



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115803063 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 14

(21) 申请号 202180041049.X

X • X • 高

(22) 申请日 2021.06.10

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(30) 优先权数据

63/038,075 2020.06.11 US

63/151,591 2021.02.19 US

(51) Int.Cl.

A61K 47/69 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/036878 2021.06.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/252803 EN 2021.12.16

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 W • 宾德 C • D • 布兰切特

M • A • 达尔维什 R • 汉努什

权利要求书19页 说明书83页

序列表1页 附图23页

(54) 发明名称

纳米脂蛋白-多肽缀合物和组合物、系统以及其使用方法

(57) 摘要

本发明总体上涉及包含至少一种多肽的纳米脂蛋白颗粒缀合物以及包含至少一种长度介于20个至60个氨基酸之间的短肽的纳米脂蛋白颗粒缀合物。还提供了相关组合物和系统以及其制备和使用方法。特别地,提供了具有抗原结合片段 (Fab) 的纳米脂蛋白颗粒 (NLP) 缀合物,其中所述NLP包含由支架蛋白质环绕的成膜脂质的双层,并且所述Fab缀合至一个或两个双层表面。在一些实施方案中,所述 (NLP) 缀合物进一步包含长度为20个至60个氨基酸的短肽。所述缀合物以及相关组合物和系统总体上展现良好的稳定性和可制造性,保留抗原结合活性,并且可增强抗原结合效力,从而提供用于递送Fab和基于Fab的治疗剂以及诊断剂的通用平台,还提供用于递送其他治疗剂和/或诊断剂的稳定平台。

1. 一种缀合物,所述缀合物包含:

支架蛋白质、成膜脂质和抗原结合多肽,

其中所述成膜脂质以脂双层方式排列并且所述支架蛋白质环绕所述双层;并且

其中经由所述双层的一个或两个表面上的所述成膜脂质中的一种或多种成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述抗原结合多肽缀合至所述一种或多种成膜脂质;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。

2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述经官能化的基团选自以下项组成的组:马来酰亚胺衍生物、卤代乙酰胺、吡啶基二硫代-丙酸酯、硫代硫酸酯和其任一者或多者的组合;并且所述互补官能团为游离硫醇基团。

3. 根据权利要求2所述的缀合物,其中所述硫醇基团为半胱氨酸硫醇基团,任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生所述抗原结合多肽的抗体中形成铰链二硫键(例如Cys-226或Cys-227)。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述经官能化的基团不缀合至所述支架蛋白质。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述支架蛋白质选自以下项组成的组:(a) 载脂蛋白A; (b) 载脂蛋白B; (c) 载脂蛋白C; (d) 载脂蛋白D; (e) 载脂蛋白H; (f) 载脂蛋白E; (g) 能够稳定化所述双层的截短形式的(a)至(f);以及(h) (a)至(g)中的任一者或多者的组合。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述成膜脂质选自以下项组成的组: $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC以及其任一者或多者的组合。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述成膜脂质中的一者或多者为 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

8. 一种缀合物,所述缀合物包含:

支架蛋白质、成膜脂质和20个至60个氨基酸的短肽,

其中所述成膜脂质以脂双层方式排列并且所述支架蛋白质环绕所述双层;并且

其中所述短肽缀合至所述双层的一个或两个表面上的所述成膜脂质中的一者或多者。

9. 根据权利要求8所述的缀合物,其中所述成膜脂质选自以下项组成的组: $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC和其任一者或多者的组合。

10. 根据权利要求8或9所述的缀合物,其中所述成膜脂质中的一者或多者为 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

11. 根据权利要求7或10所述的缀合物,其中所述脂肪酰基为 $C_{16}$ 脂肪酰基。

12. 根据权利要求7至11中任一项所述的缀合物,其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

13. 根据权利要求12所述的缀合物,其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

14. 根据权利要求7至11中任一项所述的缀合物,其中所述短肽为CKP变体,所述CKP变

体包含：

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列，在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(b) 相对于野生型CKP，在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(c) 相对于野生型CKP，在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(d) 相对于野生型CKP，在所述N端处的化学修饰；和/或

(e) 相对于野生型CKP，在所述C端处的化学修饰。

15. 根据权利要求14所述的缀合物，其中相对于野生型CKP，所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

16. 根据权利要求14或15所述的缀合物，其中所述野生型CKP为EETI-II。

17. 根据权利要求7至16中任一项所述的缀合物，其中所述短肽在所述缀合物中的活性高于所述肽在不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性。

18. 根据权利要求17所述的缀合物，其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的2倍至10倍高。

19. 根据权利要求15所述的缀合物，其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的约5倍高。

20. 根据权利要求12至16中任一项所述的缀合物，其中所述短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体，其中80%至90%、90%至95%或95%至99%的所述活性保留在所述缀合物中。

21. 根据权利要求7至20中任一项所述的缀合物，其中所述缀合物增加所述短肽的活性或亲合力。

22. 根据权利要求7至21中任一项所述的缀合物，所述缀合物进一步包含：经由所述一种或多种成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团，缀合至所述双层的一个或两个表面上的所述成膜脂质中的一者或多者的抗原结合多肽；

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。

23. 根据权利要求7至22中任一项所述的缀合物，其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子；

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、

15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子；或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的10个至60个分子；或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、

30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的10个至60个分子。

24. 根据权利要求7至23中任一项所述的缀合物，所述缀合物包含至少两种不同的肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物，其中第一肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物包含第一短肽，并且其中第二肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基包含不同于所述第一短肽的第二短肽。

25. 根据权利要求24所述的缀合物，其中所述至少两种肽（例如胱氨酸结肽）结合不同

的靶标,任选地结合两种、三种、四种或八种不同的靶标。

26. 根据权利要求25所述的缀合物,其中所述两种或更多种短肽结合两种不同的靶标。

27. 根据权利要求26所述的缀合物,其中所述靶标为选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述支架蛋白质和所述成膜脂质的摩尔比为1:60至1:100,诸如1:80;且/或

其中20%至35%、诸如20%的所述成膜脂质带有所述经官能化的基团。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述抗原结合多肽选自由以下项组成的组:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fab(scFab)、单链Fv(scFv)、VH-VH二聚体、VL-VL二聚体、VH-VL二聚体、单结构域、双体抗体、线性抗体和其任一者或多者的组合,特别是其中所述抗原结合多肽为Fab;

任选地其中所述Fab结合选自由以下项组成的组的靶标:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素β受体和其任一者或多者的组合。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物包含所述抗原结合多肽的两个或更多个分子,任选地包含所述抗原结合多肽的2个至60个、2个至32个、10个至30个或20个分子。

31. 根据权利要求30所述的缀合物,其中所述缀合物具有所述抗原结合多肽的1个至160个、10个至120个、20个至100个、40个至80个或60个分子;

其中所述抗原结合多肽为Fab并且所述Fab通过PEG间隔区连接至所述成膜脂质。

32. 根据权利要求31所述的缀合物,其中所述PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物增加了所述抗原结合多肽的活性或亲合力。

34. 根据权利要求32所述的缀合物,其中所述活性为OX40结合并且所述缀合物具有所述抗原结合多肽诸如Fab的4至8个分子。

35. 根据权利要求30至34中任一项所述的缀合物,其中所述抗原结合多肽增加了所述缀合物的血清稳定性和/或血清半衰期;

任选地其中所述血清半衰期增加2倍至20倍、5倍至15倍或10倍。

36. 根据权利要求35所述的缀合物,其中所述缀合物具有所述抗原结合多肽的5个至60个、6个至40个或7个至32个分子。

37. 根据权利要求30至36中任一项所述的缀合物,其中所述两种或更多种抗原结合多肽结合不同的靶标或表位,任选地结合两种、三种、四种或八种不同的靶标或表位。

38. 根据权利要求37所述的缀合物,其中所述两种或更多种抗原结合多肽结合两种不同的靶标或表位。

39. 根据权利要求37所述的缀合物,其中所述靶标为选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述抗原结合多肽为Fab或Fab样

分子,任选地为人或人源化Fab。

41.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述间隔区包含PEG、或GSGS的氨基酸序列。

42.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据前述权利要求中任一项所述的缀合物;以及药用媒介物。

43.根据权利要求42所述的药物组合物,其中所述组合物为具有10cP至50cP的粘度以及100mg至300mg所述缀合物/mL的浓度的液体组合物。

44.根据权利要求1至41中任一项所述的缀合物或根据权利要求42或43所述的药物组合物,其中所述缀合物或组合物经皮下或经由眼部递送施用。

45.根据权利要求44所述的缀合物或药物组合物,其中将所述缀合物或组合物诸如在海藻糖存在下冻干;且任选地重构。

46.根据权利要求45所述的缀合物或药物组合物,其中所述缀合物包含每缀合物18个至20个Fab分子;且/或

其中冻干在80mM海藻糖存在下发生;且/或

其中冻干在5mg缀合物/mL的浓度下发生。

47.根据权利要求45或46所述的缀合物或药物组合物,其中所述抗原结合多肽的80%至90%、90%至95%或95%至99%的抗原结合活性在冻干以及重构后得以保留。

48.一种液体制剂,所述液体制剂包含100mg至300mg的根据权利要求1至41中任一项所述的缀合物并且具有10cP至50cP的粘度,任选地其中所述制剂经皮下或经由眼部递送施用。

49.一种制备纳米脂蛋白颗粒和抗原结合多肽的缀合物的方法,所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;

b) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下允许所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab),所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及

c) 任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的所述缀合物。

50.根据权利要求49所述的方法,其中所述步骤b)在所述步骤a)之后而没有用来去除一些或所有未组装的成膜脂质的中间步骤。

51.根据权利要求49或50所述的方法,其中所述经官能化的基团为马来酰亚胺衍生物并且其中所述官能团为半胱氨酸硫醇基团,任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生所述抗原结合多肽的抗体中形成较链二硫键(诸如Cys-226或Cys-227)。

52.根据权利要求49至51中任一项所述的方法,其中所述经官能化的基团在所述低pH下不缀合至所述支架蛋白质。

53.根据权利要求52所述的方法,其中所述低pH为pH 5.5至6.5、pH5至6或pH 6。

54.根据权利要求49至53中任一项所述的方法,其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。

55.根据权利要求54所述的方法,其中所述间隔区为连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

57. 根据权利要求49至56中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质中的一者或多者为 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述脂肪酰基为 $C_{16}$ 脂肪酰基。

59. 根据权利要求57或58所述的方法, 其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalataB1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

61. 根据权利要求57或58所述的方法, 其中所述短肽为CKP变体, 所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列, 在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP, 在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP, 在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP, 在所述N端处的化学修饰; 和/或

(e) 相对于野生型CKP, 在所述C端处的化学修饰。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中相对于野生型CKP, 所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

63. 根据权利要求61或62所述的方法, 其中所述野生型CKP为EETI-II。

64. 根据权利要求57至63中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC); 且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

65. 根据权利要求57至64中任一项所述的方法, 其中所述短肽在所述缀合物中的活性高于所述肽在不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的2倍至10倍高。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的约5倍高。

68. 根据权利要求57至64中任一项所述的方法, 其中所述短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体, 其中80%至90%、90%至95%或95%至99%的所述活性保留在所述缀合物中。

69. 根据权利要求57至68中任一项所述的方法, 其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子;

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、

15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、

30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述Fab和所述短肽结合两种不同的靶标。

71. 根据权利要求57至70中任一项所述的方法,所述方法包括至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物,其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基包含不同于所述第一短肽的第二短肽。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述至少两种肽(例如胱氨酸结肽)结合不同的靶标,任选地结合两种、三种、四种或八种不同的靶标。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述两种或更多种短肽结合两种不同的靶标。

74. 根据权利要求70或73所述的方法,其中所述靶标为选自以下项组成的组的对: CD3和CD19; CD3和EpCAM; CD3和CEA; CD16和CD30; CD16和CD33; Ang-2和VEGF-A; 以及因子X和因子IXa。

75. 一种制备纳米脂蛋白颗粒和20个至60个氨基酸的短肽(例如胱氨酸结肽)的缀合物的方法,所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层;

其中所述成膜脂质中的一者或多者包含C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)并且脂肪酰基缀合至所述短肽;以及

任选地纯化肽缀合物。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalataB1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

78. 根据权利要求77所述的方法,其中所述短肽为CKP变体,所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP,在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP,在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP,在所述N端处的化学修饰;和/或

(e) 相对于野生型CKP,在所述C端处的化学修饰。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中相对于野生型CKP,所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

80. 根据权利要求78或79所述的方法,其中所述野生型CKP为EETI-II。

81. 根据权利要求75至80中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

82. 根据权利要求75至81中任一项所述的方法,所述方法包括至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物,其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂

肪酰基包含不同于所述第一短肽的第二短肽。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述至少两种肽(例如胱氨酸结肽)结合不同的靶标, 任选地结合两种、三种、四种或八种不同的靶标。

84. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述两种或更多种短肽结合两种不同的靶标。

85. 根据权利要求84所述的方法, 其中所述靶标为选自以下项组成的组的对: CD3和CD19; CD3和EpCAM; CD3和CEA; CD16和CD30; CD16和CD33; Ang-2和VEGF-A; 以及因子X和因子IXa。

86. 根据权利要求75至85中任一项所述的方法, 其中所述短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体, 其中80%至90%、90%至95%或95%至99%的所述活性保留在所述缀合物中。

87. 根据权利要求75至86中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团; 并且所述方法进一步包括以下步骤:

b) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下使所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab), 所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;

其中所述步骤b) 在所述步骤a) 之后而没有用来去除一些或所有未组装的成膜脂质的中间步骤; 及/或没有用来富集步骤a) 的所述肽缀合物的中间步骤。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述经官能化的基团为马来酰亚胺衍生物并且其中所述官能团为半胱氨酸硫醇基团, 任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生所述抗原结合多肽的抗体中形成铰链二硫键(诸如Cys-226或Cys-227)。

89. 根据权利要求87或88所述的方法, 其中所述经官能化的基团在所述低pH下不缀合至所述支架蛋白质。

90. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述低pH为pH 5.5至6.5、pH5至6或pH 6。

91. 根据权利要求87至90中任一项所述的方法, 其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。

92. 根据权利要求91所述的方法, 其中所述间隔区为连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。

93. 根据权利要求92所述的方法, 其中所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

94. 根据权利要求87至93中任一项所述的方法, 其中所述缀合物增加了所述短肽的活性或亲合力。

95. 根据权利要求87至94中任一项所述的方法, 其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子;

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子。

96. 根据权利要求95所述的方法, 其中所述Fab和所述短肽结合两种不同的靶标。

97. 根据权利要求96所述的方法, 其中所述靶标为选自由以下项组成的组的对: CD3和CD19; CD3和EpCAM; CD3和CEA; CD16和CD30; CD16和CD33; Ang-2和VEGF-A; 以及因子X和因子IXa。

98. 根据权利要求87至97中任一项所述的方法, 其中所述短肽在所述缀合物中的活性高于所述肽在不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性。

99. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的2倍至10倍高。

100. 根据权利要求99所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的约5倍高。

101. 一种缀合物, 所述缀合物通过根据权利要求49至100中任一项所述的方法产生。

102. 一种增加抗原结合多肽的亲合力、活性和/或效力的方法, 所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质, 所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层, 其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;

b) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下允许所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab), 所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团; 以及

c) 任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的所述缀合物, 从而增加所述抗原结合多肽的亲合力、活性和/或效力。

103. 根据权利要求102所述的方法, 其中所述抗原结合多肽为Fab或Fab样分子且/或其中所述缀合物包含所述抗原结合多肽的10个至60个、15个至30个或20个分子。

104. 根据权利要求103所述的方法, 其中所述抗原结合多肽为通过PEG间隔区连接至所述成膜脂质的Fab或Fab样分子; 并且

其中所述缀合物包含所述抗原结合多肽的1个至160个、10个至120个、20个至100个、40个至80个或60个分子。

105. 根据权利要求104所述的方法, 其中所述PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

106. 根据权利要求102至105中任一项所述的方法, 其中所述缀合物经稳定化,

任选地其中所述缀合物包含所述抗原结合多肽的7个至60个、7个至32个、40个至60个或50个分子。

107. 根据权利要求102至106中任一项所述的方法, 其中所述缀合物进一步包含结合不同的靶标的第二抗原结合多肽的一个或多个分子。

108. 根据权利要求102至107中任一项所述的方法, 其中所述缀合物以液体制剂形式来提供, 所述制剂包含100mg至300mg的所述缀合物并且具有10cP至50cP的粘度。

109. 根据权利要求102至108中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽, 并且其中所述方法增加了所述短肽的亲合力、活性和/或效力。

110. 根据权利要求109所述的方法, 其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

111. 根据权利要求109或110所述的方法, 其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

112. 根据权利要求111所述的方法, 其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、

cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

113. 根据权利要求109或110所述的方法, 其中所述短肽为CKP变体, 所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列, 在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP, 在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP, 在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP, 在所述N端处的化学修饰; 和/或

(e) 相对于野生型CKP, 在所述C端处的化学修饰。

114. 根据权利要求113所述的方法, 其中相对于野生型CKP, 所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

115. 根据权利要求113或114所述的方法, 其中所述野生型CKP为EETI-II。

116. 根据权利要求109至115中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC); 且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

117. 根据权利要求109至116中任一项所述的方法, 所述方法包括至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物, 其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽, 并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基包含不同于所述第一短肽的第二短肽。

118. 根据权利要求117所述的方法, 其中所述至少两种肽(例如胱氨酸结肽) 结合不同的靶标, 任选地结合两种、三种、四种或八种不同的靶标。

119. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述两种或更多种短肽结合两种不同的靶标。

120. 根据权利要求119所述的方法, 其中所述靶标为选自以下项组成的组的对: CD3和CD19; CD3和EpCAM; CD3和CEA; CD16和CD30; CD16和CD33; Ang-2和VEGF-A; 以及因子X和因子IXa。

121. 根据权利要求109至120中任一项所述的方法, 其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子;

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab) 的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab) 的10个至60个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab) 的10个至60个分子。

122. 根据权利要求110至121中任一项所述的方法, 其中所述短肽在所述缀合物中的活性高于所述肽在不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性。

123. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的2倍至10倍高。

124. 根据权利要求123所述的方法, 其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所

述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的约5倍高。

125. 一种增加抗原结合多肽的稳定性、保质期和/或半衰期的方法,所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;

b) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下允许所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab),所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及

c) 任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的所述缀合物,从而增加所述抗原结合多肽的稳定性、保质期和/或半衰期。

126. 一种增加纳米脂蛋白颗粒的稳定性、保质期和/或半衰期的方法,所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;

b) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下允许所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab),所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及

c) 任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的所述缀合物,从而增加所述纳米脂蛋白颗粒的稳定性、保质期和/或半衰期。

127. 根据权利要求125或126所述的方法,其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

128. 根据权利要求127所述的方法,其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

129. 一种增加长度为20个至60个氨基酸的短肽的稳定性、保质期和/或半衰期的方法,所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层;

其中所述成膜脂质中的一者或多者包含C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)并且脂肪酰基缀合至所述短肽;以及

任选地纯化肽缀合物;

b) 修饰所述成膜脂质中的一者或多者以在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团,以及

c) 在pH 4.5至6.5范围内的低pH下使所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab),所述抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;

其中所述步骤c)在所述步骤b)之后而没有用来去除一些或所有未组装的成膜脂质的中间步骤;及/或没有用来富集步骤b)的所述肽缀合物的中间步骤,

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽,

从而增加所述短肽的稳定性、保质期和/或半衰期。

130. 根据权利要求127至129中任一项所述的方法,其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

131. 根据权利要求127至130中任一项所述的方法,其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

132. 根据权利要求131所述的方法,其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、

cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

133. 根据权利要求127至130中任一项所述的方法, 其中所述短肽为CKP变体, 所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列, 在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP, 在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP, 在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP, 在所述N端处的化学修饰; 和/或

(e) 相对于野生型CKP, 在所述C端处的化学修饰。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中相对于野生型CKP, 所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

135. 根据权利要求133或134所述的方法, 其中所述野生型CKP为EETI-II。

136. 根据权利要求127至135中任一项所述的方法, 其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC); 且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

137. 根据权利要求125至136中任一项所述的方法, 其中所述抗原结合多肽为Fab或Fab样分子且/或其中所述缀合物包含所述抗原结合多肽(例如所述Fab)的5个至60个、6个至40个、7个至32个、40个至60个或50个分子。

138. 根据权利要求127至136中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子;

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、

15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子; 或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、

30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子。

139. 根据权利要求125至138中任一项所述的方法, 其中所述缀合物进一步包含生物活性剂或可检测的剂,

任选地其中所述生物活性剂为选自由以下项组成的组的细胞毒性剂: 道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤、长春地辛、放射性核素、白喉毒素、蓖麻毒素、格尔德霉素、美登素类、卡利奇霉素和其任一者或多者的组合; 且/或

任选地其中所述可检测的剂为选自由以下项组成的组的至少一种标记: 放射性同位素、荧光团、化学发光染料、发色团、酶、金属离子、纳米颗粒和其任一者或多者的组合。

140. 根据权利要求125至139中任一项所述的方法, 其中所述缀合物以液体制剂形式来提供, 所述制剂包含100mg至300mg的所述缀合物并且10cP至50cP的粘度。

141. 根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂,其用作药物。

142. 根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂,其用于治疗癌症或眼部疾病。

143. 根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂在制备药物中的用途,所述药物用于治疗癌症或眼部疾病。

144. 根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂用于制备药物的用途,所述药物用于抑制血管生成和/或肿瘤生长。

145. 一种使用抗原结合多肽(例如Fab)治疗个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂;

任选地进一步包括向所述个体施用额外的治疗剂。

146. 一种将抗原结合多肽(例如Fab)递送至有此需要的个体的方法,所述方法包括:

提供根据权利要求1至41和101中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至47中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求48所述的制剂;以及

向所述个体施用所述缀合物、组合物或制剂,

从而将所述抗原结合多肽递送至所述个体。

147. 一种以强效、稳定液体制剂将抗原结合多肽(例如Fab)递送至有此需要的个体的方法,所述方法包括:

向个体施用包含所述抗原结合多肽(例如所述Fab)和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂;

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质;

其中经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽的5个至100个分子;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽,

从而以稳定的液体制剂将所述抗原结合多肽递送至个体。

148. 一种以强效、低粘度制剂将抗原结合多肽(例如Fab)递送至有此需要的个体的方法,所述方法包括:

向个体施用包含所述抗原结合多肽(例如所述Fab)和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂;

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质;

其中经由所述成膜脂质中的一者或多者上的经官能化的基团及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述一种或多种成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽;并且

其中所述液体制剂具有10cP至50cP的粘度以及100mg至300mg所述缀合物/mL的浓度，从而以低粘度制剂将所述抗原结合多肽递送至个体。

149. 根据权利要求147或148所述的方法，其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

150. 一种以强效、稳定液体制剂将长度为20个至60个氨基酸的短肽递送至有此需要的个体的方法，所述方法包括：

向个体施用包含所述抗原结合多肽（例如所述Fab）和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂；

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质；

其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽；

其中经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团，所述成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽的5个至100个分子；

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽，

从而以稳定的液体制剂将所述抗原结合多肽递送至个体。

151. 一种以强效、低粘度制剂将长度为20个至60个氨基酸的短肽递送至有此需要的个体的方法，所述方法包括：

向个体施用包含所述抗原结合多肽（例如所述Fab）和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂；

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质；

其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽；

其中经由所述成膜脂质中的一者或多者上的经官能化的基团及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团，所述一种或多种成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽；

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽；并且

其中所述液体制剂具有10cP至50cP的粘度以及100mg至300mg所述缀合物/mL的浓度，从而以低粘度制剂将所述抗原结合多肽递送至个体。

152. 根据权利要求149至151中任一项所述的方法，其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

153. 根据权利要求149至152中任一项所述的方法，其中所述短肽为胱氨酸结肽（CKP）。

154. 根据权利要求153所述的方法，其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cycloviolacin A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalataB1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

155. 根据权利要求149至152所述的方法，其中所述短肽为CKP变体，所述CKP变体包含：

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列，在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(b) 相对于野生型CKP，在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(c) 相对于野生型CKP，在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；

(d) 相对于野生型CKP,在所述N端处的化学修饰;和/或

(e) 相对于野生型CKP,在所述C端处的化学修饰。

156. 根据权利要求155所述的方法,其中相对于野生型CKP,所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

157. 根据权利要求155或156所述的方法,其中所述野生型CKP为EETI-II。

158. 根据权利要求149至157中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

159. 根据权利要求149至158中任一项所述的方法,其中所述短肽在所述缀合物中的活性高于所述肽在不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性。

160. 根据权利要求159所述的方法,其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的2倍至10倍高。

161. 根据权利要求160所述的方法,其中所述肽在所述缀合物中的活性是所述肽在所述不包含所述抗原结合多肽的缀合物中的活性的约5倍高。

162. 根据权利要求149至161中任一项所述的方法,其中所述缀合物包含所述Fab的1个至100个分子;

任选地其中所述缀合物包含所述肽的5个至30个、10个至25个、15个至20个或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5个至40个、10个至35个、15个至30个、20个至25个或23个分子;或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的3个至30个、5个至20个、10个至15个或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子;或

任选地其中所述缀合物包含所述肽的20个至80个、25个至70个、

30个至60个、35个至50个或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10个至60个分子。

163. 根据权利要求147至162中任一项所述的方法,其中所述间隔区为连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。

164. 根据权利要求163所述的方法,其中所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

165. 根据权利要求149至164中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽(例如Fab)和所述短肽各自结合相同的靶标。

166. 根据权利要求149至164中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽(例如Fab)和所述短肽各自结合不同的靶标。

167. 根据权利要求147至166中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽为Fab,所述Fab结合选自由因子D、VEGF、Tie2、DR4和其任一者或多者的组合组成的组的靶标;并且所述制剂经由眼部递送施用。

168. 根据权利要求149至167中任一项所述的方法,其中所述短肽结合选自由以下项组成的组的靶标:因子D、VEGF、Tie2、DR4和其任一者或多者的组合。

169. 根据权利要求147至166中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽为Fab,所述

Fab结合选自由以下项组成的组的靶标:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 $\beta$ 受体和其任一者或多者的组合。

170. 根据权利要求150至166和169中任一项所述的方法,其中所述短肽结合选自由以下项组成的组的靶标:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 $\beta$ 受体和其任一者或多者的组合。

171. 根据权利要求147至166中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽结合至少两种不同的靶标。

172. 根据权利要求171所述的方法,其中所述两种不同的靶标为选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

173. 根据权利要求149至164中任一项所述的方法,其中所述短肽和所述抗原结合多肽结合至少两种不同的靶标。

174. 根据权利要求173所述的方法,其中所述两种不同的靶标为选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

175. 一种以稳定液体制剂将生物活性剂或可检测的剂递送至有此需要的个体的方法,所述方法包括:

向个体施用包含抗原结合多肽(例如Fab)、纳米脂蛋白颗粒以及生物活性剂或可检测的剂的缀合物的液体制剂,

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质;

其中经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽的5个至100个分子;

其中所述生物活性剂或所述可检测的剂缀合至所述支架蛋白质、所述成膜脂质或所述抗原结合多肽中的至少一者;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽,

从而以稳定液体制剂将所述生物活性剂或所述可检测的剂递送至有此需要的个体。

176. 一种以低粘度制剂将生物活性剂或可检测的剂递送至有此需要的个体的方法,所述方法包括:

向个体施用包含抗原结合多肽(例如Fab)、纳米脂蛋白颗粒以及生物活性剂或可检测的剂的缀合物的液体制剂,

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂层的支架蛋白质;

其中经由所述成膜脂质中的一者或多者上的经官能化的基团及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述一种或多种成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽;

其中所述生物活性剂或所述可检测的剂缀合至所述支架蛋白质、所述成膜脂质或所述抗原结合多肽中的至少一者;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽;并且

其中所述液体制剂具有10cP至50cP的粘度以及100mg至300mg所述缀合物/mL的浓度,

从而以低粘度制剂将所述生物活性剂或所述可检测的剂递送至有此需要的个体。

177. 一种将生物活性剂或可检测的剂递送至有此需要的个体的脑或中枢神经系统的方法,所述方法包括:

向个体全身性施用包含抗原结合多肽(例如Fab)、纳米脂蛋白颗粒以及生物活性剂或可检测的剂的缀合物的液体制剂,

其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双层层的支架蛋白质;

其中经由所述成膜脂质中的一者或多者上的经官能化的基团及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述一种或多种成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽;

其中所述生物活性剂或所述可检测的剂缀合至所述支架蛋白质、所述成膜脂质或所述抗原结合多肽中的至少一者;

任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质且/或间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽;并且

其中所述缀合物转运跨越血脑屏障,

从而将所述生物活性剂或所述可检测的剂递送至有此需要的个体的脑或中枢神经系统。

178. 根据权利要求175至177中任一项所述的方法,其中所述支架蛋白质为apoE2和/或apoE4。

179. 根据权利要求175至178中任一项所述的方法,其中所述抗原结合多肽为Fab或Fab样分子。

180. 根据权利要求175至179中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

181. 根据权利要求180所述的方法,其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

182. 根据权利要求180或181所述的方法,其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

183. 根据权利要求182所述的方法,其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

184. 根据权利要求180或181所述的方法,其中所述短肽为CKP变体,所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP,在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP,在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP,在所述N端处的化学修饰;和/或

(e) 相对于野生型CKP,在所述C端处的化学修饰。

185. 根据权利要求184所述的方法,其中相对于野生型CKP,所述CKP变体在其N端处包含额外的赖氨酸残基。

186. 根据权利要求184或185所述的方法,其中所述野生型CKP为EETI-II。

187. 根据权利要求175至186中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);且/或其中所述缀合物包含所述

短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

188. 根据权利要求175至187中任一项所述的方法, 其中所述间隔区为连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。

189. 根据权利要求188所述的方法, 其中所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

190. 根据权利要求175至189中任一项所述的方法, 其中所述生物活性剂为选自由以下项组成的组的细胞毒性剂: 道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤、长春地辛、放射性核素、白喉毒素、蓖麻毒素、格尔德霉素、美登素类、卡利奇霉素和其任一者或多者的组合。

191. 根据权利要求175至190中任一项所述的方法, 其中所述诊断剂为选自由以下项组成的组的标记: 放射性同位素、荧光团、化学发光染料、发色团、酶、金属离子、纳米颗粒和其任一者或多者的组合。

192. 根据权利要求175至191中任一项所述的方法, 其中所述液体制剂经静脉内施用。

193. 根据权利要求175至192中任一项所述的方法, 其中经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团, 所述成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽的5个至100个分子。

194. 根据权利要求175至193中任一项所述的方法, 其中所述抗原结合多肽为Fab并且所述Fab经由PEG间隔区连接至所述成膜脂质, 任选地其中所述PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000至3000、1500至2500、1900至2200或2000的MW。

195. 根据权利要求175至194中任一项所述的方法, 其中所述液体制剂具有10cP至50cP的粘度以及100mg至300mg所述缀合物/mL的浓度。

196. 一种用于将抗原结合多肽递送至靶细胞的系统或试剂盒, 所述系统或试剂盒包含:

一种或多种组分, 其用于制备根据权利要求1至7、11至41中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至46中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求47所述的制剂, 其中所述组分提供于所述试剂盒或系统的一个或多个隔室中, 以及

任选地关于制备所述缀合物、组合物或制剂的说明书和/或关于递送所述抗原结合多肽的说明书。

197. 一种用于将20个至60个氨基酸的短肽(例如胱氨酸结肽)递送至靶细胞的系统或试剂盒, 所述系统或试剂盒包含:

一种或多种组分, 其用于制备根据权利要求8至41中任一项所述的缀合物或根据权利要求42至46中任一项所述的缀合物或药物组合物或根据权利要求47所述的制剂, 其中所述组分提供于所述试剂盒或系统的一个或多个隔室中, 以及

任选地关于制备所述缀合物或组合物的说明书和/或关于递送所述短肽(例如所述胱氨酸结肽)的说明书。

198. 一种在制备纳米脂蛋白颗粒和抗原结合多肽的缀合物时减少脂质-支架蛋白质缀合的方法, 所述方法包括:

a) 在允许纳米脂蛋白颗粒的组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质, 所述纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层, 其中所述成膜脂质中的一者或多者在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;

b) 在低pH下使所述颗粒接触抗原结合多肽(例如Fab),所述抗原结合多肽具有位于C端的互补官能团,所述低pH有利于所述经官能化的基团缀合至所述官能团而不是所述支架蛋白质;以及

c) 任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的所述缀合物。

199. 根据权利要求198所述的方法,其中所述经官能化的基团在所述低pH下不缀合至所述支架蛋白质。

200. 根据权利要求198或199所述的方法,其中所述低pH为pH 5.5至6.5、pH 5至6或pH 6。

201. 根据权利要求198至200中任一项所述的方法,其中所述步骤b) 在所述步骤a) 之后而没有用来去除一些或所有未组装的成膜脂质的中间步骤。

202. 根据权利要求198至201中任一项所述的方法,其中所述经官能化的基团为马来酰亚胺衍生物并且其中所述官能团为半胱氨酸硫醇基团,任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生所述抗原结合多肽的抗体中形成较链二硫键(诸如Cys-226或Cys-227)。

203. 根据权利要求198至202中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质中的一者或多者为C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至20个至60个氨基酸的短肽。

204. 根据权利要求203所述的方法,其中所述脂肪酰基为C<sub>16</sub>脂肪酰基。

205. 根据权利要求203或204所述的方法,其中所述短肽为胱氨酸结肽(CKP)。

206. 根据权利要求203所述的方法,其中所述CKP为EETI-II、环杆菌素A、cyclopsychotride A、cycloviolacin 01、cycloviolacin 012、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、环杆菌素B、cyclopsychotride或varv肽A。

207. 根据权利要求203或204所述的方法,其中所述短肽为CKP变体,所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP,在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP,在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP,在所述N端处的化学修饰;和/或

(e) 相对于野生型CKP,在所述C端处的化学修饰。

208. 根据权利要求203至207中任一项所述的方法,其中所述成膜脂质以1:3至1:15、或1:6至1:12、或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一者或多者(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);且/或其中所述缀合物包含所述短肽的1个至100个、10个至90个、20个至80个、30个至70个、40个至60个或60个分子。

209. 一种增加附接至基于脂质的纳米颗粒的表面的短肽的生物活性的方法,所述方法包括

(a) 提供基于脂质的纳米颗粒,所述基于脂质的纳米颗粒包含附接其表面的短肽,其中所述基于脂质的纳米颗粒的一种或多种脂质呈现经官能化的基团,并且

(b) 在一定条件下使所述纳米颗粒与具有官能团的多肽接触,所述条件有利于所述经官能化的基团缀合至所述官能团。

210. 根据权利要求209所述的方法,所述方法进一步包括纯化包含所述基于脂质的纳米颗粒、所述短肽和所述多肽的缀合物。

211. 根据权利要求209或210所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米颗粒包含脂双层。

212. 根据权利要求209或210所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米颗粒为脂质体、固体脂质纳米颗粒 (SLN) 或纳米结构化脂质载体 (NLC)。

213. 根据权利要求209至212中任一项所述的方法, 其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述基于脂质的纳米颗粒的表面上的脂质且/或其中间隔区连接所述互补官能团与所述多肽。

214. 根据权利要求209至213中任一项所述的方法, 其中所述多肽为抗原结合多肽。

215. 根据权利要求214所述的方法, 其中所述抗原结合多肽选自由以下项组成的组: Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fab (scFab)、单链Fv (scFv)、VH-VH二聚体、VL-VL二聚体、VH-VL二聚体、单结构域、双体抗体、线性抗体和其任一者或多者的组合。

216. 根据权利要求209至215中任一项所述的方法, 其中所述短肽为CKP或CKP变体, 所述CKP变体包含:

(a) 相对于野生型CKP的对应的一个或多个环序列, 在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(b) 相对于野生型CKP, 在N端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(c) 相对于野生型CKP, 在C端处的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;

(d) 相对于野生型CKP, 在所述N端处的化学修饰; 和/或

(e) 相对于野生型CKP, 在所述C端处的化学修饰。

217. 根据权利要求209至216中任一项所述的方法, 其中与所述短肽在所述多肽缀合至所述基于脂质的纳米颗粒之前的活性相比, 在所述多肽缀合至所述基于脂质的纳米颗粒之后, 所述短肽在所述多肽的缀合之后的活性是2倍至100倍高。

## 纳米脂蛋白-多肽缀合物和组合物、系统以及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请案要求2020年6月11日提出的美国临时申请第63/038,075号、2021年2月19日提出的美国临时申请第63/151,591号的优先权权益,这些临时申请中的每一者的内容以全文引用方式并入本文中。

[0003] 在ASCII文本文件上提交序列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:146392052840SEQLIST.TXT,记录日期:2021年6月7日,大小:1KB)。

### 技术领域

[0005] 本发明总体涉及包含至少一种缀合多肽(例如共价缀合的多肽)的纳米脂蛋白颗粒缀合物、相关组合物和系统及其制备和使用方法。特别地,提供具有抗原结合片段(Fab)的纳米脂蛋白颗粒(NLP)缀合物,其中该NLP包含由支架蛋白质环绕的成膜脂质的双层,并且这些Fab缀合至一个或两个双层表面。NLP-Fab缀合物以及相关组合物和系统通常显示良好的稳定性和可制造性,保留抗原结合活性,并且可增强抗原结合效力,从而提供用于Fab的递送以及基于Fab的治疗和诊断的多功能平台并且提供用于递送其他治疗剂和/或诊断剂的稳定平台。本发明还涉及纳米脂蛋白颗粒缀合物,其包含至少一种缀合肽,例如除了缀合多肽或代替缀合多肽。

### 背景技术

[0006] 过去10年,纳米技术领域的进展已试图解决常规药物递送系统的局限性。在过去数十年也已研发许多纳米颗粒,包括无机纳米颗粒、基于聚合物的纳米颗粒、聚合物胶束、树枝状聚合物、脂质体、病毒纳米颗粒、碳纳米管以及纳米脂蛋白颗粒(NLP)。

[0007] NLP是通常由自组装以形成盘形脂双层的两亲性脂质和载脂蛋白组成的纳米级颗粒,其中通过结合至载脂蛋白来稳定该盘形体的疏水性边缘。已针对所选应用和药物负荷对NLP进行探究。然而,先前研究尚未针对片段抗体(Fab)的递送来评估此平台。

[0008] 因此,本领域仍需要用于递送抗原结合多肽和/或用于靶向其他治疗剂和诊断剂的具有良好可制造性的新颖NLP递送平台,尤其是稳定组合物和系统。本发明可满足这些以及其他需要。

### 发明内容

[0009] 本发明总体上涉及纳米脂蛋白-多肽缀合物和组合物、系统以及制备和使用这些缀合物的方法,其中纳米脂蛋白颗粒缀合至多肽(例如抗原结合多肽(例如Fab)或半胱氨酸结肽(CKP))以得到在一些实施例中具有令人意外的性质的缀合物。本发明的缀合物可提供各种优点和改良,例如低毒性、低免疫原性、良好稳定性(无交联剂)、良好可制造性(包括可产生高度浓缩但黏度较低的制剂)、最少颗粒间交联至无颗粒间交联、相对均质的NLP群体和/或增强的抗原结合效力。

[0010] 在一方面,本发明提供包含支架蛋白质、成膜脂质以及抗原结合多肽的缀合物,其中成膜脂质排列成脂双层并且支架蛋白质环绕双层;并且其中经由一种或多种成膜脂质上的经官能化的基团以及抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,抗原结合多肽缀合至双层的一个或两个表面上的成膜脂质中的一种或多种。在一些实施例中,抗原结合多肽是Fab。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质并且/或者间隔区连接互补官能团与抗原结合多肽。在一些实施例中,间隔区是GSGS。

[0011] 在一些实施例中,经官能化的基团选自由以下项组成的组:马来酰亚胺衍生物、卤代乙酰胺、吡啶基二硫代-丙酸酯、硫代硫酸酯及其任何一种或多种的组合;并且在一些实施例中,互补官能团是游离硫醇基团(例如半胱氨酸硫醇基团),任选地其中半胱氨酸在衍生抗原结合多肽的抗体中形成铰链二硫键(例如Cys-226或Cys-227,根据Kabat编号)。在一些实施例中,支架蛋白质选自由以下项组成的组:(a) 载脂蛋白A、(b) 载脂蛋白B、(c) 载脂蛋白C、(d) 载脂蛋白D、(e) 载脂蛋白H、(f) 载脂蛋白E、(g) 能够稳定该双层的(a)-(f)的截短版本以及(h) (a)-(g)中的任何一种或多种的组合;并且/或者成膜脂质是选自由以下项组成的组: $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且脂肪酰基是缀合至具有20至60个氨基酸的短肽。

[0012] 在一些实施例中,提供一种缀合物,其包含:支架蛋白质、成膜脂质以及具有20至60个氨基酸的短肽,其中所述成膜脂质排列成脂双层并且该支架蛋白质环绕所述双层;并且其中所述短肽缀合至所述双层的一个或两个表面上的所述成膜脂质中的一种或多种。在一些实施例中,成膜脂质选自由以下项组成的组: $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,成膜脂质是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且所述脂肪酰基缀合至具有20-60个氨基酸的短肽。

[0013] 在一些实施例中,脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中,短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a) 相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b) 相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c) 相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d) 相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e) 相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。

[0014] 在一些实施例中,缀合物中(例如包含短肽和抗原结合多肽的NLP缀合物中)的短肽的活性高于不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的2倍至10倍。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的约5倍。在一些实施例中,短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体,并且80%-90%、90%-95%或95%-99%的所述活性保留于所述缀合物中。在一些实施例中,所述缀合物增加所述短肽的活性或亲合力。在一些实施例中,该缀合物(例如肽-NLP缀合物)进一步包含缀合至所述双层的一个或两个表面上的所述成膜脂质中的一种或多种的抗原结合多肽,所述缀合是经由该一种或多种成膜脂质上的经官能化的基团以及该抗原结合多肽上位于C端的互补官能团来实现;任选地,其

中间隔区连接该经官能化的基团与该成膜脂质并且/或者间隔区连接该互补官能团与该抗原结合多肽。在一些实施例中,所述缀合物包含所述Fab的1-100个分子;任选地所述缀合物包含所述肽的5-30、10-25、15-20或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5-40、10-35、15-30、20-25或23个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30、5-20、10-15或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80、25-70、30-60、35-50或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物,其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基包含不同于第一短肽的第二短肽。在一些实施例中,至少两个肽(例如胱氨酸结肽)结合不同靶、任选地两个、三个、四个或八个不同靶。在一些实施例中,两个或更多个短肽结合两个不同靶。在一些实施例中,靶是选自自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0015] 在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:60至1:100,诸如1:80。在一些实施例中,20%-35%的成膜脂质携载经官能化的基团(诸如20%)。抗原结合多肽可选自由以下项组成的组:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fab(scFab)、单链Fv(scFv)、VH-VH二聚体、VL-VL二聚体、VH-VL二聚体、单结构域、双体抗体、线性抗体及其任何一种或多种的组合。在特定实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子,诸如人或人源化Fab。由抗原结合多肽(例如Fab)结合的抗原可为OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3和/或淋巴毒素β受体。

[0016] 缀合物可提供多价和/或多特异性构建体的版本。例如,缀合物可包含两个或更多个抗原结合多肽分子(例如两个或更多个Fab分子),诸如2-60、2-32、10-30或20个分子。在一些实施例中,间隔区包含PEG或GSGS的氨基酸序列。在一些实施例中,缀合物具有所述抗原结合多肽的1-160、10-120、20-100、40-80或60个分子;其中所述抗原结合多肽是Fab并且所述Fab通过PEG间隔区连接至所述成膜脂质。在一些实施例中,PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。

[0017] 此类形式可增加抗原结合多肽的活性和/或亲合力、其血清稳定性和/或其血清半衰期(与不缀合至纳米脂蛋白颗粒(NLP)的抗原结合多肽相比)。在一些实施例中,抗原结合多肽的血清半衰期增加2-20倍、5-15或10倍。在一些实施例中,所述缀合物具有所述抗原结合多肽的5-60、6-40或7-32个分子。

[0018] 在一些实施例中,该缀合物包含两种或更多种结合不同的靶或表位(例如两个、三个、四个或八个不同之靶或表位)的抗原结合多肽(例如两个或更多个Fab)。此类版本可提供双特异性构建体,例如,其中靶是选自自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。在一些实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子,任选地人或人源化Fab。

[0019] 本发明的缀合物可以包含缀合物以及药学上可接受的载体的药物组合物的形式来提供。

[0020] 本发明的另一方面提供高浓度、低黏度液体制剂,诸如包含100-300mg缀合物并且黏度为10-50cP的液体制剂。在一些实施例中,药物组合物或液体制剂经皮下或经由眼部递送来施用。在一些实施例中,将缀合物、组合物或制剂,诸如在海藻糖存在下冻干;并且任选

地重构。在特定实施例中,冻干在80mM海藻糖存在下和/或在5mg缀合物/mL的浓度下发生。在一些实施例中,该缀合物包含18-20个Fab分子/缀合物。有利的是,在一些实施例中,抗原结合多肽(例如Fab)的80%-90%、90%-95%或95%-99%的抗原结合活性在冻干和重构后得以保留。

[0021] 本发明的另一方面提供制备本发明的缀合物的方法。在一些实施例中,该方法包括a)在允许组装纳米脂蛋白颗粒的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中一种或多种成膜脂质在颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;b)使颗粒在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触抗原结合多肽(例如Fab),该抗原结合多肽具有缀合至经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及c)任选地纯化颗粒和抗原结合多肽的缀合物。在一些实施例中,步骤b)在步骤a)之后并且没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质的中间步骤。在特定实施例中,经官能化的基团是马来酰亚胺衍生物并且官能团是半胱氨酸硫醇基团,例如其中半胱氨酸在衍生抗原结合多肽的抗体中形成铰链二硫键(例如Cys-226或Cys-227,根据Kabat编号)。

[0022] 在一些实施例中,在低pH下(例如在pH 5.5-6.5、pH 5-6或pH 6下),经官能化的基团不缀合至支架蛋白质。

[0023] 在一些方法实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。在一些实施例中,间隔区是连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。在一些实施例中,PEG间隔区具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。

[0024] 在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且所述脂肪酰基是缀合至具有20至60个氨基酸的短肽。在一些实施例中,脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中,短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。在一些实施例中,成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中,缀合物中的短肽活性高于不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽活性。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的2倍至10倍。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的约5倍。在一些实施例中,短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体,并且80%-90%、90%-95%或95%-99%的所述活性保留于所述缀合物中。在一些实施例中,该缀合物包含所述Fab的1-100个分子;任选地所述缀合物包含所述肽的5-30、10-25、15-20或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5-40、10-35、15-30、20-25或23个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30、5-20、10-15或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80、

25-70、30-60、35-50或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物,其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基包含不同于第一短肽的第二短肽。在一些实施例中,至少两个肽(例如胱氨酸结肽)结合不同靶、任选地两个、三个、四个或八个不同靶。在一些实施例中,两个或更多个短肽结合两个不同靶。在一些实施例中,靶是选自自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0025] 在一些实施例中,提供了一种制备纳米脂蛋白颗粒以及具有20至60个氨基酸的短肽(例如胱氨酸结肽)的缀合物的方法,其包含:a)在允许纳米脂蛋白颗粒(自)组装的条件下,提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层;其中所述成膜脂质中的一种或多种包含C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)并且脂肪酰基缀合至所述短肽;并且任选地纯化肽缀合物。在一些实施例中,短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同的肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物,其中第一肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基包含不同于第一短肽的第二短肽。在一些实施例中,至少两个肽(例如胱氨酸结肽)结合不同靶、任选地两个、三个、四个或八个不同靶。在一些实施例中,两个或更多个短肽结合两个不同靶。在一些实施例中,所述靶是选自自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。在一些实施例中,短肽为具有生物活性的CKP或CKP变体,并且80%-90%、90%-95%或95%-99%的所述活性保留于所述缀合物中。在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;并且进一步包含以下步骤:b)使所述颗粒在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触抗原结合多肽(例如Fab),该抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;其中所述步骤b)在所述步骤a)之后,并且没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质的中间步骤;并且/或者没有用以富集步骤a)的肽缀合物的中间步骤。在一些实施例中,所述经官能化的基团是马来酰亚胺衍生物并且所述官能团是半胱氨酸硫醇基团,任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生抗原结合多肽的抗体中形成较链二硫键(诸如Cys-226或Cys-227)。在一些实施例中,所述经官能化的基团在所述低pH下不缀合至所述支架蛋白质。在一些实施例中,所述低pH为pH 5.5至6.5、pH 5至6或pH 6。在一些实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。在一些实施例中,所述间隔区是连接所述经官能

