



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117157328 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 01

(21) 申请号 202280021845.1

(22) 申请日 2022.01.28

(30) 优先权数据

63/142,704 2021.01.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2022/050122 2022.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/160057 EN 2022.08.04

(71) 申请人 儿童医院

地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 简-菲利浦·朱利安

埃杜尔尼·鲁哈斯迪茨

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 邹宗亮

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书11页 说明书56页

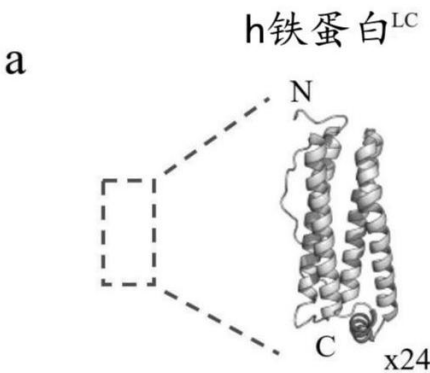
序列表22页 附图17页

(54) 发明名称

Multabody构建体、组合物和方法

(57) 摘要

在一些方面,融合蛋白包含连接至Fc单体的纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白能够自组装以形成包含一个或多个Fc二聚体的纳米笼。在一些方面,融合蛋白包含在纳米笼单体或其亚基的C端处连接至Fc单体或scFc片段的纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白能够自组装以形成纳米笼。



1. 融合蛋白, 其包含连接至Fc单体的第一纳米笼单体或其亚基, 其中多个所述融合蛋白能够自组装以形成包含一个或多个Fc二聚体的纳米笼。

2. 权利要求1所述的融合蛋白, 其中所述Fc单体在所述第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端处, 优选地在C端处连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

3. 权利要求1或2所述的融合蛋白, 其中所述亚基包含N亚基或C亚基, 其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部, 其中所述N亚基和所述C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

4. 权利要求3所述的融合蛋白, 其中所述Fc单体在所述N亚基或C亚基的C端处连接至所述N亚基或所述C亚基, 优选地其中所述Fc单体在C端处连接至C亚基。

5. 权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一纳米笼单体或其亚基进一步连接至第一生物活性部分。

6. 权利要求5所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分在所述第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端, 优选地N端处连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

7. 权利要求6所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分在所述N亚基或C亚基的N端处连接至所述N亚基或所述C亚基, 优选地其中所述第一生物活性部分在N端处连接至C亚基。

8. 权利要求5至7中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分装饰所述组装的纳米笼的内表面和/或外表面, 优选地外表面。

9. 权利要求5至8中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分包含第一抗原结合部分。

10. 权利要求9所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含抗体或其片段。

11. 权利要求10所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含Fab片段。

12. 权利要求10或11所述的融合蛋白, 其中所述抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

13. 权利要求10所述的融合蛋白, 其中所述抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

14. 权利要求5至13中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

15. 权利要求14所述的融合蛋白, 其中所述抗原与感染原相关联, 所述感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

16. 权利要求15所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。

17. 权利要求16所述的融合蛋白, 其中所述HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。

18. 权利要求17所述的融合蛋白, 其中所述HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的HIV-1特异性抗原结合部分。

19. 权利要求1至18中任一项所述的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含所述第一纳米笼单体或其亚基, 所述第一纳米笼单体或其亚基在所述第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至所述Fc单体并且在所述第一纳米笼单体或其亚基的N端处连接至所述第一生物活性部

分。

20. 权利要求5至19中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含所述C亚基,所述C亚基在所述C亚基的C端处连接至所述Fc单体并且在所述C亚基的N端处连接至所述第一生物活性部分。

21. 权利要求20所述的融合蛋白,其与N亚基或与包含N亚基的融合蛋白组合。

22. 权利要求21所述的融合蛋白,其中所述N亚基在N或C端,优选地N端处连接至第二生物活性部分。

23. 权利要求22所述的融合蛋白,其中所述第二生物活性部分包含第二抗原结合部分,并且其中,如果所述第一生物活性部分包含所述第一抗原结合部分,则所述第二抗原结合部分可以与所述第一抗原结合部分相同或不同。

24. 权利要求23所述的融合蛋白,其中所述第二抗原结合部分包含抗体或其片段。

25. 权利要求24所述的融合蛋白,其中所述第二抗原结合部分包含Fab片段。

26. 权利要求24所述的融合蛋白,其中所述抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

27. 权利要求24所述的融合蛋白,其中所述抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

28. 权利要求21至27中任一项所述的融合蛋白,其中所述N亚基进一步在所述N亚基的N或C端、优选地C端处连接至Fc单体。

29. 权利要求1至28中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc单体衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。

30. 权利要求29所述的融合蛋白,其中所述Fc单体衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

31. 权利要求30所述的融合蛋白,其中所述Fc单体是IgG1 Fc单体。

32. 权利要求1至31中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc单体包含调节所述融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。

33. 权利要求32所述的融合蛋白,其中所述Fc单体包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号是根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A;L234A、L235A和P329G(“LALAP”);G236R;G237A;和/或A330L或其组合。

34. 权利要求1至33中任一项所述的融合蛋白,其中约3至约100个纳米笼单体,诸如24、32、48或60个纳米笼单体,或约4至约200个纳米笼单体亚基,诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个,任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合,能够自组装以形成纳米笼。

35. 权利要求1至34中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、SOR、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。

36. 权利要求35所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白,任选地人脱铁铁蛋白。

37. 权利要求36所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻

链,任选地人脱铁铁蛋白轻链。

38.权利要求36或37所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,并且其中所述第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。

39.权利要求38所述的融合蛋白,其中所述第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。

40.权利要求39所述的融合蛋白,其中脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEG VSHFFRELAEEKREGYERLLKMQN QRGGRALFQDIKKPAEDEV (SEQ ID NO:1) 或

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVS
HFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEV (SEQ ID NO:
15)。

41.权利要求39或40所述的融合蛋白,其中脱铁铁蛋白的所述“C”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEA GLGEYLFERLTLRHD (SEQ ID NO:2) 或

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL
DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD (SEQ ID NO:
16)。

42.权利要求1至41中任一项所述的融合蛋白,其中所述Fc单体通过接头连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

43.权利要求5-42中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一生物活性部分通过接头连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

44.权利要求22-43中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二生物活性部分通过接头连接至所述N亚基。

45.权利要求42-44中任一项所述的融合蛋白,其中所述接头是柔性或刚性的,并且包含约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。

46.权利要求42至45中任一项所述的融合蛋白,其中所述接头包含GS域。

47.权利要求46所述的融合蛋白,其中所述GS域包含GS重复、GGGS重复、GGGS (SEQ ID NO:11) 重复和/或GGGS (SEQ ID NO:12) 重复,诸如1、2、3、4或更多个GGGS (SEQ ID NO:12) 重复。

48.权利要求47所述的融合蛋白,其中所述接头包含与以下项至少70% (诸如至少

75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GG (SEQ ID NO: 4)。

49. 权利要求47所述的融合蛋白,其中所述接头包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:

GGSGGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS G (SEQ ID NO: 5)。

50. 纳米笼,其包含至少一个权利要求1至49中任一项的融合蛋白和至少一个与所述融合蛋白自组装的第二纳米笼单体或其亚基。

51. 权利要求50所述的纳米笼,其中所述融合蛋白包含第一纳米笼单体亚基,所述第二纳米笼单体或其亚基是第二纳米笼单体亚基,并且所述第二纳米笼单体亚基与所述融合蛋白自组装以形成所述纳米笼单体。

52. 权利要求50或51所述的纳米笼,其中约1%至约100%,诸如约1%、4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,至约4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,诸如约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含在权利要求1至39中任一项的融合蛋白内。

53. 权利要求52所述的纳米笼,其中每个纳米笼单体或其亚基包含在权利要求1至49中任一项的融合蛋白内。

54. 权利要求50至53中任一项所述的纳米笼,其包含1个生物活性部分或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分,诸如2或3个不同的生物活性部分。

55. 权利要求50至54中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼是多价的。

56. 权利要求50至55中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼是多特异性的。

57. 权利要求50至56中任一项所述的纳米笼,其中至少一个生物活性部分装饰所述纳米笼的外表面,并且至少一个Fc二聚体装饰所述纳米笼的外表面。

58. 权利要求57所述的纳米笼,其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个生物活性部分装饰所述纳米笼的外表面,并且至少两个Fc二聚体装饰所述纳米笼的外表面。

59. 权利要求50至58中任一项所述的纳米笼,其包含:

(a) 至少一个纳米笼单体,其融合至第一抗原结合部分,诸如Fab,

(b) 至少一个N亚基,其融合至第二抗原结合部分,诸如Fab,和

(c) 至少一个C亚基,其:

(i) 在一端处融合至第三抗原结合部分,诸如Fab,且

(ii) 在另一端处融合至Fc单体。

60. 权利要求59所述的纳米笼,其中每个抗原结合部分连接至所述纳米笼单体或其亚基的N端,并且其中所述Fc单体连接至所述C亚基的C端。

61. 权利要求50至60中任一项所述的纳米笼,其中所述抗原结合部分特异性结合至与

抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

62. 权利要求61所述的纳米笼,其中所述抗原与感染原相关,所述感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

63. 权利要求62所述的纳米笼,其中每个抗原结合部分是不同的HIV-1特异性Fab。

64. 权利要求63所述的纳米笼,其中所述HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。

65. 权利要求64所述的纳米笼,其中所述HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和/或N49P7 Fab。

66. 权利要求65所述的纳米笼,其包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和N49P7 Fab。

67. 权利要求50至66中任一项所述的纳米笼,其包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。

68. 权利要求50至67中任一项所述的纳米笼,其包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个Fc单体。

69. 权利要求50至68中任一项所述的纳米笼,其携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。

70. 权利要求69所述的纳米笼,其中所述货物分子不融合至所述融合蛋白并且内部地包含在所述纳米笼中,或其中所述货物分子连接至所述融合蛋白或内部地或外部地结合至所述纳米笼。

71. 权利要求69所述的纳米笼,其中所述货物分子是蛋白质并且融合至所述融合蛋白,使得所述货物分子内部地包含在所述纳米笼中。

72. 权利要求69至71中任一项所述的纳米笼,其中所述货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。

73. 权利要求50至72中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出泛病毒中和广度。

74. 权利要求50至73中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出小于约0.1 μ g/mL,诸如小于约0.01 μ g/mL,诸如小于约0.001 μ g/mL的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

75. 权利要求50至74中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,诸如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

76. 权利要求50至75中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

77. 融合蛋白,其包含在第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至scFc片段的所述第一纳米笼单体或其亚基,其中多个所述融合蛋白能够自组装以形成纳米笼。

78. 权利要求77所述的融合蛋白,其中所述亚基包含N亚基或C亚基,其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部,其中所述N亚基和所述C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

79. 权利要求78所述的融合蛋白, 其中所述scFc片段在所述N亚基或C亚基的C端处连接至所述N亚基或C亚基。

80. 权利要求77至79中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一纳米笼单体或其亚基进一步连接至第一生物活性部分。

81. 权利要求80所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分在所述第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端, 优选地N端处连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

82. 权利要求81所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分在所述N亚基或C亚基的N端处连接至所述N亚基或所述C亚基, 优选地其中所述第一生物活性部分在N端处连接至C亚基。

83. 权利要求80至82中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分装饰所述组装的纳米笼的内表面和/或外表面, 优选地外表面。

84. 权利要求80至83中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分包含第一抗原结合部分。

85. 权利要求84所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含抗体或其片段。

86. 权利要求85所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含Fab片段。

87. 权利要求85或86所述的融合蛋白, 其中所述抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

88. 权利要求85所述的融合蛋白, 其中所述抗体或其片段包含Fab片段的轻链和/或重链。

89. 权利要求77至88中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

90. 权利要求89所述的融合蛋白, 其中所述抗原与感染原相关, 所述感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

91. 权利要求90所述的融合蛋白, 其中所述第一抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。

92. 权利要求91所述的融合蛋白, 其中所述HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。

93. 权利要求92所述的融合蛋白, 其中所述HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的HIV-1特异性抗原结合部分。

94. 权利要求77至93中任一项所述的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含所述纳米笼单体或其亚基, 所述纳米笼单体或其亚基在所述第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至所述scFc片段并且在所述第一纳米笼单体或其亚基的N端处连接至第一生物活性部分。

95. 权利要求79至94中任一项所述的融合蛋白, 其中所述融合蛋白包含所述C亚基, 所述C亚基在所述C亚基的C端处连接至所述scFc单体并且在所述C亚基的N端处连接至第一生物活性部分。

96. 权利要求95所述的融合蛋白, 其与N亚基或与包含N亚基的融合蛋白组合。

97. 权利要求96所述的融合蛋白, 其中所述N亚基在N或C端, 优选地N端处连接至第二生物活性部分。

98. 权利要求97所述的融合蛋白, 其中所述第二生物活性部分包含第二抗原结合部分,

并且其中,如果所述第一生物活性部分包含所述第一抗原结合部分,则所述第二抗原结合部分可以与连接至所述C亚基的所述抗原结合部分相同或不同。

99. 权利要求98所述的融合蛋白,其中所述第二抗原结合部分包含抗体或其片段。

100. 权利要求99所述的融合蛋白,其中所述第二抗原结合部分包含Fab片段。

101. 权利要求99或100所述的融合蛋白,其中所述抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

102. 权利要求99所述的融合蛋白,其中所述抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

103. 权利要求96至102中任一项所述的融合蛋白,其中所述N亚基进一步在所述N亚基的N或C端、优选地C端处连接至第二scFc片段。

104. 权利要求77至103中任一项所述的融合蛋白,其中所述scFc片段衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。

105. 权利要求104所述的融合蛋白,其中所述scFc片段衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

106. 权利要求105所述的融合蛋白,其中所述scFc片段是IgG1 scFc片段。

107. 权利要求77至106中任一项的融合蛋白,其中所述scFc片段包含调节所述融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。

108. 权利要求107所述的融合蛋白,其中所述scFc片段包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A;L234A、L235A和P329G(“LALAP”);G236R;G237A;和/或A330L或其组合。

109. 权利要求77至108中任一项所述的融合蛋白,其中约3至约100个纳米笼单体,诸如24、32、48或60个纳米笼单体,或约4至约200个纳米笼单体亚基,诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个,任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合,能够自组装以形成纳米笼。

110. 权利要求77至109中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、SOR、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。

111. 权利要求110所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白,任选地人脱铁铁蛋白。

112. 权利要求111所述的融合蛋白,其中所述第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻链,任选地人脱铁铁蛋白轻链。

113. 权利要求111或112所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,并且其中所述第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。

114. 权利要求113所述的融合蛋白,其中所述第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。

115. 权利要求114所述的融合蛋白,其中脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与

以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEG VSHFFRELAEEKREGYERLLKMQN
QRGGRALFQDIKKPAEDEV (SEQ ID NO:1) 或

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVS
HFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEV (SEQ ID NO:
15)。

116. 权利要求114或115所述的融合蛋白, 其中脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEA
GLGEYLFERLTLRHD (SEQ ID NO:2) 或

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL
DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD (SEQ ID NO:16)。

117. 权利要求77至116中任一项所述的融合蛋白, 其中所述scFc片段通过接头连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

118. 权利要求80-117中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第一生物活性部分通过接头连接至所述第一纳米笼单体或其亚基。

119. 权利要求97-118中任一项所述的融合蛋白, 其中所述第二生物活性部分通过接头连接至所述N亚基。

120. 权利要求117至119中任一项所述的融合蛋白, 其中所述接头是柔性或刚性的, 并且包含约1至约100个氨基酸残基, 诸如约1至约70个氨基酸残基, 诸如约1至约30个氨基酸残基, 诸如约8至约16个氨基酸残基。

121. 权利要求117至120中任一项所述的融合蛋白, 其中所述接头包含GS域。

122. 权利要求121所述的融合蛋白, 其中所述GS域包含GS重复、GGG重复、GGGS (SEQ ID NO:11) 重复和/或GGGG (SEQ ID NO:12) 重复, 诸如1、2、3、4或更多个GGGG (SEQ ID NO:12) 重复。

123. 权利要求122所述的融合蛋白, 其中所述接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 4)。

124. 权利要求122所述的融合蛋白, 其中所述接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

GGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO: 5)。

125. 纳米笼, 其包含至少一个权利要求77至124中任一项的融合蛋白和至少一个与所述融合蛋白自组装的第二纳米笼单体或其亚基。

126. 权利要求125所述的纳米笼, 其中所述融合蛋白包含第一纳米笼单体亚基, 所述第二纳米笼单体或其亚基是第二纳米笼单体亚基并且所述第二纳米笼单体亚基与所述融合蛋白自组装以形成所述纳米笼单体。

127. 权利要求125或126所述的纳米笼, 其中约1%至约100%, 诸如约1%、4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%, 至约4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%, 诸如约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含在权利要求77至124中任一项所述的融合蛋白内。

128. 权利要求125或126所述的纳米笼, 其中每个纳米笼单体或其亚基包含在权利要求77至124中任一项的融合蛋白内。

129. 权利要求125至128中任一项所述的纳米笼, 其包含1个生物活性部分或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分, 诸如2或3个不同的生物活性部分。

130. 权利要求125至129中任一项所述的纳米笼, 其中所述纳米笼是多价的。

131. 权利要求125至130中任一项所述的纳米笼, 其中所述纳米笼是多特异性的。

132. 权利要求125至131中任一项所述的纳米笼, 其中至少一个生物活性部分装饰所述纳米笼的外表面, 并且至少一个scFc片段装饰所述纳米笼的外表面。

133. 权利要求132所述的纳米笼, 其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个生物活性部分装饰所述纳米笼的外表面, 并且至少两个scFc片段装饰所述纳米笼的外表面。

134. 权利要求125至133中任一项所述的纳米笼, 其包含:

(a) 至少一个纳米笼单体, 其融合至第一抗原结合部分, 诸如Fab,

(b) 至少一个N亚基, 其融合至第二抗原结合部分, 诸如Fab, 和

(c) 至少一个C亚基, 其:

(i) 在一端处融合至第三抗原结合部分, 诸如Fab, 且

(ii) 在另一端处融合至scFc片段。

135. 权利要求134所述的纳米笼, 其中每个抗原结合部分连接至所述纳米笼单体或其亚基的N端, 并且其中所述scFc片段连接至所述C亚基的C端。

136. 权利要求134或135的纳米笼, 其中所述第一和/或第二抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

137. 权利要求136所述的纳米笼, 其中所述抗原与感染原相关, 所述感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

138. 权利要求137所述的纳米笼, 其中每个抗原结合部分是不同的HIV-1特异性Fab。

139. 权利要求138所述的纳米笼, 其中所述HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP_{D368R}、93TH057 gp120和/或MPER肽。

140. 权利要求139所述的纳米笼, 其中所述HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和/或N49P7 Fab。

141. 权利要求140所述的纳米笼, 其包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和N49P7 Fab。

142. 权利要求125至141中任一项所述的纳米笼,其包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。

143. 权利要求125至142中任一项所述的纳米笼,其包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个scFc片段。

144. 权利要求125至143中任一项所述的纳米笼,其携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。

145. 权利要求144所述的纳米笼,其中所述货物分子不融合至所述融合蛋白并且内部地包含在所述纳米笼中,或其中所述货物分子连接至所述融合蛋白或内部地或外部地结合至所述纳米笼。

146. 权利要求144所述的纳米笼,其中所述货物分子是蛋白质并且融合至所述融合蛋白,使得所述货物分子内部地包含在所述纳米笼中。

147. 权利要求144至146中任一项所述的纳米笼,其中所述货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。

148. 权利要求125至147中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出泛病毒中和广度。

149. 权利要求125至148中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出小于约0.1 μ g/mL,诸如小于约0.01 μ g/mL,诸如小于约0.001 μ g/mL的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

150. 权利要求125至149中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,诸如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

151. 权利要求125至150中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAb的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

152. 治疗性或防治性组合物,其包含权利要求50至76和125至151中任一项所述的纳米笼。

153. 权利要求152所述的组合物,其中所述组合物是用于治疗 and/或预防抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况。

154. 权利要求153所述的组合物,其中所述抗原与感染原相关,所述感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

155. 权利要求154所述的组合物,其中所述组合物是用于治疗 and/或预防HIV-1相关病况。

156. 核酸分子,其编码权利要求1至49和77至124中任一项所述的融合蛋白。

157. 载体,其包含权利要求156所述的核酸分子。

158. 宿主细胞,其包含权利要求157所述的载体并产生权利要求1至49和77至124中任一项所述的融合蛋白。

159. 用于治疗 and/或预防病况的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用权利要

求50至76和125至151中任一项所述的纳米笼或权利要求152至155中任一项所述的组合物。

160. 权利要求159所述的方法,其中所述病况是HIV-1相关病况。

161. 权利要求50至76和125至151中任一项所述的纳米笼或权利要求152至155中任一项所述的组合物用于治疗 and/或预防病况的用途。

162. 权利要求161所述的用途,其中所述病况是HIV-1相关病况。

163. 权利要求50至76和125至151中任一项所述的纳米笼或权利要求152至155中任一项所述的组合物,其用于治疗 and/或预防病况。

164. 权利要求163所述的纳米笼,其中所述病况是HIV-1相关病况。

165. 权利要求50-76、125-151或163-164中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼不包括任何铁蛋白重链。

166. 权利要求50-76、125-151或163-164中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼不包括能够具有亚铁氧化酶活性的任何组分。

167. 权利要求50-76或163-166中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼包括包含抗体或其抗原结合片段的至少一个生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体的数量的比率是6:1。

168. 权利要求125-151或163-166中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼包括包含抗体或其抗原结合片段的至少一个生物活性部分,并且生物活性部分的总数与scFc的数量的比率是3:1。

169. 权利要求50-76或163-166中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼包括包含抗体或其抗原结合片段的至少一个生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体或scFc的数量的比率是至少7:1。

170. 权利要求125-151或163-166中任一项所述的纳米笼,其中所述纳米笼包括包含抗体或其抗原结合片段的至少一个生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体或scFc的数量的比率是至少4:1。

Multabody构建体、组合物和方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年1月28日提交的美国临时专利申请号63/142,704的权益和优先权,出于所有目的,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并且特此通过引用将其整体并入。所述ASCII副本创建于2022年1月28日,名为“Sequence Listing Jan-2022 3206-5048_ST25.txt”,且大小为8100字节。

[0005] 领域

[0006] 本发明涉及多肽。特别地,本发明涉及Multabody多肽和相关构建体、组合物和方法。

[0007] 背景

[0008] 纳米颗粒已为各个学科中的进步做出贡献。它们的使用具有赋予靶向递送的潜力,并允许用于催化过程的有序微阵列、缓释和笼式微环境的工程化。

[0009] 对于含有敏感且亚稳态的蛋白质的纳米颗粒的制造,蛋白质自组装是有吸引力的方法。实际上,自组装的纳米颗粒在生理条件下通过非共价相互作用形成,并可靠地产生均匀且通常对称的纳米胶囊或纳米笼。自组装性蛋白质纳米颗粒具有三个有区别的表面:外部、内部和亚基间表面,这些表面均可以微调以传递额外功能。

[0010] 已描述包含自组装性蛋白质的融合蛋白。例如,已知在组装的纳米笼的外表面上展示抗原以用作疫苗。

[0011] 存在用于设计纳米颗粒以及治疗和/或预防疾病的改进的构建体、组合物和方法的需要。

发明内容

[0012] 根据一方面,提供了融合蛋白,其包含连接至Fc单体的第一纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白能够自组装以形成包含一个或多个Fc二聚体的纳米笼。

[0013] 在一方面,Fc单体在第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端处,优选地在C端处连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0014] 在一方面,亚基包含N亚基或C亚基,其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部,其中N亚基和C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

[0015] 在一方面,Fc单体在N亚基或C亚基的C端处连接至N亚基或C亚基,优选地其中Fc单体在C端处连接至C亚基。

[0016] 在一方面,第一纳米笼单体或其亚基进一步连接至第一生物活性部分。

[0017] 在一方面,第一生物活性部分在第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端,优选地N端处连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0018] 在一方面,第一生物活性部分在N亚基或C亚基的N端处连接至N亚基或C亚基,优选地其中第一生物活性部分在N端处连接至C亚基。

- [0019] 在一方面,第一生物活性部分装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,优选地外表面。
- [0020] 在一方面,第一生物活性部分包含第一抗原结合部分。
- [0021] 在一方面,第一抗原结合部分包含抗体或其片段。
- [0022] 在一方面,第一抗原结合部分包含Fab片段。
- [0023] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。
- [0024] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。
- [0025] 在一方面,第一抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。
- [0026] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。
- [0027] 在一方面,第一抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。
- [0028] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。
- [0029] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的HIV-1特异性抗原结合部分。
- [0030] 在一方面,融合蛋白包含第一纳米笼单体或其亚基,该第一纳米笼单体或其亚基在第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至Fc单体并且在第一纳米笼单体或其亚基的N端处连接至第一生物活性部分。
- [0031] 在一方面,融合蛋白包含C亚基,该C亚基在C亚基的C端处连接至Fc单体并且在C亚基的N端处连接至第一生物活性部分。
- [0032] 在一方面,融合蛋白与N亚基或与包含N亚基的融合蛋白组合提供。
- [0033] 在一方面,N亚基在N端或C端,优选地N端处连接至第二生物活性部分。
- [0034] 在一方面,第二生物活性部分包含第二抗原结合部分,并且其中,如果第一生物活性部分包含第一抗原结合部分,则第二抗原结合部分可以与第一抗原结合部分相同或不同。
- [0035] 在一方面,第二抗原结合部分包含抗体或其片段。
- [0036] 在一方面,第二抗原结合部分包含Fab片段。
- [0037] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。
- [0038] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。
- [0039] 在一方面,N亚基进一步在N亚基的N端或C端,优选地C端处连接至Fc单体。
- [0040] 在一方面,Fc单体衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。
- [0041] 在一方面,Fc单体衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
- [0042] 在一方面,Fc单体是IgG1 Fc单体。
- [0043] 在一方面,Fc单体包含调节融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。
- [0044] 在一方面,Fc单体包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号是根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A;L234A、L235A

