



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113347988 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 202080011043.3

罗埃亚

(22) 申请日 2020.02.14

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

19157490.4 2019.02.15 EP

代理人 张晨 武晶晶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.27

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/053933 2020.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/165425 EN 2020.08.20

(71) 申请人 阿贝拉生物科学公司

地址 瑞典索尔纳

(72) 发明人 约恩·路易林克

沃特·西蒙·彼得鲁斯·钟

亨德里克·巴特·范登伯格范萨帕

权利要求书2页 说明书43页

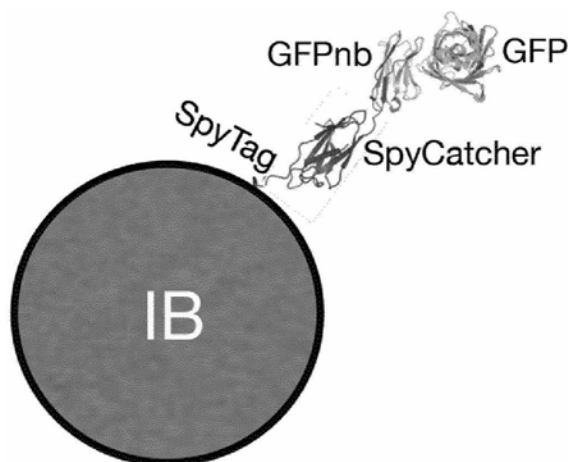
序列表16页 附图9页

(54) 发明名称

修饰的包涵体及其用途

(57) 摘要

本披露总体上涉及包涵体领域。提供了包含适用于通过共价异肽键的形成偶联至配偶体肽的偶联肽的包涵体,以及不同连接体系用于以下的用途:使得能够用例如生物功能分子有效和稳定修饰包涵体以改进包涵体在生物技术和生物医学中的用途。



1. 一种包含偶联肽的包涵体,该偶联肽适用于通过形成共价异肽键偶联至配偶体肽。
2. 根据权利要求1所述的包涵体,其中所述偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体,其中所述偶联肽和配偶体肽衍生自革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌的蛋白质。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体,其中该偶联肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr 和BDTag。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体,其中该配偶体肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr 和BDTag。
6. 根据权利要求1-3中任一项所述的包涵体,其中该偶联肽和配偶体肽形成选自由以下组成的组的连接对: SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag 和BDTag-SpyTag。
7. 一种复合物,该复合物包含根据前述权利要求中任一项所述的包涵体,该包涵体经由该偶联肽和该配偶肽之间的共价异肽键偶联至该配偶体肽。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体或复合物,该包涵体或复合物进一步包含至少一种目的蛋白质 (POI) 或其一部分。
9. 根据权利要求8所述的包涵体或复合物,其中所述目的蛋白质或其部分是抗原或其片段。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体,该包涵体进一步包含包涵体形成序列。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的包涵体或复合物,其中该配偶体肽包含另外的部分。
12. 根据权利要求11所述的包涵体或复合物,其中该另外的部分是靶向部分。
13. 一种核酸,该核酸编码根据前述权利要求中任一项所述的包涵体的包涵体形成多肽。
14. 一种组合物,该组合物包含根据前述权利要求中任一项所述的包涵体、复合物、核酸、遗传构建体和/或宿主细胞。
15. 一种根据前述权利要求中任一项所述的包涵体、复合物或组合物,用于作为诊断剂、预后剂、预防剂或治疗剂。
16. 一种产生根据权利要求7所述的复合物的方法,该方法包括将根据权利要求1所述的包涵体缀合至配偶体肽从而产生所述复合物的步骤。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中该复合物是通过在该包涵体的该偶联肽和该配偶体肽之间形成共价异肽键而产生的。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中该偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。
19. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法,其中该包涵体与存在于裂解物,例如细

胞裂解物,例如细菌裂解物中的配偶体肽缀合。

20. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法,其中该包涵体与纯化的配偶体肽缀合。

21. 根据权利要求16-20中任一项所述的方法,其中该偶联肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr 和BDTag。

22. 根据权利要求16-21中任一项所述的方法,其中该配偶体肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr 和BDTag。

23. 根据权利要求16-22中任一项所述的方法,其中该复合物在形成选自由以下组成的组的偶联肽-配偶体肽连接对后形成: SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag 和BDTag-SpyTag。

修饰的包涵体及其用途

技术领域

[0001] 本披露总体上涉及包涵体领域。更具体地,本披露涉及包含偶联肽的包涵体,该偶联肽适用于通过形成共价异肽键偶联至配偶体肽。本披露还涉及不同连接体系的用途,用于能够用例如生物功能分子有效和稳定修饰包涵体以改进包涵体在生物技术和生物医学中的用途。

背景技术

[0002] 包涵体 (IB) 通常被称为大的水不溶性聚集体,其可能在宿主细胞 (例如细菌细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞) 中过量生产蛋白质后形成。包涵体可以在细菌细胞 (例如大肠杆菌) 的细胞质中表达重组蛋白后产生,并且通常被认为是工业蛋白质生产中不想要的副产物。然而,IB中的蛋白质表达已被证明是一种有效的策略,其避免与以可溶形式表达重组蛋白相关的一些问题。IB表达的蛋白质在很大程度上抵抗宿主细胞蛋白酶的降解,并且不太可能发挥毒性作用。此外,由于它们的高浮力密度,IB很容易通过差速离心从细胞裂解物中分离,为获得大量相对纯的蛋白质提供了快速、稳健且因此具有成本效益的方案。

[0003] 不幸的是,异源蛋白质形成IB的倾向是可变的且难以预测。将目的蛋白质 (POI) 与易于聚集的多肽或IB形成序列 (IBFS) 融合是一种有用的以不溶性形式产生该目的蛋白质的策略。IB形成序列的实例包括ssTorA (Jong等人2017Microb Cell Fact[微生物细胞工厂]16:50)、Trp Δ LE (Derynck等人1984Cell[细胞]38:287-97)、酮类固醇异构酶 (Kuliopulos和Walsh 1994J Am Chem Soc[美国化学学会杂志]116:4599-607)、 β -半乳糖苷酶 (Schellenberger等人1993Int J Peptide Protein Res[肽和蛋白质研究国际杂志]41:326-32)、PagP (Hwang等人2012Protein Expr Purif[蛋白质表达与纯化]85:148-51)、EDDIE (Achmuller等人2007Nat Methods[自然方法]4:1037-43)、ELK16 (Wu等人2011Microb Cell Fact[微生物细胞工厂]10:9)、GFIL8 (Wang等人2015Microb Cell Fact[微生物细胞工厂]14:88)、PaP3.30 (Rao等人2004Protein Expr Purif[蛋白质表达与纯化]36:11-8)、TAF12-HFD (Vidovic等人2009,J Pept Sci[肽科学杂志]15:278-84) 和PurF的F4片段 (Lee等人2000Biochem Biophys Res Commun[生物化学与生物物理学研究通讯]277:575-80)。

[0004] IB非常稳定,对通过温和洗涤剂 (例如Triton X-100) 和离液剂 (例如尿素和盐酸胍) 的溶解具有显著的抵抗力。长期以来,IB被认为包含由暴露的疏水表面的非特异性相互作用形成的无序聚集体。然而,过去数十年的证据表明,IB显示出有序的淀粉样蛋白结构,其中蛋白质以紧密堆积的交叉 β 构型积累 (De Groot等人2009Trends Biochem Sci[生物化学科学趋势]34:408-16;Wang 2009Prion[朊蛋白]3:139-45)。研究人员还已经发现,IB通常至少部分由正确折叠的生物活性蛋白质组成 (Garcia-Fruitos等人2005Microb Cell Fact[微生物细胞工厂]4:27;Jevsevar等人2005Biotechnol Prog[生物技术进展]21:632-639)。因此,现在IB不再被认为蛋白质生产的废物,而是被视为在生物技术和生物医学中具有各种潜在应用的功能纳米颗粒 (Rinas等人2017Trends Biochem Sci[生物化学科学趋势]42(9):726-737)。

[0005] 以IB形式表达的酶,例如还原酶、激酶、磷酸化酶、裂解酶和脂肪酶,已作为固定化催化剂进行了测试,结果令人鼓舞(Hrabarova等人2015Insoluble Prot Methods Protoc [不溶性蛋白质方法和方案]1258,411-422;Garcia-Fruitos,和Villaverde 2010Korean J Chem Eng [韩国化学工程杂志]27,385-389)。在生物医学中,IB已作为细胞增殖和组织再生的刺激剂被研究(Seras-Franzoso等人2015Nanomedicine [纳米医学]10:873-891)。此外,由于IB的颗粒性质和高细胞膜亲和力,它们很容易被哺乳动物细胞内化,因此是细胞内递送和释放生物活性治疗蛋白的极好媒介(Vazquez等人2012Adv Mater [新材料]24:1742-1747;Unzueta等人2017Nanotechnology [纳米科技]28:015102;Cespedes等人2016Sci Rep [科学报告]6:35765)。几项研究还分析了IB用于免疫的潜力,例如用于在兔中诱导用于生物化学研究目的的抗体(参见,例如,Cameron等人1998Infect Immun [感染与免疫]66(12):5763-70)。此外,作为IB产生的抗原性多肽序列已在疫苗接种研究中进行了测试,并表明在经由不同途径(例如口服、鼻内、水浸)施用后能够在各种动物物种(包括小鼠、小牛、羊羔、鱼和鸡)中诱导(保护性)免疫应答(Yang等人2011Afr Journal Biotechnol [非洲生物技术杂志]10(41):8146-8150;Kesik等人2007Vaccine [疫苗]25:3619-3628;Kesik等人2004Immunology Letters [免疫学通讯]9:197-204;Rivera和Espino 2016Experimental Parasitology [实验寄生虫学]160:31-38;Wedrychowicz等人2007Veterinary Parasitology [兽医寄生虫学]147:77-88;PCT申请WO 2014/052378)。

[0006] 也有研究探索IB的靶向。Unzueta和合著者描述了两种导向肽(配体R9和T22)与形成IB的蛋白质的遗传融合,以有助于将IB靶向与癌症疗法相关的细胞表面受体(CXCR4)(Unzueta等人,2017,同上)。由Jiang等人FASEB J [美国实验生物学会联合会会志]2018年10月15日呈现了类似的研究。同样,IB被设计为通过展示遗传融合的CD44结合肽来特异性靶向CD44⁺细胞(Pesarrodona等人2016.Biofabrication [生物构建],8(2):025001)。然而,这种方法仅对导向肽可用的靶标和应用起作用,其目录仍然相当有限。在另一项研究中,Nahalka及其同事描述了糖蛋白胎球蛋白和非糖基化对照与原型IB的缀合,以允许靶向细菌黏附素(Talafova等人2013Microbial Cell Factories [微生物细胞工厂]12:16)。对于缀合,化学试剂戊二醛用作胺反应性同双功能交联剂。然而,甲醛和戊二醛等试剂对蛋白质具有高反应性,并且已知干扰蛋白质的功能。事实上,这些是通常已知的细胞和蛋白质固定剂,例如,用于灭活无细胞百日咳疫苗中的百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)毒素(美国专利5,578,308)。因此,此类化学交联方法难以与配偶体蛋白(其与IB偶联后需要保留生物活性)相协调。此外,涉及化学偶联的方法通常与以经济高效的方式的工业规模蛋白生产不相容。

[0007] 在另一种方法中,亮氨酸拉链肽对之间的肽-肽相互作用被用来将功能配偶体蛋白附接到包涵体上。然而,这种方法的用途有限,因为与亮氨酸拉链肽遗传融合的IB形成蛋白必须在同一宿主细胞中与功能配偶体蛋白共同表达,该功能配偶体蛋白与同源反平行亮氨酸拉链肽遗传融合(Steinmann等人2010Appl Environ Microbiol [应用环境微生物学]76(16):5563-9;Choi等人2014PLoS One [公共科学图书馆·综合]9(6):e97093;Han等人2017Metab Eng [代谢工程]40:41-49)。这种共表达方法的另一个缺点是无法实现非蛋白质来源的分子与IB的缀合。

[0008] 此外,鉴于亮氨酸拉链通过蛋白质-蛋白质相互作用缔合,以这种方式产生的IB在

施用于人或动物后或在(长期)储存期间经常面临稳定性问题,使得使用亮氨酸拉链将分子附接至IB成为没有吸引力的选择。

[0009] 总之,一种允许用分子容易且稳定的修饰IB同时保持生物功能的通用方法将具有重要价值,因为它将显著改善IB在生物技术和生物医学中的用途。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是克服上述问题并提供一种包涵体(IB),其可以容易地用另外的部分和生物功能分子修饰以改进IB在生物技术和生物医学中的用途。

[0011] 根据第一方面,在发明人令人惊讶的发现和产生包含适用于通过形成共价异肽键偶联至配偶体肽的偶联肽的包涵体之后,实现了该目的和其他目的。

[0012] 合适地,所述偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。

[0013] 在一个实施方案中,当所述偶联肽包含反应性赖氨酸残基时,所述配偶体肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基,或当所述偶联肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基时,所述配偶体肽包含反应性赖氨酸残基或反应性 α -氨基末端。

[0014] 在另一个实施方案中,所述偶联肽包含反应性天冬酰胺残基且所述配偶体肽包含反应性赖氨酸残基,或所述偶联肽包含反应性赖氨酸残基且所述配偶体肽包含反应性天冬酰胺残基。

[0015] 在一个实施方案中,所述偶联肽和配偶体肽衍生自革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌的蛋白质。合适地,所述蛋白质是来自链球菌(*Streptococcaceae*)科的革兰氏阳性细菌,例如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)或停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)。因此,所述蛋白质可以是肺炎链球菌的粘附素RrgA、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白FbaB、酿脓链球菌的主要菌毛蛋白Spy0128或停乳链球菌的纤连蛋白结合蛋白CnaB,或与其具有至少70%序列同一性的能够形成一个或多个异肽键的蛋白质。

[0016] 在一个实施方案中,该偶联肽选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0017] 在特定实施方案中,该偶联肽选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag0128、SdyTag、DogTag和SnoopTagJr。

[0018] 在一个实施方案中,该配偶体肽选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0019] 在特定实施方案中,该配偶体肽选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag和SnoopTagJr。

[0020] 在一个实施方案中,提供了根据第一方面的包涵体,其中该偶联肽和配偶体肽形成选自由以下组成的组的连接对:SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-

KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag和BDTag-SpyTag。

[0021] 在特定实施方案中,提供了根据第一方面的包涵体,其中该偶联肽和配偶体肽形成选自由以下组成的组的连接对:SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr和SnoopTagJr-DogTag。

[0022] 在另一个实施方案中,提供了根据第一方面的包涵体,其中 (i) 该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(ii) 该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag002,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iii) 该偶联肽是SpyTag,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iv) 该偶联肽是SpyTag002,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(v) 该偶联肽是DogTag,该配偶体肽是SnoopTagJr,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成;(vi) 该偶联肽是SnoopTagJr,该配偶体肽是DogTag,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成;(vii) 该偶联肽是SpyTag,该配偶体肽是BDTag,并且通过添加SpyStapler介导共价异肽键的形成;或(viii) 该偶联肽是BDTag,该配偶体肽是SpyTag,并且通过添加SpyStapler介导共价异肽键的形成。

[0023] 在特定实施方案中,提供了根据第一方面的包涵体,其中 (i) 该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(ii) 该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag002,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iii) 该偶联肽是SpyTag,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iv) 该偶联肽是SpyTag002,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(v) 该偶联肽是DogTag,该配偶体肽是SnoopTagJr,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成;或(vi) 该偶联肽是SnoopTagJr,该配偶体肽是DogTag,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成。

[0024] 根据本发明的第二方面,提供了一种复合物,其包含经由偶联肽和配偶体肽之间的共价异肽键偶联到配偶体肽上的根据第一方面的包涵体。

[0025] 在一个广泛的实施方案中,根据第一方面的包涵体或根据第二方面的复合物进一步包含至少一种目的蛋白质(POI),或其部分。

[0026] 在一个实施方案中,所述目的蛋白质是具有治疗目的的蛋白质,该蛋白质治疗选自由以下组成的组的病症或障碍:癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0027] 在另一个实施方案中,所述目的蛋白质是具有预防目的的蛋白质,该蛋白质预防选自由以下组成的组的病症或障碍:癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0028] 优选地,所述目的蛋白质是抗原或其片段。

[0029] 所述抗原可以选自由以下组成的组:来自感染性生物体的抗原、肿瘤抗原、肿瘤基质抗原和肿瘤相关抗原。

[0030] 在一些实施方案中,根据第一方面的包涵体进一步包含包涵体形成序列(IBFS)。所述IBFS可以例如选自ssTorA、Trp Δ LE、酮类固醇异构酶、 β -半乳糖苷酶、PagP、EDDIE、

ELK16、GFIL8、PaP3.30、TAF12-HFD、和PurF的F4片段。其他适用于在本发明中使用的IBFS:s描述于WO 2018/138316。

[0031] 在一个广泛的实施方案中,提供了根据第一方面的包涵体或根据第二方面的复合物,其中配偶体肽包含另外的部分。

[0032] 该另外的部分可以例如选自由以下组成的组:聚糖、粘附分子、酶和可追踪探针。

[0033] 在一个实施方案中,该另外的部分是免疫调节化合物。所述免疫调节化合物可以例如选自由以下组成的组:细胞因子、佐剂、抗体、**Nanobody®**分子、DARPIN、PAMP、TLR配体或激动剂、RNA、DNA、免疫调节肽、肽模拟物、T辅助细胞表位、免疫检查点抑制剂、PLGA、壳聚糖和TRAIL。

[0034] 在一个实施方案中,该另外的部分是靶向部分。所述靶向部分可以对免疫系统的细胞具有亲和力。因此,所述靶向部分可以对免疫系统的细胞的表面暴露的组分具有亲和力。该表面暴露的组分可以选自由以下组成的组:CD4、CD8、CD1、CD180、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、TCR、CRD、Toll样受体(TLR)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLR)、视黄酸诱导基因I样解旋酶受体(RLR)、和C型凝集素受体(CLR)、吞饮受体、CD205/DEC205、CD209/DC-SIGN、Clec9A/DNGR-1/CD370、Clec7A/Dectin-1/CD369、Clec6A/Dectin-2、Clec12A、CD1d、CD11c、CD11b、CD40、CD152/CTLA-4、CD279/PD-1、NOD样受体、RIG-I样受体、PRR、CCR、CD36、Siglec H、PDCTREM、朗格汉斯蛋白、MMR、D-SIGN和叶酸受体。

[0035] 合适地,所述靶向部分对至少一种发生病变的细胞具有亲和力。所述发生病变的细胞可以是选自由以下组成的组的癌症的肿瘤细胞:淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肺癌、黑色素瘤、肾细胞癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、膀胱癌、头颈癌、结直肠癌、食管癌、宫颈癌、胃癌、肝细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌和甲状腺癌。

[0036] 在一个实施方案中,靶向部分选自由以下组成的组:抗体、抗体结构域和保留抗体结合能力的抗体片段。

[0037] 根据本发明的第三方面,提供了编码根据第一方面的包涵体的包涵体形成多肽的核酸。

[0038] 根据本发明的第四方面,提供了包含根据第三方面的核酸的遗传构建体。

[0039] 根据本发明的第五方面,提供了包含根据第三方面的核酸或根据第四方面的遗传构建体的宿主细胞。

[0040] 根据本发明的第六方面,提供了组合物,该组合物包含根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物、根据第三方面的核酸、根据第四方面的遗传构建体、和/或根据第五方面的宿主细胞。

[0041] 根据本发明的第七方面,提供了根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物,用于作为药物。

[0042] 根据本发明的第八方面,提供了根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物,用于作为诊断剂、预后剂、预防剂或治疗剂。

[0043] 根据本发明的第九方面,提供了根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物,用于作为疫苗。

[0044] 根据本发明的第十方面,提供了治疗受试者的疾病或障碍的方法,该方法包括将根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物引入到所述受试

者的步骤。

[0045] 根据本发明的第十一方面,提供了使用根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物诊断或预判受试者的疾病或障碍的方法。

[0046] 根据本发明的第十二方面,提供了接种或免疫的方法,该方法包括将根据第一方面的包涵体、根据第二方面的复合物或根据第六方面的组合物引入到所述受试者的步骤。

[0047] 合适地,所述受试者是动物。

[0048] 在一个实施方案中,所述动物是选自人、农场动物(例如牛、绵羊、猪和山羊)和伴侣动物(例如马、狗和猫)的哺乳动物。

[0049] 在其他实施方案中,所述动物选自鸟(例如家禽)和鱼(例如鲑鱼、鳟鱼、石斑鱼、罗非鱼和鲶鱼)。

[0050] 根据本发明的第十三方面,提供了产生根据第二方面的复合物的方法,该方法包括将第一方面的包涵体缀合至配偶体肽从而产生所述复合物的步骤。

[0051] 合适地,该复合物是通过在该包涵体的该偶联肽和该配偶体肽之间形成共价异肽键而产生的。典型地,该偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。