化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。在一些实施例中,所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200、或2000的MW。在一些实施例中,所述缀合物增加所述短肽的活性或亲合力。在一些实施例中,所述缀合物包含所述Fab的1-100个分子;任选地所述缀合物包含所述肽的5-30、10-25、15-20或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5-40、10-35、15-30、20-25或23个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30、5-20、10-15或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80、25-70、30-60、35-50或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子。在一些实施例中,缀合物中短肽的活性高于不包含抗原结合多肽的缀合物中肽的活性。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的2倍至10倍。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的约5倍。

[0026] 还提供了通过本文的任何方法产生的缀合物。

[0027] 因此,本发明的另一方面提供了一种在制备纳米脂蛋白颗粒和抗原结合多肽的缀合物中减少脂质-支架蛋白质缀合的方法。该方法可包括a)在允许纳米脂蛋白颗粒组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由支架蛋白质环绕的成膜脂质的脂双层,其中一种或多种成膜脂质在颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;b)在有益于经官能化的基团与官能团而非支架蛋白质缀合的低pH(例如约5.55至约6.5、约5至约6或约6的pH)下,使颗粒接触在C端具有互补官能团的抗原结合多肽(例如Fab)。在一些实施例中,步骤b)在步骤a)之后并且没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质的中间步骤。在特定实施例中,经官能化的基团是马来酰亚胺衍生物并且官能团是半胱氨酸硫醇基团,例如其中半胱氨酸在衍生抗原结合多肽的抗体中形成铰链二硫键(例如Cys-226或Cys-227,根据Kabat编号)。在一些实施例中,所述成膜脂质是C<sub>4-28</sub>脂肪酰基并且所述脂肪酰基缀合至具有20-60个氨基酸的短肽。在一些实施例中,所述脂肪酰基是C<sub>16</sub>脂肪酰基。在一些实施例中,所述短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。

[0028] 本发明的另一方面提供增加抗原结合多肽(例如Fab)的亲合力、活性和/或效力(与在不缀合至NLP时多肽的亲合力、活性和/或效力相比)的方法。在一些实施例中,该方法包括a)在允许纳米脂蛋白颗粒(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中所述成膜脂质中的一种或多种在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;b)使所述颗粒在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触抗原结合多肽(例如Fab),该抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及c)任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的缀合

物,从而增加抗原结合多肽的亲合力、活性和/或效力(与在不缀合至NLP时多肽的亲合力、活性和/或效力相比)。在特定实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子;在特定实施例中,该缀合物包含抗原结合多肽的至少6个分子(例如10-60、15-30或20个分子)。在一些实施例中,该抗原结合多肽是通过PEG间隔区连接至所述成膜脂质的Fab或Fab样分子;并且所述缀合物包含所述抗原结合多肽的1-160、10-120、20-100、40-80或60个分子。在一些实施例中,PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。在一些实施例中,该缀合物是稳定的。在一些实施例中,与包含较少或不包含抗原结合多肽(例如少于7个Fab)的缀合物相比,该缀合物是稳定的,诸如包含所述抗原结合多肽的7-60、7-32、40-60或50个分子的缀合物。在一些实施例中,该缀合物进一步包含结合不同靶的第二抗原结合多肽的一个或多个分子;并且/或者该缀合物以包含100-300mg所述缀合物并且黏度为10-50cP的液体制剂的形式来提供。

[0029] 在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且所述脂肪酰基缀合至具有20-60个氨基酸的短肽,并且该方法增加短肽的亲合力、活性和/或效力。在一些实施例中,所述脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中,所述短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同的肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物,其中第一肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物包含第一短肽,并且其中第二肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基包含不同于第一短肽的第二短肽。在一些实施例中,所述至少两个肽(例如胱氨酸结肽)结合不同靶、任选地两个、三个、四个或八个不同靶。在一些实施例中,所述两个或更多个短肽结合两个不同靶。在一些实施例中,所述靶是选自以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。在一些实施例中,所述缀合物包含所述Fab的1-100个分子;任选地所述缀合物包含所述肽的5-30个、10-25个、15-20个、或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5-40个、10-35个、15-30个、20-25个、或23个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30个、5-20个、10-15个、或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80个、25-70个、30-60个、35-50个、或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子。在一些实施例中,缀合物中的短肽活性高于不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽活性。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的2倍至10倍。在一些实施例中,缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的约5倍。

[0030] 本发明的另一方面提供了增加抗原结合多肽(例如Fab)的稳定性、保质期和/或半

衰期(与在不缀合至NLP时多肽的亲合力、活性和/或效力相比)的方法。还提供了增加NLP的稳定性、保质期和/或半衰期(与在不缀合至抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)时NLP的稳定性、保质期和/或半衰期相比)的方法。在一些实施例中,该方法包括a)在允许纳米脂蛋白颗粒(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中所述成膜脂质中的一种或多种在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;b)使所述颗粒在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触抗原结合多肽(例如Fab),该抗原结合多肽具有结合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;以及c)任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的缀合物,从而增加抗原结合多肽的稳定性、保质期和/或半衰期(与未缀合至NLP或缀合至具有较少抗原结合多肽(例如少于7个Fab)的NLP时多肽的稳定性、保质期和/或半衰期相比)。在一些实施例中,该缀合物包含所述抗原结合多肽的5-60个分子。在特定实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子;在特定实施例中,该缀合物包含7-32个抗原结合多肽分子。

[0031] 在一些实施例中,成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且所述脂肪酰基缀合至具有20-60个氨基酸的短肽。在一些实施例中,所述脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。

[0032] 还提供了增加长度为20-60个氨基酸的短肽的稳定性、保质期和/或半衰期的方法,所述方法包括:a)在允许纳米脂蛋白颗粒(自)组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层;所述成膜脂质中的一种或多种包含 $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)并且脂肪酰基缀合至所述短肽;以及任选地纯化肽缀合物;b)修饰所述成膜脂质中的一种或多种以在所述颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团,以及c)使所述颗粒在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触抗原结合多肽(例如Fab),该抗原结合多肽具有缀合至所述经官能化的基团的位于C端的互补官能团;其中所述步骤c)紧跟步骤b)之后并且没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质的中间步骤;并且/或者没有用以富集步骤b)的肽缀合物的中间步骤。在一些实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽,从而增加所述短肽的稳定性、保质期和/或半衰期。在一些实施例中,脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。

[0033] 在一些实施例中,所述短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。

[0034] 在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。

[0035] 在一些实施例中,所述抗原结合多肽是Fab或Fab样分子并且/或者所述缀合物包含所述抗原结合多肽(例如所述Fab)的5-60、6-40、7-32、40-60或50个分子。在一些实施例

中,缀合物包含所述Fab的1-100个分子;任选地所述缀合物包含所述肽的5-30、10-25、15-20或18个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的5-40、10-35、15-30、20-25或23个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30、5-20、10-15或13个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子;或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80、25-70、30-60、35-50或40个分子以及所述抗原结合多肽(例如Fab)的10-60个分子。

[0036] 在增加亲和力、活性、效力、稳定性、保质期和/或半衰期的方法的一些实施例中,该缀合物进一步包含生物活性剂或可检测的剂。在特定实施例中,生物活性剂是选自由以下项组成的组的细胞毒性剂:道诺霉素(daunomycin)、阿霉素(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、长春地辛(vindesine)、放射性核素、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格尔德霉素(geldanamycin)、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamicin)或其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,可检测的剂是选自由以下项组成的组的标记:放射性同位素、荧光团、化学发光染料、发色团、酶、金属离子、纳米颗粒及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,缀合物是以液体制剂形式来提供,所述制剂包含100-300mg所述缀合物并且具有10-50cP的黏度。

[0037] 本发明的其他方面提供如本文所提供的缀合物、药物组合物或制剂,用作药物;用于治疗癌症或眼部疾病;用于制造用于治疗癌症或眼部疾病的药物;和/或用于制造用于抑制血管生成和/或肿瘤生长的药物。

[0038] 本发明的另一方面提供一种使用抗原结合多肽(例如Fab)和/或短肽治疗个体的方法,其包括向个体施用有效量的如本文所提供的缀合物、药物组合物或制剂。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用另外的治疗剂。

[0039] 再一方面提供一种将抗原结合多肽(例如Fab)递送至有需要的个体中的方法,其包含提供用于施用于个体的本发明的缀合物、药物组合物或制剂。有利的是,可以强效、稳定的液体制剂形式来递送抗原结合多肽(例如Fab),诸如其中缀合物包含经由成膜脂质上的经官能化的基团以及抗原结合多肽上位于C端的互补官能团缀合至5-60个抗原结合多肽分子(例如,5-60个Fab分子)的成膜脂质。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质并且/或者间隔区连接互补官能团与抗原结合多肽。有利的是,可以强效、低黏度的制剂形式来递送抗原结合多肽(例如Fab),诸如以黏度为10-50cP并且浓度为100-300mg缀合物/mL的液体制剂的形式。

[0040] 在递送抗原结合多肽的方法的一些实施例中,抗原结合多肽是Fab,其结合选自由以下项组成的组的靶:因子D、VEGF、Tie2、DR4及其任何一种或多种的组合;并且制剂经由眼部递送来施用。在递送抗原结合多肽的方法的一些实施例中,抗原结合多肽是Fab,其结合选自由以下项组成的组的靶:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 $\beta$ 受体及其任何一种或多种的组合。在特定实施例中,抗原结合多肽(例如Fab)结合至少两个不同靶,例如其中两个不同的靶选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0041] 本文还提供一种以强效、稳定的液体制剂形式将长度为20-60个氨基酸的短肽递送至有需要的个体中的方法,所述方法包括:

[0042] 向个体施用包含该抗原结合多肽(例如所述Fab)和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂;其中该纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂质层的支架蛋白质;其中所述成

膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且其中该脂肪酰基缀合至具有20至60个氨基酸的短肽；其中经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团，所述成膜脂质缀合至该抗原结合多肽的5-100个分子；任选地其中间隔区连接该经官能化的基团与该成膜脂质并且/或者间隔区连接该互补官能团与该抗原结合多肽，从而以稳定液体制剂形式将该抗原结合多肽递送至个体中。

[0043] 还提供一种以强效、低黏度制剂形式将长度为20-60个氨基酸的短肽递送至有需要的个体中的方法，所述方法包括：

[0044] 向个体施用包含所述抗原结合多肽（例如所述Fab）和纳米脂蛋白颗粒的缀合物的液体制剂；其中所述纳米脂蛋白颗粒包含环绕成膜脂质的双脂质层的支架蛋白质；其中所述成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且其中所述脂肪酰基缀合至具有20-60个氨基酸的短肽；其中经由所述一种或多种成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团，所述成膜脂质中的一种或多种缀合至所述抗原结合多肽；任选地其中间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽；并且其中所述液体制剂具有10-50cP的黏度以及100-300mg所述缀合物/mL的浓度，从而以低黏度制剂形式将所述抗原结合多肽递送至个体中。

[0045] 在递送方法的一些实施例中，所述脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中，所述短肽是胱氨酸结肽（CKP）。在一些实施例中，CKP是EETI-II。在一些实施例中，短肽是CKP变体，该CKP变体包含：(a) 相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列，在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；(b) 相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；(c) 相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代；(d) 相对于野生型CKP在N端的化学修饰；和/或(e) 相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中，相对于野生型CKP，CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中，野生型CKP是EETI-II。在一些实施例中，所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽- $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种（例如肽- $C_{16}$ 脂肪酰基缀合物和DOPC）；并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中，缀合物中的短肽活性高于不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽活性。在一些实施例中，缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的2倍至10倍。在一些实施例中，缀合物中的肽的活性是不包含抗原结合多肽的缀合物中的肽的活性的约5倍。在一些实施例中，所述缀合物包含所述Fab的1-100个分子；任选地所述缀合物包含所述肽的5-30个、10-25个、15-20个、或18个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的5-40个、10-35个、15-30个、20-25个、或23个分子；或任选地所述缀合物包含所述肽的3-30个、5-20个、10-15个、或13个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的10-60个分子；或任选地所述缀合物包含所述肽的20-80个、25-70个、30-60个、35-50个、或40个分子以及所述抗原结合多肽（例如Fab）的10-60个分子。在一些实施例中，所述间隔区是连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。在一些实施例中，PEG间隔区具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。在一些实施例中，所述抗原结合多肽（例如Fab）和所述短肽各自结合相同的靶。在一些实施例中，所述抗原结合多肽（例如Fab）和所述胱氨酸结肽各自结合不同的靶。在一些实施例中，所述抗原结合多肽是Fab，其结合选自以下项组成的组的靶：因子D、VEGF、Tie2、DR4及其任何一种或多种的组

合;并且所述制剂经由眼部递送来施用。在一些实施例中,所述短肽结合选自由以下项组成的组的靶:因子D、VEGF、Tie2、DR4及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,所述抗原结合多肽是Fab,其结合选自由以下项组成的组的靶:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 $\beta$ 受体、及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,所述短肽结合选自由以下项组成的组的靶:OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 $\beta$ 受体、及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,该抗原结合多肽结合至少两个不同的靶。在一些实施例中,所述两个不同的靶是选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。在一些实施例中,所述短肽和所述抗原结合多肽结合至少两个不同的靶。在一些实施例中,所述两个不同的靶是选自由以下项组成的组的对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0046] 再一方面提供一种以稳定的液体制剂形式将生物活性剂或可检测的剂递送至有需要的个体中的方法,该方法包括向个体施用包含本发明的缀合物和生物活性剂或可检测的剂的液体制剂,其中该缀合物包含经由成膜脂质上的经官能化的基团以及抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,缀合至抗原结合多肽的5-60个分子(例如5-60个Fab分子)的成膜脂质;并且其中生物活性剂或可检测的剂缀合至该缀合物的支架蛋白质、成膜脂质和/或抗原结合多肽。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质并且/或者间隔区连接互补官能团与抗原结合多肽。

[0047] 再一方面提供一种以低黏度制剂形式将生物活性剂或可检测的剂递送至有需要的个体中的方法,该方法包括向个体施用包含本发明的缀合物和生物活性剂或可检测的剂的液体制剂,其中生物活性剂或可检测的剂缀合至该缀合物的支架蛋白质、成膜脂质和/或抗原结合多肽;并且其中液体制剂具有10-50cP的黏度以及100-300mg缀合物/mL的浓度。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质并且/或者间隔区连接互补官能团与抗原结合多肽。

[0048] 再一方面提供一种将生物活性剂或可检测的剂递送至有需要的个体的脑或中枢神经系统中的方法,该方法包括向个体全身性施用包含本发明的缀合物以及生物活性剂或可检测的剂的液体制剂,其中生物活性剂或可检测的剂缀合至支架蛋白质、成膜脂质和/或抗原结合多肽;并且其中该缀合物穿越血-脑屏障。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质并且/或者间隔区连接互补官能团与抗原结合多肽。在特定实施例中,支架蛋白质是apoE2和/或apoE4。在特定实施例中,液体制剂经静脉内施用。

[0049] 在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种是 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并且所述脂肪酰基是缀合至具有20至60个氨基酸的短肽。在一些实施例中,所述脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中,所述短肽是胱氨酸结肽(CKP)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。在一些实施例中,短肽是CKP变体,该CKP变体包含:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在其N端包含另外的赖氨酸残基。在一些实施例中,野生型CKP是EETI-II。在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至

1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC);并且/或者所述缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中,所述间隔区是连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。在一些实施例中,所述PEG间隔区具有1000至3000、1500至2500、1900至2200、或2000的MW。

[0050] 在递送生物活性剂或可检测的剂的方法的一些实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子。在特定实施例中,生物活性剂是选自由以下项组成的组的细胞毒性剂:道诺霉素(daunomycin)、阿霉素(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、长春地辛(vindesine)、放射性核素、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格尔德霉素(geldanamycin)、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamicin)或其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,可检测的剂是选自由以下项组成的组的标记:放射性同位素、荧光团、化学发光染料、发色团、酶、金属离子、纳米颗粒及其任何一种或多种的组合。在特定实施例中,成膜脂质缀合至5-60个抗原结合多肽分子。有利的是,液体制剂可具有10-50cP的黏度以及100-300mg缀合物/mL的浓度。

[0051] 在一些实施例中,液体制剂经静脉内施用。在一些实施例中,经由所述成膜脂质上的经官能化的基团以及所述抗原结合多肽上位于C端的互补官能团,所述成膜脂质缀合至所述抗原结合多肽的5-100个分子。在一些实施例中,该抗原结合多肽是Fab并且所述Fab经由PEG间隔区连接至所述成膜脂质。在一些实施例中,所述PEG间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。在一些实施例中,该液体制剂具有10-50cP的黏度以及100-300mg所述缀合物/mL的浓度。

[0052] 另一方面提供用于进行本文所描述的方法(例如用于将抗原结合多肽(例如Fab)递送至靶细胞中)的系统或试剂盒。在一些实施例中,在该系统或试剂盒的一个或多个腔室中,该系统或试剂盒包含一种或多种用于制备本文的NLP-多肽缀合物或肽-NLP-多肽缀合物、本文的药物组合物或本文的制剂的组分。在一些实施例中,提供关于制备缀合物、组合物或制剂或其用于根据本发明方法来递送抗原结合多肽的说明书。在特定实施例中,抗原结合蛋白质是Fab或Fab样分子。

[0053] 还提供用于将具有20至60个氨基酸的短肽(例如胱氨酸结肽)递送至靶细胞中的系统或试剂盒,该系统或试剂盒包含:一种或多种用于制备本文的肽-NLP缀合物、本文的药物组合物或本文的制剂的组分,其中所述组分提供于所述试剂盒或系统的一个或多个腔室中,以及任选地用于制备所述缀合物或组合物的说明书和/或用于递送所述短肽(例如所述胱氨酸结肽)的说明书。

[0054] 在相关方面中,提供了一种增加附接至基于脂质的纳米颗粒的表面的短肽的生物活性的方法,其包括(a)提供包含表面附接有短肽的基于脂质的纳米颗粒,其中基于脂质的纳米颗粒的一种或多种脂质呈现经官能化的基团,以及(b)使纳米颗粒与具有官能团的多肽在有益于结合缀合所述经官能化的基团与所述官能团的条件下接触。在一些实施例中,该方法进一步包含纯化包含基于脂质的纳米颗粒、短肽和多肽的缀合物。在一些实施例中,基于脂质的纳米颗粒包含脂双层。在一些实施例中,基于脂质的纳米颗粒是脂质体、固体脂质纳米颗粒(SLN)或纳米结构化脂质载剂(NLC)。在一些实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与基于脂质的纳米颗粒的表面上的脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与

所述多肽。在一些实施例中,该多肽是抗原结合多肽。在一些实施例中,抗原结合多肽选自由以下项组成的组:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fab(scFab)、单链Fv(scFv)、VH-VH二聚体、VL-VL二聚体、VH-VL二聚体、单结构域、双体抗体、线性抗体及其任何一种或多种的组合。在一些实施例中,短肽是CKP或包含以下各项的CKP变体:(a)相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列,在一个或多个环序列中的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(b)相对于野生型CKP在N端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(c)相对于野生型CKP在C端的一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代;(d)相对于野生型CKP在N端的化学修饰;和/或(e)相对于野生型CKP在C端的化学修饰。在一些实施例中,与短肽在多肽缀合至基于脂质的纳米颗粒之前的活性相比,在多肽缀合基于脂质的纳米颗粒之后,该短肽在多肽的缀合之后的活性是前者的2倍至100倍。

## 附图说明

[0055] 本专利或申请案含有至少一个彩色附图。在申请且支付必要费用后,专利局将提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开案的复本。

[0056] 图1A至图1D描绘了DOPE-MCC对NLP组装的作用。图1A描绘了DOPE-MCC NLP组装和Fab缀合的示意图。图1B描绘了在NLP SEC峰中随NLP中的mol%DOPE-MCC而变化的MW和R<sub>h</sub>的MALS/QELS分析。图1C描绘了仅apoE422k(圆)、组装于pH 7.4下的NLP(平直线)以及组装于pH 6.0下的NLP(三角形)的TIC层析图。图1D描绘了1D中针对仅apoE422k(圆)、组装于pH 7.4下的NLP(平直线)以及组装于pH 6.0下的NLP(三角形)所显示TIC光谱峰的解卷积质量。

[0057] 图2A至图2C描绘了Fab-NLP的缀合、纯化和表征。图2A描绘了在以20的Fab:NLP比率缀合之后Fab-NLP的SEC纯化。第一峰对应于Fab-NLP缀合物,第二峰对应于Fab二聚体并且第三峰对应于游离未缀合的Fab。插图显示Fab-NLP峰的放大形式,其中QELS的R<sub>h</sub>叠加于峰上。左y轴是吸光度并且右y轴是跨越峰的Fab-NLP的不同缀合物部分的R<sub>h</sub>。图2B描绘了游离Fab(圆)和Fab-NLP缀合物(三角形)的TIC层析图。图2C描绘了图2C中针对游离Fab(圆)和Fab-NLP缀合物(三角形)所显示的TIC光谱峰的解卷积质量。

[0058] 图3A至图3D描绘了Fab载量的优化。图3A描绘了以递增Fab浓度组装的Fab-NLP缀合物的SEC纯化层析图。图3B描绘了在缀合反应中随Fab浓度而变化的Fab数/NLP(Fab:NLP)。图3C描绘了随Fab数/NLP(Fab:NLP)而变化的Fab-NLP缀合物的MW。图3D描绘了随Fab数/NLP(Fab:NLP)而变化的Fab-NLP缀合物的Rh。

[0059] 图4A至图4B描绘了Fab-NLP制剂。图4A描绘了仅游离Fab(圆)、Fab-NLP缀合物(正方形)和Fab-PEG缀合物(三角形)的黏度与Fab浓度之间的关系。图4B描绘了Fab-NLP缀合物在冻干之前和之后的Rh和MW分析。左y轴和灰色条是MW并且右y轴和黑色条是R<sub>h</sub>。

[0060] 图5A至图5D描绘了Fab-NLP活性。图5A描绘了在因子B裂解的因子D FRET分析中仅抗因子D Fab(十字形)、NLP缀合物(Fab-NLP,正方形)、冻干和重构后的NLP缀合物(三角形)和阴性Fab对照(圆)的活性。显示了四次重复的平均及标准偏差,数据代表n=3个独立实验。图5B描绘了在0-29.4范围内的Fab化合价缀合至NLP平台时抗OX40的激动剂活性,其中随抗OX40 fab浓度的变化来绘图。使用抗OX40 huIgG1作为阴性对照。显示了三次重复的平均和标准偏差。图5C描绘了在0-29.4范围内的Fab化合价缀合至NLP平台时抗OX40的激动剂活性,其中随抗NLP浓度的变化来绘图。使用抗OX40 huIgG1作为阴性对照。显示了三次重复

的平均和标准偏差。图5D描绘了在不同Fab-NLP化合价下由图5C中的曲线拟合计算的EC50值。

[0061] 图6A至图6B描绘了Fab-NLP缀合物在50%血清中的稳定性。图6A描绘了NLP在50%血清中培育之后的不同时间点的SEC迹线。NLP主峰左侧的肩峰是由于血清中的背景吸光度并且在后续分析中扣除。图6B描绘了由不同Fab加载密度组成的Fab-NLP缀合物随时间而变化的Fab-NLP降解。这些曲线是通过归一化至0hr时的Fab-NLP峰面积生成的。

[0062] 图7A至图7B描绘了Fab-NLP缀合物的蛋白质组合物的量化。图7A描绘了Fab-NLP缀合物的HPLC迹线。在4.95min和5.15min时观察到两个峰,其分别对应于apoE422k和Fab。图7B描绘了apoE422k在不同注入量下的HPLC迹线(左图)和相应标准曲线(右图)。使用apoE422k标准曲线来测定Fab-NLP缀合物的apoE422k浓度。

[0063] 图8A至图8B描绘了DOPE-MCC对NLP组装的作用。图8A描绘了在递增的DOPE-MCC摩尔浓度下组装的NLP的SEC分析。图8B描绘了在交联条件(pH 7.4)和非交联条件(pH 6)下组装的NLP的MW和Rh分析。

[0064] 图9A至图9D描绘了C16-EETI-II的设计和产生。图9A示出了野生型EETI-II和C16-EETI-II的氨基酸序列。棕榈酸经由N端赖氨酸缀合至EETI-II。图9B提供了C16-EETI-II产生的过程流程图。图9C提供了EETI-II的分析型RP-HPLC(左图)和LC-MS(右图)。LC-MS验证了C18-EETI-II和EETI-II的属性和纯度。图9D提供了显示在添加脂肪酸标签的情形下,C16-EETI-II的疏水性大于EETI-II(通过C16-EETI-II的较长滞留时间来指示)的分析型RP-HPLC(左图)和LC-MS(右图)。

[0065] 图10A至图10E描绘了加载CKP的NLP(NLP-CKP)的组装。图10A描绘了CKP-NLP组装和CKP缀合的示意图。图10B描绘了CKP-NLP的SEC层析图(虚线显示合并用于进一步分析的部分)。图10C描绘了使用ELSD(蒸发光散射检测器)获得的CKP-NLP的RP-HPLC层析图。观察到三个对应于ApoE422k、CKP和DOPC的峰,如通过每一者的相应卡通图所指示。图10D描绘了MW的SEC-MALS分析(使用箭头指示MW)。280nm下的吸光度显示于右轴上。图10E描绘了Rh(Rh(左轴)是通过跨越CKP-NLP峰的分散点指示的)的SEC-MALS分析。280nm下的吸光度显示于右轴上。

[0066] 图11A至图11D描绘了CKP载量对NLP大小和组成以及对CKP活性的作用。图11A描绘了在递增CKP-C16 mol%下组装的CKP-NLP的SEC层析图。图11B描绘了整个CKP-NLP SEC峰随CKP-NLP组装体中的CKP mol%而变化的平均Rh分析。图11C描绘了在纯化之后随包括于自组装反应中的CKP分子数/NLP而变化的CKP分子数/NLP的HPLC量化。重复二次分析组装体。图11D示出了含有不同CKP含量的CKP-NLP(0-63CKP/NLP)的CKP活性分析的结果。重复三次进行分析。

[0067] 图12A至图12B描绘了在37℃下储存于50%血清中之后不同时间时NLP的SEC层析图。图12A描绘了其中使用AF488标记的NLP并且在A495下监测SEC迹线中的吸光度以限制来自生物基质的背景信号的结果。图12B描绘了在37℃下于50%血清中培育时随时间而变化的CKP-NLP的归一化峰面积。

[0068] 图13A至图13D描绘了Fab-CKP-NLP缀合物的组装和表征。图13A描绘了用于生成Fab-CKP-NLP缀合物的策略的示意图。利用反应性DSPE-PEG-Mal脂质组装CKP-NLPs并且经由游离半胱氨酸将经组装的CKP-NLP缀合至Fab。图13B描绘了在完成缀合之后Fab-CKP-NLP

缀合物的SEC层析图。观察三个对应于Fab-CKP-NLP缀合物、Fab二聚体和未缀合的Fab的峰。图13C描绘了经SEC纯化的Fab-CKP-NLP缀合物的HPLC层析图。检测到Fab-CKP-NLP的所有组分,如通过每一种的相应卡通图所指示。图13D描绘了整个Fab-CKP-NLP缀合物峰的MW(上图)和Rh(下图)的SEC-MALS分析。

[0069] 图14A-14E描绘了Fab-CKP-NLP的Fab载量和稳定性。图14A描绘了在缀合步骤期间以不同Fab:CKP-NLP比率(0-150)生成的Fab-CKP-NLP缀合物的SEC层析图。观察三个对应于Fab-CKP-NLP缀合物、Fab二聚体和未缀合的Fab的峰。图14B描绘了对于低CKP-NLP和高CKP-NLP随反应中Fab比率而变化的经纯化Fab-CKP-NLP缀合物中的Fab数/NLP的HPLC分析。图14C描绘了对于低CKP-NLP和高CKP-NLP随Fab载量而变化的Fab-CKP-NLP的Rh。图14D描绘了对于低CKP-NLP和高CKP-NLP随Fab载量而变化的Fab-CKP-NLP的CKP活性分析结果。重复三次进行分析。图14E描绘了在37℃下于50%血清中培育时随时间而变化的CKP-NLP和Fab-CKP-NLP的归一化峰面积。

## 具体实施方式

### [0070] I. 定义

[0071] 除非在下文中另外定义,否则本文所用的术语为本技术领域中的一般使用。

[0072] 本文的术语“抗体”是在最广泛意义上使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段,只要其表现出期望的抗原结合活性即可。因此,在本发明的上下文中,术语抗体涉及完整免疫球蛋白分子以及此类免疫球蛋白分子的一部分。另外,该术语涉及经修饰和/或改变的抗体分子,尤其是经突变的抗体分子。该术语也涉及以重组方式或以合成方式生成/合成的抗体。在本发明的上下文中,术语抗体可与术语免疫球蛋白互换使用。

[0073] “抗体片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含结合完整抗体所结合抗原的完整抗体的一部分。抗体片段之实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、双体抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)以及单结构域抗体(例如纳米抗体、IgNAR)。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)。关于scFv片段的综述,例如参见Pluckthün,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag,New York,269-315页,(1994);也参见WO 93/16185。双体抗体是具有两个抗原结合位点(其可为二价或双特异性)的抗体片段。参见例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。Hudson等人,Nat Med 9,129-134(2003)中也描述三功能抗体和四功能抗体。单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或抗体的轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段(Domantis, Inc., Waltham, MA; 例如参见美国专利第6,248,516B1号)。包含各种抗体片段之抗体形式的其他实例包括但不限于BiTE、BiTE-Fc、DART、DART-Fc、TriKE和TandAb形式(关于综述,请参见Suurs, F. V. 等人, A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges, Pharmacology & Therapeutics, 201(2019) 103-119)。抗体片段可通过各种技术制得,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消解以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生。

[0074] 如本文中所使用,术语“抗原结合多肽”在其最广泛意义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。抗原结合多肽的实例是抗体、免疫球蛋白及其衍生物,例如抗体片段。抗原结合多肽也可包括设计的锚蛋白重复蛋白(darpin)和/或包含蛋白支架的蛋白结合剂(例如森特因(Centyrin)、黏合素(Affimer)、阿德奈汀(AdNectin)、高亲合力多聚物(Avimer)、打结素(Knottin)、单抗体、亲和钳(Affinity clamp)等)。抗原结合多肽结合(即特异性结合)至抗原决定簇。在一些实施例中,抗原结合多肽能够将其所附接的实体(例如纳米脂蛋白颗粒)引导至靶位点,例如引导至具有抗原决定簇的特定类型的肿瘤细胞或肿瘤间质。在一些实施例中,抗原结合多肽能够通过其靶抗原来激活信号传导,例如在抗原决定簇结合至T细胞上的抗原结合受体时激活信号传导。抗原结合多肽可包括抗原结合结构域,该抗原结合结构域通常包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。在某些实施例中,抗原结合多肽可包含如本领域已知的免疫球蛋白恒定区。可用的重链恒定区包括五种同型: $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  或 $\mu$ 中的任一者;可用的轻链恒定区包括二种同型中的任一者: $\kappa$ 和 $\lambda$ 。在某些实施例中,抗原结合多肽不包含Fc区。在某些实施例中,抗原结合多肽包含铰链区(或免疫球蛋白的铰链区的一部分),但不包含Fc区或不包含Fc区的全部。例如,在一些实施例中,抗原结合多肽不包括IgG Fc结构域的一个或多个亚单元,例如不包含IgG CH2恒定结构域;和/或不包含IgG CH3恒定结构域。

[0075] 如本文中所使用,术语“多肽”是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)所构成的分子。术语多肽是指两个或更多个氨基酸的任何链,并且不是指产物的具体长度。因此,在多肽的定义中包括肽、二肽、三肽、寡肽、蛋白质、氨基酸链或用于是指两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语,并且可以使用术语多肽代替这些术语中的任一者或与其互换使用。术语多肽也旨在指多肽的表达后修饰的产物,这些修饰包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生、蛋白水解裂解或非天然氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定从指定的核酸序列翻译而来。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成。本发明多肽的大小可为3、5、10、20、25、50、75、100、200、500、1,000或2,000个氨基酸。

[0076] “抗原结合位点”是指提供与抗原相互作用的抗原结合多肽的位点,即一个或多个氨基酸残基。例如,抗体或抗原结合受体的抗原结合位点包含来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基。天然免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点,Fab或scFv分子通常具有单一抗原结合位点。

[0077] 术语“抗原结合域”是指抗体或抗原结合受体的一部分,其包含特异性结合至抗原的一部分或全部并且与其互补的区域。抗原结合域可由例如一个或多个免疫球蛋白可变结构域(也称为可变区)提供。通常,抗原结合域包含免疫球蛋白轻链可变区(VL)和免疫球蛋白重链可变区(VH)。

[0078] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与结合抗原的免疫球蛋白重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有类似结构,其中每一个结构域皆在包含四个保守框架区(FR)和三个超变区(HVR)。例如参见Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co,第91页(2007)。单一VH或VL结构域通常足以赋予抗原结合特异性。

[0079] 如抗原结合多肽的上下文中所使用,术语“结合至”定义“抗原相互作用位点”和抗

原彼此的结合(相互作用)。术语“抗原相互作用位点”定义了多肽的基序,其显示出与特定抗原或特定抗原组特异性相互作用的能力。所述结合/相互作用也理解为定义“特异性识别”。术语“特异性识别”意指,抗原结合多肽能够与抗原特异性相互作用和/或结合。可使用本领域已知技术来测量抗原结合多肽(例如Fab或scFv结构域)结合至特定靶抗原决定簇的能力。一种技术涉及酶联免疫吸附测定(ELISA)。本领域技术人员熟悉的其他技术包括例如表面等离子体共振(SPR)(在BIAcore仪器上分析)(Liljeblad等人,Glyco J 17,323-329(2000))以及传统的结合测定(Heeley,Endocr Res 28,217-229(2002))。在一个实施例中,抗原结合多肽结合不相关蛋白质/抗原的程度小于抗原结合多肽结合靶抗原的10%,特别通过SPR所测量的。在某些实施例中,结合至靶抗原的抗原结合多肽的解离常数( $K_D$ )为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 $10^{-8}\text{M}$ 或更小,例如 $10^{-8}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ ,例如 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ )。如与抗原结合多肽结合使用的术语“结合”或“特异性结合”意指,抗原结合多肽不与或基本上不与非靶抗原的结构交叉反应。

[0080] “亲合力”是指分子(例如抗原结合多肽)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总强度。除非另外指示,否则如本文中所使用,“结合亲合力”是指反映结合对成员(例如抗原结合多肽以及抗原和/或受体及其配体)之间的1:1相互作用的固有结合亲合力。分子X对其配偶体Y的亲合力通常可通过解离常数( $K_D$ )来表示,该解离常数是解离速率常数与缔合速率常数(分别为 $k_{\text{解离}}$ 和 $k_{\text{缔合}}$ )的比率。因此,等效亲合力可包括不同速率常数,只要速率常数比保持相同即可。亲合力可以通过本领域已知的完善确立的方法测量,包括本文所述的那些方法。测量亲合力的优选方法是表面等离子体共振(SPR),并且测量的优选温度是25℃。

[0081] 本文所用的术语“CDR”涉及本领域所熟知的“互补决定区”。CDR是免疫球蛋白或抗原结合受体中决定所述分子的特异性并且与特定配体接触的部分。CDR通常是分子的最易变部分并且有助于这些分子的抗原结合多样性。在可变结构域中存在以下三个CDR区:CDR1、CDR2和CDR3。CDR-H描述可变重链的CDR区并且CDR-L涉及可变轻链的CDR区。VH意指可变重链并且VL意指可变轻链。可如“Kabat”(Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,NIH公开案第91-3242号,U.S.Department of Health and Human Services(1991);Chothia J.Mol.Biol.196(1987),901-917)或“Chothia”(Nature 342(1989),877-883)中所描述来确定Ig-源区域的CDR区。

[0082] 本文所用的术语“高度可变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中序列高度可变和/或形成结构确定的环(“超变环”)的每一个区域。通常,天然四链抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自超变环的氨基酸残基。除VH中的CDR1外,CDR一般包含形成高度可变环的氨基酸残基。超变区(HVR)也称为互补决定区(CDR),并且这些术语在本文中提及形成抗原结合区的可变区部分时可互换使用。该特定区域描述于Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)以及Chothia等人,J Mol Biol 196:901-917(1987)中,其中定义包括在彼此比较时氨基酸残基的重叠或子组。涵盖如由上文所引用参考文献所定义的CDR的适当氨基酸残基提出于下文表1中以供比较。涵盖特定CDR的确切残基数将根据CDR的序列和大小而变化。在给出抗体的可变区氨基酸序列下,本领域技术人员可以常规方式确定构成特定CDR的残基。

[0083] 表1.CDR定义<sup>1</sup>

| CDR                 | Kabat  | Chothia | AbM <sup>2</sup> |
|---------------------|--------|---------|------------------|
| V <sub>H</sub> CDR1 | 31-35  | 26-32   | 26-35            |
| V <sub>H</sub> CDR2 | 50-65  | 52-58   | 50-58            |
| V <sub>H</sub> CDR3 | 95-102 | 95-102  | 95-102           |
| V <sub>L</sub> CDR1 | 24-34  | 26-32   | 24-34            |
| V <sub>L</sub> CDR2 | 50-56  | 50-52   | 50-56            |
| V <sub>L</sub> CDR3 | 89-97  | 91-96   | 89-97            |

[0085] <sup>1</sup>表1中所有CDR定义的编号是根据由Kabat等人提出的编号惯例(参见下文)。

[0086] <sup>2</sup>表1中所用的具有小写字母“b”的“AbM”是指如通过Oxford Molecular的“AbM”抗体建模软件所定义的CDR。

[0087] Kabat等人也定义适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以明确地将该“Kabat编号”系统分配给任何可变区序列,而不依赖于序列本身之外的任何实验数据。如本文中所使用,“Kabat编号”是指由Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)提出的编号系统。除非另有说明,否则提及抗体可变区中特定氨基酸残基位置的编号是根据Kabat编号系统。

[0088] “骨架(framework)”或“FR”是指除高度可变区(hypervariable region)(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以如下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0089] “Fab”或“Fab分子”是指由抗原结合多肽的重链(“Fab重链”)的VH和CH1结构域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL结构域组成的蛋白质。

[0090] 单链Fv片段(或scFv)是由通过肽接头连接的抗体VH结构域和VL结构域组成的多肽。

[0091] “单链Fab片段”或“scFab”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和接头组成的多肽,其中所述抗体结构域和所述接头在N-末端至C-末端方向上具有以下顺序中的一种:a)VH-CH1-接头-VL-CL,b)VL-CL-接头-VH-CH1,c)VH-CL-接头-VL-CH1,或d)VL-CH1-接头-VH-CL;并且其中所述接头是至少30个氨基酸,优选是32个至50个氨基酸的多肽。单链Fab片段经由CL结构域与CH1结构域之间的天然二硫键达到稳定。

[0092] “交叉Fab分子”(也称为“交叉Fab”或“交叉Fab片段”)意指其中Fab重链和轻链的可变区或恒定区发生交换的Fab分子,即,交叉Fab片段包含由轻链可变区和重链恒定区构成的肽链以及由重链可变区和轻链恒定区构成的肽链。因此,交叉Fab片段包含由重链可变区和轻链恒定区构成的重链或轻链(VH-CL)以及由轻链可变区和重链恒定区构成的重链或轻链(VL-CH1)。与此相比,“常规Fab”分子意指呈其自然版本(即包含由重链可变区和恒定区构成的重链(VH-CH1)以及由轻链可变区和恒定区构成的轻链(VL-CL))的Fab分子。

[0093] “交叉单链Fab片段”是由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体轻链可变结构域(VL)、抗体轻链恒定结构域(CL)和连接体组成的多肽,其中所述抗体域和

所述连接体在N端至C端方向上具有下列序列中的一个:a) VH-CL-连接体-VL-CH1以及b) VL-CH1-连接体-VH-CL;并且其中VH和VL一起形成特异性结合至抗原的抗原结合位点。通常,连接体是长度为至少30个氨基酸(例如30-40个氨基酸)的多肽。

[0094] 本文的术语“Fc域”或“Fc区”用于定义含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的C端区域。该术语包括天然序列Fc区域和变体Fc区域。尽管IgG重链的Fc区的边界可略有变化,但通常将人IgG重链的Fc区定义为自Cys-226或Pro-230延伸至该重链的羧基末端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys-447)可以存在或可以不存在。除非本文另外规定,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号根据“EU编号”系统(也称为EU索引),如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,国立卫生研究院(National Institutes of Health),Bethesda,MD,1991中所描述。

[0095] 术语“全长抗体”表示由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。“全长抗体重链”是由N端至C端方向的抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定重链结构域1(CH1)、抗体铰链区(HR)、抗体重链恒定结构域2(CH2)和抗体重链恒定结构域3(CH3)(缩写为VH-CH1-HR-CH2-CH3)以及在IgE亚类抗体的情况下任选地抗体重链恒定结构域4(CH4)组成的多肽。优选地,“全长抗体重链”是由N端至C端方向的VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽。“全长抗体轻链”是由N端至C端方向的抗体轻链可变结构域(VL)和抗体轻链恒定结构域(CL)组成的多肽,缩写为VL-CL。抗体轻链恒定结构域(CL)可以是 $\kappa$ (kappa)或 $\lambda$ (lambda)。两条全长抗体链通过CL域和CH1域之间以及全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。典型全长抗体的实例是天然抗体,如IgG(例如IgG 1及IgG2)、IgM、IgA、IgD和IgE。本发明所用的全长抗体可来自单一物种(例如人),或其可为嵌合或人源化抗体。

[0096] “个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。特别地,个体或受试者是人,并且可为临床患者/临床试验志愿者。

[0097] 根据本发明,术语“药物组合物”是指以下制剂:其以允许其中所含活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受毒性的其他组分。

[0098] “分离的多肽”或其片段或衍生物是指非天然环境中的多肽。不需要特定纯化程度。例如,分离的多肽可从其天然或自然环境中去除。在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白被认为是出于本发明的目的而分离的,已经通过任何合适的技术分离、分级或部分或基本上纯化的天然或重组多肽也被认为是出于本发明的目的而分离的。

[0099] 如本文中所使用,术语“胱氨酸结肽”或“CKP”是指长度在26-60个氨基酸之间的肽,其含有6个形成三个二硫键的保守半胱氨酸残基。二硫化物中的一种渗入由两个其他二硫化物及其互连主链形成的大环,从而产生具有多个暴露在表面上的特征性打结拓扑。环定义为侧接6个保守半胱氨酸残基并且性质上高度可变的氨基酸区域。

[0100] 如本文中所使用,术语“靶抗原”与“靶抗原决定簇”、“靶表位”和“靶细胞抗原”同义,并且是指多肽大分子上位点(例如邻接氨基酸片段或由非邻接氨基酸之不同区域构成的构象组态),抗原结合多肽与该位点结合以形成复合物。可用的靶抗原可发现于,例如,肿瘤细胞的表面上、受病毒感染的细胞的表面上、其他患病细胞的表面上、免疫细胞的表面上、游离于血清中和/或存在于细胞外基质(ECM)中。除非另外指示,否则在本文中称为抗原的蛋白质(例如CD20、CEA、FAP、TNC)可是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质,

该脊椎动物包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在特定实施例中,靶抗原是人蛋白质。当提及本文中的特定靶蛋白时,该术语涵盖“全长”、未加工的靶蛋白,以及由靶细胞内加工而产生的任何形式的靶蛋白。该术语也涵盖天然靶蛋白质变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人靶抗原包括但不限于:CD20、CEA、FAP、TNC、MSLN、FolR1、HER1和HER2。

[0101] 术语“癌症”和“癌性”是指哺乳动物中通常以不受调控的细胞生长/增殖为特征的生理学病状。该定义包括良性和恶性癌症。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更多具体实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠道癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(例如肾细胞癌)、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑色素瘤以及各种类型的头颈癌。“早期癌症”意指非浸润性或转移性或分类为0、I或II期癌症的癌症。术语“癌症前期”是指通常先于或发展成癌症的病状或生长。“非转移性”意指癌症是良性的,或保留于原发性位点处并且尚未渗透至淋巴或血管系统或除原发性位点外的组织中。通常,非转移性癌症是0、I或II期癌症以及偶尔III期癌症中的任何癌症。

[0102] 本文所提供的数值应理解是指确切数值以及由术语“约”限定的值。通过本领域技术人员所理解的,术语“约”在所使用的上下文中用范围来限定数值,该范围是例如引述数值的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 等。

[0103] II. 包含多肽的纳米脂蛋白缀合物

[0104] 本发明的一方面涉及包含至少一种共价结合的多肽(即除支架蛋白质外并入NLP的多肽)的纳米脂蛋白颗粒缀合物。如本文中所使用,“纳米脂蛋白颗粒”或NLP是指包含脂质和支架蛋白质、尤其包含成膜脂质和支架蛋白质(诸如载脂蛋白)的超分子复合物。NLP也可称为纳米盘或重构高密度脂蛋白(rHDL),并且已描述为内源性高密度脂蛋白(HDL)的模拟物(18)。NLP通常经由自组装过程形成,其中成膜脂质形成具有盘形形状的脂双层(19),并且其中通过结合至环绕双层盘的支架蛋白质来稳定该盘的疏水性边缘。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0105] “成膜脂质”是指具有亲水区(极性头部)和疏水区(一个或多个长烃尾部)的两亲性脂质或极性脂质。成膜脂质在水性环境中自组装以形成脂双层,其中每一层的疏水性脂肪酸尾部面对面,并且极性头部暴露于水性环境。极性头基通常是衍生的磷酸酯或糖基团。成膜脂质可包含例如烷基磷酸胆碱、醚脂质、糖脂、溶血鞘脂、溶血甘油磷脂、磷脂、鞘脂和固醇。在一些实施例中,NLP包含本文所描述的两种或更多种成膜脂质。更具体实例包括但不限于以下磷脂:二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二油酰基磷酸-乙醇胺(DOPE)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基磷酸丝氨酸(DOPS)和二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)。在特定实施例中,成膜脂质是DOPE和/或DOPC。在一些实施例中,成膜脂质是非脂质两亲性分子,诸如二甘油四醚、胆固醇、麦角固醇等。在一些实施例中,NLP包含(诸如进一步包含) $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)作为成膜脂质。

[0106] 在一些实施例中,成膜脂质是生物分子,即由活生物体(例如细菌、酵母或哺乳动

物)产生的分子。

[0107] 在NLP中,由成膜脂质形成的双层是由一种或多种支架蛋白质稳定的。本文所用的“支架蛋白质”是可与成膜脂质在水性环境中自组装(诸如(实质上)环绕或包围脂双层的疏水核心)的两亲性蛋白质。支架蛋白质通常具有 $\alpha$ 螺旋二级结构,其中若干疏水性氨基酸形成疏水面并且若干亲水性氨基酸在相对侧形成亲水面。该颗粒本身变得具有水溶性,并且因此可携载于例如血液或淋巴中。

[0108] 在一些实施例中,支架蛋白质包含例如载脂蛋白、载脂蛋白或其衍生物或片段(尤其维持与成膜脂质自组装的能力的衍生物或片段)中的一种或多种。在一些实施例中,支架蛋白质是合理设计的蛋白质或肽。在一些实施例中,支架蛋白质是由活生物体(诸如哺乳动物,例如人、非人灵长类动物、大鼠、小鼠、兔或天竺鼠)产生的生物分子。在具体实施例中,支架蛋白质是以下各项中的至少一种:载脂蛋白A(例如apo A-I、apo A-II、apo A-IV、apo A-V)、载脂蛋白B(例如apo B48、apo B100)、载脂蛋白C(例如apo C-I、apo C-II、apo C-III、apo C-IV)、载脂蛋白D、载脂蛋白H、载脂蛋白E(例如apoE2、apoE4)和/或载脂蛋白III。在一些实施例中,支架蛋白质是能够稳定膜双层(例如具有疏水面和相对亲水面)的载脂蛋白的截短版本。在特定实例中,使用截短apoE4,例如apoE4的22Kd片段(称为“ApoE422k”)。在一些特定实施例中,支架蛋白质是人源ApoE422k。