和P329G (“LALAP”);G236R;G237A;和/或A330L或其组合。

[0045] 在一方面,约3至约100个纳米笼单体,诸如24、32、48或60个纳米笼单体,或约4至约200个纳米笼单体亚基,诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个,任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合,能够自组装以形成纳米笼。

[0046] 在一方面,第一纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、S0R、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。

[0047] 在一方面,第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白,任选地人脱铁铁蛋白。

[0048] 在一方面,第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻链,任选地人脱铁铁蛋白轻链。

[0049] 在一方面,融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。

[0050] 在一方面,第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。

[0051] 在一方面,脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEG
VSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID
NO: 1)或

[0052] SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVS
HFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:
15)。

[0053] 在一方面,脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0054] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL

[0055] DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD(SEQ ID NO: 2)

[0056] 或

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL
[0057] DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD(SEQ ID NO:
16)。

[0058] 在一方面,Fc单体通过接头连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0059] 在一方面,第一生物活性部分通过接头连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0060] 在一方面,第二生物活性部分通过接头连接至N亚基。

[0061] 在一方面,接头是柔性或刚性的,并且包含约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至

约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。

[0062] 在一方面,接头包含GS域。

[0063] 在一方面,GS域包含GS重复、GGS重复、GGGS (SEQ ID NO:11) 重复和/或GGGGS (SEQ ID NO:12) 重复,诸如1、2、3、4或更多个GGGGS (SEQ ID NO:12) 重复。

[0064] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0065] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO:4)。

[0066] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0067] GGS GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:5)。

[0068] 根据一方面,提供了纳米笼,其包含至少一个本文描述的融合蛋白和至少一个与该融合蛋白自组装的第二纳米笼单体或其亚基。

[0069] 在一方面,融合蛋白包含第一纳米笼单体亚基,第二纳米笼单体或其亚基是第二纳米笼单体亚基并且第二纳米笼单体亚基与融合蛋白自组装以形成纳米笼单体。

[0070] 在一方面,约1%至约100%,诸如约1%、4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,至约4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,诸如约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含在本文描述的融合蛋白内。

[0071] 在一方面,每个纳米笼单体或其亚基包含在本文描述的融合蛋白内。

[0072] 在一方面,纳米笼包含1个生物活性部分或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分,诸如2或3个不同的生物活性部分。

[0073] 在一方面,纳米笼是多价的。

[0074] 在一方面,纳米笼是多特异性的。

[0075] 在一方面,至少一个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少一个Fc二聚体装饰纳米笼的外表面。

[0076] 在一方面,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少两个Fc二聚体装饰纳米笼的外表面。

[0077] 在一方面,纳米笼,其包含:

[0078] (a) 至少一个纳米笼单体,其融合至第一抗原结合部分,诸如Fab,

[0079] (b) 至少一个N亚基,其融合至第二抗原结合部分,诸如Fab,和

[0080] (c) 至少一个C亚基,其:

[0081] (i) 在一端处融合至第三抗原结合部分,诸如Fab,且

[0082] (ii) 在另一端处融合至Fc单体。

[0083] 在一方面,每个抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基的N端,并且其中Fc单体连接至C亚基的C端。

[0084] 在一方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

[0085] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0086] 在一方面,每个抗原结合部分是不同的HIV-1特异性Fab。

[0087] 在一方面,HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。

[0088] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和/或N49P7 Fab。

[0089] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和N49P7Fab。

[0090] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。

[0091] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个Fc单体。

[0092] 在一方面,纳米笼携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。

[0093] 在一方面,货物分子不融合至融合蛋白并且内部地包含在纳米笼中,或其中货物分子连接至融合蛋白或内部地或外部地结合至纳米笼。

[0094] 在一方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子内部地包含在纳米笼中。

[0095] 在一方面,货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。

[0096] 在一方面,纳米笼展示出泛病毒中和广度。

[0097] 在一方面,纳米笼展示出小于约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诸如小于约0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,例如小于约0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0098] 在一方面,纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,例如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0099] 在一方面,纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0100] 根据一方面,提供了融合蛋白,其包含在第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至scFc片段的第一纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白能够自组装以形成纳米笼。

[0101] 在一方面,亚基包含N亚基或C亚基,其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部,其中N亚基和C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

[0102] 在一方面,scFc片段N亚基或C亚基的C端处连接至N亚基或C亚基。

[0103] 在一方面,第一纳米笼单体或其亚基进一步连接至第一生物活性部分。

[0104] 在一方面,第一生物活性部分在第一纳米笼单体或其亚基的N端或C端,优选地N端处连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0105] 在一方面,第一生物活性部分在N亚基或C亚基的N端处连接至N亚基或C亚基,优选

地其中第一生物活性部分在N端处连接至C亚基。

[0106] 在一方面,第一生物活性部分装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,优选地外表面。

[0107] 在一方面,第一生物活性部分包含第一抗原结合部分。

[0108] 在一方面,第一抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0109] 在一方面,第一抗原结合部分包含Fab片段。

[0110] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

[0111] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

[0112] 在一方面,第一抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

[0113] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0114] 在一方面,第一抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。

[0115] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。

[0116] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的HIV-1特异性抗原结合部分。

[0117] 在一方面,融合蛋白包含纳米笼单体或其亚基,纳米笼单体或其亚基在第一纳米笼单体或其亚基的C端处连接至scFc片段并且在第一纳米笼单体或其亚基的N端处连接至第一生物活性部分。

[0118] 在一方面,融合蛋白包含在C亚基的C端处连接至scFc单体并且在C亚基的N端处连接至第一生物活性部分的C亚基。

[0119] 在一方面,融合蛋白与N亚基或包含N亚基的融合蛋白组合提供。

[0120] 在一方面,N亚基在N端或C端,优选地N端处连接至第二生物活性部分。

[0121] 在一方面,第二生物活性部分包含第二抗原结合部分,并且其中,如果第一生物活性部分包含第一抗原结合部分,则第二抗原结合部分可以与连接至C亚基的抗原结合部分相同或不同。

[0122] 在一方面,第二抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0123] 在一方面,第二抗原结合部分包含Fab片段。

[0124] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

[0125] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

[0126] 在一方面,N亚基进一步在N亚基的N端或C端,优选地C端处连接至第二scFc片段。

[0127] 在一方面,scFc片段衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。

[0128] 在一方面,scFc片段衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0129] 在一方面,scFc片段是IgG1 scFc片段。

[0130] 在一方面,scFc片段包含调节融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。

[0131] 在一方面,scFc片段包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号是根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和

N434S (“LS”) ; M252Y、S254T和T256E (“YTE”) ; L234A和L235A (“LALA”) ; I253A; L234A、L235A和P329G (“LALAP”) ; G236R; G237A; 和/或A330L或其组合。

[0132] 在一方面, 约3至约100个纳米笼单体, 诸如24、32、48或60个纳米笼单体, 或约4至约200个纳米笼单体亚基, 诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合, 能够自组装以形成纳米笼。

[0133] 在一方面, 第一纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、S0R、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。

[0134] 在一方面, 第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白, 任选地人脱铁铁蛋白。

[0135] 在一方面, 第一纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻链, 任选地人脱铁铁蛋白轻链。

[0136] 在一方面, 融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基, 任选地第一人脱铁铁蛋白亚基, 并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。

[0137] 在一方面, 第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。

[0138] 在一方面, 脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEG
VSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID
NO: 1)或

[0139] SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVS
HFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:
15)。

[0140] 在一方面, 脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0141] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL
DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD(SEQ ID NO: 2)

[0142] 或
GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL

[0143] DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD(SEQ ID NO:
16)。

[0144] 在一方面, scFc片段通过接头连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0145] 在一方面, 第一生物活性部分通过接头连接至第一纳米笼单体或其亚基。

[0146] 在一方面, 第二生物活性部分通过接头连接至N亚基。

[0147] 在一方面,接头是柔性或刚性的,并且包含约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。

[0148] 在一方面,接头包含GS域。

[0149] 在一方面,GS域包含GS重复、GGS重复、GGGS (SEQ ID NO:11) 重复和/或GGGS (SEQ ID NO:12) 重复,诸如1、2、3、4或更多个GGGS (SEQ ID NO:12) 重复。

[0150] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0151] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO:4)。

[0152] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0153] GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG (SEQ ID NO:5)。

[0154] 根据一方面,提供了纳米笼,其包含至少一个如本文描述的融合蛋白和至少一个与该融合蛋白自组装的第二纳米笼单体或其亚基。

[0155] 在一方面,融合蛋白包含第一纳米笼单体亚基,第二纳米笼单体或其亚基是第二纳米笼单体亚基并且第二纳米笼单体亚基与融合蛋白自组装以形成纳米笼单体。

[0156] 在一方面,约1%至约100%,诸如约1%、4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,至约4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,诸如约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含在本文描述的融合蛋白内。

[0157] 在一方面,每个纳米笼单体或其亚基包含在本文描述的融合蛋白内。

[0158] 在一方面,纳米笼包含1个生物活性部分或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分,诸如2或3个不同的生物活性部分。

[0159] 在一方面,纳米笼是多价的。

[0160] 在一方面,纳米笼是多特异性的。

[0161] 在一方面,至少一个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少一个scFc片段装饰纳米笼的外表面。

[0162] 在一方面,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少两个scFc片段装饰纳米笼的外表面。

[0163] 在一方面,纳米笼,其包含:

[0164] (a) 至少一个纳米笼单体,其融合至第一抗原结合部分,诸如Fab,

[0165] (b) 至少一个N亚基,其融合至第二抗原结合部分,诸如Fab,和

[0166] (c) 至少一个C亚基,其:

[0167] (i) 在一端处融合至第三抗原结合部分,诸如Fab,且

[0168] (ii) 在另一端处融合至scFc片段。

[0169] 在一方面,每个抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基的N端,并且其中scFc片

段连接至C亚基的C端。

[0170] 在一方面,第一和/或第二抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

[0171] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0172] 在一方面,每个抗原结合部分是不同的HIV-1特异性Fab。

[0173] 在一方面,HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。

[0174] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和/或N49P7 Fab。

[0175] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400 Fab、10E8v4 Fab和N49P7Fab。

[0176] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。

[0177] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个scFc片段。

[0178] 在一方面,纳米笼携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。

[0179] 在一方面,货物分子不融合至融合蛋白并且内部地包含在纳米笼中,或其中货物分子连接至融合蛋白或内部地或外部地结合至纳米笼。

[0180] 在一方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子内部地包含在纳米笼中。

[0181] 在一方面,货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。

[0182] 在一方面,纳米笼展示出出泛病毒中和广度。

[0183] 在一方面,纳米笼展示出小于约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诸如小于约0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,例如小于约0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0184] 在一方面,纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,例如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0185] 在一方面,纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0186] 在一方面,提供了包含本文描述的纳米笼的治疗性或防治性的组合物。

[0187] 在一方面,组合物用于治疗 and/或预防抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况。

[0188] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0189] 在一方面,组合物用于治疗 and/或预防HIV-1相关的病况。

[0190] 根据一方面,提供了编码本文描述的融合蛋白的核酸分子。

[0191] 根据一方面,提供了包含本文描述的核酸分子的载体。

[0192] 根据一方面,提供了包含本文描述的载体并产生本文描述的融合蛋白的宿主细

胞。

[0193] 根据一方面,提供了用于治疗和/或预防病况的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本文描述的纳米笼或组合物。

[0194] 在一方面,该病况是HIV-1相关的病况。

[0195] 根据一方面,提供了本文描述的纳米笼或组合物用于治疗和/或预防病况的用途。

[0196] 在一方面,该病况是HIV-1相关的病况。

[0197] 根据一方面,提供了本文描述的纳米笼或组合物用于治疗和/或预防病况。

[0198] 在一方面,该病况是HIV-1相关的病况。

[0199] 在一方面,纳米笼不包括任何铁蛋白重链。

[0200] 在一方面,纳米笼不包括能够具有亚铁氧化酶活性的任何组分。

[0201] 在一方面,纳米笼包含至少一个包含抗体或其抗原结合片段的生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体的数量的比率是6:1。

[0202] 在一方面,纳米笼包含至少一个包含抗体或其抗原结合片段的生物活性部分,并且生物活性部分的总数与scFc的数量比率是3:1。

[0203] 在一方面,纳米笼包含至少一个包含抗体或其抗原结合片段的生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体或scFc的数量比率是至少7:1。

[0204] 在一方面,纳米笼包含至少一个包含抗体或其抗原结合片段的生物活性部分,并且生物活性部分的总数与Fc二聚体或scFc的数量比率是至少4:1。

[0205] 根据一方面,提供了融合蛋白,其包含连接至Fc单体的纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白自组装以形成包含一个或多个Fc二聚体的纳米笼。

[0206] 在一方面,亚基包含N亚基或C亚基,其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部,其中N亚基和C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

[0207] 在一方面,Fc单体在纳米笼单体或其亚基的N端或C端处、优选地在C端处连接至纳米笼单体或其亚基。

[0208] 在一方面,Fc单体在N亚基或C亚基的C端处连接至N亚基或C亚基,优选地其中Fc单体在C端处连接至C亚基。

[0209] 在一方面,纳米笼单体或其亚基进一步连接至生物活性部分。

[0210] 在一方面,生物活性部分在纳米笼单体或其亚基的N端或C端,优选地N端处连接至纳米笼单体或其亚基。

[0211] 在一方面,生物活性部分在N亚基或C亚基的N端处连接至N亚基或C亚基,优选地其中生物活性部分在N端处连接至C亚基。

[0212] 在一方面,抗原结合部分装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,优选地外表面。

[0213] 在一方面,生物活性部分包含抗原结合部分。

[0214] 在一方面,抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0215] 在一方面,第抗原结合部分包含Fab片段。

[0216] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

[0217] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

[0218] 在一方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况

相关联的抗原。

[0219] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0220] 在一方面,抗原结合部分包含HIV-1抗原结合部分。

[0221] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。

[0222] 在一方面,HIV-1抗原结合部分包含PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7。

[0223] 在一方面,融合蛋白包含在纳米笼单体的C端处连接至Fc单体并且在纳米笼单体的N端处连接至第一生物活性部分的纳米笼单体。

[0224] 在一方面,融合蛋白包含在C亚基的C端处连接至Fc单体并且在C亚基的N端处连接至生物活性部分的C亚基。

[0225] 在一方面,C亚基与N亚基组合提供。

[0226] 在一方面,N亚基在N端或C端,优选地N端处连接至生物活性部分。

[0227] 在一方面,生物活性部分包含抗原结合部分,其可以与连接至C亚基的抗原结合部分相同或不同。

[0228] 在一方面,抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0229] 在一方面,第抗原结合部分包含Fab片段。

[0230] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

[0231] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

[0232] 在一方面,N亚基进一步在N亚基的N端或C端,优选地C端处连接至Fc单体。

[0233] 在一方面,Fc单体衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。

[0234] 在一方面,Fc单体衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0235] 在一方面,Fc单体是IgG1 Fc单体。

[0236] 在一方面,Fc单体包含调节融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。

[0237] 在一方面,Fc单体包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号是根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A和/或L234A、L235A和P329G(“LALAP”)、G236R、G237A、A330L或其组合。

[0238] 在一方面,约3至约100个纳米笼单体,诸如24、32、48或60个单体,或约4至约200个纳米笼单体亚基,诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个,任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合,能够自组装以形成纳米笼。

[0239] 在一方面,纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、SOR、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。

[0240] 在一方面,纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白,任选地人脱铁铁蛋白。

[0241] 在一方面,纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻链,任选地人脱铁铁蛋白轻链。

[0242] 在一方面,融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。

[0243] 在一方面,第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。

[0244] 在一方面,脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0245] **MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDDDDVALEGV**

[0246] **SHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRRGGRALFQDIKKPAEDEW.**

[0247] 在一方面,脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0248] **GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLD
EEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD.**

[0249] 在一方面,Fc单体和/或生物活性部分通过接头连接至纳米笼单体或其亚基。

[0250] 在一方面,接头是柔性或刚性的,并且包含约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。

[0251] 在一方面,接头包含GS域。

[0252] 在一方面,GS域包含GS重复、GGS重复、GGGS重复和/或GGGS重复,诸如1、2、3、4或更多个GGGS重复。

[0253] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0254] **GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG.**

[0255] 在一方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[0256] **GGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG.**

[0257] 根据一方面,本文提供了纳米笼,其包含至少一个本文描述的融合蛋白和至少一个与该融合蛋白自组装的第二纳米笼单体或其亚基。

[0258] 在一方面,融合蛋白包含第一纳米笼单体亚基,第二纳米笼单体或其亚基是第二纳米笼单体亚基并且第二纳米笼单体亚基与融合蛋白自组装以形成纳米笼单体。

[0259] 在一方面,每个纳米笼单体包含本文描述的融合蛋白。

[0260] 在一方面,约1%至约100%,诸如约1%、4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,至约4%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,诸如约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含本文描述的融合蛋白。

[0261] 在一方面,纳米笼包含1个生物活性部分或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的生物活性部分,诸如2或3个不同的生物活性部分。

- [0262] 在一方面,纳米笼是多价的。
- [0263] 在一方面,纳米笼是多特异性的。
- [0264] 在一方面,至少一个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少一个Fc二聚体装饰纳米笼的外表面。
- [0265] 在一方面,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个生物活性部分装饰纳米笼的外表面,并且至少两个Fc二聚体装饰纳米笼的外表面。
- [0266] 在一方面,纳米笼包含融合至第一抗原结合部分(诸如Fab)的至少一个纳米笼单体、融合至第二抗原结合部分(诸如Fab)的至少一个N亚基,和在一端处融合至第三抗原结合部分(诸如Fab)且在另一端处融合至Fc单体的至少一个C亚基。
- [0267] 在一方面,每个抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基的N端,并且其中Fc单体连接至C亚基的C端。
- [0268] 在一方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。
- [0269] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。
- [0270] 在一方面,每个抗原结合部分是不同的HIV-1特异性Fab。
- [0271] 在一方面,HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。
- [0272] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400、10E8v4和/或N49P7。
- [0273] 在一方面,纳米笼包含PGDM1400、10E8v4和N49P7。
- [0274] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。
- [0275] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个Fc单体。
- [0276] 在一方面,纳米笼携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。
- [0277] 在一方面,货物分子不融合至融合蛋白并且内部地包含在纳米笼中,或其中货物分子连接至融合蛋白或内部地或外部地结合至纳米笼。
- [0278] 在一方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子内部地包含在纳米笼中。
- [0279] 在一方面,货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。
- [0280] 在一方面,纳米笼展示出出泛病毒中和广度。
- [0281] 在一方面,纳米笼展示出小于约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,诸如小于约0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,例如小于约0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。
- [0282] 在一方面,纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,例如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值。

[0283] 在一方面,纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

[0284] 根据一方面,提供了融合蛋白,其包含在纳米笼单体或其亚基的C端处连接至scFc片段的纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白自组装以形成纳米笼。

[0285] 在一方面,亚基包含N亚基或C亚基,其基本上分别对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部,其中N亚基和C亚基能够自组装以形成纳米笼单体。

[0286] 在一方面,scFc片段在纳米笼单体的C端处连接至纳米笼单体。

[0287] 在一方面,scFc片段N亚基或C亚基的C端处连接至N亚基或C亚基。

[0288] 在一方面,纳米笼单体或其亚基进一步连接至生物活性部分。

[0289] 在一方面,生物活性部分在纳米笼单体或其亚基的N端或C端,优选地N端处连接至纳米笼单体或其亚基。

[0290] 在一方面,生物活性部分在N亚基或C亚基的N端处连接至N亚基或C亚基,优选地其中生物活性部分在N端处连接至C亚基。

[0291] 在一方面,抗原结合部分装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,优选地外表面。

[0292] 在一方面,生物活性部分包含抗原结合部分。

[0293] 在一方面,抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0294] 在一方面,第抗原结合部分包含Fab片段。

[0295] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。

[0296] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。

[0297] 在一方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况相关联的抗原。

[0298] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。

[0299] 在一方面,抗原结合部分包含HIV-1抗原结合部分。

[0300] 在一方面,HIV-1特异性抗原结合部分结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。

[0301] 在一方面,HIV-1抗原结合部分包含PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7。

[0302] 在一方面,融合蛋白包含在纳米笼单体的C端处连接至scFc片段并且在纳米笼单体的N端处连接至第一生物活性部分的纳米笼单体。

[0303] 在一方面,融合蛋白包含在C亚基的C端处连接至scFc单体并且在C亚基的N端处连接至生物活性部分的C亚基。

[0304] 在一方面,C亚基与N亚基组合提供。

[0305] 在一方面,N亚基在N端或C端,优选地N端处连接至生物活性部分。

[0306] 在一方面,生物活性部分包含抗原结合部分,其可以与连接至C亚基的抗原结合部分相同或不同。

[0307] 在一方面,抗原结合部分包含抗体或其片段。

[0308] 在一方面,第抗原结合部分包含Fab片段。

- [0309] 在一方面,抗体或其片段包含scFab片段、scFv片段、sdAb片段、VHH域或其组合。
- [0310] 在一方面,抗体或其片段包含Fab片段的重链和/或轻链。
- [0311] 在一方面,N亚基进一步在N亚基的N端或C端,优选地C端处连接至scFc片段。
- [0312] 在一方面,scFc片段衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE,并且优选地是人的。
- [0313] 在一方面,scFc片段衍生自IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。
- [0314] 在一方面,scFc片段是IgG1 scFc片段。
- [0315] 在一方面,scFc片段包含调节融合蛋白的半衰期例如从数分钟或数小时至数天、数周或数月的一个或多个突变或突变组。
- [0316] 在一方面,scFc片段包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号是根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A和/或L234A、L235A和P329G(“LALAP”)、G236R、G237A、A330L或其组合。
- [0317] 在一方面,约3至约100个纳米笼单体,诸如24、32、48或60个单体,或约4至约200个纳米笼单体亚基,诸如4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50或更多个,任选地与一个或多个整个纳米笼单体组合,能够自组装以形成纳米笼。
- [0318] 在一方面,纳米笼单体或其亚基选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、SOR、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。
- [0319] 在一方面,纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白,任选地人脱铁铁蛋白。
- [0320] 在一方面,纳米笼单体或其亚基是脱铁铁蛋白轻链,任选地人脱铁铁蛋白轻链。
- [0321] 在一方面,融合蛋白包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基自组装。
- [0322] 在一方面,第一和第二脱铁铁蛋白单体亚基可互换地包含脱铁铁蛋白的“N”和“C”区。
- [0323] 在一方面,脱铁铁蛋白的“N”区包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:
- [0324] **MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDDDVALEGV
SHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW。**
- [0325] 在一方面,脱铁铁蛋白的“C”区包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:
- [0326] **GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLD
EEVKLIKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD。**
- [0327] 在一方面,scFc片段和/或生物活性部分通过接头连接至纳米笼单体或其亚基。
- [0328] 在一方面,接头是柔性或刚性的,并且包含约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。
- [0329] 在一方面,接头包含GS域。

- [0349] 在一方面,HIV-1特异性Fab结合至BG505 SOSIP D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。
- [0350] 在一方面,HIV-1特异性Fab包含PGDM1400、10E8v4和/或N49P7。
- [0351] 在一方面,纳米笼包含PGDM1400、10E8v4和N49P7。
- [0352] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个抗原结合部分。
- [0353] 在一方面,纳米笼包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个Fc单体。
- [0354] 在一方面,纳米笼携带货物分子,诸如药剂、诊断剂和/或显像剂。
- [0355] 在一方面,货物分子不融合至融合蛋白并且内部地包含在纳米笼中,或其中货物分子连接至融合蛋白或内部地或外部地结合至纳米笼。
- [0356] 在一方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子内部地包含在纳米笼中。
- [0357] 在一方面,货物分子包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。
- [0358] 在一方面,纳米笼展示出出泛病毒中和广度。
- [0359] 在一方面,纳米笼展示出小于约0.1 μ g/mL,诸如小于约0.01 μ g/mL,例如小于约0.001 μ g/mL的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。
- [0360] 在一方面,纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,例如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。
- [0361] 在一方面,纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。
- [0362] 根据一方面,提供了包含本文描述的纳米笼的治疗性或防治性的组合物。
- [0363] 在一方面,组合物用于治疗 and/或预防抗体可预防的和/或抗体可治疗的病况。
- [0364] 在一方面,抗原与感染原相关,该感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫性疾病的免疫疾病。
- [0365] 在一方面,组合物用于治疗 and/或预防HIV-1。
- [0366] 根据一方面,提供了编码本文描述的融合蛋白的核酸分子。
- [0367] 根据一方面,提供了包含本文描述的核酸分子的载体。
- [0368] 根据一方面,提供了包含本文描述的载体并产生本文描述的融合蛋白的宿主细胞。
- [0369] 根据一方面,提供了用于治疗 and/或预防病况的方法,该方法包括施用本文描述的纳米笼或组合物。
- [0370] 在一方面,该病况是HIV-1。
- [0371] 根据一方面,提供了本文描述的纳米笼或组合物用于治疗 and/或预防病况的用途。
- [0372] 在一方面,该病况是HIV-1。

