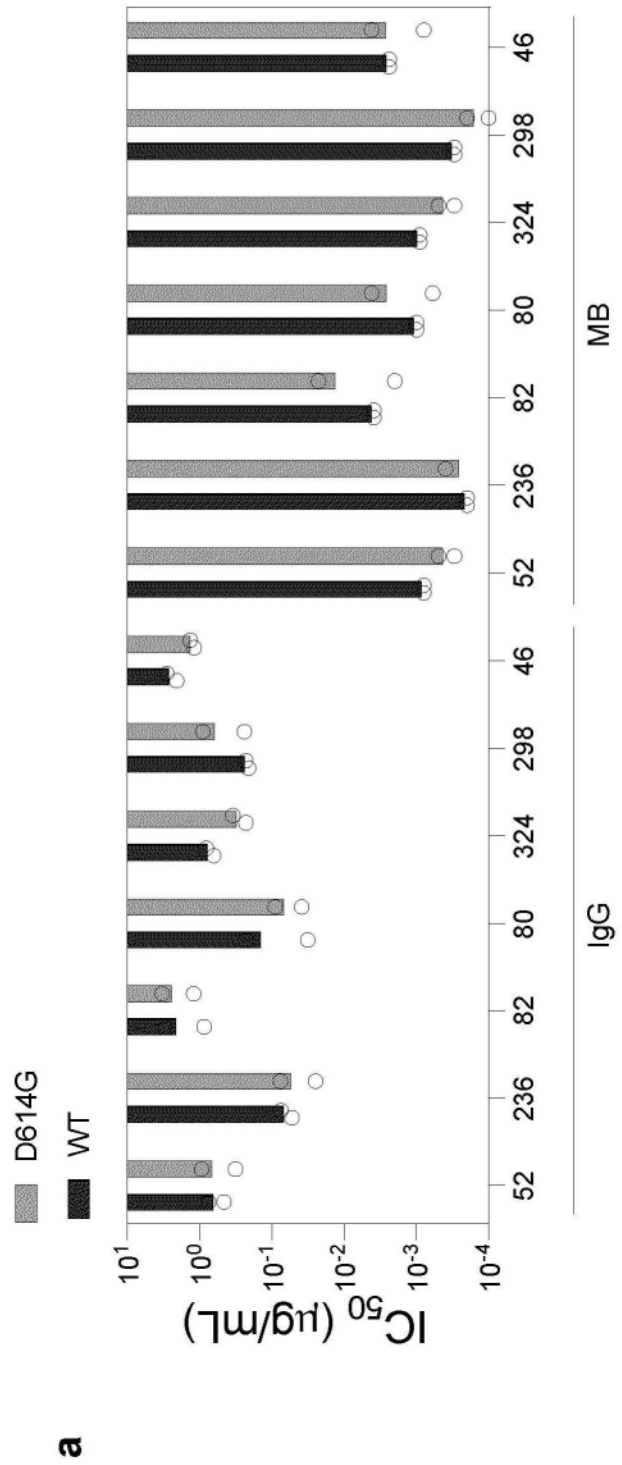

a
D614G
WT
IC50 (μg/mL)
10^1
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
MB
IgG
46
298
324
80
82
236
52

图14a

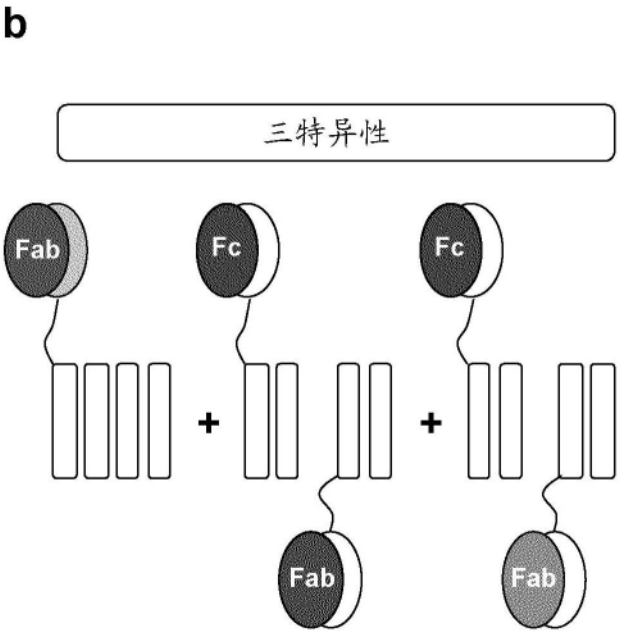


图14b

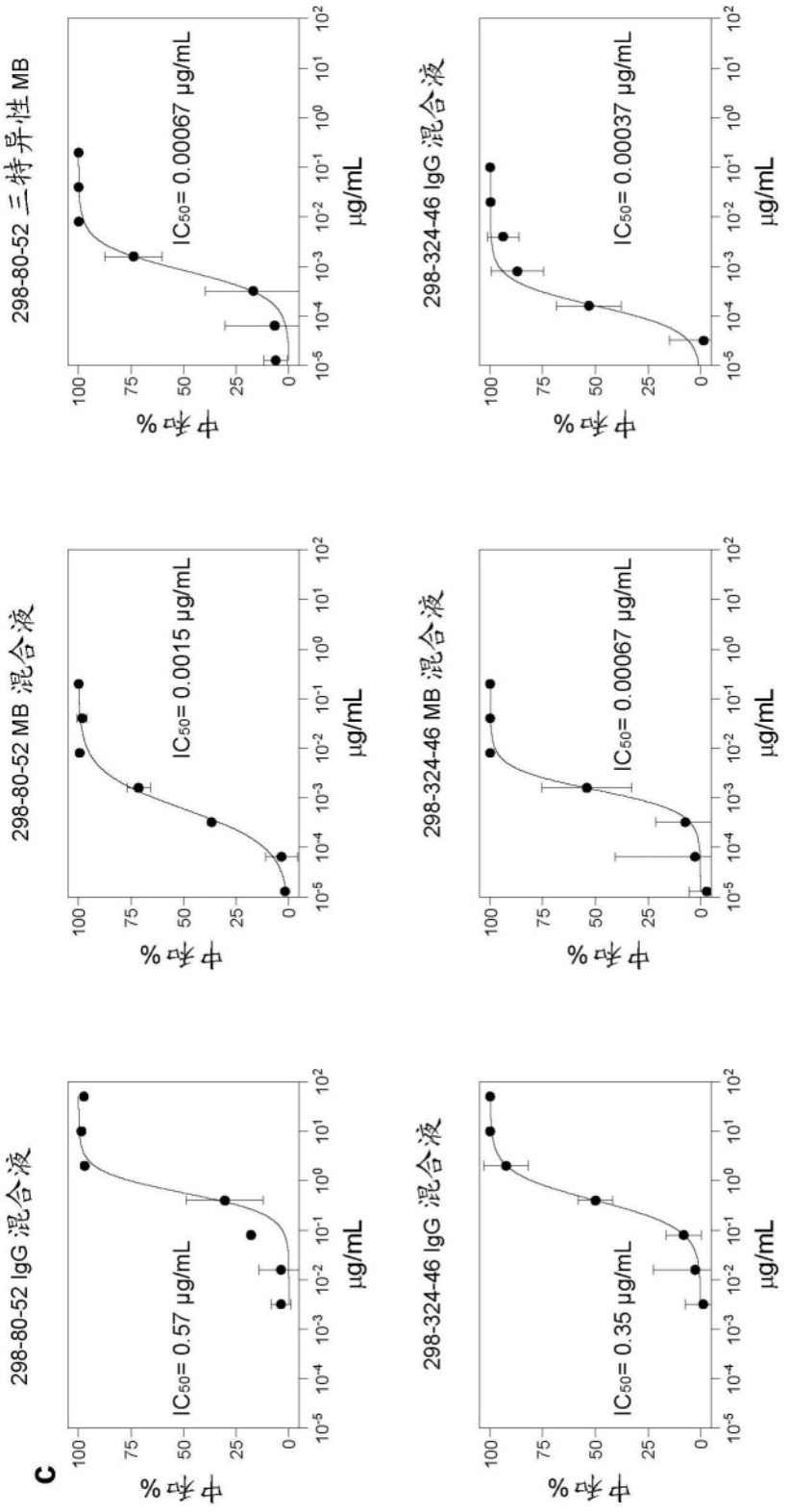

C
298-80-52 三特异性 MB
IC50= 0.00067 µg/mL
298-80-52 MB 混合液
IC50= 0.0015 µg/mL
298-80-52 IgG 混合液
IC50= 0.57 µg/mL
298-324-46 MB 混合液
IC50= 0.00067 µg/mL
298-324-46 IgG 混合液
IC50= 0.00037 µg/mL
IC50= 0.35 µg/mL
中和%
µg/mL

图14c

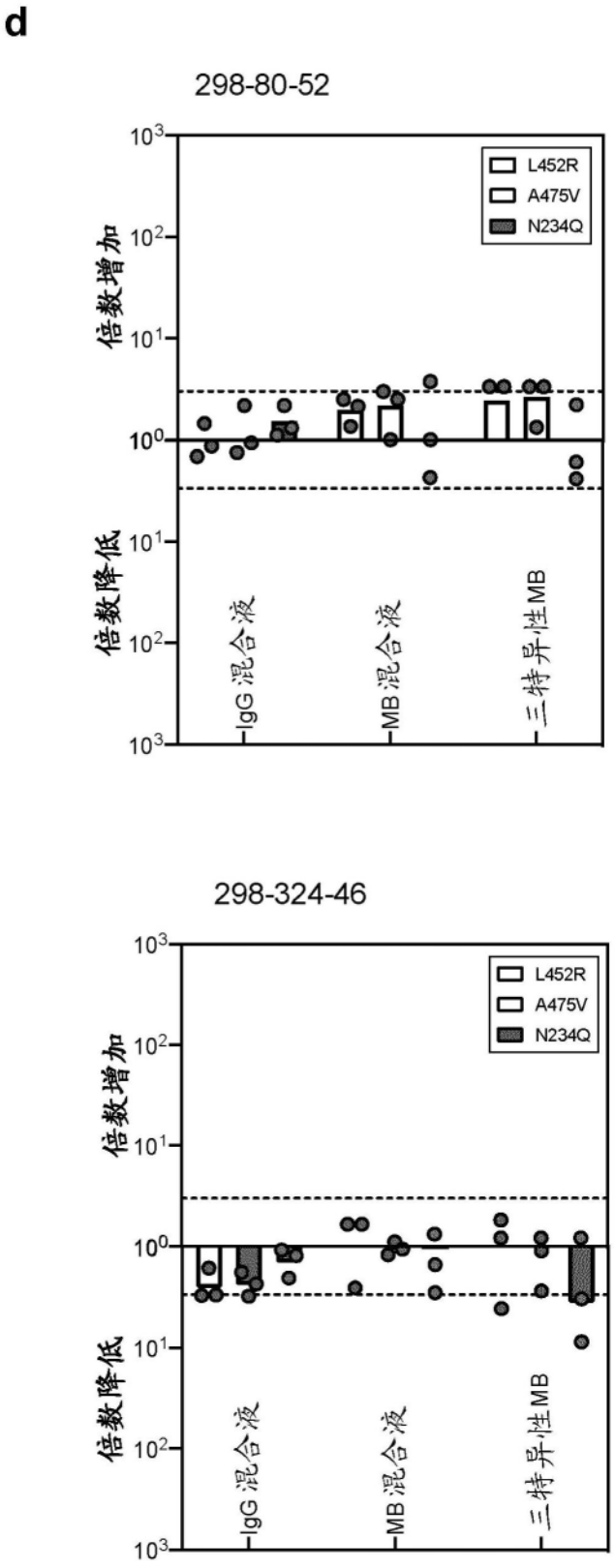

d
298-80-52
L452R
A475V
N234Q
倍数增加
倍数降低
IgG 混合液
MB 混合液
三特异性MB
298-324-46
L452R
A475V
N234Q
倍数增加
倍数降低
IgG 混合液
MB 混合液
三特异性MB