[0109] 在一些实施例中,载脂蛋白是apoE3的截短版本(例如apoE322k)、apoE2的截短版本(例如apoE222k)或apoA1的截短版本(例如 $\Delta$ 49ApoA1、MSP1、MSP1T2、MSP1E3D1)。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质组分都是由活生物体产生的生物分子,并且形成不含非生物源材料的NLP。

[0110] 本领域技术人员应理解,可以适当摩尔比来提供支架蛋白质和成膜脂质以促进NLP组装。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:50至1:100、1:60至1:90或1:70至1:80。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90或1:100。在一具体实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:80。在一些实施例中,所用比率应使得成膜脂质的大部分或所有排列为双层,并且没有或较少成膜脂质保持未组装。在一些实施例中,剩余未组装脂质变得附着于反应器皿壁,从而未留下、留下较少或极少可用于与多肽的官能团反应的未组装脂质。

[0111] 在本发明中,NLP呈现一种或多种用于与例如抗原结合多肽上的互补官能团相互作用的经官能化的基团。在一些实施例中,经官能化的基团与多肽上的互补官能团进行反应并且不缀合至NLP的其他组分(例如不缀合至一种或多种支架蛋白质)。在一些实施例中,小于25%或20%-25%、小于20%或10%-20%、小于15%或10%-15%、小于10%或5%-10%、小于5%或3%-5%或0%的经官能化的基团缀合至本发明的缀合物中的支架蛋白质。在一些实施例中,5%、4%、3%、2%、1%或0%的经官能化的基团缀合至本发明的缀合物中的支架蛋白质。

[0112] 通常,并非所有成膜脂质都发生官能化。本领域技术人员应了解,待使用的具有经官能化的基团的脂质的量将取决于例如经官能化的基团和/或成膜脂质的属性和/或待与其缀合的多肽。例如,在一些实施例中,小于60%(例如50%-60%)、小于50%(例如40%-50%)、小于40%(例如30%-40%)、小于30%(例如20%-30%)或小于20%(例如10%-20%)的成膜脂质发生官能化。在具体实施例中,10%-40%、15%-35%、20%-35%或10%、

15%、20%、25%、30%或35%的成膜脂质发生官能化。在特定实例中,20%的成膜脂质携带经官能化的基团。

[0113] “官能”或“官能化”基团是指分子结构内产生该结构的化学反应特性的一组原子。在本文中简明起见,术语“经官能化的基团”用于提及在NLP的成膜脂质上或通过间隔区连接至该成膜脂质的此类基团。术语“官能团”用于提及在多肽(例如抗原结合多肽)上或通过间隔区连接至该多肽的此类基团,其用于经由成膜脂质上的一种或多种相应经官能化的基团附接至NLP。官能团/经官能化的基团的实例包括烃、具有双键或三键的基团、含卤素基团、含氮基团、含氧基团等。在一些实施例中,经官能化的基团选自选自以下的至少一组:叠氮化物、氨基、酸酐、炔烃、羧基、卤素、羟基、硫醇和磷酸基团。通常,相应官能团与经官能化的基团之间的反应导致键形成以及相应基团的缀合。

[0114] a.NLP与多肽的缀合

[0115] 本文所用的术语“缀合”或“结合”是指紧邻基团之间的相互作用,从而导致这些基团之间发生稳定缔合。相互作用可涉及共价和/或非共价结合,例如静电相互作用。可使用任何数量的官能化策略通过分别使用NLP脂质和抗原结合多肽上的一个或多个经官能化的基团/官能团对来达成缀合,这些经官能化的基团/官能团对已知在适宜条件下成功结合。

[0116] 可使用本领域技术人员已知的技术来证实或量化如本文所描述的多肽与NLP的成功缀合。用于表征本发明的缀合物的技术实例包括但不限于荧光相关性光谱术、傅里叶转变红外光谱术(fourier transform infrared spectroscopy)、粒径筛析层析、表面等离子体共振、拉曼光谱术(raman spectroscopy)、全内反射荧光、超旋过滤(例如参见实例2、图8A和图1B)。

[0117] 图1A描绘了本发明的NLP-Fab的组装和结合的示意图。在本发明实施例中,纳米脂蛋白颗粒缀合至至少一种多肽,其中多肽共价附接或另外结合或连接至NLP的一种或多种组分以形成NLP-多肽缀合物。多肽通常附接至双层的一个或两个表面上的一种或多种成膜脂质上(诸如极性头部上)的经官能化的基团。经官能化的基团可为能够缀合至多肽上的相应或互补官能团的任何基团,如上所述。官能化成膜脂质的实例包括但不限于带有叠氮化物的脂质、带有羧酸酯的脂质、带有马来酰亚胺的脂质、带有螯合金属的脂质、带有炔丙基的脂质、带有季胺的脂质、季胺S-蛋白质的脂质等。通常,与非官能化成膜脂质相比,在NLP组装期间所使用的官能化成膜脂质的量决定了将缀合至NLP双层表面的多肽的量。

[0118] 经官能化的基团/官能团的缀合对的实例包括但不限于酯与胺;羧酸与胺;叠氮化物与乙炔;二价金属(例如 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ )与聚组氨酸;异硫氰酸酯与胺;抗生物素蛋白与生物素;谷胱甘肽S-转移酶(GST)与谷胱甘肽;硫氢基与卤代乙酰胺;硫氢基与吡啶基二硫化物;硫氢基与硫代硫酸酯;和马来酰亚胺(或马来酰亚胺衍生物)与硫氢基。如本领域技术人员将认识到,这些组分可通过已知技术合成和/或商购。

[0119] 在具体实施例中,经官能化的基团是马来酰亚胺衍生物、卤代乙酰胺、吡啶二硫代-丙酸酯和硫代硫酸酯中的一种或多种;并且互补官能团是游离硫醇基团,例如经还原硫氢基部分。在具体实施例中,经官能化的基团是马来酰亚胺并且互补官能团是经还原半胱氨酸残基。具有马来酰亚胺的脂质可商购或可由本领域技术人员合成。硫醇反应性成膜脂质的具体实例包含1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酰胺](钠盐)(1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-

maleimidophenyl) butyramide] (sodium salt))。(参见,例如实例1、图7A-7B)。

[0120] 在一些实施例中,经官能化的基团直接位于成膜脂质的极性头部上,或是该极性头部的化学结构的一部分。在一些实施例中,间隔区连接经官能化的基团与成膜脂质。“间隔区”或“接头”可由一种或多种接头组分构成。示例性间隔区组分包括6-马来酰亚胺基己酰基(6-maleimidocaproyl) (“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基(maleimidopropanoyl) (“MP”)、对-氨基苄基氧基羰基(p-aminobenzoyloxycarbonyl) (“PAB”)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶硫基)戊酸酯(N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio)pentanoate) (“SPP”)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸N-琥珀酰亚胺酯(N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) (“SMCC”)和N-琥珀酰亚胺基-4-((碘乙酰)氨基)苯甲酸酯(N-Succinimidyl(4-iodo-acetyl)aminobenzoate) (“SIAB”)。其他间隔区组分为本领域所已知并且一些描述于本文中。也参见“Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”,美国申请公开第2005/0238649号,该申请公开的内容以全文引用方式并入本文中。

[0121] 在一些实施例中,间隔区可包含氨基酸残基。示例性氨基酸间隔区组分包括二肽、三肽、四肽或五肽。示例性二肽包括:缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(alc或ala-phe)。示例性三肽包括:甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。在一些实施例中,间隔区包含长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的肽。在一些实施例中,间隔区具有2-6个氨基酸、3-5个氨基酸或4个氨基酸。间隔区通常富含甘氨酸以达成挠性,并且富含丝氨酸或苏氨酸以达成溶解性。在一些实施例中,使用甘氨酸-丝氨酸间隔区,例如(GS)<sub>n</sub>,其中G=甘氨酸,S=丝氨酸,并且n=2、3、4或5。在特定实施例中,用于Fab结合的间隔区包含氨基酸序列GSGS或由其组成。在一些实施例中,使用提供与GSGS间隔区类似挠性和溶解性的其他间隔区。

#### [0122] b. 抗原结合多肽组分

[0123] 在本发明的NLP-多肽缀合物的一些实施例中,至少一种抗原结合多肽共价附接或另外结合或连接至NLP的一种或多种组分。通常,多肽是抗原结合多肽,例如抗体片段,例如Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fab(scFab)、单链Fv(scFv)、VH-VH二聚体、VL-VL二聚体、VH-VL二聚体、单结构域、双体抗体或线性抗体。在一些实施例中,多肽是Fab。在一些实施例中,抗原结合多肽是交叉Fab或交叉单链Fab。在一些实施例中,多肽是“Fab样分子”或“Fab样多肽”,其是与Fab具有相似大小和/或构象形状但不一定能够结合至抗原的多肽。

[0124] 在某些实施例中,抗原结合多肽包含铰链区(或免疫球蛋白的铰链区的一部分),但不包括Fc区或不包括完整Fc区。在特定实施例中,抗原结合多肽包含铰链区的至少一个Cys氨基酸残基。在特定实施例中,Cys残基提供官能团,即提供用于与NLP脂质上的经官能化的基团缀合的游离硫醇基团。在具体实施例中,抗原结合多肽(例如Fab)包含铰链区的Cys-226和Cys-227中的至少一者。在特定实施例中,Cys-227提供用于缀合的游离硫醇基团。

[0125] 如上所述,本发明的NLP-多肽缀合物的多肽通过多肽的一个或多个氨基酸残基上的官能团共价附接或另外结合或连接至NLP。在一些实施例中,官能团位于C端。“位于C端”意指,官能团的位置朝向多肽的C端。例如,自N端至C端考虑,官能团可位于多肽链中的最后氨基酸残基上。位于C端的基团可位于多肽的C端处的第二至最后、第三至最后、第四至最后

或第五至最后氨基酸残基上,或位于最后1-2、1-3、2-3、1-4、2-4、1-5、3-5、1-6、2-6、3-6、1-7、3-7、4-7、1-8、3-8、5-8或1-10个氨基酸残基中的任一者上。

[0126] 在一些实施例中,官能团位于N端。“位于N端”意指,官能团的位置朝向多肽的N端。例如,自N端至C端考虑,官能团可位于多肽链中的第一氨基酸残基上。位于N端的基团可位于多肽的N端处的第二、第三、第四或第五氨基酸残基上,或位于前1-2、1-3、2-3、1-4、2-4、1-5、3-5、1-6、2-6、3-6、1-7、3-7、4-7、1-8、3-8、5-8或1-10个氨基酸残基中的任一者上。

[0127] 官能团经选择以与NLP组分上(例如NLP的成膜脂质上)的相应或互补经官能化的基团进行反应,如上文所描述。在一些实施例中,官能团选自自由以下项组成的群组:马来酰亚胺衍生物、卤代乙酰胺、吡啶基二硫代-丙酸酯及硫代硫酸酯;并且所述互补官能团是游离硫醇基团。在具体实施例中,官能团是硫醇基团,例如半胱氨酸硫醇基团。在一些具体实施例中,半胱氨酸氨基酸残基是在衍生抗原结合多肽的抗体中形成较链二硫键的残基。例如,硫醇基团可由至少一种选自Cys-226和Cys-227(基于Kabat编号)的基团提供。在一特定实施例中,C端Cys-227(例如Fab的C端Cys-227)提供用于与NLP脂质上的经官能化的基团结合的游离硫醇基团。

[0128] 在一些实施例中,官能团直接位于抗原结合多肽的氨基酸残基上,或是该氨基酸残基的化学结构的一部分。在一些实施例中,如上文所描述的间隔区连接官能团与抗原结合多肽。在任一版本中,抗原结合多肽(例如Fab)缀合至NLP,并且在抑制和激动环境中不损失或不实质性损失抗原结合活性。也参见实例4、图5B,其中位点特异性Fab缀合实现约30个Fab/NLP并且对NLP流体动力学半径的影响最小,从而指示粒度主要取决于NLP的盘形形状。

[0129] 抗原结合肽通常衍生自一种或多种免疫球蛋白类别的抗体分子。抗体或免疫球蛋白的“类别”是指其重链所拥有的恒定结构域或恒定区的类型。有五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些种类种的几种可进一步分成亚类(同型),例如,IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。在一些实施例中,抗原结合多肽是衍生自IgG分子,例如IgG分子的Fab。

[0130] 在本发明的一些方面中,抗原结合多肽是治疗剂并且缀合物可用作抗原结合多肽的递送平台。例如,抗原结合多肽(例如Fab)可作用于中和靶或阻断、激发或拮抗路径的药物负荷或生物活性分子。在本发明的一些方面中,抗原结合多肽提供靶向抗原的递送平台。靶向Fab的附接例如可经由增强内化来使递送药物富集于所关注器官或组织处(37,38,39)。例如,抗原结合多肽(例如Fab)可识别特定细胞或疾病标记物以将缀合物引导至特定靶。使抗原结合多肽缀合至NLP可介导NLP的靶向,例如以有利于将抗原结合多肽或另外的治疗剂或诊断剂递送至靶中。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0131] 在某些实施例中,本发明的NLP-多肽缀合物克服了已开发用于体内递送治疗药(9-12)、诊断成像剂(13)以及疫苗和免疫调节治疗剂(14-17)的先前纳米脂蛋白方法的缺点。过去10年,已在纳米技术领域尝试解决常规药物递送系统的局限性,包括非特异性生物分布和靶向、较差水溶解性、有限口服生物可用性和低治疗指数(1)。一些方法包括使用无机纳米颗粒(2)、基于聚合物的纳米颗粒(3)、聚合物胶束(4)、树枝状聚合物(5)、脂质体(6)、病毒纳米颗粒(7)和碳纳米管(6)。其他策略包括基于脂质体和聚合物的纳米颗粒。然而,本发明的NLP-缀合物比其他基于纳米颗粒的递送技术提供若干不同优点,包括低毒性和低免疫原性。例如,在一些实施例中,NLP-多肽缀合物不含非生物源材料,包含天然产生

和/或衍生自天然产生材料的脂质、支架蛋白质和抗原结合多肽,并且因此引起较低免疫应答和/或毒性小于需要非生物源组分的先前递送平台。在某些实施例中,其他优点包括良好稳定性(例如不使用交联剂)、良好可制造性(包括可产生高度浓缩但黏度较低的制剂)、极少颗粒间交联、相对较均质的NLP-多肽群体和/或增强的抗原结合效力,如本文所述。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0132] 在一些实施例中,抗原结合多肽(例如Fab)结合一种或多种肿瘤特异性抗原或肿瘤标记物,从而将缀合物引导至肿瘤。例如,表皮生长因子受体(EGFR)由某些肿瘤细胞过度表达。在过度表达EGFR的体内异种移植物肿瘤模型中,抗EGFR免疫脂质体在单一剂量之后于注射后24小时测量,所实现的细胞摄取为非靶向脂质体所实现的细胞摄取的6倍。另外,抗EGFR免疫脂质体-阿霉素(一种强效细胞毒素)所显示的肿瘤消退显著大于单独阿霉素或非靶向脂质体-阿霉素。

[0133] 天然存在于肿瘤细胞表面上之肿瘤标记物的其他实例包含但不限于FAP(成纤维细胞活化蛋白)、CEA(癌胚抗原)、p95(p95HER2)、BCMA(B细胞成熟抗原)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、MSLN(间皮素)、MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖)、HER-1(人表皮生长因子1)、HER-2(人表皮生长因子2)、HER-3(人表皮生长因子3)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52、F1t3、叶酸受体1(FOLR1)、人滋养细胞表面抗原2(Trop-2)癌症抗原12-5(CA-12-5)、人白细胞抗原-抗原D相关蛋白(HLA-DR)、MUC-1(粘蛋白-1)、A33-抗原、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT-3)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、转铁蛋白-受体、TNC(腱生蛋白)、碳酸酐酶IX(CA-IX)和/或结合至人主要组织相容性复合体(MHC)的分子的肽。

[0134] 许多此类肿瘤抗原为本领域所已知或易于由本领域技术人员获得。例如,A33-抗原、BCMA(B细胞成熟抗原)、癌症抗原12-5(CA-12-5)、碳酸酐酶IX(CA-IX)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA(癌胚抗原)、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、FAP(成纤维细胞活化蛋白)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT-3)、叶酸受体1(FOLR1)、HER-1(人表皮生长因子1)、HER-2(人表皮生长因子2)、HER-3(人表皮生长因子3)、人白细胞抗原-抗原D相关蛋白(HLA-DR)、MSLN(间皮素)、MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖)、MUC-1(粘蛋白-1)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、p95(p95HER2)、转铁蛋白-受体、TNC(腱生蛋白)、人滋养细胞表面抗原2(Trop-2)的序列可获得自UniProtKB/Swiss-Prot数据库并且可从<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>检索。本领域技术人员可易于推断这些数据库条目中的这些(蛋白质)序列中的相关编码区,这些数据库条目也可包含基因体DNA以及mRNA/cDNA。

[0135] (人)FAP(成纤维细胞活化蛋白)的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q12884(条目版本:168,序列版本:5)获得;(人)CEA(癌胚抗原)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P06731(条目版本:171,序列版本:3)获得;(人)EpCAM(上皮细胞粘附分子)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P16422(条目版本:117,序列版本:2)获得;(人)MSLN(间皮素)的序列可从UniProt条目号Q13421(版本号:132;序列版本:2)获得;(人)FMS样酪氨酸激酶3(FLT-3)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P36888(主要可引用登录号)或Q13414(次要登录号)以版本号165和序列版本2获得;(人)MCSP(黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖)的序列可从UniProt条目号Q6UVK1(版本号:118;序列版本:2)获得;(人)叶酸受体1(FOLR1)的序列可

从UniProt条目号P15328(主要可引用登录号)或Q53EW2(次要登录号)以版本号153和序列版本3获得;(人)滋养细胞表面抗原2(Trop-2)的序列可从UniProt条目号P09758(主要可引用登录号)或Q15658(次要登录号)以版本号172和序列版本3获得;(人)PSCA(前列腺干细胞抗原)的序列可从UniProt条目号O43653(主要可引用登录号)或Q6UW92(次要登录号)以版本号134和序列版本1获得;(人)HER-1(表皮生长因子受体)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P00533(条目版本:177,序列版本:2)获得;(人)HER-2(受体酪氨酸-蛋白质激酶erbB-2)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P04626(条目版本:161,序列版本:1)获得;(人)HER-3(受体酪氨酸-蛋白质激酶erbB-3)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P21860(条目版本:140,序列版本:1)获得;(人)CD20(B淋巴球抗原CD20)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P11836(条目版本:117,序列版本:1)获得;(人)CD22(B淋巴球抗原CD22)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P20273(条目版本:135,序列版本:2)获得;(人)CD33(B淋巴球抗原CD33)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P20138(条目版本:129,序列版本:2)获得;(人)CA-12-5(粘蛋白16)的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q8WXI7(条目版本:66,序列版本:2)获得;(人)HLA-DR的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q29900(条目版本:59,序列版本:1)获得;(人)MUC-1(粘蛋白-1)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P15941(条目版本:135,序列版本:3)获得;(人)A33(细胞表面A33抗原)的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q99795(条目版本:104,序列版本:1)获得;(人)PSMA(羧基氨基酸酯酶2)的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q04609(条目版本:133,序列版本:1)获得;(人)转铁蛋白受体的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q9UP52(条目版本:99,序列版本:1)和P02786(条目版本:152,序列版本:2)获得;(人)TNC(腱生蛋白)的序列可从Swiss-Prot数据库条目P24821(条目版本:141,序列版本:3)获得;或(人)CA-IX(碳酸酐酶IX)的序列可从Swiss-Prot数据库条目Q16790(条目版本:115,序列版本:2)获得。本领域技术人员可易于推断这些数据库条目中的这些(蛋白质)序列中的相关编码区,这些数据库条目也可包含基因体DNA以及mRNA/cDNA。

[0136] 本发明的缀合物可以多聚体和/或多价形式提供,例如如本文所描述或本领域已知的一个或多个抗原结合多肽,这些多聚体和/或多价形式更详细地描述于下文中。

[0137] c. 多聚体形式

[0138] 如本文所描述使多肽(例如抗原结合多肽)缀合至NLP可促进抗原结合多肽的多聚化,例如其中缀合物提供抗原结合多肽的两个或更多个分子,即其中相同分子的多个拷贝附接至NLP。此形式可以确定方式增加抗原结合多肽的活性或亲合力。例如,在某些抗体治疗方式中,化合价可为主要限制并且重新关注对于待有效激发或拮抗的路径需要超过2的化合价的已知mAb靶。此类靶的实例包括需要群集受体以进行活化的TNF家族成员,诸如DR5和OX40。尽管已开发各种工程策略来使化合价扩展至2以上(例如使用IgG样和非IgG样形式(41,42),诸如三功能抗体、四功能抗体、五功能抗体和自组装六聚体IgG抗体(43-45)),但这些形式具有若干局限性。例如,先前使用的形式可负面地影响药物动力学并且不能实现超过3-6的化合价,并且因此在许多情况下不能实现足够的激发/拮抗活性。在某些方面中,本发明提供了用于递送高密度的抗原结合多肽(例如Fab)的平台,使得能够获得与某些靶有关的临床相关性治疗指数所需的体内效力。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0139] 本发明的另一方面涉及使用本文所描述的缀合物平台来增加抗原结合多肽的亲

合力、活性或效力,其中本发明的NLP-多肽缀合物的抗原结合多肽是指向需要超过2的化合价的靶。例如,靶可为一种或多种选自以下项组成的组:TNF家族成员、DR4、OX40、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3和淋巴毒素 $\beta$ 受体。在具体实施例中,抗原结合多肽是结合OX40的Fab。在具体实施例中,抗原结合多肽是结合DR4的Fab。在一些实施例中,抗原结合多肽是至少一种选自以下的Fab:抗OX40、抗GITR、抗Tie2、抗因子D、抗VEGF、抗MERTK、抗CD3、抗淋巴毒素 $\beta$ 受体和抗DR4 Fab。

[0140] 在一些实施例中,本发明的NLP-多肽缀合物提供抗原结合多肽(例如Fab)的两个或更多个分子(例如2-60个分子/缀合物)以增加抗原结合多肽的活性或亲合力。在一些实施例中,该缀合物包含抗原结合多肽(例如Fab)的2-60、3-50、4-40、5-35、6-30或7-20个分子。在特定实施例中,该缀合物包含抗原结合多肽(例如Fab)的2-32、6-32、10-30、10-60、15-30或20个分子(例如参见实例2、图3A至图3D)。在一些具体实施例中,该缀合物包含抗原结合多肽(例如Fab)的3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个分子。这些实施例通常增加抗原结合多肽的活性和/或亲合力。例如,具有4-8个抗OX40 Fab分子的缀合物显示增加的抗OX40活性(例如参见实例4、图5B)。

[0141] 在一些实施例中,如本文所描述的多肽(例如抗原结合多肽,例如Fab)与NLP的缀合物增加抗原结合多肽和/或NLP的稳定性。例如,抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)与NLP的缀合物可在体外(例如增加保质期)和/或在体内(例如改善血清半衰期)改善抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的稳定性。在一些实施例中,NLP与抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的缀合物在体外(例如增加保质期)和/或在体内(例如改善血清半衰期)改善NLP颗粒的稳定性。因此,本发明的另一方面涉及使用本文所描述的缀合物平台来增加抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)或纳米脂蛋白颗粒的稳定性和/或半衰期。

[0142] 在一些实施例中,如本文所描述的多肽(例如抗原结合多肽,例如Fab或Fab样分子)与NLP的缀合物增加多肽-NLP复合物(例如抗原结合多肽-NLP复合物)的稳定性。在一些实施例中,与不缀合至多肽(例如抗原结合多肽,例如Fab或Fab样分子)的NLP相比,多肽-NLP复合物(例如抗原结合多肽-NLP复合物)的稳定性增加30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%。在一些实施例中,与不缀合至NLP的多肽(例如抗原结合多肽,例如Fab或Fab样分子)相比,多肽-NLP复合物(例如抗原结合多肽-NLP复合物)的稳定性增加30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%。在一些实施例中,与不包含抗原结合多肽的NLP相比,包含NLP和抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的缀合物的稳定性增加30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%或80%-90%,例如如本文所测量。稳定NLP-多肽缀合物通常包括5-60、10-60、15-30或20个抗原结合多肽分子/缀合物,包括7-60、7-40、7-32或8-30个抗原结合多肽(例如Fab)/缀合物。在具体实例中,NLP-多肽缀合物包含6、7、8、9或10个抗原结合多肽(例如Fab)。在某些实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子。在一特定实例中,NLP-多肽缀合物包括7-32个Fab分子/缀合物。(例如参见实例5、图6A至图6B,其证实了在生理相关温度(37°C)下Fab载量对复杂生物基质(50%血清)中的Fab-NLP稳定性的作用(通过分析型SEC测量),其中Fab-NLP显示增加的稳定性,并且在Fab/颗粒比为7或更大的情况下>63%的Fab-NLP在24小时之后保持完整)。

[0143] 因此,在一些实施例中,本发明提供令人意外地稳定并且帮助克服其他纳米颗粒

递送平台的药物动力学问题的NLP-多肽缀合物。例如,已知纳米颗粒的体内半衰期为约1-3天(参见下文实例5的参考文献40),并且单克隆抗体治疗剂通常依赖于Fc-介导的药物动力学经由FcRn再循环来延长半衰期。在一些实施例中,不使用Fc-介导的药物动力学并且基于将多肽(例如Fab或Fab样分子)的多个拷贝并入NLP盘形表面上,本发明的NLP-多肽缀合物可令人意外改善NLP稳定性。

[0144] d. 多特异性形式

[0145] 本发明的另一方面提供多特异性构建体,即包含结合两个或更多个靶的一个或多个抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的NLP缀合物。在一些实施例中,这些靶包含不同抗原。在一些实施例中,这些靶包含相同抗原。在一些实施例中,这些靶包含同一抗原上的不同表位。在一些实施例中,缀合物包含结合2、3、4、5、6、7或8个不同抗原或表位的2、3、4、5、6、7或8个不同抗原结合多肽,例如2、3、4、5、6、7或8个不同Fab。在一些实施例中,这些缀合物包含结合10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同抗原或表位之10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同抗原结合多肽,例如10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同Fab。在一些实施例中,这些缀合物包含结合25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同抗原或表位之25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同抗原结合多肽,例如25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同Fab。

[0146] 在一些实施例中,本发明的NLP-多肽缀合物的抗原结合多肽是指向两个不同靶以得到双特异性缀合物。尽管双特异性抗体的观念已超过60年,但与设计、稳定性和制造有关的难题最初推迟了其发展。最近,抗体改造技术的进展已使得越来越关注双特异性模式,导致FDA最新批准三种双特异性抗体治疗剂(瑞莫韦比(Removab),其靶向EpCAM和CD3;布林赛特(Blinicyto),其靶向CD19和CD3;以及海姆布拉(Hemlibra)(Chugai),其靶向因子IXa和因子X)以及超过100种处于临床试验中的多特异性候选者(例如法瑞昔单抗(Faricimab),其靶向VEGF-A和Ang-2)。双特异性构建体促进了独特作用机制,诸如使免疫细胞衔接至肿瘤细胞、阻断信号传导路径和/或将载荷(payload)特异性递送至肿瘤中。

[0147] 本文所公开的NLP-多肽缀合物提供了新颖和多功能的双特异性平台,其可易于扩展至多特异性形式和/或高化合价。例如,在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含两种不同Fab中的每一种的一个分子,从而提供二价、双特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含两种不同Fab中的每一种的两个分子,从而提供四价、双特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含第一Fab的一个分子以及第二Fab的两个分子,从而提供三价、双特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含两种不同Fab中的每一种的三个拷贝,从而提供六价、双特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含三种不同Fab中的每一种的两个拷贝,从而提供六价、三特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含第一Fab的两个拷贝以及第二Fab的三个拷贝,从而提供五价、双特异性缀合物。在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含两种不同Fab中的每一种的四个拷贝,从而提供八价、双特异性缀合物。对于本领域技术人员来说,用于提供特定多价和多特异性的另外配制将是显而易见的。

[0148] 在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合一对临床相关靶的两种抗原结合多肽中的每一种的至少一个分子。“临床相关靶的对”、“临床相关的靶抗原对”、“临床相关对”或

本文的类似表达是指两种疾病媒介(诸如细胞表面受体、可溶性配体或其他蛋白质),其在特定疾病的病理生理学中发挥作用,使得双特异性抗体或其他双特异性构建体结合至两个靶可在治疗疾病时产生有益效果。例如,在T细胞和肿瘤细胞例如由本发明的双特异性NLP-多肽缀合物结合时,形成细胞溶解突触,其中T细胞释放成孔穿孔素和细胞毒性颗粒酶-B,继而使得靶细胞死亡。作为另一实例,本文所描述的双特异性NLP-多肽缀合物可使用一个分子同时阻断两个靶的信号传导路径,这有利于抑制复杂路径,诸如血管生成。

[0149] 在一些实施例中,临床相关的抗原对包含T细胞标记物和肿瘤抗原,诸如本文所公开和/或本领域已知的肿瘤抗原中的任何一种或多种。在一些实施例中,临床相关的抗原对包含共刺激受体和肿瘤抗原,例如本文所公开和/或本领域已知的肿瘤抗原中的任何一种或多种。在一些实施例中,临床相关的抗原对包含天然杀手(NK)细胞标记物和肿瘤抗原,例如本文所公开和/或本领域已知的肿瘤抗原中的任何一种或多种。

[0150] “T细胞标记物”是指可由抗原结合部分识别的任何靶,并且在将抗原结合部分施用受试者后,该标记物将抗原结合部分比受试者的其他细胞或组织优先引导至T细胞。示例性T细胞标记物包含CD3。“NK细胞标记物”是指可由抗原结合部分识别的任何靶,并且在将抗原结合部分施用受试者后,该标记物将抗原结合部分比受试者的其他细胞或组织优先引导至T细胞。示例性NK细胞标记物包含CD316A。

[0151] 可由本文所提供的双特异性或多特异性缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)靶向的分子的其他实例包括但不限于细胞因子、可溶性血清蛋白及其受体以及其他膜结合蛋白(例如粘附素)。在具体实施例中,双-或多特异性缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)结合一种、两种或更多种选自由以下项组成的组的细胞因子、细胞因子相关蛋白和细胞因子受体:8MPI、8MP2、8MP38(GDF10)、8MP4、8MP6、8MP8、CSFI(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1( $\alpha$ FGF)、FGF2( $\beta$ FGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFN81、IFNG、IFNWI、FEL1、FEL1( $\epsilon$ )、FEL1( $\zeta$ )、IL 1A、IL 1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL 12A、IL 12B、IL 13、IL14、IL 15、IL 16、IL 17、IL 17B、IL 18、IL 19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFBb3、LTA(TNF- $\beta$ )、LTB、TNF(TNF- $\alpha$ )、TNFSF4(OX40配体)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27配体)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANSE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEGI)、TNFSF18、HGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP(瘦素)、PTN和THPO。

[0152] 在一些实施例中,靶抗原是趋化因子、趋化因子受体或趋化因子相关蛋白。在具体实施例中,双-或多特异性缀合物结合一种、两种或更多种选自由以下项组成的组的趋化因子、趋化因子受体或趋化因子相关蛋白:CCL1(1-309)、CCL2(MCP-1/MCAF)、CCL3(MIP-I $\alpha$ )、CCL4(MIP-I $\beta$ )、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CCL11(科塔新(cotaxin))、CCL

13 (MCP-4)、CCL 15 (MIP-I $\delta$ )、CCL 16 (HCC-4)、CCL 17 (TARC)、CCL 18 (PARC)、CCL 19 (MDP-3b)、CCL20 (MIP-3 $\alpha$ )、CCL21 (SLC/艾克杜斯-2 (exodus-2))、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2、嗜酸性粒细胞趋化因子-2 (eotaxin-2))、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸性粒细胞趋化因子-3 (eotaxin-3))、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GR01)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL 10 (IP 10)、CXCL 11 (1-TAC)、CXCL 12 (SDFI)、CXCL 13、CXCL 14、CXCL 16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL 1 (SCYDI)、SCYE1、XCL1 (淋巴细胞趋化蛋白 (lymphotactin))、XCL2 (SCM-I $\beta$ )、BLRI (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCRI (CKRI/HM145)、CCR2 (mcp-IRB IRA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8R $\alpha$ )、IL8RB (IL8R $\beta$ )、LTB4R (GPR16)、TCP 10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1、HDF1 $\alpha$ 、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SL1T2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2和VHL。

[0153] 在一些实施例中，靶抗原为CD蛋白。在具体实施例中，双-或多特异性缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)结合一种、两种或更多种选自由以下项组成的组的CD蛋白：ErbB受体家族诸如EGF受体、HER2、HER3或HER4受体的CD3、CD4、CD5、CD16、CD19、CD20、CD34、CD64、CD200成员；细胞粘附分子诸如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 $\alpha$ 4/ $\beta$ 7整合素和 $\alpha$ v/ $\beta$ 3整合素，包括其 $\alpha$ 或 $\beta$ 亚单元(例如抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体)；生长因子，诸如VEGF-A、VEGF-C；组织因子(TF)； $\alpha$ 干扰素( $\alpha$ IFN)；TNF $\alpha$ ；白细胞介素，诸如IL-1 $\beta$ 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-S、IL-9、IL-13、IL 17AF、IL-1S、IL-13R $\alpha$ 1、IL13R $\alpha$ 2、IL-4R、IL-5R、IL-9R、IgE；血型抗原；f1k2/f1t3受体；肥胖症(OB)受体；mp1受体；CTLA-4；RANKL、RANK、RSV F蛋白、蛋白C等。

[0154] 在特定实施例中，多特异性NLP-多肽缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)结合低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)-1或LRP-8或转铁蛋白受体以及至少一种选自由以下项组成的组的靶：1)  $\beta$ -分泌酶(BACE1或BACE2)、2)  $\alpha$ -分泌酶、3)  $\gamma$ -分泌酶、4)  $\tau$ -分泌酶、5) 淀粉样前体蛋白(APP)、6) 死亡受体6(DR6)、7)  $\beta$ -淀粉样蛋白、8)  $\alpha$ -突触核蛋白、9) 帕金森蛋白(Parkin)、10) 亨廷顿蛋(Huntingtin)、11) p75 NTR和12) 半胱天冬酶(caspase)-6。

[0155] 在特定实施例中，多特异性NLP-多肽缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)结合选自由以下项组成的组的一个或多个临床相关对：IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ；IL-12和IL-1S；IL-13和IL-9；IL-13和IL-4；IL-13和IL-5；IL-5和IL-4；IL-13和IL-1 $\beta$ ；IL-13和IL-25；IL-13和TARC；IL-13和MDC；IL-13和MEF；IL-13和TGF；IL-13和LHR激动剂；IL-12和TWEAK；IL-13和CL25；IL-13和SPRR2a；IL-13和SPRR2b；IL-13和ADAMS；IL-13和PED2；IL17A和IL17F；CD3和CD19；CD138和CD20；CD138和CD40；CD19和CD20；CD20和CD3；CD3S和CD13S；CD3S和CD20；CD3S和CD40；CD40和CD20；CD-S和IL-6；CD20和BR3；TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ；TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ；TNF- $\alpha$ 和IL-2；TNF- $\alpha$ 和IL-3；TNF- $\alpha$ 和IL-4；TNF- $\alpha$ 和IL-5；TNF- $\alpha$ 及IL-6；TNF- $\alpha$ 和IL8；TNF- $\alpha$ 和IL-9；TNF- $\alpha$ 和IL-10，TNF- $\alpha$ 和IL-11；TNF- $\alpha$ 和IL-12；TNF- $\alpha$ 和IL-13；TNF- $\alpha$ 和IL-14；

TNF- $\alpha$ 和IL-15;TNF- $\alpha$ 和IL-16;TNF- $\alpha$ 和IL-17;TNF- $\alpha$ 和IL-18;TNF- $\alpha$ 和IL-19;TNF- $\alpha$ 和IL-20;TNF- $\alpha$ 和IL-23;TNF- $\alpha$ 和IFN- $\alpha$ ;TNF- $\alpha$ 和CD4;TNF- $\alpha$ 和VEGF;TNF- $\alpha$ 和MIF;TNF- $\alpha$ 和ICAM-1;TNF- $\alpha$ 和PGE4;TNF- $\alpha$ 和PEG2;TNF- $\alpha$ 和RANK配体;TNF- $\alpha$ 和Te38;TNF- $\alpha$ 和BAFF;TNF- $\alpha$ 和CD22;TNF- $\alpha$ 和CTLA-4;TNF- $\alpha$ 和GP130;TNF- $\alpha$ 和IL-12p40;VEGF和HER2;VEGF-A和HER2;VEGF-A和PDGF;HER1和HER2;VEGFA和ANG2;VEGF-A和VEGF-C;VEGF-C和VEGF-D;HER2和DR5;VEGF和IL-8;VEGF和MET;VEGFR和MET受体;EGFR和MET;VEGFR和EGFR;HER2和CD64;HER2和CD3;HER2和CD16;HER2和HER3;EGFR (HER I) 和HER2;EGFR和HER3;EGFR和HER4;IL-14和IL-13;IL-13和CD40L;IL4和CD40L;TNFR1和IL-1R;TNFR1和IL-6R;TNFR1和IL-18R;EpCAM和CD3;MAPG和CD28;EGFR和CD64;CSPG和RGM A;CTLA-4和BTN02;IGF1和IGF2;IGF1/2和Erb2B;MAG和RGM A;NgR和RGM A;NogoA和RGM A;OMGp和RGM A;POL-1和CTLA-4;以及RGM A和RGM B。

[0156] 可由本发明的多特异性NLP-多肽缀合物(例如NLP-Fab缀合物或NLP-Fab样分子缀合物)共靶向的其他临床相关对包括CD63和CD95(死亡受体);HER2和CD63(涉及溶酶体内化的受体);CD20或CD19和CD47(中断“Don't eat me”信号);LAG-3和PD1;CTLA4和PD1;以及LAG-3和PD-L1。

[0157] 在具体实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3(一般T细胞标记物)的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合靶向CD19(肿瘤抗原)的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在另一具体实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合EpCAM(肿瘤抗原)的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在再一具体实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3之第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合CEA的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在再一具体实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD16A(NK细胞标记物)的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合CD30或CD33的第二抗原结合多肽(例如第二Fab);以及任选地结合IL-15的第三抗原结合多肽(例如第三Fab)。

[0158] 在一特定实例中,NLP-多肽缀合物包含结合Ang-2的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合VEGF-A的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在另一特定实例中,NLP-多肽缀合物包含结合 $\delta$ 样配体4的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合VEGF的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在再一特定实例中,NLP-多肽缀合物包含结合DR5 d第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合FAP(成纤维细胞活化蛋白)的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。

[0159] 在一些特定实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab);以及结合CD33、gp100、HER2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3)和TROP-2中的至少一者的第二抗原结合多肽(例如第二Fab);以及任选地结合至少一种选自IL-2、CD137和CD28的共刺激分子的第三抗原结合多肽(例如第三Fab)。在一些特定实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab);以及结合CD33、gp100、HER2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3和TROP-2中的至少一者的第二抗原结合多肽(例如第二Fab);以及任选地结合PD1和/或PD-L1的第三抗原结合多肽(例如第三Fab)。在一特定实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab);结合CEA的第二抗原结合多肽(例如第二Fab);以及结合PD1和PD-L1中的至少一者的第三抗原结合多肽(例如第三Fab)。

[0160] 在一些特定实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合CD28的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合CD20的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在一些特定实施例中,NLP-多

肽缀合物包含结合PD1的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合CTLA4的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在一些特定实施例中,NLP-多肽缀合物包含结合两个不同HER2表位的两个抗原结合多肽。

[0161] d.短肽组分

[0162] 在一些实施例中,NLP-多肽缀合物包含(诸如进一步包含)至少一种共价附接至包含1-80、10-70或20-60个氨基酸的短肽(例如CKP或CKP变体)的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基。

[0163] 在一些实施例中,所述 $C_{4-28}$ 脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中, $C_{4-28}$ 脂肪酰基包含官能团(例如描述于本文其他地方的官能团)。在一些实施例中,官能团直接位于 $C_{4-28}$ 脂肪酰基的烃尾部上,或是该烃尾部的化学结构的一部分。在一些实施例中,官能团与短肽的一个或多个氨基酸残基上的相应或互补官能团(例如如本文其他地方所描述)发生反应。在一些实施例中,相应或互补官能团位于肽(例如CKP或CKP变体)的C端。在一些实施例中,相应或互补官能团位于肽(例如CKP或CKP变体)的N端。在一些实施例中, $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合至短肽(例如CKP或CKP变体)的N端的赖氨酸侧链的 $\epsilon$ 氨基。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个短肽(例如1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个 $C_{4-28}$ 脂肪酰基分子,每一个分子共价附接至短肽(例如CKP或CKP变体))。在一些实施例中,短肽:NLP的摩尔比为1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60。在一些实施例中,NLP中的短肽:抗原结合多肽的摩尔比在1-100、10-90、20-80、30-70或40-60之间。在一些实施例中,包含短肽和抗原结合多肽的NLP的短肽:抗原结合多肽的摩尔比在约1:60与60:1之间,包括该范围内的任何比率。在一些实施例中,包含短肽和抗原结合多肽的NLP的短肽:抗原结合多肽的摩尔比为约20。在一些实施例中,NLP包含1-50个抗原结合多肽(例如Fab或Fab样多肽)和1-100(诸如约60)个短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含短肽(例如CKP或CKP变体)的5-30、10-25、15-20或18个分子以及抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的5至40、10至35、15至30、20至25或23个分子。在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含短肽(例如CKP或CKP变体)的3-30、5-20、10-15或13个分子以及抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的10至60个分子。在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含短多肽(例如CKP或CKP变体)的20-80、25-70、30-60、35-50或40个分子及抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)的10至60个分子。在一些实施例中,NLP中的短肽:抗原结合多肽的摩尔比在1-100、10-90、20-80、30-70或40-60之间。在一些实施例中,包含短肽和抗原结合多肽的NLP的短肽:抗原结合多肽的摩尔比在约1:60与60:1之间,包括该范围内的任何比率。在一些实施例中,包含短肽和抗原结合多肽的NLP的短肽:抗原结合多肽的摩尔比为约20。

[0164] 在一些实施例中,将缀合肽的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基并入肽-NLP-多肽缀合物中会增加肽(例如CKP或CKP变体)的亲合力、活性或效力,例如如上文针对抗原结合多肽所描述。

[0165] 在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含两个或更多个不同短肽(例如CKP或CKP变体)(诸如2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同短肽,诸如CKP或CKP变体),这些不同短肽例如显示两种或更多种不同活性,例如不同靶结合特异性和/或不同治疗活性。本文所公开的肽-NLP-多肽缀合物提供可扩展至多特异性形式和/或高化合价的多特异性平台,该扩展不仅是针对抗原结合多肽(如上所述),也是针对短肽(例如CKP或CKP变体)。例如,在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含2、3、4、5、6、7或8个不同短肽(例如CKP或CKP变体),例如结合2、

3、4、5、6、7或8个不同抗原或表位的2、3、4、5、6、7或8个不同肽。在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同短肽(例如CKP或CKP变体),例如结合10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同抗原或表位的10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同肽。在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同短肽(例如CKP或CKP变体),例如结合25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同抗原或表位的25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同肽。

[0166] 在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含短肽(例如CKP或CKP变体)和抗原结合肽(例如Fab或Fab样分子)。在一些实施例中,短肽与抗原结合多肽结合相同靶。在一些实施例中,短肽与抗原结合多肽结合不同靶。在一些实施例中,短肽显示与抗原结合多肽的活性(例如治疗活性)互补或协同的活性(例如治疗活性)。例如,在一些实施例中,肽-NLP-多肽缀合物包含结合两种不同抗原的两个短肽,其中两种不同抗原选自以下对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X及因子IXa。在一些实施例中,该缀合物包含短肽(例如CKP或CKP变体)和抗原结合多肽,其中短肽和抗原结合多肽结合两种不同抗原。在一些实施例中,两种不同抗原选自以下对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0167] 在一些实施例中,缀合物包含结合选自OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3和淋巴毒素β受体的靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,缀合物包含结合前述靶的任何组合的至少两个不同短肽(例如CKP或CKP变体)或短肽(例如CKP或CKP变体)和抗原结合肽(例如Fab或Fab样分子)。在一些实施例中,缀合物包含结合选自因子D、VEGF、Tie2及DR4的靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,缀合物包含结合前述靶的任何组合的至少两个不同短肽(例如CKP或CKP变体)或短肽(例如CKP或CKP变体)和抗原结合肽(例如Fab或Fab样分子)。

[0168] 在一些实施例中,短肽是半胱氨酸结肽(CKP)。半胱氨酸结肽通常长度为20至60个氨基酸并且包含形成三个分子内二硫键的6个保守半胱氨酸,这些分子内二硫键排列成称为胱氨酸结基序的打结构象,即通过穿有第三二硫键的两个二硫键所形成的环(Craik等人(2001) *Toxicon* 39(1):43-60)。此种结构基序存在于来自各种物种的肽和蛋白质中,并且赋予肽框架抵抗热、化学以及酶促降解的高稳定性(Colgrave等人(2004) *Biochemistry* 43,5965-5975)。示例性CKP包括例如但不限于EETI-II(UniProt登录号:P12071)、环状抗菌肽(cyclopsychotride)A(UniProt登录号:P56872)、环紫菌素(cycloviolacin)01(UniProt登录号:P82230)、环紫菌素012(UniProt登录号:P83836)、kalata(例如kalata B1(UniProt登录号:P56254)、kalata B8(UniProt登录号:P85175)等)、palicourein(UniProt登录号:P84645)、tricyclon A(UniProt登录号:B6E617)、木鳖子(*Momordica cochinchinensis*)胰蛋白酶抑制剂(例如MCoTI 1(UniProt登录号:P82408))、菠菜(*Spinacia oleracea*)胰蛋白酶抑制剂(例如SOTI 1(UniProt登录号:P84779))、环状菌素A(UniProt登录号:P56871)、环状菌素B(UniProt登录号:56879)、环状抗菌肽(UniProt登录号:P56872)和varv肽A(UniProt登录号:P58446)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。EETI-II的氨基酸序列是GCPRIILMRCKQSDCLAGCVCGPNGFCG(SEQ ID NO:1)。

[0169] 存在于侧接于CKP中的保守半胱氨酸残基的环区中的高氨基酸序列多样性表明,

非天然序列可耐受于这些区域中。已使用CKP主链作为用于肽接枝和亲合力成熟的框架来生成结构和/或生物活性显著不同于天然CKP的高度稳定肽。例如,已使用喷瓜 (*Ecballium elaterium*) 胰蛋白酶抑制剂II (EETI-II) 作为分子支架,其中使用针对靶(诸如弹性蛋白酶、促血小板生成素和整合素)的接枝的生物活性肽合理取代该胰蛋白酶结合环(PRILMR)。例如参见Kimura等人(2009) *Proteins* 77, 359-369; Gunasekera等人(2008) *J. Med. Chem.* 51:7697-7704; Krause等人(2007) *Proteins* 77, 359-369; Hilpert等人(2003) *J. Biol. Chem.* 278, 24986-24993; 以及Kimura等人(2011) *PLoS One* 6, e16112)。另外,已经由亲合力成熟来生成结合所关注靶(例如VEGFA和LRP6)的EETI-II的肽衍生物。参见WO 2017/049009。在一些实施例中,该肽为CKP变体。在一些实施例中,CKP变体相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列在一个或多个环序列中包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含化学修饰。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含化学修饰。在一些实施例中,CKP变体包含允许共价缀合C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)至CKP变体(例如在CKP变体的N端或其附近,或在CKP变体的C端或其附近)的修饰。在一些实施例中,CKP变体相对于衍生其的野生型CKP在其N端进一步包含(例如经修饰以进一步包含)另一赖氨酸残基。在一些实施例中,CKP变体结合至不同于由衍生其的野生型CKP结合的靶的靶。在一些实施例中,CKP变体显示不同于由衍生其的野生型CKP结合的靶的活性(例如治疗活性)。在一些实施例中,CKP变体是衍生自EETI-TT (SEQ ID NO: 1)。