[0373] 在一方面,该用途是用于治疗 and/或预防病况。

[0374] 在一方面,该病况是HIV-1。

[0375] 在审查本发明的以下详细描述后,本发明的新颖特征对于本领域技术人员来说将变得显而易见。然而,应当理解,本发明的详细描述和所呈现的具体实施例虽然指示本发明的某些方面,但仅出于说明目的而提供,因为根据本发明的详细描述和随后的权利要求,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0376] 附图简述

[0377] 本发明将从以下参考附图的描述中得到进一步理解,其中:

[0378] 图1HIV-1bNAb多聚化驱动中和作用效力中的提高。(a) 脱铁铁蛋白(24个亚基)和(b) 单链Fab-脱铁铁蛋白融合物的自组装的示意图。Fab轻链(LC)和重链(HC)分别以浅粉色和深粉色显示,并通过GGs样柔性接头(深色)连接至人脱铁铁蛋白轻链(灰色)的N端。(c) 人脱铁铁蛋白上展示的不同Fab密度的示意性表示。scFab-人脱铁铁蛋白编码质粒连同未缀合脱铁铁蛋白以1:4(深黄色)、1:1(黑色)、4:1(蓝色)和1:0(红色)的比率的共转染导致具有不同的scFab价(valency)的分子,如通过尺寸排阻层析和SDS-PAGE中较早的洗脱体积和较少的未缀合脱铁铁蛋白所证实的。显示了具有最低和最高价的样品的负染色电子显微照片。(d) 五种bNAb针对五PsV组(PV0.04、JRCSF、BG505 T332N、THRO4156.18和t278-50)的中和作用的亲合力效应。由于中和作用抗性,在以下情况中省略IC₅₀倍数增加分析:N49P7-t278-50、VRC01-T278-50和10-1074-THRO4156.18。效力倍数增加计算为亲本IgG IC₅₀(μg/mL)除以Fab-脱铁铁蛋白融合物IC₅₀(μg/mL)。条(±SD)代表来自n=3个生物学独立样品的平均值。

[0379] 图2scFab-脱铁铁蛋白融合物的表征。(a) 使用ImageJ软件(rsb.info.nih.gov/ij/),通过光密度法定量对应于scFab-脱铁铁蛋白和未缀合脱铁铁蛋白的SDS-PAGE条带。(b) 显示了每个泳道(黄色框)中的条带的强度图。(c) 颗粒上展示的scFab的近似数计算如下:scFab条带的强度/总强度,并与从用于共转染的DNA比率推断的理论数比较。

[0380] 图3 32-N Multabody的设计、组装和生物物理表征。(a) 有利于scFab-人脱铁铁蛋白亚基的异二聚化的人脱铁铁蛋白分割设计的示意图。基于驱动自组装的必需异寡聚化,具有四种组分的Multabody的纯化可以通过两步纯化来实现:蛋白A(Fc结合)和蛋白L(PGDM1400结合)。(b) 32-N的负染色电子显微照片。(c) 24-mer PGDM1400(黑色)与32-N Multabody(深洋红色)的尺寸排阻层析串联多角度光散射一致的。每个洗脱峰的摩尔质量(UV吸光度下的线)显示样品是单分散的,并且由于该设计中的额外抗体片段,Multabody的尺寸比24-mer形式更大。(d) 对32-N、12-mer multabody和亲本IgG的T_m和T_{agg}温度的比较。(e) 32-N Multabody与多个表位的结合的浓度响应曲线。在HIV Env(灰色)的表面表示中,PGDM1400、N49P7和10E8v4结合位点分别以红色、蓝色和粉色着色。通过测量在pH 7.5和pH 5.6下的结合测试Fc与人FcRn的功能性结合。BG505 SOSIP.664_D368R三聚体和93TH057 gp120单体分别被选为PGDM1400和N49P7的表位特异性配体。

[0381] 图4bNAb PGDM1400、10E8v4和N49P7的结合概况。IgG与固定化在Ni-NTA生物传感器上的93TH057 gp120、BG505 SOSIP.664_D368R和MPER His标签化抗原的结合的BLI响应曲线。

[0382] 图5 32-N multabody针对14假病毒组的中和作用特性。(a) 32-N Multabody(红色

菱形)、亲本bNAb(黑色圆圈)和IgG组合(蓝色三角形)的广度和中位 IC_{50} 值($\mu\text{g/mL}$)。IgG混合物含有如在Multabody样品中的亲本抗体中的每一种(即PGDM1400、N497和10E8v4)。14PsV组基于对亲本IgG的易感性和抗性进行选择。(b) 每种PsV变体的 IC_{50} 值($\mu\text{g/mL}$)。

[0383] 图6第二代Multabody版本2(MB.v2;参见图6的底部)的示意性表示。在分割Multabody设计中,单链Fc区(绿色)融合至脱铁铁蛋白的第二半部的C端。相对于先前版本(MB.v1;参见图6的顶部)中采用的方向,此修改反转Multabody中Fc的方向。

[0384] 图7第二代Multabody版本3(MB.v3)的示意图。(a) 融合至脱铁铁蛋白原聚体的C端(具体地铁蛋白的C半部)的单链Fc区(绿色)恢复到单体Fc链。(b) 功能性Fc片段的折叠由在去铁铁蛋白纳米笼的4重对称轴处融合至两个独立铁蛋白亚基的C端的两条Fc链的同二聚化产生。

[0385] 图8优化的Multabody版本的表征。(a) 32-N MB.v2和32-N MB.v3的负染色电子显微照片。对三个不同版本的 T_{agg} 温度(b),以及在温度应力条件下随时间变化的稳定性(c)的比较。功能性中和作用测定以评估加速热稳定性测定之前和之后的活性Multabody。结合至多个表位(d)和Fc受体(e-f)的浓度响应曲线。具有Fc半衰期延长突变LS的32-N MB.v3并入测定中。

[0386] 图9 32-N Multabody版本2和3的中和作用特性。(a) 32-N Multabody版本(不同深浅的红色菱形)和IgG混合物(蓝色三角形)针对其中44%的PsV变体对PGDM1400中和作用具有抗性的25PsV组的广度和中位 IC_{50} 值($\mu\text{g/mL}$)比较。显示了对每种PsV的 IC_{50} 值($\mu\text{g/mL}$)。(b) 以克和摩尔量比较三种32-N Multabody版本以及亲本IgG和IgG混合物针对118种PsV的扩展多进化枝组的效力-广度曲线。

[0387] 图10 32-N Multabody v3在免疫缺陷小鼠中的体内暴露。皮下施用5mg/kg的具有Fc修饰的(LS突变)的32-N MB.v3和亲本IgG混合物后,使用每组三只雌性NOD/Shi-scid/IL-2R γ null免疫缺陷小鼠品系(NCG)小鼠以评估血液中的Multabody循环,以进行比较。

[0388] 某些方面的详细描述

[0389] 本文描述的是由多个自组装性纳米笼单体形成的纳米笼平台。这些被称为“Multabody”平台并允许调节纳米笼的结合和药代动力学的特征,例如,通过控制在纳米笼内融合分子的数量或比率。

[0390] 纳米笼的每个单体可以按原样独立表达或可以与另一部分融合,诸如scFc片段或Fc单体。生物活性部分,诸如抗体或其片段,诸如Fab片段,还可以融合至单体中的一个或多个或所有,以产生多价的和/或多特异性的纳米笼。此外,每个单体可以独立地分裂成亚基,使得每个亚基包含约一半的单体,从而为scFc片段、Fc单体和/或生物活性部分提供额外的水平或控制和展示源。

[0391] 在此,证明了Multabody平台上的HIV-1靶向性Fab的多聚化与Fc单体或scFc片段组合导致显著更大的中和HIV-1病毒的能力。如本文所证明的,Multabody的增加效力和泛中和能力不是简单地以1:1比率增加,其中价的加倍导致效力的加倍。相反,在某些方面,效力协同地增加了至少10倍,并且在某些方面更多。这种工程化分子的治疗潜力使用含有44%的对导致MB效力的Fab特异性具有抗性的PsV变体的25PsV组并且针对118种PsV的扩展多进化枝组得到证明。

[0392] 定义

[0393] 除非另外解释,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与由本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。分子生物学中常见术语的定义可以在例如 Benjamin Lewin, *Genes V*, 由 Oxford University Press 出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (编), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由 Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (编), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8) 中找到。尽管与本文描述的方法和材料相似或等同的任何方法和材料可以用于本发明的测试的实践中,但是本文描述了典型的材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0394] 还应理解,本文所使用的术语仅是为了描述特定方面的目的,而不是旨在是限制性的。本文引用了许多专利申请、专利和出版物以协助理解所描述的方面。这些参考文献中的每一篇均通过引用以其整体并入本文。

[0395] 在理解本申请的范围时,冠词“一”、“一个”、“该”和“所述”旨在意指存在元素的一个或多个。另外,如本文所用,术语“包含”及其派生词旨在是开放式术语,其明确陈述的特征、元素、组分、组、整体和/或步骤的存在,但不排除其他未陈述的特征、元素、组分、组、整体和/或步骤的存在。前述内容也适用于具有相似含义的词语,诸如术语“包括”、“具有”及其派生词。

[0396] 将理解,描述为“包括”某些组分的任何方面也可以“由……组成”或“基本上由……组成”,其中“由……组成”具有封闭式或限制性含义,并且“基本上由……组成”意指包括这些组分特定的但排除其他组分,除了作为杂质存在的材料、由于用于提供该组分的过程而存在的不可避免的材料以及为了实现本发明的技术效果以外的目的而添加的组分。例如,使用短语“基本上由……组成”定义的组合物涵盖任何已知的可接受的添加剂、赋形剂、稀释剂、载剂,等等。典型地,基本上由一组组分组成的组合物将包含小于5重量%、典型地小于3重量%、更典型地小于1%且甚至更典型地小于0.1重量%的非指定组分。

[0397] 将理解,本文定义为包括的任何组分可以通过但书或否定限制的方式明确地从要求保护的发明中排除。例如,在一些方面,本文所描述的纳米笼和/或融合蛋白可以排除铁蛋白重链和/或可以排除铁结合组分。

[0398] 另外,本文给出的所有范围包括范围的端点以及任何中间范围点,无论是否明确陈述。

[0399] 如本文所用,诸如“基本上”、“约”和“大约”的程度术语意指修饰的术语的合理偏差量,使得最终结果不会显著改变。如果该偏差不会否定其所修饰的单词的含义,则这些程度术语应解释为包括所修饰术语的至少 $\pm 5\%$ 的偏差。

[0400] 缩写“例如(e.g.)”衍生自拉丁语例如(exempli gratia),并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”或“诸如”同义。词语“或”旨在包括“和”,除非上下文另有明确说明。

[0401] 如本文所用,术语“受试者”指动物界的任何成员,典型地哺乳动物。术语“哺乳动物”指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、其他高等灵长类、家养动物和农场动物以及动物园动物、运动动物或宠物动物,诸如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。典型地,哺乳动物是人。

[0402] 术语“蛋白质纳米颗粒”、“纳米笼”和“Multabody”在本文中可互换地使用,并且指的是由多个纳米笼单体制成的基于蛋白质的多面体形状的结构。这些纳米笼单体或其亚基各自由蛋白质或多肽(例如糖基化多肽)构成以及任选地由以下的单个或多个特征构成:核酸、辅基(prosthetic group)、有机化合物和无机化合物。蛋白质纳米颗粒的非限制性实例包括铁蛋白纳米颗粒(参见,例如,Zhang, Y. *Int. J. Mol. Sci.*, 12:5406-5421, 2011, 通过引用并入本文)、encapsulin纳米颗粒(参见,例如, Sutter et al., *Nature Struct. and Mol. Biol.*, 15:939-947, 2008, 通过引用并入本文)、硫氧化还原酶(Sulfur Oxygenase Reductase, SOR)纳米颗粒(参见,例如, Urich et al., *Science*, 311:996-1000, 2006, 通过引用并入本文)、二氧四氢蝶啶合酶纳米颗粒(参见,例如, Zhang et al., *J. Mol. Biol.*, 306:1099-1114, 2001)或丙酮酸脱氢酶纳米颗粒(参见,例如, Izard et al., *PNAS* 96:1240-1245, 1999, 通过引用并入本文)。铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、SOR、二氧四氢蝶啶合酶和丙酮酸脱氢酶是自组装成球状蛋白复合物的单体蛋白,该复合物在某些情况下分别由24、60、24、60和60个蛋白亚基组成。铁蛋白和脱铁铁蛋白在本文中通常可互换地提及,并且应理解为两者均适合用于本文所描述的融合蛋白、纳米笼和方法中。羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P和MS2外壳蛋白也产生纳米笼,它们预期用于本文。此外,完全或部分合成的自组装性单体也预期用于本文。

[0403] 将理解,每个纳米笼单体可以分成两个或更多个将自组装成功能性纳米笼单体的亚基。例如,铁蛋白或脱铁铁蛋白可以分成N亚基和C亚基,例如,通过将全长铁蛋白基本上分成两半而获得的N亚基和C亚基,使得每个亚基可以分别结合至不同的scFc片段或Fc单体或生物活性部分(例如Fab片段),用于随后自组装成纳米笼单体和纳米笼。在一些方面,每个亚基可以在两端处连接至相同或不同的scFc和/或Fc单体和/或生物活性部分。所谓“功能性纳米笼单体或其亚基”意指纳米笼单体或其亚基能够与互补的单体或亚基自组装成如本文所描述的纳米笼。

[0404] 术语“铁蛋白”和“脱铁铁蛋白”在本文中可互换地使用,并且通常指能够组装成典型地包含24个蛋白质亚基的铁蛋白复合物的多肽(例如,铁蛋白链)。将理解,铁蛋白可以来自任何物种。典型地,铁蛋白是人铁蛋白。在一些实施方案中,铁蛋白是野生型铁蛋白。例如,铁蛋白可以是野生型人铁蛋白。在一些实施方案中,铁蛋白轻链用作纳米笼单体,和/或铁蛋白轻链的亚基用作纳米笼单体亚基。在一些实施方案中,组装的纳米笼不包括任何铁蛋白重链或能够与铁结合的其他铁蛋白组分。

[0405] 如本文所用,术语“多特异性”指具有至少两个结合位点的特征,在该结合位点处至少两个不同的结合配偶体(binding partner)例如抗原或受体(例如Fc受体)可以结合。例如,包含至少两个Fab片段的纳米笼是“多特异性的”,其中两个Fab片段的每一个结合至不同的抗原。作为额外的实例,包含Fc片段(其能够与Fc受体结合)和Fab片段(其能够与抗原结合)的纳米笼是“多特异性的”。

[0406] 如本文所用,术语“多价”指具有至少两个结合位点的特征,在该结合位点处结合配偶体例如抗原或受体(例如Fc受体)可以结合。可以结合到至少两个结合位点的结合配偶体可以是相同或不同的。

[0407] 本文使用的术语“抗体”,在本领域中也称为“免疫球蛋白”(Ig),是指由成对的重链和轻链多肽构建的蛋白质;存在多种Ig同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG(诸如IgG₁、IgG₂、

IgG₃、和IgG₄)和IgM。将理解,抗体可以来自任何物种,包括人、小鼠、大鼠、猴、美洲驼或鲨鱼。当抗体正确折叠时,每条链折叠成由更多的线性多肽序列连接的许多不同的球状域。例如,在IgG的情况下,免疫球蛋白轻链折叠成可变(V_L)和恒定(C_L)域,而重链折叠成可变(V_H)和三个恒定(C_{H1}、C_{H2}、C_{H3})域。重链可变域和轻链可变域(V_H和V_L)的相互作用导致抗原结合区(Fv)的形成。每个域具有本领域技术人员所熟悉的完善建立的结构。

[0408] 轻链和重链可变区负责结合靶抗原,并且因此可以在抗体之间显示出显著的序列多样性。恒定区显示出较少的序列多样性,并负责结合许多天然蛋白质以引发重要的免疫事件。抗体的可变区包含分子的抗原结合决定簇,并且因此决定抗体对其靶抗原的特异性。大多数的序列可变性发生在六个高变区,每个可变重链和可变轻链各三个;高变区组合以形成抗原结合位点,并有助于抗原决定簇的结合和识别。抗体对其抗原的特异性和亲和力由高变区的结构以及它们的其呈现给抗原的表面的大小、形状和化学性质决定。

[0409] 本文所提及的“抗体片段”可以包括本领域已知的任何适合的抗原结合抗体片段。抗体片段可以是天然存在的抗体片段,或者可以通过操作天然存在的抗体或通过使用重组方法获得。例如,抗体片段可以包括但不限于Fv、单链Fv(scFv;由与肽接头连接的V_L和V_H组成的分子)、Fc、单链Fc(例如,包含例如经由接头(诸如氨基酸接头)连接在一起的两个Fc单体的多肽)、Fc单体(例如,包含恰好一个CH2域和恰好一个CH3结构域的单Fc链,其典型地能够与另一个Fc单体二聚化)、Fab、单链Fab、F(ab')₂、单域抗体(sdAb;由单个V_L或V_H构成的片段),和这些中的任一者的多价呈现。如本文所用,“抗原结合部分”指特异性结合至靶抗原的抗体或抗体的一部分。

[0410] 如本文所用,所谓术语“合成抗体”意指使用重组DNA技术生成的抗体。该术语还应解释为意指已通过合成编码该抗体的DNA分子生成的抗体,并且该DNA分子表达抗体蛋白或指定该抗体的氨基酸序列,其中该DNA或氨基酸序列已使用本领域可获得且众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0411] 如本文所用,短语“抗体可预防的”和“抗体可治疗的”病况通常指已知与至少一种抗原的表达或存在相关联的病况。例如,在感染性疾病的上下文中,抗原可以是感染性疾病病原体上的抗原,抗原可以由感染的细胞表达,和/或抗原可以由参与对感染的免疫应答的细胞表达。“抗体可预防的病况”通常是其中抗体可以用于防止病况免于确立的那些病症。“抗体可治疗的病况”通常是其中抗体可以用于治疗确立的病况的那些病症。

[0412] 术语“表位”指抗原决定簇。表位是分子上的特定化学基团或肽序列,其是抗原性的,即,其引发特异性免疫应答。抗体特异性地结合例如多肽上的特定的抗原表位。表位可以由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位典型地在变性溶剂的暴露时保留,而由三级折叠形成的表位典型地在用变性溶剂处理时丢失。表位典型地以独特的空间构象包含至少3个、更通常至少5个、约9个、约11个或约8至12个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如X射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如,“Epitope Mapping Protocols” in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, 编(1996)。

[0413] 如本文所用,术语“抗原”定义为激发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生,或特定的免疫活性细胞(immunologically-competent)的激活,或两者。技术人员将理解,任何大分子,包括几乎所有蛋白质或肽,可以充当抗原。此外,抗原可以衍生自重组

DNA或基因组DNA。技术人员将理解,任何DNA,包括编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列,因此编码如本文所用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本文描述的方面包括但不限于使用多于一种基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列可以以各种组合排列以引发期望的免疫应答。此外,技术人员将理解,抗原不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以从生物样品合成或可以衍生自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、细胞或生物流体。

[0414] “编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中的特定核苷酸序列的固有特性,以充当生物过程中其他聚合物和大分子合成的模板,该其他聚合物和大分子具有定义的核苷酸(例如,rRNA、tRNA和mRNA)序列或定义的氨基酸序列和由此产生的生物学特性。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)都可以称为编码蛋白质或该基因或cDNA的其他产物。

[0415] 如本文所用,术语“表达”定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0416] 如本文所用,短语“HIV-1相关病况”是指HIV-1感染的病况(包括原发感染、潜伏感染)和/或由HIV-1感染导致的病况(例如获得性免疫缺陷综合征)。

[0417] “分离的”是指从天然状态改变或脱离。例如,天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于诸如例如宿主细胞的非天然的环境中。

[0418] 除非另有说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度是编码蛋白质的核苷酸序列可以以一些形式含有内含子。

[0419] 如本文所用,所谓术语“调节”意指与不存在治疗或化合物的受试者中的应答水平相比,和/或与其他方面相同但未经治疗的受试者中的应答水平相比,介导在受试者中应答的水平的可检测的增加或减少。该术语涵盖扰乱和/或影响天然的信号或应答,从而在受试者(典型地,人)中介导有益的治疗性应答。

[0420] 术语“可操作地连接”指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接,这导致后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系中时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。举例来说,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么启动子可操作地连接至编码序列。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在需要接合两个蛋白质编码区处,在相同的阅读框中。

[0421] 组合物的“胃肠外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。还包括吸入和鼻内施用。

[0422] 如本文所用,术语“多核苷酸”定义为核苷酸的链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,如本文所用,核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是多核苷酸的一般知识,该多核苷酸可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文所用,多核苷酸包括但不限于通过本领域中可用的任何手段获得的所有核酸序列,包括但不限于

重组手段,即使用普通克隆技术和PCR等从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列,以及通过合成手段。

[0423] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用,并且是指包含通过肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可以包含蛋白质的或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语指短链和较长链两者,短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物,较长链在本领域中通常称为蛋白质,其中存在很多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0424] 如本文所用,关于抗体的所谓术语“特异性结合”意指识别特定抗原但基本上不识别或结合样品中的其他分子的抗体。例如,特异性结合至来自一个物种的抗原的抗体也可以结合至来自一个或多个物种的该抗原。但是,此类交叉物种反应性本身并不改变抗体作为特异性的分类。在另一个实例中,特异性结合至抗原的抗体也可以结合至该抗原的不同等位基因形式。然而,此类交叉反应性本身并不改变抗体作为特异性的分类。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以用于指抗体、蛋白质或肽与第二化学种类的相互作用,意指该相互作用取决于化学种类上特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合至特定的蛋白质结构,而不是普遍地至蛋白质。如果抗体对表位“A”是特异性的,则在含有标记的“A”和抗体的反应物中,含有表位A(或游离的、未标记的A)的分子的存在将减少结合至抗体的标记的A的量。

[0425] 如本文所用,“治疗”病况(例如,本文描述的病况诸如HIV-1)或病况的“治疗”是用于获得有益的或期望的结果(诸如临床结果)的方法。有益的或期望的结果可以包括但不限于一种或多种症状或病况的减轻或改善;疾病、病症或病况的程度的减弱;疾病、病症或病况的稳定(即不恶化)状态;预防疾病、病症或病况的散播;延迟或减缓疾病、病症或病况的进展;疾病、病症或病况的改善或缓和;以及无论是可检测到的还是不可检测到的缓解(无论是部分缓解还是全部缓解)。“缓和”疾病、病症或病况意指与不存在治疗的程度或时间进程相比,疾病、病症或病况的程度和/或不期望的临床表现减少和/或进展的时间进程减缓或延长。如本文所用,术语“预防(prevention)”或“防治(prophylaxis)”指获得或发展疾病或病症(例如HIV-1)的风险的降低,或疾病或病症(例如HIV-1)的复发的降低或抑制。因此,HIV-1治疗性或防治性组合物是指包含如本文描述的组装的纳米笼或如本文描述的能够组装成纳米笼的融合蛋白的组合物,当施用给受试者时,其能够治疗和/或预防HIV-1。

[0426] 术语“治疗有效量”、“有效量”或“足够量”是指当施用给受试者(包括哺乳动物,例如人)时,足以实现期望的结果的量,例如有效引起导致细胞死亡的量。本文描述的化合物的有效量可以根据诸如分子、受试者的年龄、性别、物种和体重等因素而变化。如技术人员所理解的,可以调整剂量或治疗方案以提供最优治疗响应。例如,在一些方面,本文描述的融合蛋白的治疗有效量的施用足以治疗和/或预防HIV-1。此外,使用治疗有效量的受试者的治疗方案可以由单次施用组成,或者替代性地包括一系列应用。治疗期的频率和长度取决于多种因素,诸如分子、受试者的年龄、药剂的浓度、患者对药剂的响应性或其组合。还将理解,用于治疗的药剂的有效剂量在特定治疗方案的进程中可以增加或减少。剂量的变化

可以通过本领域已知的标准诊断测定产生并且变得显而易见。在一些方面,本文描述的融合蛋白可以在用常规疗法治疗所讨论的疾病或病症之前、期间或之后施用。例如,本文描述的融合蛋白可以发现与HIV-1的常规治疗组合的特定用途。

[0427] 如本文所用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”指通过其将外源性核酸转移或引入到宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代主题细胞及其后代。