[0052] 在一个实施方案中,该包涵体与存在于裂解物,例如细胞裂解物,例如细菌裂解物中的配偶体肽缀合。

[0053] 在另一个实施方案中,该包涵体与纯化的配偶体肽缀合。

[0054] 该偶联肽可以选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0055] 因此,该偶联肽可以选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag0128、SdyTag、DogTag和SnoopTagJr。

[0056] 该配偶体肽可以选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0057] 该配偶体肽可以例如选自由以下组成的组:SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag和SnoopTagJr。

[0058] 在特定实施方案中,该复合物在形成选自由以下组成的组的偶联肽-配偶体肽连接对后产生:SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag和BDTag-SpyTag。

[0059] 因此,该复合物在形成选自由以下组成的组的偶联肽-配偶体肽连接对后产生:SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr和SnoopTagJr-DogTag。

附图说明

[0060] 图1A. 使用SpyTag和SpyCatcher的连接体系,用绿色荧光 Nanobody®分子

(GFPnb) 修饰的包涵体 (对GFP (SEQ ID NO:10) 具有亲和力) 的示意图。观察到包涵体 (IB) 在其表面表达SpyTag, 该SpyTag与SpyCatcher共价结合。另外的部分GFPnb与SpyCatcher连接, 然后GFPnb与GFP非共价结合 (实施例1)。

[0061] 图1B. 配偶体肽 (结合蛋白配偶体) SpyCatcher (左) 和与GFPnb结合的GFP (右) 的带状图 (实施例1)。

[0062] 图2A. 对使用SpyTag/SpyCatcher连接体系的成功IB修饰进行SDS-PAGE分析。在约75kDa加合物处的箭头 (◀) 指示SpyTag与SpyCatcher的缀合, 融合蛋白SpyCatcher-SnoopCatcher (SEQ ID NO:1) 连接到ssTorA (3x) -MBP-SpT (SEQ ID NO:2) IB (实施例2)。

[0063] 图2B. 对使用SnoopTag/SnoopCatcher连接体系的成功IB修饰进行SDS-PAGE分析。在约75kDa加合物处的箭头 (◀) 指示SnoopTag与SnoopCatcher的缀合, 融合蛋白SpyCatcher-SnoopCatcher连接到ssTorA (3x) -MBP-SnT IB (实施例2)。

[0064] 图3A. 利用SpyTag/SpyCatcher或SnoopTag/SnoopCatcher体系, 对不具有包涵体形成序列ssTorA的Pla2 IB和具有包涵体形成序列ssTorA的AED0 IB与配偶体肽的成功缀合进行SDS-PAGE分析。加合物用箭头 (◀) 指示 (实施例3)。

[0065] 图3B. 利用SpyTag/SpyCatcher或SnoopTag/SnoopCatcher体系, 通过使用识别掺入SpyCatcher-SnoopCatcher融合蛋白的多组氨酸检测标签的抗体的蛋白质印迹对不具有包涵体形成序列ssTorA的Pla2 IB和具有包涵体形成序列ssTorA的AED0 IB与配偶体肽的成功缀合进行验证。加合物用箭头 (◀) 指示 (实施例3)。

[0066] 图4A. 使用三分型系统对SnT-mEGFP-SpT (SEQ ID NO:7) 和ssTorA (3x) -MBP-KT (SEQ ID NO:5) IB之间的成功连接进行相差和荧光显微术分析。GFP-荧光信号由与SnT-mEGFP-SpT和SpyLigase (SEQ ID NO:6) (+SpyLigase) 混合的IB发射, 而当SpyLigase不存在时 (-) 检测不到信号 (实施例4)。

[0067] 图4B. ssTorA (3x) -MBP-KT IB和可溶性SnT-mEGFP-SpT与SpyLigase混合 (三分型系统) 情况下和不存在SpyLigase情况下的SDS-PAGE分析。分析显示, 当SpyLigase存在 (+SpyLigase) 时, 新出现的带象征着ssTorA (3x) -MBP-KT IB和SnT-mEGFP-SpyTag之间键的形成, 而当SpyLigase不存在时 (-) 则缺乏键的形成。ssTorA (3x) -MBP-KT-SnT-mEGFP-SpT的加合物用箭头 (◀) 指示 (实施例4)。

[0068] 图5A. 用GFP特异性Nanobody®分子 (GFPnb) 成功修饰IB的相差和荧光显微术分析。观察到与融合蛋白SpC-GFPnb和GFP混合的ssTorA (3x) -MBP-SpT IB在荧光显微术分析中发射信号, 而与GFPnb-SpC EQ (SEQ ID NO:9) (SpyCatcher中E77Q氨基酸取代干扰异肽键形成) 和GFP混合的IB不发射信号 (实施例5)。

[0069] 图5B. SDS-PAGE分析显示ssTorA (3x) -MBP-SpT IB与GFPnb-SpC (SEQ ID NO:8) 蛋白的混合产生加合物, 而ssTorA (3x) -MBP-SpT IB与突变体GFPnb-SpC EQ的混合不产生加合物。加合物通过箭头 (◀) 指示 (实施例5)。

[0070] 图6A. ssTorA (3x) -AED0-SpT IB与融合蛋白混合的SDS-PAGE分析, 该融合蛋白包含蛋白A的抗体结合结构域、ZZ结构域和位于C端的SpyCatcher002部分 (SpC2) 的串联融合双重版本, 形成ZZ-SpC2 (SEQ ID NO:11)。作为对照, ZZ-SpC2还与缺乏SpT的ssTorA (3x) -

AED0混合。IB缔合的重链物质和ssTorA (3x) -AED0-SpT与ZZ-SpC2结合的加合物由箭头(◀)指示(实施例6)。

[0071] 图6B. ssTorA (3x) -AED0-IB (有和没有SpT) 与如上所述的ZZ-SpC2预温育, 并与Alexa 594兔抗小鼠IgG温育的荧光显微术分析。

[0072] 图7. 具有SpC2的ZZ结构域(ZZ)和蛋白A/G(AG)与携带SpT的IB的成功偶联的SDS-PAGE分析。IB缔合的重链和轻链材料以及加合物(ZZ加合物、AG加合物)由箭头(◀)指示(实施例7)。

[0073] 图8. 来自细菌裂解物的ZZ-SpC2与ssTorA (3x) -AED0-SpT的成功缀合的SDS-PAGE分析。加合物通过箭头(◀)指示(实施例8)。

[0074] 定义

[0075] 如本文所用, 提供以下定义有助于对本发明的理解。

[0076] 术语“包涵体”, 有时缩写为“IB”, 是指聚集的多肽在细胞质或细胞核中的不溶性沉积物。在本文中, 该术语主要是指在原核细胞、细菌细胞的细胞质内形成的包涵体。该术语还可以指原核细胞、细菌细胞周质中的多肽聚集体或指真核细胞的细胞质和/或细胞核中的多肽聚集体。包涵体可以在宿主细胞内自发形成, 例如作为不溶性或部分不溶性多肽的过度表达的结果。在本披露中, 通常在宿主细胞内可溶或部分可溶的目的多肽或蛋白质可以与IB形成序列融合, 产生包含与IB形成序列可操作地连接的目的多肽的融合多肽。当该融合多肽被表达时, 包涵体形成序列诱导融合多肽形成包涵体, 从而诱导目的多肽形成包涵体。包涵体中含有的聚集的多肽可能错误折叠、部分错误折叠或可能具有天然或接近天然的折叠。包涵体中多肽的不溶性形式保护多肽免于被宿主细胞内的蛋白水解酶降解。此外, 它保护宿主细胞免受多肽在其可溶性天然形式中可能具有的任何毒性作用。而且, 包涵体的形成可以有助于某些多肽的分离和纯化, 否则这些多肽难以纯化或需要许多和/或昂贵的纯化步骤。鉴定包涵体和定量包涵体形成的手段和方法是本领域公知的。此类手段和方法的非限制性实例包括包涵体分级测定、相差显微术、其他光学测量技术、粒度测量、凝胶分离测定(例如SDS-PAGE)、蛋白水解消化和电子显微术。

[0077] 因此, 如上所示的, 术语“包涵体形成序列”, 在本文中有时缩写为“IBFS”, 是指当与目的多肽融合时诱导包涵体形成的多肽序列。包涵体形成序列导致包含目标多肽和由包涵体形成序列编码的肽的融合多肽聚集在包涵体中。

[0078] 术语“多肽”在本文中用于表示通过相邻残基的 α -氨基和羧基基团之间的肽键彼此连接的一系列两个或更多个氨基酸残基。该术语用于表示未指定长度的肽。因此, 肽、寡肽、多肽和蛋白质包括在本文“多肽”的定义内。典型地, 尽管并非排他地, 术语“肽”在本文中用于表示短的多肽, 例如具有约两个氨基酸至约50个氨基酸的长度。术语“蛋白质”在本文中用于表示更长和/或更复杂的多肽, 例如两条或更多条多肽链的复合物。蛋白质也可以与辅因子或其他蛋白质结合。术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”还可以包括翻译后修饰, 例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。包含一种或多种氨基酸类似物或经标记的氨基酸的多肽也包括在定义内。

[0079] 可互换的术语“多肽序列”、“肽序列”和“蛋白质序列”是指多肽、肽或蛋白质中氨基酸的顺序。按照常规, 本文中通常从N末端到C末端报告多肽序列。

[0080] 术语“目的多肽”、“目的肽”和“目的蛋白质”，缩写为“POI”，可互换使用，指本发明的使用者感兴趣并且可以由宿主细胞的遗传机制表达(例如作为重组蛋白)的多肽、肽或蛋白质。在一些情形下，术语“POI”还应理解为指编码所讨论的POI的遗传序列。POI可以是任何类型的POI。例如，POI可以是异源或同源多肽、可溶性或部分可溶性细胞质多肽、可溶性或部分可溶性分泌性多肽或膜多肽。在一些实施方案中，POI是对宿主细胞有毒性的多肽，其在宿主细胞中容易降解或当以可溶性形式存在时难以从宿主细胞中纯化。POI可包含衍生自各种不同蛋白质或合成来源的翻译融合肽或片段。POI可以是任意长度。特别地，POI可以是长度为至少约2、5、10、25或50个氨基酸，并且可以为长度多至1000、1500、2000、3000或5000个氨基酸。在一些实施方案中，POI可包含衍生自各种不同蛋白质或合成来源的翻译融合肽。

[0081] 术语“融合多肽”、“融合蛋白”和“融合肽”是指氨基酸的聚合物，即多肽、蛋白质或肽，包含至少两个部分，每个部分代表不同的功能和/或来源。本发明的融合多肽可以以任何顺序包含：含有所披露的包涵体形成序列的至少第一部分和含有目的多肽或肽的至少第二部分。在可替代的实施方案中，融合多肽可包含多于一个包涵体形成序列和/或多于一个POI。融合多肽可以例如在其N末端包含一个或多个包涵体形成序列和/或在其C末端包含一个或多个包涵体形成序列。它还可以包含含有其他功能性的另外部分，例如用于将一个或多个包涵体形成序列与一个或多个POI分离的可切割元件。

[0082] 术语“遗传构建体”是指遗传元件如基因或其他多肽编码元件、启动子、调控元件、转录和终止区等的工程化的组合，组装成单个核酸。遗传构建体还可以包含编码来自不同多肽的两个或更多个部分的遗传元件，使得该遗传构建体编码包含两个或更多个部分的融合多肽。表达载体是遗传构建体的一个实例。遗传构建体的另一个实例是多肽编码核酸，其被整合到宿主的基因组中并由其表达。

[0083] 表达“重组多肽”、“重组遗传构建体”和“重组复合物”是指多肽或由使用实验室方法将来自多个来源的遗传物质组合在一起的核酸，产生核酸和由其编码的不会在自然界中发现的多肽。

[0084] 术语“宿主”、“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用以指示一种或多种载体或分离的和纯化的核酸分子已经被或可以被引入其中的原核或真核细胞。因此，遗传构建体可以由载体表达或整合到宿主的基因组中并由其表达。

[0085] 在优选的实施方案中，宿主细胞是微生物宿主细胞。在另一个优选的实施方案中，该微生物宿主细胞是细菌细胞。应理解，此类术语不仅指特定的受试细胞，而且还指这样的细胞的后代或潜在后代。因为某些变化可在后代中由于突变或环境影响而发生，这种子代可能在事实上与亲代细胞不同，但是仍然包括在如在此使用的术语范围内。

[0086] 术语“连接体系”或“蛋白质连接体系”用于描述包含至少第一和第二分子部分的任何体系，该第一和第二分子部分彼此具有亲和力并且在它们之间可以形成某种键。连接体系可以例如由两个肽组成，它们之间可以自发地或在酶的辅助下形成共价键，或者其中使用化学交联手段将不同的分子连接在一起。在本披露中，连接体系特别是指具有自发形成异肽键的功能性或能够在酶(例如连接酶，例如SpyLigase、SnoopLigase或SpyStapler)的存在下形成异肽键的第一和第二肽。进一步可能的是将另外的分子连接到两个肽中的每一个，从而产生复合物，其中构成连接体系的连接的是彼此具有亲和性的两个肽。在本披露

中,连接体系的两个肽之一被称为“偶联肽”,连接体系的另一个肽被称为“配偶体肽”,其中偶联肽与IB连接并且配偶体肽可以任选地将另外的分子连接到整个复合物。因此,术语“复合物”在本文中用于描述包含偶联肽并经由偶联肽和配偶体肽之间的共价异肽键偶联至配偶体肽的IB。

[0087] 正如所述,术语“偶联肽”在本文中用于描述构成连接体系的两个肽之一。更具体地,偶联肽是具有结合连接体系的另一肽,即“配偶体肽”的独特功能性的氨基酸的聚合物。在本发明的上下文中,偶联肽典型地遗传地融合至POI(例如作为C端、N端或内部肽标签),并且任选地还遗传地融合至IBFS,形成遗传构建体。可以将所述遗传构建体掺入载体中,该载体被引入宿主细胞并随后在宿主细胞中表达以产生重组多肽,该重组多肽包含具有可接近连接体系的配偶体肽的偶联肽的包涵体。遗传构建体还可以整合到宿主的基因组中并由其表达。

[0088] 术语“配偶体肽”是指如本发明的上下文中定义的连接体系的其他肽。它是氨基酸的聚合物,具有结合连接体系第一部分,即“偶联肽”的独特功能性。与偶联肽不同,配偶体肽典型地在未附接至IB的情况下产生。任选地,它可以与另外的分子融合表达或以与另外的分子的复合物表达。虽然本文描述的连接体系的部分被称为“肽”,但应理解,在一些实施方案中,它们可以包含超过50个氨基酸。

[0089] 术语“SpyTag-SpyCatcher连接体系”、“SpyTag”和“SpyCatcher”分别描述了可用于本披露的特定连接体系的第一部分(偶联肽)和第二部分(配偶体肽)。连接体系衍生自酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白FbaB中存在的CnaB结构域。在该结构域的疏水核心内,三联氨基酸(赖氨酸、天冬氨酸和催化谷氨酸)自发形成异肽键(Hagan等人2010Angew Chem Int Ed Engl[应用化学英文国际版]11月2日;49(45):8421-5)。通过将分离的CnaB结构域分离成肽,所谓的“SpyTag”,有时缩写为“SpT”,以及剩余的蛋白配偶体称为“SpyCatcher”,有时缩写为“SpC”,从而将其转化为蛋白质连接体系(Zakeri等人2012Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]109)。这两种肽具有在彼此之间自发形成异肽键的能力。在本发明的上下文中,IB中的SpyTag和目的蛋白质可以形成重组多肽,其中SpyTag充当偶联肽并且可接近配偶体肽(例如通过展示在IB的表面上)。SpyCatcher充当配偶体肽并可能与SpyTag形成牢固的结合。

[0090] 术语“SnoopTag-SnoopCatcher连接体系”、“SnoopTag”和“SnoopCatcher”分别是指另一连接体系的第一部分(偶联肽)和第二部分(配偶体肽),该另一连接体系衍生自来自肺炎链球菌的黏附素RrgA的D4 Ig样结构域(Veggiani等人2016Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]113(5):1202-7)。为了创建该体系,D4 Ig样结构域被切割以创建称为“SnoopTag”(有时缩写为“SnT”)的偶联肽和剩余的配偶体肽“SnoopCatcher”,有时缩写为“SnC”。在本发明的上下文中,IB中的SnoopTag和目的蛋白质可以形成重组多肽,其中SnoopTag可接近配偶体肽(例如通过展示在IB的表面上)。

[0091] 术语“KTag”和“SpyLigase”分别指肽标签和酶。在CnaB结构域成功适应SpyTag/SpyCatcher蛋白质连接体系后,SpyCatcher被进一步分裂成“KTag”,有时缩写为“KT”和“SpyLigase”(Fierer等人2014Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]4月1日;111(13):E1176-81)。KTag充当偶联肽,其可以在SpyLigase(其是催化键形成所必需的)存在下与配偶体肽形成共价键。还已经发现,在SpyLigase存在的情况下,KTag和SpyTag可以

在充当偶联肽和充当配偶体肽之间交替。然而，SpyLigase在键形成后仍然是与连接体系分离的多肽。

[0092] 尽管本文所提及的“Catchers”通常被称为配偶体肽，但一些Catchers也可以适合作为偶联肽(即在IB中表达并且与配偶体肽可接近的部分)。

[0093] 术语“可操作地连接”是指多肽或核酸片段的第一部分与多肽或核酸片段的第二部分的相关联，使得一部分的功能受另一部分的影响。例如，根据本发明的融合多肽包含与偶联肽可操作地连接并且任选地与IBFS可操作地连接的POI，意味着该POI与该偶联肽可操作地连接并受其影响并且任选地与该IBFS可操作地连接并受其影响，但是这些部分不一定是连续融合的。类似地，对于核酸，启动子可以例如与编码序列可操作地连接，例如编码根据本发明的融合多肽，意味着该启动子能够影响该编码序列的表达，即该编码序列处于该启动子的转录控制之下。翻译起始区例如核糖体结合位点可操作地连接至编码例如多肽的核酸序列，如果它被定位以有助于多肽的翻译。

[0094] 术语“修饰的IB”是指表达偶联肽并且其中在该偶联肽的可接近配偶体肽的部分(例如展示在IB表面上的部分)和该配偶体肽之间形成异肽键的IB。所述配偶体肽可以进一步结合可具有一定功能性的另外的部分。

[0095] 如本文所用，术语“部分”是指分子组分或细胞组分，即术语“部分”不限于涉及分子的一半或部分，因为该词先前已在化学技术领域定义和使用。

[0096] 术语“另外的部分”是指可以与配偶体肽连接的任何分子组分或细胞组分，例如肽、细胞因子、佐剂、抗体、聚糖、佐剂、黏附、酶和可追踪探针。

[0097] 术语“靶向部分”是指任何分子组分或细胞组分，其可以连接到配偶体肽并且具有靶向特定标记(比如靶分子、组织、细胞、受体等)的功能性。

[0098] 术语“功能部分”是指至少一种分子组分或细胞组分，其具有一定的功能，因此该术语可以指任何种类的功能组分或基因。

[0099] 术语“抗原”是指能够在宿主生物体中诱导免疫应答的分子。

[0100] 术语“佐剂”是指具有改变其他试剂作用的能力的药学或免疫学试剂。

[0101] 术语“免疫刺激性工具”是指分子组分或细胞组分或分子组分或细胞组分的系统，其可用于刺激宿主的免疫系统，即以这样的方式触发该免疫系统，例如引发免疫应答。这可以通过例如将某种抗原引入宿主细胞来完成，其中该抗原可以是免疫刺激性工具的一部分。

[0102] 术语“AEDO”是指“不同来源的抗原表位”。

[0103] 术语“可接受的载剂、稀释剂或赋形剂”是指可安全用于局部或全身性施用的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质(例如药物组合物或疫苗)。可以采用的任何安全的施途径，包括口服、肠胃外、直肠、舌下、口腔、静脉内、关节内、肌肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹膜内、脑室内、局部、粘膜、和经皮施用。根据特定的施途径，可以使用本领域已知的多种载剂、稀释剂和赋形剂。这些可以例如选自由以下组成的组：糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、海藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水和盐例如无机酸盐(包括盐酸盐、溴酸盐和硫酸盐)、有机酸(如乙酸、丙酸和丙二酸)水和无热原的水。

具体实施方式

[0104] 本发明总体上涉及表达和展示偶联肽(例如肽标签)的包涵体。通过共价异肽键的形成,所述偶联肽可以与任选地融合到另外的部分的配偶体肽偶联,从而在包涵体和另外的部分之间产生连接。