[0170] 在一些实施例中,包含抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)和短肽的缀合物(例如肽-NLP-多肽缀合物)中短肽的活性为包含短肽的缀合物(例如肽-NLP缀合物,即不含抗原结合多肽)中短肽的活性的例如约2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-或10倍中的任一者。在一些实施例中,短肽的活性是约2倍至20倍,例如约5倍。在一些实施例中,短肽是CKP,例如EETI-II。在一些实施例中,短肽是衍生自EETI-II的CKP变体。

[0171] III. 包含短肽的纳米脂蛋白缀合物

[0172] 本发明的另一方面涉及包含至少一种含有1-80、10-70或20-60个氨基酸的短肽(即除支架蛋白质外的NLP并入的肽)的纳米脂蛋白颗粒缀合物。如本文其他地方所论述,“纳米脂蛋白颗粒”或NLP是指包含脂质和支架蛋白质、尤其包含成膜脂质和支架蛋白质(诸如载脂蛋白)的超分子复合物。NLP通常通过自组装过程形成,其中成膜脂质形成具有盘形形状的脂双层(参见下文实例5的参考文献19),并且其中通过结合至环绕双层盘的支架蛋白质来稳定该盘的疏水性边缘。在一些实施例中,成膜脂质包含C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)。在一些实施例中,成膜脂质包含烷基磷酸胆碱、醚脂质、糖脂、溶血鞘脂、溶血甘油磷脂、磷脂、鞘脂和/或固醇。另外或替代地,在一些实施例中,成膜脂质是磷脂或不同磷脂的组合。示例性磷脂包括但不限于例如二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二油酰基卵磷脂(DOPC)、二油酰基磷酸丝氨酸(DOPS)和二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)及其组合。在特定实施例中,成膜脂质是DOPE和/或DOPC。在一些实施例中,成膜脂质是非脂质两亲性分子,诸如二甘油四醚、胆固醇、麦角固醇等。

[0173] 在一些实施例中,成膜脂质是生物分子,即由活生物体(例如细菌、酵母或哺乳动物)产生的分子。

[0174] 在此类肽-NLP缀合物中,由成膜脂质形成的双层由一种或多种支架蛋白质(即本文其他地方所描述的支架蛋白质)稳定。在一些实施例中,支架蛋白质是载脂蛋白。在一些实施例中,支架蛋白质是载脂蛋白A、载脂蛋白B、载脂蛋白C、载脂蛋白D、载脂蛋白H、载脂蛋白E或前述各项中的任何一种或多种的组合。在一些实施例中,支架蛋白质是能够稳定该双层的前述载脂蛋白中的任一种的截短版本。在一些实施例中,支架蛋白质是apoE3的截短版本(例如apoE322k)、apoE2的截短版本(例如apoE222k)或apoA1的截短版本(例如 $\Delta$ 49ApoA1、MSP1、MSP1T2、MSP1E3D1)。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质组分都是由活生物体产生的生物分子,并且形成不含非生物源材料的NLP。

[0175] 本领域技术人员应理解,可以适当摩尔比来提供支架蛋白质和成膜脂质以促进肽-NLP缀合物组装。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:50至1:100、1:60至1:90或1:70至1:80。在一些实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90或1:100。在一具体实施例中,支架蛋白质和成膜脂质的摩尔比为1:80。在一些实施例中,所用比率应使得成膜脂质的大部分或所有排列为双层,并且没有或较少成膜脂质保持未组装。

[0176] 在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含至少一种共价附接至包含1-80、10-70或20-60个氨基酸的短肽的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基成膜脂质。在一些实施例中,所述 $C_{4-28}$ 脂肪酰基是 $C_{16}$ 脂肪酰基。在一些实施例中, $C_{4-28}$ 脂肪酰基包含官能团(例如描述于本文其他地方的官能团)。在一些实施例中,官能团直接位于 $C_{4-28}$ 脂肪酰基的烃尾部上,或是该烃尾部的化学结构的一部分。在一些实施例中,官能团与短肽的一个或多个氨基酸残基上的相应或互补官能团(例如如本文其他地方所描述)发生反应。在一些实施例中,相应或互补官能团位于肽的C端。在一些实施例中,相应或互补官能团位于肽的N端。在一些实施例中, $C_{4-28}$ 脂肪酰基缀合至短肽的N端的赖氨酸侧链的 $\epsilon$ 氨基。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个短肽(例如1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个共价附接至短肽的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)成膜脂质)。在一些实施例中,短肽:NLP的摩尔比为1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60。可使用下文实例6和7中所描述的技术来证实和/或量化如本文所描述短肽在NLP中的成功并入,这些技术是例如液相层析-质谱、凝胶电泳、高效液相层析(HPLC)和核磁共振(NMR)。图10A描绘了包含短肽的示例性NLP的组装的示意图。

[0177] 在一些实施例中,并入结合肽的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基成膜脂质会促进短肽的多聚化,例如其中缀合物提供两个或更多个短肽分子,即将同一肽的多个拷贝并入肽-NLP缀合物中。以此方式,肽的亲合力、活性或效力有所增加,例如如本文其他地方针对抗原结合多肽所描述。

[0178] 在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含两个或更多个不同短肽(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同短肽),这些不同短肽例如显示两种或更多种不同活性,例如不同靶结合特异性和/或不同治疗活性。本文所公开的肽-NLP缀合物提供可关于短肽扩展至多特异性形式和/或高化合价的多特异性平台。例如,在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含2、3、4、5、6、7或8个不同短肽,例如结合2、3、4、5、6、7或8个不同抗原或表位的2、3、4、5、6、7或8个不同肽。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不

同短肽,例如结合10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同抗原或表位的10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30个不同肽。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同短肽,例如结合25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同抗原或表位的25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60个不同肽。

[0179] 对于本领域技术人员来说,提供关于短肽的特异性多价和多特异性的构型是显而易见的。例如,在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含结合两种不同抗原的两个短肽,其中两种不同抗原选自以下对:CD3和CD19;CD3和EpCAM;CD3和CEA;CD16和CD30;CD16和CD33;Ang-2和VEGF-A;以及因子X和因子IXa。

[0180] 在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含结合选自OX40、DR4、GITR、Tie2、因子D、VEGF、MerTK、CD3和淋巴毒素 $\beta$ 受体的靶的短肽。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含至少两个结合前述靶的任何组合的不同短肽。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含结合选自因子D、VEGF、Tie2和DR4的靶的短肽。在一些实施例中,肽-NLP缀合物包含至少两个结合前述靶的任何组合的不同短肽。

[0181] 在一些实施例中,短肽是半胱氨酸结肽(CKP)。示例性CKP包括但不限于,例如EETI-II(UniProt登录号:P12071)、环状抗菌肽A(UniProt登录号:P56872)、环紫菌素01(UniProt登录号:P82230)、环紫菌素012(UniProt登录号:P83836)、kalata(例如kalata B1(UniProt登录号:P56254)、kalata B8(UniProt登录号:P85175)等)、palicourein(UniProt登录号:P84645)、tricyclon A(UniProt登录号:B6E617)、木鳖子(*Momordica cochinchinensis*)胰蛋白酶抑制剂(例如MCoTI 1(UniProt登录号:P82408))、菠菜(*Spinacia oleracea*)胰蛋白酶抑制剂(例如SOTI 1(UniProt登录号:P84779))、环状菌素A(UniProt登录号:P56871)、环状菌素B(UniProt登录号:56879)、环状抗菌肽(UniProt登录号:P56872)和varv肽A(UniProt登录号:P58446)。在一些实施例中,CKP是EETI-II。EETI-II的氨基酸序列是GCPRI LMRCKQDS DCLAGCVC GPNGFCG (SEQ ID NO:1)。

[0182] 在一些实施例中,该肽为CKP变体。在一些实施例中,CKP变体相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列在一个或多个环序列中包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含化学修饰。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含化学修饰。在一些实施例中,CKP变体包含允许共价缀合 $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如 $C_{16}$ 脂肪酰基)至CKP变体(例如在CKP变体的N端或其附近,或在CKP变体的C端或其附近)的修饰。在一些实施例中,CKP变体结合至不同于由衍生其的野生型CKP结合的靶的靶。在一些实施例中,CKP变体显示不同于由衍生其的野生型CKP结合的靶的活性(例如治疗活性)。在一些实施例中,CKP变体是衍生自EETI-TT (SEQ ID NO:1)。

[0183] 在一些实施例中,包含短肽的肽-NLP缀合物(例如NLP缀合物)中短肽的活性(例如生物活性)比游离短肽(即尚未并入肽-NLP缀合物中的肽)的活性低(例如后者为前者的约2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-或10倍中的任一者)。在一些实施例中,短肽之活性低约5倍。在一些实施例中,包含短肽的肽-NLP缀合物中短肽的活性(例如生物活性)是游离肽的活性的

80%-90%、90%-95%或95%-99%。在一些实施例中,短肽是CKP,例如EETI-II。在一些实施例中,短肽是衍生自EETI-II的CKP变体。

[0184] 增加NLP的稳定性(例如活体外稳定性或活体内半衰期)的方法为本领域所已知并且可用于增加肽-NKP缀合物的稳定性。例如参见Gilmore SF,Carpenter TS,Ingolfsson HI,Peters SKG,Henderson PT,Blanchette CD,Fischer NO“Lipid composition dictates serum stability of reconstituted high-density lipoproteins: implications for in vivo applications”Nanoscale,2018,10(16):7420-7430;和Gilmore SF,Blanchette CD,Scharadin TM,Hura GL,Rasley A,Corzett M,Pan CX,Fischer NO,Henderson PT.“Lipid Cross-Linking of Nanolipoprotein Particles Substantially Enhances Serum Stability and Cellular Uptake”ACS Applied Material Interfaces,2016,8:32。

[0185] 可将本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和NLP-多肽缀合物)以其自身或作为药物组合物的一部分施用有需要的受试者。此类药物组合物如下文所述。

[0186] IV. 药物组合物和施用

[0187] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,例如包含至少一种本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)以及药学上可接受的载体的药物组合物。药物组合物也可称为“药物”或“制剂”。可基于已知技术将本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和NLP-多肽缀合物)、尤其NLP-Fab缀合物或肽-NLP-Fab缀合物制备成包含药学上可接受的载体的生理上可接受的制剂。例如,组合缀合物与药学上可接受的载体或载剂以形成药物组合物。

[0188] “药学上可接受的载体”或“药学上可接受的载剂”是指药物组合物中的除活性成分外的成分,其对受试者无毒,并且不以有害方式与组合物的其他成分相互作用。通常,将药学上可接受的载体并入药物组合物中并施用受试者,而不会引起超过活性成分的预期有益效应的不期望生物效应。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、溶剂、赋形剂、稳定剂、稀释剂、防腐剂等。所用载体通常取决于药物组合物的形式和/或预期施用途径。药学上可接受的载剂或赋形剂优选地满足毒理学和制造测试的要求标准并且/或者包括在美国食品药品监督管理局(U.S.Food and Drug Administration)编制的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)中。

[0189] 可通过静脉内施用(例如以团剂形式或通过连续输注一定时间段)将药物组合物施用于受试者。可通过静脉内、真皮内、肌内、腹膜腔内、脑脊髓内、关节内、滑膜内或皮下施用来施用药物组合物。在一些实施例中,通过气管内、阴道、口服、舌下或眼部施用途径来施用药物组合物。在一些实施例中,将药物组合物施用于脑或中枢神经系统。

[0190] 可以固体、液体或气溶胶的形式在适宜剂量下将本发明组合物施用于受试者。固体组合物的实例包括丸剂、乳霜和可植入剂量单元。可经口施用丸剂。可经局部施用治疗性乳霜。可植入剂量单元可经局部(例如在肿瘤位点处)施用,或可植入以全身性释放药物组合物,例如经皮下施用。液体组合物的实例包括适于经肌内、经皮下、经静脉内、经动脉内注射的制剂以及用于局部和眼内施用的制剂。气溶胶制剂的实例包括用于施用于肺的吸入式制剂。

[0191] 在某些实施例中,全身性施用药物组合物。药物组合物可肠胃外或非肠胃外施用。对于非肠胃外施用而言,药物组合物通常包含无菌水性或非水性的溶液、悬浮液和乳液。在一些实施例中,可在使用时间时例如通过将粉末状组合物(例如以冻干形式提供)溶于适当水性液体(例如蒸馏水)或非水性溶剂中来制备溶液或悬浮液。非水性溶剂包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯(例如油酸乙酯)。水性溶剂可选自水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。非肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏试剂(lactated Ringer's)或不挥发性油。也可存在防腐剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0192] 在一些实施例中,将药物组合物施用于脑或中枢神经系统以例如治疗神经系统疾病。在特定实施例中,在经局部或全身性施用后,缀合物(例如NLP-Fab缀合物、NLP-Fab样分子缀合物、肽-NLP-Fab缀合物或肽-NLP-Fab样分子缀合物)可穿越血-脑屏障,从而递送(例如靶向递送)至脑(脑实质)或中枢神经系统中。在用于递送至脑或中枢神经系统的特定实施例中,支架蛋白质是载脂蛋白(诸如载脂蛋白E、尤其apoE2和/或apoE4),并且该缀合物显示在全身性递送(例如静脉内)后生物分布至脑实质中。

[0193] a. 皮下和眼部制剂

[0194] 在一些实施例中,本发明提供呈高度浓缩但黏度较低的制剂形式的本发明缀合物,如下文更详细地描述。例如,在施用途径限制了可递送制剂的体积的情况下(诸如在皮下和眼部施用途径的情况下),此类制剂是有利的。

[0195] 用于皮下递送的药物组合物通常包括含有以下各项的赋形剂:糖稳定剂(例如蔗糖或海藻糖)和/或表面活性剂(例如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)和/或氨基酸(例如组氨酸、精氨酸、甘氨酸和/或丙氨酸)。对于皮下递送而言,可经由以下设备递送制剂:注射器(例如预填充注射器);自动注射器;注射装置(例如INJECT-EASE™和GENJECT™装置);注射笔(诸如GENPEN™);无针装置(例如MediJector™和BioJector™);皮下贴剂递送系统;或适于经皮下施用溶液或悬浮液制剂的其他装置。

[0196] 对于眼部递送而言,药物组合物可经配制以含有缓冲剂、稳定剂、防腐剂和/或填充剂以使组合物适于经眼部施用患者。用于眼部递送的药物组合物通常包含:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐以及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯基吡咯酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂(诸如EDTA);糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属复合物(例如锌蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂诸如聚乙二醇(PEG)。

[0197] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括含有缀合物的固体疏水性聚合物的缓释基质,这些基质呈成形物品形式,例如膜或微胶囊。本文所用的缓释基质是由可通过酶促或酸/碱水解或通过溶解降解的材料、通常聚合物制得的基质。一旦插入身体中,基质便由酶和体液施加作用。期望地,缓释基质选自生物兼容材料,诸如脂质体、聚丙交酯(聚丙交酯酸)、聚乙交酯(乙醇酸聚合物)、聚丙交酯-共-乙醇酸交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚

酞、聚(原酸)酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸(诸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸)、多核苷酸、聚乙烯丙烯、聚乙烯吡咯酮和硅酮。缓释基质的非限制性实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 $\gamma$ -L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球))和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0198] 在某些实施例中,药物组合物包含一种或多种允许本发明缀合物渗透角膜的渗透性增强剂。此类渗透性增强剂的实例包括例如表面活性剂、胆汁酸、螯合剂、防腐剂、环糊精(即与亲脂性药物形成复合物的具有亲水性外表面和亲脂性内表面的圆柱形寡核苷酸)等。此类渗透性增强剂会增加化学稳定性和生物可用性并且降低局部刺激。在某些实施例中,本文所提供的药物组合物进一步包含增加本发明缀合物在各个眼部部分中的吸收和分布的试剂。

[0199] 在某些实施例中,将本文所提供的药物组合物配制为原位胶凝系统,例如在组合物与泪液接触时在眼部表面上因特定物理化学参数(离子强度、温度、pH或溶剂交换)的变化而表现出溶胶至凝胶相变的基于聚合物的黏性液体。在某些实施例中,将本文所提供的药物组合物配制为眼喷雾。在某些实施例中,将本文所提供的药物组合物配制为微乳液。关于各种眼部医药制剂的其他细节提供于(例如)以下文献中:Gaikwad等人(2013) *Indo Amer J Pharm Res.* 3,3216-3232; Achouri等人(2012) *Drug Dev Indust Pharm.* 39,1599-1617; Lu(2010) *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 4,49-57; Baranowski等人(2014) *Sci World J.* doi.org/10.1155/2014/861904; Lang(1995) *Adv Drug Deliv Rev.* 16,39-43; Short(2008) *Toxicologic Path.* 36,49-62; 以及其他文献。

[0200] 对于眼部递送而言,缀合物可通过注射(例如结膜下注射、角膜内注射或玻璃体内注射)施用;或经局部施用,例如以滴眼剂形式;或通过将缀合物连续递送至眼睛中的玻璃体内装置来施用。

#### [0201] b. 剂量

[0202] 通常,药物组合物将包括有效量的本文所描述的NLP缀合物。药物(例如抗原结合多肽或其他药物)的“有效量”是指在施用药物的细胞或组织中产生生理学变化(通常是使接受药物组合物的受试者产生有益效应)所需的量。

[0203] 药物组合物的剂量取决于各种因素,例如例如所治疗的病症、病症的严重程度和病程、施用缀合物是用于预防目的或治疗目的、其他临床因素(诸如受试者的体重、身材、性别以及整体健康状况、待施用的特定NLP缀合物、同时施用的其他药物、施用途径、先前疗法、受试者的临床史以及主治医师的判断)。

[0204] 通常,用于药物组合物的规则施用的方案应在1 $\mu$ g至5g单位/天的范围内。可通过周期性评价来监测进展。缀合物可适当地一次性或经一系列治疗来施用并且可在自诊断开始的任何时间施用于受试者。可作为唯一治疗或与其他可用于治疗所论述病症的治疗剂或疗法方法组合来施用缀合物。

#### [0205] c. 低黏度制剂

[0206] 本发明的另一方面涉及包含本文所描述的一种或多种缀合物的低黏度液体制剂。“黏度”是指因剪切应力或拉伸应力而变形的流体的抗性的量度;其可使用黏度计或流变仪

来评估。除非另外指示,否则在25℃下进行黏度测量(厘泊,cP)。

[0207] 令人意外地,在一些实施例中,可以维持相对较低黏度的高浓度液体制剂形式来提供本文所描述的缀合物(例如NLP-多肽缀合物和/或肽-NLP-多肽缀合物)。通常,在高蛋白质浓度下,蛋白质-蛋白质相互作用会增加黏度。与之相比,本发明NLP缀合物(例如NLP-多肽缀合物和/或肽-NLP-多肽缀合物)在黏度实质性增加之前允许出人意料地高的蛋白质浓度(参见例如实例3、图4A,其中评估Fab载量对浓度/黏度关系的影响)。该关系是重要的化学、制造和控制(CMC)考虑因素,并且在某些实施例中,本发明的NLP缀合物可以出人意料地高的浓度提供于低黏度液体制剂中。实际上,相对于替代多价形式(Fab-PEG缀合物),使用Fab-NLP缀合物可实现显著更高的Fab浓度。

[0208] “低黏度制剂”(或“低黏度液体制剂”)的黏度通常低于50cP,例如40-50cP;或低于40cP,例如30-40cP;或低于30cP,例如20-30cP;或低于20cP,例如10-20cP。在一些实施例中,黏度为10-50cP、15-45cP、20-40cP、25-35cP或30cP。在一些实施例中,低黏度制剂的浓度大于50mg缀合物/mL,例如50-75mg/mL;大于75mg缀合物/mL,例如75-100mg/mL;大于100mg缀合物/mL,例如100-150mg/mL;大于150mg缀合物/mL,例如150-200mg/mL;大于200mg缀合物/mL,例如200-250mg/mL;大于250mg缀合物/mL,例如250-300mg/mL;大于300mg缀合物/mL,例如300-350mg/mL;大于350mg缀合物/mL,例如350-400mg/mL;或大于400mg缀合物/mL,例如400-450mg/mL。在一些实施例中,低黏度制剂的浓度为100-200、200-300或100-300mg缀合物/mL。在一些实施例中,该缀合物是NLP-多肽缀合物或肽-NLP-多肽缀合物。在特定实施例中,低黏度制剂的抗原结合多肽是Fab或Fab样分子。

[0209] 在一些实施例中,低黏度制剂包含具有20-40、25-35、20-30、25-40、25-30或30个抗原结合多肽(例如Fab)/缀合物的缀合物。在某些实施例中,抗原结合多肽是Fab或Fab样分子。在某些实施例中,该缀合物包含25、27、28、29、30、31、32、33、34或35个抗原结合多肽分子(例如Fab或Fab样分子)/缀合物。在一些实施例中,低黏度制剂中的缀合物进一步包含1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个短肽。示例性短肽进一步详细论述于本文的其他地方。

[0210] 本领域技术人员应认识到,以低黏度制剂形式提供高浓度的抗原结合多肽有利于经由可施用体积受限的途径来递送有效量的抗原结合多肽。例如,对于眼部递送而言,注射体积通常限于100μl;对于皮下递送而言,注射体积通常限于1-2ml。因此,本发明的缀合物(例如NLP-多肽缀合物和/或肽-NLP-多肽缀合物)(例如用于以高浓度、低黏度制剂形式经由体积受限途径(诸如经由眼部递送和皮下施用)进行施用。因此,在一些实施例中,本发明向有需要的受试者提供皮下和眼部制剂,即分别经皮下或经由眼部递送施用的本发明的药物组合物。根据本文所描述的低黏度制剂,皮下或眼部制剂有利地在低黏度液体中包含高浓度的缀合物(例如NLP-多肽缀合物和/或肽-NLP-多肽缀合物)。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0211] d. 冻干制剂

[0212] 在一些实施例中,可冻干本发明的药物组合物、制剂和缀合物中的任一种,并重构。“冻干”是指帮助储存易腐材料和/或使其更易于运输的冷冻-干燥过程。冷冻-干燥涉及冷冻材料并且然后降低周围压力,同时增加温度以使材料中的冷冻水直接升华成气相。通常,冻干导致水分含量小于5%(例如3%-5%)或小于3%(例如2%-3%)或小于2%(例如

1%-2%)产物。随后可在使用前通常在冻干和储存的相同容器或小瓶中重构冻干产物。通常,通过添加水性液体(例如蒸馏水或水性缓冲液)来重构(再水化)产物。此外,治疗剂在冻干期间的稳定性及其在重构后保留活性的能力是重要的化学、制造和控制(CMC)考虑因素。例如参见Bjelosevic等人“Excipients in Freeze-Dried Biopharmaceuticals: Contributions Toward Formulation Stability and Lyophilisation Cycle Optimisation”Int J Pharm 2020Feb 25;576。

[0213] 令人意外地,在一些实施例中,可冻干并重构NLP缀合物(例如NLP-抗原结合多肽缀合物和/或肽-NLP-抗原结合多肽缀合物)而不损失抗原结合活性(参见例如实例4、图4B和图5A-5D,其中评估冻干时的Fab-NLP稳定性以评价Fab-NLP的可制造性)。在一些实施例中,在冻干和重构后,至少80%(例如80%-90%)、至少90%(例如90%-95%)或至少95%(例如95%-99%)的抗原结合活性得以保留。在一些实施例中,98%、99%或100%的抗原结合活性得以保留。

[0214] 对于冻干而言,以预冻干制剂形式来提供缀合物(例如NLP-抗原结合多肽缀合物和/或肽-NLP-抗原结合多肽缀合物),该预冻干制剂通常是包含缀合物的pH缓冲溶液。pH可为4-8或5-7。示例性缓冲剂包括组氨酸、磷酸盐、Tris、柠檬酸盐、琥珀酸盐和其他有机酸。在一些实施例中,将冻干保护剂添加至预冻干制剂中。冻干保护剂的非限制性实例包括非还原糖,诸如蔗糖或海藻糖。在特定实施例中,将海藻糖添加至待冻干的含有本发明缀合物的溶液中。预冻干制剂中的冻干保护剂的量通常使得在重构后所得制剂等渗。然而,高渗重构制剂也可以是合适的。

[0215] 在一些实施例中,冻干是在海藻糖存在下发生,例如其中缀合物是在40-200mM海藻糖存在下冻干。在特定实施例中,在冻干本发明缀合物(例如包含Fab作为抗原结合多肽的缀合物)期间,以50-150mM、60-100mM或70-90mM的浓度使用海藻糖。在一些实施例中,冻干是在60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM或100mM海藻糖存在下发生,例如其中缀合物包含Fab作为抗原结合多肽。在一些实施例中,冻干在80mM海藻糖存在下发生。

[0216] 在一些实施例中,冻干在1-10mg缀合物/mL的浓度下发生。在特定实施例中,该缀合物包含Fab作为抗原结合多肽,并且在2-8mg缀合物/mL、3-6mg缀合物/mL或5mg缀合物/mL下冻干该缀合物。在一些实施例中,该缀合物包含Fab,并且冻干是在70mM、75mM、80mM、85mM或90mM海藻糖存在下以及在2-8mg缀合物/mL、3-6mg缀合物/mL或5mg缀合物/mL的浓度下发生。在一特定实施例中,该缀合物包含Fab,并且冻干是在80mM海藻糖存在下以及在5mg缀合物/mL的浓度下发生。

[0217] 在一些实施例中,已发现,期望将表面活性剂添加至预冻干制剂中。替代地或另外,可将表面活性剂添加至冻干制剂和/或重构制剂中。示例性表面活性剂包括非离子型表面活性剂,诸如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂基硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-硫代甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈油酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如月桂酰胺丙基甜菜碱);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈油酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油酰基牛磺酸二钠;和MONAQUAT™系列(Mona Industries Inc., Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚

丙二醇和乙二醇与丙二醇的共聚物(例如Pluronic、PF68等)。所添加表面活性剂的量应使得其可减少重构缀合物的聚集并且最小化重构后的微粒形成。例如,表面活性剂可以0.001%-0.5%,优选地0.005%-0.05%的量存在于预冻干制剂中。

[0218] 在某些实施例中,使用冻干保护剂(例如海藻糖)和填充剂(例如甘露醇或甘氨酸)的混合物来制备预冻干制剂。填充剂可允许产生均匀冻干饼,并且在其中并无过多凹穴,等等。

[0219] 在将缀合物、缓冲剂、冻干保护剂和其他可选组分混合在一起之后,冻干制剂。许多不同冷冻-干燥剂可用于此目的,诸如Hull150<sup>TM</sup>(Hull, USA)或GT20<sup>TM</sup>(Leybold-Heraeus, Germany)冷冻-干燥剂。在一些实施例中,可期望在重构缀合物的容器中冻干缀合物制剂以避免转移步骤。容器可为(例如)3、5、10、20、50或100cc小瓶。

[0220] 在期望后续时间时、通常在将缀合物施用于患者时,可使用稀释剂重构冻干制剂以在重构制剂中提供期望缀合物浓度(例如本文所提供的缀合物浓度的任一种)。例如,期望浓度可为50-75mg/mL、75-100mg/mL、100-150mg/mL、1500-200mg/mL、200-250mg/mL、250-300mg/mL、300-350mg/mL、350-400mg/mL或400-450mg/mL。如上所述,重构制剂中的此类高缀合物浓度尤其可用于意欲经皮下或经眼部递送重构制剂的情况。然而,对于其他施用途径(诸如静脉内施用)而言,可期望重构制剂中的缀合物浓度较低(例如5-50mg/mL、10-40mg/mL)。

[0221] 重构通常发生于25°C的温度下以促进水合作用,但可视需要采用其他温度。重构所需时间将取决于例如稀释剂类型、赋形剂的量和缀合物组分。示例性稀释剂包括无菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。稀释剂任选地含有防腐剂。示例性防腐剂包括但不限于芳香醇(诸如苄基醇或酚醇)。可通过评价与缀合物兼容的不同防腐剂浓度来确定所采用防腐剂的量。

#### [0222] V. 制备方法

##### [0223] a. 制备包含抗原结合多肽的纳米脂蛋白缀合物的方法

[0224] 本发明的另一方面涉及制备包含多肽(例如抗原结合多肽)的缀合物的方法。这些方法通常涉及a)在允许纳米脂蛋白颗粒组装(例如自组装)的条件下提供支架蛋白质和一种或多种成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中成膜脂质中的一种或多种在颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团;b)使颗粒在低pH下接触在C端具有缀合至经官能化的基团的互补官能团的抗原结合多肽;以及c)任选地纯化所述颗粒和所述抗原结合多肽的缀合物。

[0225] 在一些实施例中,成膜脂质包含C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)。在一些实施例中,C<sub>4-28</sub>脂肪酰基共价附接至短肽(例如本文所述的短肽)。可如实例7中所述来产生此种肽缀合的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基。产生结合肽缀合的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基的其他方法为本领域已知。

[0226] 在一些实施例中,通过体外翻译方法组装NLP(包括肽-NLP),其中在从mRNA转译支架蛋白质的同时实现NLP的自组装。在此过程中,混合表达系统溶解物与成膜脂质和编码支架蛋白质质粒DNA。使反应进行(例如大约4-24小时)直至在支架蛋白质表达期间发生组装为止。

[0227] 在一些实施例中,在预定支架蛋白质:脂质比率和/或可增加产率或控制所得NLP

(或肽-NLP)的大小和组成的条件下实施该方法。例如,可选择支架蛋白质:脂质比率以提供具有上述比率的NLP(或肽-NLP)。在一些实施例中,在肽缀合的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基:其他成膜脂质的预定摩尔比率(例如10%摩尔比率,即10%肽缀合的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基和90%其他成膜脂质)下实施该方法。

[0228] 为形成本发明的缀合物,在允许官能化脂质与抗原结合多肽官能团之间发生缀合的条件下,使NLP(例如缀合至短肽的NLP或不缀合至短肽的NLP)和抗原结合多肽接触适当时间。在特定实施例中,使具有马来酰亚胺官能化脂质(1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺-N-[4-(对-马来酰亚胺甲基)环己烷-甲酰胺](钠盐))((1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexane-carboxamide](sodium salt))) (DOPE-MCC)的NLP组装体缀合至含有C端半胱氨酸的Fab(例如参见实例1-2、图2A-2C和图8A-8B)。在另一实施例中,使包含肽缀合的 $C_{4-28}$ 脂肪酰基(例如肽缀合的 $C_{16}$ 脂肪酰基)与马来酰亚胺官能化脂质(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺-N-[4-(对-马来酰亚胺甲基)环己烷-甲酰胺](钠盐)) (DOPE-MCC)的组装体的NLP缀合至含有C端半胱氨酸的Fab。参见实例10和图13A。

[0229] 通常,马来酰亚胺(或马来酰亚胺衍生物)与无硫醇缓冲水溶液中的硫氢基,例如,在6.5与0.5之间的pH下反应1-24小时以形成共价硫醚键。然后例如在反应完成时通过添加游离硫醇来淬灭马来酰亚胺。令人意外地,在一些实施例中,本发明方法利用低pH来缀合包含游离硫醇的抗原结合多肽与马来酰亚胺官能化脂质。低pH可为4.5-6.5、5.5-6.5、5-6或6。低pH有利于官能化脂质缀合至抗原结合多肽,而不是缀合至NLP的支架蛋白质(例如参见实例2、图1C-1D三角形)。实际上,令人意外地,在pH 7.4下组装NLP时,马来酰亚胺反应性脂质缀合至载脂蛋白(参见,例如实例2、图1B、图1C-1D(圆)和图8A)。然而,在pH 6下组装时,未观察到该不期望反应。这些组装条件限制了支架蛋白质(例如apoE422k蛋白)上的游离赖氨酸与马来酰亚胺官能化脂质(例如DOPE-MCC)之间的交联。

[0230] 因此,在如上所述的一些实施例中,经官能化的基团与多肽(例如抗原结合多肽)上的互补官能团进行反应并且不缀合至NLP的其他组分(例如不缀合至支架蛋白质)。例如,使用如本发明方法中所描述的低pH(例如pH 4.5-6.5、5.5-6.5、5-6或6),在形成本发明缀合物时,小于25%或20%-25%、小于20%或10%-20%、小于15%或10%-15%、小于10%或5%-10%、小于5%或3%-5%或0%的经官能化的基团缀合至支架蛋白质。在一些实施例中,在形成本发明缀合物时,5%、4%、3%、2%、1%或0%的经官能化的基团缀合至支架蛋白质。在特定实施例中,经官能化的基团是马来酰亚胺或马来酰亚胺衍生物并且官能团是游离硫醇基团。

[0231] 因此,在一些方面中,本发明提供一种制备纳米脂蛋白颗粒和抗原结合多肽的缀合物时减少脂质-支架蛋白质缀合的方法。

[0232] 在一些实施例中,这些方法无需在缀合至抗原结合多肽之前分离NLP与未反应组分。即,步骤b)(使颗粒在低pH下接触在C端具有缀合至所述经官能化的基团的互补官能团的抗原结合多肽)可紧跟步骤a)(在使纳米脂蛋白颗粒组装的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层,其中成膜脂质中的一种或多种在颗粒的一个或两个表面上呈现经官能化的基团),没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质或一些或所有未组装支架蛋白质的中间步骤。令人意外地,如

本文所描述,在使用特定比率的官能化成膜脂质与支架蛋白质时,较少官能化成膜脂质保持未组装成NLP,并且那些较少保持未组装的变得附着于反应器皿壁,从而未留下、留下较少或极少可用于与抗原结合多肽的官能团反应的。因此,在如上所述的一些实施例中,以1:50至1:100、1:60至1:90或1:70至1:80的摩尔比组合支架蛋白质和成膜脂质,并且在缀合至抗原结合多肽(例如Fab)之前无需或不实施去除未组装脂质的步骤。在一些实施例中,支架蛋白质与成膜脂质的摩尔比为1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90或1:100,并且在缀合至抗原结合多肽(例如Fab)之前无需或不实施去除未组装脂质的步骤。在一具体实施例中,支架蛋白质与成膜脂质的摩尔比为1:80,并且在缀合至抗原结合多肽(例如Fab)之前无需或不实施去除未组装脂质的步骤。

[0233] 在其中NLP包含结合肽的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基的一些实施例中,在自组装后并且在缀合至抗原结合多肽(例如Fab)之前,经由(例如)粒径筛析层析纯化NLP-肽缀合物,如上文所述。

[0234] b. 制备包含短肽的纳米脂蛋白缀合物的方法

[0235] 在相关方面中,提供了制备包含短肽的缀合物(即肽-NLP缀合物)的方法。还提供了增加具有20至60个氨基酸的短肽的亲合力、活性和/或效力的方法。在一些实施例中,该方法包括在允许组装(例如自组装)纳米脂蛋白颗粒的条件下提供支架蛋白质和成膜脂质,该纳米脂蛋白颗粒包含由所述支架蛋白质环绕的所述成膜脂质的脂双层;其中所述成膜脂质中的一种或多种包含缀合至所述短肽(例如长度为20至60个氨基酸之间的肽)的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基(例如C<sub>16</sub>脂肪酰基)。在一些实施例中,该方法进一步包含纯化肽-NLP缀合物(例如经由粒径筛析层析)。在一些实施例中,短肽是胱氨酸结肽(CKP),例如本文其他地方所描述的CKP。在一些实施例中,短肽是CKP变体。在一些实施例中,CKP变体相对于野生型CKP的相应一个或多个环序列在一个或多个环序列中包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含一个或多个氨基酸插入、缺失和/或取代。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在N端包含化学修饰。另外或替代地,在一些实施例中,相对于野生型CKP,CKP变体在C端包含化学修饰。在一些实施例中,所述成膜脂质以1:3至1:15或1:6至1:12或1:9的摩尔比包含肽-C<sub>4-28</sub>脂肪酰基缀合物以及DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC中的至少一种或多种(例如肽-C<sub>16</sub>脂肪酰基缀合物和DOPC)。在一些实施例中,该缀合物包含所述短肽的1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60个分子。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同肽(例如如本文其他地方进一步所详述)。图10A描绘了包含短肽的示例性NLP的组装的示意图。

[0236] 在一些实施例中,所述成膜脂质中的一种或多种在所述肽缀合物的一个或两个表面上呈现经官能化的基团,并且该方法进一步包含使所述肽-NLP缀合物在pH 4.5-6.5范围内的低pH下接触肽(例如抗原结合多肽,诸如Fab或Fab样分子)的步骤,该肽在C端具有缀合至所述经官能化的基团的互补官能团。在一些实施例中,多肽(例如抗原结合多肽)与肽-NLP缀合物的缀合紧跟肽-NLP缀合物的组装(例如自组装)之后,没有用以去除一些或所有未组装成膜脂质的中间步骤。在一些实施例中,抗原结合多肽与肽缀合物的缀合紧跟肽缀合物的组装(例如自组装)之后,没有用以富集肽缀合物的中间步骤。在一些实施例中,经官

能化的基团是马来酰亚胺衍生物并且其中所述官能团是半胱氨酸硫醇基团,任选地其中所述半胱氨酸氨基酸残基在衍生抗原结合多肽的抗体中形成较链二硫键(诸如Cys-226或Cys-227)。在一些实施例中,在所述低pH下,经官能化的基团不缀合至所述支架蛋白质。在一些实施例中,所述低pH为pH 5.5至6.5、pH5至6或pH 6。在一些实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质并且/或者间隔区连接所述互补官能团与所述抗原结合多肽。在一些实施例中,间隔区是连接所述经官能化的基团与所述成膜脂质的PEG间隔区。在一些实施例中,PEG间隔区具有1000-3000、1500-2500、1900-2200、或2000的MW。

[0237] 本文的本发明方法可在工业上用于产生如本文所描述的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和NLP-多肽缀合物)。此类缀合物可用于例如体外、离体以及体内治疗方法中。本文提供基于使用本发明缀合物中的一种或多种的各种方法。

[0238] VI. 治疗方法和用途

[0239] 本发明的另一方面涉及本文所描述缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和NLP-多肽缀合物)用于治疗的用途。待治疗的疾病、病症、病理学病状将告知选择用于缀合物中的抗原结合多肽和/或短肽。更特别地,在某些疾病、病症或病状中,需要或期望使用多价和/或多特异性抗原结合构建体缀合物(例如NLP-Fab缀合物、NLP-Fab样分子缀合物、肽-NLP-Fab缀合物或肽-NLP-Fab样分子缀合物)。本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和NLP-多肽缀合物)提供了用于如上文所描述的多价和/或多特异性抗原结合多肽和/或短肽的多功能平台,其可用于各种目的,例如用作治疗、防治、递送和诊断。

[0240] 如本文中所使用,“治疗”(及其语法变体,诸如“治疗(treat或treating)”)是指试图改变所治疗受试者的疾病的自然病程以产生有益效应的临床干预,并且可以防治方式或在疾病病程期间实施。有益的治疗效应包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、缓解、改良预后等。在一些实施例中,使用包含抗原结合多肽(包括例如Fab或Fab样分子)和/或短肽(例如CKP或CKP变体)的NLP缀合物来延迟疾病发生或减缓疾病进展,或减小疾病复发的可能性、频率和/或严重程度。

[0241] 通常,将缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)以治疗有效量提供至需要其益处的受试者。例如,药物组合物中的药物的“治疗有效量”是指如下量:在施用于受试者时可将有有效量的药物(例如抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)和/或短肽(例如CKP或CKP变体)和/或其他治疗剂或诊断剂)提供至靶细胞或组织以在细胞或组织中产生生理学变化,从而使接受药物组合物的受试者产生有益效应。通常以实现期望治疗或预防性结果的剂量和时间段来施用药物组合物。

[0242] a. 恶性疾病的治疗

[0243] 在一些实施例中,抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)结合在血管生成和/或肿瘤生长中发挥作用的靶;并且该缀合物(例如NLP-多肽缀合物)可用于抑制血管生成和/或肿瘤生长以治疗恶性疾病。在一些实施例中,可用于抑制血管生成和/或肿瘤生长的缀合物进一步包含结合在血管生成和/或肿瘤生长中发挥作用的靶的短肽(即肽-NLP-多肽缀合物)。在一些实施例中,短肽与抗原结合多肽结合相同靶。在一些实施例中,短肽与抗原结合多肽结合不同靶。在一些实施例中,短肽显示与抗原结合多肽的活性(例如治疗活性)互补

或协同的活性(例如治疗活性)。在特定实施例中,恶性疾病选自上皮、内皮或间皮来源的癌症以及血液癌症。本发明缀合物可用于治疗肿瘤(包括癌前期、非转移性、转移性和癌性肿瘤,例如早期癌症)或用于治疗处于发生癌症的风险下的受试者。在其他方面中,缀合物(例如Fab)的抗原结合多肽发挥靶向或稳定作用,例如使稳定NLP-Fab缀合物或稳定肽-NLP-Fab缀合物靶向与下文更详细论述的疾病有关的抗原。

[0244] 在特定实施例中,癌症或肿瘤选自由以下项组成的组:胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、口腔癌、胃癌、宫颈癌、B和T细胞淋巴瘤、骨髓性白血病、卵巢癌、白血病、淋巴白血病、鼻咽癌、结肠癌、前列腺癌、肾细胞癌、头颈癌、皮肤癌(黑色素瘤)、泌尿生殖道癌(例如睾丸癌、卵巢癌、内皮癌、宫颈癌和肾癌)、胆管癌、食管癌、唾液腺癌和甲状腺癌或其他肿瘤性疾病(如血液肿瘤、神经胶质瘤、肉瘤或骨肉瘤)。

[0245] 在肿瘤(例如癌性肿瘤)的情况下,治疗有效量的药物可减少癌细胞的数量;减小原发性肿瘤的大小;抑制(即在某种程度上减缓或停止)癌细胞浸润至周边器官中;抑制(即在某种程度上减慢或停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和/或在某种程度上减轻与症状有关的一种或多种症状。对于癌症疗法而言,可例如通过评价存活持续时间、疾病进展时间(TTP)、应答率(RR)、反应持续时间和/或生活质量来测量体内功效。

[0246] “减小或抑制”意指使得总体降低例如20%、50%、75%、85%、90%或95%的能力。减小或抑制可是指对以下各项之效应:所治疗病症之一种或多种症状、转移之存在或大小、原发性肿瘤之大小或血管生成病症中之血管的大小或数量。

[0247] 肿瘤可为实体肿瘤或非实体或软组织肿瘤。软组织肿瘤的实例包括白血病(例如慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、成人急性淋巴母细胞性白血病、急性骨髓性白血病、急性成熟B淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、淋巴球性白血病或毛细胞白血病)或淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、皮肤T细胞淋巴瘤或霍奇金病(Hodgkin's disease))。实体肿瘤包括除血液、骨髓或淋巴系统外的身体组织的任何癌症。实体肿瘤可进一步分成上皮细胞来源的那些以及非上皮细胞来源的那些。上皮细胞实体肿瘤的实例包括由以下项组成的组的肿瘤:胃肠道、结肠、乳房、前列腺、肺、肾、肝、胰腺、卵巢、头颈、口腔、胃、十二指肠、小肠、大肠、肛门、胆囊、唇、鼻咽、皮肤、子宫、男性生殖器、泌尿器、膀胱和皮肤。非上皮来源的实性瘤包括肉瘤、脑肿瘤和骨肿瘤。

[0248] 在一些实施例中,NLP缀合物包含结合如上文所描述的一对临床相关靶的至少两种抗原结合多肽的至少一个分子(包括例如一个或多个Fab或Fab样分子)。例如,临床相关对可包含T细胞标记物、共刺激受体或NK细胞标记物中的至少一种;以及肿瘤抗原(诸如本文所公开和/或本领域已知的肿瘤抗原中的任何一种或多种)。在一些实施例中,NLP缀合物包含(诸如进一步包含)短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,该短肽表现出与缀合物中的抗原结合多肽相同的活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,短肽与缀合物中的抗原结合多肽表现不同(例如互补或协同)活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同短肽中的每一种的至少一个分子。

[0249] 在具体实例中,NLP缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)和结合靶向CD19(肿瘤抗原)的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗急性淋巴细胞性白血病。在另一具体实例中,NLP缀合物包含结合CD3的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合EpCAM(肿瘤抗原)的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗各种来源(包括结肠、

直肠、卵巢、胃、食管、肺、胰脏、乳房和头颈)的癌症。

[0250] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合HER1、优选地人HER1的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌。

[0251] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合HER2、优选地人HER2的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗胃癌、乳腺癌和/或子宫颈癌。

[0252] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合HER3、优选地人HER3的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗胃癌和/或肺癌。

[0253] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CEA、优选地人CEA的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0254] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合p95、优选地人p95的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0255] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合BCMA、优选地人BCMA的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0256] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合MSLN、优选地人MSLN的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0257] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合MCSP、优选地人MCSP的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0258] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CD19、优选地人CD19的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0259] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CD20、优选地人CD20的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤。

[0260] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CD22、优选地人CD22的第一抗

原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤。

[0261] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CD38、优选地人CD38的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0262] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CD52F1t3、优选地人CD52F1t3的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0263] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合FolR1、优选地人FolR1的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0264] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合Trop-2、优选地人Trop-2的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质母细胞瘤和/或口腔癌。

[0265] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合CA-12-5、优选地人CA-12-5的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗卵巢癌、肺癌、乳腺癌和/或胃肠道癌。

[0266] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合HLA-DR、优选地人HLA-DR的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗胃肠道癌、白血病和/或鼻咽癌。

[0267] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合MUC-1、优选地人MUC-1的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一者的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和/或胰腺癌。

[0268] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合A33、优选地人A33之第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗结肠癌。

[0269] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合PSMA、优选地人PSMA之第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗前列腺癌。

[0270] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合PSCA、优选地人PSCA之第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中之至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0271] 特定实施例提供了本发明的NLP缀合物,其包含结合转铁蛋白受体、优选地人转铁蛋白受体之第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0272] 特定实施例提供本发明的NLP缀合物,其包含结合腱生蛋白、优选地人腱生蛋白的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中之至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗上皮、内皮或间皮来源的癌症和血液癌症。

[0273] 特定实施例提供本发明的NLP缀合物,其包含结合CA-IX、优选地人CA-IX的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及任选地结合NK细胞标记物、T细胞标记物或共刺激受体中的至少一种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),用于治疗肾癌。

[0274] 本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)、药物组合物或制剂可单独施用或与另一治疗剂或可检测的剂/标记联合施用。术语“组合”并不限制治疗方案的各组分施用受试者的顺序。举例而言,可在施用其他疗法之前、同时或之后施用药物组合物或药物。“组合”也不限制各施用之间的时间。因此,在两种组分并不同时或并行施用时,这些施用可间隔1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时或72小时或易于由本领域技术人员确定和/或本文所描述的任何适当时间差。

[0275] 其他疗法可包括一种或多种适于治疗或预防疾病或其症状的治疗方案,如本文所描述或本领域所已知。这些治疗方案的实例包括但不限于施用疼痛药物、施用化学治疗剂、手术处理疾病或其症状。用于与本发明缀合物联合施用的其他治疗剂的实例(例如在治疗恶性疾病的背景下)包括作用于胃肠道系统的药物、用作细胞抑制剂的药物、预防高尿酸血症的药物、抑制免疫反应的药物(例如皮质类固醇)、作用于循环系统的药物和/或本领域已知的药物(诸如T细胞共刺激分子或细胞因子)。

[0276] 本发明进一步构想与能够提供用于免疫效应细胞、用于细胞增殖或用于细胞刺激的活化信号的分子的共施用方案。所述分子可为例如用于T细胞的一级活化信号(例如共刺激分子:B7家族分子、Ox40L、4.1BBL、CD40L、抗CTLA-4、抗PD-1)或细胞因子白细胞介素(例如IL-2)。

[0277] b. 眼部疾病的治疗

[0278] 在某些实施例中,本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)可用于治疗受试者的眼部疾病或病症。在某些实施例中,受试者被怀疑患有特征在于异常血管生成和/或异常血管渗透性的眼部疾病或病症或处于患有该眼部疾病或病症的风险下。在某些实施例中,受试者已经诊断患有特征在于异常血管生成和/或异常血管渗透性的眼部疾病或病症。

[0279] 在一些实施例中,眼部疾病或病症是眼部血管增殖性疾病,例如选自以下项组成的组的眼部血管增殖性疾病:糖尿病性失明、视网膜病变、原发性糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性(AMD)、增殖性糖尿病性视网膜病变(PDR)、早产儿视网膜病变(ROP)、脉络膜新生血管形成(CNV)、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、逢希伯-林道综合征(von Rippel-Lindau disease)、眼组织胞浆菌病、视网膜静脉阻塞(视网膜分支静脉阻塞(BRVO))