[0428] 如本文所用,短语“在转录控制下”或“可操作地连接”意指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制通过RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0429] “载体”是包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质的组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子化合物或两性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应当解释为包括促进核酸至细胞中的转移的非质粒和非病毒化合物,诸如,例如聚赖氨酸化合物、脂质体,等等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体,等等。

[0430] 与一种或多种进一步的治疗剂“组合”施用包括同时(并行)和以任何顺序连续施用。

[0431] 术语“药学上可接受的”意指化合物或化合物的组合与用于药物用途的配制剂的其余成分是相容的,并且根据已建立的政府标准(包括由美国食品和药物管理局颁布的标准),其对于施用于人通常是安全的。

[0432] 术语“药学上可接受的载剂”包括但不限于溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂、抗真菌剂、等渗剂和/或吸收延迟剂等等。药学上可接受的载剂的使用是众所周知的。

[0433] “变体”是生物活性融合蛋白、抗体或其片段,其由于比较序列内一个或多个氨基酸残基的插入、缺失、修饰和/或取代而具有不同于比较序列的氨基酸序列。变体通常与比较序列具有小于100%的序列同一性。然而,通常生物活性变体将具有与比较序列具有至少约70%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,诸如至少约71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。变体包括至少10个氨基酸的肽片段,其保留一定水平的比较序列的生物活性。变体还包括多肽,其中在比较序列的N端或C端处或内部添加一个或多个氨基酸残基。变体还包括多肽,其中许多氨基酸残基缺失和/或任选地由一个或多个氨基酸残基取代。变体还可以共价地修饰,例如通过用不同于天然存在的氨基酸的部分取代或通过修饰氨基酸残基以产生非天然存在的氨基酸。

[0434] “百分比氨基酸序列同一性”在本文中定义为在对齐序列并引入空位(gap)(如果需要)以获得最大百分比序列同一性并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的部分之后,候选序列中与感兴趣的序列(诸如本发明的多肽)中的残基相同的氨基酸残基的百分比。候选序列中的N端、C端或内部延伸、缺失或插入均不应解释为影响序列同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序是本领域众所周知的,诸如“BLAST”。

[0435] 用于本文目的的“活性的”或“活性”指本文描述的融合蛋白的生物学和/或免疫学活性,其中“生物学”活性指由融合蛋白引起的生物学功能(或是抑制的或是刺激的)。

[0436] 本文描述的融合蛋白可以包含修饰。此类修饰包括但不限于与效应分子的缀合。

修饰进一步包括但不限于与可检测的报告部分的缀合。还包括延长半衰期的修饰(例如聚乙二醇化)。还包括用于去免疫化的修饰。蛋白质和非蛋白质剂可以通过本领域已知的方法缀合至融合蛋白。缀合方法包括直接连接、通过共价附接的接头和特异性结合对成员(例如抗生物素蛋白-生物素)的连接。此类方法包括例如由Greenfield et al., Cancer Research 50,6600-6607(1990)(其通过引用并入本文)描述的方法,以及由Amon et al., Adv.Exp.Med.Biol.303,79-90(1991)和由Kiseleva et al., Mol.Biol. (USSR) 25,508-514(1991)(这两者通过引用并入本文)描述的那些方法。

[0437] 包含Fc单体的融合蛋白

[0438] 本文描述的是融合蛋白。在一些方面,融合蛋白包含连接至Fc单体的纳米笼单体或其亚基,其中多个融合蛋白自组装以形成包含一个或多个Fc二聚体的纳米笼。以这种方式,组装的一种或多种Fc二聚体可以装饰组装的纳米笼的内表面、组装的纳米笼的外表面或两者。在一些实施方案中,组装的一种或多种Fc二聚体装饰组装的纳米笼的外表面。通过将Fc二聚体分成单体组分,在纳米笼设计中提供额外的控制。Fc单体将有助于组装纳米笼以及其他连接组分诸如生物活性部分的比率的更严格控制。

[0439] 在一些方面,纳米笼单体亚基而不是完整的纳米笼单体用于融合蛋白。纳米笼单体可以分成两部分,其中之一包含纳米笼单体的N端末端,称为“N亚基”,并且其中另一个包含纳米笼单体的C端末端,称为“C亚基”。N亚基或C亚基可以各自基本上代表纳米笼单体的一半,或者它们可以不平均地划分。典型地,N亚基和C亚基分别基本上对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部。N亚基和C亚基能够自组装以形成本身能够自组装形成如上所述的纳米笼的纳米笼单体。

[0440] 将理解,每个纳米笼单体以及每个N亚基和C亚基包含N端和C端。Fc单体可以在任一端或两端处连接至纳米笼单体或其亚基。典型地,Fc单体在C端处连接至纳米笼单体或其亚基。同样,Fc单体可以连接至N亚基和/或C亚基的任一端或两端。典型地,Fc单体在C端处连接至C亚基。

[0441] 在典型的方面,纳米笼单体或其亚基进一步连接至生物活性部分。与Fc单体一样,生物活性部分可以在纳米笼单体或其亚基的N端或C端处连接至纳米笼单体或其亚基,并且典型地在N端处连接。当使用纳米笼单体亚基时,生物活性部分同样可以在任一端处、典型地在与Fc单体相对的端处连接至N亚基或C亚基。典型地,生物活性部分在C端处连接至C亚基。

[0442] 抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基,使得其装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,典型地其装饰组装的纳米笼的外表面。

[0443] 生物活性部分典型地是特异性结合至抗原靶标的抗体或其片段。将理解,抗体或其片段可以包含例如Fab片段的重链和/或轻链或由例如Fab片段的重链和/或轻链组成。抗体或其片段可以包含例如Fab(例如scFab)片段、scFv片段、sdAb片段和/或VHH区或由例如Fab(例如scFab)片段、scFv片段、sdAb片段和/或VHH区组成。在一些实施方案中,生物活性部分不包含任何CH2域或CH3域。将理解,任何抗体或其片段可以用于本文描述的融合蛋白。

[0444] 通常,本文描述的融合蛋白与Fab轻链和/或重链缔合,其可以与融合蛋白分开地或连续地产生。

[0445] 在典型的方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的

疾病相关联的抗原。例如,抗原可以与感染原相关,感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫疾病的免疫疾病。

[0446] 在示例性的方面,抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。例如,HIV-1特异性抗原结合部分可以结合至BG505 SOSIP_D368R、93TH057 gp120和/或MPER肽。在具体实例中,HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的抗原结合部分。

[0447] 在某些方面,本文描述的纳米笼单体包含连接至Fc单体或至生物活性部分(例如Fab片段)的N亚基或C亚基。N亚基或C亚基能够与互补的C亚基或N亚基自组装以形成完整的纳米笼单体,多个纳米笼单体自组装以形成纳米笼,因此允许多个Fc单体和/或其他部分自组装成一个纳米笼。每种不同组分的量通过控制基因和表达比率来控制。这些纳米笼单体亚基可以单独或组合使用。

[0448] 例如,Fc单体或生物活性部分(例如Fab片段)可以连接至分开的脱铁铁蛋白单体(N亚基或C亚基,其各自典型地是全长脱铁铁蛋白单体的约一半)。融合至Fc单体或生物活性部分(例如Fab片段)的每个亚基自组装成脱铁铁蛋白单体,其进而与其他脱铁铁蛋白单体(完整的脱铁铁蛋白或由N亚基和C亚基形成的组装的脱铁铁蛋白)自组装以形成纳米笼。

[0449] 当使用全长纳米笼单体时,纳米笼单体典型地包含在纳米笼单体的C端处连接的Fc单体和在纳米笼单体的N端处连接的生物活性部分。当使用纳米笼单体亚基时,该亚基典型地包含在该亚基的C端处连接的Fc单体和在该亚基N端处连接的生物活性部分。典型地,C亚基用于本文描述的融合蛋白,具有在C亚基的C端处连接的Fc单体以及在C亚基的N端处连接生物活性部分。

[0450] 在一些方面,本文描述的N亚基或C亚基与互补的C亚基或N亚基(其与该N亚基或C亚基能够自组装)组合提供。互补的C亚基或N亚基可以是也可以不是融合蛋白。在一些方面,互补的C亚基或N亚基在N端或C端(典型地N端)处连接至生物活性部分。生物活性部分可以是,例如抗原结合部分诸如Fab片段,其可以与连接至N亚基或C亚基的任何生物活性部分或抗原结合部分相同或不同。互补的C亚基或N亚基可以在其N端或C端(典型地C端)处连接至Fc单体。将理解,典型地,Fc单体融合至铁蛋白的C亚基的C端,以便利用纳米笼的4重轴并由此与另一半相遇。

[0451] 例如,在一些方面,融合蛋白包含在C端处连接至Fc单体的和在N端处连接至Fab片段的C亚基。在使用中,C亚基与在N亚基的N端处连接至Fab片段的N亚基自组装以形成纳米笼单体,该Fab片段可以与连接至C亚基的Fab片段相同或不同。如上所描述,多个纳米笼单体自组装以形成纳米笼。纳米笼单体亚基可以单独或组合提供,并且可以具有相同或不同的融合至其的生物活性部分。

[0452] Fc单体可以是衍生自任何抗体类型或物种的任何Fc单体。典型地,Fc单体是人的并且衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。例如,Fc单体可以衍生自诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的IgG,诸如IgG1 Fc单体。

[0453] Fc单体可以包含将融合蛋白的半衰期从例如几分钟或几小时调节至几天、几周或几月的一个或多个突变或突变组。例如,Fc单体可以包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A;L234A、L235A和P329G(“LALAP”);G236R;G237A;和/或A330L或其组合。

[0454] 此外,考虑了本文描述的融合蛋白和纳米笼中的其他取代,其包括Fc序列修饰和其他试剂(例如人血清白蛋白、人血清白蛋白肽序列和诸如Fab和/或靶向人血清白蛋白的纳米抗体的抗体)的添加,这允许生物利用度的变化并且将被技术人员所理解。此外,本文描述的融合蛋白和纳米笼可以按顺序调节或通过添加其他剂来减弱免疫原性和抗药物应答(治疗性的,例如将序列与宿主匹配,或添加免疫抑制疗法[诸如,例如当施用英夫利昔单抗用于治疗类风湿性关节炎或诱导新生儿耐受时为甲氨蝶呤,这是减少针对FVIII的抑制剂的发生率的主要策略(综述于:DiMichele DM,Hoots WK,Pipe SW,Rivard GE,Santagostino E.International workshop on immune tolerance induction:consensus recommendations.Haemophilia.2007;13:1-22,通过引用以其整体并入本文)]。

[0455] 如本文所描述,纳米笼单体可以由亚基形成。因此,纳米笼单体亚基可以包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,诸如脱铁铁蛋白N亚基或C亚基,并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基(诸如互补的C亚基或N亚基)自组装。将理解,其他纳米笼单体可以分成与如本文所描述的脱铁铁蛋白非常相似的二分的亚基,使得亚基自组装并且各自适合与生物活性部分融合。

[0456] 脱铁铁蛋白的“N”区典型地包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:

[0457] MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEG VSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:1)。

[0458] 将理解,在描述了单独或作为另一种融合蛋白的组分、完整或部分的脱铁铁蛋白的“N”区的本文任何地方,序列MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:1)可以用SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:15)替换。因此,在一些方面,脱铁铁蛋白的“N”区典型地包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:

SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVS

[0459] HFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW(SEQ ID NO:15)

[0460] 脱铁铁蛋白的“C”区典型地包含与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列或由与以下项至少70%(诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)相同的序列组成:

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL

[0461] DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD(SEQ ID NO:2)。

[0462] 将理解,在描述了单独或作为另一种融合蛋白的组分、完整或部分的脱铁铁蛋白的“N”区的本文任何地方,序列GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD(SEQ ID NO:2)可以用

[0463] GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEE VKLI KKMGDHLTNLHRL GGPEAGLGEYLFERLTLKHD (SEQ ID NO:16) 替换。因此, 在一些方面, 脱铁铁蛋白的“C”区典型地包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLLHALGSARTDPHLCDFLETHFL

[0464] DEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD(SEQ ID NO: 16)

[0465] 在抗体或其片段包含两条链,诸如第一链和第二链,或重链和轻链的情况下,两条链任选地通过接头分开。接头可以是柔性的或刚性的,但其典型地是柔性的以允许链适当地折叠。相似地,Fc单体和/或生物活性部分典型地通过接头连接至纳米笼单体或其亚基。

[0466] 接头通常是足够长的以赋予融合蛋白一些柔性,但是将理解,接头长度将变化,这取决于纳米笼单体或其亚基和Fc单体和生物活性部分序列以及融合蛋白的三维构象。因此,接头典型地为约1至约130个氨基酸残基,诸如约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120或125至约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125或130个氨基酸残基,或约50至约90个氨基酸残基,诸如70个氨基酸残基,或约1至约100个氨基酸残基,诸如约1至约70个氨基酸残基,诸如约1至约30个氨基酸残基,诸如约8至约16个氨基酸残基。

[0467] 接头可以具有任何氨基酸序列,并且在一个典型的实例中,接头包含GS域或一系列G和S氨基酸,诸如一系列GS重复、GGGS重复、GGGS重复和/或GGGS重复。典型地,接头包含GGGS和/或GGGS重复,更典型地,接头包含至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个GGGS和/或GGGS重复,诸如约5个GGGS重复和/或约14个GGGS重复。在具体的方面,接头包含与以下项至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成:

[illegible]

[0468] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 3),

[0469] GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG (SEQ ID NO:4), 或

[0470] GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:5)。

[0471] 在典型的方面,抗体或其片段特异性结合至与HIV-1相关联的抗原。

[0472] 在一些方面,本文描述的融合蛋白包含与以下序列的一个或多个或其组合至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列或由与以下序列的一个或多个或其组合至少70% (诸如至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列组成,其中铁蛋白亚基为粗体并且接头加下划线。当在这些情况的每一种中,显示了完整铁蛋白单体 (MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSH FFRELAEEKREGYERLLKM**QNR**GRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKA AMAL**EKKLNQ**ALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDH LTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD; SEQ ID NO:6), 或显示了N铁蛋白单体或C铁蛋白单体 (在N铁蛋白的情况下MSSQIRQNYSTDVEAAV

[0481] 10E8v4 C铁蛋白 Fc1 (SEQ ID NO:9)

[0482] SELTQDPAVSVALKQTVTITCRGDSLRSHYASWYQKKPGQAPVLLFYG
KNNRPSGIPDRFSGSASGNRASLTITGAQAEDEADYYCSSRDKSGSRLSVF
GGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE
GSTVEKTVAPTECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GSLRLSCSASGFDFDNAWMTWVRQP PGKGLEWVGRITGPGE GWSVDYAE
SVKGRFTISRDN TKNTLYLEMNNVRTEDTGY YFCARTGKY YDFWSGYPPG
EEYFQDWGQGTLVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**GKTPD**
AMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLI
KKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHDGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWOOGNV FSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

[0483] 32-N MB.v3 LS:

[0484] N49P7 N铁蛋白 (SEQ ID NO:7)

[illegible]

[0487] PGDM1400 h铁蛋白 (SEQ ID NO:8)

[0488]

[0489]

[0490]

其亚基的C末端,惊人地观察到改进的效力和中和效率。

[0500] 在一些方面,纳米笼单体亚基而不是完整的纳米笼单体用于融合蛋白。纳米笼单体可以分成两部分,其中之一包含纳米笼单体的N末端,称为“N亚基”,并且其中另一个包含纳米笼单体的C末端,称为“C亚基”。N亚基或C亚基可以各自基本上代表纳米笼单体的一半,或者它们可以不平均地划分。典型地,N亚基和C亚基分别基本上对应于纳米笼单体的N端半部和纳米笼单体的C端半部。N亚基和C亚基能够自组装以形成本身能够自组装形成如上所述的纳米笼的纳米笼单体。

[0501] 将理解,每个纳米笼单体以及每个N亚基和C亚基包含N端和C端。scFc片段可以在任一端或两端处连接至纳米笼单体或其亚基。典型地,scFc片段在C端处连接至纳米笼单体或其亚基。同样,scFc片段可以连接至N亚基和/或C亚基的任一端或两端。典型地,scFc片段在C端处连接至C亚基。

[0502] 在典型的方面,纳米笼单体或其亚基进一步连接至生物活性部分。与scFc片段一样,生物活性部分可以在纳米笼单体或其亚基的N端或C端处连接至纳米笼单体或其亚基,并且典型地在N端处连接。当使用纳米笼单体亚基时,生物活性部分同样可以在任一端处、典型地在与scFc片段相对的端处连接至N亚基或C亚基。典型地,生物活性部分在C端处连接至C亚基。

[0503] 抗原结合部分连接至纳米笼单体或其亚基,使得其装饰组装的纳米笼的内表面和/或外表面,典型地其装饰组装的纳米笼的外表面。

[0504] 生物活性部分典型地是特异性结合至抗原靶标的抗体或其片段。将理解,抗体或其片段可以包含例如Fab片段的重链和/或轻链或由例如Fab片段的重链和/或轻链组成。抗体或其片段可以包含例如Fab (例如scFab) 片段、scFv片段、sdAb片段和/或VHH区或由例如Fab (例如scFab) 片段、scFv片段、sdAb片段和/或VHH区组成。在一些实施方案中,生物活性部分不包含任何CH2域或CH3域。将理解,任何抗体或其片段可以用于本文描述的融合蛋白。

[0505] 通常,本文描述的融合蛋白与Fab轻链和/或重链缔合,其可以与融合蛋白分开地或连续地产生。

[0506] 在典型的方面,抗原结合部分特异性结合至与抗体可预防的和/或抗体可治疗的疾病相关联的抗原。例如,抗原可以与感染原相关,感染原包括病毒、细菌、寄生物、真菌或酵母、癌症或包括自身免疫疾病的免疫疾病。

[0507] 在示例性的方面,抗原结合部分包含HIV-1特异性抗原结合部分。例如,HIV-1特异性抗原结合部分可以结合至BG505 S0SIP_D368R、93TH057gp120和/或MPER肽。在具体实例中,HIV-1特异性抗原结合部分包含来自PGDM1400、10E8v4、和/或N49P7的抗原结合部分。

[0508] 在某些方面,本文描述的纳米笼单体包含连接至scFc片段或至生物活性部分 (例如Fab片段) 的N亚基或C亚基。N亚基或C亚基能够与互补的C亚基或N亚基自组装以形成完整的纳米笼单体,多个纳米笼单体自组装以形成纳米笼,因此允许多个scFc片段和/或其他部分自组装成一个纳米笼。每种不同组分的量通过控制基因和表达比率来控制。这些纳米笼单体亚基可以单独或组合使用。

[0509] 例如,scFc片段或生物活性部分 (例如Fab片段) 可以连接至分开的脱铁铁蛋白单体 (N或C亚基,其各自典型地是全长脱铁铁蛋白单体的约一半)。融合至scFc片段或生物活性部分 (例如Fab片段) 的每个亚基自组装成脱铁铁蛋白单体,脱铁铁蛋白单体相继地与其

他脱铁铁蛋白单体(完整的脱铁铁蛋白或由N亚基和C亚基形成的组装的脱铁铁蛋白)自组装以形成纳米笼。

[0510] 当使用全长纳米笼单体时,纳米笼单体典型地包含在纳米笼单体的C端处连接的scFc片段和在纳米笼单体的N端处连接的生物活性部分。当使用纳米笼单体亚基时,该亚基典型地包含在该亚基的C端处连接的scFc片段和在该亚基N端处连接的生物活性部分。典型地,C亚基用于本文描述的融合蛋白,具有在C亚基的C端处连接的scFc片段以及在C亚基的N端处连接生物活性部分。

[0511] 在一些方面,本文描述的N亚基或C亚基与互补的C亚基或N亚基(其与该N亚基或C亚基能够自组装)组合提供。互补的C亚基或N亚基可以是也可以不是融合蛋白。在一些方面,互补的C亚基或N亚基在N端或C端(典型地N端)处连接至生物活性部分。例如,生物活性部分可以是,例如抗原结合部分诸如Fab片段,其可以与连接至N亚基或C亚基的任何生物活性部分或抗原结合部分相同或不同。互补的C亚基或N亚基可以在其N端或C端(典型地C端)处连接至scFc片段。

[0512] 例如,在一些方面,融合蛋白包含在C端处连接至scFc片段的和在N端处连接至Fab片段的C亚基。在使用中,C亚基与在N亚基的N端处连接至Fab片段的N亚基自组装以形成纳米笼单体,该Fab片段可以与连接至C亚基的Fab片段相同或不同。如上所描述,多个纳米笼单体自组装以形成纳米笼。纳米笼单体亚基可以单独或组合提供,并且可以具有相同或不同的融合至其的生物活性部分。

[0513] scFc片段可以是衍生自任何抗体类型或物种的任何scFc片段。典型地,scFc片段是人的并且衍生自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE。例如,scFc片段可以衍生自诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的IgG,诸如IgG1 scFc片段。

[0514] scFc片段可以包含将融合蛋白的半衰期从例如几分钟或几小时调节至几天、几周或几月的一个或多个突变或突变组。例如,scFc片段可以包含在L234、L235、G236、G237、M252、I253、S254、T256、P329、A330、M428、N434或其组合(其中编号根据EU索引)的一个或多个处的突变,诸如M428L和N434S(“LS”);M252Y、S254T和T256E(“YTE”);L234A和L235A(“LALA”);I253A;L234A、L235A和P329G(“LALAP”);G236R;G237A;和/或A330L或其组合。

[0515] 此外,考虑了本文描述的融合蛋白和纳米笼中的其他取代,其包括Fc序列修饰和其他试剂(例如人血清白蛋白、人血清白蛋白肽序列和诸如Fab和/或靶向人血清白蛋白的纳米抗体的抗体)的添加,这允许生物利用度中的改变并且将被技术人员所理解。此外,本文描述的融合蛋白和纳米笼可以按顺序调节或通过添加其他剂来减弱免疫原性和抗药物应答(治疗性的,例如将序列与宿主匹配,或添加免疫抑制疗法[诸如当施用英夫利昔单抗用于治疗类风湿性关节炎或诱导新生儿耐受时为甲氨蝶呤,这是减少针对FVIII的抑制剂的发生率的主要策略(综述于:DiMichele DM,Hoots WK,Pipe SW,Rivard GE,Santagostino E.International workshop on immune tolerance induction:consensus recommendations.Haemophilia.2007;13:1-22,通过引用以其整体并入本文)]。

[0516] 如本文所描述,纳米笼单体可以由亚基形成。因此,纳米笼单体亚基可以包含第一脱铁铁蛋白亚基,任选地第一人脱铁铁蛋白亚基,诸如脱铁铁蛋白N亚基或C亚基,并且其中第一脱铁铁蛋白亚基能够与第二脱铁铁蛋白亚基(诸如互补的C亚基或N亚基)自组装。将理解,其他纳米笼单体可以分成与如本文所描述的脱铁铁蛋白非常相似的二分的亚基,使得

[0532] PWTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHOGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

[0533]

[0534]

[illegible]

[0537] 或其組合。

[0538] 在进一步的方面,融合蛋白与进一步的部分,诸如可检测的部分(例如,小分子、荧光分子、放射性同位素或磁性颗粒)、药物制剂、诊断剂或其组合缀合或缔合并且可以包括例如抗体-药物缀合物。

[0539] 在一些方面,其中进一步的部分是可检测的部分,可检测的部分包含荧光蛋白,诸如GFP、EGFP、紫黄晶,和/或基于黄素的荧光蛋白,诸如LOV-蛋白,诸如iLOV。

[0540] 在一些方面,其中进一步的部分是药物制剂,药物制剂可以包含例如小分子、肽、脂质、碳水化合物或毒素。

[0541] 在典型的方面,从本文描述的融合蛋白组装的纳米笼包含约3至约100个纳米笼单体,其中没有、一些或全部可以作为二分纳米笼单体亚基提供,诸如约3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96或98至约4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98或100个纳米笼单体,诸如24、32或60个纳米笼单体。纳米笼单体或其亚基可以是任何已知的天然的、合成的或部分合成的纳米笼单体,并且在一些方面选自铁蛋白、脱铁铁蛋白、encapsulin、S0R、二氢四氢蝶啶合酶、丙酮酸脱氢酶、羧基体、穹窿蛋白、GroEL、热休克蛋白、E2P、MS2外壳蛋白、其片段及其变体。典型地,纳米笼单体或其亚基是铁蛋白或脱铁铁蛋白或其亚基。

[0542] 本文还描述了以上描述的融合蛋白对,其中每对自组装以形成纳米笼单体,其中第一和第二纳米笼单体亚基融合至如本文描述的不同的生物活性部分。这为由亚基对组装的单个纳米笼单体提供了多价和/或多特异性。

[0543] 纳米笼

[0544] 本文还公开了包含至少一个如本文所公开的融合蛋白的纳米笼,其中纳米笼由至少一个融合蛋白和额外的融合蛋白和/或纳米笼单体或其亚基(诸如铁蛋白,例如,人铁蛋白轻链)自组装。

[0545] 本文还描述了纳米笼,其包含至少一个本文描述的融合蛋白和至少一个与该融合蛋白自组装以形成纳米笼的第二纳米笼单体或其亚基。进一步,本文描述了融合蛋白对,其中该对自组装以形成纳米笼单体,和其中第一和第二纳米笼单体亚基融合至不同的生物活性部分。