[0105] 因此,广义而言,本披露是基于发明人对使用不同连接体系用各种功能部分修饰包涵体的强大系统和方法的出乎意料的发现和开发。

[0106] 已经进行了若干次尝试以实现蛋白质与包涵体的连接。然而,如背景部分中所述,实现连接与许多障碍和缺点有关。例如,保持蛋白质的生物活性是使用化学交联时遇到的问题。不稳定的键形成和仅用其他蛋白质修饰包涵体的限制是与使用亮氨酸拉链肽对的蛋白质-蛋白质相互作用相关的问题。

[0107] 本发明人出人意料地并且有利的设法产生具有偶联肽的IB,该偶联肽保留功能并保持其与其配偶体肽的结合特异性。结果是,形成了非常牢固的共价异肽键,将偶联肽直接连接到配偶体肽,从而将包涵体连接到配偶体肽。

[0108] 典型地,该偶联肽包含参与异肽键的一个残基而配偶体肽包含参与异肽键的另一残基。例如,当偶联肽包含反应性赖氨酸残基时,配偶体肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基,或当偶联肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基时,配偶体肽包含反应性赖氨酸残基或反应性 α -氨基末端。因此,偶联肽可以包含反应性天冬酰胺残基而配偶体肽可以包含反应性赖氨酸残基,或偶联肽可以包含反应性赖氨酸残基而配偶体肽可以包含反应性天冬酰胺残基。

[0109] 因此,通过将包含对配偶体肽具有亲和力的偶联肽的连接体系与任选地包含或构成POI的IB组合,发明人创造了用于包涵体修饰和随后的靶抗原和/或药物递送以及其他应用的新颖且创造性的平台。

[0110] 由于发明人具有共价连接蛋白质部分以在IB上可接近的能力,这为IB提供了改进的功能性,使得该组合成为可能。此类功能性的实例是使用IB进行抗原或药物递送,并进一步为它们配备亲和结合剂(抗体、**Affibody®**分子、**Nanobody®**分子)或碳水化合物/糖分子,以将IB靶向某些组织或细胞类型。

[0111] 偶联肽和配偶体肽典型地衍生自革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌的蛋白质,该蛋白质是和/或包含能够形成一个或多个异肽键的结构域。

[0112] 本领域技术人员将熟悉能够形成一个或多个异肽键的蛋白质和适合用于本发明中的非限制性实例包括:酿脓链球菌的Spy0128 (Kang等人2007Science[科学]318(5856), 1625-28)、Spy0125 (Pointon等人2010J Biol Chem[生物化学杂志]285(44), 33858-66)和FbaB (Oke等人2010J Struct Funct Genomics[结构与功能基因组学杂志]11(2), 167-80), 停乳链球菌的纤连蛋白结合蛋白CnaB (**Pröschel**等人2017PLoS One[公共科学图书馆·综合]12(6)), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的Cna (Kang等人2007同上)), 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的ACE19蛋白 (Kang等人2007同上), 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的BcpA菌毛蛋白 (Budzik等人2007PNAS USA[美国国家科学院院刊], 106(47), 19992-7), 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的次要菌毛蛋白GBS52 (Kang等人2007Science[科学]318(5856), 1625-8), 白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)的SpaA (Kang等人2009PNAS USA[美国国家科学院院刊]106(40), 16967-71),

变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的 SpaP (Nylander 等人 2011 *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* [晶体学报 F 节结构生物学通讯] 67 (Pt1), 23-6), 肺炎链球菌的 RrgA (Izore 等人 2010 *Structure* [结构] 18 (1), 106-15)、RrgB 和 RrgC (El Mortaji 等人 2010 *J Biol Chem* [生物化学杂志] 285 (16), 12405-15) 以及格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*) 的 SspB (Forsgren 等人 2010 *J Mol Biol* [分子生物学杂志] 397 (3), 740-51)。

[0113] 合适地, 所述蛋白质是链球菌 (*Streptococcaceae*) 科的革兰氏阳性细菌, 比如酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 或停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)。因此, 所述蛋白质可以是肺炎链球菌的粘附素 RrgA、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 FbaB、酿脓链球菌的主要菌毛蛋白 Spy0128 或停乳链球菌的纤连蛋白结合蛋白 CnaB, 或与其具有至少 70% 序列同一性的能够形成一个或多个异肽键的蛋白质。

[0114] 在一个实施方案中, 发明人利用偶联肽, 例如基于利用来自酿脓链球菌细菌的黏附蛋白 (例如 Spy0128 或 FbaB) 的反应能够形成自发酰胺键的肽标签, 将异源蛋白连接到 IB。这些包括偶联肽 SpyTag 与其关联配偶体肽 SpyCatcher 的不可逆的肽-蛋白质相互作用。因此, IB 与连接体系相连, 最终构建体是 IB-SpyTag-SpyCatcher。

[0115] 实施例 1 和图 1A 和 1B 描述并说明了发明人用功能亲和部分修饰 IB 以允许 IB 靶向特定靶标、细胞和/或组织的概念证明。在该特定实施例中, 使用 SpyTag 和 SpyCatcher 的连接体系 (Zakeri 等人 2012 同上) 用对绿色荧光蛋白 (GFP) 具有亲和力的绿色荧光蛋白 **Nanobody®** 分子 (GFPnb) 修饰包涵体 (IB)。

[0116] 在另一个实施方案中, 使用基于来自肺炎链球菌的黏附素 RrgA 的第二连接体系。该系统包含偶联肽 (肽标签) SnoopTag, 与其配偶体肽 (结合蛋白配偶体) SnoopCatcher 形成自发的异肽键。在该实施方案中, 包涵体连接至 SnoopTag 和 SnoopCatcher 的第二连接体系 (Veggiani 等人, 2016 同上), 最终构建体是 IB-SnoopTag-SnoopCatcher。

[0117] 可用于以类似方式实践本发明的连接体系的另外的非限制性实例包括 SdyTag-SdyCatcher (Pröschel 等人 2017 *PLoS One* [公共科学图书馆·综合] 12 (6); Tan 等人 *PLoS One*. [公共科学图书馆·综合] 2016.11 (10)), SpyTag002-SpyCatcher002 (Keeble 等人 2017 *Angew Chem Int Ed Engl* [应用化学英文国际版] 12月22日 56 (52): 16521-16525), SpyTag003-SpyCatcher003 (Keeble 等人 2019 *Proc Natl Acad Sci USA* [美国国家科学院院刊] 12月26日 116 (52): 26523-26533), SpyTag0128-SpyCatcher0128 (Zakeri 和 Howarth 2010 *J Am Chem Soc* [美国化学学会杂志] 132 (13); WO 2011/098772), KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr 和 SnoopTagJnr-DogTag (Buldun 等人 2018 *J Am Chem Soc*. [美国化学学会杂志] 2月28日; 140 (8): 3008-3018), SpyTag-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag-BDTag 和 BDTag-SpyTag (Wu 等人 2018 *J Am Chem Soc* [美国化学学会杂志] 11月19日 140 (50): 17474-17483)。

[0118] 关于上述连接体系, 本发明人出人意料地发现肽 KTag (其源自 SpyCatcher 的蛋白质) 和 SpyTag 可以在充当偶联肽和配偶体肽之间交替, 以在 SpyLigase 的促进下, 与偶联肽和配偶体肽形成不可逆的肽-蛋白质相互作用。这意味着, 当充当偶联肽时, KTag 可以与充当配偶体肽的 SpyTag 结合, 根据 KTag-SpyTag 形成连接体系。因此, 在所披露的包涵体的一个实施方案中, 最终构建体可以是 IB-KTag-SpyTag。在所披露的包涵体的另一个实施方案

中, KTag可以替代地充当配偶体肽并结合SpyTag, 在这种情况下SpyTag充当偶联肽, 使得最终构建体可以是IB-SpyTag-KTag。

[0119] 类似地, 在衍生自细菌肺炎链球菌的黏附素RrgA的三分型系统中, 其中偶联肽为DogTag且配偶体肽为SnoopTagJr, 或其中偶联肽为SnoopTagJr且配偶体肽为DogTag, 共价异肽键的形成可以通过添加SnoopLigase介导。

[0120] 先前被认为是蛋白质产生中不想要的副产物, 如今在包涵体中产生的蛋白质被视为功能纳米颗粒, 在诊断、组织工程、药物递送和抗原递送等领域具有许多潜在应用。因此, 本发明的包涵体典型地包含至少一种目的蛋白质(POI)或其部分。

[0121] 在一个实施方案中, 所述目的蛋白质是具有治疗病症或障碍的治疗目的蛋白质。合适地, 所述病症或障碍选自由以下组成的组: 癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0122] 在另一个实施方案中, 所述目的蛋白质是具有预防病症或障碍的预防目的蛋白质。合适地, 所述病症或障碍选自由以下组成的组: 癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0123] 优选地, 所述目的蛋白质是抗原或其片段。所述抗原可以选自由以下组成的组: 来自感染性生物体的抗原、肿瘤抗原、肿瘤基质抗原和肿瘤相关抗原。

[0124] 在IB中表达或表达为IB的POI的特征可以变化。它可以是例如可溶性或部分可溶性细胞质多肽、可溶性或部分可溶性分泌性多肽或膜多肽。

[0125] POI的功能也可以变化。例如, 它可以构成生物活性分子, 例如用于免疫的抗原、针对疾病的治疗剂或治愈剂(例如生长因子、激素、白介素、干扰素或影响细胞组分例如受体、通道和脂质的其他多肽)、酶、毒素、结构多肽、研究工具(如绿色荧光蛋白(GFP))或抗微生物多肽。

[0126] 将IBFS可操作地融合到POI序列形成融合多肽。使用熟知的重组DNA技术, 这些序列很容易地一起融合到例如载体中。所述融合多肽可以包含多于一种POI。因此, 融合多肽可以包含两种、三种或多种POI。融合多肽的可能几个POI可以具有不同的特征和功能。每当在本文中以单数形式提及, POI也可以替代地以两个、三个或更多个POI存在。

[0127] 融合多肽的组分以形成一个连续多肽的方式融合。一个或几个POI可以与包涵体形成序列相邻。替代性地, 融合多肽可以包含POI和包涵体形成序列之间的中间体氨基酸序列。此外, POI相对于包涵体形成序列的顺序没有限制。因为在DNA水平实施融合多肽的设计, 必须小心从事, 从而POI的阅读框与包涵体形成序列的阅读框相同。

[0128] 包涵体在一些环境中天然地形成。而且, 当需要在包涵体中特异性地表达目的肽(POI)时, 可以使用包涵体形成序列(IBFS), 例如信号序列ssTorA。通过技术人员熟知的技术, 这样的IBFS与表达POI的序列遗传融合, 并且作为这样的融合的结果, POI在不溶性包涵体(IB)中表达。IBFS可以与任何长度、功能和溶解度的POI融合, 以在包涵体中产生POI。通常, 当POI在不溶性包涵体中表达并聚集时, 因为其可以针对蛋白水解降解得到保护, 其产生会增加。更进一步, 保护宿主细胞免受POI的任何毒性。包含POI的包涵体很容易与其他蛋白质和细胞组分分离, 例如通过离心和/或过滤。

[0129] 本领域技术人员将熟悉除ssTorA之外的IBFS, 包括Trp Δ LE、酮类固醇异构酶、 β -半乳糖苷酶、PagP、EDDIE、ELK16、GFIL8、PaP3.30、TAF12-HFD, 和PurF的F4片段。适用于在本

发明中使用的其他IBFS:s是基于WO 2018/138316中描述的来自ssTorA的最小基序的序列。

[0130] POI还可以任选地包含用于其他功能的氨基酸序列的另外的部分,例如,用于纯化或生化检测POI的氨基酸标签,例如六His标签。

[0131] 在一个实施方案中,POI可以是抗原,其序列可以与IBFS和/或偶联肽(例如肽标签)序列连接,产生融合多肽。所述融合多肽可包含多于一种作为抗原的POI,但也可包含其他种类的相邻连接的POI。

[0132] 在实施例2中,发明人通过将两种不同的偶联肽(肽标签)SpyTag和SnoopTag分别成功地缀合到它们的同源SpyCatcher和SnoopCatcher来验证他们的发现。使用融合蛋白ssTorA(3x)-MBP偶联肽产生包涵体,其中ssTorA(3x)是与麦芽糖结合蛋白(MBP)遗传融合的IBFS ssTorA的三个拷贝,已知麦芽糖结合蛋白成功地与ssTorA(3x)和C端偶联肽(肽标签)(SpyTag(ssTorA(3x)-MBP-SpT)或SnoopTag(ssTorA(3x)-MBP-SnT))产生包涵体。然后将每种融合蛋白与可溶性SpyCatcher-SnoopCatcher(包含N端SpyCatcher部分和C端SnoopCatcher部分的融合蛋白)一起温育。SDS-page分析表明,根据ssTorA(3x)-MBP-SpT/SnT-SpyCatcher-SnoopCatcher(图2A和图2B),使用系统中的任一个形成加合物。偶联肽(肽标签)典型地位于POI的C端,但也可能位于N端或内部。“内部”意指肽标签位于距POI的N末端(N-terminal end)和C末端(C-terminal end)(在本文中也分别称为N末端(N-terminus)和C末端(C-terminus))的至少1个、至少2个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25或至少30个氨基酸处。

[0133] 将IBFS融合到偶联肽序列和POI序列以形成包涵体是可能的,但在本披露中不是必需的。然而,已经使用IBFS的实施方案也根据IBFS-IB偶联肽形成融合多肽并且在例如POI的特征方面经受与未使用IBFS的融合多肽相同的条件。

[0134] 鉴于前述内容,应理解,可以在有或没有IBFS的情况下产生包涵体。例如,发明人已设法通过使用人重组蛋白磷脂酶2(Pla2)来修饰自发形成的IB,其表面携带偶联肽,例如SpyTag或SnoopTag,并可与SpyCatcher、SnoopCatcher或KTag配偶体肽连接。实施例3更详尽地披露了发明人如何用SpyTag或SnoopTag成功地修饰ssTorA(3x)诱导的和ssTorA(3x)非依赖性包涵体。发明人已使用以携带C端SpyTag或SnoopTag的包涵体形式表达的人重组蛋白(Pla2),并将标签共价偶联至SpyCatcher-SnoopCatcher(SpC-SnC)融合蛋白。SDS-PAGE分析(图3A)通过显示代表Pla2-SpT-SpC-SnC缀合加合物的条带来验证偶联。掺入SpyCatcher-SnoopCatcher融合蛋白的多组氨酸检测标签能够通过使用抗体识别的蛋白质印迹法进一步进行验证(图3B)。使用类似的方法,证明了SpyCatcher-SnoopCatcher与由多肽(包含N端IBFS(ssTorA[3x]))、C端SpyTag或SnoopTag、和(ssTorA(3x)-AED0-SpT和ssTorA(3x)-AED0-SnT)之间不同来源的短抗原表位)形成的IB的偶联。

[0135] 当使用IBFS时,发明人分别使用融合蛋白ssTorA(3x)-MBP-SnT或ssTorA(3x)-MBP-SpT(分别是,用于包涵体形成的三重TorA信号序列、麦芽糖结合蛋白(MBP)(已知其与ssTorA(3x)产生良好的包涵体)和C端SnoopTag或SpyTag)产生包涵体。技术人员认识到ssTorA、MBP和AED0仅仅是可以用于形成包涵体的IBFS、蛋白质和抗原的实例,并且本披露决不限于这些实例的使用。在研究下表1时应该记住,该表表示了蛋白质与包涵体的成功连接的概览,其中MBP、AED0和ssTorA为如何利用本发明的包涵体的示例性实例。

[0136] 表1. 蛋白质与包涵体成功连接的概述

[0137]	IB蛋白 (包括偶联肽)	偶联蛋白 (包括配偶体肽)
	Pla2-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	Pla2-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	ssTorA (3x) -AED0-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	ssTorA (3x) -AED0-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	ssTorA (3x) -MBP-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	ssTorA (3x) -MBP-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher
	ssTorA (3x) -MBP-SpyTag	GFPnb-SpyCatcher (+GFP)
	ssTorA (3x) -MBP-KTag	SnoopTag-mEGFP-SpyTag+SpyLigase
	ssTorA (3x) -AED0-SpyTag	SpyCatcher002-ZZ
	ssTorA (3x) -AED0-SpyTag	SpyCatcher002-蛋白A/G

[0138] 可能合适的IB (包括偶联肽) 和配偶体肽的另外的实例列于下表2中。

[0139] 表2. IB (包括偶联肽) 和配偶体肽的另外的实例

[0140]	<i>IB 蛋白</i>	<i>偶联蛋白 (包括配偶体肽)</i>	<i>备注</i>
	ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中
	ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	ZZ-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且抗体结合至缀合的 IB
	ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	蛋白 A/G-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且抗体结合至缀合的 IB
	ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	GFP 纳米抗体-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且抗体结合至缀合的 IB

[0141]

ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	ZZ-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	蛋白 A/G-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	GFP 纳米抗体-SpyCatcher	+ GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	ZZ-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	蛋白 A/G-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	GFP 纳米抗体-SpyCatcher	偶联蛋白存在于细菌裂解物中并且 GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	ZZ-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	蛋白 A/G-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	GFP 纳米抗体-SpyCatcher	+并且 GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	ZZ-SnoopCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	蛋白 A/G-SnoopCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	GFP 纳米抗体-SnoopCatcher	+ GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	ZZ-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	蛋白 A/G-SnoopCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	GFP 纳米抗体-SnoopCatcher	+ GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	SpyCatcher-SnoopCatcher	

[0142]

ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	ZZ-SpyCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	蛋白 A/G-SnoopCatcher	+抗体结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	GFP 纳米抗体-SnoopCatcher	+ GFP 结合至缀合的 IB
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	KTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	KTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	KTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag002	SpyCatcher002-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag002	SpyCatcher002-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag002	SpyCatcher002-模型蛋白质	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-SdyTag	SdyCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-TrxA-SdyTag	SdyCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-抗原-SdyTag	SdyCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTagJnr	DogTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTagJnr	DogTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTagJnr	DogTag-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-DogTag	SnoopTagJnr-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-DogTag	SnoopTagJnr-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化

[0143]

ssTorA(3X)-抗原-DogTag	SnoopTagJnr-模型蛋白质	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag002	SpyCatcher002-抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag002	SpyCatcher002-抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag002	SpyCatcher002-抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	SnoopCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	SnoopCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	SnoopCatcher-抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SpyCatcher	SpyTag-抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyCatcher	SpyTag-抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyCatcher	SpyTag-抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopCatcher	SnoopTag-抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopCatcher	SnoopTag-抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SnoopCatcher	SnoopTag-抗体	
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTagJnr	DogTag-抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTagJnr	DogTag-抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-	DogTag-抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化

[0144]

SnoopTagJnr		
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag002	SpyCatcher002-纳米抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag002	SpyCatcher002-纳米抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag002	SpyCatcher002-纳米抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTag	SnoopCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTag	SnoopCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SnoopTag	SnoopCatcher-纳米抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SpyCatcher	SpyTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyCatcher	SpyTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SpyCatcher	SpyTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-MBP-SnoopCatcher	SnoopTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopCatcher	SnoopTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-抗原-SnoopCatcher	SnoopTag-纳米抗体	
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-纳米抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-纳米抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-纳米抗体	偶联由添加的 SpyLigase 催化
ssTorA(3X)-MBP-SnoopTagJnr	DogTag-纳米抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-TrxA-SnoopTagJnr	DogTag-纳米抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化
ssTorA(3X)-抗原-	DogTag-纳米抗体	偶联由添加的 SnoopLigase 催化

[0145]

SnoopTagJnr		
KSI-MBP-SpyTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
KSI-TrxA-SpyTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
KSI-抗原-SpyTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
KSI-MBP-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
KSI-TrxA-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
KSI-抗原-SnoopTag	SnoopCatcher-模型蛋白质	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-聚糖	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-聚糖	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-聚糖	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-佐剂	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-佐剂	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-佐剂	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-细胞因子	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-细胞因子	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-细胞因子	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	SpyCatcher-黏附素	
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	SpyCatcher-黏附素	
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	SpyCatcher-黏附素	
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	KTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-	KTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag

[0146]

SpyTag		催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	KTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	KTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	KTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	KTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	KTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	KTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	KTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-SpyTag	KTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-SpyTag	KTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-SpyTag	KTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag

[0147]

		催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-聚糖	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-佐剂	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-细胞因子	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化，并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
ssTorA(3X)-MBP-KTag	SpyTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag

[0148]			催化, 并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
	ssTorA(3X)-TrxA-KTag	SpyTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化, 并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代
	ssTorA(3X)-抗原-KTag	SpyTag-黏附素	偶联由添加的 SpyLigase/SpyTag 催化, 并且 KTag 可以被组分 SnoopTagJnr/DogTag/SnoopLigase 体系替代

[0149] 如先前所描述, 本披露展示了使用多种不同连接体系用多种另外的部分修饰包涵体的强大方法。合适地, 另外的部分与配偶体肽附接、连接或以其他方式偶联。

[0150] 该另外的部分可以构成任何生物活性分子, 例如针对疾病的治愈剂 (例如生长因子、激素、白介素、干扰素或影响细胞组分例如受体、通道和脂质的其他多肽)、酶、毒素、结构多肽、研究工具 (如绿色荧光蛋白 (GFP)) 或抗微生物多肽。