和视网膜中央静脉阻塞 (CRVO))、角膜新血管形成、视网膜新血管形成和皮肤发红。在某些实施例中,角膜新血管形成会引起眼睛感染、眼睛发炎、眼睛创伤(包括化学烧伤)或角膜缘干细胞屏障损失。在具体实施例中,角膜新血管形成源自疱疹性角膜炎、沙眼或盘尾丝虫病。

[0280] 在特定实施例中,用于治疗眼部疾病的缀合物包含结合VEGF(优选地人VEGF)、因子D(优选地人因子D)、Tie2(优选地人Tie2)和DR4(优选地人DR4)中的至少一种的抗原结合多肽(例如Fab)。在更特定实施例中,用于治疗眼部疾病的缀合物包含结合VEGF(例如VEGF-A,优选地人VEGF-A)的抗原结合多肽(例如Fab)。在甚至更特定实施例中,用于治疗眼部疾病的缀合物包含结合VEGF(例如VEGF-A,优选地人VEGF-A)的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)和结合因子D(优选地人因子D)、Tie2(优选地人Tie2)和DR4(优选地人DR4)中的一种或多种的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在一具体实例中,该缀合物包含结合VEGF-A的第一抗原结合多肽(例如第一Fab)以及结合Ang-2的第二抗原结合多肽(例如第二Fab),其例如用于治疗糖尿病性黄斑水肿。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)至少一种结合上文所列靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中,Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中,Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

[0281] 在某些实施例中,将用于治疗眼部疾病病症的本发明缀合物与第二治疗剂联合施用。对于眼部疾病或病症是由炎症性反应触发的患者而言,可考虑使用抗发炎剂的联合疗法。对于患有继发于细菌、病毒、真菌或棘状变形虫感染的眼部疾病或病症的患者而言,联合疗法可包含施用抗微生物剂以及任选地抗发炎剂。

[0282] 在某些实施例中,将用于治疗眼部疾病病症的本发明缀合物与第二疗法联合施用,该第二疗法是诸如雷射光凝疗法(LPT)和/或光动力学疗法(PDT),其中可通过光活化使光活化分子(例如维替泊芬(verteporfin))在局部损害新生血管内皮(例如参见WO 2014/033184)。在某些实施例中,第二疗法是透热疗法和烧灼术,其中通过单极透热单元施加凝固电流或通过使用电解针热烧灼来阻塞血管。

[0283] c. 其他疾病的治疗

[0284] 本发明缀合物还可用于治疗其他例如具有以下特征的疾病:治疗益处需要使用抗原结合多肽(在一些实施例中短肽)的多聚体和/或多特异性形式,特别是稳定、高亲合力形式或由其增强,和/或待以小体积来施用高浓度的抗原结合多肽(在一些实施例中短肽),如本文所描述。

[0285] 例如,本发明缀合物可用于治疗过敏性或炎症性病症,或用于治疗自身免疫病,或用于治疗处于发生过敏性或炎症性病症或自身免疫病的风险下的受试者。

[0286] 作为接受本文所提供组合物的候选者的其他受试者患有以下疾病或处于发生这些疾病的风险下:纤维血管组织异常增殖、红斑痤疮、获得性免疫缺陷综合症、动脉阻塞、特应性角膜炎、细菌性溃疡、白塞病(Bechets disease)、血液性肿瘤、颈动脉阻塞性疾病、脉络膜新生血管形成、慢性炎症、慢性视网膜脱离、慢性葡萄膜炎、慢性玻璃体炎、隐形眼镜过戴综合症、角膜移植片排斥、角膜新生血管形成、角膜移植植物新生血管形成、克罗恩病(Crohn's disease)、伊耳斯氏病(Eales disease)、流行性角膜结膜炎、真菌性溃疡、单纯疱疹感染、带状疱疹感染、高粘滞综合征、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、白血病、脂质变

性、莱姆氏病 (Lyme's disease)、边缘性角质层分离、莫伦氏溃疡 (Mooren ulcer)、除麻疯病外的分枝杆菌 (Mycobacteria) 感染、近视、眼部新生血管疾病、视凹、奥斯勒-韦伯综合征 (Osler-Weber syndrome) (奥斯勒-韦伯-伦杜综合征 (Osler-Weber-Rendu))、骨关节炎、佩吉特氏病 (Paget's disease)、睫状体平坦部炎、类天疱疮、小水疱病、多动脉炎、激光后并发症、原生动物感染、弹性纤维假黄瘤、翼状胬肉干燥性角膜炎、放射状角膜切开术、视网膜新生血管形成、早产儿视网膜病变、晶状体后纤维增生、肉样瘤、巩膜炎、镰状细胞性贫血、干燥综合征 (Sogren's syndrome)、实体瘤、斯特格氏病 (Stargart's disease)、史蒂文约翰逊病 (Steven's Johnson disease)、上缘角膜炎、梅毒、系统性红斑狼疮、Terrien边缘变性 (Terrien's marginal degeneration)、弓形虫症、尤氏肉瘤 (Ewing sarcoma)、神经母细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、溃疡性结肠炎、静脉阻塞、维生素A缺乏症、韦格纳肉样瘤 (Wegener's sarcoidosis)、与糖尿病有关的不期望血管生成、寄生虫病、异常伤口愈合、手术后肥大、损伤或创伤 (例如急性肺损伤/ARDS)、毛发生长抑制、排卵和黄体形成抑制、植入抑制及子宫中胚胎发育抑制。

[0287] 特定实施例提供用于治疗血友病 (例如血友病A) 的本发明缀合物, 其包含结合因子IXa、优选地人因子IXa的第一抗原结合多肽 (例如Fab) 以及结合因子X的第二抗原结合多肽 (例如第二Fab)。血友病A是严重遗传性出血病症, 其中患者因促凝血辅因子蛋白质 (因子VIII) 的缺陷或功能障碍而遭受大面积出血。在一些实施例中, 本发明的双特异性缀合物与因子IXa和因子X的结合可模拟经激活因子VIII的功能的一些, 并且可用于治疗疾病。参见例如Nogami等人, New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors; Blood; 2019; 133 (5): 399-406。在一些实施例中, 该缀合物包含 (例如进一步包含) 结合上文所列示靶的短肽 (例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中, Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中, Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中, Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

#### [0288] VII. 递送方法和用途

[0289] 本发明的另一方面提供了用于递送一种或多种其他治疗剂或诊断剂的缀合物 (例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)。可以组合物形式 (例如如上文所描述的组合物形式) 来递送缀合物。在一些实施例中, 以低黏度制剂形式来提供缀合物, 从而提供高浓度的NLP-多肽结合或肽-NLP-多肽缀合物, 例如如上文所描述。在一些实施例中, 抗原结合多肽用作稳定剂以稳定包含例如短肽和/或一种或多种其他治疗剂或诊断剂的缀合物, 从而例如增加保质期和/或血清半衰期, 尤其可例如促进缀合物的冻干 (不显著损失活性) 和/或促进包含高缀合物浓度的低黏度制剂的制造, 同样例如如上文所论述。在具体实施例中, 本发明缀合物允许跨越血-脑屏障来特异性或靶向递送, 从而允许其负荷 (例如一种或多种短肽和/或一种或多种其他治疗剂或诊断剂) 接近脑或中枢神经系统中的靶, 同样例如如上文所论述。在某些实施例中, 使用本发明缀合物来递送特定治疗剂或诊断剂以及实现跨越血-脑屏障更详细地描述于下文中。

#### [0290] a. 治疗剂的递送

[0291] 在一些实施例中, 抗原结合多肽包含如上文所描述的治疗剂。在一些实施例中, 抗原结合多肽更多地用作靶向部分, 从而基于对特异性抗原的亲合力将缀合物引导至某些细胞或组织中, 并且除抗原结合多肽外, 该缀合物进一步包含一种或多种治疗剂或诊断剂 (例

如分别为生物活性剂或可检测的剂)。尽管NLP已被探索用于所选应用和药物货物(包括溶解膜蛋白(21-26)、生成蛋白质孔隙复合物(27)、疏水性药物(14,28,29)、蛋白质(14,20,30,31)、癌症新抗原(32)和免疫调节药物(17)),但本公开提供了具有令人意外的特性的含有抗原结合多肽(尤其Fab)的缀合物,这些特性包括(如本文所述)生理条件下的稳定性、良好可制造性、在不损失(或不显著损失)活性下冻干和重构的能力,以及在低粘度制剂中浓缩的能力。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,该短肽表现出与缀合物中的抗原结合多肽相同的活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,短肽与缀合物中的抗原结合多肽表现不同(例如互补或协同)活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同短肽中的每一种的至少一个分子。本段落中所引用的所有参考文献可参见下文的实例5。

[0292] 因此,在一些方面中,本发明提供以稳定和/或低黏度液体制剂形式将生物活性剂或可检测的剂递送至有需要的个体中的方法,其包含向个体施用包含进一步包含生物活性剂和/或可检测的剂的本发明缀合物的液体制剂。在一些实施例中,抗原结合多肽(例如Fab)提供本文所引述功能中的一种或多种,例如用作包含抗原结合多肽以及另一种治疗剂或诊断剂的缀合物的靶向剂和稳定剂。在一些实施例中,抗原结合多肽是Fab。在一些实施例中,抗原结合多肽是Fab样分子,即与Fab具有相似大小和/或构象形状但未必能够结合至抗原的多肽。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,该短肽表现出与缀合物中的抗原结合多肽相同的活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,短肽与缀合物中的抗原结合多肽表现不同(例如互补或协同)活性(例如结合活性和/或治疗活性)。在一些实施例中,该缀合物包含至少两种不同短肽中的每一种的至少一个分子。

[0293] 其他治疗剂或诊断剂将通过共价或非共价缔合与本文所描述的缀合物进行缔合。例如,疏水性治疗剂或诊断剂可与脂双层的非极性区域缔合,而任何亲水性部分则延伸至内部区域和外部区域中的任一个或两个。在一些实施例中,对治疗剂或诊断剂官能化以直接和/或经由药物和/或脂质上的间隔区与NLP的成膜脂质上的相同或不同经官能化的基团相互作用,例如如本文所描述(也参见例如US 2009/0311276A1、US 2019/0142752A1、US 2018/0318218A1、US 2019/0307692A1、US 2010/0092567A1及US 2011/0059549A1)。在一些实施例中,治疗剂或诊断剂可直接和/或经由间隔区(例如如本文所描述)与缀合物的抗原结合多肽(例如Fab)进行缔合。替代地或另外,该缀合物可进一步包含一个或多个结合治疗剂或诊断剂(或结合治疗剂或诊断剂的半抗原)的抗原结合多肽(例如Fab),从而允许预靶向递送。在预靶向递送中,将本发明缀合物施用于受试者,其中该缀合物包含结合肿瘤标记物(例如CEA、CD38)的抗原结合多肽以及治疗剂或诊断剂。在其中缀合物包含短肽的一些实施例中,治疗剂或诊断剂可与缀合物的短肽进行缔合。

[0294] 在特定实施例中,本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)靶向特定类型的癌症。例如,可使用包含一个或多个抗原结合多肽(例如Fab)和/或一个或多个结合(人)EpCAM(作为天然存在于肿瘤细胞表面上之肿瘤特异性抗原)的短肽的缀合物靶向胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌。可使用包含一个或多个抗原结合多肽(例如Fab)和/或一个或多个结合HER1、优选地人HER1或Trop-2、优选地人Trop-2的短肽的缀合物靶向胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞

癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌。另外,可使用包含一个或多个结合MCSP、优选地人MCSP、FOLR1、优选地人FOLR1、PSCA、优选地人PSCA、EGFRvIII、优选地人EGFRvIII或MSLN、佳地人MSLN的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质母细胞瘤和/或口腔癌。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)结合上文所列示靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中,Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中,Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

[0295] 可使用包含一个或多个结合HER2、优选地人HER2的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胃癌、乳腺癌和/或子宫颈癌。可使用包含一个或多个结合HER3、优选地人HER3的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胃癌和/或肺癌。可使用包含一个或多个结合CD20、优选地人CD20和/或CD22、优选地人CD22的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向B细胞淋巴瘤和/或T细胞淋巴瘤。可使用包含一个或多个结合CD33、优选地人CD33的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向骨髓性白血病。可使用包含一个或多个结合CA12-5、优选地人CA12-5的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向卵巢癌、肺癌、乳腺癌和/或胃肠道癌。可使用包含一个或多个结合HLA-DR、优选地人HLA-DR的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胃肠道癌、白血病和/或鼻咽癌。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)结合上文所列示靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中,Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中,Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

[0296] 可使用包含一个或多个结合MUC-1、优选地人MUC-1的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌和/或胰腺癌。可使用包含一个或多个结合A33、优选地人A33的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向结肠癌。可使用包含一个或多个结合PSMA、优选地人PSMA的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向前列腺癌。可使用包含一个或多个结合转铁蛋白受体、优选地人转铁蛋白受体的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胃肠道癌、胰腺癌、胆管细胞癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、皮肤癌和/或口腔癌。可使用包含一个或多个结合转铁蛋白受体、优选地人转铁蛋白受体的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向胰腺癌、肺癌和/或乳腺癌。可使用包含一个或多个结合CA-IX、优选地人CA-IX的抗原结合多肽(例如Fab)的缀合物靶向肾癌。在一些实施例中,该缀合物包含(例如进一步包含)结合上文所列示靶的短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中,Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中,Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

[0297] 用于递送至靶组织(例如如上文所提供)的治疗剂可为杀死或抑制肿瘤细胞的细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(Syrigos和Epenetos, Anticancer Research 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz和Springer, Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172 (1997); 美国专利第4,975,278号),而全身性施用这些药物可对正常细胞以及试图消除的肿瘤细胞产生不可接受程度的毒性。细胞毒性剂可为选自以下各项的一种或多种:道诺霉素、阿霉素、甲氨蝶呤和长春地辛、放射性核素、细菌毒素(诸如白喉毒素)、植物毒素(诸如蓖麻毒蛋白)、小分子毒素(诸如格尔德霉素)、美登素生物碱和卡奇霉素。毒素可包括通过微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制在内的机制来施加其细胞毒性和细胞生长抑制效应。

[0298] 细胞毒性或细胞抑制剂也可包括酶活性毒素及其片段,这些酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思子毒素A链、莫迪素A链、 $\alpha$ -八叠球菌、油桐蛋白(*Aleurites fordii* protein)、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(*Phytolacca americana* protein)(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、姜黄素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族毒素。例如参见WO 93/21232。可使用的放射性核素的实例包括 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、Lu放射性同位素等。

[0299] 在一具体实例中,本发明缀合物包含结合CEA的第一抗原结合多肽(例如Fab)和结合镧-111-标记的肽,例如用于预靶向递送镧-111的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在另一具体实例中,本发明缀合物包含结合CD38的第一抗原结合多肽(例如Fab)和结合 $^{90}\text{Y}$ 复合物用于预靶向递送 $^{90}\text{Y}$ 的第二抗原结合多肽(例如第二Fab)。在再一具体实例中,本发明缀合物包含结合CD22的第一抗原结合多肽(例如Fab)以及结合CD19的第二抗原结合多肽(例如第二Fab);并且进一步包含直接附接至第一和/或第二抗原结合多肽的白喉。在一些实施例中,这些缀合物包含(例如进一步包含)短肽(例如CKP或CKP变体)。在一些实施例中,Fab和短肽结合至相同靶。在一些实施例中,Fab和短肽结合至不同靶。在一些实施例中,Fab和短肽表现互补或协同的治疗活性。

[0300] 在一些实施例中,使用(例如)已知蛋白偶联剂使细胞毒性剂附接至本发明缀合物的一个或多个抗原结合多肽(或(若存在)一个或多个短肽)。蛋白偶联剂的实例包括但不限于N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate)(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(iminothiolane)(IT)、亚氨基酸酯的双功能衍生物(诸如己二酸二甲酯盐酸盐(dimethyl adipimidate HCl)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯(disuccinimidyl suberate))、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺(bis(pazidobenzoyl) hexanediamine))、双重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺(bis-(pdiazoniumbenzoyl)-ethylenediamine))、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在一个实施例中,碳-14标记的1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyl-diethylene triaminepentaacetic acid)(MX-DTPA)一种示例性螯合剂,用于将放射性核苷酸缀合至抗原结合多肽。参见例如WO 94/11026。

[0301] 在特定实施例中,细胞毒性剂选自由以下项组成的组:卡奇霉素、美登木素生物碱、海兔毒素(dolastatin)、奥里斯他汀(aurostatin)、新月毒素(trichothecene)和CC1065以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。可用于本发明缀合物中的其他抗肿瘤剂包括BCNU、链佐霉素(streptozotocin)、长春新碱(vincristine)和5-氟尿嘧啶,统称为LL-E33288复合物的药物家族(描述于美国专利第5,053,394号和第5,770,710号中)以及埃斯培拉霉素(esperamicin)(美国专利第5,877,296号)。

[0302] 在一些实施例中,治疗剂是核苷酸,例如siRNA、干扰RNA、CRISPR RNA、shRNA、适配体或核酶。

[0303] b. 诊断剂的递送

[0304] 本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)

可包含可检测的剂,该可检测的剂例如用于诊断或基础研究、用于监测疾病进展和/或治疗剂效能、用于鉴别某些患者亚群体(例如更可能对治疗剂具有反应的患者)等。

[0305] 可检测的剂是一种标记,其可目测或另外检测为定位于已递送药物的细胞或组织处(通常经由从该标记发出的信号)。信号可为例如放射性、荧光、化学发光、在酶促反应中最终产生化合物等。用于本发明缀合物的可检测的剂的实例包括但不限于放射性同位素、荧光团、化学发光染料、发色团、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、染料、金属离子、纳米颗粒、金属溶胶、配体(诸如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白(streptavidin)或半抗原)等。在一些实施例中,使用放射性原子作为例如用于闪烁研究的可检测的剂。放射性原子的实例包括例如 $^{99m}\text{Tc}$ 或 $^{123}\text{I}$ 。在一些实施例中,使用自旋标记作为诸如用于核磁共振(NMR)成像或磁共振成像(MRI)的可检测的剂,其实例包括碘-123(再次)、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0306] 在一些实施例中,可检测的剂是荧光团。术语“荧光团”是指能够在可检测影像中表现荧光的物质或其部分。例如,在一些实施例中,膜脂质可经荧光标记,诸如(1-油酰基-2-[12-[(7-硝基-2-1,3-苯并恶二唑-4-基)氨基]十二烷基]-sn-甘油-3-磷酸胆碱)(1-Oleoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-Glycerol-3-Phosphocholine)。本领域技术人员应认识到,在此类实施例中,可通过用于组装NLP缀合物的荧光标记的脂质的量来增强来自可检测的剂的信号。

[0307] 可如上文所描述或以本领域已知的其他方式将可检测的剂并入缀合物中。例如,可通过化学氨基酸合成使用包含例如氟-19以代替氢的氨基酸前体来生物合成或合成抗原结合多肽(例如Fab)。可检测药物(例如 $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 和 $^{111}\text{In}$ )可经由肽中的半胱氨酸残基进行附接。钇-90可经由赖氨酸残基进行附接。可使用IODOGEN法(Fraker等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978))来并入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal, CRC Press 1989)详细描述了其他方法。另外或替代地,可对短肽作出此类修饰,其中该缀合物包含短肽。

[0308] c. 跨越血-脑屏障的递送

[0309] 本发明的另一方面涉及将生物活性剂或可检测的剂递送至脑或中枢神经系统中,以(例如治疗神经学疾病)的方法。靶向脑和CNS的治疗方式面临特殊挑战,特别是调控分子输送并且可阻止药物到达脑实质的血-脑屏障(BBB)。因此,药物穿越BBB的能力在脑疾病的药理学治疗中至关重要(Dal Margo等人,“Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting” Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 14 (2018) 429-438)。

[0310] 在一些实施例中,本发明提供了用于将生物活性剂或可检测的剂递送至脑或中枢神经系统中的缀合物、药物组合物、制剂、方法、系统和试剂盒。通常,通过例如静脉内途径将本发明缀合物全身性施用于个体,从而允许缀合物循环并且最终穿越通过BBB。例如,可使用液体制剂,其包含药学上可接受的载体以及抗原结合多肽(例如Fab或Fab样分子)、纳米脂蛋白颗粒和生物活性剂或可检测的剂的缀合物。在一些实施例中,该缀合物进一步包含短肽(例如CKP或CKP变体)。可通过静脉内注射或其他适当全身性或局部途径来施用制剂。

[0311] 对于脑/CNS递送而言,缀合物的纳米脂蛋白包含允许缀合物跨越BBB的支架蛋白

质。在一些实施例中,支架蛋白质是载脂蛋白,特别是apoE4、apoE2、任一种的截短版本或apoE2、apoE2截短版本、apoE4和apoE4截短版本中的一种或多种的组合。例如,ApoE已显示在递送纳米颗粒结合药物跨越BBB时发挥突出作用(Dal Margo等人,“Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting”*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14 (2018) 429-438)。在一些实施例中,药物组合物进一步包含表面活性剂,例如聚山梨醇酯80。与在未结合至本发明缀合物时(例如在未与NLP-Fab缀合物或NLP-Fab-短肽缀合物缔合/共价结合时)的情况相比,这些缀合物可增加跨越BBB易位并增加(例如显著增加)生物活性剂或可检测的剂至脑或中枢神经系统的递送。

[0312] 可根据本发明治疗的神经学疾病包括中枢和周边神经系统的任何疾病。非限制性实例包括脑、脊髓、颅神经、周边神经、神经根、自主神经系统、神经肌肉接头和肌肉的疾病。在特定实施例中,本发明缀合物可用于治疗脑及中枢神经系统的神经学疾病。在具体实例中,本发明缀合物可用于治疗例如阿尔茨海默病(Alzheimer disease)、其他失智症、脑肿瘤、脑血管疾病、癫痫、偏头痛、其他头痛病症、多发性硬化、神经感染、由营养不良导致的神经学病症、帕金森氏病(Parkinson's disease)、中风、由头部创伤所致的创伤性神经系统病症等。

#### [0313] VIII. 系统和试剂盒

[0314] 本发明的另一方面涉及系统和/或试剂盒,诸如经设计以有利于实施本文所描述的过程或使用方法中的一种或多种的系统和试剂盒。通常,该系统或试剂盒包含本发明的缀合物(例如肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物)、药物组合物或制剂和/或相关组分,其中这些缀合物、组合物和组分提供于不同腔室或容器中。适当容器包括例如瓶、小瓶(例如双室小瓶)、注射器(诸如双室注射器)和测试管。容器可由各种材料(诸如玻璃或塑料)形成。腔室是指容器内例如用以使既定容器内的不同组分保持分开的分区,并且可与容器包含相同或不同材料。

[0315] 在一些实施例中,成膜脂质、支架蛋白质、抗原结合多肽(例如Fab)并且在一些实施例中,结合肽的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基提供于试剂盒的一个或多个不同腔室或容器中,并随附用于制备本发明缀合物的说明书。说明书可包括于包装插页中。包装插页也可含有关于本发明的缀合物例如用于治疗、防治或诊断应用的适应症、用途、剂量、施用、联合疗法、禁忌和/或警告的信息。

[0316] 在一些实施例中,NLP和抗原结合多肽(例如Fab)并且(在一些实施例中)肽缀合的C<sub>4-28</sub>脂肪酰基提供于试剂盒的单独腔室或容器中。在一些实施例中,该试剂盒在试剂盒的单独腔室或容器中提供用于制备如本文所描述药物组合物的肽-NLP缀合物、肽-NLP-多肽缀合物和/或NLP-多肽缀合物以及药学上可接受的载剂。例如,试剂盒可包括用于制备例如用于经皮下或经眼部递送低体积、高浓度缀合物的低黏度缀合物制剂的说明书。在一些实施例中,该缀合物进一步包含另一治疗剂或可检测的剂(标记),或试剂盒在一或多个其他腔室或容器中提供其他治疗剂和/或可检测的剂(标记),任选地提供关于使用缀合物的说明书。

[0317] 在一些实施例中,在试剂盒中提供呈冻干制剂形式的本发明缀合物,任选地包括关于材料重构和/或使用的说明书。例如,容器可容纳冻干制剂并且在容器上具有或连有指

示重构和/或使用说明的标记。标记可指示,将冻干制剂重构至如上文所描述的缀合物浓度。标记可进一步指示,制剂可用或意欲用于皮下或眼部施用。容纳制剂的容器可为多次使用性小瓶,其允许重复施用(例如2-6次施用)重构制剂。试剂盒可进一步包含含有适当稀释剂(例如BWFI)的第二容器或腔室。试剂盒可进一步包括自商业和使用角度考虑期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及带有使用说明书的包装插页。

[0318] IX. 增加附接至纳米颗粒表面的短肽的生物活性的方法。

[0319] 本文也提供增加附接至基于脂质的纳米颗粒的表面的短肽(例如长度在20-60个氨基酸之间的肽)的活性(例如生物活性)的方法。在一些实施例中,该方法包括提供基于脂质的纳米颗粒,该基于脂质的纳米颗粒包含附接(例如共价附接)至纳米颗粒的表面的短肽,其中纳米颗粒的一种或多种脂质呈现经官能化的基团;并且允许纳米颗粒与具有官能团的多肽(例如Fab)在有益于缀合所述经官能化的基团与所述官能团的条件下接触。在一些实施例中,该方法进一步包含纯化包含基于脂质的纳米颗粒、短肽和多肽的缀合物。在一些实施例中,纳米颗粒是脂质体。在一些实施例中,纳米颗粒包含脂双层。在一些实施例中,基于脂质的纳米颗粒是固体脂质纳米颗粒(SLN)。在一些实施例中,基于脂质的纳米颗粒是纳米结构化脂质载体(NLC)。在一些实施例中,间隔区连接所述经官能化的基团与基于脂质的纳米颗粒的表面上的脂质。在一些实施例中,间隔区连接所述互补官能团与所述多肽。用于缀合多肽与脂质的示例性经官能化的基团和互补官能团详细描述于本文其他地方。在一些实施例中,该多肽是抗原结合多肽。用于缀合至包含脂双层的脂质体或纳米颗粒中的脂质的示例性抗原结合多肽详细描述于本文其他地方。在一些实施例中,肽是CKP。在一些实施例中,该肽为CKP变体。在一些实施例中,与不含多肽的基于脂质的纳米颗粒上的短肽的活性(例如生物活性)相比,使多肽缀合至纳米颗粒会将短肽的活性(例如生物活性)增加约2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、20-、50-、100-或150倍中的任一者。

[0320] 本文所公开的例如所有参考文献、出版物和专利申请案中的每一者的全部内容皆以引用方式并入本文中。

[0321] 实例

[0322] 以下为本发明的方法和组合物的实例。应当理解,鉴于上文给出的一般描述,可以实施各种其他实施例。

[0323] 实例1:NLP-Fab缀合物的产生

[0324] 材料

[0325] 从Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 购买1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC) 和DOPE-MCC。从Thermo Fisher (Carlsbad, CA) 获得人血清、Alexa Fluor 488NHS酯(AF488)。所有其他试剂均是从Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 订购。

[0326] apoE422k和Fab的蛋白质表现和纯化

[0327] 在大肠杆菌(E.coli) 细胞中于摇瓶条件下使用确立的表达质体喝方法来产生ApoE422k。在收获后,粉碎细胞,旋转并收集上清液。在Ni-NTA管柱(XK16/20 3ml) 上纯化ApoE422k,随后在SEC(Superdex 75 16/60) 上纯化。对于Ni-NTA纯化而言,洗涤管柱并在50mM磷酸盐缓冲液、200mM NaCl、10mM咪唑(pH 8)(缓冲液A) 中结合蛋白质。使用缓冲液A+0.2%Triton X114+0.2%Triton X100深度洗涤蛋白质(20管柱体积) 并使用50mM磷酸盐缓冲液、200mM NaCl、400mM咪唑(pH 8) 洗脱。过滤合并部分并使用3kDa分子量截止旋转浓缩

器浓缩。然后经由烟草蚀纹病毒包-核内肽酶 (TEV蛋白酶) 消解来去除His标签 (将TEV标签添加于His标签与蛋白质序列之间的N端上)。以100:1的蛋白质重量对TEV重量比将TEV蛋白酶添加至纯化的蛋白质中。通过使反应混合物通过Ni-NTA管柱 (XK 16/20 3ml) 从含有His标签的TEV蛋白酶来纯化裂解的蛋白质。浓缩所合并蛋白质并运行于SEC (Superdex 75 16/60) 上的PBS中。收集SEC馏分并使用质谱分析属性, 并且通过粒径筛析层析 (SEC) 分析聚集。合并具有正确分子量 (MW) 并且聚集物含量<5%的馏分并且通过280下的吸光度测定蛋白质浓度。

[0328] 在此实验中, 设计具有C端半胱氨酸的Fab构建体 (简称为Fab) 以使得能够位点特异性地缀合至NLP。使用对不相关胞质抗原 (cMET) 具有特异性的物种匹配性非靶向兔Fab来进行实验以评估Fab缀合和缀合对Fab-NLP稳定性的效应。如先前描述来表达和纯化兔Fab。使用如先前描述进行纯化的人抗OX40 Fab和人抗因子D (AFD) Fab来进行实验以评估缀合至NLP平台后的Fab活性。使用20mM DTT将所有经纯化的Fab去半胱氨酸化以还原半胱氨酸缀合物并使用6.5mM谷胱甘肽 (GSH) 再氧化。然后对样本实施缓冲液交换并在200mM精氨酸琥珀酸盐 (pH 5) 中洗涤并储存以限制进一步的半胱氨酸化。

#### [0329] NLP组装

[0330] 根据先前所报告程序来组装NLP。对于所有NLP组装而言, 总脂质对apoE422k的摩尔比为80:1, 先前已显示此比率可产生相对均质的NLP群体。使用如结果章节中所描述的DOPC和DOPE-MCC脂质的组合来组装NLP。在氯仿中制备或获得这些脂质并等分至玻璃小瓶中。然后使用N2流在搅动下去除氯仿以形成薄脂质膜。将脂质溶于PBS缓冲液 (137mM氯化钠、2.7mM氯化钾、10mM磷酸盐缓冲液, pH 7.4) 或50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.0, 150mM NaCl并且使用80mM胆酸钠)。在添加apoE422k (在最终组装体积中150 $\mu$ M) 之后, 将样本在22 $^{\circ}$ C下培育至少1小时。为去除胆酸盐, 将样本与洗涤剂去除生物珠粒 (Sigma-Aldrich) 在振荡下于500 $\mu$ L costar 0.22旋转过滤器中一起培育2h。在振荡两小时之后, 将样品在200g下离心5min并收集含有NLP的滤液。通过SEC使用AKTA Avant系统和S200 10/300Increase柱来纯化随后不用于Fab结合的样品。与之相比, 在此阶段并不纯化用于结合至Fab的样品, 而是立即如下文所描述进行结合。

#### [0331] Fab-NLP结合和纯化

[0332] 在上述透析步骤之后, 测定含有DOPE-MCC的NLP中的apoE422k浓度且将NLP与Fab在50mM磷酸钠缓冲液 (pH 6.0)、150mM NaCl中以介于0-60之间的Fab:NLP摩尔比一起孵育。在NLP组装的同一天进行结合以限制马来酰亚胺的水解。将样品置于振荡器并孵育2-4小时。在2-4小时反应孵育期之后, 在较DOPE-MCC 2倍摩尔过量下添加n-乙酰基半胱氨酸 (NAC) 以淬灭任何未反应马来酰亚胺。使用AKTA Avant系统和S20010/300Increase柱来纯化所得Fab-NLP缀合物。通过SEC-MALS如下文所描述来分析Fab-NLP峰中的每一级分, 且基于MW及流体动力学半径 ( $R_h$ ) 分析来汇集级分以产生均质Fab-NLP样品。

#### [0333] 实例1的结果和论述

#### [0334] 优化Fab-NLP缀合物条件

[0335] 此研究确立了利用NLP作为Fab递送载体的适宜性。图1A示出了用于生成Fab-NLP缀合物的研发策略的示意性概述。概括地说, 此方式涉及通过结合双层形成脂质 (辅助脂质) 及官能化脂质 (具有官能化头部基团的脂质) 与含有正交反应基团的Fab分子来组装

NLP。在这些实验中,选择DOPC作为辅助脂质,因为它以前显示出可相对于含有DMPC的NLP形成较稳定颗粒(20)。

[0336] 在选择用于结合Fab与NLP的合适的官能化脂质时的一个重要考虑因素在于,应选择化学选择性反应对以与避免与存在于apoE422k支架蛋白质上的天然官能团(例如氨基和羧基)发生反应。因apoE422k蛋白质不含半胱氨酸(硫醇反应性基团),故选择采用含有马来酰亚胺头部基团的脂质DOPE-MCC的硫醇-马来酰亚胺化学进行Fab结合。通过保留Cys-227(通常涉及全长IgG中的链间铰链二硫键的残基)作为Fab C端残基(在实例中简称为Fab)来实现位点特异性Fab结合。所得Fab含有具有游离、反应性硫醇的这种未配对Cys(48)。此策略容许通过使用马来酰亚胺反应性基团修饰NLP表面且随后位点特异性地结合至硫醇反应性Fab来组装NLP(图1A)。

[0337] 实例2:NLP-Fab缀合物的分析

[0338] NLP和Fab-NLP缀合物的SEC-MALS/QELS分析

[0339] 使用Acclaim SEC-1000分析型SEC柱(Thermo Fisher Scientific)测定MW和 $R_h$ ,该柱使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)的等度梯度(其中额外掺加150mM NaCl)且偶联至多角度光散射系统(MALS)(Wyatt Instruments)。另外,使用准弹性光散射(QELS)测量扩散系数(D),其中使用单光子计数模块(在99.0°角度下检测)捕获散射激光的强度波动。假设为球形形状,使用斯托克斯-爱因斯坦关系(Stokes-Einstein relationship)自D计算 $R_h$ 。

[0340] NLP和Fab-NLP缀合物的LCMS分析

[0341] 使用Agilent 6230ESI-TOF LC/MS对NLP和NLP-Fab缀合物进行LCMS分析。使用加热至80℃的Kinetex 2.6μm XB-C18柱(Phenomenex)分析所注射NLP样品。溶剂运行为自30%甲醇和70%水的混合物至100%2-丙醇的梯度。所有溶剂都具有0.05%三氟乙酸。仅注射ApoE422k和Fab以提供基线质量。

[0342] NLP、Fab-NLP和Fab载量的HPLC分析

[0343] 使用HPLC分析和280nm下吸光度的组合分析Fab-NLP缀合物中的ApoE422k和Fab浓度。在Agilent 1290Infinity Bio-inert HPLC上使用与上文在LCMS分析中所描述相同的柱和梯度来测定apoE422k浓度。NLP-Fab缀合物的样品A280 HPLC色谱图如图7A所示。观察到两个对应于apoE422k(4.95min)和结合至DOPE-MCC的Fab(约5.15min)的峰。基于通过注入1-8μg apoE422k且积分曲线下面积所生成的标准曲线来确定apoE422k的浓度(图7B)。考虑到关于生成Fab-DOPE-MCC试剂的挑战(其主要是由脂质和蛋白质的不兼容溶解性所致),使用apoE422k浓度和A280总吸光度且使用下列方程式,而非使用HPLC标准曲线,来量化Fab-DOPE-MCC缀合物:

[0344]  $[Fab] = (Abs_{280} - [apoE422k] \cdot \epsilon_{apoE422k}) / \epsilon_{Fab}$

[0345] 其中[Fab]、Abs280、[apoE422k]、 $\epsilon_{apoE422k}$ 和 $\epsilon_{Fab}$ 分别是Fab浓度、280nm下吸光度、通过HPLC分析测得的apoE422k浓度、apoE422k的消光系数和Fab的消光系数。

[0346] 实例2的结果和论述

[0347] Fab-NLP结合条件的进一步优化

[0348] 为评估掺入马来酰亚胺-硫醇反应性的影响,评价DOPE-MCC对NLP组装的影响。在多种DOPE-MCC浓度(0、10、20和30mol%)下于pH7.4PBS中组装NLP并通过SEC-MALS/QELS进行分析(图1B和8A)。跨越不同DOPE-MCC浓度的所得SEC色谱图(图8A)以及所测量的MW和 $R_h$

(图1B;黑点代表MW,灰色正方形代表 $R_h$ )都产生几乎相同的结果,从而指示功能性脂质对整体NLP形状和大小并不具有显著影响。然而,进一步的LCMS分析揭示了未由初始分析捕获的产物复杂性(图1C-1D)。针对单独apoE422k在约4.9min的洗脱时间下观察到TIC单峰(图1C,圆)且解卷积质量(约22kDa)(图1D,圆)与apoE422k的预计质量一致,但针对组装于pH 7.4PBS中的NLP未观察到明显apoE422k峰。替代地,在所有MCC浓度(数据未展示)下都存在滞留时间介于4.8-6.5min之间的多个TIC峰(图1C,平线),其中在解卷积后于约23kDa、24kDa和25kDa下观察到三个主峰的模式(图1D,平线)。

[0349] 有趣的是,这些质量增加对应于DOPE-MCC脂质的MW(960kDa),从而表明在pH 7.4下于PBS缓冲液中的组装和纯化过程期间,DOPE-MCC结合至apoE422k支架蛋白质并使其脂质化且23kDa、24kDa和25kDa分别对应于结合至1、2和3个脂质的apoE422k。尽管马来酰亚胺对硫醇的反应性在介于6.5-7.5之间的pH值下具有高度特异性,但已有报道称在碱性pH值下与蛋白质上的氨基的反应性(50)。高浓度的紧邻经暴露赖氨酸残基的马来酰亚胺以及在此步骤处不存在巯基增加了发生此副反应的机会,如先前已观察到的(51)。为接近此倾向,在pH 6.0下进行反应。这些条件对于马来酰亚胺-硫醇化学而言并非最佳且需要延伸Fab结合的反应时间,但减小了未质子化、亲核胺的可能性。在pH 6.0下组装也有助于最小化马来酰亚胺水解,马来酰亚胺水可较迅速地发生于较高pH值下且产生不可逆和非反应性的马来酸(52)。因此,使用20mol%DOPE-MCC在50mM磷酸钠缓冲液、150mM NaCl中于pH 6.0下组装NLP并在SEC纯化后通过LCMS进行分析。使用这些组装条件,仅观察到LC色谱图中的单峰(图1C,三角形)且将此峰解卷积至apoE422k的预期质量(约22kDa)(图1D,三角形)。这些综合发现强烈表明,DOPE-MCC脂质结合至apoE422k上的经暴露的赖氨酸。

[0350] 有趣的是,在检测到显著apoE422k-DOPE-MCC结合的任一组装中都不存在聚集(图8A),从而表明交联可为颗粒内事件而非颗粒间事件。为进一步评价apoE422k-DOPE-MCC结合对NLP聚集的效应,在pH 7.4和6.0下制备具有相同组合物(20mol%DOPE-MCC)的NLP并通过SEC-MALS进行分析。与先前观察一致,两种样品的MW和 $R_h$ 相同(图8B),尽管在pH 7.4下制得的样品发生深度apoE422k脂质化。这些数据进一步证实,DOPE-MCC:apoE422k结合不产生颗粒间交联,而是产生颗粒内交联。

[0351] 可假设,驻留于支架蛋白质与脂质核心的界面上的赖氨酸残基的pKa发生改变,从而使其在pH 7.4下去质子化且能够与毗邻马来酰亚胺进行反应。在apoE422k蛋白质中的8个赖氨酸中,7个位于包围脂双层的螺旋结构域上(53)且易于接近脂双层中的DOPE-MCC。另外,先前已报道赖氨酸侧链pKa在疏水性环境中的降低,其中赖氨酸残基包埋在蛋白质和DOPC双层中(54,55)。在这些研究中,水不可及性赖氨酸残基显示低于正常 $pK_a \geq 10$ 的pKa值,且分别低至5.2和6。仅面向NLP脂双层的赖氨酸残基的pKa值的选择性降低可将未观察到分子间聚集物阐释为,其亲核性胺可能不能与附近NLP上的头部基团相互作用。DOPE-MCC对apoE422K的脂质化的检测强调使用高级分析技术(例如LCMS)来评估新治疗递送平台的重要性。工艺相关杂质的早期检测和平台问题的鉴别有利于成功研发新颖平台技术。尚未使用传统分析型SEC方法检测到此交联事件,且尽管尚未明了此副产物是否使稳定性或活性产生显著差异,但可变性不可控制且可另外引起制造困难。

[0352] Fab-NLP缀合物纯化和Fab载量

[0353] 在确立组装条件后,在极少DOPE-MCC:apoE422k交联和相对均质的NLP群体的情形

下,进一步优化Fab-NLP结合方法。使用对不相关胞质靶(cMET)具有特异性的兔Fab分子作为这些实验的代用试剂。使用依序NLP组装和结合步骤来产生Fab-NLP缀合物并纯化,其中Fab添加直接发生于自NLP去除基于生物珠粒的胆酸盐之后,且并无NLP纯化步骤。选择此方案以最小化结合之前的马来酰亚胺水解可能。基于报道介于20-35mol%之间的功能性脂质组合物的最大结合效率的先前研究,选择20mol%DOPE-MCC以供放大(31)。最初在Fab:NLP摩尔反应比率为20下研发纯化方案。将Fab与NLP一起孵育2-3小时且以2倍于DOPE-MCC的摩尔浓度添加NAC以淬灭未反应马来酰亚胺且防止DOPE-MCC:apoE422k交联。

[0354] 然后在S200 SEC柱上纯化Fab-NLP且在SEC曲线中观察到三个主峰;NLP-Fab缀合物( $r_t \sim 10\text{min}$ ),Fab二聚体( $r_t \sim 14\text{min}$ ),未结合Fab( $r_t \sim 16\text{min}$ ) (图2A)。Fab二聚体的出现是通过在结合步骤期间经由在Fab的C端硫醇处成二硫化物形而发生二聚化所引起。有趣的是,起始材料不含任何Fab二聚体(数据未显示),因此此现象似乎发生于结合步骤期间且在其他Fab中没有持续观察到,从而表明可存在诱导此现象的独特性质(局部PI)。然而,仍能证实Fab与NLP的成功结合。

[0355] 通过SEC-MALS对NLP峰的深度分析指导了汇集策略(图2A插页)。一般而言,NLP峰相对较为对称且该峰中的 $R_h$ 值仅略有变化,其中最大变化(12.9-10.5nm)位于峰前端(9-9.5min滞留时间)且最小变化(10.3-9.6nm)位于峰的中间和末端(9.5-10.25min滞留时间)(图2A插页)。因此,为生成最均质的NLP-Fab制剂,汇集9.5-10.25min之间的样品级分并进行LCMS分析。单独Fab的LCMS分析在TIC色谱图中产生单峰且滞留时间为约5.4min(图2B,圆)。此峰的解卷积质量为约45.7kDa,此对应于Fab的预期质量。在此滞留时间内在NLP-Fab缀合物池的TIC色谱图中观察到两个峰(图2B,三角形),其中这些峰的解卷积质量对应于DOPE-MCC:Fab缀合物(约46.7kDa)和apoE422k(图2C,三角形)。总而言之,这些结果表明,Fab经由DOPE-MCC脂质成功地结合至NLP。

[0356] 为进一步探究NLP平台的Fab承载能力,使NLP与递增浓度的Fab结合且在纯化步骤后测量Fab数量/NLP,如材料和方法中所描述。在这些实验中,Fab反应浓度自0-270 $\mu\text{M}$ 变化,此对应于0-50Fab/NLP。如图3A中所展示,随着Fab浓度增加至216 $\mu\text{M}$ 的饱和值,NLP峰逐渐增加。在最高216 $\mu\text{M}$ 的饱和点时也观察到Fab二聚体和未结合Fab峰的逐渐增加,随后在较高浓度(270 $\mu\text{M}$ )下显著增加,从而指示NLP结合已经饱和且所添加超过216 $\mu\text{M}$ 的所有其他试剂都不结合至NLP。

[0357] 如上文所描述来量化在每一条件下结合的Fab量(图3B)。在较低Fab浓度(0-200 $\mu\text{M}$ )下,观察到Fab载量在0-30Fab/NLP内的线性增加。然而,此趋势在较高Fab浓度(>200 $\mu\text{M}$ )下趋于平缓且不能在NLP上加载超出约30Fab/NLP的额外Fab。基于公开的晶体结构,典型Fab的横截面直径为约4nm(56),此对应于约12.6nm<sup>2</sup>的表面积,而基于SEC-QELS分析,NLP的 $R_h$ 测定为约7.5nm,此对应于350nm<sup>2</sup>的总结合表面积,从而得到约30Fab/NLP。此最大承载能力证实了结果且与考虑Fab和NLP结合表面的尺寸时的理论最大承载能力一致。

[0358] 为进一步表征Fab载量对NLP结构的影响,随Fab载量变化测量Fab-NLP缀合物的MW和 $R_h$ 。基于跨越Fab-NLP缀合物峰的MALS分析,Fab-NLP缀合物的MW在较高Fab载量下有所增加,其中MW自0Fab载量下的约225kDa增加至Fab:NLP比率为30时的约900kDa(图3C)。有趣的是,此MW增加暗示承载能力低于HPLC分析约16Fab/NLP。此偏差可源于Fab-NLP缀合物相对于游离Fab的dn/dc值变化,该变化可影响计算。考虑到HPLC方法是apoE422k和Fab浓度的独

立测量,可认为这些值较准确地反映了Fab载量。

[0359] 尽管具有此偏差,但MALS分析明确指示,如所预计,MW随Fab载量线性增加。与MW分析不同, $R_h$ 并不随Fab载量增加显著改变(图3D)。这些结果与NLP的盘形性质一致且指示NLP表面积是控制Fab化合价的主导因素。此现象已观察于其中球状蛋白结合至NLP的两个先前研究中(20,31)。在两个实例中,使加His标签的蛋白质附接至含有镍螯合脂质的NLP,且所达成的最大载量数与基于蛋白质大小和NLP表面积的理论结合能力一致。值得注意的是, $R_h$ 分析假设具有球形形状,此对于这些假定盘形纳米颗粒不可能完全准确。然而,先前已报道,溶液中的NLP形状是动态的且NLP可采用除静态盘形形状外,更能反映球型颗粒的各种不同构象(57);因此,合理确信上述MALS分析。

[0360] 实例3:NLP-Fab缀合物的可制造性

[0361] Fab-NLP缀合物的流变性分析

[0362] 使用Anton Paar Physica MCR 501旋转流变仪利用CP20-0.5°锥和板配置来测量粘度。CP20-0.5几何结构具有20-mm的直径及0.5°的角度。在25°C下使用流变仪温度控制器(具有来自水浴的循环流体的帕尔贴板(Peltier plate))来进行测量。将大约20μL的每种样品加载于底板上以供测量,然后将椎体缓慢降至期望的间隙宽度。所测量扭矩决定剪切应力,自该剪切应力计算粘度,如先前所描述。

[0363] NLP和Fab-NLP缀合物的冻干

[0364] 使用80mM海藻糖作为赋形剂来冻干Fab-NLP缀合物。此是用于蛋白质和脂质体制剂的常用赋形剂。在这些实验中,在PBS中纯化Fab-NLP缀合物。添加海藻糖直至最终浓度为80mM。冷冻前的Fab-NLP蛋白质浓度为2mg/ml。通过在干冰上孵育60min来冷冻300μL Fab-NLP样品。然后将样品在Labconco冻干器上冻干过夜。在完成冻干之后,在水中重构样品并通过SEC分析。

[0365] 实例3的结果和论述

[0366] Fab-NLP制剂

[0367] 关于生产纳米颗粒-蛋白质缀合物的已知挑战是制造期间的调配。特定是,蛋白质浓度与粘度之间的关系可显著影响药物制造的关键参数。在因体积限制而需要高浓度药物或蛋白质制剂(例如使用注射体积分别限在100μl (58) 和1-2ml (59,60) 的眼部递送和皮下施用)时,这变得尤其重要。在高蛋白质浓度下,蛋白质-蛋白质相互作用可导致粘度增加,因排除体积的增加,其他结合部分的存在可加剧这种情况(61)。因此,为评价基于NLP的递送对粘度的效应,在裸Fab、Fab-NLP缀合物和Fab-PEG缀合物之间比较Fab浓度与粘度之间的关系(47)(图4A)。使用生物活性人抗因子DFab进行这些实验以改良可翻译性。为允许更好地直接比较Fab化合价,选择市售PEG支架,其中该支架具有8个含有马来酰亚胺反应性末端的PEG臂以允许结合8个Fab/PEG。生成和表征8臂PEG缀合物的细节已描述于别处(47)。对于Fab-NLP缀合物而言,Fab载量为约30Fab/NLP,选择该载量以最大化NLP上的Fab密度。