图14d

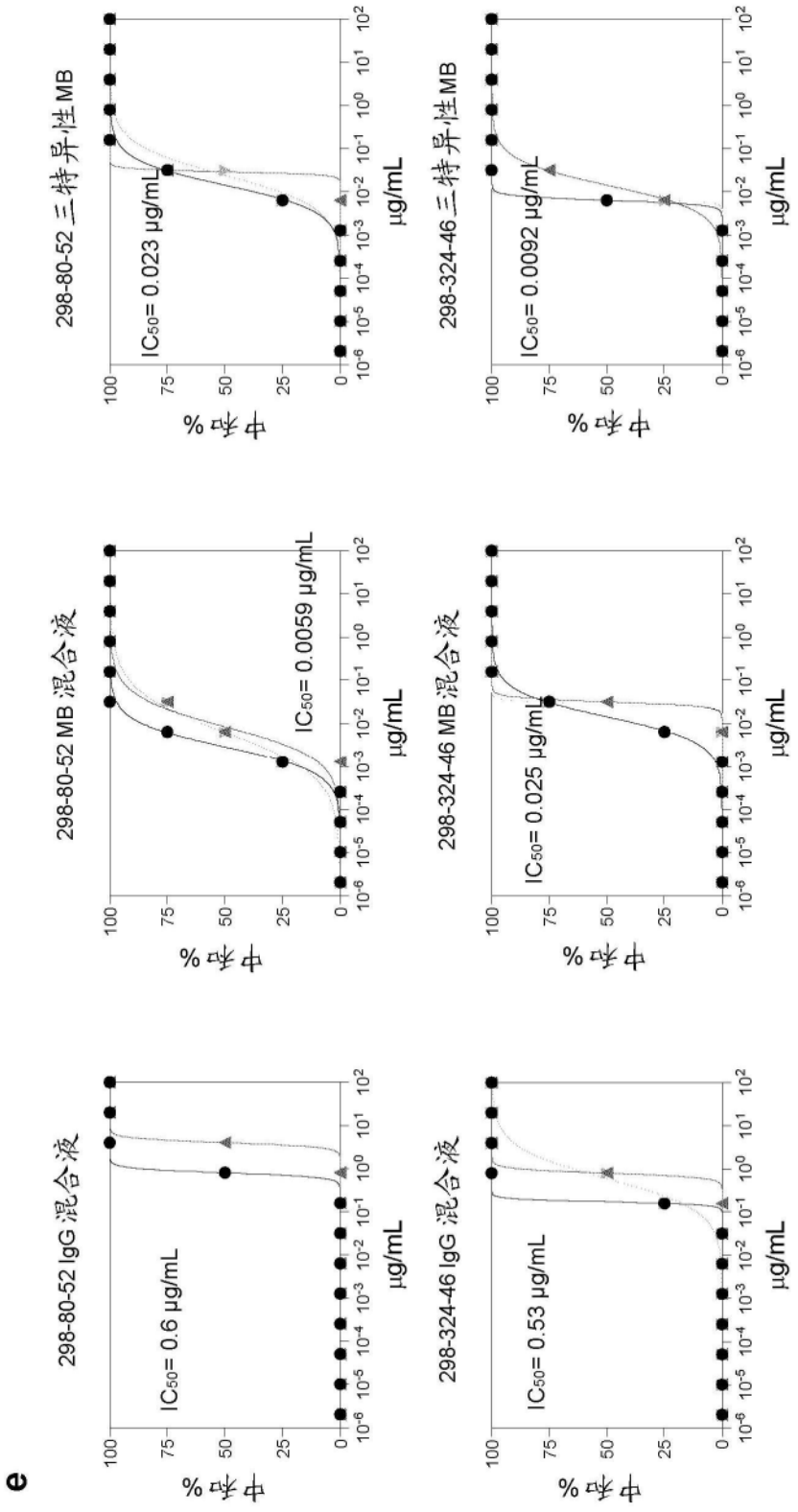

e
298-80-52 三特异性MB
IC50= 0.023 μg/mL
298-324-46 三特异性MB
IC50= 0.0092 μg/mL
298-80-52 MB 混合液
IC50= 0.0059 μg/mL
298-324-46 MB 混合液
IC50= 0.025 μg/mL
298-80-52 IgG 混合液
IC50= 0.6 μg/mL
298-324-46 IgG 混合液
IC50= 0.53 μg/mL
中和%
μg/mL

图14e

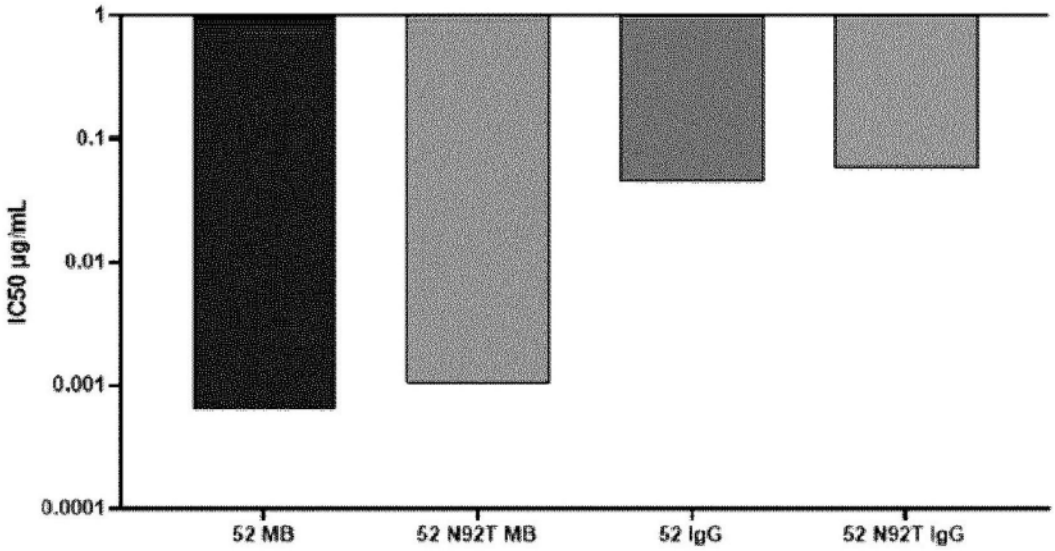
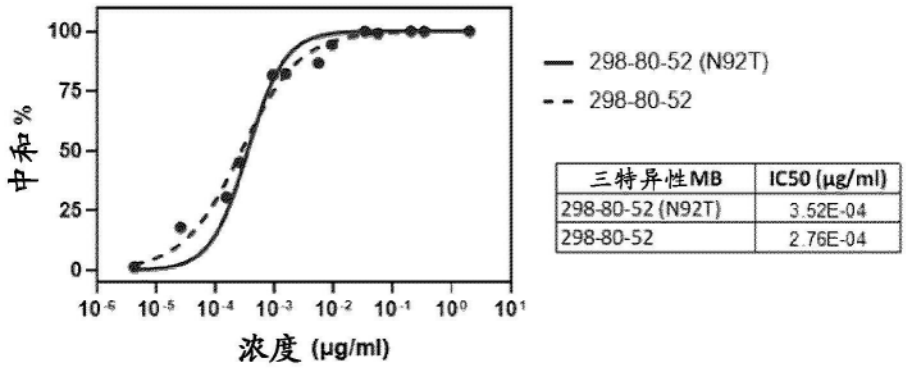


图15



三特异性MB	IC50 (μg/ml)
298-80-52 (N92T)	3.52E-04
298-80-52	2.76E-04

图16

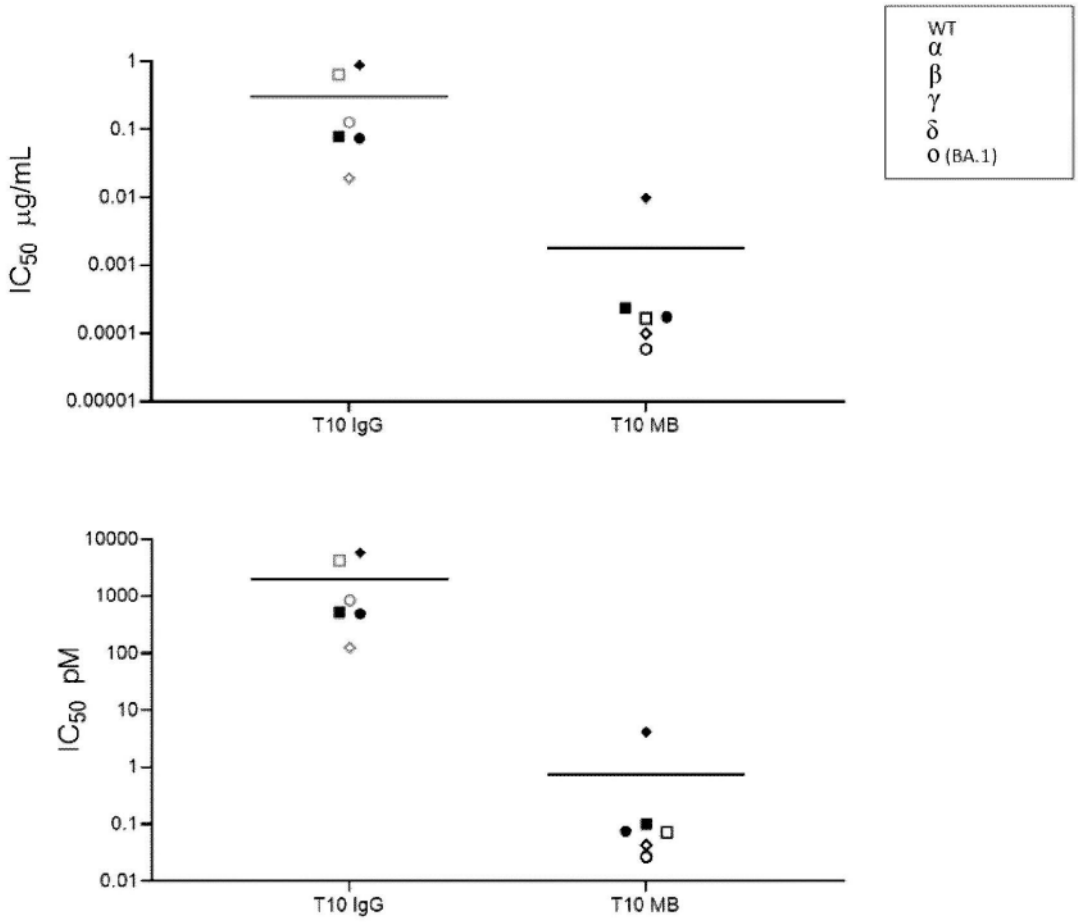
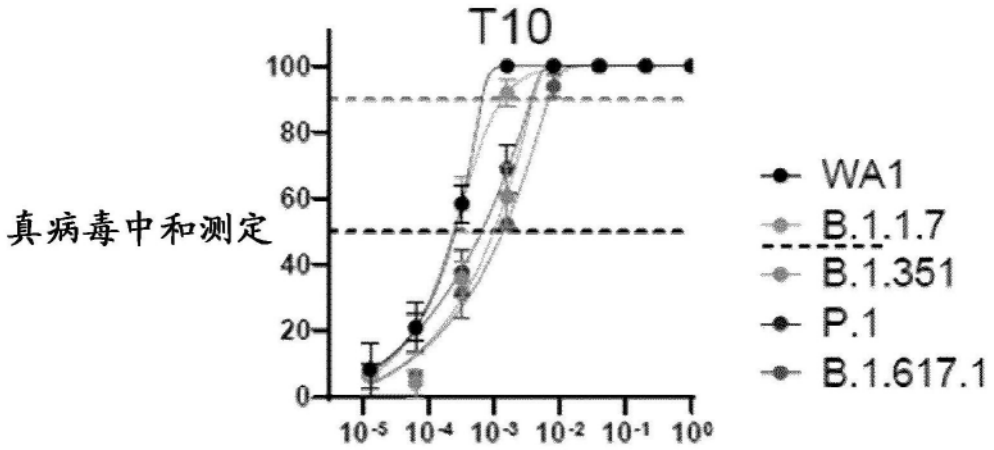