[0151] 另外的部分的非限制性实例包括免疫调节或靶向化合物, 比如细胞因子、佐剂、抗体、**Affibody®**分子、**Nanobody®**分子、DARPIN、PAMP、TLR配体或激动剂、脂质、RNA、DNA、免疫调节肽、肽模拟物、T辅助细胞表位、免疫检查点抑制剂、PLGA、壳聚糖、TRAIL、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10R DN或其亚基、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-24、IL-27、GM-CSF、IFN- α 、IFN- γ 、CCL3 (MIP-1a)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP3)、XCL1 (淋巴细胞趋化因子)、CXCL1 (MGS- α)、CCR7、CCL 19 (MIP-3b)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10)、CXCL12 (SDF-1)、CCL21 (6Ckine)、OX40L、4-IBBL、CD40、CD70、GITRL、LIGHT、b-防御素、HMGB1、Flt3L、IFN- β 、TNF、dnFADD、TGF- α 、PD-L1RNAi、PD-L1反义寡核苷酸、TGF β RII DN、ICOS-L和S100。在一些实施方案中, 包涵体的另外的部分是将IB引导至特定亚细胞位置、细胞或组织, 例如聚糖、佐剂、黏附素、酶、可追踪探针、抗体、**Affibody®**分子、**Nanobody®**分子、DARPIN、毒素、药物、化疗药物、补体系统的组分、激素。这使得能够使用包涵体进行靶向, 使其适合用于抗原或药物递送。

[0152] 因此, 在使用连接体系对所披露的包涵体进行第一次修饰后, 本发明人进一步表明, 所述包涵体有可能通过将配偶体肽连接至另外的部分而进行第二次修饰。在本披露的实施例4中, 另外的部分是可溶性mEGFP (单体增强型绿色荧光蛋白) 衍生物, 在其N末端携带SnoopTag, 在其C末端携带SpyTag (SnT-mEGFP-SpT)。将其与携带基因融合的KTag的ssTorA (3x) -MBP IB (ssTorA (3x) -MBP-KT) 混合。如之前所提及的, 需要SpyLigase来形成K-Tag和SpyTag之间的键, 因此添加到一批中, 而留下一批不添加。荧光显微镜分析 (图4A) 验证需要SpyLigase来驱动键的形成, 因为不具有SpyLigase的批次没有发射信号, 但具有SpyLigase的批次发射清楚的信号。随后使用SDS-PAGE分析样品, 这进一步验证了发现, 因为看到一条带, 象征着在约100kDa处的加合物 (图4B)。

[0153] 因此, 通过成功地将偶联肽表达为IB的一部分 (例如展示在其表面上) 并维持其对配偶体肽的结合特异性, 发明人已成功地将IB连接到特定化合物, 例如功能部分。技术人员

将理解,这开启了多种可能的应用领域,例如使用所披露的修饰的包涵体作为免疫刺激性工具。

[0154] 通过改变另外的部分,修饰的包涵体构成了具有巨大潜力的生物学工具。发明人已经表明可以将以IB形式表达的POI连接至特定靶标。在例如POI是抗原并且另外的部分对免疫系统的特定细胞具有亲和力的情况下,包涵体提供用于靶抗原递送的系统。因此,在一个实施方案中,另外的部分是对表面暴露的组分例如受体具有亲和力的靶向部分。

[0155] 靶向部分可能对其具有亲和力的表面暴露的组分的非限制性实例是CD4、CD8、CD1、CD180、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、TCR、CRD、Toll样受体(TLR)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLR)、视黄酸诱导基因I样解旋酶受体(RLR)、和C型凝集素受体(CLR)、吞饮受体、CD205/DEC205、CD209/DC-SIGN、Clec9A/DNGR-1/CD370、Clec7A/Dectin-1/CD369、Clec6A/Dectin-2、Clec12A、CD1d、CD11c、CD11b、CD40、CD152/CTLA-4、CD279/PD-1、NOD样受体、RIG-I样受体、PRR、CCR、CD36、Siglec H、PDCTREM、朗格汉斯蛋白、MMR、D-SIGN和叶酸受体。

[0156] 在另一个实施方案中,当POI是具有治疗特性的蛋白质时,所披露的靶向递送系统可以适用于将以IB形式产生的药物引导至身体的某些区域。实例包括但不限于将IB引导至受损或发生病变的组织和细胞。在本披露的一个实施方案中,靶向部分对任何类型癌症的至少一个肿瘤细胞具有亲和力。癌症可以选自由以下组成的组:淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、黑色素瘤、肾细胞癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、膀胱癌、头颈癌、结直肠癌、食管癌、宫颈癌、胃癌、肝细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌和甲状腺癌。

[0157] 在另一个实施方案中,靶向部分是抗体。本领域技术人员将理解,该实施方案可应用于大量领域,例如免疫疗法、免疫、疫苗递送和免疫激活。因此,靶向部分可以是适用于将具有预防目的的目的蛋白质引导至身体的某些区域的抗体。在一个实施方案中,抗体是单克隆、多克隆或结构域抗体(例如Nanobody®分子或dAb)。

[0158] 众所周知,抗体是免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区的至少一个抗原识别位点特异性结合靶标(抗原),例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽或其他。如本文所用,术语“抗体或其抗原结合片段”不仅涵盖全长或完整的多克隆或单克隆抗体,还涵盖其抗原结合片段,例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₃、Fv及其变体、包含一个或多个抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、微抗体、二抗体、三抗体、四抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型,包括抗体的糖基化变体、抗体和共价修饰的抗体的氨基酸序列变体。经修饰的抗体及其抗原结合片段的进一步的实例包括Nanobody®分子、AlbuAb、DART(双亲和力重靶向)、BiTE(双特异性T细胞衔接子)、TandAb(串联双抗体)、DAF(双重作用Fab)、二合一抗体、SMIP(小型模块免疫药物)、FynomAb(与抗体融合的fynomer)、DVD-Ig(双可变结构域免疫球蛋白)、CovX抗体(肽修饰的抗体)、双抗体和三功能抗体(triomAb)。抗体及其抗原结合片段的变体的列表不应被视为限制性的。

[0159] 技术人员还知道到合适的非抗体来源的亲和分子,包括DARPINS、Affibody®分子、葡萄球菌蛋白A、链球菌蛋白G、蛋白A/G嵌合体、蛋白L或蛋白A结构域衍生物蛋白Z及其ZZ二聚体。应当理解,这些分子与免疫球蛋白特异性结合。因此,通过本文所述的异肽键合

技术用蛋白A/G/L或其衍生物修饰IB允许这些IB随后装配现成的抗体。

[0160] 如本文所用,术语“全长抗体”是指任何类型的抗体,例如IgD、IgE、IgG、IgA、IgM或IgY(或其任何亚类)。不同类型的抗体的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0161] “抗原结合片段”是抗体分子或其衍生物的部分或区域,其保留相应全长抗体的结合抗原的全部或大部分。抗原结合片段可包含重链可变区(V_H)、轻链可变区(V_L)或两者。 V_H 和 V_L 中的每一个典型地含有三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3。 V_H 或 V_L 中的三个CDR侧接框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)。如上文简要列出的,抗原结合片段的实例包括但不限于:(1) Fab片段,其是具有 V_L - C_L 链和 V_H - C_H1 链的单价片段;(2) Fab'片段,其是具有重链铰链区的Fab片段,(3) $F(ab')_2$ 片段,其是由重链铰链区接合(例如通过铰链区的二硫键连接)的Fab'片段的二聚体(4) Fc片段;(5) Fv片段,其是具有抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域的最小抗体片段;(6) 单链Fv(scFv)片段,其是单个多肽链,其中scFv的 V_H 和 V_L 结构域通过肽接头连接;(7) $(scFv)_2$,其包含两个 V_H 结构域和两个 V_L 结构域,它们通过两个 V_H 结构域经由二硫桥缔合;以及(8) 结构域抗体,其可以是特异性结合抗原的抗体单可变结构域(V_H 或 V_L)多肽。

[0162] 可以经由常规方法制备抗原结合片段。例如, $F(ab')_2$ 片段可以通过全长抗体分子的胃蛋白酶消化产生,并且Fab片段可以通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥来生成。替代性地,可以经由重组技术通过在合适的宿主细胞(例如大肠杆菌、酵母、哺乳动物、植物或昆虫细胞)中表达重链和轻链片段并将它们在体内或在体外组装以形成所需的抗原结合片段来制备片段。可以经由重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备单链抗体。例如,可以在两个可变区之间并入柔性接头。技术人员知道制备全长抗体及其抗原结合片段的方法。

[0163] 因此,在一个实施方案中,本披露的这一方面提供了包含靶向部分的包涵体,该靶向部分是选自由以下组成的组的抗体或抗原结合片段:全长抗体、Fab片段、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、Fc片段、Fv片段、单链Fv片段、 $(scFv)_2$ 和结构域抗体。

[0164] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab片段和scFv片段。在一个特定实施方案中,所述至少一种抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

[0165] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组:单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体及其抗原结合片段。

[0166] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指具有单价亲和力的抗体,意指单克隆抗体的样品中的每个抗体分子结合抗原上的相同表位,而如本文所用,术语“多克隆抗体”是指针对特定抗原应答的抗体的集合,但在该集合中可能存在不同的抗体分子,例如识别抗原上的不同表位。多克隆抗体典型地通过接种合适的哺乳动物产生,并从哺乳动物的血清中纯化。单克隆抗体由相同的免疫细胞制成,这些细胞是唯一亲本细胞(例如杂交瘤细胞系)的克隆。如本文所用,术语“人抗体”是指具有可变区和恒定区的抗体,该抗体基本上对应于或衍生自从人受试者获得的抗体。如本文所用,术语“嵌合抗体”是指重组或基因工程化的抗体,比如小鼠单克隆抗体,其含有来自不同物种(例如人)的多肽或结构域,例如引入以降低抗体的免疫原性。术语“人源化抗体”是指来自非人物种的抗体,其蛋白质序列已被修饰以增加其与人中天然产生的抗体变体的相似性,例如以降低免疫原性。

[0167] **Nanobody®**分子(单结构域抗原结合片段)由于其尺寸小、产生简单和亲和力高,允许有广泛的生物技术和治疗应用。例如,它们已被用于靶向小鼠中的特定免疫细胞类

型 (Groeve, K. 等人 2010J Nucl Med [美国核医学杂志] 51 (5) : 第782-9页)。用亲和结合剂 (例如 **Nanobody®** 分子) 修饰本文所述的 IB, 允许将 IB 靶向例如特定免疫细胞类型, 这可能会大大提高所需免疫应答的效率。**Nanobody®** 分子还可用于将 IB 靶向肿瘤或受损组织。应当理解, 激动性 **Nanobody®** 分子可以激活某些细胞, 而拮抗性 **Nanobody®** 分子可以抑制某些过程、细胞和/或组分。

[0168] 在实施例 5 中, 发明人表明, 根据 ssTorA (3x) -MBP-SpT 的构建体, 可以通过从包含三个拷贝的 IBFS ssTorA、作为模型蛋白质的麦芽糖结合蛋白和表达 SpyTag 的序列的融合序列制成包涵体来获得这种类型的修饰。将包涵体与对已与配偶体肽 SpyCatcher (GFPnb-SpC) 融合的绿色荧光蛋白 GFP (本文中表示为 GFPnb) 具有亲和力的 **Nanobody®** 分子混合在 PBS 中。作为对照, PBS 中的 ssTorA (3x) -MBP-SpT 包涵体也与融合到无催化活性的 SpyCatcher 突变体 (E56Q) (其缺乏与 SpyTag 偶联肽形成异肽键的能力) 的 GFPnb 混合 (本文中表示为 GFPnb-SpC EQ)。使用相差显微术分析混合物 (图 5A), 来自与 GFPnb-SpC 的混合物的包涵体均匀地发出荧光, 而与 GFPnb-SpC EQ 温育的那些包涵体是暗的。还使用使用 SDS-PAGE 随后考马斯亮蓝染色分析混合物 (图 5B)。结论是, GFPnb-SpC 构建体的 SpyCatcher 部分与 ssTorA (3x) -MBP-SpT 构建体的 SpyTag 形成了异肽键, 将包涵体连接到 GFPnb (其随后与 GFP 相互作用)。

[0169] 表达载体

[0170] 为了表达本披露的融合多肽, 编码它的核酸以表达载体的形式构建或整合到宿主细胞的基因组中并由其直接表达。

[0171] 可以使用标准分子生物学技术产生基因表达构建体, 该技术涉及限制酶、DNA 连接酶、PCR、寡核苷酸合成、DNA 纯化和本领域技术人员熟知的其他方法。

[0172] 在一个实施方案中, 表达构建体包含含有 POI 序列和偶联肽 (例如肽标签) 序列的转录单位。合适地, 偶联肽 (例如肽标签) 序列位于 POI 的 C 末端 (C-terminal end 或 C-terminus)。在一些实施方案中, 肽标签序列位于 POI 的 N 末端 (N-terminal end 或 N-terminus)。在其他实施方案中, 如上文所述, 肽标签序列在 POI 内部。任选地, 遗传构建体可进一步包括包涵体形成序列 (IBFS) 以促进包涵体产生。在这种情况下, 转录单位被布置成使得编码 POI 的部分的阅读框与 IBFS 的阅读框匹配。任选地, 转录单位还包含编码 POI 和 IBFS 之间的中间体氨基酸序列的序列和/或编码提供其他功能性 (例如用于纯化 POI 的标签) 的另外的氨基酸序列的序列。

[0173] 在表达构建体中, 转录单位被布置成使其与一个或多个启动子和/或控制其表达的其他序列可操作地连接。典型地, 构建体包含具有启动子或转录起始区的转录单位的 5' 区域, 以及任选地控制转录终止的转录单位的 3' 区域。此类控制区典型地 (尽管不一定) 衍生自对选择的表达宿主细胞是天然的基因。

[0174] 可用于驱动融合多肽从不同宿主细胞中的转录单位表达的转录起始区和启动子对于本领域技术人员来说是非常多的并且是熟悉的。合适的启动子取决于选择用于表达的宿主细胞。这些包括但不限于用于大肠杆菌中使用的 tet、lac、tac、trc、ara (pBAD)、trp、rha、λPL 和 T7 启动子, 用于在芽孢杆菌属中使用的 amy、apr 和 npr 启动子以及用于在酵母菌属中使用的 CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO 和

TPI启动子。大肠杆菌中优选的启动子包括tet、araBAD和lac以及T7启动子。在大肠杆菌和其他宿主中具有类似动力学性质的其他启动子也是优选的。如下文进一步描述的,此类启动子能够实现强大且快速的蛋白质产生,因此有助于有效的包涵体产生。

[0175] 转录终止区可以任选地包括在载体中以优化表达和/或增加转录的mRNA的稳定性。此类区域也是本领域已知的,或者可以衍生自对优选的宿主是天然的各种基因。

[0176] 此外,构建体典型地包含其他功能,例如一个或多个选择标记和允许和控制载体自主复制的序列,例如,复制起点(ori)。复制起点决定了载体的拷贝数。优选地,复制起点是高拷贝数复制起点。如下文将进一步描述的,此类复制起点能够实现强大且快速的蛋白质产生,因此有助于有效的包涵体产生。

[0177] 载体优选是自主或自我复制的质粒、粘粒、噬菌体、病毒或逆转录病毒。多种宿主/载体组合可用于表达本发明的融合多肽。例如,有用的表达载体可以包含染色体、非染色体和/或合成核酸序列的片段。合适的载体包括具有特定宿主范围的载体,例如对例如大肠杆菌具有特异性的载体,以及具有宽的宿主范围的载体,例如可用于革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌的载体。

[0178] 更优选的是具有特定宿主范围的载体,例如对例如大肠杆菌具有特异性的载体。

[0179] 其他有用的载体(例如在大肠杆菌中表达)是:pQE70、pQE60和pQE-9(凯杰有限公司(QIAGEN, Inc));pBluescript载体、Phagescript载体、pNH8A、[rho]NH16a、pNH18A、[rho]NH46A(Stratagene克隆系统公司(Stratagene Cloning Systems, Inc.));ptrc99a、pKK223-3、[rho]KK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia Biotech公司(Pharmacia Biotech, Inc.));pLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pACYC177、pACYC184、pRSF1010和pBW22(Wilms等人,2001Biotechnology and Bioengineering[生物技术与生物工程],73(2)95-103)或其衍生物。进一步有用的质粒是本领域技术人员熟知的,并且描述于例如“Cloning Vectors[克隆载体]”(编辑Pouwels P.H.等人Elsevier[爱思唯尔出版社],阿姆斯特丹-纽约-牛津,1985)中。

[0180] 载体被引入宿主细胞中,并且由载体编码的蛋白质表达在包涵体中。在本披露的情况下,这导致目的蛋白质的包涵体展示其配偶体肽可接近的偶联肽(例如在其表面上)。包涵体上的偶联肽对至少一种配偶体肽具有特异性亲和力,其可与该配偶体肽形成异肽键。因此,形成了非常牢固的共价键,将偶联肽直接连接到配偶体肽,并将包涵体间接连接到配偶体肽。

[0181] 有效形成包涵体的表达动力学

[0182] 典型地,尽管并非排他地,本披露中的载体被布置为促进融合多肽(例如连接至偶联肽的POI,任选地包含IBFS)在相对短的时间段内相对高水平的表达。融合多肽的快速和强表达有助于有效形成包涵体。融合多肽在任何时间在宿主细胞中的表达不仅由表达水平,即表达强度决定,还由表达速率,即表达动力学决定。为了有效形成包涵体,优选表达水平高,即表达强,并且表达速率也高,即表达快。可以通过各种方式实现高水平的快速速率的表达。例如,可以选择提供快速表达动力学的强启动子来控制融合多肽的表达。一种替代性方法是将编码融合多肽的核酸序列排列布置在高拷贝数的载体中,使得编码融合多肽的核酸的多个拷贝将存在于宿主细胞中。随着表达被诱导,融合多肽将由多个拷贝平行表达,确保以快速速率高水平表达。强、快速的启动子和高拷贝数载体的组合在水平和速度方面

提供了更有效的表达。

[0183] 可以通过使用具有高拷贝数复制起点的载体或质粒来实现强而快速的表达,促进IB的形成。细胞中大量拷贝的表达载体使得能够在任何时间由大量的转录单位平行表达,从而导致融合多肽的快速和强表达。

[0184] 尽管快速和强表达可能是有利的并且是典型地优选的,但是应当理解,较慢速率的IB表达(例如通过使用具有缓慢诱导动力学的载体)也可能是合适的。

[0185] 宿主细胞

[0186] 对于融合多肽的蛋白质表达和产生,使用本领域已知的合适方法将包含编码融合多肽的转录单位的载体转化到合适的宿主细胞中。宿主细胞优选是可以通过本领域技术人员熟知的方法培养和操作的细胞,其能够表达异源蛋白质并且其中在某些多肽过表达后可以形成包涵体。携带编码融合多肽的表达载体的宿主细胞构成了用于产生融合多肽的表达系统。表达系统可以是诱导型的或非诱导型的。

[0187] 用于在包涵体中表达融合多肽的优选宿主细胞包括微生物宿主的细胞,例如细菌、酵母和丝状真菌。可以使用的宿主细胞的实例包括但不限于:细菌属的物种:埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、弧菌属(*Vibrio*)、志贺氏杆菌属(*Shigella*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、发酵单胞菌属(*Zymomonas*)、赤细菌属(*Erythrobacter*)、绿硫菌属(*Chlorobium*)、着色菌属(*Chromatium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、噬细胞菌属(*Cytophaga*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacteria*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、异常球菌属(*Deinococcus*)、泛菌属(*Pantoea*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基单胞菌(*Methylobacter*)、甲基杆菌属(*Methylobacter*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、集胞藻属(*Synechocystis*)、聚球藻属(*Synechococcus*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、粘球菌属(*Myxococcus*)、博德特菌属(*Bordetella*)和柄杆菌属(*Caulobacter*),真菌或酵母属例如曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、假丝酵母属(*Candida*)和汉逊酵母属(*Hansenula*)。

[0188] 融合多肽的表达

[0189] 可以在宿主细胞中实现包涵体中目的多肽的表达。宿主细胞在以下条件下培养,在该条件中编码融合多肽的核酸被翻译成大量融合多肽分子并且融合多肽分子聚集在包涵体中。