[0368] 在这些实验中,在整个所测试浓度范围中,单独Fab的粘度保持相对恒定(图4A,圆)。与之相比,在Fab浓度达到80-100mg/ml之间时,Fab-PEG缀合物的粘度特征突然增加至约1000cP(图4A,三角形)。尽管针对Fab-NLP缀合物观察到类似特征,但粘度发生指数性增加的Fab浓度极高(>300mg/ml)(图4A,正方形)。这些结果指示,相对于较传统的基于PEG的方式,可使用NLP平台实现极高Fab制剂浓度。在NLP制剂中Fab仅构成整体药品的约30%(质

量),而Fab-PEG缀合物中的Fab含量为约90%(质量),这些发现令人意外。这种观察现象的一种可能原因在于Fab在NLP表面上的排序。因高蛋白质浓度下的粘度是通过分子内蛋白质相互作用和蛋白质的包装能力驱动的,故似乎可能的是,高密度Fab与NLP表面的结合可诱导在PEG八聚体形式中不能实现的排序。

[0369] 除与高浓度制剂兼容外,Fab-NLP缀合物也在冻干后显示出稳定的行为。在这些实验中,在约18Fab/NLP的Fab载量下生成Fab-NLP缀合物,在80mM海藻糖存在于下于5mg/ml的浓度下冻干并通过SEC-MALS分析。选择海藻糖作为赋形剂,此乃因其已广泛用于冻干脂质体以及红细胞(62,63)。如图4B中所展示,冻干前后的MW和 $R_h$ 展现较小的变化,从而证实了Fab-NLP缀合物高度稳定的观点。因与建立的制造工艺兼容,故除延长的保质期外,冻干稳定性也是期望制剂属性(64)。这些结果与海藻糖是用于基于脂质的纳米颗粒制剂的极佳赋形剂的先前报道一致,且证实Fab-NLP缀合物可与需要基于冻干的制剂的制造工艺兼容。

[0370] 实例4:NLP-Fab缀合物的活性

[0371] 抗因子D Fab阻断活性分析

[0372] 使用如先前所描述的因子B裂解TR-FRET分析来测定Fab-NLP缀合物的活性(47,49)。考虑到Fab抑制因子D的预期1:1化学计量学,使用Fab MW代替多聚体MW来计算缀合物摩尔浓度。

[0373] 抗OX40 Fab激动剂活性分析

[0374] 如先前描述来进行OX40激动剂分析(45)。简言之,将经NF $\kappa$ B荧光素酶报告基因改造的过度表达OX40的Jurkat细胞以80,000个细胞/孔接种在384-孔组织培养板(Corning Inc.,目录号:3985BC)中的20 $\mu$ l含有10%FBS的RPMI 1640培养基中。以4X浓度将抗OX40形式连续稀释于培养基中且将10 $\mu$ l经浓缩抗体添加至每个孔中。使所有孔体积都达到40 $\mu$ l并在37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下在CO $_2$ 孵育器中孵育16-18h。然后将40 $\mu$ l Bright Glo(Promega目录号:E2610)添加至每个孔中并在振荡并在室温下孵育10min。使用Perkin Elmer Envision读板器检测发光。

[0375] 实例4的结果和论述

[0376] Fab-NLP缀合物的抑制和激发活性

[0377] 在一些情况下,蛋白质至纳米颗粒的结合和固定可负面地影响蛋白质活性(65,66)。这些负效应可归因于各种不同因素,包括但不限于结合时的构象变化、失去活动自由和蛋白质变形。对于Fab-NLP结合而言,我们旨在通过以下方式来缓解这些问题:使用位点特异性化学防止以随机定向进行结合,并将结合手柄置于Fab活性区(重链和轻链的可变结构域)的相对端(重链的C端区域)。然而,这不能保证,Fab与NLP的结合对活性并无任何影响。因此,为评价Fab结合的效应,使用补体因子D-依赖性因子B裂解的时间解析荧光能量转移(TR-FRET)分析来测量抗因子D Fab的抑制活性。最大TR-FRET信号出现于因子B在不存在因子D活性下保持完整时。在此分析中,通过单独抗因子D Fab、Fab-NLP缀合物及冻干并重构的Fab-NLP缀合物来测量因子D抑制(图5A)。在所有三种试剂中未观察到抑制活性的显著差异,从而证实结合和冻干并不损失抑制。这些发现指示,一般而言,经由C端半胱氨酸标签来结合Fab并不显著影响重链和轻链的CDR区的活性。

[0378] 除评估结合对Fab的抑制活性的效应外,也评价使用此平台经由较高化合价来增强激动剂Fab活性的可能。若干在临床上有价值的激动剂路径(包括TNF家族成员)需要超过

2的化合价方达成强效活性(41, 42)。mAb领域已试图使用各种工程策略来解决此限制性, 这些工程策略包括研发三体抗体、四体抗体、五体抗体以及自组装六聚体IgG1 (43-45)。然而, 已报道, 这些工程策略会负面地影响PK且难以达成超过3-6的化合价(43), 此可能不足以激发/拮抗所感兴趣的路径。

[0379] 因此, 接下来意欲测试使用Fab-NLP缀合物平台来激发已知需要较高化合价的路径的可能。据报道, OX40 TNF家族受体需要较高化合价来诱导激动剂活性。在最新公开案中, 针对化合价4报道了中等激发活性且仅针对六聚体IgG形式(其具有化合价12)观察到高效活性(45)。因此, 使用OX40受体作为模型系统来评估Fab-NLP化合价对激动剂活性的效应。以介于0至30之间的OX40 Fab:NLP摩尔比生成Fab-NLP缀合物且在过度表达OX40的Jurkat NF $\kappa$ B荧光素酶报告基因分析中测量激动剂活性(图5B)。使用全长抗OX40 huIgG1 mAb(化合价2)作为阴性对照。如所预计, 在所测试整个浓度范围内, 针对单独的抗OX40 huIgG或NLP未发现活性(图5B-分别是三角形和十字形)。对于Fab-NLP缀合物而言, 在3.8的Fab化合价下观察到低激动剂活性程度(图5B-星形), 与之相比, 在化合价增加至8.3Fab/NLP时观察到高效活性(图5B-正方形)且在化合价高于该值时仅观察到轻微活性增加。这些结果表明, 强烈效力的最小化合价为约8且与比较化合价为4和12的分子的激动剂活性的上文所提及研究一致(45)。值得注意的是, 图5B中的数据是相对于Fab浓度而非NLP浓度来显示。在基于NLP浓度分析数据时, 随着Fab化合价自3.8增加至29.4, Fab/NLP复合物的曲线(图5C)和相应EC<sub>50</sub>(图5D)降低约4倍。这些发现表明, Fab-NLP缀合物的整体效力随化合价的增加而增加。总而言之, 这些发现证实, 已成功地使用此平台来强效活化需要高化合价的路径, 此结果不能使用经工程化mAb平台达成。

[0380] 实例5:NLP-Fab缀合物的血清稳定性

[0381] 使用AF488标记NLP和Fab-NLP

[0382] 如上文所描述来生成NLP和Fab-NLP缀合物。在裸NLP或Fab-NLP缀合物的SEC纯化之前, 使用AF488经由游离赖氨酸通过与经NHS活化的AF488一起在NHS-AF488:总蛋白质比率为5下孵育2-4小时来标记样品。在此孵育期之后, 通过相对于反应中的总NHS-AF488添加2X摩尔过量的Tris来淬灭未反应NHS-AF488。然后通过SEC在AKTA Avant系统上使用S200 10/300Increase柱自未反应AF488纯化经AF488标记的NLP。

[0383] 50%血清中的NLP和Fab-NLP缀合物的SEC分析

[0384] 在含有50%血清的PBS缓冲液中孵育经AF488标记的NLP和Fab-NLP缀合物并通过SEC(Acclaim SEC 1000, Thermo Fisher Scientific)在PBS缓冲液孵育后的不同时间点进行分析。在495nm波长下监测经标记NLP样品的吸光度以避免来自血清蛋白和组分的干扰吸光度。观察于6-9分钟之间的峰归因于NLP和NLP-Fab缀合物, 且10-13分钟之间的峰归因于已自NLP解离的游离未结合Fab或apoE422k。将所测试不同时间点下的NLP峰面积正规化至时间0hr下的峰面积且使用这些归一化值来测定NLP降解的动力学。

[0385] 实例5的结果和论述

[0386] Fab-NLP血清稳定性

[0387] 本文的NLP平台可用作体内递送载体, 尽管已报道其他NLP结构在复杂生物基质中具有低稳定性(20, 67, 68)。在一先前研究中, DOPC NLP在37°C下在50%血清中的半衰期报道为介于3-6小时之间(20), 这显著低于纳米颗粒的全身性半衰期(24-48小时)。为解决此

限制性, 先前研究评估了可交联脂质组分对整体NLP稳定性的效应且证实使双层核心交联会显著改良稳定性(68)。更具体而言, 在100%血清中于48小时时间段中未观察到NLP降解, 而在不存在交联下观察到极快降解(约10min)(68)。尽管前景良好, 但此方法的缺点之一在于, 添加不具有已知天然降解或生物转变路径的非天然交联脂质会增加安全风险。

[0388] 考虑到NLP稳定性对其用作体内递送载体的重要性, 在经选择以模拟体内条件的50%血清中使用兔Fab代用分子来评价NLP-Fab缀合物稳定性。为评估NLP的稳定性和完整性, 使用AF488标记Fab-NLP缀合物并通过SEC在495nm的吸光度下进行分析, 选择该吸光度是因为其分光亮度特征与血清/NLP-Fab样品中的血清蛋白和组分的固有吸光度不重叠。单独NLP的示例性SEC迹线展示于图6A中。完整NLP的滞留时间(~8min)不同于自解离NLP释放的游离apoE422k(分别为8min与11.75min), 且由此可易于通过SEC随时间追踪NLP的稳定性和完整性。值得注意的是, 在滞留时间为约6.25min下观察到的次要肩峰是源于血清中的聚集物且扣除背景以供分析。

[0389] 为评估Fab载量对稳定性的效应, 使用AF488标记具有不同量Fab(0、2、7、16和32Fab/NLP)的Fab-NLP缀合物, 在37℃下在50%血清中进行孵育并通过SEC在介于0-24h之间的不同时间点下进行分析。相对于时间0h下的峰面积来归一化Fab-NLP SEC峰面积以容许比较不同Fab-NLP缀合物。与先前的公开研究一致(20, 67), 单独NLP(图6B, 三角形)最初快速降解且在3小时之后仅剩余50%的材料, 随后在剩余24小时孵育期中较缓慢地降解。也针对Fab:NLP加载密度为2的Fab-NLP缀合物观察到极类似趋势(图6B, 圆)。然而, 在Fab:NLP加载密度增加至7时观察到NLP稳定性显著改良(图6B, 正方形), 其中未观察到稳定性的初始特征快速降低, 而在整个24小时中主要是逐渐缓慢降低, 其中在37℃下在50%血清中孵育之后63%的Fab-NLP保持完整。在Fab:NLP加载密度为16和32时也观察到类似趋势(图6B, 分别是星形及菱形), 且所检测稳定性进一步增加, 其中大于70%的Fab-NLP缀合物在24小时孵育期结束时保持完整。

[0390] Fab-NLP缀合物的改良稳定性表明, 进入NLP表面与降解有关且所结合Fab可保护NLP免受血清蛋白影响。血清蛋白(例如白蛋白)以及天然HDL和LDL颗粒与NLP的疏水性脂双层核心的相互作用被认为是体内或体外血清条件下的NLP降解的主要驱动因素。这些相互作用被认为会破坏使NLP保持组装和完整的脂质-脂质及脂质-载脂蛋白疏水性凡得瓦相互作用(van der Waals interaction)。此假设进一步得到先前研究的支持, 其中展示使脂双层核心(68)或载脂蛋白(69)交联可显著改良NLP稳定性。尽管具有这些发现, 但关于血清蛋白酶活性对NLP稳定性的影响知之甚少。载脂蛋白可由血清蛋白裂解, 从而导致纳米颗粒分解。然而, 考虑到使Fab结合至NLP表面且使脂双层核心及载脂蛋白交联已展示可改良稳定性, NLP分解的主要驱动因素似乎可能在于凡得瓦相互作用的破坏, 此与载脂蛋白的血清蛋白酶裂解不同。令人意外地, 在7的相对较低Fab密度下观察到稳定性显著改良, 该密度对应于约25%的表面覆盖率(假设Fab表面积为约 $2.2\text{nm}^2$ )。这些数据表明, 最小数量的表面保护蛋白即足以显著影响NLP稳定性。重要的是, 这是在不使用非天然交联剂下所实现的。

[0391] 使用NLP作为体内药物递送载体的预期困难之一在于颗粒在复杂生物基质(例如血清)中的整体稳定性。然而, 基于上述结果, 令人意外地, 在以高于值约7Fab:NLP阈值的Fab加载密度下组装为Fab-NLP缀合物时, 此问题似乎有所缓解。因此, 无需修饰(例如可能引入额外毒性倾向的脂质交联)即可达成递送Fab-NLP缀合物期间的稳定性。

[0392] 总结:

[0393] 在此研究中,描述Fab-NLP缀合物的研发、优化和表征。使用结合至具有C端半胱氨酸的Fab的马来酰亚胺反应性脂质来生成NLP。在pH 7.4下组装时,马来酰亚胺反应性脂质展示最可能经由赖氨酸残基结合至载脂蛋白、然而,在pH 6下组装NLP时,未观察到此不期望反应。将位点特异性Fab结合条件优化且证实在最高30Fab/NLP下的结合。有趣的是,大量Fab的结合对NLP流体动力学半径(即NLP直径)具有最小影响且对NLP分子量具有显著影响,从而指示粒度主要取决于NLP的盘形形状。

[0394] 也评估冻干后的Fab-NLP粘度及其稳定性以评价Fab-NLP的可制造性。即,以下列两种方式来评估Fab-NLP平台与所确立制造工艺的兼容性:通过在制造期间的多个相关Fab浓度中比较其与另一多聚化技术(Fab-PEG八聚体缀合物)的粘弹性行为;及通过评价其冻干后的稳定性。Fab-NLP缀合物可相对于另一多价形式(Fab-PEG缀合物)实现了显著较高的Fab浓度且冻干并无显示任何稳定性或活性问题。此外,在抑制及激发背景中未发现Fab结合至NLP可影响Fab活性,且能够利用Fab承载能力来活化需要高效力化合价的激动剂路径。最后,在50%血清中评估Fab-NLP缀合物的稳定性且Fab-NLP显示增加的稳定性,其中在Fab/颗粒比率为7或更大时>63%的Fab-NLP在24小时之后保持完整。这些发现将Fab-NLP确立为用于以多价形式靶向递送Fab的平台且Fab-NLP与所确立制造工艺兼容。

[0395] 此研究的综合结果证明,NLP是性能良好的多功能平台,其极适于Fab或Fab样分子的多聚化。这些结果证明,NLP是用于以多价形式靶向递送Fab的令人意外的有用平台且与所确立制造工艺兼容。

[0396] 实例1-5的参考文献

[0397] (1) Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G. 及 Shin, D.M. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clin Cancer Res 14,1310-6.

[0398] (2) Mareeva, T., Wanjalla, C., Schnell, M.J. 及 Sykulev, Y. (2010) A novel composite immunotoxin that suppresses rabies virus production by the infected cells. J Immunol Methods 353,78-86.

[0399] (3) Bhatt, R., de Vries, P., Tulinsky, J., Bellamy, G., Baker, B., Singer, J.W. 及 Klein, P. (2003) Synthesis and in vivo antitumor activity of poly(L-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin. J Med Chem 46,190-3.

[0400] (4) Kim, T.Y., Kim, D.W., Chung, J.Y., Shin, S.G., Kim, S.C., Heo, D.S., Kim, N.K. 及 Bang, Y.J. (2004) Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. Clin Cancer Res 10,3708-16.

[0401] (5) Malik, N., Evagorou, E.G., and Duncan, R. (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. Anticancer Drugs 10,767-76.

[0402] (6) Markman, M. (2006) Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary. Expert Opin Pharmacother 7,1469-74.

[0403] (7) Manchester, M. Singh, P. (2006) Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. Adv Drug Deliv Rev 58,1505-22.

[0404] (8) Wu, W., Wieckowski, S., Pastorin, G., Benincasa, M., Klumpp, C., Briand,

J.P., Gennaro, R., Prato, M. 及 Bianco, A. (2005) Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 6358-62.

[0405] (9) Tufteland, M., Ren, G., and Ryan, R.O. (2008) Nanodisks derived from amphotericin B lipid complex. *J Pharm Sci* 97, 4425-32.

[0406] (10) Yuan, Y., Wang, W., Wang, B., Zhu, H., Zhang, B. 及 Feng, M. (2013) Delivery of hydrophilic drug doxorubicin hydrochloride-targeted liver using apoAI as carrier. *J Drug Target* 21, 367-74.

[0407] (11) Ding, Y., Wang, W., Feng, M., Wang, Y., Zhou, J., Ding, X., Zhou, X., Liu, C., Wang, R. 及 Zhang, Q. (2012) A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA delivery for tumor gene therapy. *Biomaterials* 33, 8893-905.

[0408] (12) Gaidukov, L., Bar, D., Jacobson, S., Naftali, E., Kaufman, O., Tabakman, R., Tawfik, D.S. 及 Levy-Nissenbaum, E. (2009) In vivo administration of BL-3050: highly stable engineered PON1-HDL complexes. *BMC Clin Pharmacol* 9, 18.

[0409] (13) Frias, J.C., Ma, Y., Williams, K.J., Fayad, Z.A. 及 Fisher, E.A. (2006) Properties of a versatile nanoparticle platform contrast agent to image and characterize atherosclerotic plaques by magnetic resonance imaging. *Nano Lett* 6, 2220-4.

[0410] (14) Fischer, N.O., Rasley, A., Corzett, M., Hwang, M.H., Hoeprich, P.D. 及 Blanchette, C.D. (2013) Colocalized delivery of adjuvant and antigen using nanolipoprotein particles enhances the immune response to recombinant antigens. *J Am Chem Soc* 135, 2044-7.

[0411] (15) Bhattacharya, P., Grimme, S., Ganesh, B., Gopisetty, A., Sheng, J.R., Martinez, O., Jayarama, S., Artinger, M., Meriggioli, M. 及 Prabhakar, B.S. (2010) Nanodisc-incorporated hemagglutinin provides protective immunity against influenza virus infection. *J Virol* 84, 361-71.

[0412] (16) Fischer, N.O., Infante, E., Ishikawa, T., Blanchette, C.D., Bourne, N., Hoeprich, P.D. 及 Mason, P.W. (2010) Conjugation to nickel-chelating nanolipoprotein particles increases the potency and efficacy of subunit vaccines to prevent West Nile encephalitis. *Bioconjug Chem* 21, 1018-22.

[0413] (17) Weilhammer, D.R., Blanchette, C.D., Fischer, N.O., Alam, S., Loots, G.G., Corzett, M., Thomas, C., Lychak, C., Dunkle, A.D., Ruitenberg, J.J., Ghanekar, S.A., Sant, A.J. 及 Rasley, A. (2013) The use of nanolipoprotein particles to enhance the immunostimulatory properties of innate immune agonists against lethal influenza challenge. *Biomaterials* 34, 10305-18.

[0414] (18) Fischer, N.O., Blanchette, C.D., Segelke, B.W., Corzett, M., Chromy, B.A., Kuhn, E.A., Bench, G. 及 Hoeprich, P.D. (2010) Isolation, characterization, and stability of discretely-sized nanolipoprotein particles assembled with apolipoprotein III. *PLoS One* 5, e11643.

- [0415] (19) Blanchette, C.D., Law, R., Benner, W.H., Pesavento, J.B., Cappuccio, J.A., Walsworth, V., Kuhn, E.A., Corzett, M., Chromy, B.A., Segelke, B.W., Coleman, M.A., Bench, G., Hoeprich, P.D. 及 Sulchek, T.A. (2008) Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations. *J Lipid Res* 49, 1420-30.
- [0416] (20) Fischer, N.O., Weilhammer, D.R., Dunkle, A., Thomas, C., Hwang, M., Corzett, M., Lychak, C., Mayer, W., Urbin, S., Collette, N., Chiun Chang, J., Loots, G.G., Rasley, A. 及 Blanchette, C.D. (2014) Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One* 9, e93342.
- [0417] (21) Cappuccio, J.A., Blanchette, C.D., Sulchek, T.A., Arroyo, E.S., Kralj, J.M., Hinz, A.K., Kuhn, E.A., Chromy, B.A., Segelke, B.W., Rothschild, K.J., Fletcher, J.E., Katzen, F., Peterson, T.C., Kudlicki, W.A., Bench, G., Hoeprich, P.D. 及 Coleman, M.A. (2008) Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles. *Mol Cell Proteomics* 7, 2246-53.
- [0418] (22) Cappuccio, J.A., Hinz, A.K., Kuhn, E.A., Fletcher, J.E., Arroyo, E.S., Henderson, P.T., Blanchette, C.D., Walsworth, V.L., Corzett, M.H., Law, R.J., Pesavento, J.B., Segelke, B.W., Sulchek, T.A., Chromy, B.A., Katzen, F., Peterson, T., Bench, G., Kudlicki, W., Hoeprich, P.D., Jr. 及 Coleman, M.A. (2009) Cell-free expression for nanolipoprotein particles: building a high-throughput membrane protein solubility platform. *Methods Mol Biol* 498, 273-96.
- [0419] (23) Wadsater, M., Laursen, T., Singha, A., Hatzakis, N.S., Stamou, D., Barker, R., Mortensen, K., Feidenhans'l, R., Moller, B.L. 及 Cardenas, M. (2012) Monitoring shifts in the conformation equilibrium of the membrane protein cytochrome P450 reductase (POR) in nanodiscs. *J Biol Chem* 287, 34596-603.
- [0420] (24) Justesen, B.H., Laursen, T., Weber, G., Fuglsang, A.T., Moller, B.L. 及 Pomorski, T.G. (2013) Isolation of monodisperse nanodisc-reconstituted membrane proteins using free flow electrophoresis. *Anal Chem* 85, 3497-500.
- [0421] (25) Baylon, J.L., Lenov, I.L., Sligar, S.G. 及 Tajkhorshid, E. (2013) Characterizing the membrane-bound state of cytochrome P450 3A4: structure, depth of insertion, and orientation. *J Am Chem Soc* 135, 8542-51.
- [0422] (26) Gao, T., Petrlova, J., He, W., Huser, T., Kudlick, W., Voss, J. 及 Coleman, M.A. (2012) Characterization of de novo synthesized GPCRs supported in nanolipoprotein discs. *PLoS One* 7, e44911.
- [0423] (27) Akkaladevi, N., Hinton-Chollet, L., Katayama, H., Mitchell, J., Szerszen, L., Mukherjee, S., Gogol, E.P., Pentelute, B.L., Collier, R.J. 及 Fisher, M.T. (2013) Assembly of anthrax toxin pore: lethal-factor complexes into lipid nanodiscs. *Protein Sci* 22, 492-501.
- [0424] (28) Tufteland, M., Pesavento, J.B., Bermingham, R.L., Hoeprich, P.D., Jr. 及

- Ryan,R.O. (2007) Peptide stabilized amphotericin B nanodisks. *Peptides* 28,741-6.
- [0425] (29) Jia,J.,Xiao,Y.,Liu,J.,Zhang,W.,He,H.,Chen,L. 及 Zhang,M. (2012) Preparation,characterizations,and in vitro metabolic processes of paclitaxel-loaded discoidal recombinant high-density lipoproteins. *J Pharm Sci* 101,2900-8.
- [0426] (30) Weilhammer,D.,Dunkle,A.D.,Blanchette,C.D.,Fischer,N.O.,Corzett,M.,Lehmann,D.,Boone,T.,Hoeprich,P.,Driks,A. 及 Rasley,A. (2017) Enhancement of antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses using a self-assembled biologic nanolipoprotein particle vaccine. *Vaccine* 35,1475-1481.
- [0427] (31) Blanchette,C.D.,Fischer,N.O.,Corzett,M.,Bench,G. 及 Hoeprich,P.D. (2010) Kinetic analysis of his-tagged protein binding to nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 21,1321-30.
- [0428] (32) Kuai,R.,Sun,X.,Yuan,W.,Xu,Y.,Schwendeman,A. 及 Moon,J.J. (2018) Subcutaneous Nanodisc Vaccination with Neoantigens for Combination Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem* 29,771-775.
- [0429] (33) Merino,M.,Zalba,S. 及 Garrido,M.J. (2018) Immunoliposomes in clinical oncology:State of the art and future perspectives. *J Control Release* 275,162-176.
- [0430] (34) Eloy,J.O.,Petrilli,R.,Trevizan,L.N.F. 及 Chorilli,M. (2017) Immunoliposomes:A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 159,454-467.
- [0431] (35) Noble,G.T.,Stefanick,J.F.,Ashley,J.D.,Kiziltepe,T. 及 Bilgicer,B. (2014) Ligand-targeted liposome design:challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol* 32,32-45.
- [0432] (36) Alibakhshi,A.,Abarghooi Kahaki,F.,Ahangarzadeh,S.,Yaghoobi,H.,Yarian,F.,Arezumand,R.,Ranjbari,J.,Mokhtarzadeh,A. 及 de la Guardia,M. (2017) Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *J Control Release* 268,323-334.
- [0433] (37) Ohradanova-Repic,A.,Nogueira,E.,Hartl,I.,Gomes,A.C.,Preto,A.,Steinhuber,E.,Muhlgrabner,V.,Repic,M.,Kuttke,M.,Zwirzitz,A.,Prouza,M.,Suchanek,M.,Wozniak-Knopp,G.,Horejsi,V.,Schabbauer,G.,Cavaco-Paulo,A. 及 Stockinger,H. (2018) Fab antibody fragment-functionalized liposomes for specific targeting of antigen-positive cells. *Nanomedicine* 14,123-130.
- [0434] (38) Hoang,B.,Ekdawi,S.N.,Reilly,R.M. 及 Allen,C. (2013) Active targeting of block copolymer micelles with trastuzumab Fab fragments and nuclear localization signal leads to increased tumor uptake and nuclear localization in HER2-overexpressing xenografts. *Mol Pharm* 10,4229-41.
- [0435] (39) Mamot,C.,Drummond,D.C.,Noble,C.O.,Kallab,V.,Guo,Z.,Hong,K.,Kirpotin,D.B. 及 Park,J.W. (2005) Epidermal growth factor receptor-targeted

immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res* 65,11631-8.

[0436] (40) Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. 及 Bao, G. (2016) The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)* 11,673-92.

[0437] (41) Steeland, S., Vandenbroucke, R.E. 及 Libert, C. (2016) Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today* 21, 1076-113.

[0438] (42) Redmond, W.L. 及 Weinberg, A.D. (2007) Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. *Crit Rev Immunol* 27,415-36.

[0439] (43) Cuesta, A.M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B. 及 Alvarez-Vallina, L. (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* 28,355-62.

[0440] (44) Nunez-Prado, N., Compte, M., Harwood, S., Alvarez-Mendez, A., Lykkemark, S., Sanz, L. 及 Alvarez-Vallina, L. (2015) The coming of age of engineered multivalent antibodies. *Drug Discov Today* 20,588-94.

[0441] (45) Yang, Y., Yeh, S.H., Madireddi, S., Matochko, W.L., Gu, C., Pacheco Sanchez, P., Ultsch, M., De Leon Boenig, G., Harris, S.F., Leonard, B., Scales, S.J., Zhu, J.W., Christensen, E., Hang, J.Q., Brezski, R.J., Marsters, S., Ashkenazi, A., Sukumaran, S., Chiu, H., Cubas, R., Kim, J.M. 及 Lazar, G.A. (2019) Tetravalent biepitopic targeting enables intrinsic antibody agonism of tumor necrosis factor receptor superfamily members. *MAbs* 11,996-1011.

[0442] (46) Fischer, N.O., Blanchette, C.D., Chromy, B.A., Kuhn, E.A., Segelke, B.W., Corzett, M., Bench, G., Mason, P.W. 及 Hoeprich, P.D. (2009) Immobilization of His-tagged proteins on nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 20,460-5.

[0443] (47) Shatz, W., Hass, P.E., Peer, N., Paluch, M.T., Blanchette, C., Han, G., Sandoval, W., Morando, A., Loyet, K.M., Bantseev, V., Booler, H., Crowell, S., Kamath, A., Scheer, J.M. 及 Kelley, R.F. (2019) Identification and characterization of an octameric PEG-protein conjugate system for intravitreal long-acting delivery to the back of the eye. *PLoS One* 14,e0218613.

[0444] (48) Shatz, W., Hass, P.E., Mathieu, M., Kim, H.S., Leach, K., Zhou, M., Crawford, Y., Shen, A., Wang, K., Chang, D.P., Maia, M., Crowell, S.R., Dickmann, L., Scheer, J.M. 及 Kelley, R.F. (2016) Contribution of Antibody Hydrodynamic Size to Vitreal Clearance Revealed through Rabbit Studies Using a Species-Matched Fab. *Mol Pharm* 13,2996-3003.

[0445] (49) Tesar, D., Luoma, J., Wyatt, E.A., Shi, C., Shatz, W., Hass, P.E., Mathieu, M., Yi, L., Corn, J.E., Maass, K.F., Wang, K., Dion, M.Z., Andersen, N., Loyet, K.M., van Lookeren Campagne, M., Rajagopal, K., Dickmann, L., Scheer, J.M. 及 Kelley, R.F. (2017)

Protein engineering to increase the potential of a therapeutic antibody Fab for long-acting delivery to the eye. *Mabs* 9,1297-1305.

[0446] (50) Hermanson, G.T. (2008) *Bioconjugate Techniques*, pp 283.

[0447] (51) Partis, M.D., Griffiths, D.G., Roberts, G.C. 及 Beechey, R.B. (1983) Cross-Linking of Protein by Omega-Maleimido Alkanoyl N-Hydroxysuccinimido Esters. *J Protein Chem* 2,263-277.

[0448] (52) Hermanson, G.T. (2008) *Bioconjugate Techniques*, pp 767.

[0449] (53) Dong, J., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H., Segelke, B.W., Rupp, B., Capila, I., Hernaiz, M.J., LeBrun, L.A. 及 Linhardt, R.J. (2001) Interaction of the N-terminal domain of apolipoprotein E4 with heparin. *Biochemistry* 40,2826-34.

[0450] (54) Isom, D.G., Castaneda, C.A., Cannon, B.R. 及 Garcia-Moreno, B. (2011) Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108,5260-5.

[0451] (55) Panahi, A., and Brooks, C.L., 3rd. (2015) Membrane environment modulates the pKa values of transmembrane helices. *J Phys Chem B* 119,4601-7.

[0452] (56) Strong, R.K., Campbell, R., Rose, D.R., Petsko, G.A., Sharon, J., and Margolies, M.N. (1991) Three-dimensional structure of murine anti-p-azophenylarsonate Fab 36-71.1. X-ray crystallography, site-directed mutagenesis, and modeling of the complex with hapten. *Biochemistry* 30,3739-48.

[0453] (57) Gao, T., Blanchette, C.D., He, W., Bourguet, F., Ly, S., Katzen, F., Kudlicki, W.A., Henderson, P.T., Laurence, T.A., Huser, T. 及 Coleman, M.A. (2011) Characterizing diffusion dynamics of a membrane protein associated with nanolipoproteins using fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Sci* 20, 437-47.

[0454] (58) Henein, C., Awwad, S., Ibeanu, N., Vlatakis, S., Brocchini, S., Tee Khaw, P. 及 Bouremel, Y. (2019) Hydrodynamics of Intravitreal Injections into Liquid Vitreous Substitutes. *Pharmaceutics* 11.

[0455] (59) Dias, C., Abosaleem, B., Crispino, C., Gao, B. 及 Shaywitz, A. (2015) Tolerability of High-Volume Subcutaneous Injections of a Viscous Placebo Buffer: A Randomized, Crossover Study in Healthy Subjects. *AAPS PharmSciTech* 16, 1101-7.

[0456] (60) Mathaes, R., Koulov, A., Joerg, S. 及 Mahler, H.C. (2016) Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals-Pushing the Boundaries. *J Pharm Sci* 105,2255-9.

[0457] (61) Zarzar, J., Shatz, W., Peer, N., Taing, R., McGarry, B., Liu, Y., Greene, D.G. 及 Zarraga, I.E. (2018) Impact of polymer geometry on the interactions of protein-PEG conjugates. *Biophys Chem* 236,22-30.

[0458] (62) Chen, C., Han, D., Cai, C. 及 Tang, X. (2010) An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release* 142,299-311.

[0459] (63) Fernandez-Moure, J., Maisha, N., Lavik, E.B. 及 Cannon, J.W. (2018) The Chemistry of Lyophilized Blood Products. *Bioconjug Chem* 29, 2150-2160.

[0460] (64) Franze, S., Selmin, F., Samaritani, E., Minghetti, P. 及 Cilurzo, F. (2018) Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics* 10.

[0461] (65) Rusmini, F., Zhong, Z. 及 Feijen, J. (2007) Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* 8, 1775-89.

[0462] (66) Abad, J.M., Mertens, S.F., Pita, M., Fernandez, V.M. 及 Schiffrin, D.J. (2005) Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc* 127, 5689-94.

[0463] (67) Gilmore, S.F., Carpenter, T.S., Ingolfsson, H.I., Peters, S.K.G., Henderson, P.T., Blanchette, C.D. 及 Fischer, N.O. (2018) Lipid composition dictates serum stability of reconstituted high-density lipoproteins: implications for in vivo applications. *Nanoscale* 10, 7420-7430.

[0464] (68) Gilmore, S.F., Blanchette, C.D., Scharadin, T.M., Hura, G.L., Rasley, A., Corzett, M., Pan, C.X., Fischer, N.O. 及 Henderson, P.T. (2016) Lipid Cross-Linking of Nanolipoprotein Particles Substantially Enhances Serum Stability and Cellular Uptake. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, 20549-57.

[0465] (69) Nasr, M.L., and Wagner, G. (2018) Covalently circularized nanodiscs; challenges and applications. *Curr Opin Struct Biol* 51, 129-134.

[0466] 实例6:实例7-11的材料和方法

[0467] 材料

[0468] 如实例1中所论述来获得用于实例7-11中的试剂。

[0469] apoE422k和Fab的蛋白质表现和纯化

[0470] 如先前所描述(参见下文的参考文献18和19)使用所确立表达质体和方法在摇瓶条件下于大肠杆菌细胞中来表达ApoE422k。简言之,使用6x His标签表达apoE422k并在Ni-NTA柱(XK16/20 3ml)上纯化,随后进行尺寸排阻色谱(SEC)(Superdex 75 16/60)。洗涤柱且在50mM磷酸盐缓冲液、200mM NaCl、10mM咪唑(pH 8,缓冲液A)中结合蛋白质。使用缓冲液A+0.2% Triton X114+0.2% Triton X100充分洗涤柱结合蛋白质(20个柱体积)并使用50mM磷酸盐缓冲液、200mM NaCl、400mM咪唑(pH 8)洗脱。过滤自洗脱峰收集的级分并使用3kDa分子量截止旋转浓缩器浓缩。经由烟草蚀刻病毒包-核内肽酶(TEV蛋白酶)消解来去除His标签(将TEV卷标添加于His标签与蛋白质序列之间的N端上)。以100:1的apoE422k:TEV重量比率添加TEV蛋白酶。通过使反应混合物通过Ni-NTA管柱(XK 16/20 3ml)从含有His标签的TEV蛋白酶来纯化裂解的蛋白质。浓缩所合并蛋白质并运行于SEC(Superdex 75 16/60)上的PBS中。收集SEC级分并分别通过质谱及SEC分析蛋白质的属性和聚集。汇集具有正确分子量(MW)且聚集(<5%)的级分且通过280下的吸光度测定蛋白质浓度。

[0471] 设计具有C端半胱氨酸的Fab构建体(简称为“Fab”)以使得能够位点特异性地结合至CKP-NLP。使用如先前描述进行纯化的人抗因子D(AFD) Fab作为代用品来评估Fab与CKP-

NLP的结合(参见下文的参考文献18)。使用20mM DTT将所有经纯化的Fab去半胱氨酸化以还原半胱氨酸缀合物并使用6.5mM谷胱甘肽(GSH)再氧化。然后对样本实施缓冲液交换并在200mM精氨酸琥珀酸盐(pH 5)中洗涤并储存以限制进一步的半胱氨酸化。

[0472] C16-EETI-II的合成和表征。

[0473] 使用标准9-芴基甲氧基羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl)方案在固相上以化学方式来合成线性EETI-II或EETI-II-C16肽,如下文的参考文献20中所描述。使用小规模折叠分析和LC-MS分析鉴别最佳折叠条件。在室温及振荡下,将所获得粗制线性肽在0.5mg/ml下在最佳折叠缓冲液(0.1M碳酸氢铵(pH 9.0)、2mM还原谷胱甘肽、0.5mM氧化谷胱甘肽、4%DMSO,这是用于EETI-II;0.1M碳酸氢铵(pH 9.0)、1mM还原谷胱甘肽、50%DMSO,这是用于C16-EETI-II)中氧化24小时。使用C18 Sep-Pak(Waters,目录号:WAT043345)去除过量盐并通过RP-HPLC(Agilent技术,Santa Clara,CA)使用C18柱(用于EETI-II(简称为“CKP”))和C4柱(用于EETI-II-C16(简称为“CKP-C16”))纯化冻干产物。使用LC-MS系统(Agilent Technologies,Santa Clara,CA)确认纯化肽的属性并且其纯度经证实>95%。

[0474] CKP-NLP组装和纯化

[0475] 为允许将CKP掺入NLP中,如上文所描述向CKP附加C16脂肪酸标签(CKP-C16)。如先前所描述,基于以下原理向NLP中掺入使用疏水性标签合成的分子:疏水性标签在脂双层的核心内的分配可将该分子有效锚定至NLP表面(参见下文的参考文献9、10)。如所先前描述来组装CKP-NLP且略微修改(参见下文的参考文献9、10、18)。简言之,组装期间的总脂质对apoE422k摩尔比为80:1,先前已展示该比率会产生相对均质的NLP群体(参见下文的参考文献6、11、19、21)。使用指示摩尔比的DOPC和CKP-C16(无Fab结合)或DOPC、DSPE-PEG-Mal(Fab结合)及CKP-C16来组装CKP-NLP,如下文实例中所描述。在氯仿或甲醇中制备或获得这些脂质且以等分样品形式储存于埃彭道夫管(Eppendorf tube)中。在N<sub>2</sub>流及搅动下去除氯仿以形成薄脂质膜。将脂质溶于50mM磷酸钠缓冲液(pH 6.0,150mM NaCl且使用80mM胆酸钠)中。在添加apoE422k(在最终组装体积中150μM)之后,将样品在室温下孵育至少1小时。然后通过与生物珠粒(Sigma-Aldrich)在振荡下于500μL costar 0.22μM旋转过滤器中一起孵育2h来去除胆酸盐。在振荡两小时之后,将样品在200g下离心5分钟且收集含有NLP的滤液。通过SEC使用AKTA Avant系统和S200 10/300Increase柱来纯化不用于Fab结合的CKP-NLP。在SEC纯化之前,首先使拟用于生成Fab-CKP-NLP缀合物的CKP-NLP结合至Fab,如下文所描述。

[0476] Fab-CKP-NLP结合和纯化

[0477] 如先前所描述使Fab结合至CKP-NLP且略微修改(参见下文的参考文献18)。简言之,在胆酸盐去除步骤之后,如下文所描述通过HPLC来测定CKP-NLP的apoE422k浓度。在介于0-160之间的Fab:NLP摩尔比下在50mM磷酸钠缓冲液(pH 6.0)、150mM NaCl中使含硫醇Fab结合至马来酰亚胺官能化CKP-NLP,该摩尔比是基于apoE422k浓度且假设4apoE422k/NLP所计算(参见下文的参考文献6)。选择此结合缓冲液以限制马来酰亚胺与apoE422k之间的NLP内交联,如先前所描述(参见下文的参考文献18)。结合反应总是与CKP-NLP组装在同一天进行以限制马来酰亚胺水解。在2-4小时的反应孵育期之后,以相对于DSPE-PEG-MCC 2倍摩尔过量来添加n-乙酰基半胱氨酸(NAC)以淬灭任何未反应马来酰亚胺。使用AKTA Avant系统和S200 10/300Increase柱纯化所得Fab-CKP-NLP缀合物。通过SEC-MALS如下文所描述来分析Fab-CKP-NLP峰中的每个级分。基于MW及流体动力学半径(R<sub>h</sub>)分析来汇集级

分以产生最均质的Fab-CKP-NLP样品。

[0478] 使用经C端半胱氨酸改造以使得能够位点特异性地结合至CKP-NLP的人抗因子D (AFD) Fab (简称为“Fab”) 作为模型Fab。表达Fab并如先前描述进行纯化(下文的参考文献18、22)。使用20mM DTT还原经纯化Fab以去除半胱氨酸或在表达期间形成的GSH缀合物并纯化,且然后使用6.5mM谷胱甘肽(GSH)再氧化以确保半胱氨酸是游离的以结合至马来酰亚胺官能化CKP-NLP。对样品实施缓冲液交换,在200mM精氨酸琥珀酸盐(pH 5)中洗涤及储存以限制进一步的半胱氨酸化。

#### [0479] CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的HPLC分析

[0480] 通过HPLC使用Agilent 1290Infinity Bio-inert HPLC来分析CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物中的ApoE422k、CKP和Fab浓度。使用加热至80℃的Kinetex 2.6μm XB-C16柱(Phenomenex)分析所注射NLP样品。溶剂运行为自30%甲醇、70%水和0%2-丙醇的混合物至100%2-丙醇的梯度。所有溶剂都具有0.05%三氟乙酸。优化梯度以允许分离所有组分。对于Fab-CKP-NLP缀合物而言,需要还原条件,这是因为使用这些梯度和缓冲液条件不能分离完整Fab与游离apoE422k。基于通过注入1-16μg每一组分且积分曲线下面积所生成的标准曲线来测定apoE422k、Fab和CKP-C16浓度。基于A280 UV信号和蒸发光散射式检测器(ELSD)信号来生成标准曲线。

#### [0481] CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的LCMS分析

[0482] 使用Agilent 6230ESI-TOF LC/MS进行CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的LCMS分析。使用加热至80℃的Kinetex 2.6μm XB-C18柱(Phenomenex, Torrance, CA)来分析所注射NLP样品。溶剂运行为自30%甲醇和70%水的混合物至100%2-丙醇的梯度。所有溶剂都具有0.05%三氟乙酸。

#### [0483] CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的SEC-MALS/QELS分析

[0484] 如先前所描述来测定MW和 $R_h$ (下文的参考文献18)。简言之,将样品注射于Acclaim SEC-1000分析型SEC柱(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)上,该柱使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)的等度梯度(使用额外的150mM NaCl)且偶联至多角度光散射系统(MALS)(Wyatt Instruments, Santa Barbara, CA)。使用准弹性光散射(QELS)测量扩散系数(D),其中使用单光子计数模块(在99.0°角度下检测)捕获散射激光的强度波动。使用斯托克斯-爱因斯坦关系自D来计算 $R_h$ 。斯托克斯-爱因斯坦关系假设为球形形状且通过TEM和AFM分析测得NLP是盘形而非球形(参见下文的参考文献6)。估计 $R_h$ 由此对应于与NLP具有相同扩散系数的球体。然而,最近已报道,溶液中的NLP形状是高度动态的,其中NLP可采用除静态盘形形状外的更能反映球型颗粒的各种不同构象(下文的参考文献18、23)。出于这些原因,假定自此分析获得的 $R_h$ 值是准确的。

#### [0485] 胰蛋白酶酶促分析

[0486] 如先前所描述来进行分析且略微修改(参见下文的参考文献2)。简言之,在室温下,将肽NLP缀合物在指示浓度下与胰蛋白酶(2nM)一起孵育30min。将底物L-精氨酸-7-酰氨基-4-甲基香豆素(L-Arg-AMC)(75μM)添加至混合物中且立即测量蛋白水解活性。三重复运行样品并重复两次。使用KaleidaGraph软件分析数据。

#### [0487] 使用AF488标记CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物

[0488] 如上文所描述来生成CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物且在SEC纯化之前(在胆酸盐

去除之后),使用AF488经由游离赖氨酸通过与经NHS活化的AF488一起在NHS-AF488:总蛋白质比率为5下孵育2-4小时来标记样品。通过相对于反应中的总NHS-AF488添加10X摩尔过量的Tris-HCl缓冲液(pH 8)来淬灭未反应NHS-AF488。然后通过SEC在AKTA Avant系统上使用S200 10/300Increase柱自未反应AF488纯化经AF488标记的NLP,如上文所描述。

[0489] 50%血清中的CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的SEC分析如先前描述来分析经AF488标记的CKP-NLP和Fab-CKP-NLP的降解(参见下文的参考文献9、18、24和25)。在含有50%血清的PBS缓冲液(pH 7.4)中孵育经AF488标记的CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物并通过SEC(Acclaim SEC 1000,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)分析。在495nm波长下监测经标记NLP样品的吸光度以避免来自血清蛋白和组分的干扰吸光度。观察于5-5.5分钟之间的峰归因于CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物,且6-6.5分钟之间的峰归因于已自NLP解离的未结合Fab或apoE422k。将所测试不同时间点下的NLP峰面积归一化至时间0hr下的峰面积且使用这些归一化值来测定CKP-NLP和Fab-CKP-NLP降解的动力学。

[0490] 实例7:CKP-NLP的组装、纯化和表征

[0491] 胱氨酸结肽EETI-II(喷瓜(*Ecballium elaterium*)胰蛋白酶抑制剂-II)是发现于喷瓜中的强效胰蛋白酶抑制剂。为生成CKP-NLP,设计EETI-II的脂肪酰化形式,其中棕榈酸结合至在EETI-II的N端经改造的赖氨酸侧链的 $\epsilon$ 氨基(图9A)。首先,通过固相肽合成来生成线性C16-EETI-II。在肽合成期间的最后步骤中掺入脂肪酸,然后自树脂裂解肽并去保护。然后在不同缓冲液中筛选所获得线性粗产物以鉴别用以生成三个二硫键产物的最佳折叠条件,如通过分析LC-MS所评价。这种产生策略简化了纯化过程(而非在CKP折叠之后结合脂肪酸)。参见图9B。折叠EETI-II-C16并纯化至接近均质,从而产生几毫克级的EETI-II-C16。通过LC-MS证实EETI-II-C16的属性和纯度(图9C)。分析型RP-HPLC迹线指示,EETI-II-C16的疏水性大于EETI-II,如通过其滞留时间长于天然EETI-II所反映(图9D)。这是由于脂肪酸部分的结合。EETI-II-C16在水性缓冲液(>0.5mM,于60mM磷酸盐缓冲液中,pH 7.4)中仍展示溶解性。经纯化的EETI-II-16显示针对胰蛋白酶的抑制效力,这与结构研究中N端处的化学修饰应对EETI-II活性具有最小破坏的预测一致。为简单起见,EETI-II和EETI-II-C16在本文中分别称为“CKP”和“CKP-C16”。

[0492] 经由自发性自组装使用DOPC作为辅助脂质且使用胆酸盐进行脂质溶解来生成CKP-NLP,如图10A中所展示的示意图中所示。在去除胆酸盐之后,通过SEC纯化自组装CKP-NLP。CKP-NLP的典型SEC色谱图展示于图10B中。该CKP-NLP样品是在CKP-C16相对于DOPC的摩尔比为10%(例如90mol%DOPC、10mol%CKP-C16)下所组装,该摩尔比对应于40CKP/NLP且假设4apoE422k支架/NLP(参见下文的参考6)。收集对应于SEC峰的中段的级分,汇集并就进行反相HPLC分析。图10C展示使用10mol%CKP-C16组装的CKP-NLP样品在SEC纯化之后的HPLC ELSD色谱图。在对应于4.8min、5.3min和8.5min的滞留时间下观察三个峰。使用标准曲线和LC/MS分析来验证观察于4.8min、5.3min和8.5min下的峰分别对应于apoE422k(22.3kDa)、CKP-C16(3.7kDa)和DOPC(0.79kDa)。这些发现展示,上述策略可将CKP-C16掺入NLP中。生成每一组分的标准曲线并使用其来计算掺入经纯化CKP-NLP中的CKP-C16的量。对于10mol%CKP-C16样品而言,所掺入CKP-C16经计算为8.4mol%,此指示在组装和纯化过程期间材料略有损失。除CKP-NLP组合物的HPLC分析外,也通过SEC-MALS测量NLP分子量(图10D-10E)。CKP-NLP峰的MW自200kDa变至400kDa,其中整个峰中的平均MW为266kDa(滞留时