WT
α
β
γ
δ
o (BA.1)
IC50 µg/mL
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
T10 IgG
T10 MB
IC50 pM
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
T10 IgG
T10 MB

图17



	效力IC50 (ng/mL)				
构建体	WA1	B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.1
T10	0.25	0.24	0.99	0.64	1.38

图18

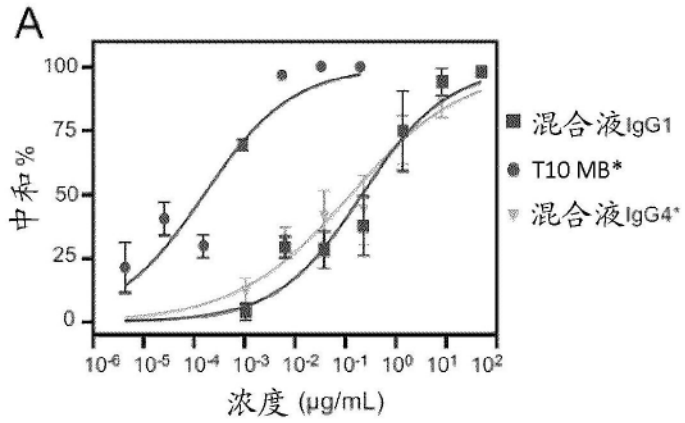


图19a

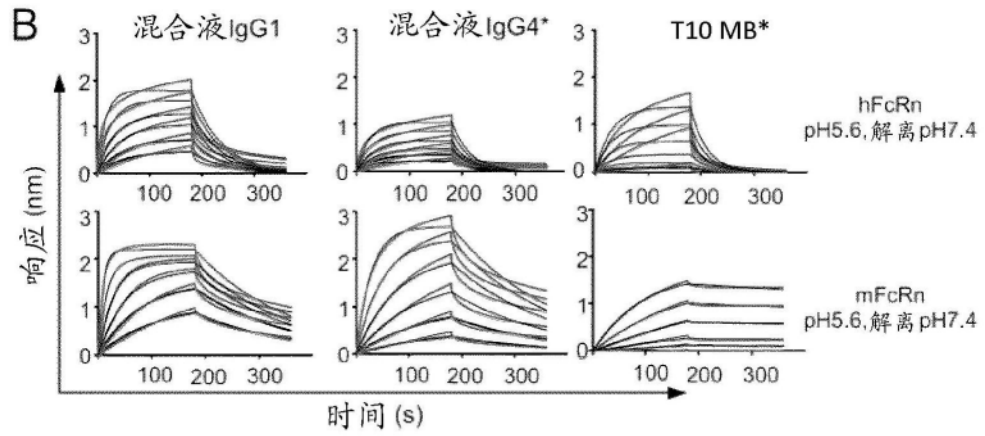


图19b

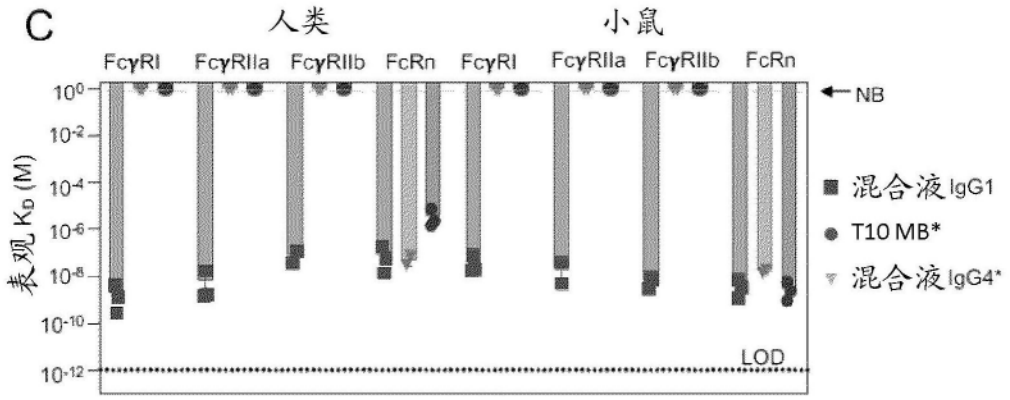


图19c

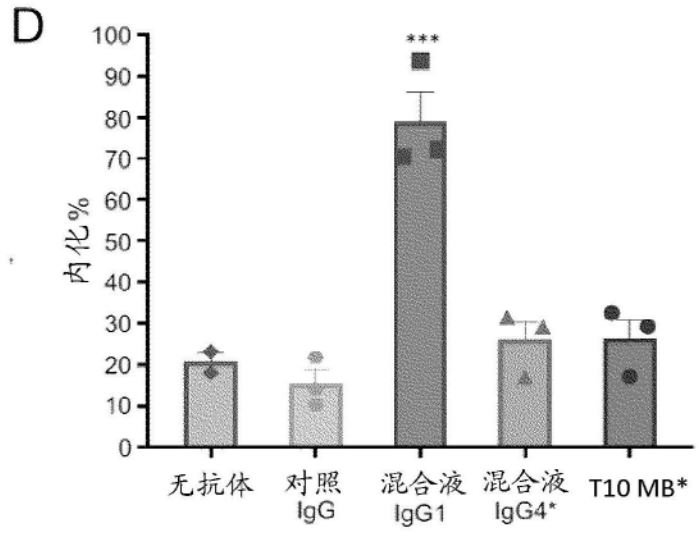


图19d

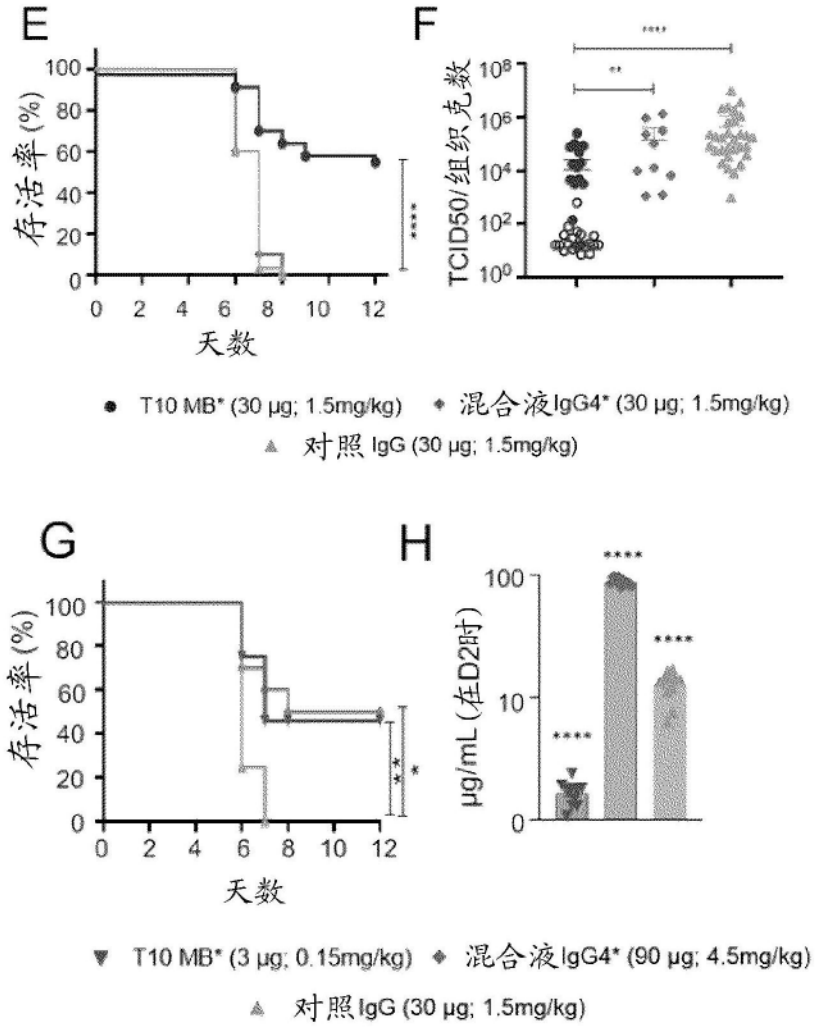