[0546] 将理解, 纳米笼可以由多个相同的融合蛋白、由多个不同的融合蛋白 (并且因此是多价的和/或多特异性的)、由融合蛋白和野生型蛋白的组合、以及其任何组合自组装。例如, 纳米笼可以用本文描述的融合蛋白的至少一个与至少一个Fc单体和/或scFc片段组合

来内部地和/或外部地装饰。在一些方面,至少一个Fc单体和/或scFc片段和至少一个Fab片段装饰纳米笼的外表面。在一些方面,至少两个Fc单体和/或scFc片段和至少两个Fab片段装饰纳米笼的外表面。

[0547] 在典型的方面,约20%至约80%的纳米笼单体或其亚基包含本文描述的融合蛋白。考虑到本文描述的模块化解决方案,纳米笼理论上可以包含多达三倍或四倍于纳米笼中单体的生物活性部分(诸如抗体片段和/或Fc单体/scFc片段),因为每个纳米笼单体可以分成两个亚基,其中每个可以在每端处独立地结合至不同的生物活性部分。尽管如此,典型地使用较低的数量来避免位阻。将理解,可以利用这种模块性来达到生物活性部分的任何期望比率。

[0548] 在一些实例中,本文描述的纳米笼可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个或更多个相同的或基本上相同的或功能上等同的Fc单体或scFc片段的拷贝。在额外的或替代性的实例中,本文描述的纳米笼可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个或相同的或基本上相同的或功能上等同的生物活性部分诸如Fab片段的拷贝。在额外的或替代性的实例中,本文描述的纳米笼可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个不同的Fc单体和/或scFc片段和/或其他生物活性部分。以这种方式,纳米笼可以是多价的和/或多特异性的,并且其程度可以用本文描述的系统相对容易地控制。在一些实施方案中,纳米笼是多价且多特异性的。

[0549] 在一些方面,本文描述的纳米笼可以进一步包含至少一个整个纳米笼单体,任选地融合至生物活性部分的纳米笼单体,该生物活性部分可以与本文描述为连接至纳米笼单体亚基的生物活性部分相同或不同。

[0550] 在一些方面,本文描述的纳米笼包含各自包含融合至纳米笼单体或其亚基的不同的抗原结合部分的第一和第二融合蛋白,以及任选地包含融合至纳米笼单体或其亚基的Fc单体或scFc片段的第三融合蛋白。

[0551] 在一些实施方案中,第一、第二和第三融合蛋白各自包含融合至N半铁蛋白或C半铁蛋白的生物活性部分或其部分,其中第一、第二和第三融合蛋白的至少一个融合至N半铁蛋白或C半铁蛋白,以及第一、第二和第三融合蛋白的至少一个融合至C半铁蛋白,并且其中Fc单体或scFc片段融合至C半铁蛋白的C末端。

[0552] 在一些实施方案中,第一融合蛋白和任选的第二融合蛋白各自包含融合至完整的脱铁铁蛋白的抗原结合部分。相似地,在一些实施方案中,第三蛋白质包含融合至完整的脱铁铁蛋白的生物活性部分。将理解,完整的纳米笼单体和纳米笼单体的亚基的组合预期用于本文描述的模块化纳米笼中。

[0553] 将理解,典型地,至少一个在其N端处连接至生物活性部分(例如Fab)的完整的纳米笼单体用于本文描述的纳米笼。典型地,每对N铁蛋白亚基和C铁蛋白亚基有一个此类完整纳米笼单体。这允许纳米笼适当地多聚化,而没有过多的位阻,并且还降低了可能导致不期望的过多的亲合力的纳米笼上的Fc单体和/或scFc片段的数量。

[0554] 虽然蛋白质可包含任何数量或比率的融合蛋白,但在一些实施方案中,本文描述的纳米笼包含三个Fab,其每个对与相同疾病相关联的不同的抗原具有特异性,以及Fc单体或scFc片段,任选地为2:2:2:1的Fab1:Fab2:Fab:Fc单体/scFc的比率。

[0555] 本文还描述了包含纳米笼的组合物,诸如治疗性或防治性组合物。还描述了用于治疗 and/或预防HIV-1的相关方法和用途,其中该方法或用途包含将本文描述的纳米笼或组合物施用至有此需要的受试者。

[0556] 在针对HIV-1的具体实施方案中,纳米笼在一些方面展示出泛病毒中和广度。在额外的或替代性的方面,纳米笼展示出小于约0.1 μ g/mL,诸如小于约0.01 μ g/mL,例如小于约0.001 μ g/mL的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。在额外的或替代性的方面,纳米笼展示出小于约42pM,诸如小于约4.2pM,例如小于约0.42pM的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。在额外的或替代性的方面,纳米笼展示出在质量和/或摩尔基础上比相应的bNAbs的混合物更有力至少约10、至少约100、至少约1000、至少约10,000或至少约100,000的针对118种PsV的多进化枝组的平均中位IC₅₀值。

[0557] 将理解,还考虑了与本文描述的那些基本上相同的多肽。基本上相同的序列可以包含一个或多个保守的氨基酸突变。本领域已知,参考序列的一个或多个保守氨基酸突变可以产生与参考序列相比在生理、化学或功能性特性上没有实质变化的突变体肽;在此类情况下,将认为参考序列和突变体序列是“基本上相同的”多肽。保守氨基酸突变可以包括氨基酸的添加、缺失或取代;保守氨基酸取代在本文中定义为用具有相似的化学性质(例如大小、电荷或极性)的另一个氨基酸残基取代氨基酸残基。

[0558] 在非限制性实例中,保守突变可以是氨基酸取代。此类保守氨基酸取代可以用碱性、中性、疏水性或酸性氨基酸取代相同组的另一个。所谓术语“碱性氨基酸”意指具有大于7的侧链pK值的亲水性氨基酸,其典型地在生理pH下带正电荷。碱性氨基酸包括组氨酸(His或H)、精氨酸(Arg或R)和赖氨酸(Lys或K)。所谓术语“中性氨基酸”(也称“极性氨基酸”)是指具有在生理pH下不带电荷的侧链的亲水性氨基酸,但其具有至少一个键,在该键中由两个原子共享的电子对被其中一个原子更紧密地结合(hold)。极性氨基酸包括丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、半胱氨酸(Cys或C)、酪氨酸(Tyr或Y)、天冬酰胺(Asn或N)和谷氨酰胺(Gln或Q)。术语“疏水性氨基酸”(也称“非极性氨基酸”)意指包括根据Eisenberg(1984)的标准化共识疏水性标度展示出大于零的疏水性的氨基酸。疏水性氨基酸包括脯氨酸(Pro或P)、异亮氨酸(Ile或I)、苯丙氨酸(Phe或F)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、色氨酸(Trp或W)、甲硫氨酸(Met或M)、丙氨酸(Ala或A)和甘氨酸(Gly或G)。

[0559] “酸性氨基酸”指具有小于7的侧链pK值的亲水性氨基酸,其典型地在生理pH下带负电荷。酸性氨基酸包括谷氨酸/谷氨酸盐(Glu或E)和天冬氨酸(Asp或D)。

[0560] 序列同一性用于评价两个序列的相似性;其通过计算当为残基位置间的最大对应性而比对两个序列时的相同残基的百分比来确定。可以使用任何已知的方法计算序列同一性;例如,计算机软件可用于计算序列同一性。在不希望是限制性的情况下,序列同一性可以通过软件计算,诸如由wiss Institute of Bioinformatics维护的NCBI BLAST2服务(并且如在ca.expasy.org/tools/blast/所找到的)、BLAST-P、Blast-N、或FASTA-N,或本领域已知的任何其他适当的软件。

[0561] 本发明的基本相同的序列可以是至少85%相同的;在另一个实例中,基本上相同

的序列可以在氨基酸水平上与本文描述的序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100% (或其间的任何百分比) 相同。在具体的方面,基本上相同的序列保留参考序列的活性和特异性。在非限制性的实施方案中,序列同一性的差异可能是由于保守氨基酸突变所致。

[0562] 本发明的多肽或融合蛋白还可以包含额外的序列以帮助其表达、检测、纯化或任何其他期望的特性,诸如抑制转胞吞作用的肽。可以使用本领域技术人员已知的任何此类序列或标签。例如,并且在不希望是限制性的情况下,融合蛋白可以包含靶向序列或信号序列(例如但不限于ompA)、检测标签、包括Strep标签或其任何变体的示例性标签盒(tag cassette);参见例如美国专利No.7,981,632,His标签、具有序列基序DYKDDDDK (SEQ ID NO:14) 的Flag标签、Xpress标签、Avi标签、Calmodulin标签、Polyglutamate标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、CREB结合蛋白(CBP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、绿色荧光蛋白(GFP)、硫氧还蛋白标签或其任何组合;纯化标签(例如但不限于His₅或His₆)或其组合。

[0563] 在另一个实例中,额外的序列可以是诸如由Cronan等人在W0/1995/004069中或Voges等人在W0/2004/076670中描述的生物素识别位点。还如本领域技术人员已知的,接头序列可以与额外的序列或标签结合使用。

[0564] 更具体地,标签盒可以包含能够以高亲和力或亲合力特异性地结合抗体的细胞外组分。在单链融合蛋白结构之内,标签盒可以位于(a)紧邻连接器区的氨基端,(b)插入接头模块之间并连接接头模块,(c)紧邻结合域的羧基端,(d)插入结合域(例如scFv或scFab)和效应器域之间并将结合域与效应器域连接,(e)插入结合域的亚基之间并将其连接,或(f)单链融合蛋白的氨基端处。在某些实施方案中,一个或多个连接氨基酸可以布置在标签盒与疏水部分之间并将其连接,或布置在标签盒与连接器区之间并将其连接,或布置在标签盒与接头模块之间并将其连接,或布置在标签盒与结合域之间并将其连接。

[0565] 本文还涵盖使用各种方法固定化在表面上的分离或纯化的融合蛋白、多肽或其片段;例如并且在不希望是限制性的情况下,多肽可以通过His-标签偶联、生物素结合、共价结合、吸附等等连接至或偶联至表面。固体表面可以是任何适合的表面,例如但不限于微量滴定板的孔表面、表面等离子体共振(SPR)传感器芯片的通道、膜、珠(例如基于磁性或基于琼脂糖的珠或其他层析树脂)、玻璃、薄膜或任何其他有用的表面。

[0566] 在其他方面,融合蛋白可以连接至货物分子;融合蛋白可以将货物分子递送至期望的位点并且可以使用本领域已知的任何方法(重组技术、化学缀合、螯合等)连接至货物分子。货物分子可以是任何类型的分子,例如治疗剂或诊断剂。

[0567] 在一些方面,货物分子是蛋白质并且融合至融合蛋白,使得货物分子内部地或外部地包含在纳米笼中。在其他方面,货物分子不融合至融合蛋白并且内部地包含在纳米笼中。货物分子典型地是蛋白质、小分子、放射性同位素或磁性颗粒。

[0568] 本文描述的融合蛋白特异性结合至其靶标。抗体特异性是指抗体对抗原的特定表位的选择性识别,本文描述的抗体或片段的抗体特异性可以基于亲和力和/或亲合力来决定。亲和力由抗原与抗体的解离的平衡常数(K_D)表示,其测量抗原决定簇(表位)和抗体结合位点之间的结合强度。亲合力是抗体与其抗原之间的结合的强度的量度。抗体典型地以 10^{-5} 至 10^{-11} M的 K_D 结合,任意大于 10^{-4} M的 K_D 通常认为指示非特异性结合。 K_D 的值越小,抗原决

定簇与抗体结合位点之间的结合强度越强。在一些方面,本文描述的抗体具有小于 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 、 10^{-14}M 、或 10^{-15}M 的 K_D 。

[0569] 本文还描述了编码本文描述的融合蛋白和多肽的核酸分子,以及包含该核酸分子的载体和包含该载体的宿主细胞。

[0570] 编码本文描述的融合蛋白的多核苷酸包括具有与本发明的多核苷酸的核酸序列基本上相同的核酸序列的多核苷酸。“基本上相同的”核酸序列在本文定义为当两个序列最佳对齐(具有适当的核苷酸插入或缺失)并比较以确定两个序列之间的核苷酸的精确匹配时,与另一个核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%同一性的序列。

[0571] 编码抗体的片段的多核苷酸的合适来源包括表达全长抗体的任何细胞,诸如杂交瘤和脾细胞。如以上所描述的,片段本身可以用作抗体等同物,或者可以重组成等同物。本节中描述的DNA缺失和重组可以通过已知的方法进行,诸如在以上标题为“抗体的功能性等同物”的节中列出的公布专利申请中描述的那些和/或其他标准的重组DNA技术,诸如以下描述的那些。如本领域已知的,DNA的另一个来源是由噬菌体展示文库产生的单链抗体。

[0572] 另外,提供了含有可操作地连接至表达序列、启动子和增强子序列的此前描述的多核苷酸序列的表达载体。已经开发了用于在原核系统(诸如细菌)和真核系统(包括但不限于酵母和哺乳动物细胞培养系统)中高效合成抗体多肽的的多种表达载体。本发明的载体可以包含染色体DNA序列、非染色体DNA序列和合成DNA序列的片段。

[0573] 可以使用任何适合的表达载体。例如,原核克隆载体包括来自大肠杆菌的质粒,诸如colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM和RP4。原核载体还包括噬菌体DNA,诸如MI3和其他丝状单链DNA噬菌体的衍生物。在酵母中有用的载体的实例是2 μ 质粒。用于哺乳动物细胞中表达的合适载体包括众所周知的SV-40的衍生物、腺病毒、逆转录病毒衍生的DNA序列和衍生自功能性哺乳动物载体(诸如以上描述的那些)与功能性质粒和噬菌体DNA的組合的穿梭载体。

[0574] 额外的真核表达载体是本领域已知的(例如,P. J. Southern & P. Berg, J. Mol. Appl. Genet, 1:327-341 (1982); Subramani et al, Mol. Cell. Biol, 1:854-864 (1981); Kaufman & Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol, 159:601-621 (1982); Kaufman & Sharp, Mol. Cell. Biol, 159:601-664 (1982); Scallan et al., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Nat'l Acad. Sci USA, 80:4654-4659 (1983); Urlaub & Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci USA, 77:4216-4220, (1980), 所有这些通过引用并入本文。

[0575] 表达载体典型地含有至少一个可操作地连接至待表达的DNA序列或片段的表达控制序列。将控制序列插入载体中以便控制和调控克隆的DNA序列的表达。有用的表达控制序列的实例是lac系统、trp系统、tac系统、trc系统、噬菌体lambda的主要操作子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、酵母的糖酵解启动子,例如3-磷酸甘油酸激酶的启动子、酵母酸性磷酸酶的启动子,例如Pho5、酵母 α 交配因子的启动子,以及衍生自多瘤、腺病毒、逆转录病毒和猿猴病毒的启动子,例如早期启动子和晚期启动子或SV40,以及已知控制原核细胞或真

核细胞及其病毒的基因的表达式或其他序列或其组合。

[0576] 本文还描述了含有此前描述的表达载体的重组宿主细胞。本文描述的融合蛋白可以在除了杂交瘤以外的细胞系中表达。包含编码根据本发明的多肽的序列的核酸可以用于合适的哺乳动物宿主细胞的转化。

[0577] 基于感兴趣蛋白的高水平表达、组成型表达和来自宿主蛋白的最小污染来选择特定偏好的细胞系。可用作表达的宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,并且包括许多永生化细胞系,诸如但不限于HEK 293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞和许多其他的。合适的额外的真核细胞包括酵母和其他真菌。有用的原核宿主包括,例如,大肠杆菌,诸如大肠杆菌SG-936、大肠杆菌HB 101、大肠杆菌W3110、大肠杆菌X1776、大肠杆菌X2282、大肠杆菌DHI、大肠杆菌T7 Shuffle和大肠杆菌MRC1、假单胞菌属、芽孢杆菌属(诸如枯草芽孢杆菌)和链霉菌属。

[0578] 通过在允许多肽的表达式条件下培养细胞并从宿主细胞或宿主细胞周围的培养基中纯化多肽,这些本发明的重组宿主细胞可以用于产生融合蛋白。可以通过在感兴趣的抗体编码基因的5'末端处插入信号或分泌前导肽编码序列来促进表达的多肽对于重组宿主细胞中的分泌的靶向(参见Shokri et al, (2003) Appl Microbiol Biotechnol.60(6): 654-664, Nielsen et al, Prot. Eng., 10:1-6 (1997); von Heinje et al., Nucl. Acids Res., 14:4683-4690 (1986), 所有这些通过引用并入本文。这些分泌前导肽元件可以衍生自原核序列或真核序列。相应地,适当地,使用分泌前导肽,前导肽是连接至多肽的N端以引导多肽出宿主细胞胞质溶胶的移动和到培养基中的分泌的氨基酸。

[0579] 本文描述的融合蛋白可以融合至额外的氨基酸残基。例如,此类氨基酸残基可以是肽标签以促进分离。还考虑了用于抗体归巢至特异性器官或组织的其他氨基酸残基。

[0580] 将理解,Fab纳米笼可以通过例如质粒的共转染来生成,质粒一个编码包含融合至铁蛋白链(例如,铁蛋白轻链)的Fab重链的融合蛋白,并且另一个编码Fab轻链。典型地,构建体排列为LC-接头-HC-接头-纳米笼单体/亚基,但也可以排列为HC-接头-LC-接头-纳米笼单体/亚基。如本文所描述,可以使用scFv或任何其他的抗原结合部分。替代性地,可以使用仅需要转染一个质粒(例如,使用编码包含Fab轻链、Fab重链和铁蛋白链(例如铁蛋白轻链)的融合蛋白的质粒)的单链Fab铁蛋白纳米笼。这可以用Fab轻链和Fab重链之间的具有不同的长度(例如60或70个氨基酸)的接头来完成。当使用单链Fab时,可以确保重链和轻链配对。标签(例如Flag、HA、myc、His6x、Strep等)也可以添加在构建体的N端处或接头内,以便于如以上所描述的纯化。进一步,当不同的Fab纳米颗粒质粒共转染时,标签系统可以用于使用串行/附加亲和层析步骤确保许多不同的Fab存在于相同的纳米颗粒上。这为纳米颗粒提供了多特异性。如果期望,可以插入蛋白酶位点(例如TEV、3C等)以在表达和/或纯化后切割接头和标签。

[0581] 可以使用任何合适的方法或途径以施用本文描述的融合蛋白。施用途包括例如口服、鼻内、静脉内、腹膜内、皮下或肌内施用。

[0582] 应当理解,在为了防治或治疗目的在哺乳动物中使用的情况下,本文描述的融合蛋白将以额外地包含药学上可接受的载剂的组合物的形式施用。适合的药学上可接受的载剂包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等等的一种或多种,以及其组合。药学上可接受的载剂可以进一步包含增强结合蛋白的保质期或有效性的少量辅助物质,诸

如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。如本领域众所周知的,可以配制注射组合物使得在施用至哺乳动物后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0583] 尽管本文描述的融合肽和Multabody对施用至人特别有用,但它们也可施用至其他哺乳动物。如本文所用,术语“哺乳动物”旨在包括但不限于人、实验室动物、家养宠物和农场动物。

[0584] 以上公开笼统地描述了本发明。通过参考以下具体的实例可以获得更完整的理解。这些实例仅是为了说明的目的提供,并且除非另有说明,不旨在是限制性的。因此,本发明决不应解释为限于以下实例,而是应解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0585] 以下实例不包括常规方法(诸如载体和质粒的构建、将编码多肽的基因插入到这样的载体和质粒中、或将质粒引入到宿主细胞中所采用的的那些)的详细描述。此类方法为本领域普通技术人员所熟知,并在许多出版物中描述,其包括通过引用并入本文的 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0586] 在没有进一步描述的情况下,使用前面的描述和以下的说明性的实例,应相信本领域普通技术人员可以制备和利用本发明的化合物并实践所要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体指出本发明的典型的方面,并且不应解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

实施例

[0587] 实施例1

[0588] 摘要

[0589] HIV的快速演化仍然是预防和治疗的治疗法的主要障碍。在本文,我们描述了称为Multabody.v2 (MB.v2) 和Multabody.v3 (MB.v3) 的第二代抗体平台的设计,该平台允许形成能够与靶标(在本例中,为HIV包膜)的三个独立表位建立多重且同时的相互作用的单个分子。该技术的多价性和多特异性特性转化为超过具有最有力的抗HIV bnAb的那种的非凡效力,以及一系列不同的HIV-1毒株的完全泛中和。因此,这些新的MB.v2和MB.v3平台具有针对HIV-1的防治和疗法的潜力。

[0590] 介绍

[0591] 尽管经数十年的研究,还是不存在针对人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)的有效的疫苗或治愈。然而,小部分的HIV-1感染的个体在循环的HIV-1分离株间发展出具有罕见中和效力的抗体的事实强调了抗体介导的HIV-1的控制的潜力。自第一代广泛中和抗体(bNAb) 2F5 (1)、4E10 (2,3)、2G12 (4) 和b12 (5,6) 发现以来,由于Env特异性单B细胞分选 (7-9)、抗体克隆和高通量中和测定 (10-13),以及更加最近地蛋白质组解卷积 (14) 的新技术的实施,bNAb的目录戏剧性地增加。目前已描述了数十种HIV bnAb靶向三聚体HIV包膜(Env)上的6个保守位点,包括在三聚体顶端的V1/V2环、V3环聚糖、CD4结合位点(CD4bs)、gp120-gp41界面、融合肽和近膜外部区(MPER) (7,9,10,12-19)。

[0592] bNAb作为对抗HIV-1中的治疗性分子的兴趣源于针对在猕猴 (20-23,23) 和人源化小鼠 (24-27) 中的攻击研究观察到的有力抗病毒活性,以及源于输注bNAb后受感染人中实

现的病毒血症减少(28-32)。另外,与口服抗逆转录病毒疗法(ART)相比,抗体具有关键优势:它们具有更长的循环半衰期,并且可以形成增强宿主对病毒的免疫力的免疫复合物。这些观察结果导致对基于抗体的疗法的临床评价,以通过被动施用bNAbs赋予针对HIV-1的保护和控制和/或清除受感染的个体中的HIV-1的努力。

[0593] bNAbs的临床使用的主要限制之一是中和抗性病毒群体的快速演化(29-31,33,34)。RNA病毒诸如HIV-1展示出非凡的遗传多样性(35),这使病毒能够发展逃逸mAb识别的抗性突变。然而,消除与某些bNAbs的结合的突变可能在病毒适应性中带来显著不利后果(36-38)。类似于HIV-1治疗方案中不同药物的组合,这个观察结果提示,针对HIV-1的成功的基于抗体的疗法应包括bNAbs特异性的组合。因此,最近已探索具有针对Env的双特异性(39-41)或三特异性(42-44)的不同形式的抗体样分子的开发。额外的考虑是体内功效所需要的抗体的量。事实上,已针对使用结构指导的设计或生物信息学方法(诸如VRC01(45)、10E8(46,47)和NIH45-46(48))来工程化改造bNAbs以改进其效力进行大量努力,但迄今为止成功有限。在靶向Env中的多个表位的双特异性抗体和三特异性抗体的情况下,效力通常受到其亲本mAb的效力限制。因此,迄今为止,已达到中和广度的显著改进,但抗病毒效力的相对小^{40,43, (43), 45}。

[0594] 最近已描述了多特异性、多亲和力的抗体(MULTi-specific, multi-Affinity antiBODY, Multabody)平台,以驱动抗体片段的寡聚化,并将靶向SARS-CoV-2的抗体转化成罕见有力的中和剂(49)。利用这个平台,已在此在单个分子之内组合三种针对HIV-1的最佳bNAbs和来自IgG1的可结晶片段(Fc)的多个拷贝。通过Multabody的进一步工程化以最大化颗粒内Fab的数量,已显著改进通过Multabody技术实现的效力、广度和同质性。产生的抗HIV Multabody.v3显示出完全的泛病毒中和广度和0.0009 $\mu\text{g/mL}$ (0.4pM)的针对118种假病毒(PsV)的多进化枝组的平均中位 IC_{50} 值,其与最佳的目前已知bNAbs制成的混合物相比以质量和摩尔浓度计分别低32倍和460倍。本文描述的Multabody.v3设计代表用于开发针对HIV-1的下一代生物制品的稳健且强力的平台。

[0595] 材料和方法

[0596] 仅Fab的基于脱铁铁蛋白的多聚体的表达和纯化。合成编码人脱铁铁蛋白轻链和scFab-人脱铁铁蛋白融合物的基因,并通过GeneArt(Life Technologies)将其克隆到pHLsec表达载体中。将200ml的HEK293F细胞(Thermo Fisher Scientifics)以 0.8×10^6 细胞/mL的密度接种在Freestyle表达培养基中,并在Multitron Pro摇床(Infors HT)中在37 $^{\circ}\text{C}$ 、8% CO_2 和70%湿度下以125rpm振荡温育。接种后24h之内,使用在室温(RT)下预温育10分钟的50 μg 过滤的DNA与转染试剂FectoPRO(Polyplus Transfections)以1:1比率瞬时转染细胞。将编码scFab-人脱铁铁蛋白和人脱铁铁蛋白的质粒以1:4、1:1、4:1和1:0的比率混合以便分别获得20%、50%、80%和100%scFab价纳米颗粒。6-7天后,通过在5000 $\times g$ 离心15分钟收获细胞悬浮液,并通过0.22 μm Steritop过滤器(EMD Millipore)过滤上清液。通过对Fab的亲合层析纯化纳米颗粒并在洗涤后洗脱。将含有蛋白质的级分合并、浓缩并加载至20mM磷酸钠pH 8.0,150mM NaCl中的Superose 6 10/300GL尺寸排阻柱(GE Healthcare)上。