间为9-10min) (图10D)。类似地,CKP-NLP峰的流体动力学大小( $R_h$ )自5.8nm变至7.3nm,其中整个峰中的平均 $R_h$ 为6.2nm(滞留时间为9-10min) (图10E),这些综合结果表明,CKP-NLP颗粒是多分散性的。这些发现与自整体和单分子测量来评估NLP大小的先前报道一致。例如参见下文所列示的参考文献6。参考文献6报道,发现NLP的多分散性性质取决于多个离散NLP大小,这些离散NLP大小取决于与NLP缔合的apoE422k支架蛋白质数(其可在4-7之间变化),且NLP多分散性代表这些离散大小的随机高斯分布(Gaussian distribution)。基于SEC分析,滞留时间、 $R_h$ 和MW与平均含有4个apoE422k/NLP的NLP一致。这些综合发现表明,可成功地生成CKP-NLP、纯化并表征,如通过模型脂质化肽CKP-C16所例示。

[0493] 实例8:CKP掺入对NLP大小、加载效率及CKP活性的效应的分析

[0494] 接下来,如下所述来评估CKP掺入对NLP大小的效应。通过在前体有机相中组装CKP-NLP与mol%介于0-40%之间的CKP-C16来测量最大CKP载量。使用0、5%、10%、20%和40%CKP-C16组装的CKP-NLP的归一化分析型SEC色谱图展示于图11A中。随着CKP含量自0%增加至20%,观察到滞留时间轻微增加,从而指示粒度略有降低。在CKP-C16浓度自20%增加至40%时,观察到滞留时间大幅增加且出现对应于游离apoE422k蛋白质的大峰。这些结果也反映于SEC-MALS迹线中的CKP-NLP峰的 $R_h$ 分析中(图11B)。在不存在CKP下NLP的 $R_h$ 为约7nm且在5%CKP下降低至约6.3nm。随着CKP-C16含量自5%增加至20%,未观察到 $R_h$ 发生进一步变化;然而,在CKP-C16浓度增加至40%时,观察到剧降至4.5nm。如上文所提及,先前已报道(参见下文的参考文献6),NLP的大小分布主要取决于离散NLP大小的随机高斯分布,其中离散大小取决于apoE422k/NLP数量。基于经验单分子测量和分子动态仿真,向NLP中添加apoE422k蛋白质使得直径增加约2.5nm(参见下文的参考文献6)。不受限于理论,在CKP-C16含量自0%增加至20%时观察到直径降低约0.7nm表明,此变化并非由apoE422k/NLP平均数的差异所致。据报道,对于具有既定离散大小的NLP而言,NLP大小存在可取决于组合物的一定程度的灵活性(参见下文的参考文献6)。不受限于理论,NLP大小的此轻微降低可由NLP组合物改变所致。CKP-C16仅含单一脂肪酰基链且表面积小于DOPC,且NLP直径随CKP-C16含量增加的此轻微降低可源于CKP-C16的横截面表面积小于DOPC。此原理不能阐释在40%CKP-C16组合物所观察的 $R_h$ 快速下降及出现游离apoE422k峰。这种直径变化与在平均apoE422k数量/NLP降低一时的预计变化非常匹配(参见下文的参考文献6)。这些发现表明,在CKP-C16含量增加至40%时,不再有足够的脂质内容物/表面积可容纳4个apoE422k/NLP(针对具有较低CKP-C16含量的NLP所观察)且这些颗粒是由3个apoE422k/NLP组成。然而,若此属实,则游离apoE422k预计会增加25%,而非基于SEC色谱图中的曲线下面积所观察的50%增加。另一解释为,CKP-NLP可能不再形成,且CKP-C16-DOPC混合物可形成球形微胞。在较高洗涤剂比率下混合双层形成脂质与洗涤剂可形成微胞(参见下文的参考文献26)。类似现象可发生于具有较高CKP-C16浓度的CKP-NLP中。因CKP-C16与具有较大极性头部基团和单一脂肪酰基链的洗涤剂分子具有类似结构,故较高比率的CKP-C16可诱导形成微胞而非双层,这是形成NLP的必要条件。在较高CKP摩尔比下,NLP的基本结构和生物物理性质有所改变。

[0495] 为评价将CKP掺入NLP平台中的效率,通过反相HPLC量化掺入经纯化CKP-NLP中的CKP的量。图11C示出了随在CKP-NLP组装期间添加的CKP含量(X轴)而变化的经纯化CKP-NLP中所量化的CKP/NLP比率(Y轴),假设4apoE422k/NLP。虚线代表在反应中的所有CKP都掺入NLP中时的理论限值。在较低CKP浓度(16和32CKP/NLP,分别对应于5和10mol%CKP)下,添加

至反应中的几乎所有CKP都已掺入(分别是13.3和27.6CKP/NLP),如点与虚线的接近程度所证实(理论限值)。然而,在较高浓度下,CKP加载效率开始偏离理论上限(图11C)。不受限于理论,这些发现表明,在较高CKP浓度下加载效率的回报递减。NLP能够容纳最多约60个CKP-C16分子而不影响NLP组装过程。(图11C)。为达成此结论,假设在40%CKP浓度下为4apoE422k/NLP(128CKP/NLP)。然而,情况可能并非如此,此乃因较高CKP浓度改变了apoE422k/NLP数或诱导形成微胞/NLP杂交体。尽管具有此潜在倾向,但这些综合结果表明,较高CKP载量条件下的掺入效率有所降低。

[0496] 如下所述来评估CKP-NLP中的CKP掺入对CKP活性的效应:在此分析中,在游离CKP、CKP-C16和CKP-NLP的不同浓度下以不同CKP:NLP摩尔比(0、13.4、28.6和63)使用基于胰蛋白酶的分析来测量CKP活性(图11D)。尽管NLP-CKP组装相对可重现,但通常在最终组合物之间观察到可变性。本发明制剂的CKP:NLP摩尔比与上述样品略有不同。游离CKP(三角形,图11D)和CKP-C16(圆,图11D)分子具有相等效力以及几乎相等的 $K_i^{app}$ (0.16),且具有0CKP的CKP-NLP样品并无活性(十字形,图11D)。CKP-NLP也具有几乎相等的功效,不论CKP加载密度如何(星形和正方形,图11D)。然而,CKP-NLP中的CKP的整体效力小于游离CKP和CKP-C16约5倍。不受限于理论,这可能是由于( $K_i^{app} \sim 0.4nM$ )或使CKP锚定至NLP表面的空间位阻效应。众所周知,固定活性配体可因空间效应而影响活性(参见下文的参考文献27、28)。或者,CKP-C16可因脂质与CKP-C16之间的化学电位差而发生相分离过程以变成团簇,且这些团簇会负面地影响CKP活性。尽管对活性具有此负面影响,但CKP在加载于NLP平台上时仍较为高效。

[0497] 实例9:CKP载量对CKP-NLP稳定性的影响

[0498] NLP作为药物递送平台的限制性之一在于复合物生物环境中的低稳定性(参见下文的参考文献9、24、25)。例如,DOPC NLP在37℃下在50%血清中的半衰期报道为介于3-6小时之间(参见下文的参考文献9),此低于纳米颗粒的潜在全身性半衰期(24-48小时)。最近证实,使双层核心交联可显著改良稳定性(参见下文的参考文献24),其中针对经交联NLP在48小时时间段内于100%血清中未观察到NLP降解,且在不存在交联下观察到极快降解(约10min)(参见下文的参考文献24)。然而,这种方式可涉及增加安全风险,因为添加了并无已知天然降解或生物转变路径的非天然交联脂质。最近报道,使Fab结合至NLP平台会显著改良NLP稳定性(参见下文的参考文献18)。如下所述来评估CKP掺入对CKP NLP稳定性的效应。通过SEC在50%血清中使用荧光团标签(用以监测随时间而变化的降解)来评价CKP-NLP的稳定性。选择50%血清以模拟体内条件。在这些研究中,以不同时间间隔将经AF488的标记CKP-NLP注射于SEC上且在495nm的吸光度下监测所洗脱CKP-NLP。选择此荧光团和吸光度特征是因为其分光亮度特征与血清/CKP-NLP样品中的血清蛋白和组分的固有吸光度不重叠。图12A示出了不具有CKP的裸NLP在不同时间点下的SEC色谱图。SEC色谱图中观察于滞留时间5.25min时的第一峰对应于CKP-NLP且在滞留时间7.1min时的第三峰对应于游离apoE422k。随着孵育时间增加,观察到CKP-NLP峰减少且游离apoE422k峰增加。NLP峰减少可直接量度NLP降解且通过计算曲线下面积来加以量化。在所有样品中,在滞留时间6.2min时观察到中间峰,且此峰不随孵育时间变化。考虑到所有样品中的此峰及时间点的一致性,峰可能源于血清中的背景污染物。

[0499] 为系统地评估CKP载量对稳定性的效应,使用含有不同量的CKP-C16(0、10和

36CKP/NLP)的CKP-NLP来进行这些实验。相对于时间0h下的峰面积来归一化CKP-NLP SEC峰面积以容许比较不同CKP-NLP。与针对Fab与NLP的结合所报告的效应不同,掺入CKP-C16似乎并不影响整体NLP稳定性(图12B)。所有CKP-NLP样品都显示初始快速降解,其中仅50%的材料在37℃下于2-4小时之后剩余,随后在剩余24小时孵育期内较缓慢地降解。这种降解模式与关于NLP的先前报道极其一致(参见下文的参考文献18、24)。这些发现表明,先前针对Fab与NLP表面的结合所观察的稳定效应(如实例5中所描述)并不转化为具有较小尺寸的分子(Fab为约45kDa且CKP为约3kDa)。不受限于理论,Fab可形成防止与血清蛋白相互作用的物理屏障,这些相互作用可使两亲性纳米颗粒去稳定(Darwish M, Shatz W, Leonard B, Loyet K, Barrett K, Wong JL, Li H, Abraham R, Lin M, Franke Y, Tam C, Mortara K, Zilberleyb I, Blanchette CD, "Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics" Bioconjugate Chemistry, 2020, 31, 8 1995-2007)。先前已报道,需要7的Fab摩尔载量方观察到的Fab结合的稳定效应,该载量对应于向NLP表面添加约315kDa MW。与之相比,86CKP/NLP的最高CKP载量仅构成约260kDa的额外MW。因此,如果由Fab结合所致的稳定化增加主要是通过添加至NLP表面上的MW驱动,则即使在最高CKP载量下也不能达到稳定该NLP所需的MW量。这可解释针对CKP掺入未观察到稳定化效应的原因。或者,稳定化效应不仅源于添加的MW,且也源于结合实体的流体动力学大小。即使可在不破坏整体NLP结构下于表面上加载较多CKP,也可能观察不到稳定化效应。这些综合发现表明,CKP的体内递送的循环半衰期和稳定性存在限制且在应用此技术来治疗疾病时必须考虑这些限制。

[0500] 实例10: Fab-CKP-NLP缀合物的组装、纯化和表征

[0501] 将CKP和Fab二者掺入NLP中将允许研发具有一种以上功能活性的纳米颗粒平台。例如,NLP可包含展现靶向活性(例如HER2、CD20等)的Fab和展现治疗活性的CKP。或者,NLP可包含展现协同治疗活性或互补治疗活性的Fab和CKP。如下所述来评估将CKP和Fab二者掺入NLP中的可能。经研发用于将CKP和Fab二者掺入NLP平台中的策略描述于图13A中。采用相同的CKP-NLP组装方法,且添加官能化PEG脂质以随后结合至含有功能反应性标签的Fab(图13A)。使用马来酰亚胺-硫醇生物结合策略使Fab结合至NLP,其中PEG脂质头部基团具有末端反应性马来酰亚胺且Fab含有C端半胱氨酸氨基酸(参见下文的参考文献18)。用于经由硫醇-马来酰亚胺化学使用经马来酰亚胺甲基环己烷-1-羧酸酯(DOPE-MCC)头部基团官能化的DOPE脂质来结合Fab的策略描述于实例1中。使用DOPE-MCC脂质进行初始先导NLP组装且在将CKP-C16添加至脂质混合物中时始终观察到沉淀,而此现象在使用DSPE-PEG-Ma1时未观察到。因此,使用DSPE-PEG-Ma1来进一步优化Fab与NLP平台的结合。使用10%mol DSPE-PEG-Ma1脂质组装CKP-NLP以确保在NLP表面上具有足够的马来酰亚胺配体密度以供Fab结合。使用含有C端半胱氨酸的人抗因子D Fab作为代用Fab,因为该分子先前已经由硫醇-马来酰亚胺结合成功地结合至PEG聚合物支架(参见下文的参考文献22)和NLP(参见下文的参考文献18)。在基于生物珠粒的胆酸盐去除步骤之后即刻使Fab结合至马来酰亚胺官能化CKP-NLP,且并无CKP-NLP纯化步骤。使用此方式来最小化结合之前的马来酰亚胺水解可能。在Fab:CKP-NLP摩尔比为20下进行初始先导结合。将Fab与CKP-NLP一起孵育2-3小时且较DSPE-PEG-Ma1以2倍摩尔浓度添加NAC以淬灭未反应马来酰亚胺并防止DOPE-MCC:apoE422k交联,如先前所描述(参见下文的参考文献16)。通过SEC纯化Fab-CKP-NLP且在SEC色谱图中

观察到以下三个主峰:Fab-CKP-NLP缀合物( $rt \sim 10\text{min}$ )、Fab二聚体( $rt \sim 14\text{min}$ )和未结合的Fab( $rt \sim 16\text{min}$ ) (图13B)。在结合反应之后存在Fab二聚体是由于在结合步骤期间经由二硫化物形成在C端硫醇处发生二聚化,如先前所描述(参见下文的参考文献18)。收集跨越NLP峰中心的馏分,汇集并进行HPLC和SEC-MALS分析。经纯化和还原的Fab-CKP-NLP样品的示例性HPLC色谱图展示于图13C中。在1.75、2.05、2.8、3.1、3.4和3.95min的滞留时间下观察到峰且分别对应于Fab轻链、DSPE-PEG-Mal、apoE422k、CKP-C16、Fab重链-DSPE-PEG-Mal缀合物和DOPC。生成每一组分的标准曲线并使用其来量化CKP-C16掺入和Fab结合。图13C中所示的示例性HPLC色谱图对应于18CKP/NLP和23Fab/NLP。如针对CKP-NLP所描述,也通过SEC-MALS测量粒度(图13D-13E)。Fab-CKP-NLP峰的MW可变性(220kDa至1500kDa,其中平均MW为700kDa)显著宽于CKP-NLP(200kDa至400kDa,其中整个峰中的平均MW为266kDa)(图13D)。也观察到整个Fab-CKP-NLP峰中的 $R_h$ 具有类似可变性趋势。不受限于理论,Fab-CKP-NLP的MW和 $R_h$ 的可变性增加可能是因为所结合Fab数/NLP的分布。基于该Fab-CKP-NLP样品的HPLC分析,每NLP平均具有20个Fab;然而,Fab/NLP的分布是高斯分布且预计可看到Fab介于0(MW $\sim 300\text{kDa}$ )至30(MW $\sim 1500\text{kDa}$ )的CKP-NLP。整个Fab-CKP-NLP峰中的 $R_h$ 可变性(图13E)类似于CKP-NLP(约2倍)(图10E)。先前已报道,使Fab和蛋白质结合至NLP对 $R_h$ 的影响显著小于MW,此乃因盘形NLP的大小主要取决于直径而非双层高度,双层高度最受蛋白质与NLP表面的结合影响(参见下文的参考文献18)。这些发现与这一假设一致。

[0502] 实例11:CKP和Fab载量对最大Fab结合、Fab-CKP-NLP大小、CKP活性和Fab-CKP-NLP稳定性的效应

[0503] 如下所述来检验CKP加载密度和Fab加载密度对Fab-CKP-NLP大小、活性和血清稳定性的影响。使用10mol%DOPE-PEG-Mal在两个CKP加载密度:12.7CKP/NLP(称为“低CKP-NLP”)和40CKP/NLP(称为“高CKP-NLP”)下组装CKP-NLP且以不同Fab:CKP-NLP比率结合至Fab。图14A示出了以介于0至150之间的Fab:CKP-NLP比率缀合物Fab的低CKP-NLP的SEC色谱图。最高Fab:NLP比率150对应于约1Fab:1DSPE-PEG-Mal。随着Fab浓度增加,CKP-NLP峰逐渐增加直至在约150下达到饱和值。随着Fab结合比率的增加,观察到Fab二聚体和未结合Fab峰的逐渐增加。该结果可重复于高CKP-NLP中且如实例6中所描述来量化Fab结合量(图14B)。对于两种CKP组合物而言,在反应中的Fab:NLP比率自0增加至100时,观察到结合Fab载量(实际上附接至NLP的量)发生线性增加。然而,在较高比率下观察到极小Fab载量增加且结合至NLP表面的饱和Fab量经测定为约50Fab/NLP(图14B)。与之相比,先前已报道,在经由DOPE-MCC脂质在10mol%DOPE-MCC-脂质组合物下直接结合至NLP表面时,最大Fab承载能力为30。这种最大承载能力经证实取决于可用NLP表面积,且在NLP表面积与由30个Fab占据的总表面积之间存在很强的相关性。CKP-NLP的表面积类似于Darwish M, Shatz W, Leonard B, Loyet K, Barrett K, Wong JL, Li H, Abraham R, Lin M, Franke Y, Tam C, Mortara K, Zilberleyb I, Blanchette CD, “Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics” *Bioconjugate Chemistry*, 2020, 31, 8 1995-2007中所描述的,且由此Fab载量增加可能不归因于表面积增加。观察到在不存在CKP下Fab结合能力的类似增加,从而表明这种效应并非因为在NLP表面上存在CKP。在此研究中,Fab并不直接结合至表面,而是结合至自NLP表面延伸的PEG2000连接体。因此,似乎可能的是,间隔区增加整体缀合物积且限制空间位阻,从而与直接结合至NLP表面相比容许较高数量的Fab结合至

NLP。CKP密度对Fab载量并无显著影响(图14B)。因此,考虑到在较高CKP载量下可能具有较大空间位阻,该结果较为意外。不受限于理论,PEG连接体可消除来自CKP的任何立体影响,此乃因其在NLP表面与用于Fab加载的结合手柄之间产生间隔区。

[0504] 为进一步评估Fab载量对NLP大小的影响,通过SEC-MALS在不同Fab载量下测量高CKP NLP和低CKP NLP的 $R_h$ (图14C)。在Fab载量自0Fab/NLP增加至10Fab/NLP时观察到 $R_h$ 增加且随着Fab载量自10Fab/NLP增加至50Fab/NLP仅观察到极小增加。这些结果与先前发现一致(参见下文的参考文献9、11、18)且表明,Fab结合并不改变NLP的盘形性质且NLP直径及表面积(而非Fab载量)是 $R_h$ 的驱动因素。

[0505] Fab与NLP表面的结合可产生分析物与CKP的相互作用的潜在物理屏障。因此,为评估Fab载量对CKP活性的影响,评估具有不同Fab密度的低CKP-NLP和高CKP-NLP中的CKP活性(图14D)。Fab密度并不影响高CKP-NLP制剂和低CKP-NLP制剂中的CKP活性,且样品之间的受质抑制常数( $K_i^{app}$ )的差异在分析误差内(0.3-0.05nM)。与之相比且如实例8中所论述,在不存在Fab结合下观察到CKP活性降低。观察于Fab-CKP-NLP中的这些意外结果可高度重现。这些结果指示,Fab载量可可靠地控制于1-50Fab/CKP-NLP,Fab加载程度并不依赖于CKP密度,且Fab结合似乎并不影响CKP活性,不论Fab密度如何。不受限于理论,Fab可能非特异性地结合至胰蛋白酶,从而增加NLP表面处的有效胰蛋白酶浓度。也似乎可能的是,如果CKP-C16相分离成斑块而导致在不存在Fab结合下活性降低,则在Fab结合之后此效应得以减轻以恢复活性。

[0506] 如实例5中所描述,Fab结合可对NLP稳定性具有显著影响,此可能因为提供了抵抗血清蛋白的立体屏障。为确定这些发现是否可扩展至CKP-NLP平台,在50%血清中对Fab-CKP-NLP(50Fab/NLP和20CKP/NLP)与CKP-NLP(20CKP/NLP)的稳定性进行比较(图14E)。如已针对“空”NLP(即尚未加载CKP和/或Fab的NLP)所观察,Fab结合对CKP-NLP稳定性具有显著影响。CKP-NLP可快速降解且在前4h内超过50%的颗粒已降解。与之相比,Fab-CKP-NLP令人意外地稳定且超过75%的材料在24h内保持完整。不受限于理论,这些发现表明,即使在Fab经由PEG间隔区且在其他分子肽实体存在下附接于NLP表面上时,Fab层的稳定效应也得以维持。

[0507] 实例7-11的结论

[0508] 实例7-11描述CKP-NLP和Fab-CKP-NLP缀合物的研发和表征。对于CKP掺入而言,研发自组装策略,其中向CKP附加C16烃尾,从而使得能够在组装过程期间分配至双层核心且将CKP显示于NLP表面上。NLP能够容纳最多约60个CKP-C16分子而不影响NLP组装过程。CKP-C16掺入至NLP轻微降低CKP胰蛋白酶抑制活性,但分子仍然高效(亚纳米摩尔结合剂)。发现CKP-NLP稳定性与单独NLP相当且在37℃下于50%血清中具有相对较短的半衰期(约1h)。通过引入硫醇反应性马来酰亚胺脂质来使Fab结合至NLP平台,其中马来酰亚胺基团附接至PEG间隔区。使用此结合策略,Fab载量可可靠地控制于1-50Fab/CKP-NLP且Fab加载程度并不依赖于CKP密度。Fab结合也不影响CKP活性,不论Fab密度如何。最后,Fab结合对于改良CKP-NLP稳定性具有显著影响且超过75%的Fab-CKP-NLP在37℃下孵育24h之后保持完整。这些综合发现表明,NLP是用于潜在递送肽样候选药物的有前景平台。此外,可经由使靶向或治疗性Fab结合至CKP-NLP来实现靶向或多药物递送。

[0509] 实例6-11的参考文献

- [0510] (1) Ackerman, S.E., Currier, N.V., Bergen, J.M. 及 Cochran, J.R. (2014) Cystine-knot peptides: emerging tools for cancer imaging and therapy. *Expert Rev Proteomics* 11, 561-72.
- [0511] (2) Gao, X., Stanger, K., Kaluarachchi, H., Maurer, T., Ciepla, P., Chalouni, C., Franke, Y. 及 Hannoush, R.N. (2016) Cellular uptake of a cystine-knot peptide and modulation of its intracellular trafficking. *Sci Rep* 6, 35179.
- [0512] (3) Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. 及 Avrutina, O. (2012) Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design. *Molecules* 17, 12533-52.
- [0513] (4) Bazak, R., Hourri, M., El Achy, S., Kamel, S. 及 Refaat, T. (2015) Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 769-84.
- [0514] (5) Fischer, N.O., Blanchette, C.D., Segelke, B.W., Corzett, M., Chromy, B.A., Kuhn, E.A., Bench, G. 及 Hoeprich, P.D. (2010) Isolation, characterization, and stability of discretely-sized nanolipoprotein particles assembled with apolipoprotein III. *PLoS One* 5, e11643.
- [0515] (6) Blanchette, C.D., Law, R., Benner, W.H., Pesavento, J.B., Cappuccio, J.A., Walsworth, V., Kuhn, E.A., Corzett, M., Chromy, B.A., Segelke, B.W., Coleman, M.A., Bench, G., Hoeprich, P.D. 及 Sulchek, T.A. (2008) Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations. *J Lipid Res* 49, 1420-30.
- [0516] (7) Martinez, D., Decossas, M., Kowal, J., Frey, L., Stahlberg, H., Dufourc, E.J., Riek, R., Habenstein, B., Bibow, S. 及 Loquet, A. (2017) Lipid Internal Dynamics Probed in Nanodiscs. *Chemphyschem* 18, 2651-2657.
- [0517] (8) Mors, K., Roos, C., Scholz, F., Wachtveitl, J., Dotsch, V., Bernhard, F. 及 Glaubitz, C. (2013) Modified lipid and protein dynamics in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1222-9.
- [0518] (9) Fischer, N.O., Weilhammer, D.R., Dunkle, A., Thomas, C., Hwang, M., Corzett, M., Lychak, C., Mayer, W., Urbin, S., Collette, N., Chiun Chang, J., Loots, G.G., Rasley, A. 及 Blanchette, C.D. (2014) Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One* 9, e93342.
- [0519] (10) Fischer, N.O., Rasley, A., Corzett, M., Hwang, M.H., Hoeprich, P.D. 及 Blanchette, C.D. (2013) Colocalized delivery of adjuvant and antigen using nanolipoprotein particles enhances the immune response to recombinant antigens. *J Am Chem Soc* 135, 2044-7.
- [0520] (11) Blanchette, C.D., Fischer, N.O., Corzett, M., Bench, G. 及 Hoeprich, P.D. (2010) Kinetic analysis of his-tagged protein binding to nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 21, 1321-30.

- [0521] (12) He, W., Felderman, M., Evans, A.C., Geng, J., Homan, D., Bourguet, F., Fischer, N.O., Li, Y., Lam, K.S., Noy, A., Xing, L., Cheng, R.H., Rasley, A., Blanchette, C.D., Kamrud, K., Wang, N., Gouvis, H., Peterson, T.C., Hubby, B. 及 Coleman, M.A. (2017) Cell-free production of a functional oligomeric form of a Chlamydia major outer-membrane protein (MOMP) for vaccine development. *J Biol Chem* 292, 15121-15132.
- [0522] (13) Tufteland, M., Pesavento, J.B., Bermingham, R.L., Hoeprich, P.D., Jr. 及 Ryan, R.O. (2007) Peptide stabilized amphotericin B nanodisks. *Peptides* 28, 741-6.
- [0523] (14) Jia, J., Xiao, Y., Liu, J., Zhang, W., He, H., Chen, L. 及 Zhang, M. (2012) Preparation, characterizations, and in vitro metabolic processes of paclitaxel-loaded discoidal recombinant high-density lipoproteins. *J Pharm Sci* 101, 2900-8.
- [0524] (15) Weilhammer, D., Dunkle, A.D., Blanchette, C.D., Fischer, N.O., Corzett, M., Lehmann, D., Boone, T., Hoeprich, P., Driks, A. 及 Rasley, A. (2017) Enhancement of antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses using a self-assembled biologic nanolipoprotein particle vaccine. *Vaccine* 35, 1475-1481.
- [0525] (16) Kuai, R., Sun, X., Yuan, W., Xu, Y., Schwendeman, A. 及 Moon, J.J. (2018) Subcutaneous Nanodisc Vaccination with Neoantigens for Combination Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem* 29, 771-775.
- [0526] (17) Weilhammer, D.R., Blanchette, C.D., Fischer, N.O., Alam, S., Loots, G.G., Corzett, M., Thomas, C., Lychak, C., Dunkle, A.D., Ruitenber, J.J., Ghanekar, S.A., Sant, A.J. 及 Rasley, A. (2013) The use of nanolipoprotein particles to enhance the immunostimulatory properties of innate immune agonists against lethal influenza challenge. *Biomaterials* 34, 10305-18.
- [0527] (18) Darwish, M., Shatz, W., Leonard, B., Loyet, K., Barrett, K., Wong, J.L., Li, H., Abraham, R., Lin, M., Franke, Y., Tam, C., Mortara, K., Zilberleyb, I. 及 Blanchette, C. (2020) Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics. *Bioconjug Chem* 31, 1995-2007.
- [0528] (19) Fischer, N.O., Blanchette, C.D., Chromy, B.A., Kuhn, E.A., Segelke, B.W., Corzett, M., Bench, G., Mason, P.W. 及 Hoeprich, P.D. (2009) Immobilization of His-tagged proteins on nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 20, 460-5.
- [0529] (20) Zhang, Y.N., Appleton, B.A., Wiesmann, C., Lau, T., Costa, M., Hannoush, R.N. 及 Sidhu, S.S. (2009) Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides. *Nat Chem Biol* 5, 217-219.
- [0530] (21) Fischer, N.O., Infante, E., Ishikawa, T., Blanchette, C.D., Bourne, N., Hoeprich, P.D. 及 Mason, P.W. (2010) Conjugation to nickel-chelating nanolipoprotein particles increases the potency and efficacy of subunit vaccines to prevent West Nile encephalitis. *Bioconjug Chem* 21, 1018-22.

- [0531] (22) Shatz, W., Hass, P.E., Peer, N., Paluch, M.T., Blanchette, C., Han, G., Sandoval, W., Morando, A., Loyet, K.M., Bantsev, V., Booler, H., Crowell, S., Kamath, A., Scheer, J.M. 及 Kelley, R.F. (2019) Identification and characterization of an octameric PEG-protein conjugate system for intravitreal long-acting delivery to the back of the eye. *PLoS One* 14, e0218613.
- [0532] (23) Gao, T., Blanchette, C.D., He, W., Bourguet, F., Ly, S., Katzen, F., Kudlicki, W.A., Henderson, P.T., Laurence, T.A., Huser, T. 及 Coleman, M.A. (2011) Characterizing diffusion dynamics of a membrane protein associated with nanolipoproteins using fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Sci* 20, 437-47.
- [0533] (24) Gilmore, S.F., Blanchette, C.D., Scharadin, T.M., Hura, G.L., Rasley, A., Corzett, M., Pan, C.X., Fischer, N.O. 及 Henderson, P.T. (2016) Lipid Cross-Linking of Nanolipoprotein Particles Substantially Enhances Serum Stability and Cellular Uptake. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, 20549-57.
- [0534] (25) Gilmore, S.F., Carpenter, T.S., Ingolfsson, H.I., Peters, S.K.G., Henderson, P.T., Blanchette, C.D. 及 Fischer, N.O. (2018) Lipid composition dictates serum stability of reconstituted high-density lipoproteins: implications for in vivo applications. *Nanoscale* 10, 7420-7430.
- [0535] (26) Lichtenberg, D., Ahyayauch, H. 及 Goni, F.M. (2013) The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophys J* 105, 289-99.
- [0536] (27) Shuai, W., Das, R.K., Naghdi, M., Brar, S.K. 及 Verma, M. (2017) A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnol Appl Biochem* 64, 496-508.
- [0537] (28) Bagheri, M., Beyermann, M. 及 Dathe, M. (2009) Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1132-41.

## 序列表

&lt;110&gt; 基因泰克公司

&lt;120&gt; 纳米脂蛋白-多肽缀合物和组合物、系统以及其使用方法

&lt;130&gt; 14639-20528.40

&lt;140&gt; 尚未分配

&lt;141&gt; 与此同时

&lt;150&gt; US 63/151,591

&lt;151&gt; 2021-02-19

&lt;150&gt; US 63/038,075

&lt;151&gt; 2020-06-11

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; 用于 Windows 的 FastSEQ,4.0 版

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 喷瓜 (Ecballium elaterium)