图19e、图19f、图19g、图19h

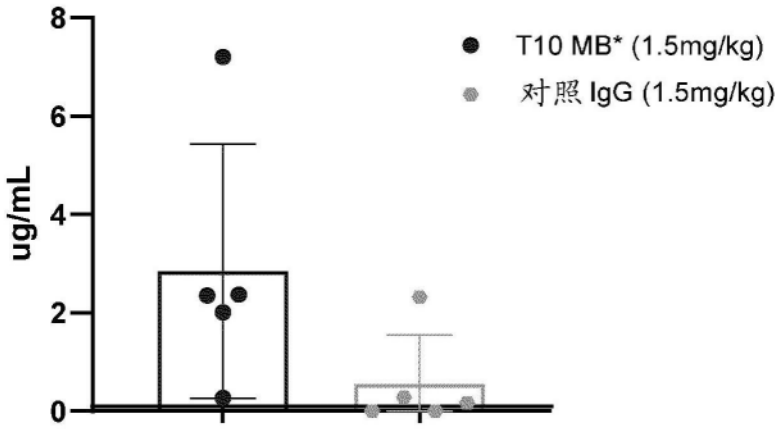


图19i

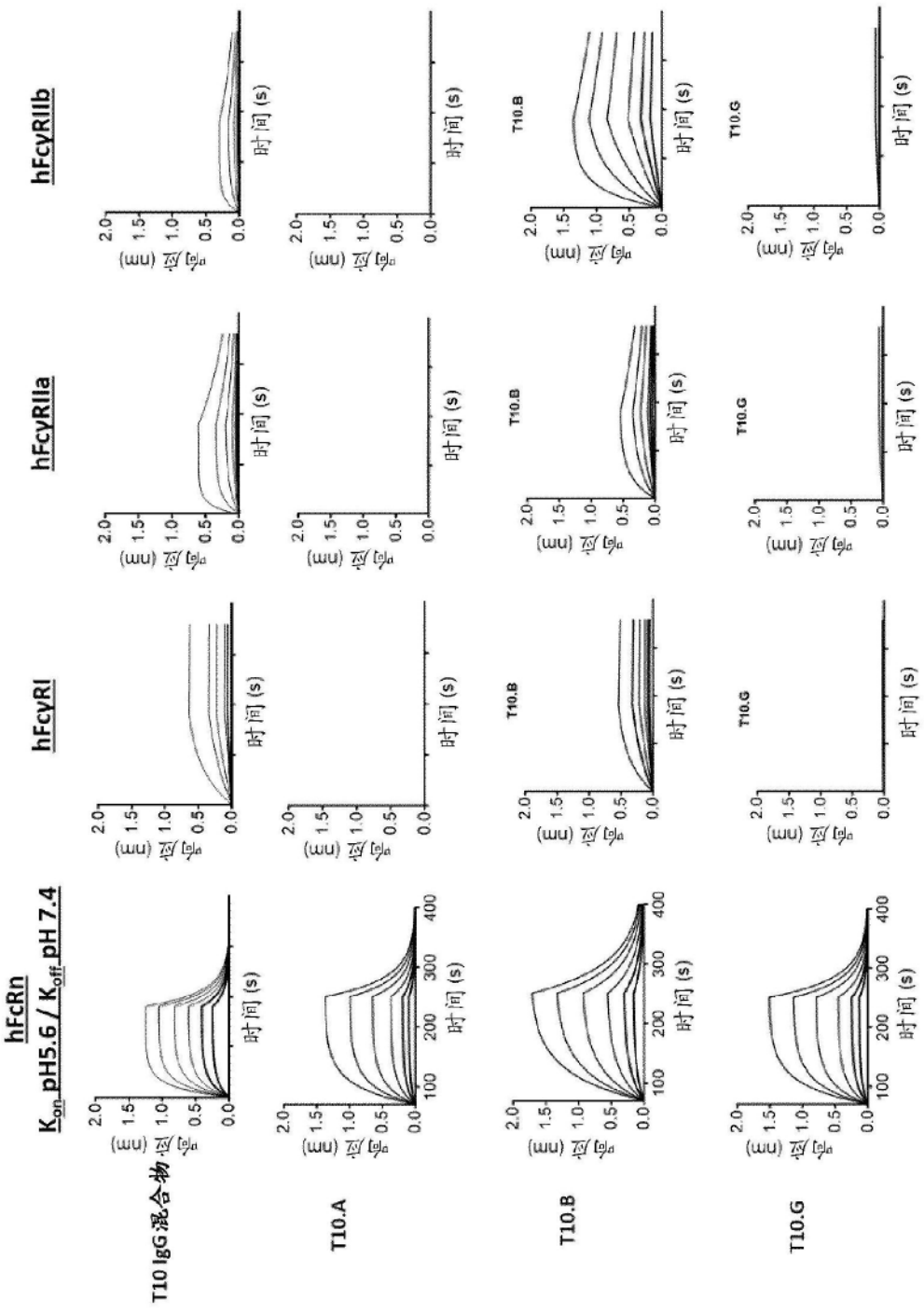

hFcRn
K_{on} pH5.6 / K_{off} pH 7.4
hFcγRI
hFcγRIIa
hFcγRIIb
T10 IgG混合物
T10.A
T10.B
T10.G
时间 (s)
nm)

图20a

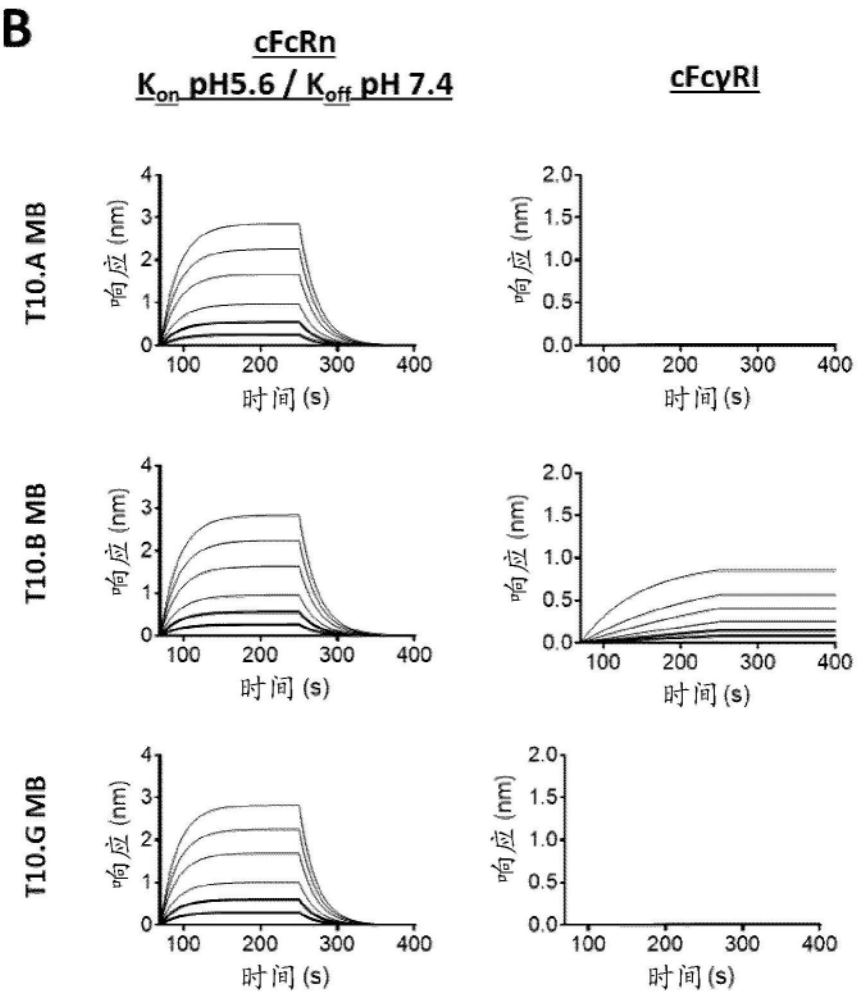

B
cFcRn
Kon pH5.6 / Koff pH 7.4
cFcγRI
T10.A MB
T10.B MB
T10.G MB
响应 (nm)
时间 (s)

图20b

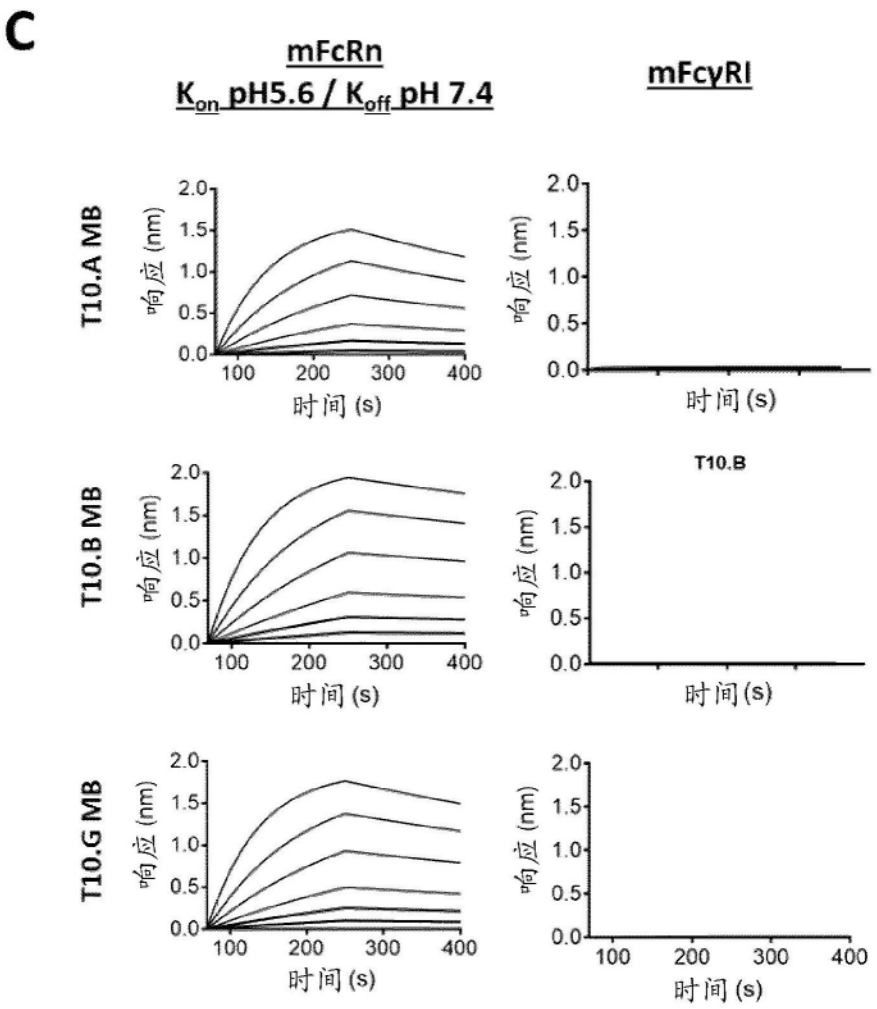

C
mFcRn
Kon pH5.6 / Koff pH 7.4
mFcγRI
T10.A MB
T10.B MB
T10.G MB
T10.B
响应 (nm)
时间 (s)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100
200
300
400