[0597] 32-N MB.v1、32-N MB.v2和32-N MB.v3 Multabody的设计、表达和纯化。编码连接至半铁蛋白的scFab、scFc和Fc片段的基因通过使用KOD-Plus诱变试剂盒(Toyobo,大阪,日本)缺失人脱铁铁蛋白的轻链的残基1至95(留下铁蛋白的C端部分,“C铁蛋白”)或残基95至

175(留下铁蛋白的N端部分,“N铁蛋白”)来生成。HEK 293F细胞中的32-N MB.v1的瞬时转染通过以4:2:1:1比率混合67 μ g的质粒PGDM1400 scFab-人脱铁铁蛋白:scFcN-铁蛋白:N49P7 scFab-C铁蛋白:10E8v4 scFab-C铁蛋白来获得。在32-N MB.v2的情况下,以5:1:1比率使用59 μ g的质粒PGDM1400 scFab-人脱铁铁蛋白:N49P7 scFab-N铁蛋白:10E8v4 scFab-C铁蛋白-scFc,并且在32-N MB.v3的情况下,以3:1:1比率使用63 μ g的质粒PGDM1400 scFab-人脱铁铁蛋白:N49P7 scFab-N铁蛋白:10E8v4 scFab-C铁蛋白-Fc。本实施例中使用的各种构建体的特性汇总在下表1中。

[0598] 表1:Multabody构建体的特性。

构建体和对应的图	Fc	Fc 的附属物	Fab 组分 (参见相应的排列图)
32-N MB.v1 (图 6A 的顶部) (也称为 T-01 MB)	单链 Fc(scFc)	N 铁蛋白的 N 端	Fab1: PGDM1400 scFab Fab2: N49P7 scFab Fab3: 10E8v4 scFab
[0599] 32-N MB.v2 (图 6A 的底部) (也称为 T-01 MBv1.5)	scFc	C 铁蛋白的 C 端	Fab1: PGDM1400 scFab Fab2: 10E8v4 scFab Fab3: N49P7 scFab
32-N MB.v3 (图 7A) (也称为 T-01 MBv2)	Fc 单体	C 铁蛋白的 C 端	Fab1: PGDM1400 scFab Fab2: 10E8v4 scFab Fab3:: N49P7 scFab

[0600] 将DNA混合物过滤并与FectoPR0以1:1比率在室温下温育,然后添加到细胞培养物。使用具有20mM Tris pH 8.0、3M MgCl₂和10%甘油洗脱缓冲液的第一HiTrap Protein AHP柱(GE Healthcare),通过亲和层析纯化Multabody。在使用PD-10脱盐柱(GE Healthcare)的缓冲液交换后,使用HiTrap Protein L柱(GE Healthcare)通过第二亲和层析进一步纯化Multabody。将含有蛋白质的级分浓缩并通过在20mM磷酸钠pH 8.0、150mM NaCl中在Superose 6 10/300GL柱(GE Healthcare)上的凝胶过滤进一步。

[0601] 负染色电子显微镜。以大约0.02mg/mL的浓度将3 μ L的Multabody添加到碳包被的铜网达30s,并用3 μ L的2%甲酸铀酰染色。立即使用WhatmanNo.1滤纸从网上除去过量染色,并添加额外的3 μ L 2%甲酸铀酰达20s。使用在200kV下操作并配备有Orius电荷耦合器件(CCD)相机(Gatan Inc.)的场发射FEI Tecnai F20电子显微镜将网成像。

[0602] 生物层干涉法。使用Octet RED96 BLI系统(Pall ForteBio)在PBS pH 7.4、0.01% BSA和0.002% Tween中进行结合动力学测量。选择了Multabody组分中的每一个的独特His标签化配体,并将其加载到Ni-NTA生物传感器上以达到0.8nm的信号响应。通过将加载的生物传感器分别转移至含有multabody的系列稀释液(50-25-12.5-6.25-3.1-1.5nM)的孔和含有缓冲液的孔来测量缔合率。通过将生物传感器浸入含有缓冲液的孔中来测量解离率。这两个步骤的每一个的持续时间为180s。为达到与PGDM1400的选择性结合,引入BG505SOSIP.664三聚体的CD4bs中的D368R突变,并且因此扰乱N49P7与该抗原的结合。相

似地, gp120亚基93TH057、MPER肽和Fc受体(与2-微球蛋白复合的Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb和hFcRn)分别作为N49P7、10E8和Fc结合的配体产生。通过在生理pH(7.5)和酸性pH(5.6)下测量multabody与hFcRn

[0603] 2-微球蛋白复合物的结合来测试其进行内体(endosomal)再循环的能力。

[0604] 尺寸排阻层析串联多角度光散射(SEC-MALS)。MiniDAWN TREOS和Optilab T-rEX折光仪(Wyatt)与Agilent Technologies 1260infinity II HPLC串联使用。将50 μ g的24-mer PGDM1400 scFab多聚体和Multabody 32-N加载到20mM磷酸钠pH 8.0、150mM NaCl中的Superose 6 10/300(GE Healthcare)柱上。使用ASTRA软件(Wyatt)进行数据收集和分析。

[0605] 溶解温度和聚集温度测量。使用UNit系统(Unchained Labs)测定Multabody、亲本IgG和12-mer同源寡聚Fab和Fc的溶解温度(T_m)和聚集温度(T_{agg})。 T_m 通过测量重心平均荧光获得,而 T_{agg} 测定为观察到在266nm波长下相对于基线的静态光散射的50%增加时的温度。样品浓缩至1.0mg/mL,并且以1 $^{\circ}$ C增量经受从25 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C的热爬坡。使用UNit分析软件计算三个独立测量的平均值和标准误差。

[0606] 加速热稳定性测定。不同的Multabody版本经受极端温度和浓度条件达连续四周。10mg/ml的每种样品在40 $^{\circ}$ C下温育并且每周计算正确折叠的蛋白质的百分比,分析在将10 μ L的样品加载到Superose 6 10/300GL柱(GE Healthcare)上后通过尺寸排阻层析获得的每个峰的面积。这个分析用功能性测定(在本例中为中和测定)来补充,以测定在实验开始时(第0周)和在实验结束时(第4周)的活性蛋白的量。

[0607] 病毒产生和T2M-b1中和测定。25种HIV-1假型病毒组通过用HIV-1亚型B骨架NL4-3.Luc.R⁺E质粒(AIDS研究和参考试剂计划(ARRRP))和编码全长Env克隆的质粒的共转染293T细胞来生成,如先前所述(50)。HIV分离株X2088、ZM106.9、NL4.3和3817由AIDS疫苗发现(CAVD)合作机构友情提供,SF162来自J.L.Nieva.(Biofisika研究所)并且pCNE8、1632、THRO、278、ZM197、JRCSF、t257、Du422、BG505、p1054.TC4.1499、6535、ZM214M.PL15、AC10.29、p16845、P6244_13.B5.4576、pM246F_C1G,TRJ04551、QH0692和pCAAN5342来自NIH ARRRP。使用标准T2M-b1中和测定在单循环中和测定中测定中和作用。简而言之,在与T2M-b1细胞的44-72h温育之前,将抗体和基于抗体的颗粒与10-15%组织培养感染性剂量的假病毒在37 $^{\circ}$ C下温育1h。病毒中和通过将Britelite plus试剂(PerkinElmer)添加到细胞并且使Synergy Neo2 Multi-Mode Assay Microplate Reader(Biotek Instruments)以相对光单位(RLU)计测量发光来监测。118种PsV的扩展多进化枝组由Michael Seaman博士在哈佛医学院病毒学和疫苗研究中心按照标准方案进行。使用10 μ g/mL的截止限来测定抗体广度。

[0608] 药代动力学。体内研究使用雌性NOD/Shi-scid/IL-2R γ null免疫缺陷小鼠品系(NCG)进行。由抗体PGDM1400、N49P7和10E8v4的scFab以及含有半衰期延长突变(M428L/N434S)的IgG1 Fc的scFc片段构成的32-N MB.v3用于该研究。皮下注射在200 μ L的PBS(pH 7.5)中的5mg/kg的Multabody或对照样品(匹配Multabody的Fab特异性的IgG混合物)的单次注射剂。血液样品在多个时间点收集,并且血清样品通过ELISA针对循环抗体的水平进行评估。简而言之,96孔Pierce Nickel Coated Plates(Thermo Fisher)用50 μ L的0.5 μ g/ml的由以下MB识别的His_{6x}标签化抗原中的每一个包被:BG505SOSIP.664_D368R三聚体、gp120亚基93TH057和MPER肽,以使用IgG和Multabody的试剂特异性标准曲线来测定循环样品浓

度。HRP-Protein A (Invitrogen) 用作二级分子,并且化学发光信号使用Synergy Neo2 Multi-Mode Assay Microplate Reader (Biotek Instruments) 来定量。

[0609] 结果

[0610] HIV-1bNAb的效力可以通过亲合力增强

[0611] 脱铁铁蛋白是由24个相同亚基的自寡聚化形成的大约6nm流体动力学半径的球形纳米笼(图1a)。为了调查多价对中和效力的影响,我们使用了人脱铁铁蛋白的轻链的自组装特性以使衍生自靶向不同HIV-1Env表位的最有力且最广泛的HIV-1bNAb的抗原结合片段(Fab)多聚化。脱铁铁蛋白亚基遗传融合至单链Fab(scFab)。scFab使用轻链和重链之间的柔性接头生成,以确保正确的Fab异二聚化。脱铁铁蛋白自组装驱动了scFab的多聚化,并在纳米笼外围展示抗体片段(图1b)。不同密度的多聚化Fab通过编码scFab-人脱铁铁蛋白的质粒连同不同比率的非遗传修饰的人脱铁铁蛋白的共转染来实现(图1c和图3)。使用小HIV-1假病毒(PsV)组将scFab-脱铁铁蛋白融合物阻断HIV-1感染的能力与相应的IgG进行比较(图1d)。引人注目地,PGDM1400是迄今描述的最有力的抗HIV bNAb之一,当经由脱铁铁蛋白的轻链进行多聚化时,与其常规的IgG形式相比,显示出高10至40倍的中和效力。bNAb10-1074也显示出中和效力的可观改进(4至40倍),然而bNAb 10E8、N49P7和VRC01没有显示出效果或显示出较温和的增强。

[0612] scFab-脱铁铁蛋白融合物的表征

[0613] 使用ImageJ软件(rsb.info.nih.gov/ij/),通过光密度法定量对应于scFab-脱铁铁蛋白和未缀合脱铁铁蛋白的SDS-PAGE条带(图2a)。图2b显示了每个泳道(黄色框)中条带的强度图。颗粒上展示的scFab的近似数如下计算:scFab条带的强度/总强度,并与从用于共转染的DNA比率推断的理论数进行比较(图2c)。

[0614] Multabody有力且广泛地中和HIV-1

[0615] 考虑到这些结果,试图使用此前描述的基于脱铁铁蛋白分割设计的Multabody平台来增加PGDM1400的覆盖范围(49)。该策略包括将四螺旋脱铁铁蛋白亚基分成两个半部(N铁蛋白和C铁蛋白),并且将它们的N端融合至具有不同特异性的scFab(图3a)。此方法允许在纳米笼的表面上包含更多数量的Fab,这导致具有更高亲合力的最终分子。另外,该设计允许高效组合三种不同抗体特异性以及可结晶片段(Fc)的以赋予分子IgG样特性,诸如易于利用蛋白A亲和力纯化。具体地,我们将scFab PGDM1400与近泛中和抗体10E8v4(具有改进的溶解度的修饰的10E8(51))和N49P7的scFab以及人IgG1同种型的Fc片段组合(图3a)。正如所预期的,产生的Multabody(称为32-N)形成了具有与相应IgG相似的生物物理学和功能性特性(图3d)的高度装饰且同质的颗粒(图3b和c)。使用以下表位特异性分子在结合动力学实验中评估了通过三特异性Multabody的表位接合:BG505 SOSIP D368R (PGDM1400)、93TH057 gp120 (N49P7)、MPER肽(10E8v4)和人Fc受体(FcRn和Fc γ R)(Fc)(图3e)。以高表观结合亲和力与三种表位特异性抗原的结合以及无可检测的解离,证实了Multabody中所有特异性的存在。没有个体IgG分子具有有结合所有抗原的能力(图4)。

[0616] 在标准化体外T₂M-b1中和测定(50)中针对14-PsV组评估了Multabody32-N的中和效力和广度。设计14-PsV组以包括对于正在评价的每种bNAb具有至少一种抗性PsV的低敏感性PsV(截止IC₅₀设置在10 μ g/mL)。将Multabody的IC₅₀值和广度与每种个体IgG以及含有Multabody中存在的IgG的相同相对量的IgG混合物进行比较。32-N MB具有0.0071 μ g/mL

(3pM)的中位 IC_{50} 值(图5)。然而,尽管相对于亲本IgG的混合物实现了12倍改进的效力,但Multabody不能针对这个组达到100%中和(93%广度与10 μ g/mL的截止限)。另外,个体 IC_{50} 值的检查揭示,Multabody展示出针对对PGDM1400中和具有抗性的那些PsV的低效力(图5b)。这个数据表明,Multabody的中和特性在很大程度上取决于颗粒内的三种抗体特异性之一,在本例中为PGDM1400。

[0617] 工程化改造去铁铁蛋白支架

[0618] 为进一步改进Multabody的中和特性,我们向其设计引入了一些修饰,并制成第二代版本(MB.v2和MB.v3)。在原始Multabody(下文称为MB.v1)中,scFc位于N铁蛋白半部的N端,并且每个功能性Fc同二聚体将仅一个Fab(Fab2或Fab3)并入Multabody中(图6顶行)。

[0619] 相比之下,在优化的MB.v2中,Fc片段置于C铁蛋白半部的C端。由分割的脱铁铁蛋白互补驱动,两个不同的Fab(Fab2和Fab3)和一个Fc域以1:1:1比率并在相对于彼此的确定位置自缔合(图6;底行;参见“MB.v2形式”)。

[0620] 在MB.v3的情况下,该优化的版本每个Fc同二聚体包含更高数量的Fab。在这个设计中,每个二聚体Fc将两个Fab2和两个Fab3并入Multabody中。为了实现此,单体Fc片段(即一条Fc链)和scFab分别置于C铁蛋白半部的C端和N端(图7a)。因此,功能性Fc同二聚体的二聚化驱动MB.v3颗粒的组装以及分割的铁蛋白互补和铁蛋白亚基寡聚化(图7b)。

[0621] 重要地,这些设计确保与PGDM1400不同的更高数量的Fab(即Fab2和Fab3)的组装,因此有利于完全组装的Multabody中的三种Fab的每个的更平衡的亲合力。

[0622] 产生的Multabody颗粒(MB.v2和MB.v3)组装成高度稳定且良好形成的球形颗粒,其中不同Multabody版本之间在形态学和生物物理学特性中没有显著差异(图8a-c)。抗原(图8d)和Fc受体结合(图8e)证实了在MB.v3的情况下包含Fc片段的正确二聚化的Multabody的正确折叠。在MB.v2和MB.v3形式中,Fc在铁蛋白的C端处的安置导致具有反转且更远处定位的Fc域并因此减少的Fc亲合力的颗粒的形成。因此,即使在如32-N MB.v3 LS变体(图8f)所显示的半衰期延长突变LS(M428L/N434S)的存在下,这些Multabody在酸性pH下与Fc γ RI和FcRn的结合与32-N Mb.v1相比减少(图3e和图8e),并且在酸性pH下与FcRn的结合产生可测量的 K_{off} 。

[0623] 由第二代Multabody颗粒实现的非凡效力和泛中和广度

[0624] 接下来,我们评估了优化的Multabody版本MB.v2和MB.v3)针对PsV组的中和效力,该PsV组通过添加对PGDM1400具有高度抗性的11种HIV-1株到我们此前的组来生成。产生的25-PsV组含有56%的对PGDM1400中和具有抗性(截止 IC_{50} 设置在10 μ g/mL)的PsV变体(图9a)。正如所预期的,在PGDM1400抗性PsV的存在下,32-N MB.v1的广度和效力受到很大影响(图9a)。然而,如所工程化改造的,抗体N49P7和10E8v4的中和概况在32-NMB.v2和32-N MB.v3中是更占优势的,这允许这种优化的Multabody实现泛中和,而保存对这种类型的分子先前观察到的增强的中和效力(图9a)。当针对118种PsV的扩展多进化枝组进行测试时,32-N MB.v3匹配了相应IgG混合物的泛中和广度(100%病毒覆盖范围,截止 IC_{50} 设置在10 μ g/mL),但展示出引人注目的中和效力(图9b)。具体地,IgG混合物和32-N Mb.v1仅能够以0.001 μ g/mL的 IC_{50} 值分别中和9%和8%的PsV,而在32-N MB.v3的情况下,以仅0.001 μ g/mL的 IC_{50} 值,仍将50%的PsV中和(图9b)。值得注意地,32-NMB.v3实现了仅0.0009 μ g/mL(0.4pM)的中位 IC_{50} 值,并且因此与IgG混合物相比,以质量中和在摩尔浓度计分别实现了更

有力32倍和490倍的泛中和(图9b)。

[0625] Multabody的体内药代动力学与相应的IgG相似

[0626] 我们接下来检查了含有具有LS突变的IgG1 Fc片段的32-N MB.v3的体内生物利用度。5mg/kg的单个剂量皮下施用到NOD/Shi-scid/IL-2R γ null免疫缺陷小鼠品系(NCG)中,并且每两天检测血清中的Multabody的水平,持续连续15天。Multabody施用耐受良好,没有体重下降或可见的毒性迹象。另外,Multabody显示了具有与亲本IgG混合物类似的衰减率的数天体内暴露(图10)。此数据证明了Multabody平台生成具有生物利用度特性的分子并且为其可开发性提供一组令人鼓舞的初始体内验证的可行性。

[0627] 参考文献

[0628] 1.Conley,A.J.et al.Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5,an anti-gp41 human monoclonal antibody.Proc.Natl.Acad.Sci.(2006)doi:10.1073/pnas.91.8.3348。

[0629] 2.Stiegler,G.et al.A Potent Cross-Clade Neutralizing Human Monoclonal Antibody against a Novel Epitope on gp41 of Human Immunodeficiency Virus Type 1.AIDS Res.Hum.Retroviruses(2002)doi:10.1089/08892220152741450。

[0630] 3.Zwick,M.B.et al.Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41.J.Virol.(2002)doi:10.1128/jvi.75.22.10892-10905.2001。

[0631] 4.BUCHACHER,A.et al.Generation of Human Monoclonal Antibodies against HIV-1 Proteins;Electrofusion and Epstein-Barr Virus Transformation for Peripheral Blood Lymphocyte Immortalization.AIDS Res.Hum.Retroviruses(2009)doi:10.1089/aid.1994.10.359。

[0632] 5.Barbas,C.F.et al.Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1992)。

[0633] 6.Burton,D.R.et al.Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody.Science(80-.).(1994)doi:10.1126/science.7973652。

[0634] 7.Wu,X.et al.Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1.Science(80-.).(2010)doi:10.1126/science.1187659。

[0635] 8.Scheid,J.F.et al.Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals.Nature(2009)doi:10.1038/nature07930。

[0636] 9.Sok,D.et al.A Recombinant HIV Envelope Trimer Selects for Quaternary Dependent Antibodies Targeting the Trimer Apex.AIDS Res.Hum.Retroviruses(2014)doi:10.1089/aid.2014.5002.abstract。

[0637] 10.Walker,L.M.et al.Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target TL-326.Science(80-.).(2009)doi:10.1126/science.1178746。

- [0638] 11.Walker,L.M.et al.Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies.Nature(2011)doi:10.1038/nature10373。
- [0639] 12.Doria-Rose,N.A.et al.Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies.Nature(2014)doi:10.1038/nature13036。
- [0640] 13.Huang,J.et al.Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody.Nature(2012)doi:10.1038/nature11544。
- [0641] 14.Sajadi,M.M.et al.Identification of Near-Pan-neutralizing Antibodies against HIV-1 by Deconvolution of Plasma Humoral Responses.Cell(2018)doi:10.1016/j.cell.2018.03.061。
- [0642] 15.Scheid,J.F.et al.Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding.Science(80-.).(2011)doi:10.1126/science.1207227。
- [0643] 16.Huang,J.et al.Identification of a CD4-Binding-Site Antibody to HIV that Evolved Near-Pan Neutralization Breadth.Immunity(2016)doi:10.1016/j.immuni.2016.10.027。
- [0644] 17.Pejchal,R.et al.A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield.Science(80-.).(2011)doi:10.1126/science.1213256。
- [0645] 18.Blattner,C.et al.Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 env trimers.Immunity(2014)doi:10.1016/j.immuni.2014.04.008。
- [0646] 19.Mouquet,H.et al.Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies.Proc.Natl.Acad.Sci.(2012)doi:10.1073/pnas.1217207109。
- [0647] 20.Baba,T.W.et al.Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection.Nat.Med.(2000)doi:10.1038/72309。
- [0648] 21.Hessell,A.J.et al.Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques.Nat.Med.(2009)doi:10.1038/nm.1974。
- [0649] 22.Hessell,A.J.et al.Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers.PLoS Pathog.(2009)doi:10.1371/journal.ppat.1000433。
- [0650] 23.Hofmann-Lehmann,R.et al.Postnatal pre- and postexposure passive immunization strategies: Protection of neonatal macaques against oral simian-human immunodeficiency virus challenge.J.Med.Primatol.(2002)doi:10.1034/j.1600-0684.2002.01014.x。
- [0651] 24.Hofmann-Lehmann,R.et al.Postnatal Passive Immunization of Neonatal Macaques with a Triple Combination of Human Monoclonal Antibodies against Oral

Simian-Human Immunodeficiency Virus Challenge.J.Virol. (2002) doi:10.1128/jvi.75.16.7470-7480.2001。

[0652] 25.van der Velden,Y.U.et al.Short Communication:Protective Efficacyof Broadly Neutralizing Antibody PGDM1400 Against HIV-1 Challenge inHumanized Mice.AIDS Res.Hum.Retroviruses(2018)doi:10.1089/aid.2018.0114。

[0653] 26.Klein,F.et al.HIV therapy by a combination of broadly neutralizingantibodies in humanized mice.Nature(2012)doi:10.1038/nature11604。

[0654] 27.Deruaz,M.et al.Protection of humanized mice from repeatedintravaginal HIV challenge by passive immunization:Amodel for studying theefficacy of neutralizing antibodies in vivo.J.Infect.Dis. (2016) doi:10.1093/infdis/jiw203。

[0655] 28.Horwitz,J.A.et al.HIV-1 suppression and durable control bycombining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs inhumanized mice.Proc.Natl.Acad.Sci. (2013)doi:10.1073/pnas.1315295110。

[0656] 29.Mehandru,S.et al.Adjunctive Passive Immunotherapy in HumanImmunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals Treated with AntiviralTherapy during Acute and Early Infection.J.Virol. (2007)doi:10.1128/jvi.01340-07。

[0657] 30.Caskey,M.et al.Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans bybroadly neutralizing antibody 3BNC117.Nature(2015)doi:10.1038/nature14411。

[0658] 31.Caskey,M.et al.Antibody 10-1074 suppresses viremia inHIV-1-infected individuals.Nat.Med. (2017)doi:10.1038/nm.4268。

[0659] 32.Lynch,R.M.et al.Virologic effects of broadly neutralizing antibodyVRC01 administration during chronic HIV-1 infection.Sci.Transl.Med. (2015)doi:10.1126/scitranslmed.aad5752。

[0660] 33.Ledgerwood,J.E.et al.Safety,pharmacokinetics and neutralization ofthe broadly neutralizing HIV-1 human monoclonal antibody VRC01 in healthyadults.Clin.Exp.Immunol. (2015)doi:10.1111/cei.12692。

[0661] 34.Toma,J.et al.Loss of Asparagine-Linked Glycosylation Sites inVariable Region 5 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope IsAssociated with Resistance to CD4 Antibody Ibalizumab.J.Virol. (2011)doi: 10.1128/jvi.02237-10。

[0662] 35.Jacobson,J.M.et al.Antiviral Activity of Single-Dose PRO 140,aCCR5 Monoclonal Antibody,in HIV-Infected Adults.J.Infect.Dis. (2008)doi:10.1086/592169。

[0663] 36.Onafuwa-Nuga,A.&Telesnitsky,A.The Remarkable Frequency ofHuman Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Recombination.Microbiol.Mol.Biol.Rev. (2009)doi:10.1128/mmbr.00012-09。

[0664] 37.Sather,D.N.et al.Broadly Neutralizing Antibodies Developed by

anHIV-Positive Elite Neutralizer Exact a Replication Fitness Cost on theContemporaneous Virus.J.Virol. (2012)doi:10.1128/JVI.01893-12。