&lt;400&gt; 1

Gly Cys Pro Arg Ile Leu Met Arg Cys Lys Gln Asp Ser Asp Cys Leu

1 5 10 15

Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys Gly

20 25

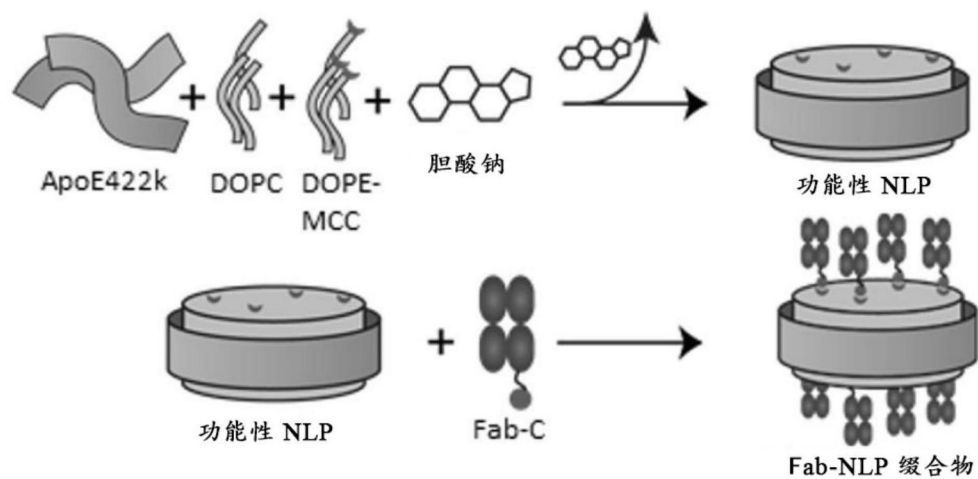


图1A

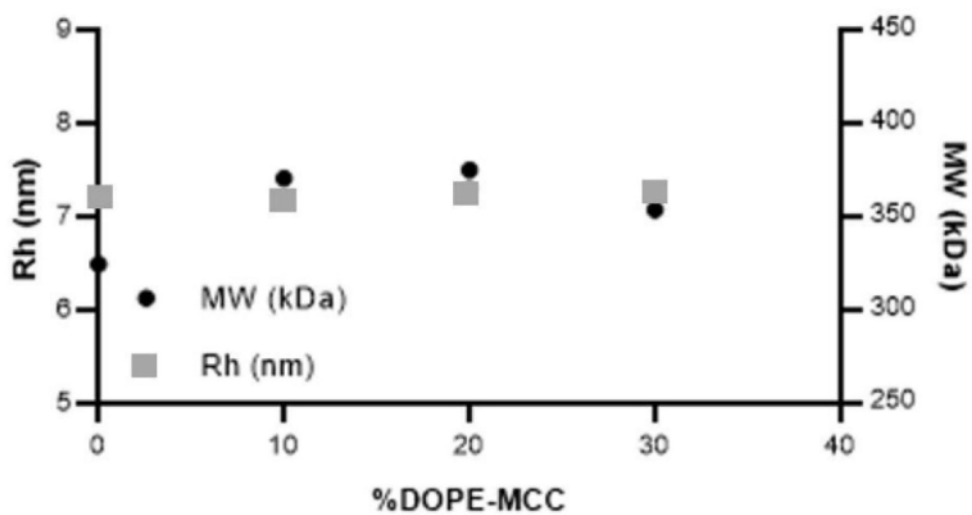


图1B

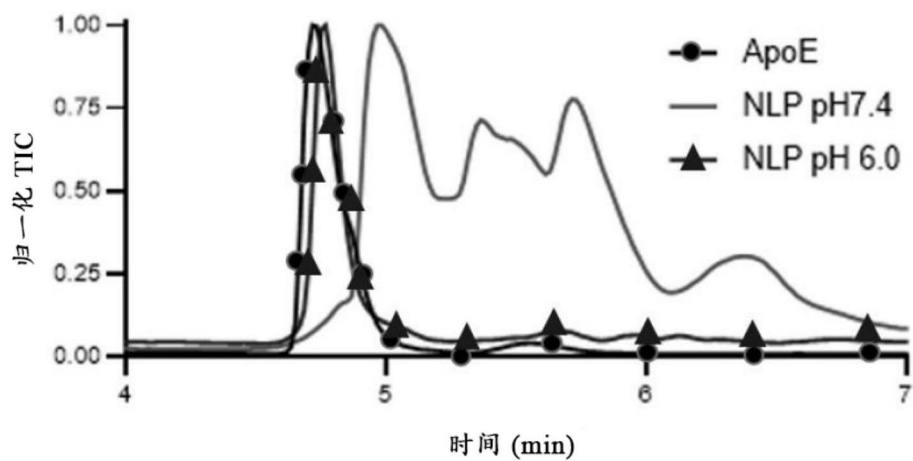


图1C

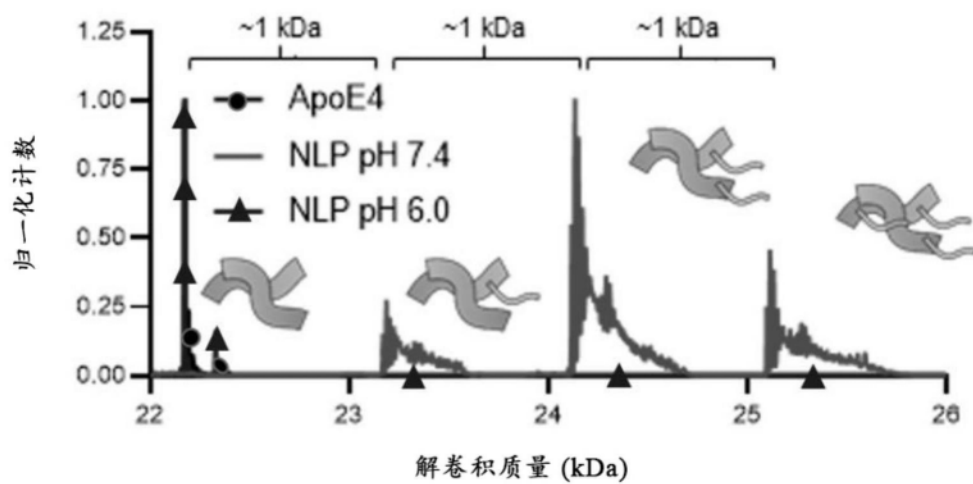


图1D

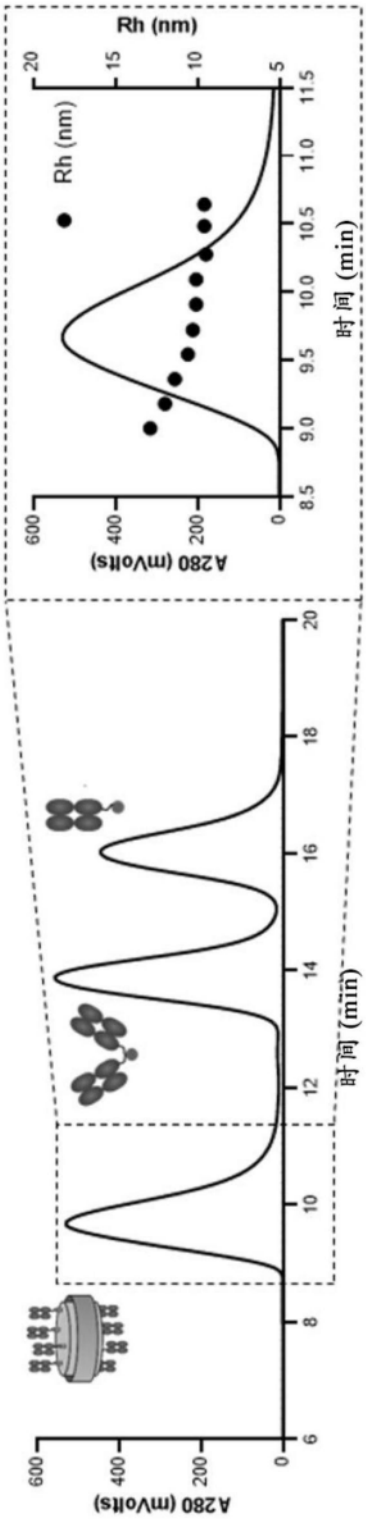


图2A

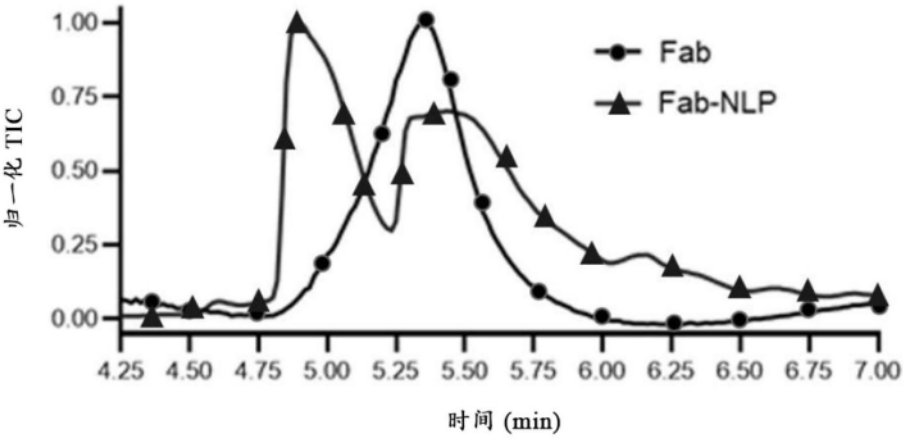


图2B

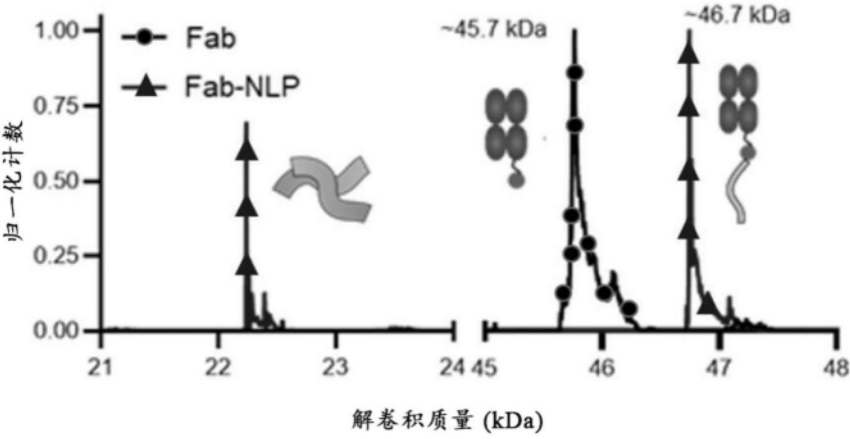


图2C

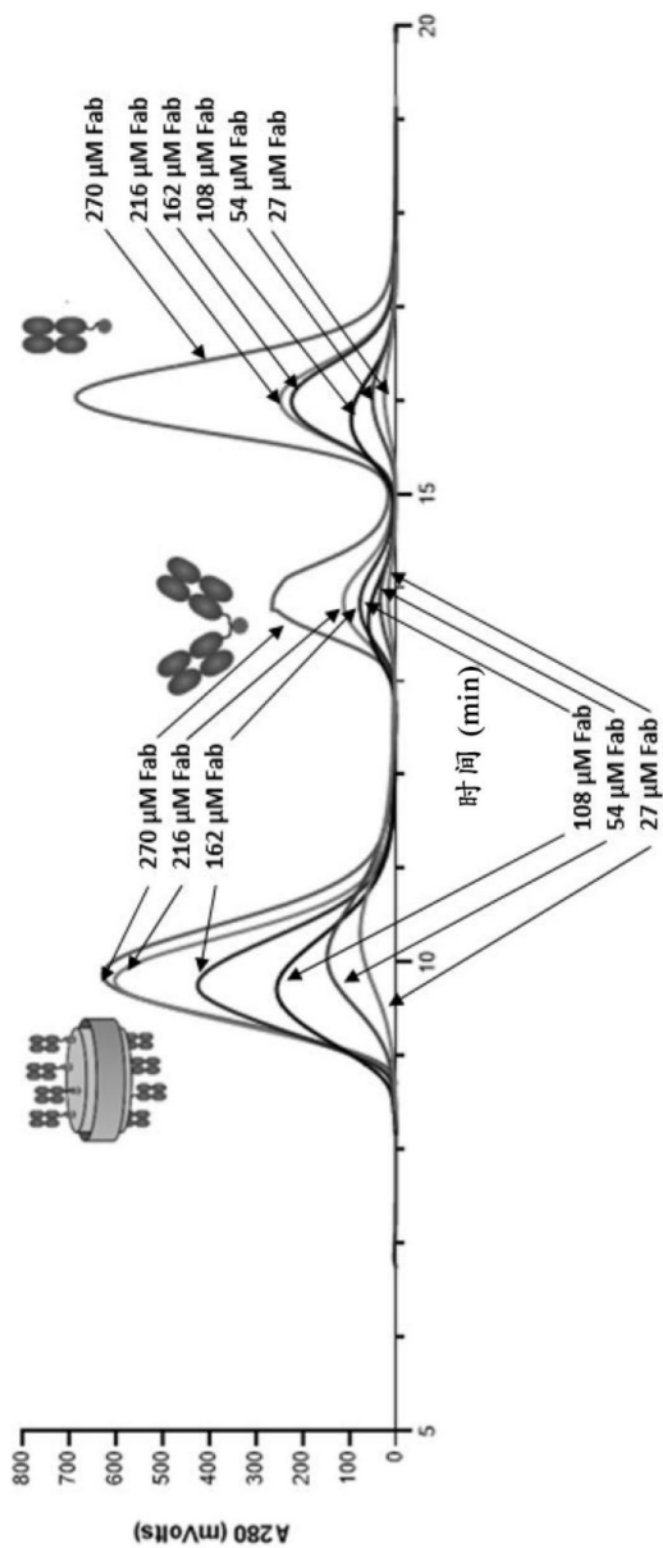


图3A

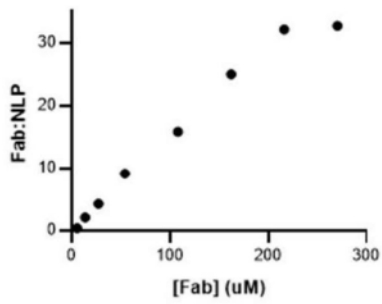


图3B

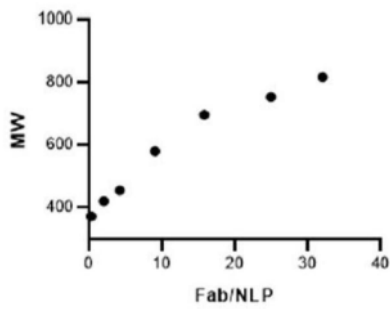


图3C

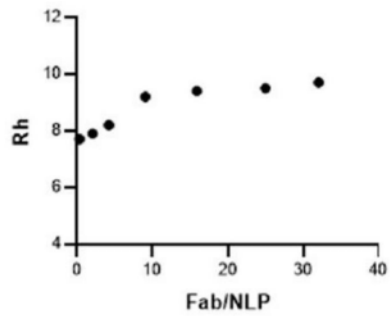


图3D

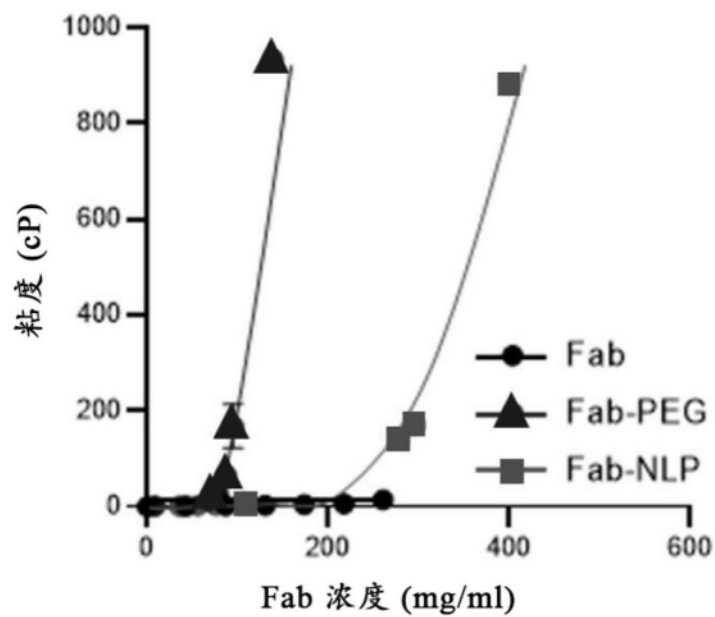


图4A

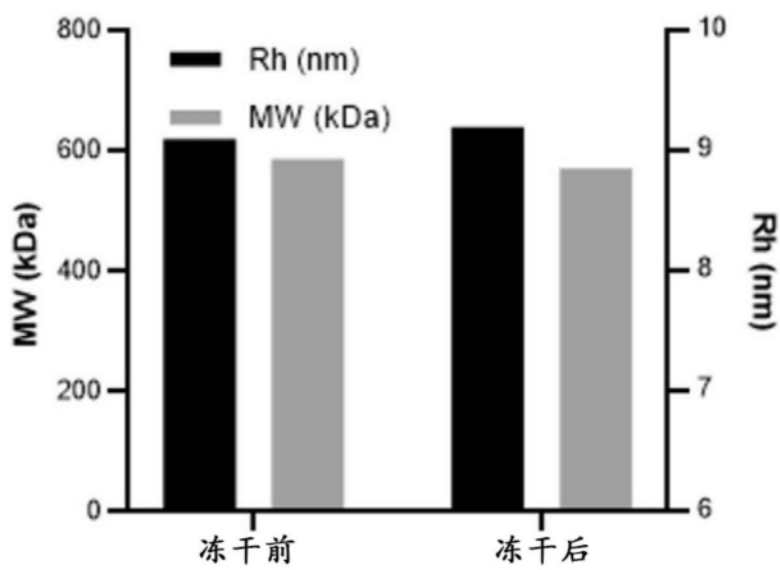


图4B

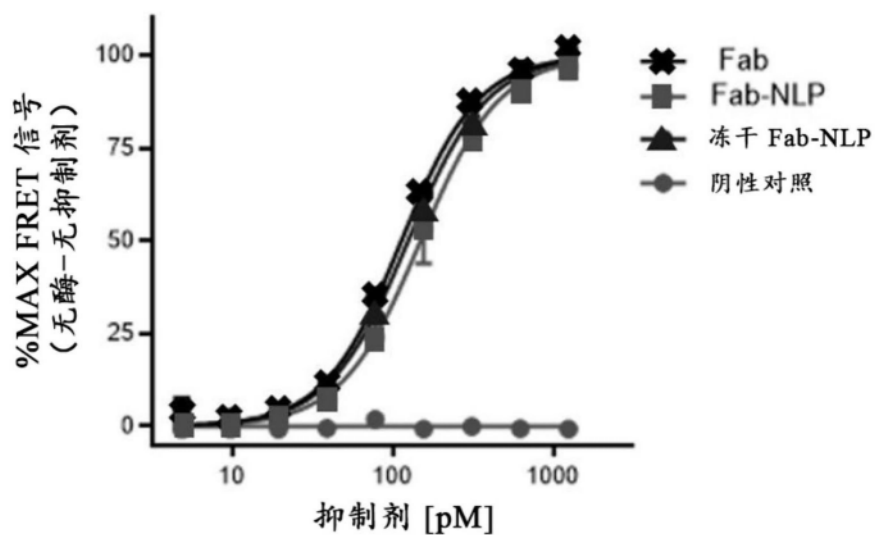


图5A

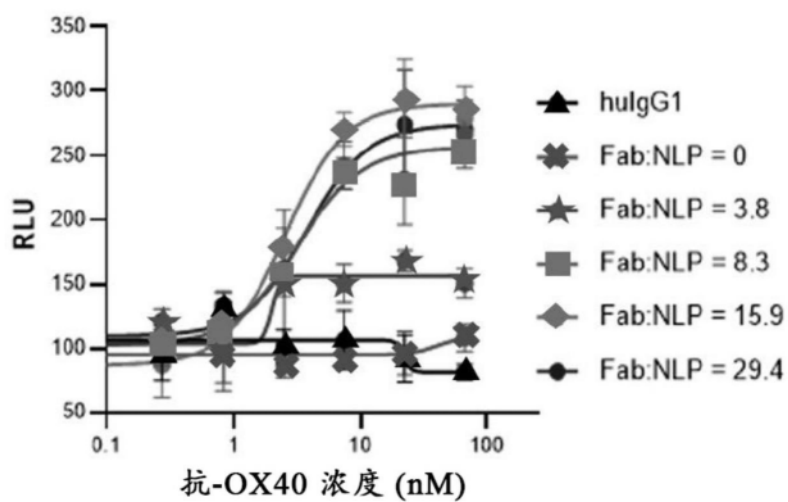


图5B

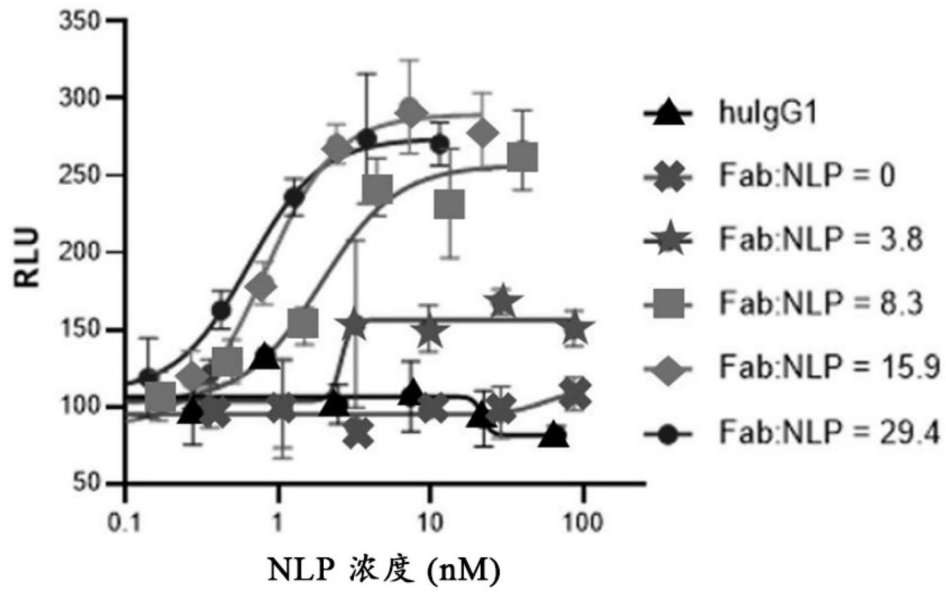


图5C

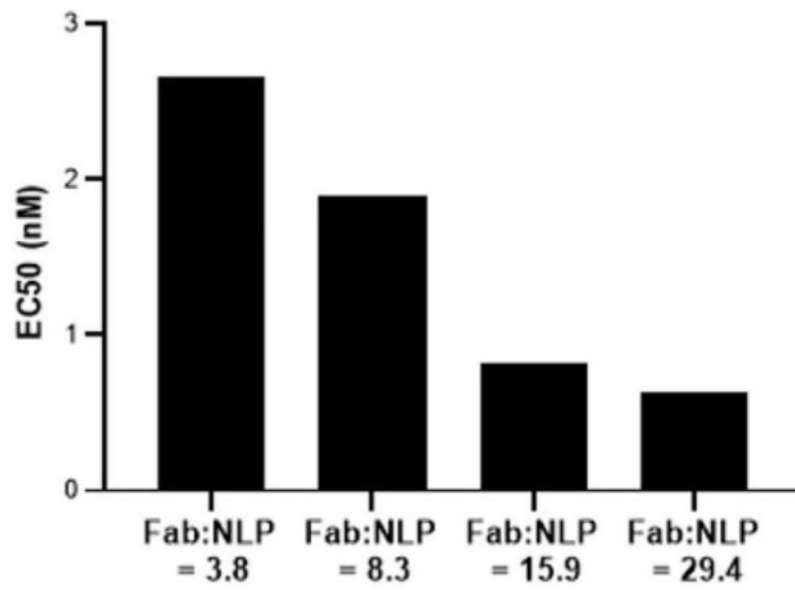


图5D

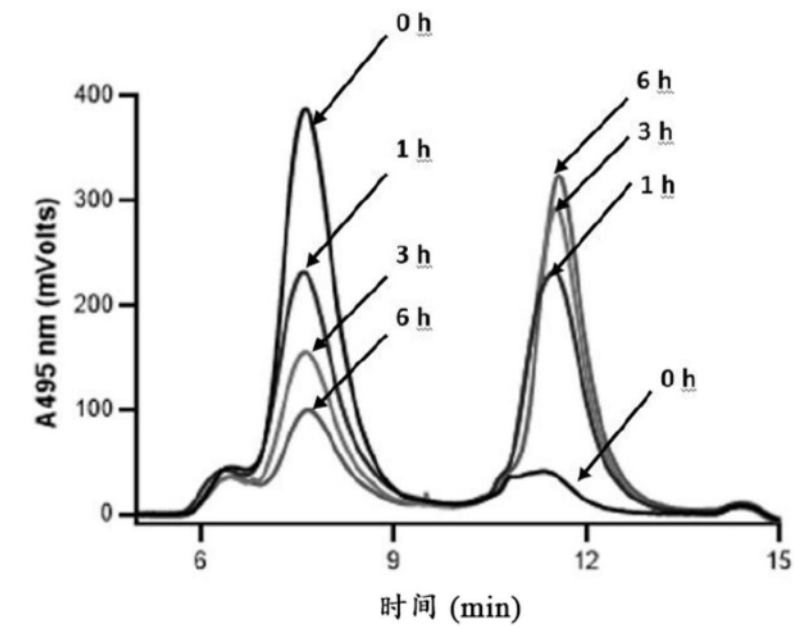


图6A

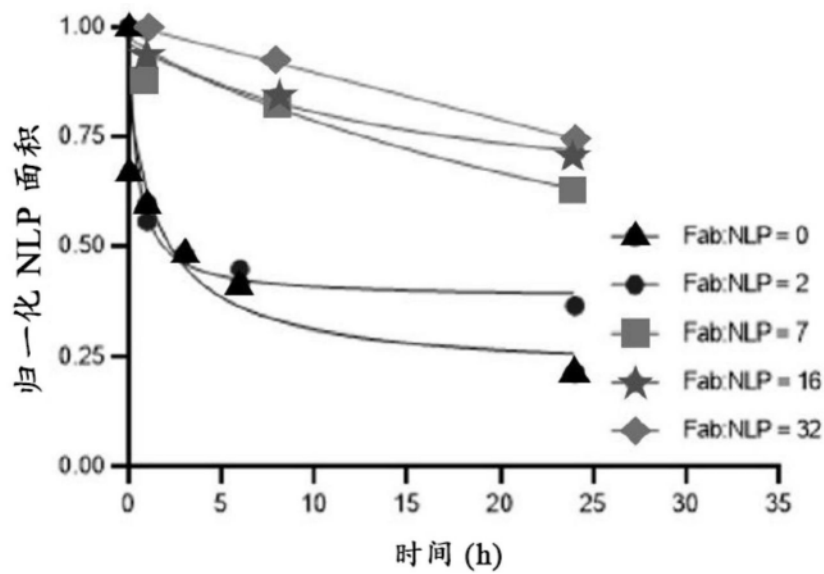


图6B

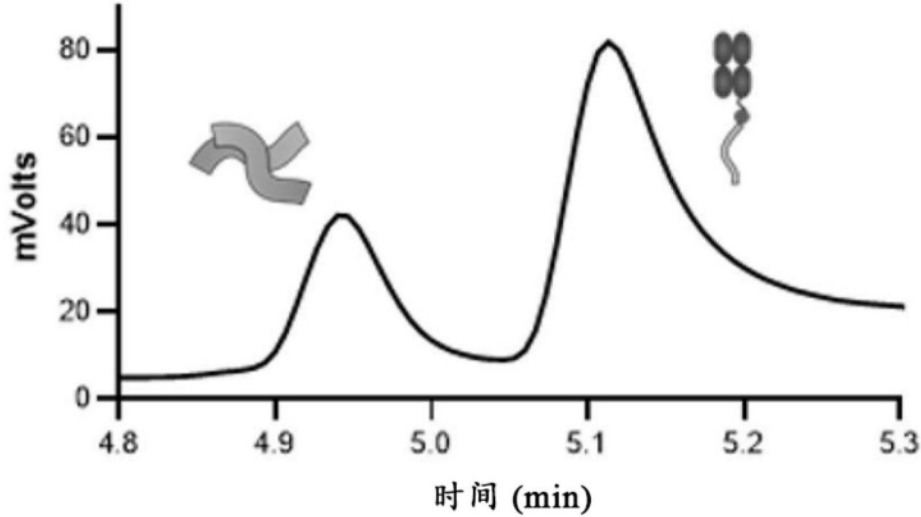


图7A

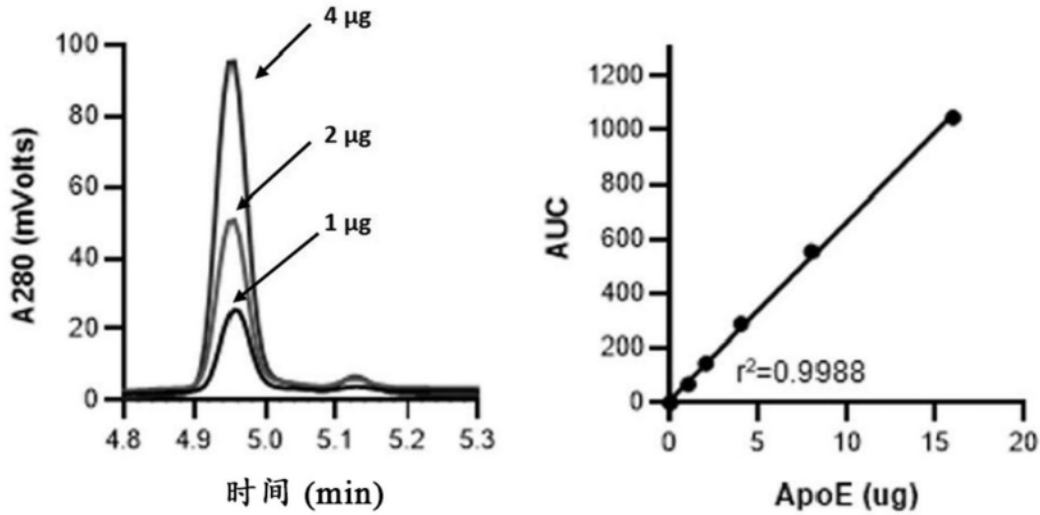


图7B

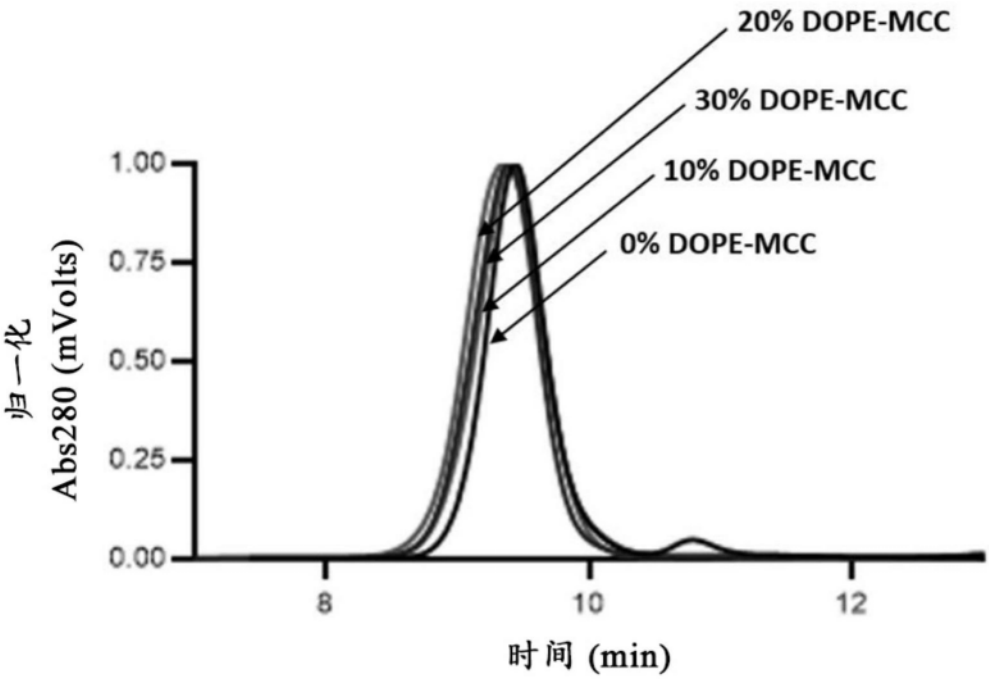


图8A

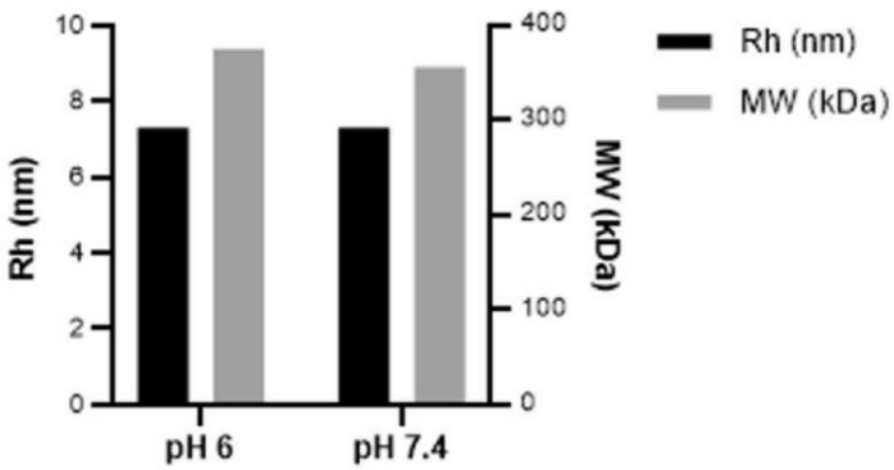


图8B



图9A

线性肽合成/纯化



分析型折叠测试



大规模折叠/HPLC 纯化



LC-MS 分析 (QC)

图9B

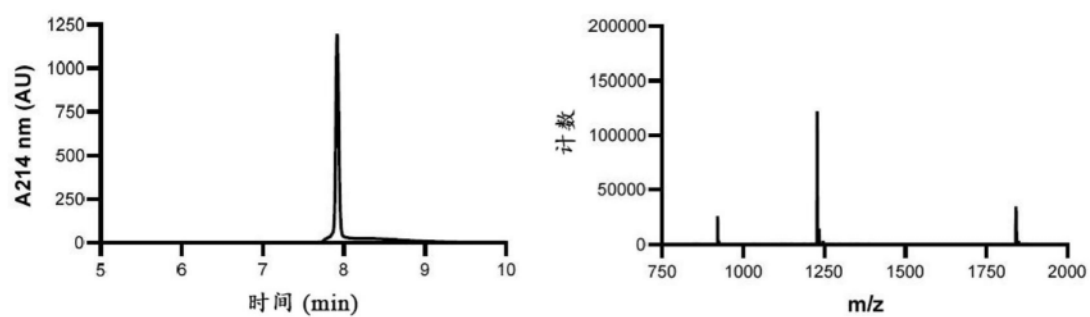


图9C

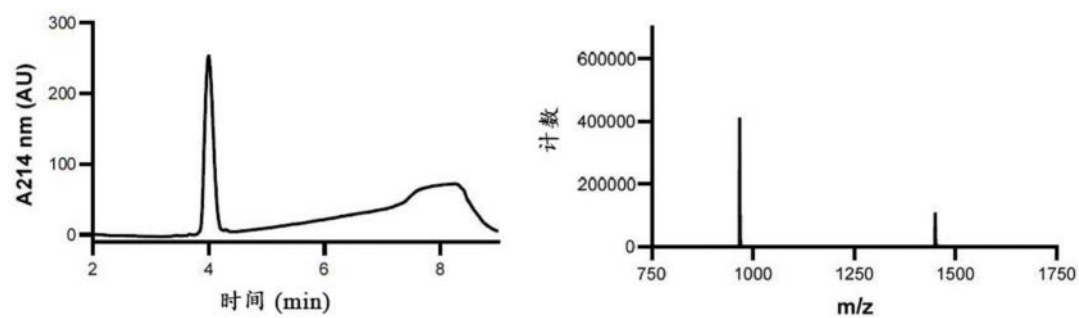


图9D

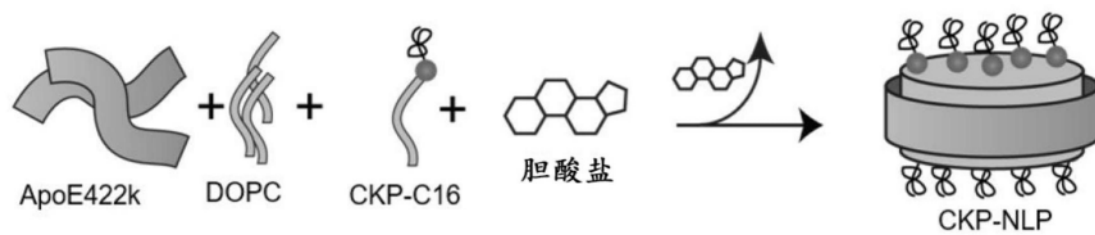


图10A

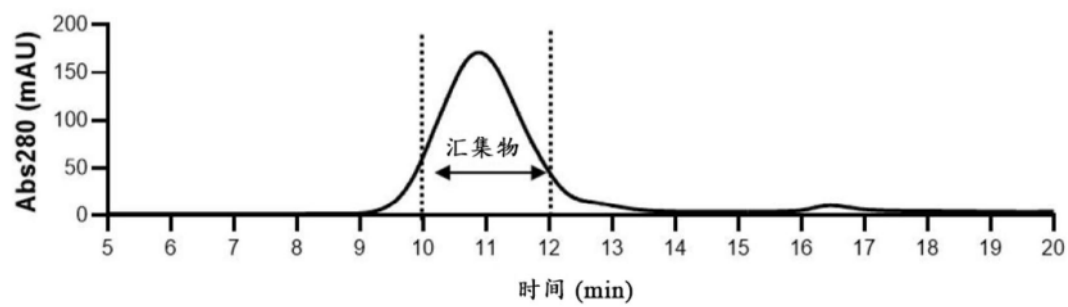


图10B

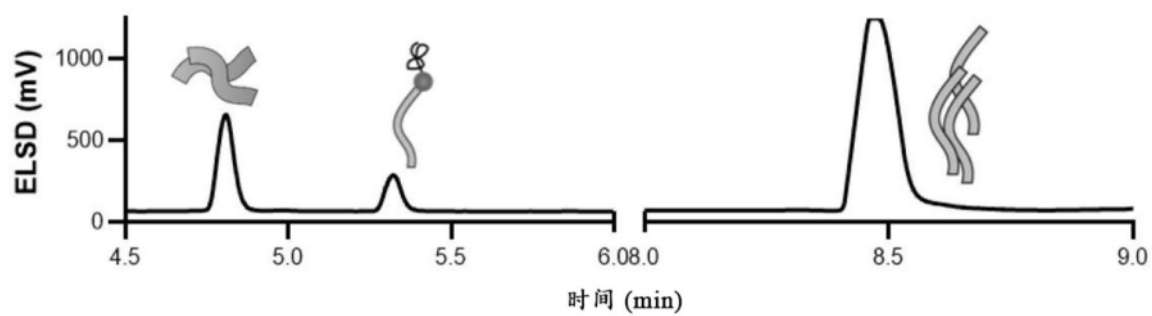


图10C

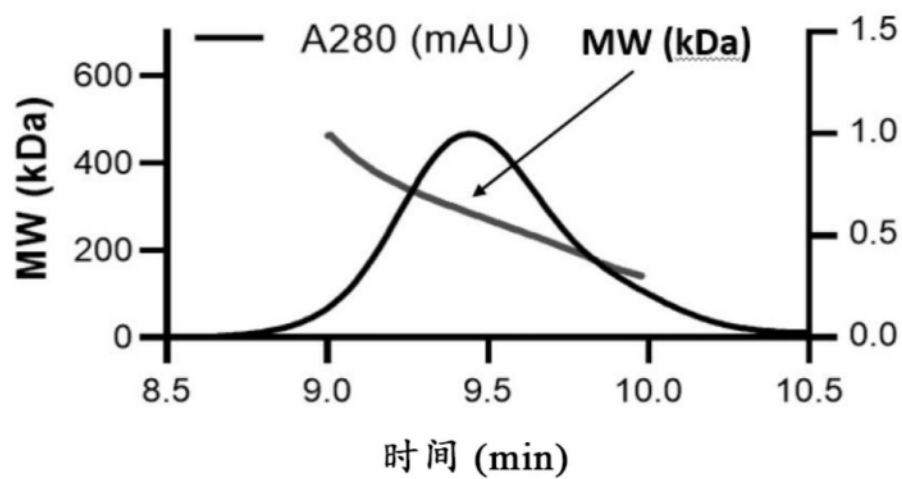


图10D

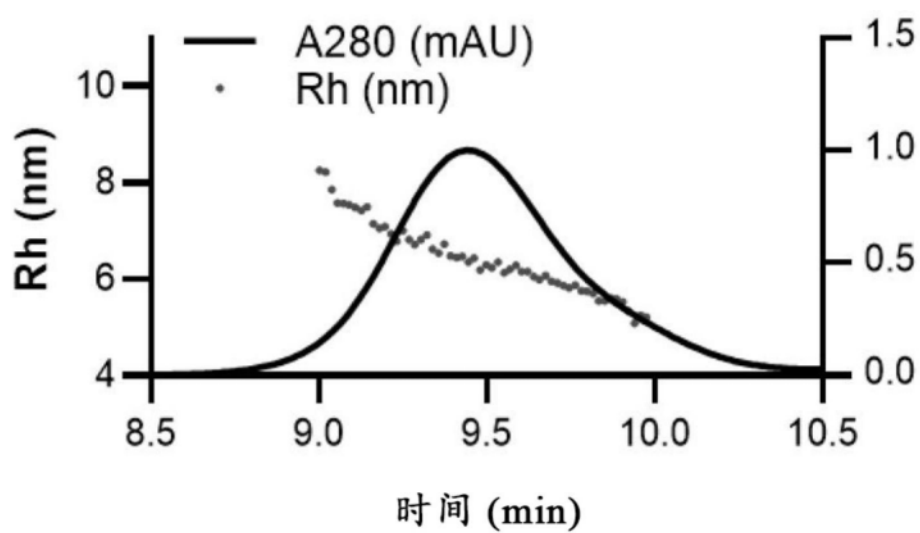


图10E

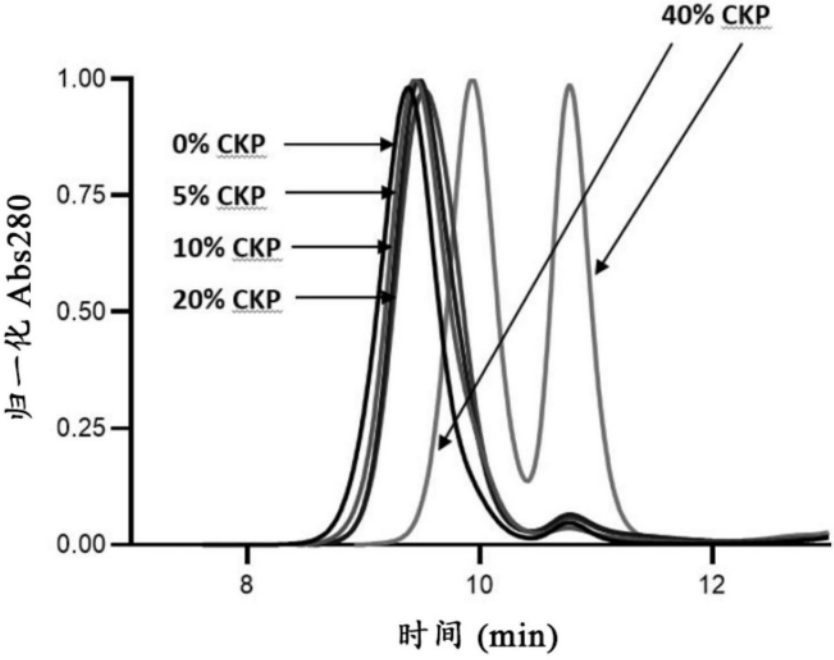


图11A

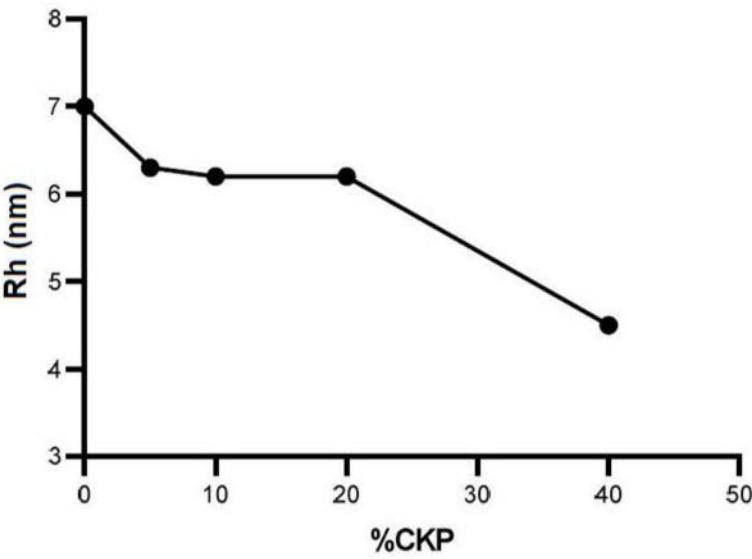


图11B

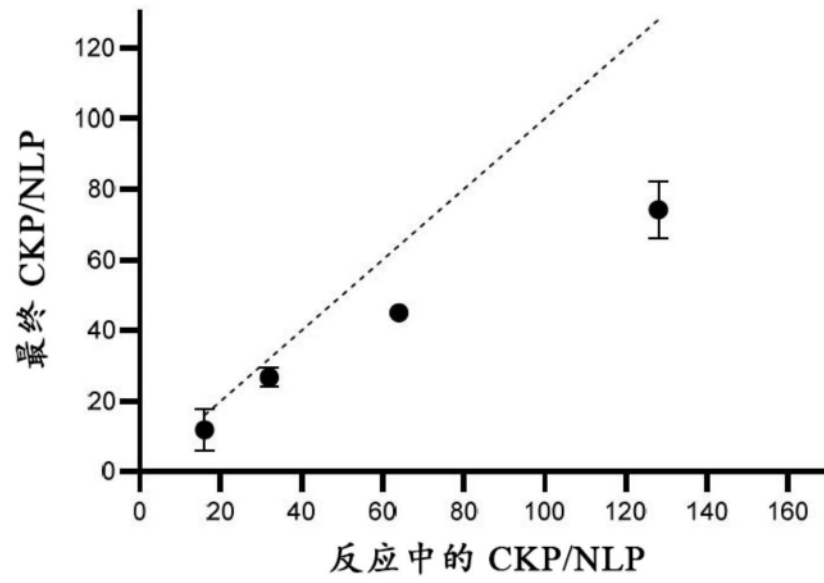


图11C

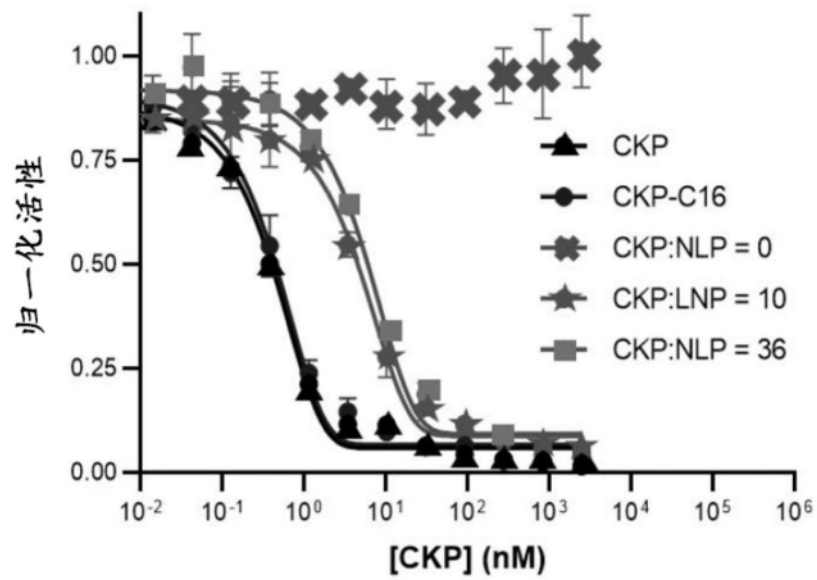


图11D

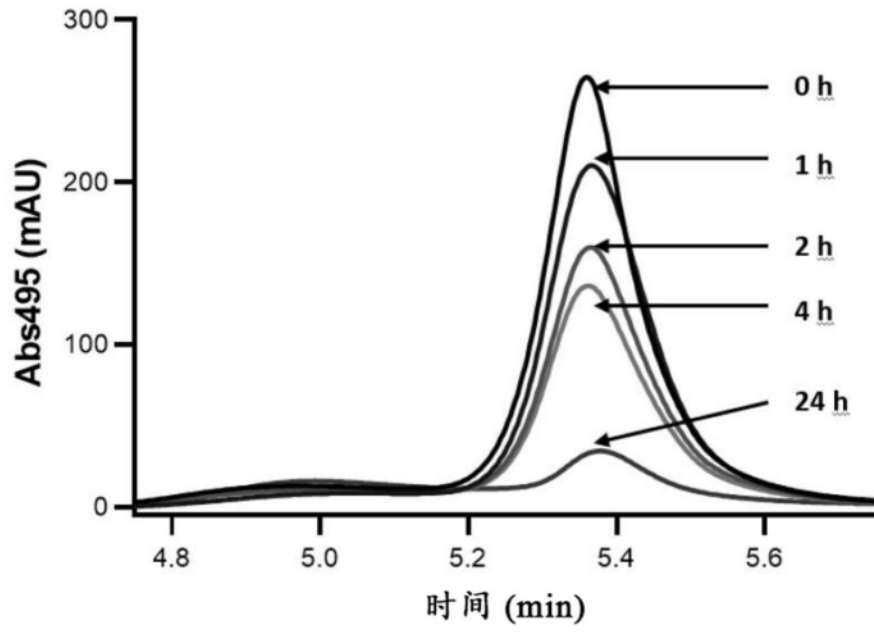


图12A

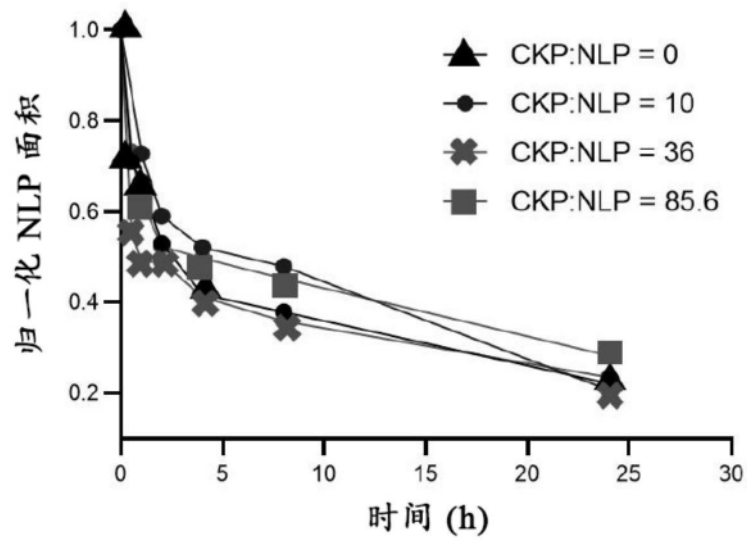


图12B

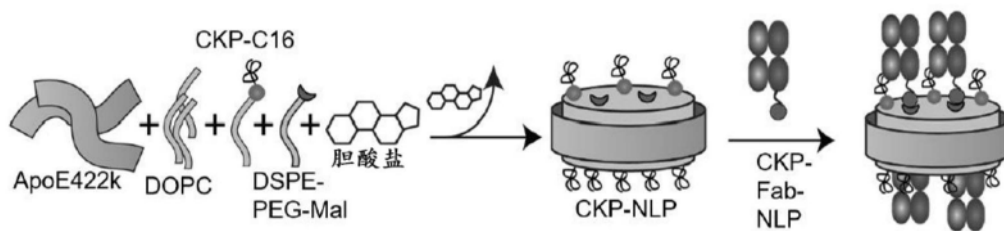


图13A

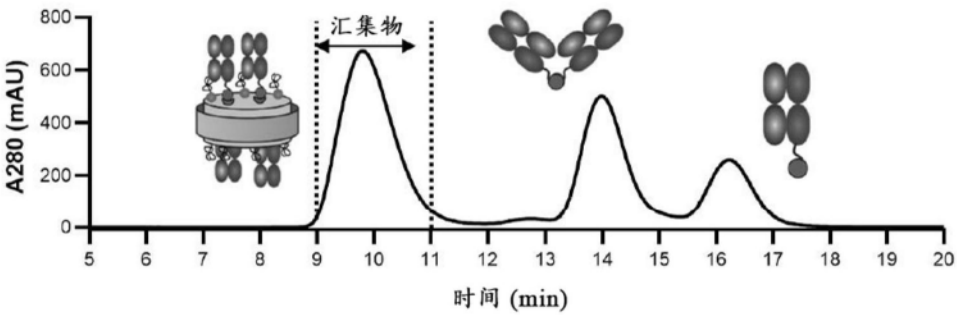


图13B

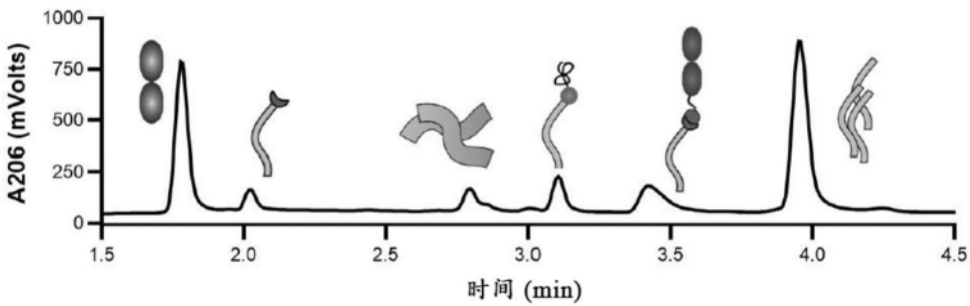


图13C

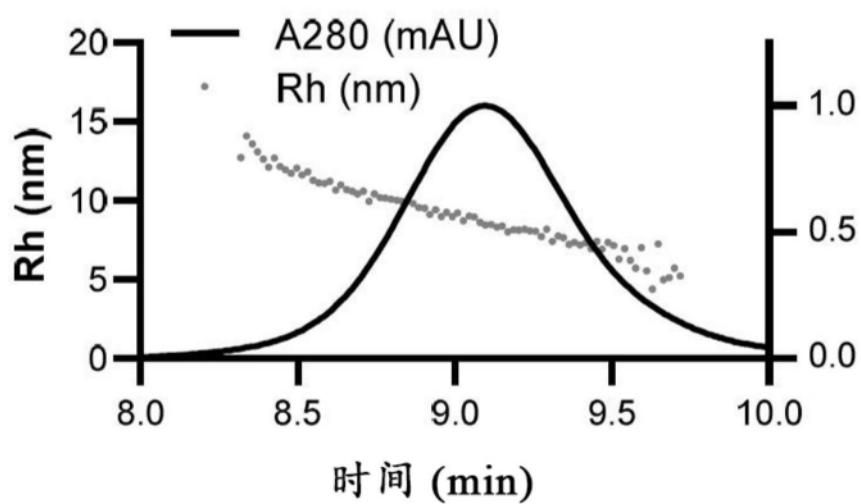
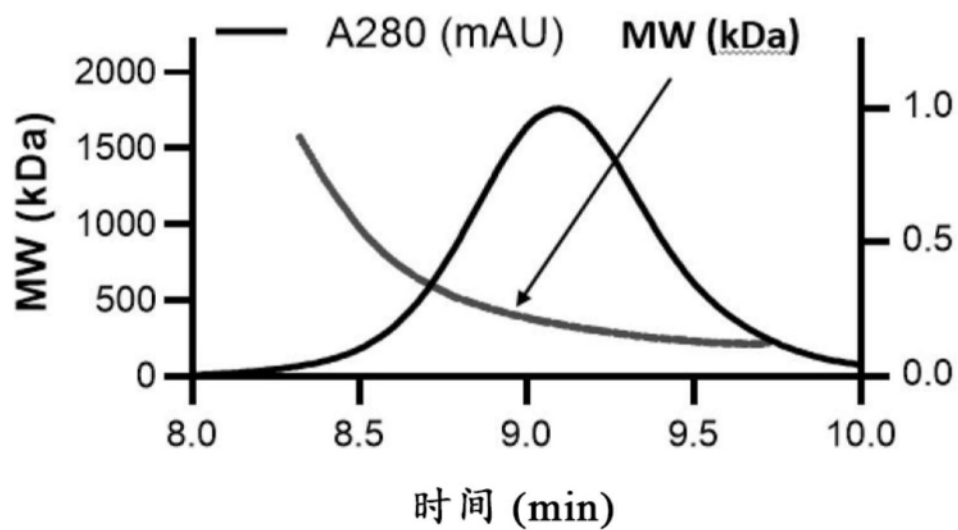


图13D

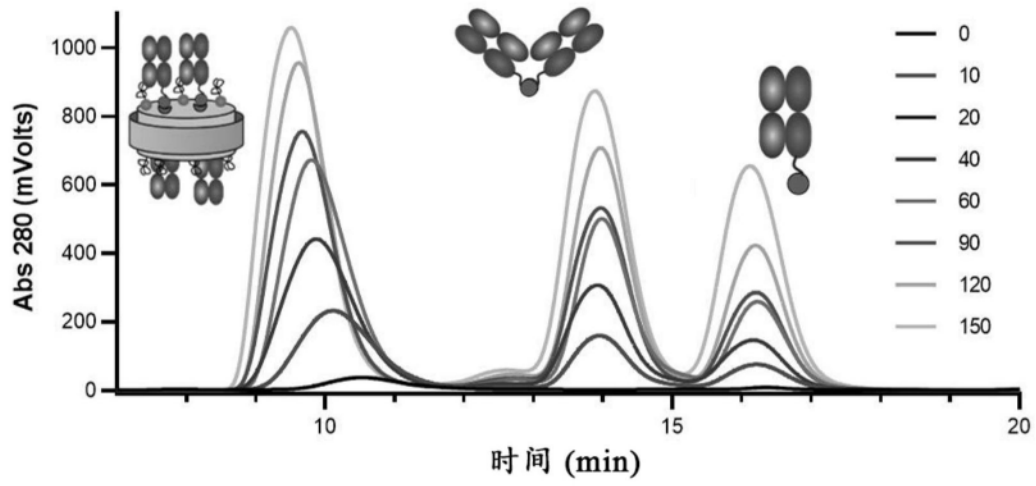


图14A

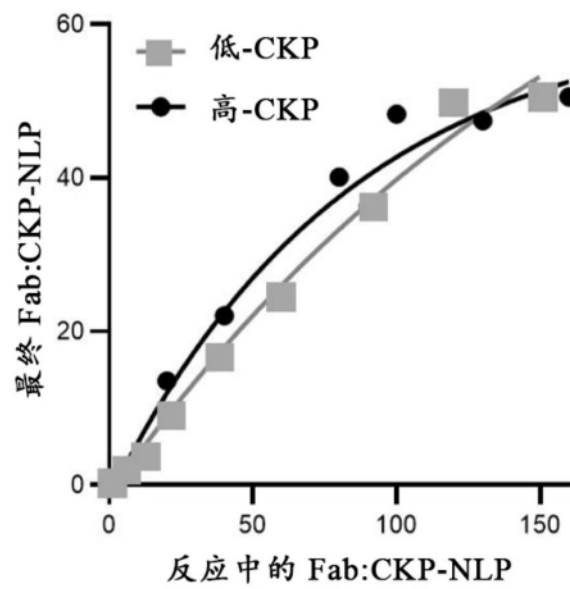


图14B

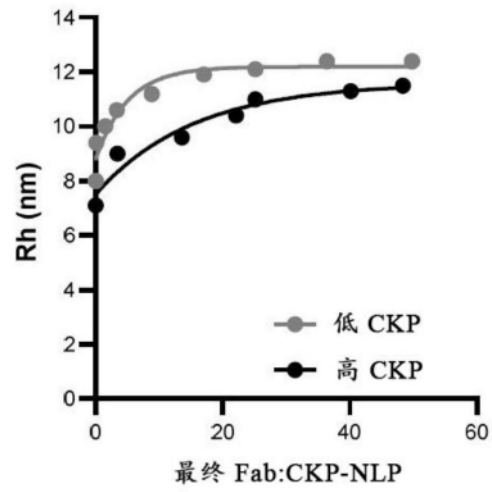


图14C

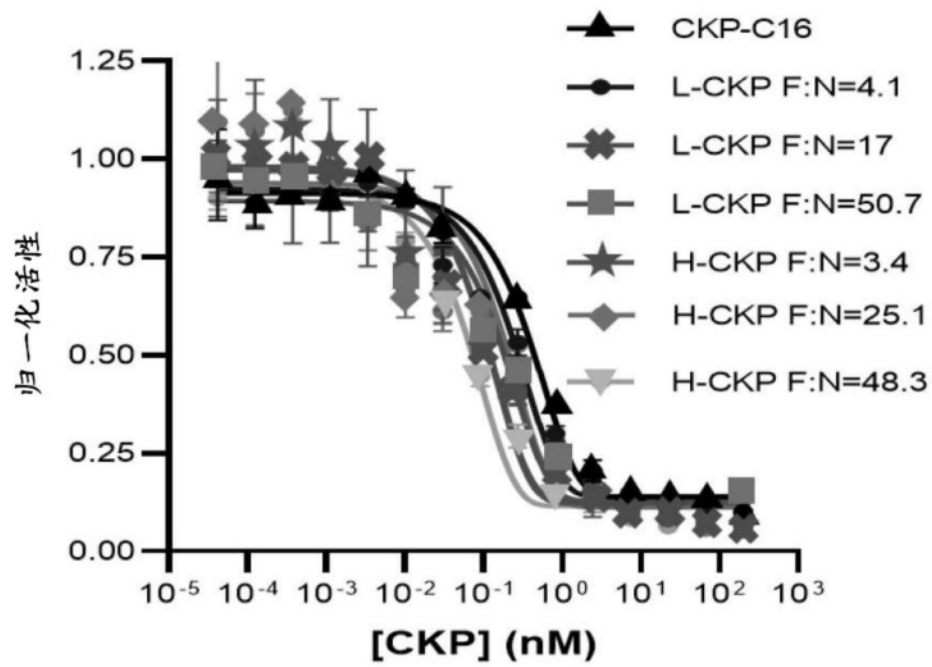


图14D

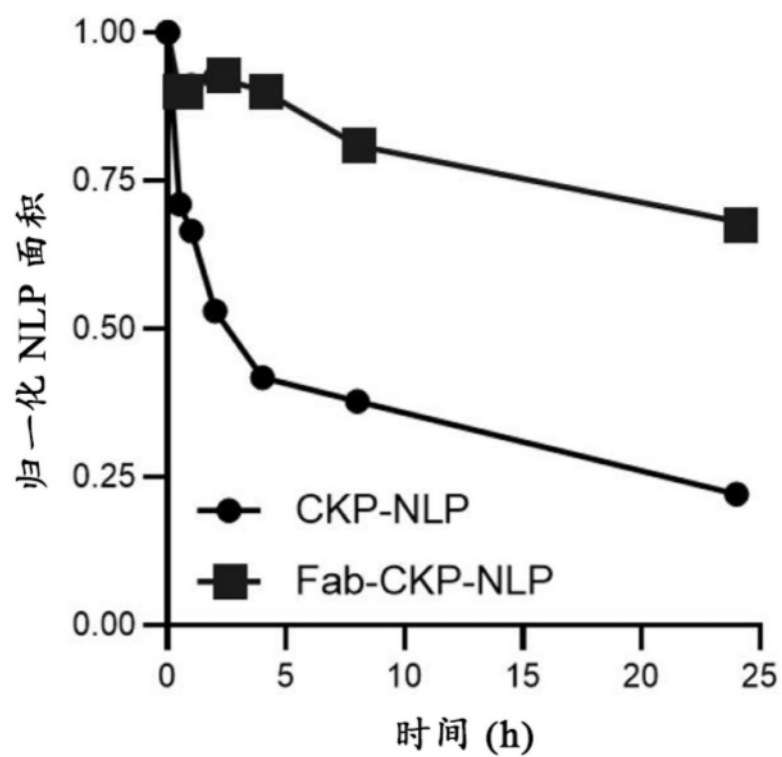


图14E