图20c

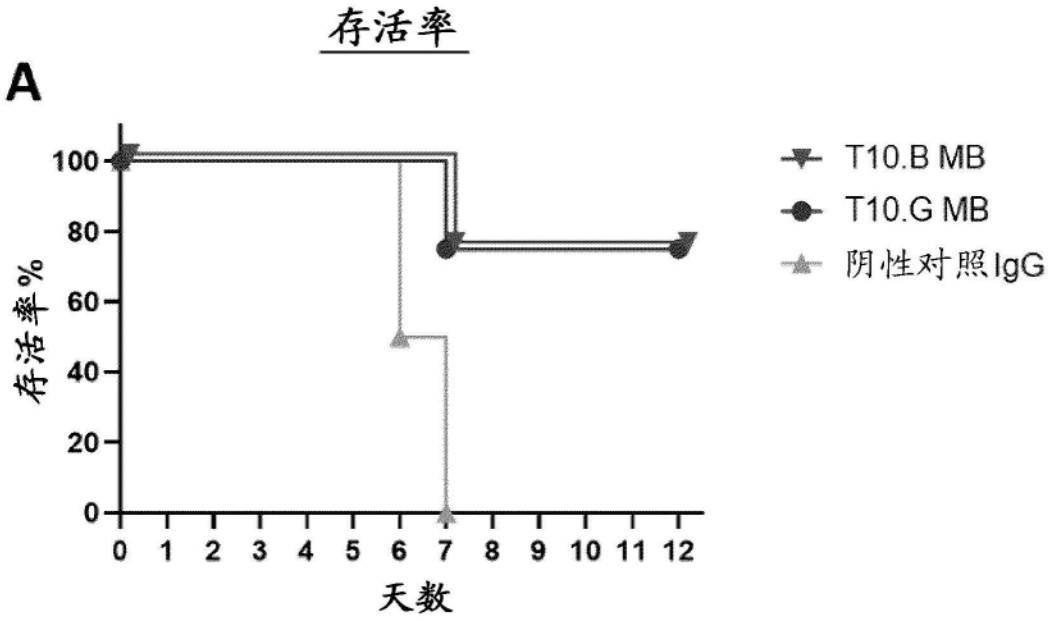

存活率
A
100
80
60
40
20
0
存活率%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
天数
T10.B MB
T10.G MB
阴性对照IgG

图21a

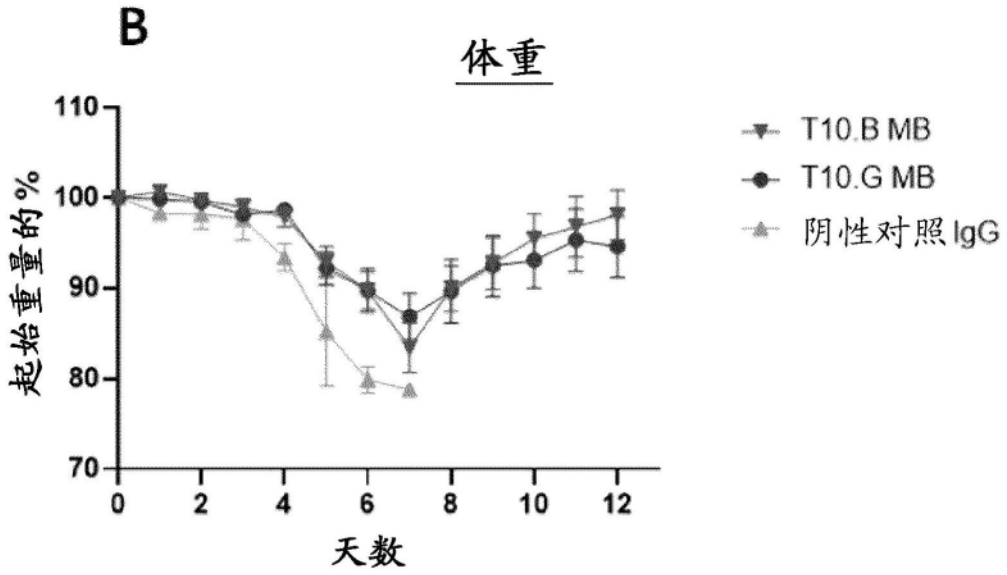

B
体重
110
100
90
80
70
起始重量的%
0 2 4 6 8 10 12
天数
T10.B MB
T10.G MB
阴性对照IgG

图21b

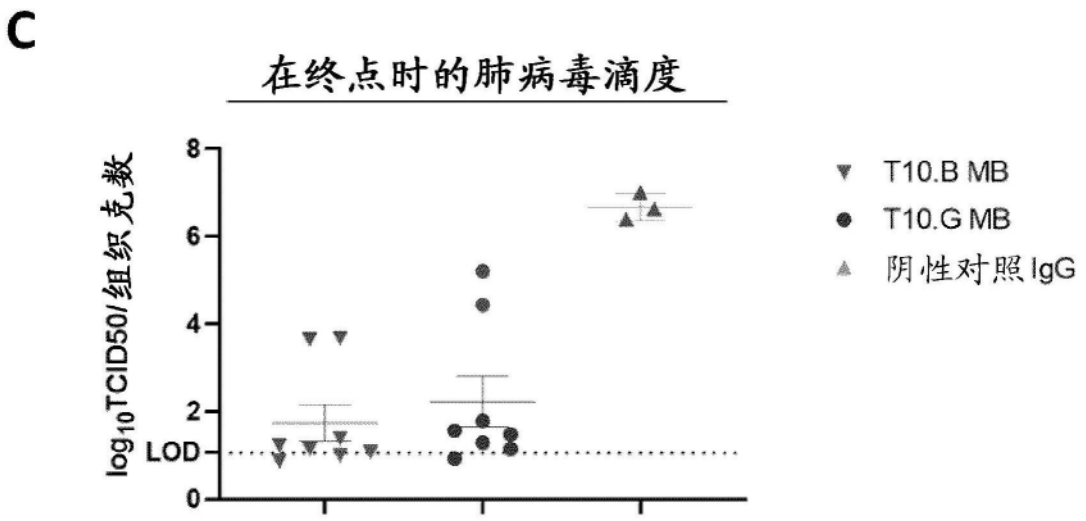

C
在终点时的肺病毒滴度
log10TCID50/组织克数
8
6
4
2
LOD
0
T10.B MB
T10.G MB
阴性对照 IgG

图21c

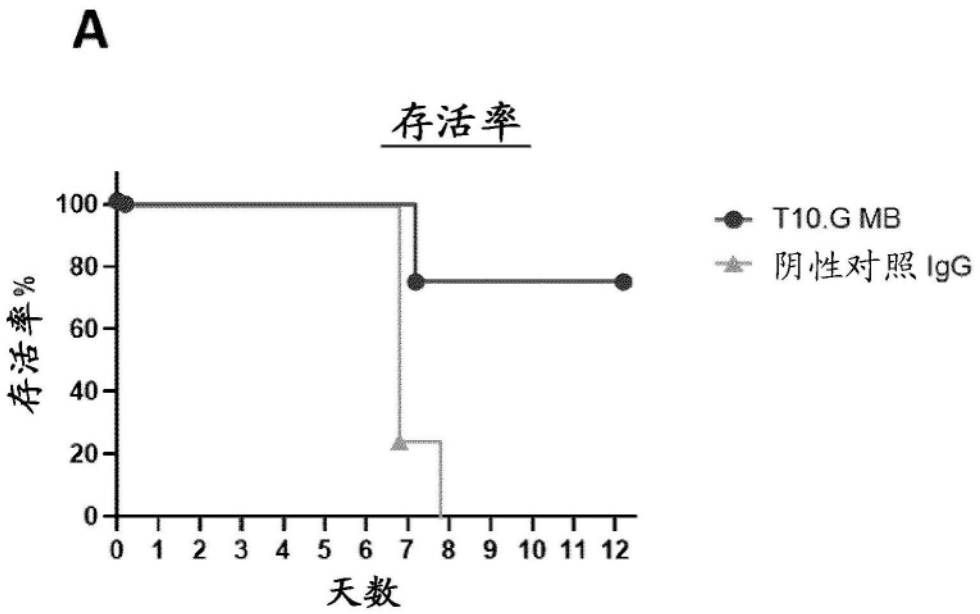

A
存活率
存活率 %
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
天数
T10.G MB
阴性对照 IgG

图22a

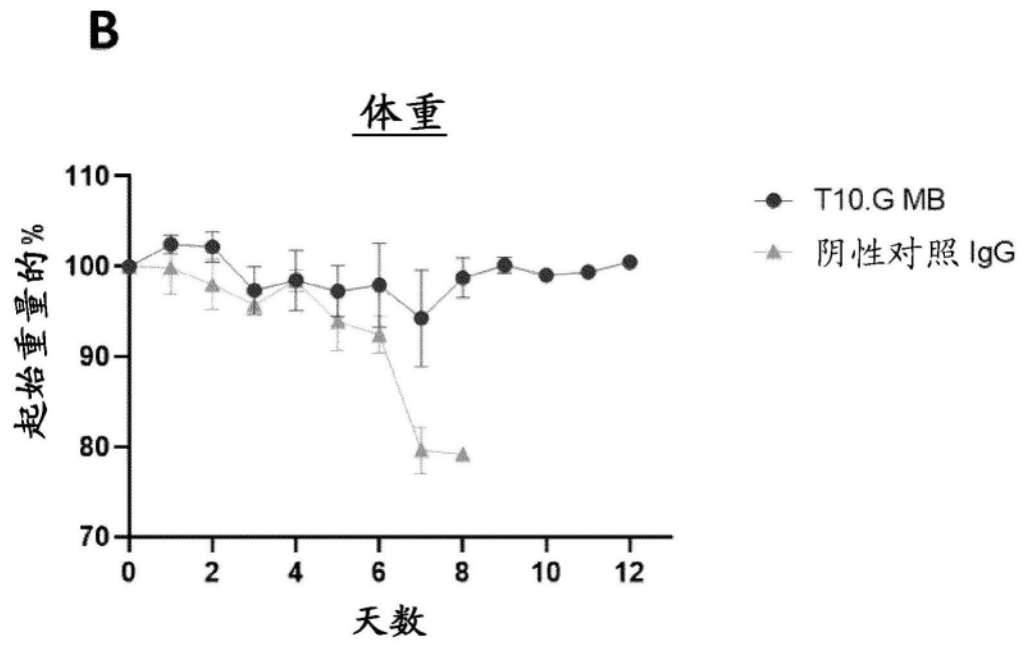

B
体重
起始重量的%
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
天数
T10.G MB
阴性对照 IgG