[0665] 38.Lynch,R.M.et al.HIV-1 Fitness Cost Associated with Escape fromthe VRC01 Class of CD4 Binding Site Neutralizing Antibodies.J.Virol. (2015)doi: 10.1128/jvi.03608-14。

[0666] 39.Pietzsch,J.et al.Human anti-HIV-neutralizing antibodies frequentlytarget a conserved epitope essential for viral fitness.J.Exp.Med. (2010)doi:10.1084/jem.20101176。

[0667] 40.Asokan,M.et al.Bispecific Antibodies Targeting Different Epitopeson the HIV-1 Envelope Exhibit Broad and Potent Neutralization.J.Virol. (2015)doi:10.1128/jvi.02097-15。

[0668] 41.Bournazos,S.,Gazumyan,A.,Seaman,M.S.,Nussenzweig,M.C.&Ravetch, J.V.Bispecific Anti-HIV-1 Antibodies with Enhanced Breadth andPotency.Cell (2016)doi:10.1016/j.cell.2016.04.050。

[0669] 42.Huang,Y.et al.Engineered Bispecific Antibodies with ExquisiteHIV-1-Neutralizing Activity.Cell(2016)doi:10.1016/j.cell.2016.05.024。

[0670] 43.Xu,L.et al.Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediatepotent SHIV protection in macaques.Science(80-.). (2017)doi:10.1126/science.aan8630。

[0671] 44.Steinhardt,J.J.et al.Rational design of a trispecific antibody targeting the HIV-1 Env with elevated anti-viral activity.Nat.Commun. (2018) doi:10.1038/s41467-018-03335-4。

[0672] 45.Khan,S.N.et al.Targeting the HIV-1 Spike and Coreceptor with Bi- and Trispecific Antibodies for Single-Component Broad Inhibition of Entry.J.Virol. (2018)doi:10.1128/jvi.00384-18。

[0673] 46.Rudicell,R.S.et al.Enhanced Potency of a Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody In Vitro Improves Protection against Lentiviral Infection In Vivo.J.Virol. (2014)doi:10.1128/JVI.02213-14。

[0674] 47.Kwon,Y.D.et al.Surface-Matrix Screening Identifies Semi-specific Interactions that Improve Potency of a Near Pan-reactive HIV-1-Neutralizing Antibody.Cell Rep. (2018)doi:10.1016/j.celrep.2018.01.023。

[0675] 48.Rujas,E.et al.Functional Optimization of Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 10E8 by Promotion of Membrane Interactions.J.Virol. (2018)doi: 10.1128/jvi.02249-17。

[0676] 49.Diskin,R.et al.Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design.Science(80-.). (2011)doi: 10.1126/science.1213782。

[0677] 50.Rujas,E.et al.Multivalency transforms SARS-CoV-2 antibodies into broad and ultrapotent neutralizers.bioRxiv(2020)。

[0678] 51.Kwon,Y.D.et al.Optimization of the Solubility of HIV-1-Neutralizing Antibody 10E8 through Somatic Variation and Structure-Based Design.J.Virol.(2016)doi:10.1128/jvi.03246-15。

[0679] 52.Montefiori,D.C.Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay.Methods Mol.Biol.(2009)doi:10.1007/978-1-59745-170-3_26。

序列表

<110> 儿童医院

<120> Multabody构建体、组合物和方法

<130> 3206-5048 (171554) ELL

<140> Unknown

<141> 2022-01-28

<150> US 63/142704

<151> 2021-01-28

<160> 17

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 90

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱铁铁蛋白的“N”区

<400> 1

```
Met Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala Ala
1           5           10           15
Val Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu
          20           25           30
Ser Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly Val
          35           40           45
Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Glu
          50           55           60
Arg Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Gln
65           70           75           80
Asp Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp
          85           90
```

<210> 2

<211> 85

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱铁铁蛋白的“C”区

<400> 2

```
Gly Lys Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys
1           5           10           15
```

Leu Asn Gln Ala Leu Leu Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr
 20 25 30
 Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu
 35 40 45
 Val Lys Leu Ile Lys Lys Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg
 50 55 60
 Leu Gly Gly Pro Glu Ala Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu
 65 70 75 80
 Thr Leu Arg His Asp
 85

<210> 3

<211> 70

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 65 70

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

20 25

<210> 6

<211> 175

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala Ala

1 5 10 15

Val Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu

20 25 30

Ser Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly Val

35 40 45

Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Glu

50 55 60

Arg Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Gln

65 70 75 80

Asp Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp Gly Lys Thr Pro Asp Ala

85 90 95

Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu Asn Gln Ala Leu Leu

100 105 110

Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp Pro His Leu Cys Asp

115 120 125

Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys

130 135 140

Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Pro Glu Ala

145 150 155 160

Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr Leu Arg His Asp

165 170 175

<210> 7

<211> 621

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N49P7_N-铁蛋白

<400> 7

Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	His	Asn	Leu	Val	Ser	Trp	Cys
			20					25						30	
Gln	His	Gln	Pro	Gly	Arg	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Phe	Asn
			35					40						45	
Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
			50					55						60	
Gly	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Asp	Ala
65						70				75					80
Glu	Tyr	Phe	Cys	Trp	Ala	Tyr	Glu	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
						85				90					95
Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro
						100				105					110
Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu
						115				120					125
Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp
						130									140
Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln
145						150									160
Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu
						165				170					175
Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly
						180				185					190
Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly
						195				200					205
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
						210									220
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
225						230				235					240
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
						245				250					255
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
						260				265					270

Gly Ser Ala Asp Leu Val Gln Ser Gly Ala Val Val Lys Lys Pro Gly		
275	280	285
Asp Ser Val Arg Ile Ser Cys Glu Ala Gln Gly Tyr Arg Phe Pro Asp		
290	295	300
Tyr Ile Ile His Trp Ile Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp		
305	310	315
Met Gly Trp Met Asn Pro Met Gly Gly Gln Val Asn Ile Pro Trp Lys		
	325	330
Phe Gln Gly Arg Val Ser Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Glu Thr Ala		
	340	345
Phe Leu Asp Leu Arg Gly Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
	355	360
Cys Val Arg Asp Arg Ser Asn Gly Ser Gly Lys Arg Phe Glu Ser Ser		
370	375	380
Asn Trp Phe Leu Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Ala Val Thr Ile Gln		
385	390	395
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
	405	410
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
	420	425
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
	435	440
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
450	455	460
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
465	470	475
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
	485	490
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
	500	505
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	515	520
Ser Gly Gly Met Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val		
530	535	540
Glu Ala Ala Val Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr		
545	550	555
Thr Tyr Leu Ser Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu		
	565	570
Glu Gly Val Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu		

	580		585		590
Gly Tyr Glu Arg Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala					
	595		600		605
Leu Phe Gln Asp Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp					
	610		615		620
<210> 8					
<211> 736					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> PGDM1400_h铁蛋白					
<400> 8					
Asp Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro His Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser His Ser Leu Ile His Gly					
	20		25		30
Asp Arg Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Val Gln Lys Pro Gly Arg Ser					
	35		40		45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro					
	50		55		60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
65	70		75		80
Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Gly					
	85		90		95
Arg Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys					
	100		105		110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu					
	115		120		125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe					
	130		135		140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln					
145	150		155		160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser					
	165		170		175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu					
	180		185		190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser					
	195		200		205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser					

210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
225	230	235
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
245	250	255
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
260	265	270
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
275	280	285
Ser Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Arg Lys Pro Gly		
290	295	300
Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Gly Asn Thr Leu Lys Thr		
305	310	315
Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Ser Val Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp		
325	330	335
Met Gly Trp Ile Ser His Glu Gly Asp Lys Lys Val Ile Val Glu Arg		
340	345	350
Phe Lys Ala Lys Val Thr Ile Asp Trp Asp Arg Ser Thr Asn Thr Ala		
355	360	365
Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
370	375	380
Cys Ala Lys Gly Ser Lys His Arg Leu Arg Asp Tyr Ala Leu Tyr Asp		
385	390	395
Asp Asp Gly Ala Leu Asn Trp Ala Val Asp Val Asp Tyr Leu Ser Asn		
405	410	415
Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
420	425	430
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
435	440	445
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
450	455	460
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
465	470	475
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
485	490	495
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
500	505	510
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
515	520	525

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
530	535	540	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
545	550	555	560
Gly Met Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala			
	565	570	575
Ala Val Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr			
	580	585	590
Leu Ser Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly			
	595	600	605
Val Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr			
	610	615	620
Glu Arg Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe			
625	630	635	640
Gln Asp Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp Gly Lys Thr Pro Asp			
	645	650	655
Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu Asn Gln Ala Leu			
	660	665	670
Leu Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp Pro His Leu Cys			
	675	680	685
Asp Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys			
	690	695	700
Lys Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Pro Glu			
705	710	715	720
Ala Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr Leu Arg His Asp			
	725	730	735
<210> 9			
<211> 881			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 10E8v4_C-铁蛋白_Fc1			
<400> 9			
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Lys Gln Thr			
1	5	10	15
Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Asp Ser Leu Arg Ser His Tyr Ala Ser			
	20	25	30
Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Phe Tyr Gly			
	35	40	45

Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ala
50						55					60				
Ser	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp
65					70					75				80	
Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	Gly	Ser	Arg	Leu
				85					90					95	
Ser	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys
			100					105					110		
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln
			115					120					125		
Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Gly
			130				135					140			
Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	Gly
145					150					155				160	
Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala
				165					170					175	
Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	Ser
			180					185					190		
Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	Val
			195					200					205		
Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			210				215					220			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
225					230					235				240	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
				245					250					255	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
			260					265					270		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Arg	Leu	Val
			275				280						285		
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
			290				295					300			
Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Asp	Asn	Ala	Trp	Met	Thr	Trp	Val
305					310					315				320	
Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Thr	Gly
				325					330					335	
Pro	Gly	Glu	Gly	Trp	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
			340					345					350		
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Thr	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Met

355	360	365
Asn Asn Val Arg Thr Glu Asp Thr Gly Tyr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr		
370	375	380
Gly Lys Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Gly Glu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Gln Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Ala Ser		
405	410	415
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
420	425	430
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
435	440	445
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
450	455	460
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
465	470	475
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
485	490	495
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
500	505	510
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
515	520	525
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
530	535	540
Lys Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu		
545	550	555
Asn Gln Ala Leu Leu Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp		
565	570	575
Pro His Leu Cys Asp Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val		
580	585	590
Lys Leu Ile Lys Lys Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu		
595	600	605
Gly Gly Pro Glu Ala Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr		
610	615	620
Leu Arg His Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
625	630	635
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Lys		
645	650	655
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
660	665	670

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 675 680 685
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 690 695 700
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 705 710 715 720
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 725 730 735
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 740 745 750
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 770 775 780
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 785 790 795 800
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 805 810 815
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 820 825 830
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 835 840 845
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 850 855 860
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 865 870 875 880
 Lys

<210> 10

<211> 883

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10E8v4_C-铁蛋白_Fc1-LS

<400> 10

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

35	40	45
Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala		
50	55	60
Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp		
65	70	75
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Lys Ser Gly Ser Arg Leu		
85	90	95
Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys		
100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln		
115	120	125
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly		
130	135	140
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly		
145	150	155
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala		
165	170	175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser		
180	185	190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val		
195	200	205
Ala Pro Thr Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
210	215	220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
225	230	235
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
245	250	255
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
260	265	270
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Arg Leu Val		
275	280	285
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser		
290	295	300
Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asp Asn Ala Trp Met Thr Trp Val		
305	310	315
Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Thr Gly		
325	330	335
Pro Gly Glu Gly Trp Ser Val Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg		
340	345	350

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met		
355	360	365
Asn Asn Val Arg Thr Glu Asp Thr Gly Tyr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr		
370	375	380
Gly Lys Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Gly Glu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Gln Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Ala Ser		
405	410	415
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
420	425	430
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
435	440	445
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
450	455	460
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
465	470	475
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
485	490	495
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
500	505	510
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
515	520	525
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
530	535	540
Gly Gly Lys Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys		
545	550	555
Lys Leu Asn Gln Ala Leu Leu Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg		
565	570	575
Thr Asp Pro His Leu Cys Asp Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu		
580	585	590
Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His		
595	600	605
Arg Leu Gly Gly Pro Glu Ala Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg		
610	615	620
Leu Thr Leu Arg His Asp Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
625	630	635
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly		
645	650	655
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		

660	665	670
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
675	680	685
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
690	695	700
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly Val Glu Val	
705	710	715
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
725	730	735
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
740	745	750
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
755	760	765
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
770	775	780
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
785	790	795
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
805	810	815
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
820	825	830
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
835	840	845
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu		
850	855	860
His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
865	870	875
		880
Pro Gly Lys		
<210> 11		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 接头		
<400> 11		
Gly Gly Gly Ser		
1		
<210> 12		
<211> 5		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 13

<211> 1178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10E8v4_C-铁蛋白_Fc

<400> 13

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Lys Gln Thr

1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Asp Ser Leu Arg Ser His Tyr Ala Ser

20 25 30

Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Phe Tyr Gly

35 40 45

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala

50 55 60

Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp

65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Lys Ser Gly Ser Arg Leu

85 90 95

Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro Lys

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln

115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly

145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala

165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser

180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val

195	200	205
Ala Pro Thr Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
210	215	220
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
225	230	235
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
245	250	255
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
260	265	270
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Arg Leu Val		
275	280	285
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser		
290	295	300
Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Asp Asn Ala Trp Met Thr Trp Val		
305	310	315
Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Thr Gly		
325	330	335
Pro Gly Glu Gly Trp Ser Val Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg		
340	345	350
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met		
355	360	365
Asn Asn Val Arg Thr Glu Asp Thr Gly Tyr Tyr Phe Cys Ala Arg Thr		
370	375	380
Gly Lys Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Gly Glu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Gln Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Ala Ser		
405	410	415
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr		
420	425	430
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
435	440	445
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
450	455	460
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
465	470	475
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
485	490	495
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
500	505	510

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
515	520	525
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
530	535	540
Lys Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu		
545	550	555
Asn Gln Ala Leu Leu Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp		
565	570	575
Pro His Leu Cys Asp Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val		
580	585	590
Lys Leu Ile Lys Lys Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu		
595	600	605
Gly Gly Pro Glu Ala Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr		
610	615	620
Leu Arg His Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
625	630	635
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp Lys		
645	650	655
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
660	665	670
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
675	680	685
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
690	695	700
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
705	710	715
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
725	730	735
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
740	745	750
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
755	760	765
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
770	775	780
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
785	790	795
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
805	810	815
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		

820	825	830
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
835	840	845
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
850	855	860
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
865	870	875
Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
885	890	895
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
900	905	910
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
915	920	925
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
930	935	940
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
945	950	955
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
965	970	975
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
980	985	990
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
995	1000	1005
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
1010	1015	1020
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
1025	1030	1035
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
1040	1045	1050
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
1055	1060	1065
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
1070	1075	1080
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
1085	1090	1095
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
1100	1105	1110
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
1115	1120	1125

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 1130 1135 1140
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 1145 1150 1155
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 1160 1165 1170
 Leu Ser Pro Gly Lys
 1175

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Flag标签

<400> 14

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 15

<211> 89

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱铁铁蛋白的"N"区

<400> 15

Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala Ala Val

1 5 10 15

Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Ser

20 25 30

Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly Val Ser

35 40 45

His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Glu Arg

50 55 60

Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Gln Asp

65 70 75 80

Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp

85

<210> 16

<211> 85

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 脱铁铁蛋白的“C”区

<400> 16

Gly	Lys	Thr	Pro	Asp	Ala	Met	Lys	Ala	Ala	Met	Ala	Leu	Glu	Lys	Lys
1				5				10					15		
Leu	Asn	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Leu	His	Ala	Leu	Gly	Ser	Ala	Arg	Thr
			20					25					30		
Asp	Pro	His	Leu	Cys	Asp	Phe	Leu	Glu	Thr	His	Phe	Leu	Asp	Glu	Glu
		35					40					45			
Val	Lys	Leu	Ile	Lys	Lys	Met	Gly	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Arg
	50					55					60				
Leu	Gly	Gly	Pro	Glu	Ala	Gly	Leu	Gly	Glu	Tyr	Leu	Phe	Glu	Arg	Leu
65					70					75					80
Thr	Leu	Lys	His	Asp											
				85											

<210> 17

<211> 734

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PGDM1400_h铁蛋白

<400> 17

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

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
130						135					140					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
				165					170					175		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
			180					185					190			
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
	195					200					205					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
210					215					220						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
225				230						235					240	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				245					250					255		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			260					265					270			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	275						280					285				
Ser	Gln	Ala	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Arg	Lys	Pro	Gly	
290					295					300						
Thr	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Pro	Gly	Asn	Thr	Leu	Lys	Thr	
305				310						315					320	
Tyr	Asp	Leu	His	Trp	Val	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	
				325					330					335		
Met	Gly	Trp	Ile	Ser	His	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Glu	Arg	
			340				345						350			
Phe	Lys	Ala	Lys	Val	Thr	Ile	Asp	Trp	Asp	Arg	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	
	355					360						365				
Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
370					375					380						
Cys	Ala	Lys	Gly	Ser	Lys	His	Arg	Leu	Arg	Asp	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Asp	
385				390						395					400	
Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Trp	Ala	Val	Asp	Val	Asp	Tyr	Leu	Ser	Asn	
				405					410					415		
Leu	Glu	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	
	420						425					430				
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	

435	440	445
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
450	455	460
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
465	470	475
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
485	490	495
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
500	505	510
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
515	520	525
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
530	535	540
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
545	550	555
Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala Ala Val		
565	570	575
Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Ser		
580	585	590
Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly Val Ser		
595	600	605
His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Glu Arg		
610	615	620
Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Gln Asp		
625	630	635
Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp Gly Lys Thr Pro Asp Ala Met		
645	650	655
Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu Asn Gln Ala Leu Leu Asp		
660	665	670
Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp Pro His Leu Cys Asp Phe		
675	680	685
Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys Met		
690	695	700
Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Pro Glu Ala Gly		
705	710	715
Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr Leu Lys His Asp		
725	730	