[0190] 宿主细胞在适用于特定宿主细胞的培养基中培养。例如,培养基包含合适的碳源。此外,培养基优选针对蛋白质表达进行优化。例如,宿主细胞可以在本领域已知的常规培养基(例如复合培养基如Luria-Bertani液体培养基或“营养酵母液体培养基”、如Kortz等人1995, *J Biotechnol* [生物技术杂志] 39, 59-65所述的含有甘油的培养基、或Kulla等人1983, *Arch Microbiol* [微生物学文献集] 135, 1所述的矿物盐培养基)中培养。可以适当地修饰培养基,例如,通过添加另外成分,如缓冲液、盐、维生素或氨基酸。优选将与表达载体

的抗生素抗性标记相匹配的抗生素添加到培养基中,以确保载体的稳定存在,从而确保稳定的蛋白质表达。

[0191] 如果宿主是大肠杆菌,则有利地使用Luria-Bertani液体培养基(LB培养基)。细胞通常在37℃的温度下培养。当培养物达到早期对数期(OD_{660} 为约0.3至约0.5)时,通过向培养基中添加诱导剂来适当地诱导靶蛋白的表达,该诱导剂适于所使用的表达载体的启动子。诱导剂诱导包含POI和包涵体形成序列的融合多肽的表达。诱导通常在约30℃至45℃的温度下(通常在约37℃的温度下)进行。在稍高的温度下(例如在约42℃下)的诱导经常是优选的,因为它经常导致更有效的包涵体形成。

[0192] 至于用于细胞培养的合适系统,例如可以在培养管、摇瓶或细菌发酵罐中使用连续或不连续培养,例如分批培养或补料分批培养。融合多肽的表达可以通过例如SDS-PAGE组合考马斯染色/银染色、蛋白质印迹或其变型,包括斑点印迹进行监测。

[0193] 也可以通过在600nm或660nm处随时间跟踪光密度来监测细胞生长。当细胞培养物达到用于蛋白质回收的最佳阶段时,收获细胞并从宿主细胞培养物中回收含有融合多肽的包涵体。为了获得表达的多肽的最大产量,通常在细胞培养物达到稳定期时收获细胞。典型地,例如通过EDTA和/或溶菌酶处理,和/或超声处理或弗氏压碎,将细胞均质化或裂解,以释放包含融合多肽的不溶性包涵体。

[0194] 包涵体的回收

[0195] 从细胞裂解物中分离包涵体的方法是本领域熟知的,并且包括离心、过滤及其组合(Burgess RR 2009Methods Enzymol[酶学方法]463:259-82;Nguyen L 1993Protein Expr Purif[蛋白质表达与纯化]4:425-433;Palmer和Wingfield 2012Curr Protoc Protein Sci[蛋白质科学最新方案]第6章:6.3单元;Batas B等人1999JBiotecnol[生物技术杂志]68(2-3):149-58)。典型地,该过程涉及几个均质化循环。

[0196] 配偶体肽(例如Catcher)及其相缔合的另外的部分典型地(尽管并非排他地)使用载体/基因组和宿主克隆和以可溶性形式表达,这些载体/基因组和宿主可能与用于表达POI和偶联肽的那些不同。因此,虽然配偶体肽及其另外的(功能性)部分可以在细菌(例如大肠杆菌)或酵母细胞中克隆和表达,但它们也可以在真核细胞例如昆虫细胞(例如S2、Sf9、MimicTM Sf9、Sf21和Trichoplusia ni High-5)或哺乳动物细胞(例如PER.C6.[®]、COS-7、CHO、HeLa和HEK293)中克隆和表达,并使用本领域技术人员已知的标准技术和方法进行纯化。

[0197] 修饰的包涵体可有利地用于将特定药物递送至某一靶标。因此,在某些方面和实施方案中,上文所述的包涵体、复合物、核酸、核酸构建体和/或宿主细胞可以单独地或以组合物的形式施用于受试者。所述组合物可包含可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。在一个实施方案中,组合物是药物组合物和/或免疫学组合物。在一个实施方案中,组合物是疫苗组合物。

[0198] 在一个实施方案中,本文披露的包涵体或复合物用作药物。

[0199] 本发明的包涵体可用作治疗剂、诊断剂、预后剂或预防剂。例如,这可以通过使用抗体作为附接至配偶体肽的另外的部分来实现,从而可以在人体中检测到对所述抗体具有亲和力的抗原。实施例5和图5中披露了利用该技术的实例,其中另外的部分是对绿色荧光

蛋白具有亲和力的绿色荧光 Nanobody® 分子。通过将 GFP Nanobody® 分子交换为对某些疾病条件下特异性存在的蛋白质具有亲和力的 Nanobody® 分子,所披露的包涵体可用于疾病的诊断和/或提供疾病的预判。

[0200] 本发明的一些方面和实施方案还提供了治疗、诊断、预判或预防受试者的疾病或障碍的方法,该方法包括向所述受试者施用本发明的包涵体、复合物或组合物的步骤。受试者可以是任何动物,例如选自人、农场动物(例如牛、绵羊、猪和山羊)和伴侣动物(例如马、狗和猫)的哺乳动物。动物也可以是鱼(例如鲑鱼、鳟鱼、石斑鱼、罗非鱼和鲶鱼)或鸟(例如家禽)。

[0201] 根据先前披露的实施方案的包涵体、复合物或组合物也可用作疫苗。通过将例如免疫刺激部分连接至配偶体肽并因此连接至以抗体形式表达的 POI,所披露的包涵体可用于刺激免疫系统,使其靶向特定类型的发生病变的细胞或感染。

[0202] 上面呈现的类型的靶向部分提供了一种产生修饰的包涵体的方法,该修饰的包涵体对免疫系统特定组分具有亲和力。此外,通过将聚集目的蛋白质(比如包涵体中的抗原)的能力与用免疫靶向部分修饰所述包涵体的能力组合,发明人使得刺激来自免疫系统的某一应答和使用如本文所述的修饰的包涵体作为例如疫苗成为可能。基于相同的原理,本披露提供了一种药物递送系统,其中包涵体由聚集的生物药物分子组成,并用对特定细胞类型(比如癌细胞)具有亲和力的靶向部分修饰,因此使用包涵体作为药物。非常需要靶向药物递送,因为它可以提供施用途径,该施用途径有效地将药物递送到目的位点和/或靶标并且与例如其中药物通过血液系统分布的口服施用相比对患者的压力更小。

[0203] 鉴于前述内容,技术人员将理解该方法可用于其中 IB 与人和动物中的细胞或组织之间的特定相互作用是先决条件的应用。例如,涉及使用 IB 用于抗原递送的免疫方法预计将显著受益于用靶向免疫系统特定细胞亚群的亲和分子(例如抗体、Affibody® 分子或 Nanobody® 分子)修饰 IB,从而允许更多定制的免疫应答。类似地,用识别肿瘤特异性分子(例如存在于肿瘤细胞表面的分子)的亲和分子修饰 IB 将允许基于靶向的 IB 的癌症疗法。

[0204] 此外,蛋白质黏附素或聚糖可以附接在 IB 的表面,以促进它们与优选的细胞类型或组织的缔合。IB 用于抗原递送或癌症治疗的功能性也可以通过为它们装配免疫调节分子(如佐剂或细胞因子)来增强,以允许定制的免疫应答。

[0205] 在其他实施方案中,IB 可以用允许将 IB 固定在特定基质上的结合配偶体进行修饰,例如以促进固定化生物催化。

[0206] 应当理解,本文披露的包涵体、复合物和组合物可适用于各种医学和/或兽医应用,并且可用于治疗任何动物,例如哺乳动物,例如人、农场动物(例如牛、绵羊、猪或山羊)或伴侣动物(例如马、狗或猫)。在一个实施方案中,所述哺乳动物是人。动物还可以是鸟(例如家禽)或鱼(例如鲑鱼、鳟鱼、石斑鱼、罗非鱼或鲶鱼)。

[0207] 总之,本文描述了一种使用连接体系用功能部分修饰包涵体的通用、简单且具成本效益的方法,该连接系统使得所述包涵体适用于多种生物技术和生物医学目的。

[0208] 为了使本发明能够被充分理解并付诸实践,参考以下非限制性实例。

[0209] 实施例

[0210] 通用程序

[0211] 包含另外的部分的可溶性配偶体肽的蛋白质表达和纯化

[0212] 使用大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞容纳本文披露的不同构建体,这些构建体克隆到合适的表达载体 (pET28a或pDEST14) 中。将细胞放置过夜并将过夜培养物在新鲜培养基中传代培养并继续使细胞生长。在达到早期对数期 ($OD_{600} \approx 0.3$) 后,用0.4mM IPTG诱导目的蛋白质的表达。通过低速离心在诱导后4h从培养物中收集细胞并重悬于45ml PBS中。此后,再次通过低速离心收集细胞并储存在-80℃。将细胞重悬 (42x浓缩) 在结合缓冲液 (50mM磷酸钠, 300mM NaCl, pH 7.4) 中。将PMSF添加到0.5mM。细胞悬浮液在1.2kbar下通过OneShot细胞破碎机两次。随后,在4℃下通过两个离心步骤清除悬浮液: 第一步在10,000x g下持续10min, 第二步在293,000x g下持续45min。根据制造商的说明,使用TALON Superflow (通用电气医疗集团生命科学部 (GE Healthcare Life Sciences)) 从澄清的裂解物中纯化目的蛋白质。

[0213] 包涵体表达和包含偶联肽的POI的分离

[0214] 将来自过夜培养物的大肠杆菌TOP10F' 细胞 (具有克隆到表达载体pIBA中的构建体) 在新鲜培养基中传代培养并继续生长直至达到早期对数期 ($OD_{600} \approx 0.3$), 从而用0.2μg/ml的脱水四环素诱导融合蛋白的表达。诱导后3h通过低速离心从培养物中收集细胞,然后重悬于40ml的10mM Tris-HCl, pH 8.0中。通过低速离心再次收集细胞并冷冻储存 (-20℃或-80℃)。随后将细胞重悬于10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM Na-EDTA、10μg/ml溶菌酶中至 OD_{600} 为20 (如由最终培养物 OD 计算), 并在37℃下温育1h。将悬浮液在冰上冷却并使用尖端超声波仪 (Branson Sonifier 250, 每个样品的设置不同) 进行超声处理,直到所有细胞都被裂解 (通过显微术验证细胞裂解)。使用15,000x g下离心15min收集包括包涵体的所有不溶性物质。将沉淀的物质重悬于一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0中,并超声处理以打碎包涵体的团块。添加一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0、2mM Na-EDTA、2% Triton X-100 (以给出最终1mM EDTA和1% TX-100)。将悬浮液在环境温度下温育、搅拌1h。通过以15,000x g离心15min收集包涵体,再次重悬于一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0中,并超声处理以打碎团块。添加一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0、2M尿素。将悬浮液在环境温度下温育、搅拌1h。使用15,000x g离心15min收集包涵体,重悬于一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0中,并超声处理以打碎团块。添加一半体积的10mM Tris-HCl pH 8.0、2M NaCl。将悬浮液在环境温度下温育、搅拌1h。使用15,000x g离心15min收集包涵体,重悬于一个体积的10mM Tris-HCl pH 8.0中,并超声处理以打碎团块。使用15,000x g离心15min收集包涵体,重悬于PBS中并储存在-20℃。

[0215] 实施例1

[0216] 概念证明

[0217] 该实施例说明了用功能亲和部分修饰IB以允许IB靶向特定细胞和/或组织的概念证明。图1A是使用SpyTag和SpyCatcher的连接体系用Nanobody® (GFPnb) (对绿色荧光蛋白 (GFP) 具有亲和力) 修饰的包涵体 (IB) 的示意图。GFPnb能够结合GFP,从而产生荧光修饰的IB。图1B是带状图,其显示了配偶体肽SpyCatcher (左侧) 和与GFP (右侧) 结合的GFPnb。

[0218] 实施例2

[0219] 使用两种不同的异肽键合技术与包涵体缀合

[0220] 该实施例说明了当与以IB形式表达的蛋白质融合时,两种不同的偶联肽 (即肽标签) 与它们各自的同源配偶体肽 (即结合蛋白配偶体) 成功共价缀合。序列ssTorA (3x) -MBP

与C端SpyTag (ssTorA (3x) -MBP-SpT; SEQ ID NO:2) 或SnoopTag (ssTorA (3x) -MBP-SnT; SEQ ID NO:13) 遗传融合并且所得的融合物以IB形式在两个不同的批次中表达。

[0221] 从pET28a表达包含N端SpyCatcher组分和C端SnoopCatcher组分的可溶性融合蛋白 (SpyCatcher-SnoopCatcher; SpC-SnC; SEQ ID NO:1)。使用具有3500Da MWC0 (Spectra/Por) 的透析膜在4℃下将纯化的SpyCatcher-SnoopCatcher用500x体积的PBS透析16h。透析后添加甘油至终浓度为10% (v/v)。

[0222] 在PBS pH 8.0中, 将分离自表达ssTorA (3x) -MBP-SpT或ssTorA (3x) -MBP-SnT的细胞中的包涵体 (总蛋白约15μg) 与纯化的和透析的SpyCatcher-SnoopCatcher (最终浓度为10μM) 混合。将混合物在25℃温育2h。

[0223] SpyCatcher-SnoopCatcher与ssTorA (3x) -MBP-SpT IB和ssTorA (3x) -MBP-SnT IB的成功缀合可以从对应于0.75μg包涵体的样品的SDS-PAGE和考马斯染色分析中看出。有效形成约75kDa的加合物, 指示肽标签 (SpyTag或SnoopTag) 和结合蛋白配偶体 (SpyCatcher或SnoopCatcher) 之间存在共价键, 分别见图2A和图2B。

[0224] 为了比较, 将反应混合物中使用的等量包涵体物质和SpyCatcher-SnoopCatcher加载到凝胶上。分子量 (kDa) 标记指示在分图的左侧。加合物用箭头指示。

[0225] 实施例3

[0226] 使用两种不同的异肽键合技术缀合至ssTorA (3x) 诱导的且ssTorA (3x) 非依赖性的包涵体

[0227] 该实施例显示了使用两种不同的异肽键合系统SpyCatcher/SpyTag和SnoopCatcher/SnoopTag将配偶体蛋白缀合到IB。此外, 它说明了两种系统都可以用于与各种设计的IB形成序列的缀合。此外, 它显示了配偶体蛋白与独立于IB形成标签形成的Pla2 IB的成功偶联。

[0228] 如实施例2中从载体pET28a表达融合蛋白SpyCatcher-SnoopCatcher (SpC-SnC; SEQ ID NO:1), 并在4℃使用具有3500Da MWC0 (Spectra/Por) 的透析膜用500x体积的PBS透析16h。透析后添加甘油至终浓度为10% (v/v)。

[0229] 衍生自Pla2 (携带C端SpyTag或SnoopTag) 的包涵体分别作为构建体Pla2-SpT (SEQ ID NO:4) 和Pla2-SnT (SEQ ID NO:3) 产生。同样, 包含在IBFS ssTorA (3x) 和SnoopTag或SpyTag之间融合的不同来源的短抗原表位 (AED0) 的包涵体被制成为构建体ssTorA (3x) -AED0-SnT和ssTorA (3x) -AED0-SpT。将包涵体 (30μg总蛋白) 与纯化的SpyCatcher-SnoopCatcher (70μM终浓度) 在PBS中混合。将混合物在25℃温育2h。通过离心收集包涵体并重悬于PBS中。使用SDS-PAGE和考马斯染色分析对应于1.5μg包涵体总蛋白的样品。分析表明, 当混合在一起时, 衍生自携带C端SpyTag或SnoopTag的Pla2的IB与SpyCatcher-SnoopCatcher融合蛋白共价偶联, 如通过图3A中可见的加合物 (由箭头指示) 验证。同样, ssTorA (3x) -AED0-SnT或ssTorA (3x) -AED0-SpT IB与SpyCatcher-SnoopCatcher共价偶联, 如通过图3A中可见的加合物验证。

[0230] 使用对应于1.5μg包涵体总蛋白的样品和单克隆抗多组氨酸抗体 (西格玛公司 (Sigma), H1029), 通过SDS-PAGE和蛋白质印迹进行进一步验证 (图3B)。分子量 (kDa) 标记指示在分图的左侧。在图3A中, 加合物用箭头指示; 在图3B中, 同样指示了对应的位置。

[0231] 实施例4

[0232] SnT-mEGFP-SpT与ssTorA (3x) -MBP-KT包涵体的缀合

[0233] 该实施例说明了生物功能分子经由配偶体肽 (SpyTag) 和偶联肽之间的共价异肽键形成成功地缀和到包涵体。在这种情况下,偶联肽是与麦芽糖结合蛋白ssTorA (3x) -MBP在其C末端遗传融合的KTag (ssTorA (3x) -MBP-KT;SEQ ID NO:5)。从表达ssTorA (3x) -MBP-KT的细胞中分离包涵体(14μg总蛋白)。

[0234] 单体增强型绿色荧光蛋白 (mEGFP) 用作与C末端的配偶体肽 (SpyTag) 和N末端的冗余SnoopTag (SnT-mEGFP-SpT;SEQ ID NO:7) 偶联的另外的部分。SnT-mEGFP-SpT由pET28a表达并纯化。存在连接酶蛋白SpyLigase (SEQ ID NO:6) 以驱动偶联反应并由pDEST14表达。在4℃,使用具有3500Da MWC0 (Spectra/Por) 的透析膜用250x体积的PBS透析SpyLigase和SnT-mEGFP-SpT持续3h、15h和3h,在中间更换PBS。

[0235] 从表达ssTorA (3x) -MBP-KT (14μg总蛋白) 的细胞中分离的包涵体与纯化的SnT-mEGFP-SpT和SpyLigase (最终浓度分别为5μM和20μM) 在40mM Na₂HPO₄、20mM柠檬酸,1.5M三甲胺N-氧化物(TMAO) 中混合。在对照实验中,添加PBS代替SpyLigase。将混合物在4℃温育23h。通过离心收集包涵体并重悬于PBS中。

[0236] 通过荧光显微术分析验证根据ssTorA (3x) -MBP-KTag-SpT-mEGFP-SnT,SnT-mEGFP-SpT与ssTorA (3x) -MBP-KT IB的成功缀合,其显示在图4A中(比例尺指示1μm)。分析显示由IB与SnT-mEGFP-SpT和SpyLigase的混合发射的GFP荧光信号,而当SpyLigase不存在时,检测不到信号。

[0237] 对应于0.7μg包涵体总蛋白的样品通过SDS-PAGE和考马斯染色进行分析,如图4B所见,其中分子量(kDa) 标记指示在分图左侧。ssTorA (3x) -MBP-KT-SpT-mEGFP-SnT加合物用箭头指示。该分析披露当SpyLigase存在时,出现代表ssTorA (3x) -MBP-KT和SnT-mEGFP-SpT之间加合物的条带,表明ssTorA (3x) -MBP-KT IB和可溶性SnT-mEGFP-SpT之间形成共价异肽键。

[0238] 实施例5

[0239] GFPNanobody®-SpyCatcher (GFPnb-SpC) 与ssTorA (3x) -MBP-SpT包涵体的缀合

[0240] 该实例是实施例1中概念证明的扩展,说明了成功使用连接体系技术将另外的部分偶联到包涵体。更具体地,该实施例显示了Nanobody®分子与包涵体的偶联。

[0241] 大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞用于容纳过夜培养物中克隆到载体pET22b中的GFPnb-SpyCatcher (SEQ ID NO:8) 构建体。然后将培养物在新鲜培养基中传代培养并恢复细胞生长。当培养物达到OD₆₀₀≈0.85后,用0.5mM的IPTG诱导GFPnb的表达,并将温度降至12℃。通过低速离心在诱导后20h从培养物中收集细胞并储存在-20℃。然后将细胞解冻并重悬于PBS中。在21℃振荡温育30min后,使用离心除去细胞。作为对照,还产生了含有具有氨基酸取代E77Q的SpyCatcher的构建体 (GFPnb-SpC EQ;SEQ ID NO:9),该取代破坏了异肽键形成。

[0242] 根据制造商的说明,使用TALON Superflow (通用电气医疗集团生命科学部) 从悬浮培养基中纯化GFPnb-SpC和GFPnb-SpC EQ蛋白。使用具有3500Da MWC0 (Spectra/Por) 的透析膜在4℃下将纯化的GFPnb-SpC和GFPnb-SpC EQ用1000x体积的PBS透析16h。

[0243] 将从表达ssTorA (3x) -MBP-SpT (SEQ ID NO:2) 的细胞中分离的包涵体 (约15μg总蛋白) 与纯化的GFPnb-SpC或GFPnb-SpC EQ (终浓度分别为3.0μM或3.2μM) 混合在PBS中。将混合物在25℃温育2h。通过离心收集包涵体并重悬于PBS中。将pET28a表达的纯化的GFP (SEQ ID NO:10) 添加至2.8μM终浓度。

[0244] 从SDS-PAGE和考马斯染色分析得出GFPnb-SpC与ssTorA (3X) -MBP-SpT IB的成功缀合。有效形成约75kDa加合物的加合物, 表明偶联肽/肽标签 (SpC) 和配偶体肽/结合蛋白配偶体 (SpT) 之间的共价连接, 见图5B。作为对照, 在将ssTorA (3X) -MBP-SpT IB与携带缺乏异肽键形成的SpyCatcher部分的GFPnb-SpC EQ温育后, 没有观察到加合物。