图22b

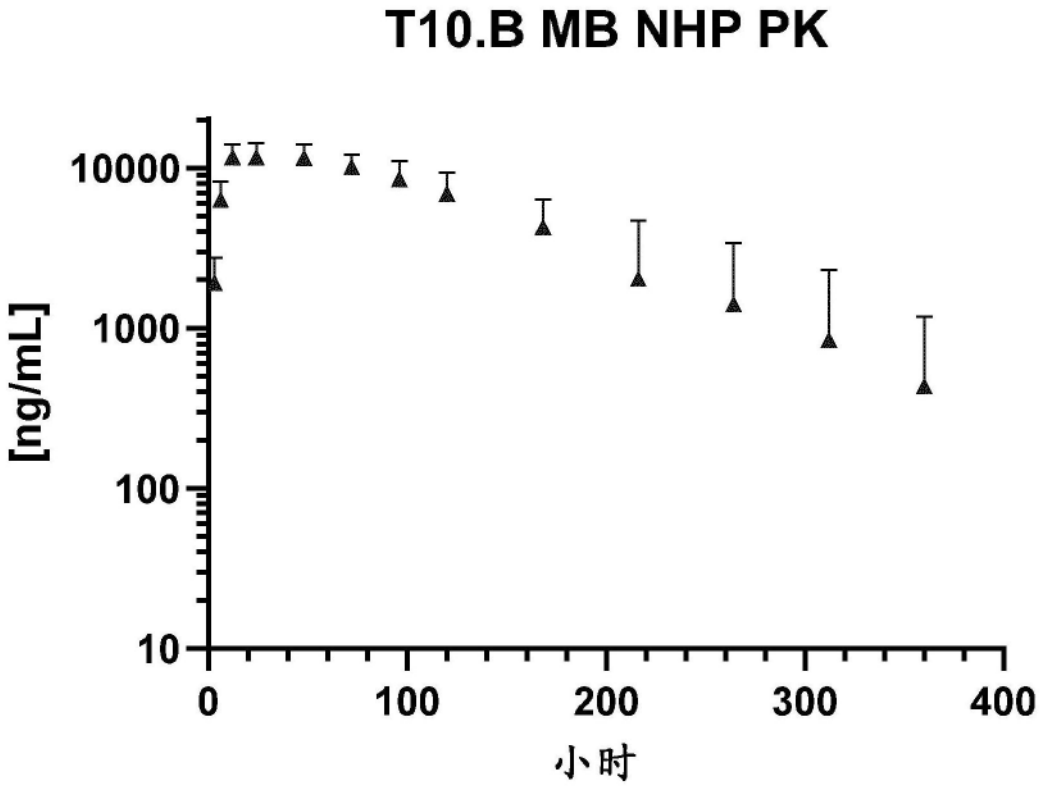

T10.B MB NHP PK
[ng/mL]
10000
1000
100
10
0
100
200
300
400
小时

图23

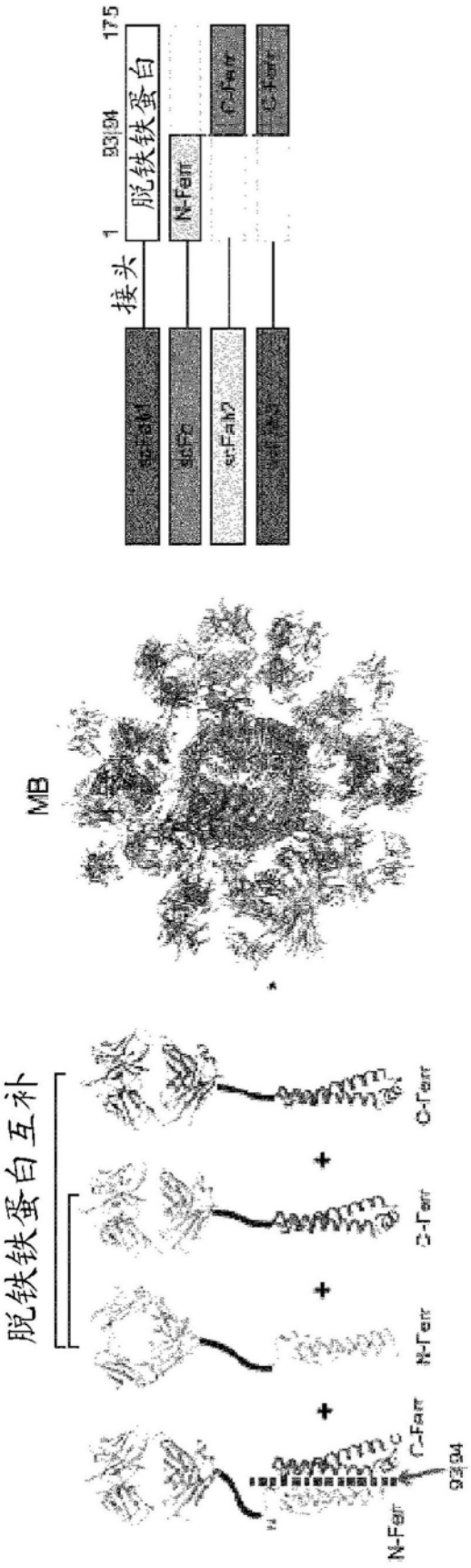

接头
1
93|94
175
脱铁铁蛋白
N-Ferr
C-Ferr
C-Ferr
sf-FaM1
sf-Fe
sf-FaM2
MB
脱铁铁蛋白互补
N-Ferr
C-Ferr
93|94
N-Ferr
C-Ferr
C-Ferr

图24a

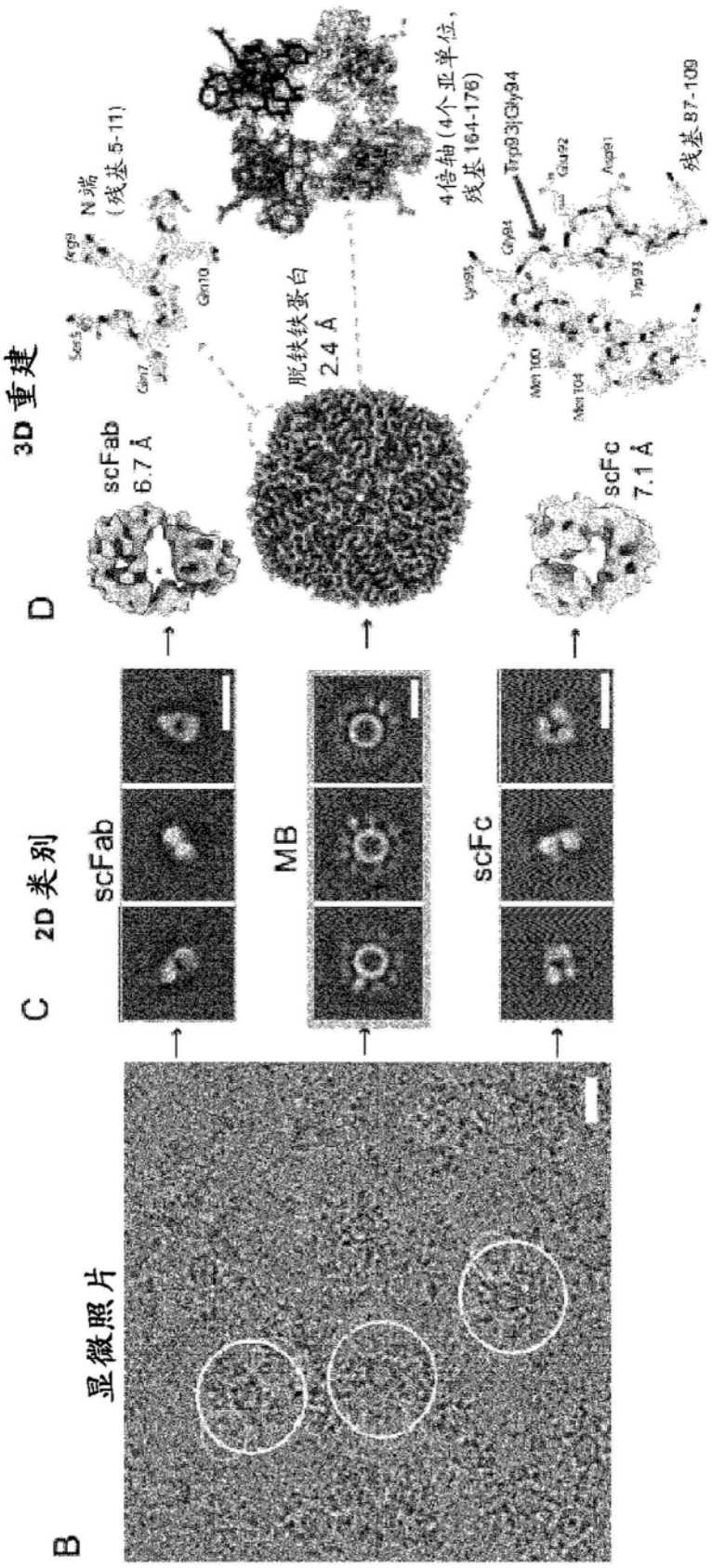


图24b、图24c、图24d

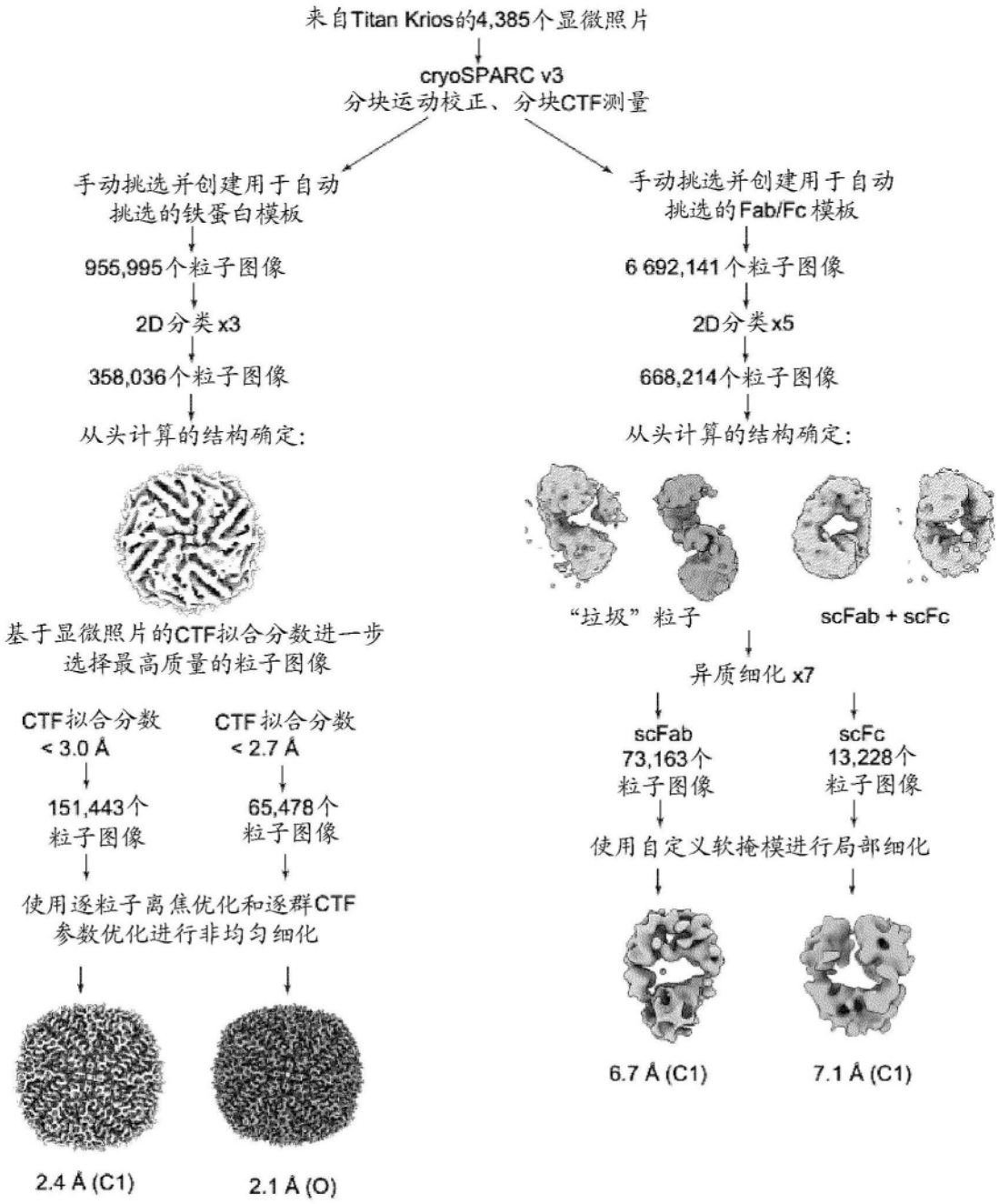

来自Titan Krios的4,385个显微照片
cryoSPARC v3
分块运动校正、分块CTF测量
手动挑选并创建用于自动挑选的铁蛋白模板
955,995个粒子图像
2D分类x3
358,036个粒子图像
从头计算的结构确定:
基于显微照片的CTF拟合分数进一步选择最高质量的粒子图像
CTF拟合分数 < 3.0 Å
CTF拟合分数 < 2.7 Å
151,443个粒子图像
65,478个粒子图像
使用逐粒子离焦优化和逐群CTF参数优化进行非均匀细化
2.4 Å (C1)
2.1 Å (O)
手动挑选并创建用于自动挑选的Fab/Fc模板
6 692,141个粒子图像
2D分类x5
668,214个粒子图像
从头计算的结构确定:
“垃圾”粒子
scFab + scFc
异质细化 x7
scFab 73,163个粒子图像
scFc 13,228个粒子图像
使用自定义软掩模进行局部细化
6.7 Å (C1)
7.1 Å (C1)

图25

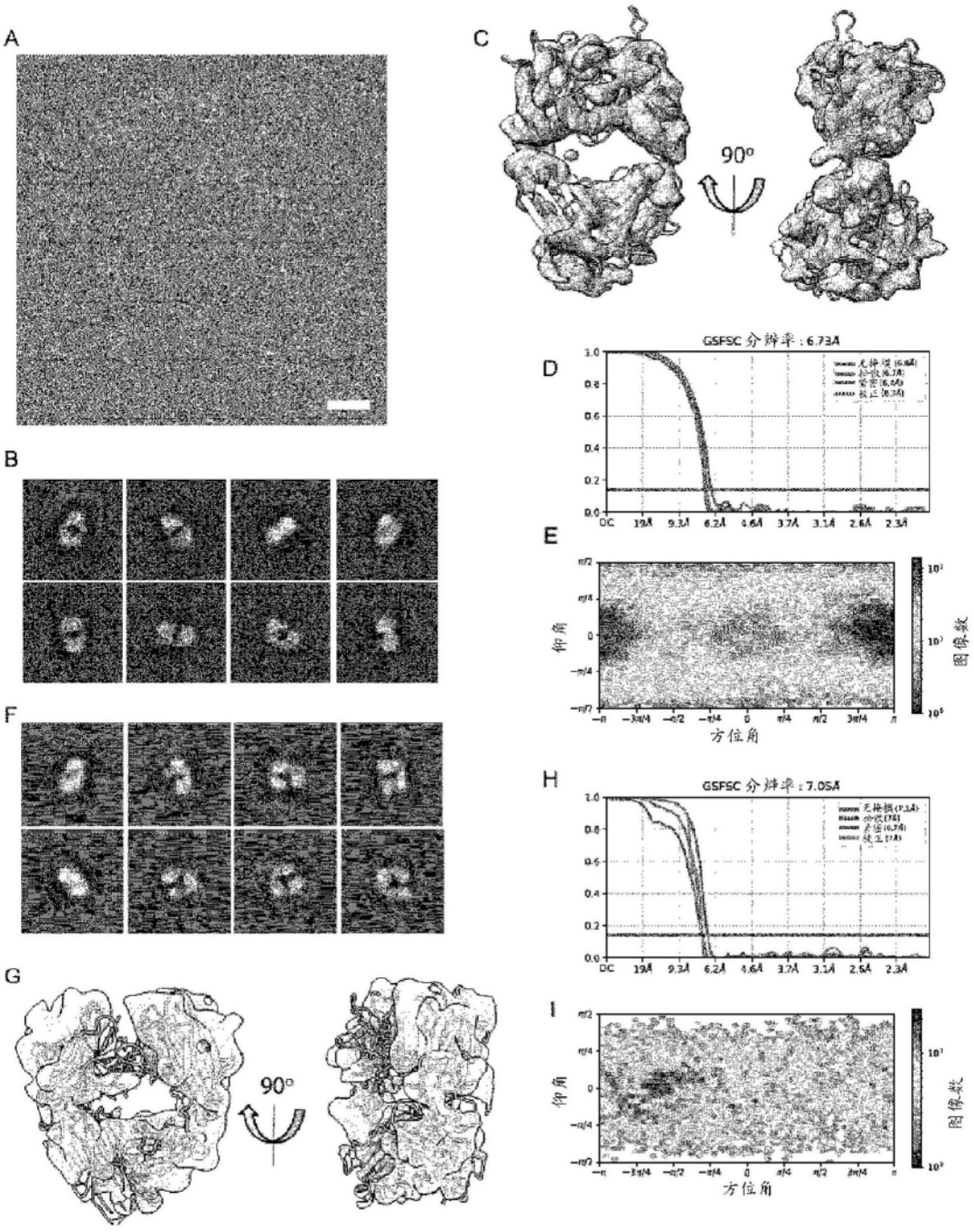

A
B
C
90°
D
GSFSC 分辨率：6.73Å
E
仰角
方位角
图像数
F
G
90°
H
GSFSC 分辨率：7.05Å
I
仰角
方位角
图像数

图26

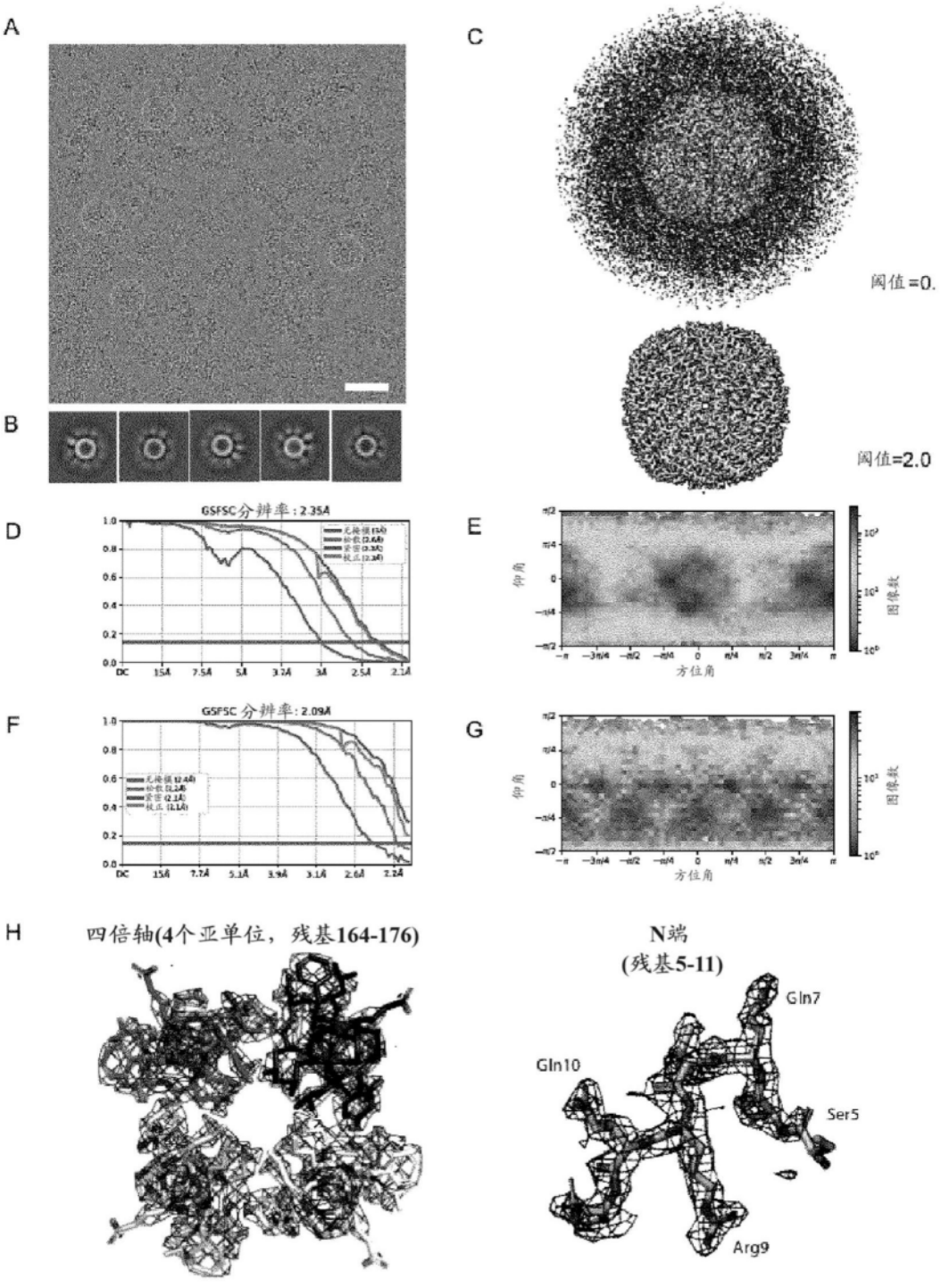

A
B
C
阈值=0.
阈值=2.0
D
GSFSC分辨率：2.35Å
E
仲角
方位角
图像数
F
GSFSC分辨率：2.09Å
G
仲角
方位角
图像数
H
四倍轴(4个亚单位，残基164-176)
N端
(残基5-11)
Gln7
Gln10
Ser5
Arg9