[0245] 为了确认缀合反应后 **Nanobody®** 分子的功能性, 将IB与可溶性GFP在环境温度下温育50min, 并使用离心收集包涵体, 然后重悬于PBS中并通过荧光显微术分析。

[0246] 功能 **Nanobody®** 分子与IB的有效缀合通过IB (与GFPnb-SpC一起温育并且随后用GFP处理) 的荧光信号发射来证明 (图5A)。作为对照, 在对与GFPnb-SpC EQ温育的IB进行GFP处理后未检测到荧光信号。因此, 必须在ssTorA (3x) -MBP-SpT IB和GFPnb-SpC之间形成异肽键 (ssTorA (3x) -MBP-SpT-SpC-GFPnb), 才能在所使用的测定中实现对IB的荧光标记。

[0247] 实施例6

[0248] 功能抗体结合性ZZ分子与IB的偶联

[0249] 该实施例说明异肽键合技术可用于通过Ig结合蛋白或衍生的结构域的偶联, 用抗体修饰IB。而且, 还证明了SpyCatcher002在IB上下文中的功能。

[0250] 葡萄球菌蛋白A、链球菌蛋白G和消化链球菌 (*Peptostreptococcus*) 蛋白L是与哺乳动物免疫球蛋白分子结合的蛋白质。重组版本也可用, 并广泛用作抗体纯化程序中的亲和分子。此类分子的实例还包括蛋白A的抗体结合结构域B的衍生物 (称为蛋白Z) (Nilsson等人 (1987), *Prot Eng* [蛋白质工程] 1:107-113), 或称为ZZ的串联融合双重版本。与蛋白A一样, Z和ZZ对抗体的Fc结构域具有亲和力。另一个实例是蛋白A/G, 其是一种重组融合蛋白 (组合了金黄色葡萄球菌蛋白A和链球菌蛋白G的IgG结合结构域, 并具有50kDa的质量)。而Z和ZZ主要结合人和兔IgG以及一些类别的小鼠和大鼠IgG, 蛋白A/G结合人、兔、小鼠和大鼠IgG的所有亚类。

[0251] 为了允许异肽键介导的ZZ与IB偶联, 产生并纯化了包含ZZ和位于C端的SpyCatcher002部分的融合蛋白 (ZZ-SpC2; SEQ ID NO:11)。此外, 制备了携带同源SpT部分的ssTorA (3x) -AED0-SpT IB。将ZZ-SpC2和IB混合并在4℃下温育过夜。作为对照, ZZ-SpC2还与缺乏SpT的ssTorA (3x) -AED0混合。第二天早上, 通过低速离心收集IB, 并重悬于PBS/甘油 (15%) 中。此时, 添加具有针对大肠杆菌SurA的多克隆抗体的兔抗血清, 并将混合物在环境温度下温育1小时以允许抗体由ZZ结合。然后通过低速离心分离IB, 以将IB结合的抗体与可溶性抗体分离, 并通过考马斯染色的SDS-PAGE进行分析。代表加合物ssTorA (3x) -AED0-SpT和ZZ-SpC2的蛋白质条带的出现证明了ZZ-SpC2与携带SpT的IB的成功偶联。当使用缺乏SpT的IB时, 没有观察到加合物。反过来, SurA抗体与展示ZZ的IB成功结合, 随后从装配SpT并用ZZ-SpC2修饰的IB样品中特异性回收IgG重链物质 (图6A)。

[0252] 还经由替代方法 (包括荧光显微术) 证明了抗体的成功结合 (图6B)。为此, 将如上与ZZ-SpC2预温育的ssTorA (3x) -AED0-SpT和ssTorA (3x) -AED0 IB与荧光Alexa 594兔抗小

鼠IgG在环境温度下温育30min。随后,对IB进行荧光显微术分析。然而,对于缺乏SpT的IB,仅观察到荧光的背景水平,而对于装配SpT并能够与ZZ-SpC2形成共价键的ssTorA (3x) - AED0,观察到用荧光抗体进行的有效标记(见上文)。

[0253] 实施例7

[0254] 通过偶联ZZ或蛋白A/G,特异性抗体与IB结合

[0255] 该实施例说明异肽键合技术可用于通过Ig结合蛋白或衍生的结构域(如ZZ或蛋白A/G)的偶联,用抗体修饰IB。此外,还证明了在IB表面偶联的ZZ和蛋白A/G的保留的功能和特异性。

[0256] 而ZZ通常结合人IgG,但对大鼠IgG仅具有中等亲和力,蛋白质A/G以高亲和力结合人和大鼠IgG。为了允许ZZ和蛋白A/G与IB偶联,将它们翻译融合到C端SpyCatcher002 (SpC2) 结构域并纯化(分别是ZZ-SpC2 (SEQ ID NO.11) 和AG-SpC2 (SEQ ID NO:12))。此外,在有或没有(模拟)同源SpT部分的情况下制备ssTorA (3x) -AED0-SpT IB。将各自的IB与ZZ-SpC2和AG-SpC2混合并在4℃下温育过夜。第二天早上,通过离心分离IB并重悬于PBS/甘油(15%)中。将悬浮液分开,一半与来自大鼠血清(西格玛公司I8015)的IgG,另一半与来自人血清的IgG,在室温下温育30min。随后,通过SDS-PAGE和考马斯染色对IB的ZZ和蛋白A/G的成功偶联以及随后的抗体结合进行了分析。

[0257] 通过检测分别包含ssTorA (3x) -AED0-SpT和ZZ-SpC2或AG-SpC2之间的共价融合物的加合物(ZZ加合物、AG加合物),证明了装配SpC2的ZZ和蛋白质A/G与携带SpT的IB的成功共价偶联。与IB偶联时ZZ的功能通过对应于人抗体的重链和轻链的考马斯染色条带的出现来证明,而在与大鼠抗体温育的IB样品中未观察到重链或轻链物质。与蛋白A/G偶联的IB在与人和大鼠来源的IgG温育后展示出重链和轻链条带,表明偶联的蛋白质A/G与这两种类型的抗体在IB背景下的功能关联(图7)。

[0258] 实施例8

[0259] 细菌裂解物中的结合配偶体蛋白与IB的成功偶联

[0260] 该实施例说明了细菌裂解物中存在的IB与结合配偶体蛋白的成功缀合。出人意料地,与使用纯化的缀合配偶体相比,缀合以相似的效率进行。

[0261] 在与IB连接之前结合配偶体蛋白的纯化是一个耗时且昂贵的过程。用表达结合配偶体蛋白构建体的细菌宿主菌株的裂解物中存在的未纯化物质进行异肽键反应,在时间效率和成本效率方面增强了缀合IB的生产过程。作为概念证明,衍生自融合蛋白ssTorA (3x) -AED0-SpT、携带C端SpyTag的IB与ZZ-SpC2(装配C端SpyCatcher002部分,在生产大肠杆菌菌株的裂解物中存在)缀合。

[0262] 裂解物制备自大肠杆菌BL21 (DE3) ::pET28-ZZ-SpC2的培养物(用0.5mM IPTG诱导3h)。收获约1,7000D600单位的细胞物质并重悬于9ml结合缓冲液(50mM磷酸钠,300mM氯化钠,pH 7.4)中。将细胞通过OneShot细胞破碎机(恒定系统公司(Constant systems Ltd), 达文特里,英国)裂解,并将裂解物进行连续低速(10,000x g,10min,4℃)和高速(293,000x g,1h,4℃)离心步骤以去除碎片和其他不溶性成分。将所得澄清的裂解物(上清液)用于偶联实验。为了测试缀合,将6.1μl PBS悬浮的ssTorA (3x) -AED0-SpT IB(8μg)与1μl含有ZZ-SpC2的澄清的裂解物混合,并在室温下温育2小时。将样品进行低速离心,并将所得的含有非IB缔合物质的上清液(sup)和含有IB和缔合物质的沉淀通过SDS-PAGE和考马斯染色分

析。作为阴性对照,测试缺乏SpyTag (ssTorA (3x) -AED0) 的IB与裂解物携带的ZZ-SpC2的缀合。此外,分析了与如实施例6所述的纯化的ZZ-SpC2一起温育的ssTorA (3x) -AED0-SpT和ssTorA (3x) -AED0 IB反应样品以进行比较。

[0263] 细菌裂解物中的ZZ-SpC2成功缀合到ssTorA (3x) -AED0-SpT之后,在IB级分(包含ssTorA (3x) -AED0-SpT和ZZ-SpC2之间的共价融合)中检测到加合物。在没有获得SpyTag的阴性对照样品中没有检测到这种加合物。重要的是,加合物带的强度与在ssTorA (3x) -AED0-SpT IB与亲和纯化的ZZ-SpC2温育后检测到的加合物带的强度相同,意想不到的表明在复合物裂解物中使用配偶体肽(结合配偶体蛋白)不会干扰其与IB的缀合。此外,在与粗制或纯化的ZZ-SpC2温育的IB样品中观察到高度相似的蛋白质表达谱,表明与使用纯化的结合配偶体蛋白相比,在复杂裂解物环境中的缀合不会导致IB缀合物的更高程度的蛋白质污染(图8)。总之,这些数据证明了使用未纯化的结合配偶体蛋白产生基于异肽键的IB缀合物的潜力。

[0264] 表3中列出了用于实践本发明的构建体的蛋白质序列。

[0265] 表3. 构建体的蛋白质序列 (SEQ ID No.1-12)

[0266]

<i>SpyCatcher-SnoopCatcher (SpC-SnC)</i> MSYYHHHHHHHDYDSATHIKFSKRDEDEGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVK DFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDHIGSPANLK ALEAQKQKEQRQAAEELANAKKLKEQLEKGSHEMKPLRGAVFSLQKQHPDYPDIYG AIDQNGTYQNVRTGEDGKLTfKNLSDGKYRLFENSEPAGYKPVQNKPIVAFQIVNG EVRDVTsIVPQDIPATYEFTNGKHytNEPIPPK* (SEQ ID NO:1)
<i>ssTorA(3X)-MBP-SpT</i> MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRASMNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTP RRASAKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAA TGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIA VEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGG YAFKYENGKYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETA MTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEF LENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQPM SAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTRITKSGSGSGSAHIVMVDAYKPTK* (SEQ ID NO:2)
<i>Pla2-SnT</i> MGLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGfYGCYCGWGGRGTPKDGTDWCCWAHDHCYg RLEEKGCNIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNLCACDRKLVYCLKRNLSYNP QYQYFPNILCSGTGSGSKLGDIEFIKVNK* (SEQ ID NO:3)
<i>Pla2-SpT</i> MGLLDLKSMIEKVTGKNALTNYGfYGCYCGWGGRGTPKDGTDWCCWAHDHCYg RLEEKGCNIRTQSYKYRFAWGVVTCEPGPFCHVNLCACDRKLVYCLKRNLSYNP QYQYFPNILCSGTGSGSAHIVMVDAYKPTK* (SEQ ID NO:4)
<i>ssTorA(3X)-MBP-KT</i> MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRASMNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTP RRASAKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAA TGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIA VEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGG YAFKYENGKYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETA MTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEF LENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQPM SAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTRITKSGSGSGSATHIKFSKRdGY* (SEQ ID NO:5)
<i>SpyLigase</i> MSYYHHHHHHHDYDGQSGDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPG

[0267]

KYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGKATKGGSGGSGGSGEDSATHI* (SEQ ID NO:6)
<i>SnT-mEGFP-SpT</i> MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGKLGDIKFIKVNKSGSGESGSGVSKGEELFTGVVP ILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCQ FSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSQLADHYQ QNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKG SGEGSGSGSGSAHIVMVDAYKPTK* (SEQ ID NO:7)
<i>GFPnb-SpC</i> MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYS MRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSKSGSGGTGDSATHIKFSKRDEGDKEL AGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNE QQQVTVNGKATKGDAHIGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:8)
<i>GFPnb-SpC EQ</i> MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYS MRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSKSGSGGTGDSATHIKFSKRDEGDKEL AGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVQTAAPDGYEVATAITFTVNE QQQVTVNGKATKGDAHIGSGHHHHHH* (SEQ ID NO:9)
<i>GFP</i> MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP WPTLVTTLTYGVCQFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRA VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRH NIEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSADPNEKRDHMLLEFVT AAGITHGMDELYKKLAAALEHHHHHH* (SEQ ID NO:10)
<i>ZZ-SpC2</i> MGKSGSVDNKFNFKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAK KLNDAAQAPKVDNKFNFKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAE AKKLNDAAQAPKGSVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEGRELGA TMELRDSSGKTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQG VTVNGEATKGDAHTGSSGSLEHHHHHH* (SEQ ID NO:11)
<i>AG-SpC2</i> MGNAAQHDEAQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLN DSQAPKADAQQNFNKQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLG EAKKLNESQAPKADNKFNFKEQQNAFYEILNMPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSA LSEAKKLNESQAPKADNKFNFKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSQSA NLLAEAKKLNDAAQAPKADNKFNFKEQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLKDDPSVS KEILAEAKKLNDAAQAPKEEDSLEGSGSGTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVF KQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKLINGKTLKGETT TEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEKPEVIDASELTPAVTTY KLINGKTLKGETTTKAVDAETA EKAFKQYANDNGVDGVWYDDATKTFTVTEKLA AAGTSGSGEGSGSVTTLSGLSGEQGPSGDMTTEEDSATHIKFSKRDEGRELGA MELRDSSGKTISTWISDGHVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQG VTVNGEATKGDAHTGSSGSLEHHHHHH* (SEQ ID NO:12)
<i>ssTorA(3X)-MBP-SnT</i> MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRASMNNNDLFQASRRRFLAQL LGGLTVAGMLGPSLLTPRRASMNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTP RRASAKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEFQVAA TGDGPDIIIFWAHDFRGGYASGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDVRYNGKLIAYPIA VEALSIIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIADGG

[0268]

YAFKYENGKYDIKDVGVNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNKGETA
MTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEF
LENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQPM
SAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTRITKSGSGSGSKLGDIEFIKVNK* (SEQ
ID NO:13)

[0269] 除非上下文另有要求,术语“包含(comprise、comprises和comprising)”或类似术语旨在意指非排他性的包含,使得所列举的要素或特征列表不仅包括那些说明或列出的要素,也可能包括未列出或说明的其他要素或特征。

[0270] 虽然已经参考各种示例性方面和实施方案描述了本发明,但是本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的广泛的精神的范围的情况下,可以进行各种改变并且可以用等同物来替换其要素。另外,在不脱离本发明的实质范围的情况下,可以进行许多修改以使特定情况或分子适应本发明的传授内容。因此,意图是本发明不限于所设想的任何特定实施方案,而是本发明将包括落入所附权利要求的范围内的所有实施方案。

[0271] 实施方案清单

[0272] 1. 一种包含偶联肽的包涵体,该偶联肽适用于通过形成共价异肽键偶联至配偶体肽。

[0273] 2. 根据项目1所述的包涵体,其中所述偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。

[0274] 3. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,其中当所述偶联肽包含反应性赖氨酸残基时,所述配偶体肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基,或当所述偶联肽包含反应性天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸残基时,所述配偶体肽包含反应性赖氨酸残基或反应性 α -氨基末端。

[0275] 4. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,其中所述偶联肽包含反应性天冬酰胺残基且所述配偶体肽包含反应性赖氨酸残基,或所述偶联肽包含反应性赖氨酸残基且所述配偶体肽包含反应性天冬酰胺残基。

[0276] 5. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,其中所述偶联肽和配偶体肽衍生自革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌的蛋白质

[0277] 6. 根据项目5所述的包涵体,其中所述蛋白质是革兰氏阳性细菌的蛋白质。

[0278] 7. 根据项目5或6所述的包涵体,其中所述蛋白质是来自选自酿脓链球菌、肺炎链球菌或停乳链球菌的链球菌科的革兰氏阳性细菌的蛋白质。

[0279] 8. 根据项目5-7中任一项所述的包涵体,其中所述蛋白质是肺炎链球菌的粘附素RrgA、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白FbaB、酿脓链球菌的主要菌毛蛋白Spy0128或停乳链球菌的纤连蛋白结合蛋白CnaB,或与其具有至少70%序列同一性的能够形成一个或多个异肽键的蛋白质。

[0280] 9. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,其中该偶联肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0281] 10. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,其中该配偶体肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。

[0282] 11. 根据项目1-8中任一项所述的包涵体,其中该偶联肽和配偶体肽形成选自由以下组成的组的连接对:SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag和BDTag-SpyTag。

[0283] 12. 根据项目1-8中任一项所述的包涵体,其中(i)该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(ii)该偶联肽是KTag,该配偶体肽是SpyTag002,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iii)该偶联肽是SpyTag,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(iv)该偶联肽是SpyTag002,该配偶体肽是KTag,并且通过添加SpyLigase介导共价异肽键的形成;(v)该偶联肽是DogTag,该配偶体肽是SnoopTagJr,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成;(vi)该偶联肽是SnoopTagJr,该配偶体肽是DogTag,并且通过添加SnoopLigase介导共价异肽键的形成;(vii)该偶联肽是SpyTag,该配偶体肽是BDTag,并且通过添加SpyStapler介导共价异肽键的形成;或(viii)该偶联肽是BDTag,该配偶体肽是SpyTag,并且通过添加SpyStapler介导共价异肽键的形成。

[0284] 13. 一种复合物,该复合物包含根据前述项目中任一项所述的包涵体,该包涵体经由该偶联肽和该配偶肽之间的共价异肽键偶联至该配偶体肽。

[0285] 14. 根据前述项目中任一项所述的包涵体或复合物,该包涵体或复合物进一步包含至少一种目的蛋白质(POI)或其部分。

[0286] 15. 根据项目14所述的包涵体或复合物,其中所述目的蛋白质是具有治疗目的的蛋白质,该蛋白质治疗选自由以下组成的组的病症或障碍:癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0287] 16. 根据项目14所述的包涵体或复合物,其中所述目的蛋白质是具有预防目的的蛋白质,该蛋白质预防选自由以下组成的组的病症或障碍:癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、移植排斥和感染性疾病。

[0288] 17. 根据项目14所述的包涵体或复合物,其中所述目的蛋白质或其部分是抗原或其片段。

[0289] 18. 根据项目17所述的包涵体或复合物,其中所述抗原选自由以下组成的组:来自感染性生物体的抗原、肿瘤抗原、肿瘤基质抗原或肿瘤相关抗原。

[0290] 19. 根据前述项目中任一项所述的包涵体,该包涵体进一步包含包涵体形成序列。

[0291] 20. 根据前述项目中任一项所述的包涵体或复合物,其中该配偶体肽包含另外的部分。

[0292] 21. 根据项目20所述的包涵体或复合物,其中该另外的部分选自由以下组成的组:聚糖、佐剂、粘附分子、酶和可追踪探针。

[0293] 22. 根据项目20所述的包涵体或复合物,其中该另外的部分是免疫调节化合物。

[0294] 23. 根据项目22所述的包涵体或复合物,其中该免疫调节化合物选自由以下组成的组:细胞因子、佐剂、抗体、**Nanobody®**分子、DARPIN、PAMP、TLR配体或激动剂、RNA、DNA、免疫调节肽、肽模拟物、T辅助细胞表位、免疫检查点抑制剂、PLGA、壳聚糖和TRAIL。

[0295] 24. 根据项目20所述的包涵体或复合物,其中该另外的部分是靶向部分。

[0296] 25. 根据项目24所述的包涵体或复合物,其中该靶向部分对免疫系统的细胞具有亲和力。

[0297] 26. 根据项目25所述的包涵体或复合物,其中该靶向部分对免疫系统的细胞的表面暴露的组分具有亲和力。

[0298] 27. 根据项目26所述的包涵体或复合物,其中该表面暴露的组分选自以下组成的组:CD4、CD8、CD1、CD180、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、TCR、CRD、Toll样受体(TLR)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体(NLR)、视黄酸诱导基因I样解旋酶受体(RLR)、和C型凝集素受体(CLR)、吞饮受体、CD205/DEC205、CD209/DC-SIGN、Clec9A/DNGR-1/CD370、Clec7A/Dectin-1/CD369、Clec6A/Dectin-2、Clec12A、CD1d、CD11c、CD11b、CD40、CD152/CTLA-4、CD279/PD-1、NOD样受体、RIG-I样受体、PRR、CCR、CD36、Siglec H、PDCTREM、朗格汉斯蛋白、MMR、D-SIGN和叶酸受体。

[0299] 28. 根据项目24所述的包涵体或复合物,其中该靶向部分对至少一种发生病变的细胞具有亲和力。

[0300] 29. 根据项目28所述的包涵体或复合物,其中该发生病变的细胞是癌症的肿瘤细胞。

[0301] 30. 根据项目29所述的包涵体或复合物,其中该癌症选自以下组成的组:淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肺癌、黑色素瘤、肾细胞癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、膀胱癌、头颈癌、结直肠癌、食管癌、宫颈癌、胃癌、肝细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌和甲状腺癌。