图27

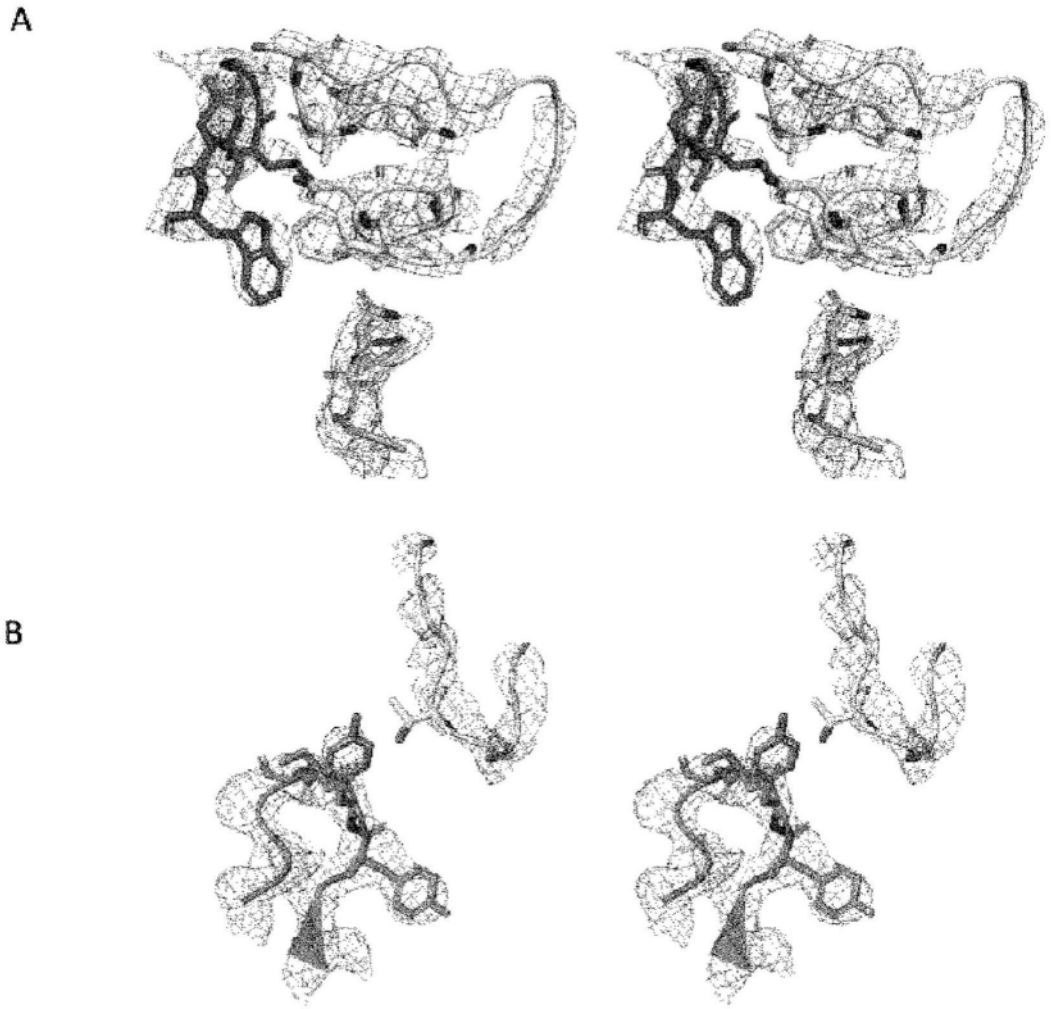


图28

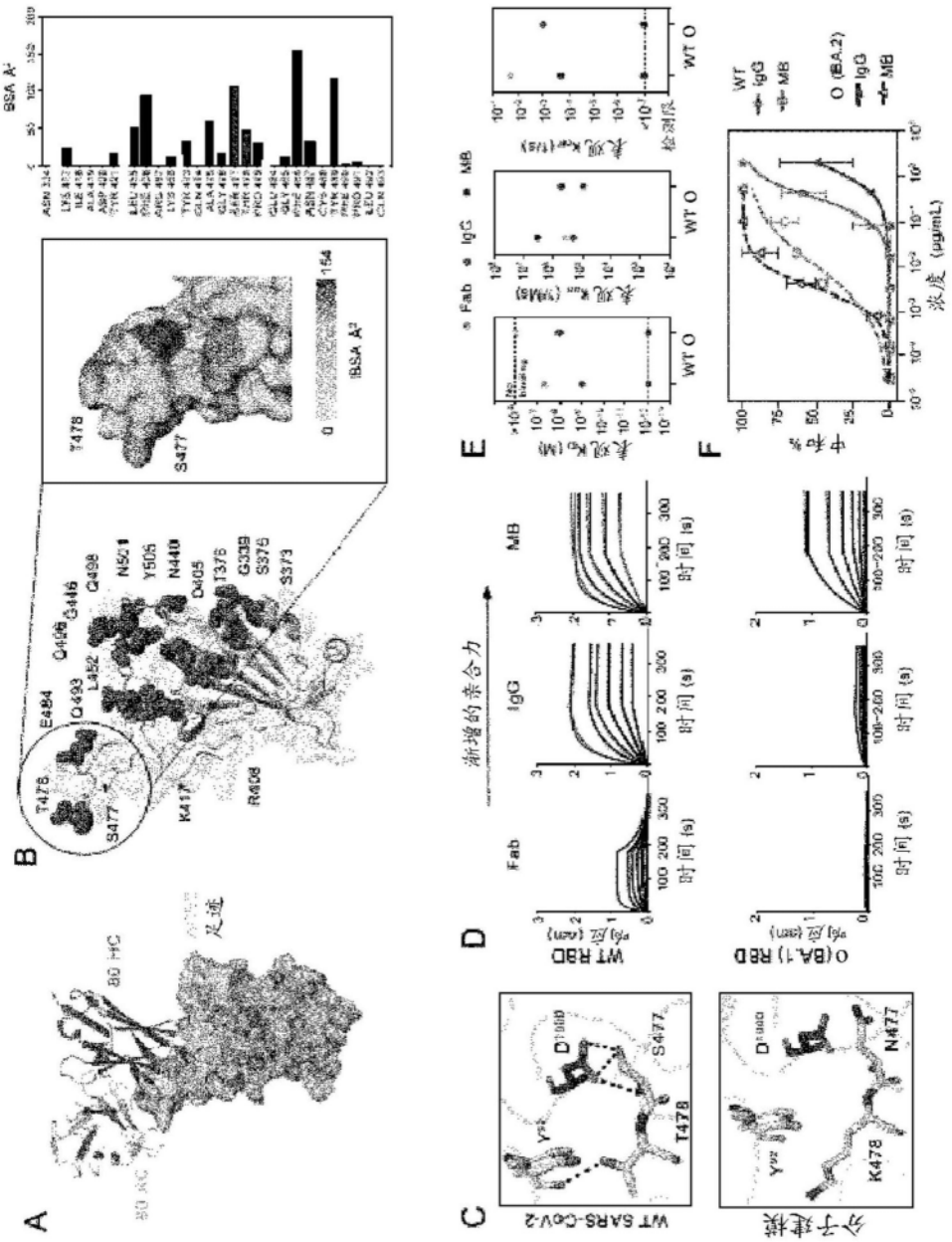


图29a、图29b、图29c、图29d、图29e、图29f

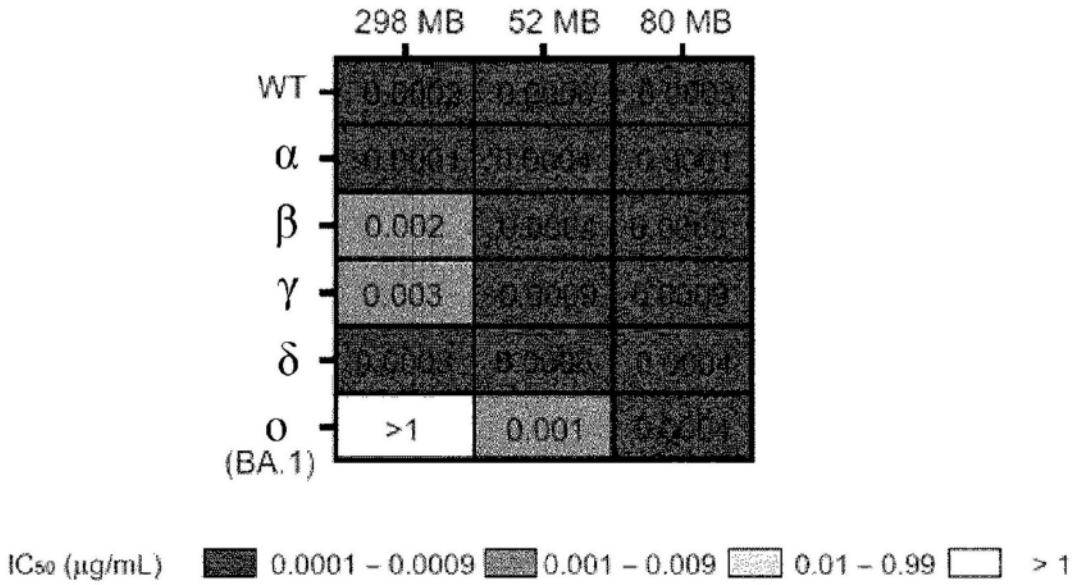

298 MB
52 MB
80 MB
WT
α
β
γ
δ
ο (BA.1)
0.002
0.003
>1
0.001
IC50 (μg/mL)
0.0001 – 0.0009
0.001 – 0.009
0.01 – 0.99
> 1

图29g

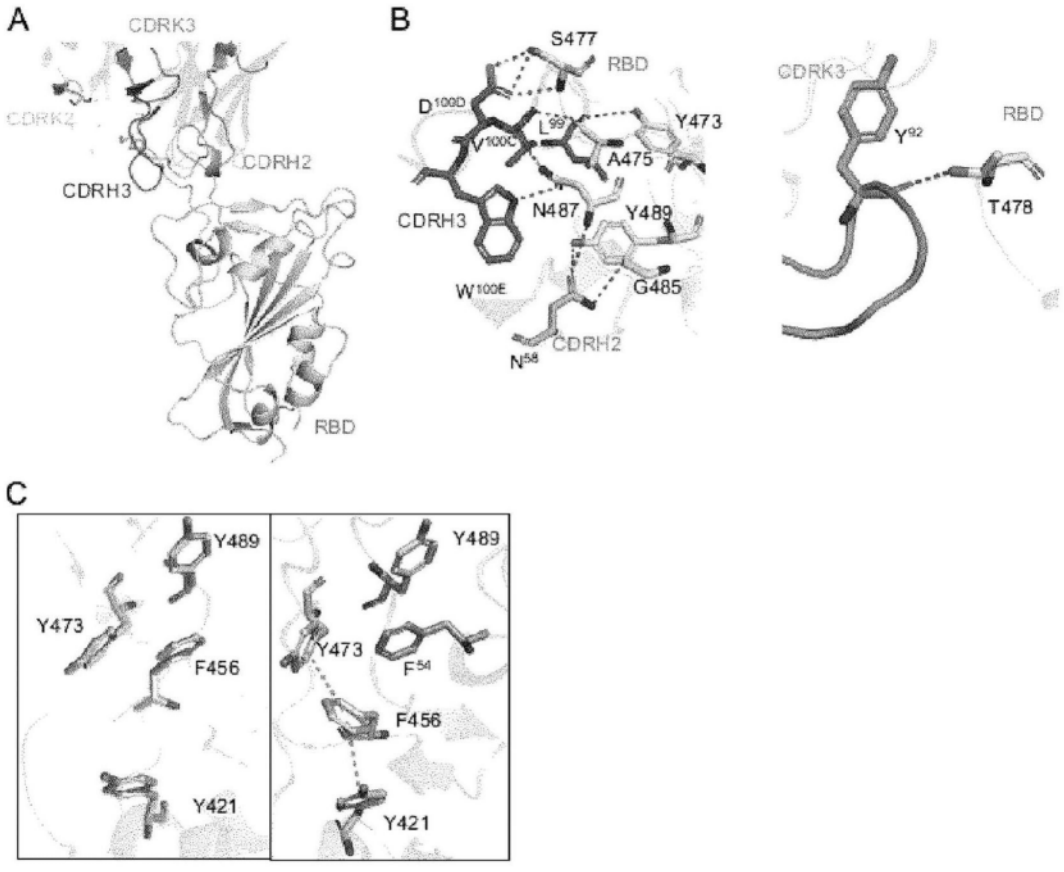

A
CDRK3
CDRK2
CDRH2
CDRH3
RBD
B
S477
RBD
D100D
L99
Y473
V100C
A475
N487
Y489
CDRH3
W100E
G485
CDRH2
N58
CDRK3
Y92
RBD
T478
C
Y489
Y473
F456
Y421
Y489
Y473
F54
F456
Y421

图30