[0302] 31. 根据项目24-30中任一项所述的包涵体或复合物,其中该靶向部分是抗体、抗体结构域或保留抗体结合的抗体片段。

[0303] 32. 一种核酸,该核酸编码根据前述项目中任一项所述的包涵体的包涵体形成多肽。

[0304] 33. 一种遗传构建体,该遗传构建体包含根据项目32所述的核酸。

[0305] 34. 一种宿主细胞,该宿主细胞包含根据项目32所述的核酸或根据项目33所述的遗传构建体。

[0306] 35. 一种组合物,该组合物包含根据前述项目中任一项所述的包涵体、复合物、核酸、遗传构建体和/或宿主细胞。

[0307] 36. 根据前述项目中任一项所述的包涵体、复合物或组合物,用于作为药物。

[0308] 37. 一种根据前述项目中任一项所述的包涵体、复合物或组合物,用于作为诊断剂、预后剂、预防剂或治疗剂。

[0309] 38. 根据前述项目中任一项所述的包涵体、复合物或组合物,用于作为疫苗。

[0310] 39. 一种治疗受试者的疾病或障碍的方法,该方法包括将根据前述项目中任一项所述的包涵体、复合物或组合物引入所述受试者的步骤。

[0311] 40. 一种诊断或预判受试者的疾病或障碍的方法,该方法使用根据项目1-35中任一项所述的包涵体、复合物或组合物。

[0312] 41. 一种疫苗接种或免疫的方法,该方法包括将根据项目1-35中任一项所述的包涵体、复合物或组合物引入所述受试者的步骤。

[0313] 42. 根据项目39-41中任一项所述的方法,其中所述受试者是动物。

- [0314] 43. 根据项目42所述的方法, 其中所述动物是哺乳动物。
- [0315] 44. 根据项目43所述的方法, 其中所述哺乳动物是人、农场动物或伴侣动物。
- [0316] 45. 根据项目42所述的方法, 其中所述动物是鸟或鱼。
- [0317] 46. 一种产生根据实施方案13所述的复合物的方法, 该方法包括将根据实施方案1所述的包涵体与配偶体肽缀合从而产生所述复合物的步骤。
- [0318] 47. 根据实施方案46所述的方法, 其中该复合物是通过在该包涵体的该偶联肽和该配偶体肽之间形成共价异肽键而产生的。
- [0319] 48. 根据实施方案47所述的方法, 其中该偶联肽包含参与所述异肽键的一个残基并且所述配偶体肽包含参与所述异肽键的另一残基。
- [0320] 49. 根据实施方案46-48中任一项所述的方法, 其中该包涵体与存在于裂解物, 例如细胞裂解物, 例如细菌裂解物中的配偶体肽缀合。
- [0321] 50. 根据实施方案46-48中任一项所述的方法, 其中该包涵体与纯化的配偶体肽缀合。
- [0322] 51. 根据实施方案46-50中任一项所述的方法, 其中该偶联肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SnoopTag、SpyTag002、SpyTag003、SpyTag0128、SdyTag、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。
- [0323] 52. 根据实施方案46-51中任一项所述的方法, 其中该配偶体肽选自由以下组成的组: SpyTag、KTag、SpyCatcher、SnoopCatcher、SpyCatcher002、SpyCatcher003、SpyCatcher0128、SdyCatcher、DogTag、SnoopTagJr和BDTag。
- [0324] 53. 根据实施方案46-52中任一项所述的方法, 其中该复合物在形成选自由以下组成的组的偶联肽-配偶体肽连接对后产生: SpyTag-SpyCatcher、SpyTag-SpyCatcher002、SnoopTag-SnoopCatcher、SpyTag002-SpyCatcher002、SpyTag002-SpyCatcher、SpyTag003-SpyCatcher003、SpyTag0128-SpyCatcher0128、SdyTag-SdyCatcher、KTag-SpyTag、SpyTag-KTag、DogTag-SnoopTagJr、SnoopTagJr-DogTag、SpyTag-BDTag和BDTag-SpyTag。

序列表

<110> 阿贝拉生物科学公司

<120> 修饰的包涵体及其用途

<130> 21111860

<160> 13

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 1

```

Met Ser Tyr Tyr His His His His His Asp Tyr Asp Ser Ala Thr
1           5           10           15
His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly
          20           25           30
Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp
          35           40           45
Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr
          50           55           60
Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala
65           70           75           80
Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys
          85           90           95
Ala Thr Lys Gly Asp Ala His Ile Gly Ser Pro Ala Asn Leu Lys Ala
          100          105          110
Leu Glu Ala Gln Lys Gln Lys Glu Gln Arg Gln Ala Ala Glu Glu Leu
          115          120          125
Ala Asn Ala Lys Lys Leu Lys Glu Gln Leu Glu Lys Gly Ser His Met
          130          135          140
Lys Pro Leu Arg Gly Ala Val Phe Ser Leu Gln Lys Gln His Pro Asp
145          150          155          160
Tyr Pro Asp Ile Tyr Gly Ala Ile Asp Gln Asn Gly Thr Tyr Gln Asn
          165          170          175
Val Arg Thr Gly Glu Asp Gly Lys Leu Thr Phe Lys Asn Leu Ser Asp
          180          185          190
Gly Lys Tyr Arg Leu Phe Glu Asn Ser Glu Pro Ala Gly Tyr Lys Pro

```

195	200	205
Val Gln Asn Lys Pro Ile	Val Ala Phe Gln Ile	Val Asn Gly Glu Val
210	215	220
Arg Asp Val Thr Ser Ile	Val Pro Gln Asp Ile	Pro Ala Thr Tyr Glu
225	230	235
Phe Thr Asn Gly Lys His Tyr	Ile Thr Asn Glu Pro	Ile Pro Pro Lys
245	250	255
<210> 2		
<211> 504		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 工程化的融合蛋白		
<400> 2		
Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala		
1	5	10
Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu		
20	25	30
Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser		
35	40	45
Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met		
50	55	60
Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn		
65	70	75
Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly		
85	90	95
Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg		
100	105	110
Ala Ser Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly		
115	120	125
Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys		
130	135	140
Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu		
145	150	155
Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe		
165	170	175
Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala		
180	185	190
Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr		

195	200	205
Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala		
210	215	220
Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro		
225	230	235
Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala		
245	250	255
Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr		
260	265	270
Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn		
275	280	285
Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys		
290	295	300
Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn		
305	310	315
Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu		
325	330	335
Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr		
340	345	350
Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln		
355	360	365
Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala		
370	375	380
Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu		
385	390	395
Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala		
405	410	415
Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile		
420	425	430
Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile		
435	440	445
Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn		
450	455	460
Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln		
465	470	475
Thr Arg Ile Thr Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala His Ile Val Met		
485	490	495
Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys		
500		

<210> 3

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 3

```

Met Gly Leu Leu Asp Leu Lys Ser Met Ile Glu Lys Val Thr Gly Lys
1           5           10           15
Asn Ala Leu Thr Asn Tyr Gly Phe Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Trp Gly
          20           25           30
Gly Arg Gly Thr Pro Lys Asp Gly Thr Asp Trp Cys Cys Trp Ala His
          35           40           45
Asp His Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Glu Lys Gly Cys Asn Ile Arg Thr
          50           55           60
Gln Ser Tyr Lys Tyr Arg Phe Ala Trp Gly Val Val Thr Cys Glu Pro
65           70           75           80
Gly Pro Phe Cys His Val Asn Leu Cys Ala Cys Asp Arg Lys Leu Val
          85           90           95
Tyr Cys Leu Lys Arg Asn Leu Arg Ser Tyr Asn Pro Gln Tyr Gln Tyr
          100          105          110
Phe Pro Asn Ile Leu Cys Ser Gly Thr Gly Ser Gly Ser Lys Leu Gly
          115          120          125
Asp Ile Glu Phe Ile Lys Val Asn Lys
          130          135

```

<210> 4

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 4

```

Met Gly Leu Leu Asp Leu Lys Ser Met Ile Glu Lys Val Thr Gly Lys
1           5           10           15
Asn Ala Leu Thr Asn Tyr Gly Phe Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Trp Gly
          20           25           30
Gly Arg Gly Thr Pro Lys Asp Gly Thr Asp Trp Cys Cys Trp Ala His
          35           40           45
Asp His Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Glu Lys Gly Cys Asn Ile Arg Thr

```

50	55	60
Gln Ser Tyr Lys Tyr Arg Phe Ala Trp Gly Val Val Thr Cys Glu Pro		
65	70	75
Gly Pro Phe Cys His Val Asn Leu Cys Ala Cys Asp Arg Lys Leu Val		80
85	90	95
Tyr Cys Leu Lys Arg Asn Leu Arg Ser Tyr Asn Pro Gln Tyr Gln Tyr		
100	105	110
Phe Pro Asn Ile Leu Cys Ser Gly Thr Gly Ser Gly Ser Ala His Ile		
115	120	125
Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys		
130	135	
<210> 5		
<211> 503		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 工程化的融合蛋白		
<400> 5		
Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala		
1	5	10
Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu		15
20	25	30
Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser		
35	40	45
Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met		
50	55	60
Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn		
65	70	75
Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly		80
85	90	95
Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg		
100	105	110
Ala Ser Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly		
115	120	125
Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys		
130	135	140
Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu		
145	150	155
Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe		160

				165				170				175				
Trp	Ala	His	Asp	Arg	Phe	Gly	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Leu	Ala	
				180				185				190				
Glu	Ile	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Tyr	Pro	Phe	Thr	
				195				200				205				
Trp	Asp	Ala	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	
				210				215				220				
Val	Glu	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	
225					230				235				240			
Pro	Lys	Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	
				245				250				255				
Lys	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	
				260				265				270				
Trp	Pro	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	
				275				280				285				
Gly	Lys	Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	
				290				295				300				
Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Met	Asn	
305					310				315				320			
Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	
				325				330				335				
Thr	Ala	Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	
				340				345				350				
Ser	Lys	Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	
				355				360				365				
Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	
				370				375				380				
Ser	Pro	Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	
385					390				395				400			
Thr	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	
				405				410				415				
Val	Ala	Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	
				420				425				430				
Ala	Ala	Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Met	Pro	Asn	Ile	
				435				440				445				
Pro	Gln	Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ile	Asn	
				450				455				460				
Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	
465					470				475				480			

Thr Arg Ile Thr Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Ile Lys
 485 490 495

Phe Ser Lys Arg Asp Gly Tyr
 500

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌

<400> 6

Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Gly Gln Ser
 1 5 10 15

Gly Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser
 20 25 30

Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp
 35 40 45

Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro
 50 55 60

Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln
 65 70 75 80

Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly Gly Ser Gly Gly
 85 90 95

Ser Gly Gly Ser Gly Glu Asp Ser Ala Thr His Ile
 100 105

<210> 7

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 7

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Gly Lys Leu Gly Asp Ile Glu Phe Ile Lys Val
 20 25 30

Asn Lys Gly Ser Gly Glu Ser Gly Ser Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu
 35 40 45

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 50 55 60

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr

65	70	75	80
Tyr Gly Lys Leu Thr	Leu Lys Phe Ile Cys	Thr Thr Gly Lys Leu Pro	
	85	90	95
Val Pro Trp Pro Thr	Leu Val Thr Thr Leu Thr	Tyr Gly Val Gln Cys	
	100	105	110
Phe Ser Arg Tyr Pro	Asp His Met Lys Gln His	Asp Phe Phe Lys Ser	
	115	120	125
Ala Met Pro Glu Gly Tyr	Val Gln Glu Arg Thr Ile	Phe Phe Lys Asp	
	130	135	140
Asp Gly Asn Tyr Lys Thr	Arg Ala Glu Val Lys Phe	Glu Gly Asp Thr	
	145	150	155
Leu Val Asn Arg Ile Glu	Leu Lys Gly Ile Asp	Phe Lys Glu Asp Gly	
	165	170	175
Asn Ile Leu Gly His Lys	Leu Glu Tyr Asn Tyr	Asn Ser His Asn Val	
	180	185	190
Tyr Ile Met Ala Asp Lys	Gln Lys Asn Gly Ile Lys	Val Asn Phe Lys	
	195	200	205
Ile Arg His Asn Ile Glu	Asp Gly Ser Val Gln	Leu Ala Asp His Tyr	
	210	215	220
Gln Gln Asn Thr Pro Ile	Gly Asp Gly Pro Val	Leu Leu Pro Asp Asn	
	225	230	235
His Tyr Leu Ser Thr Gln	Ser Lys Leu Ser Lys	Asp Pro Asn Glu Lys	
	245	250	255
Arg Asp His Met Val Leu	Leu Glu Phe Val Thr	Ala Ala Gly Ile Thr	
	260	265	270
Leu Gly Met Asp Glu Leu	Tyr Lys Gly Ser Gly	Glu Gly Ser Gly Ser	
	275	280	285
Gly Ser Gly Ser Ala His	Ile Val Met Val Asp	Ala Tyr Lys Pro Thr	
	290	295	300
Lys			
305			
<210> 8			
<211> 245			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 工程化的融合蛋白			
<400> 8			
Met Lys Tyr Leu Leu Pro	Thr Ala Ala Ala Gly	Leu Leu Leu Leu Ala	

1	5	10	15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala			
	20	25	30
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly			
	35	40	45
Phe Pro Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly			
	50	55	60
Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser			
65	70	75	80
Ser Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp			
	85	90	95
Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp			
	100	105	110
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly			
	115	120	125
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Lys Gly Ser Gly Gly Thr Gly			
	130	135	140
Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys			
145	150	155	160
Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr			
	165	170	175
Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr			
	180	185	190
Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu			
	195	200	205
Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr			
	210	215	220
Val Asn Gly Lys Ala Thr Lys Gly Asp Ala His Ile Gly Ser Gly His			
225	230	235	240
His His His His His			
	245		

<210> 9

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 9

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20	25	30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr	Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys	
35	40	45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val	Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu	
50	55	60
Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe	Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg	
65	70	75
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met	Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg	
85	90	95
Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly	Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val	
100	105	110
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val	Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile	
115	120	125
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile	Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn	
130	135	140
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile	Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly	
145	150	155
Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg	His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val	
165	170	175
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln	Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro	
180	185	190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr	Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser	
195	200	205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp	His Met Val Leu Leu Glu Phe Val	
210	215	220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly	Met Asp Glu Leu Tyr Lys Lys Leu	
225	230	235
Ala Ala Ala Leu Glu His His His	His His His His	
245	250	

<210> 11

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 11

Met Gly Lys Gly Ser Gly Ser Val	Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln
1	5
Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu	His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu
	10
	15

20	25	30
Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser		
35	40	45
Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro		
50	55	60
Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu		
65	70	75
Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile		
85	90	95
Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu		
100	105	110
Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Gly Ser Val Thr Thr		
115	120	125
Leu Ser Gly Leu Ser Gly Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr		
130	135	140
Glu Glu Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp		
145	150	155
Gly Arg Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly		
165	170	175
Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr		
180	185	190
Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly		
195	200	205
Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln		
210	215	220
Val Thr Val Asn Gly Glu Ala Thr Lys Gly Asp Ala His Thr Gly Ser		
225	230	235
Ser Gly Ser Leu Glu His His His His His His		
245	250	

<210> 12

<211> 642

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 12

Met Gly Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr		
1	5	10
Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe		
		15

20	25	30
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly		
35	40	45
Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln		
50	55	60
Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu		
65	70	75
Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser		
85	90	95
Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys		
100	105	110
Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys		
115	120	125
Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn		
130	135	140
Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser		
145	150	155
Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln		
165	170	175
Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe		
180	185	190
Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly		
195	200	205
Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu		
210	215	220
Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn		
225	230	235
Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu		
245	250	255
Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys		
260	265	270
Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu		
275	280	285
Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp Ser Leu Glu Gly Ser Gly		
290	295	300
Ser Gly Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu		
305	310	315
Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys		
325	330	335

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp		
340	345	350
Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala		
355	360	365
Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly		
370	375	380
Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr		
385	390	395
Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly		
405	410	415
Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys		
420	425	430
Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr		
435	440	445
Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys		
450	455	460
Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn		
465	470	475
Asp Asn Gly Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr		
485	490	495
Phe Thr Val Thr Glu Lys Leu Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ser Gly Glu		
500	505	510
Gly Ser Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly Glu Gln Gly		
515	520	525
Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr His Ile Lys		
530	535	540
Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met		
545	550	555
Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp		
565	570	575
Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val		
580	585	590
Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe		
595	600	605
Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Glu Ala Thr Lys		
610	615	620
Gly Asp Ala His Thr Gly Ser Ser Gly Ser Leu Glu His His His His		
625	630	635
His His		640

<210> 13

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 工程化的融合蛋白

<400> 13

```

Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala
1           5           10           15
Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu
          20           25           30
Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser
          35           40           45
Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met
          50           55           60
Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg Ala Ser Met Asn Asn Asn
65           70           75           80
Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala Gln Leu Gly Gly
          85           90           95
Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu Thr Pro Arg Arg
          100          105          110
Ala Ser Ala Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly
          115          120          125
Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys
          130          135          140
Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu
145          150          155          160
Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe
          165          170          175
Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala
          180          185          190
Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr
          195          200          205
Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala
          210          215          220
Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro
225          230          235          240
Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala
          245          250          255

```

Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr		
260	265	270
Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn		
275	280	285
Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys		
290	295	300
Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn		
305	310	315
Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu		
325	330	335
Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr		
340	345	350
Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln		
355	360	365
Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala		
370	375	380
Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu		
385	390	395
Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala		
405	410	415
Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile		
420	425	430
Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile		
435	440	445
Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn		
450	455	460
Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln		
465	470	475
Thr Arg Ile Thr Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Leu Gly Asp Ile		
485	490	495
Glu Phe Ile Lys Val Asn Lys		
500		

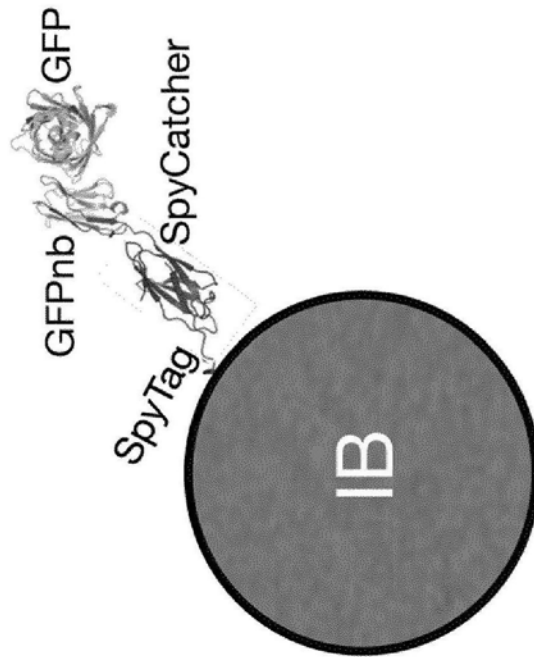


图1A



图1B

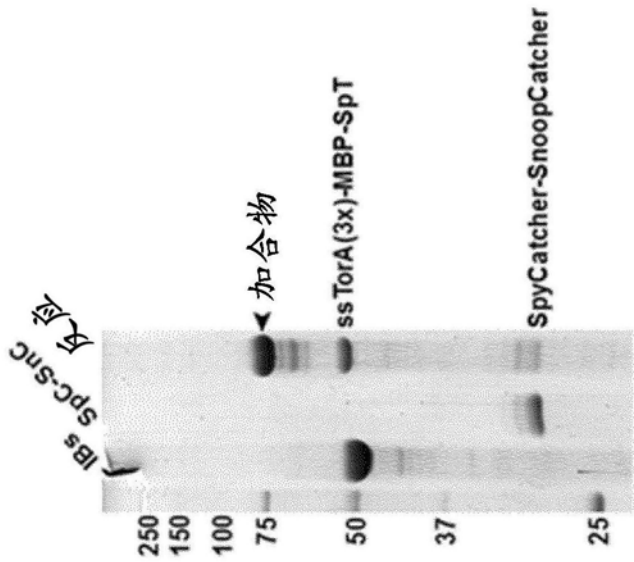


图2A

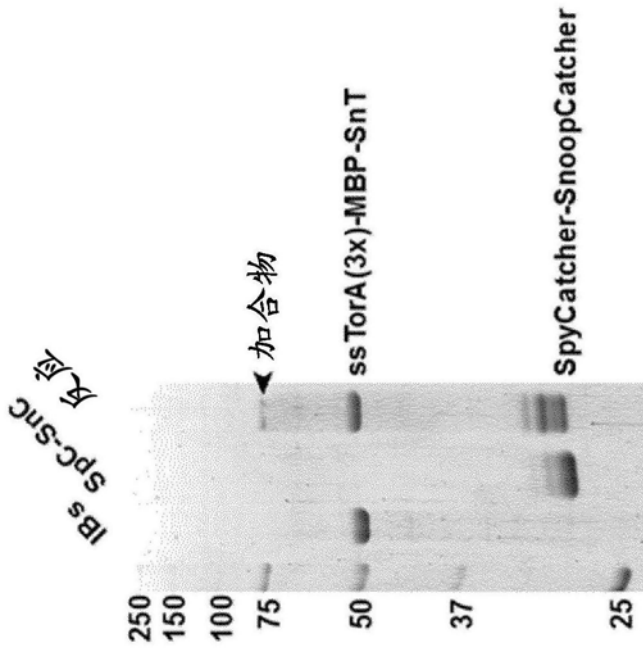


图2B

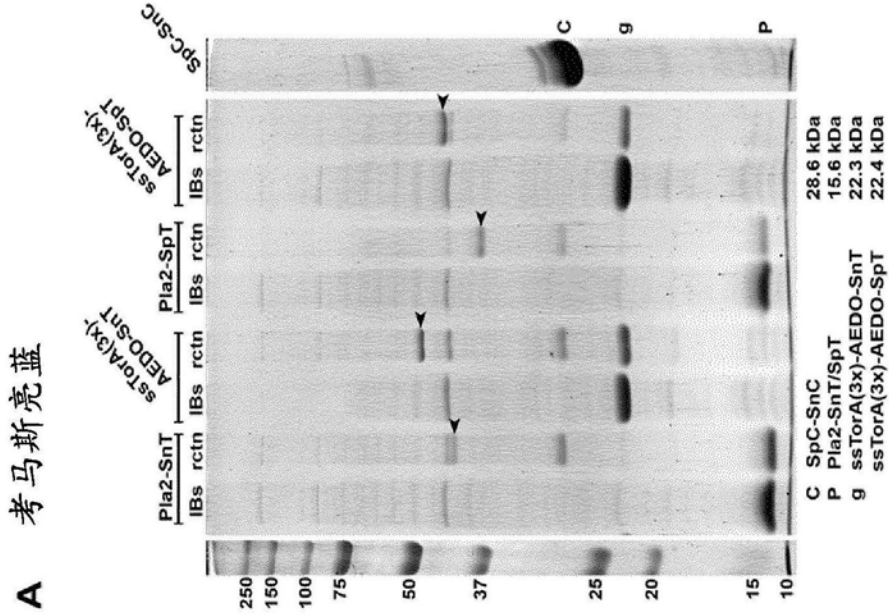


图3A

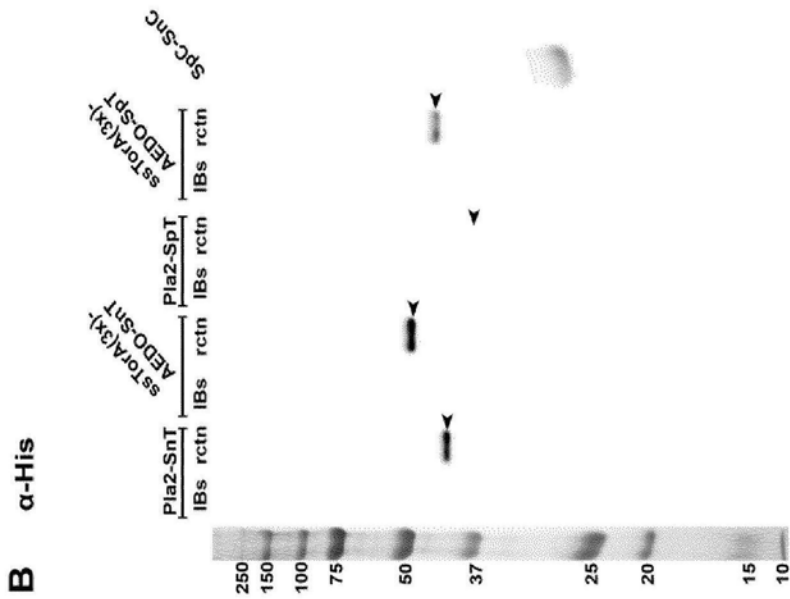


图3B

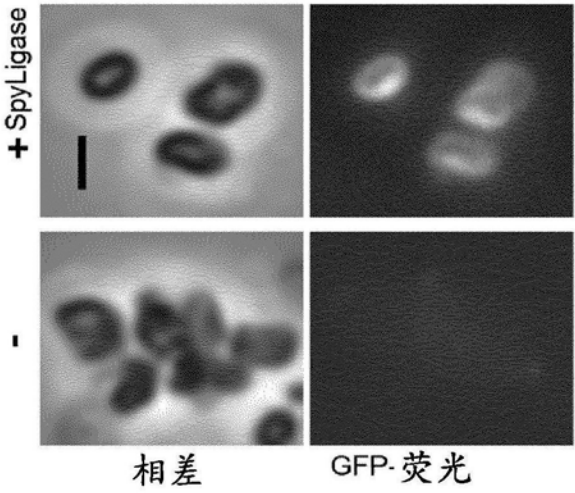


图4A

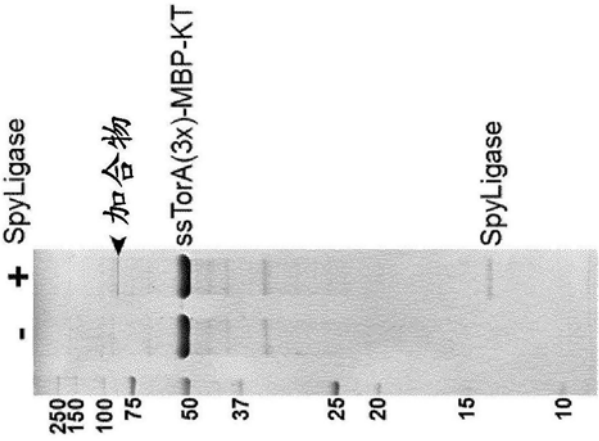


图4B

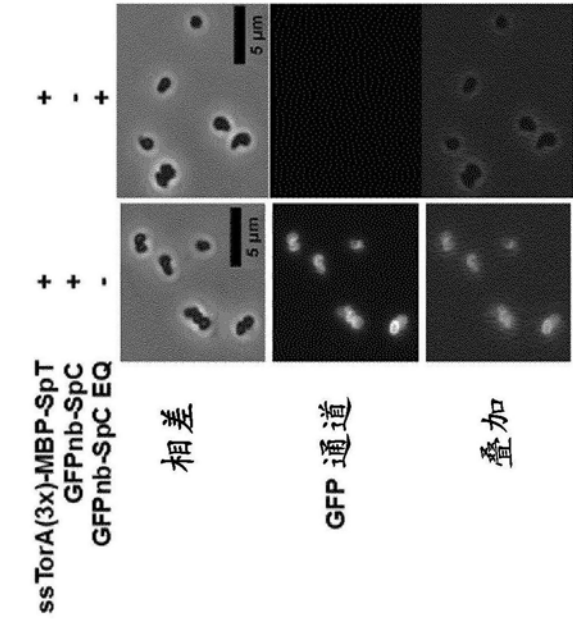


图5A

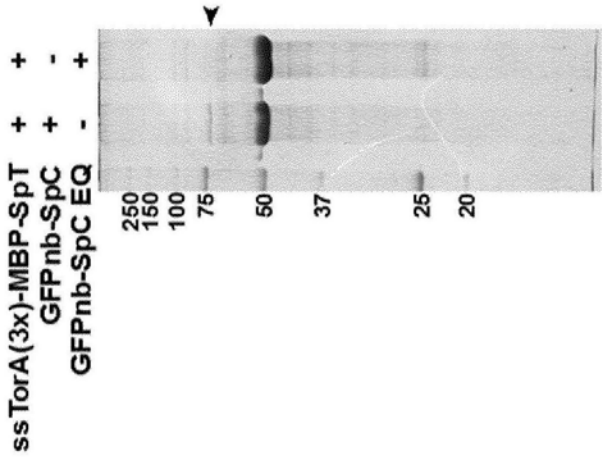


图5B

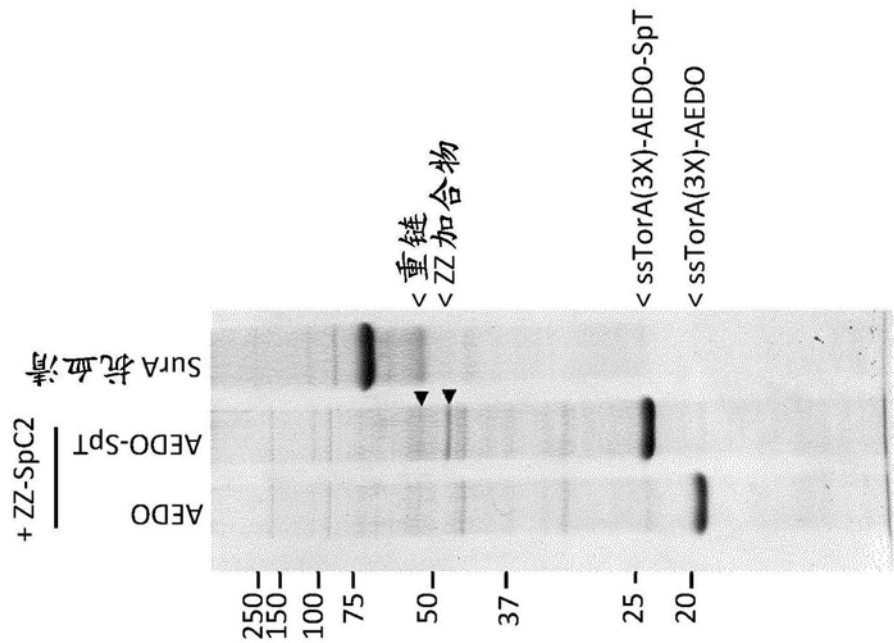
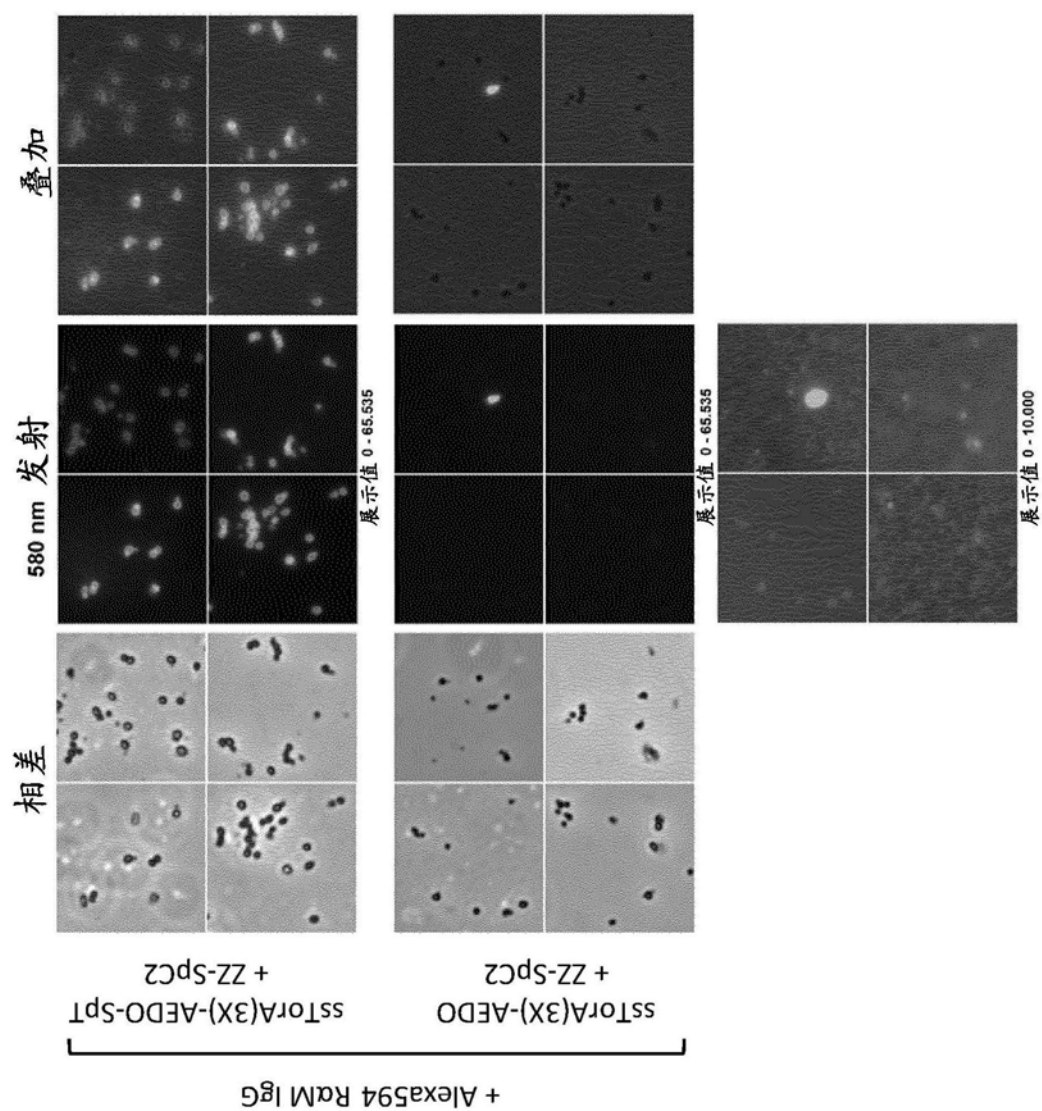


图6A



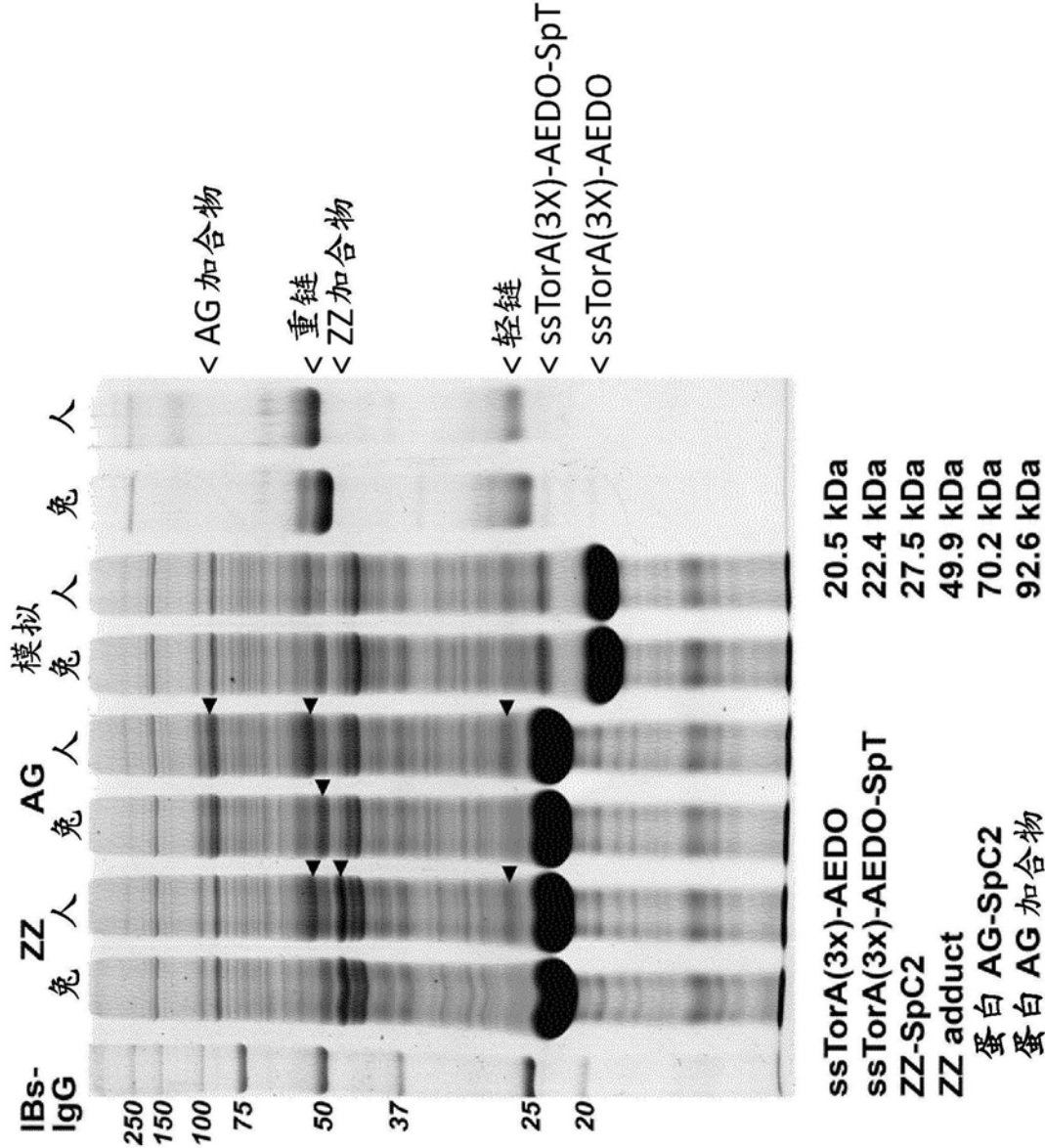


图7

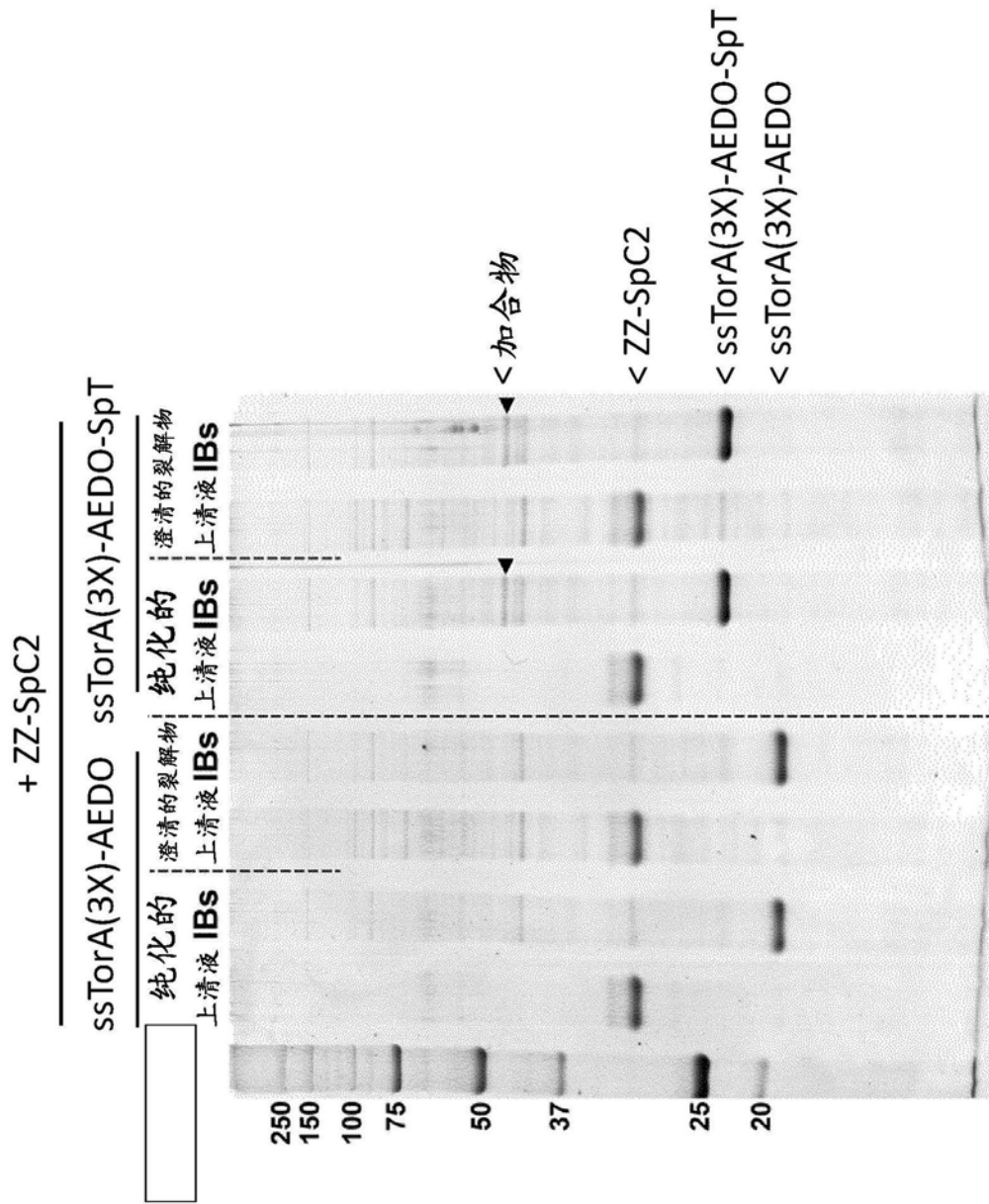


图8