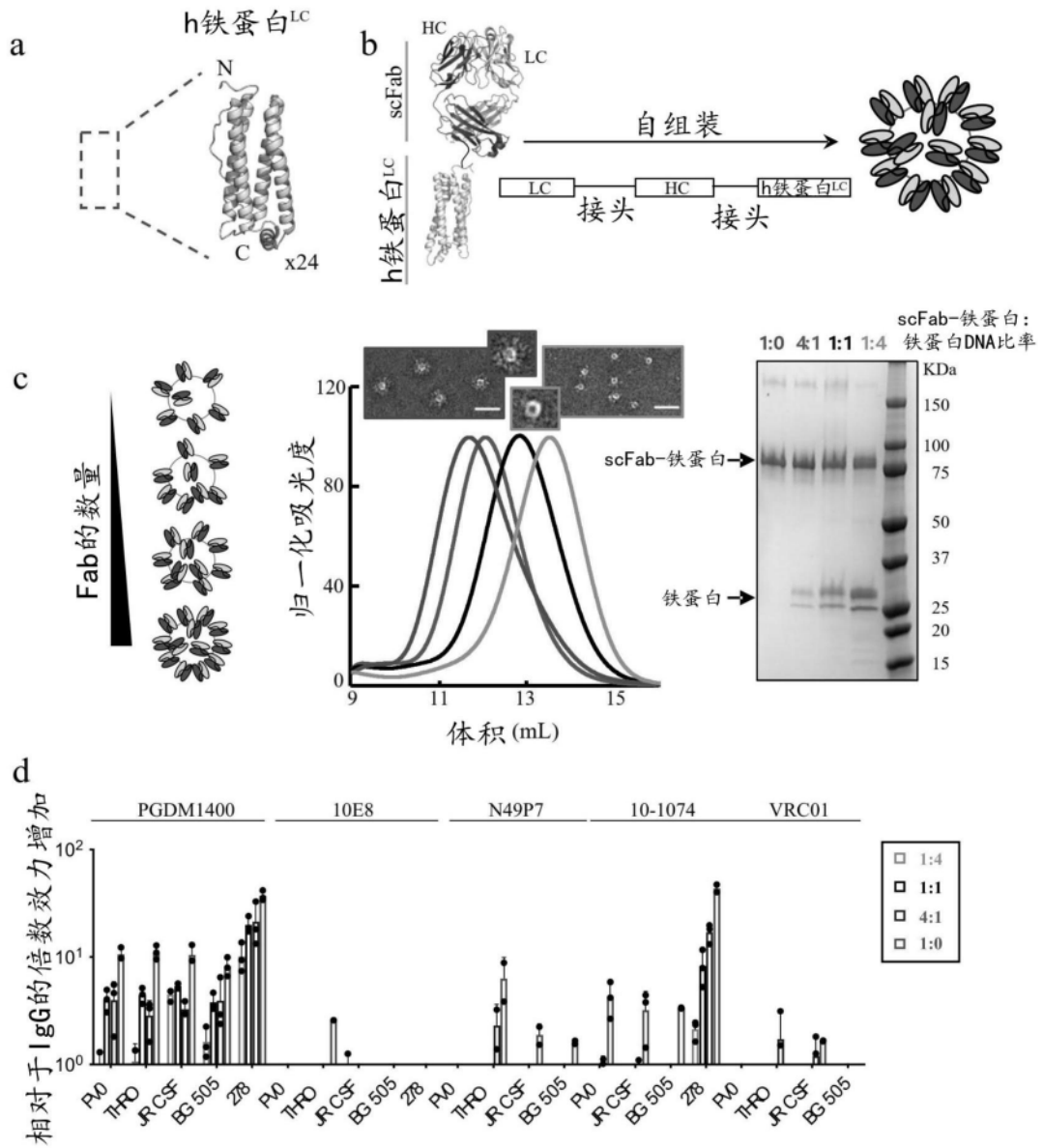


图1

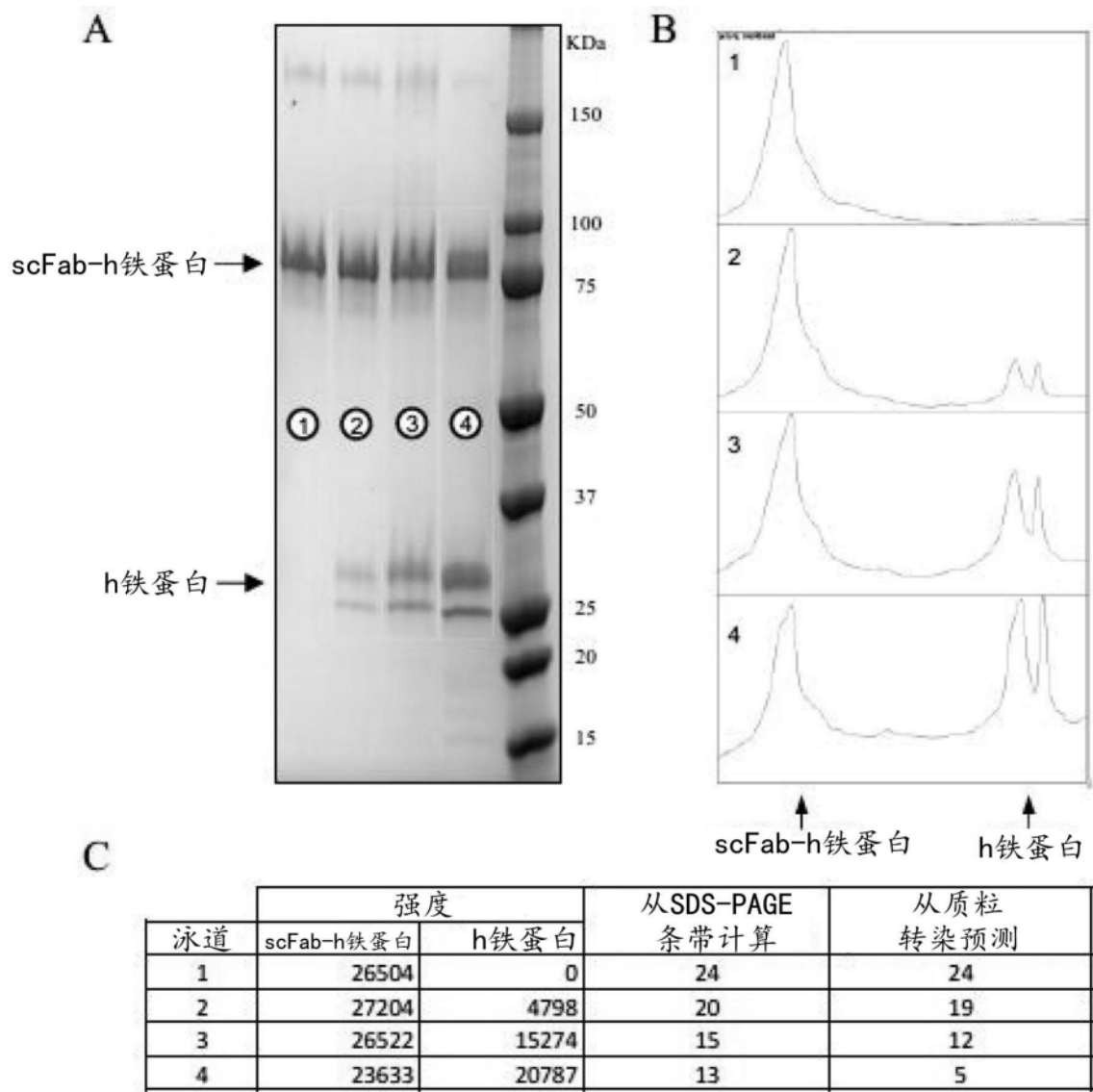


图2

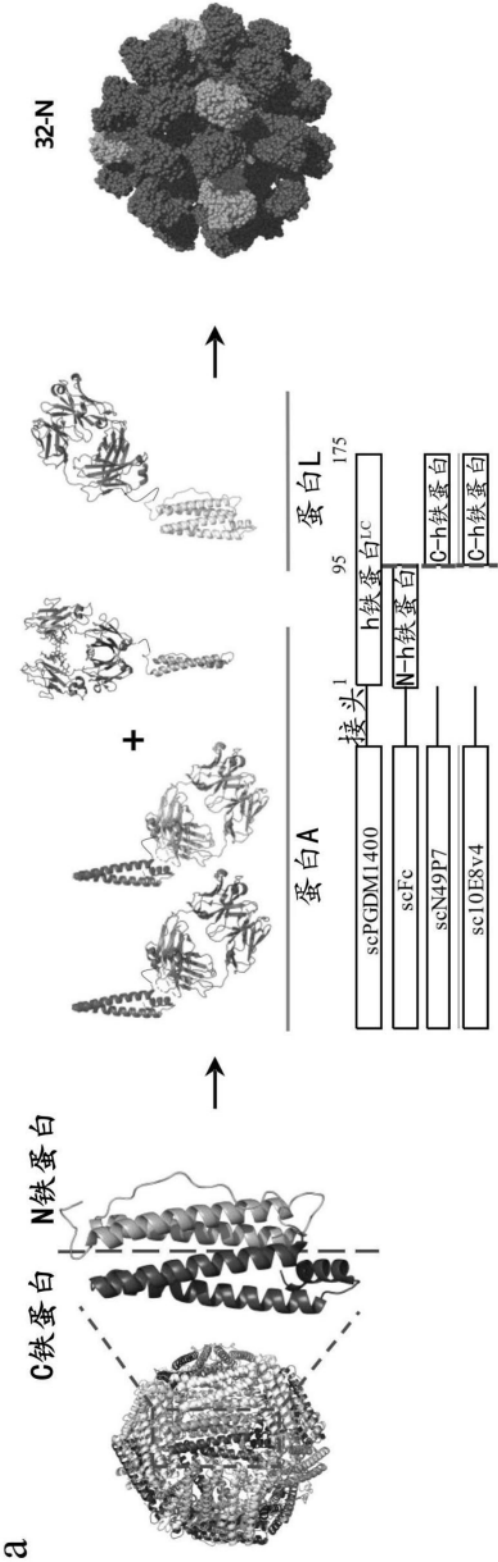


图3a

b

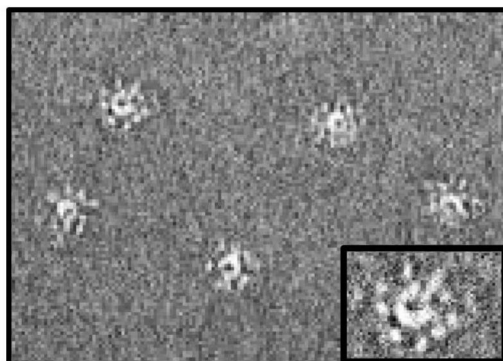


图3b

c

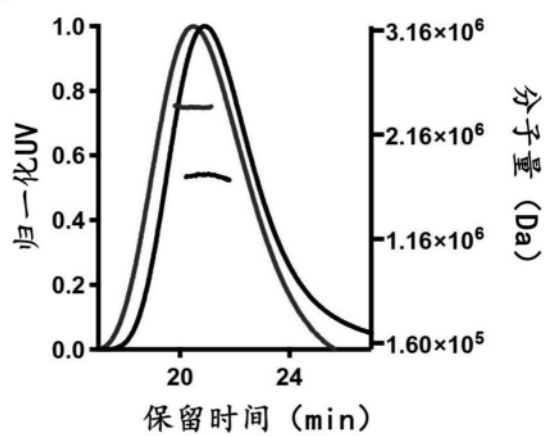


图3c

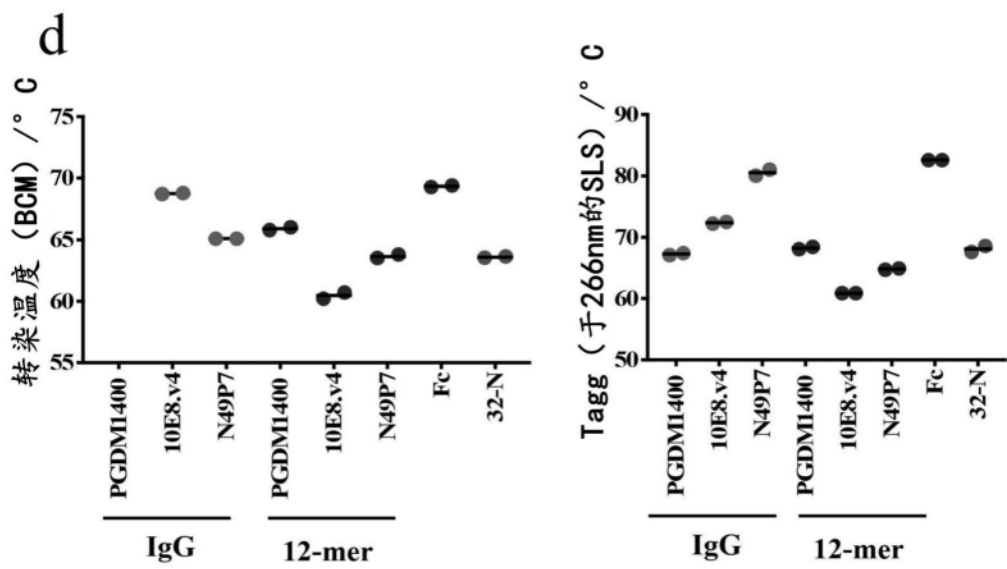


图3d

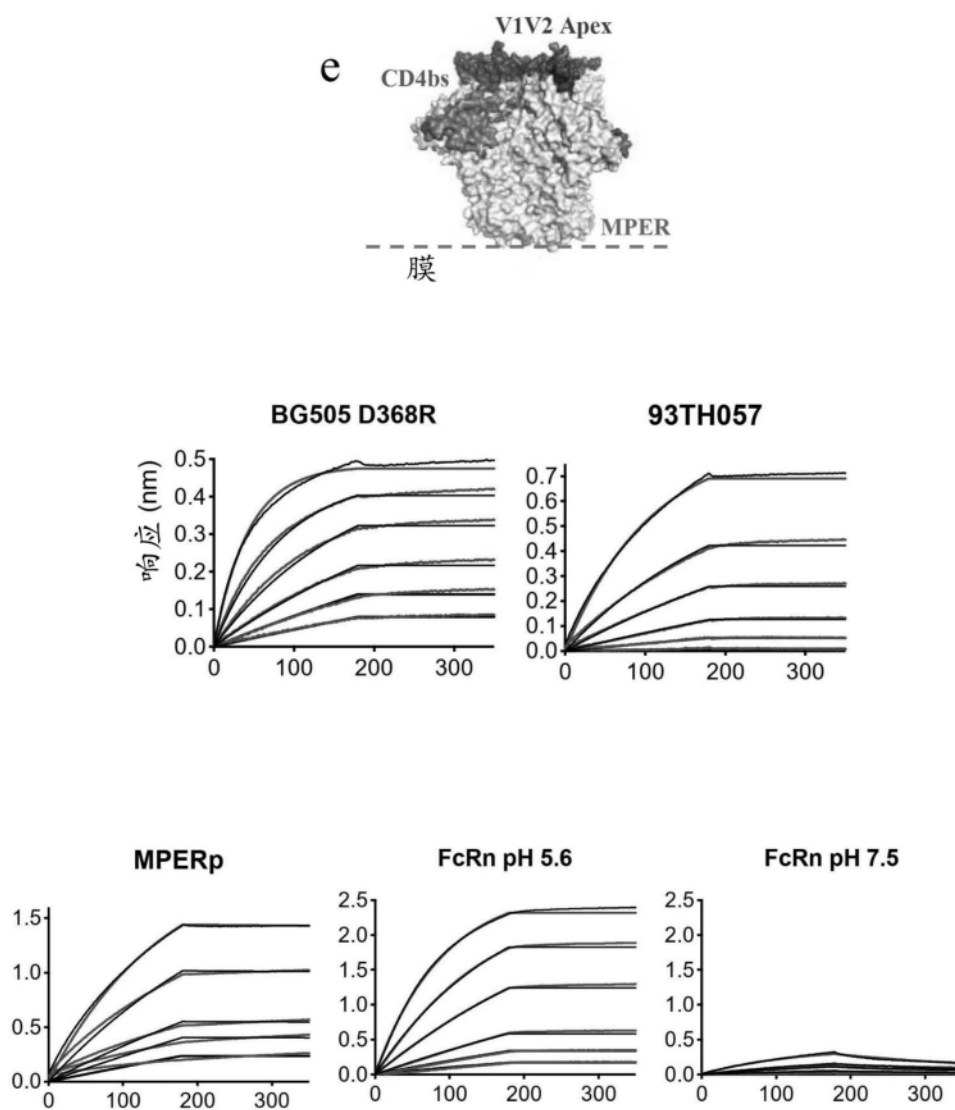


图3e

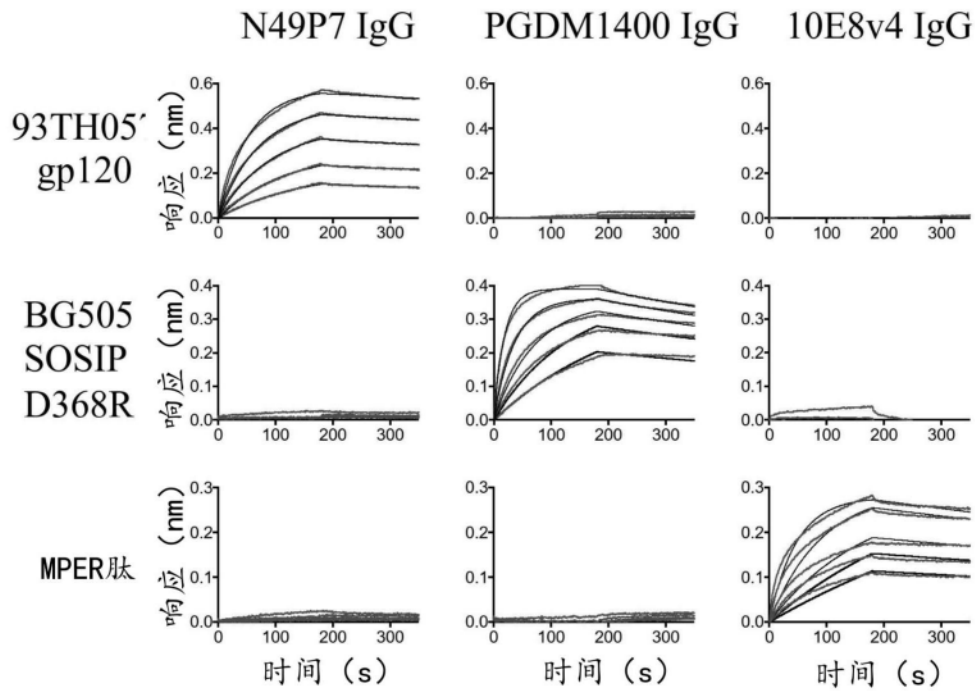
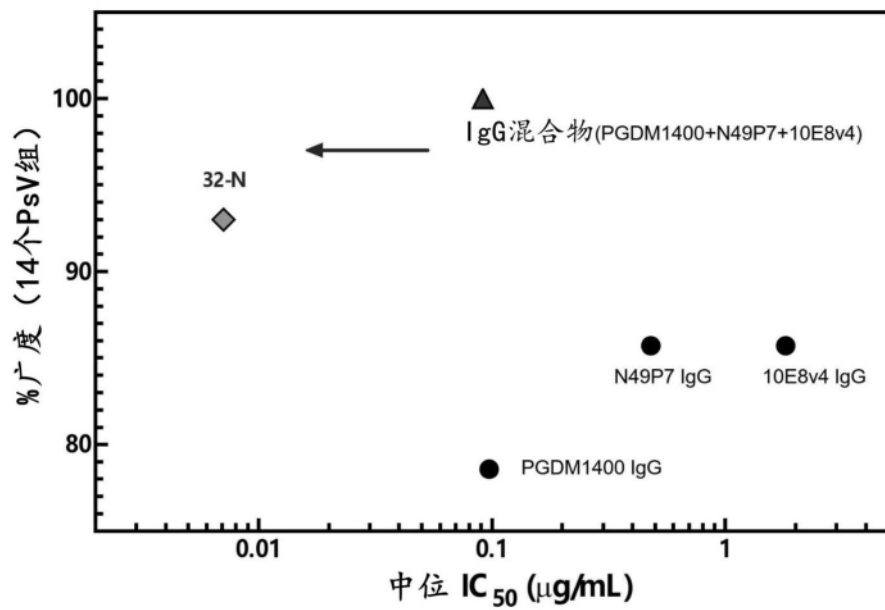


图4

a



b

HIV-1 PsV	IgG			IgG 混合物	32-N
	PGDM1400	N49P7	10E8v4		
CRF02_AG (克隆 257)	0.012	1.24	1.5	0.021	0.0048
CRF02_AG (克隆 278)	0.16	> 10	1.8	0.16	0.0065
X1632	0.018	> 10	2	0.042	0.0071
ZM106.9	0.013	0.18	> 10	0.016	0.006
JRCSF	0.0074	0.13	1.8	0.0081	0.0067
pTHRO4156	0.092	7.5	0.37	0.13	0.12
3817.V2	> 10	3.3	3.1	7.2	> 10
PVO, 克隆 4	1.26	0.28	6.3	0.85	0.11
X2088	> 10	0.38	> 10	1.5	0.96
Du422	6	9.9	0.55	0.25	8.5
ZM197M.PB7	0.1	0.58	0.19	0.031	0.022
pCNE8	0.0027	0.28	0.96	0.012	0.0029
BG 505	0.0032	0.21	1.36	0.0088	0.0065
SF162	> 10	0.15	3.03	0.56	2.5
广度	78	86	86	100	93
中位 IC_{50} ($\mu g/mL$)	0.071	0.33	1.65	0.086	0.0071

图5

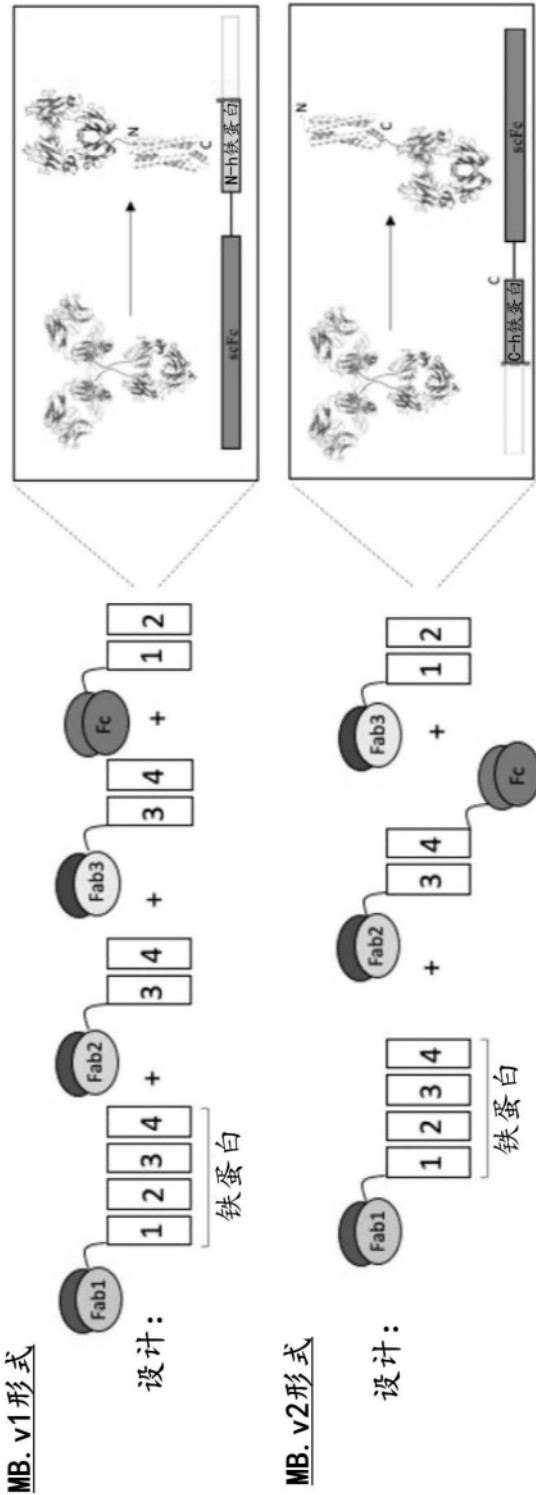
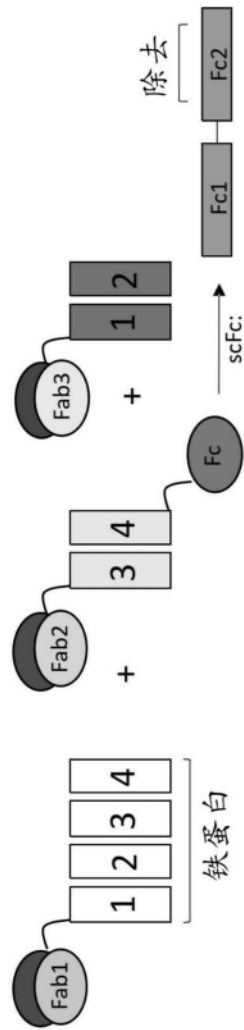


图6

a MB. v3形式

设计:



b

铁蛋白组装块 Fc组装块

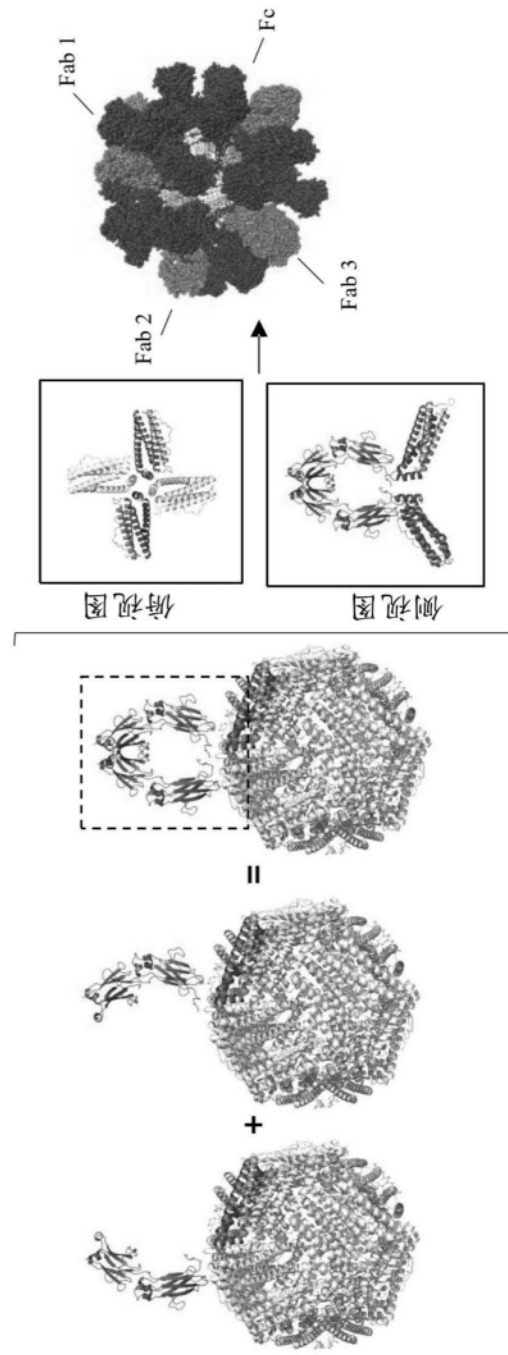


图7

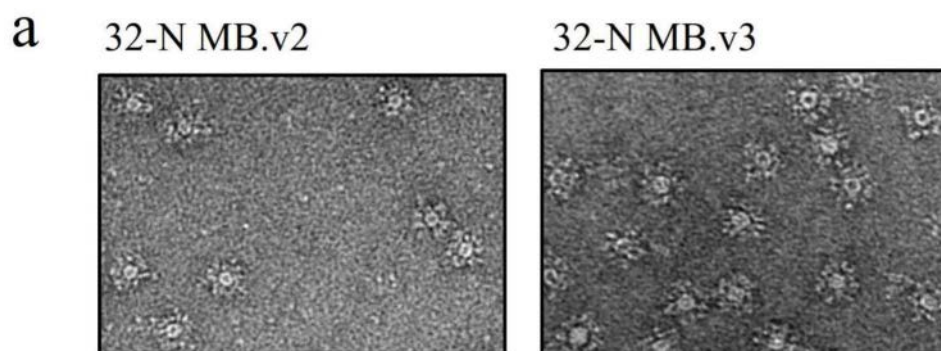


图8a

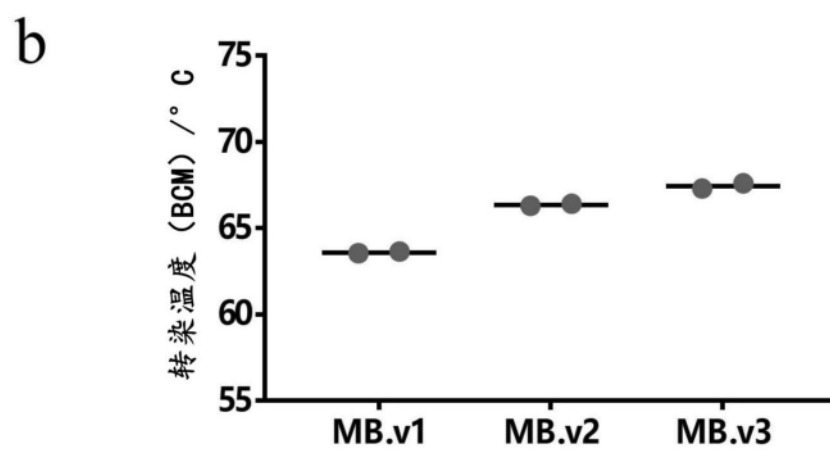


图8b

C

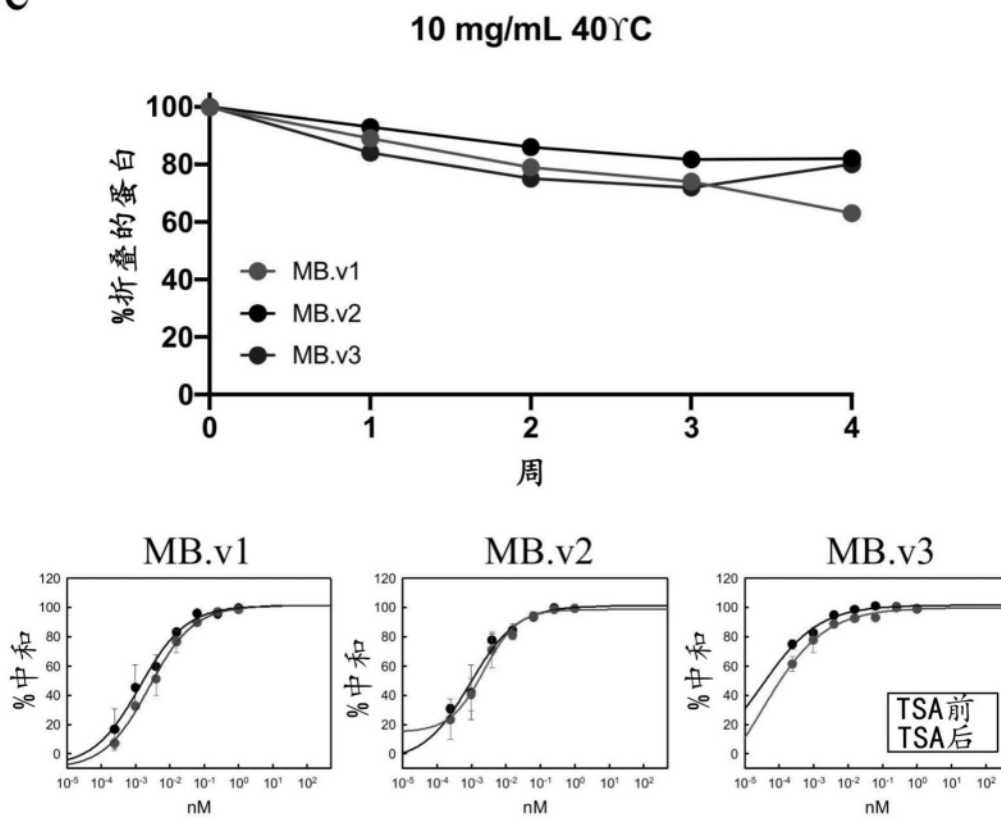


图8c

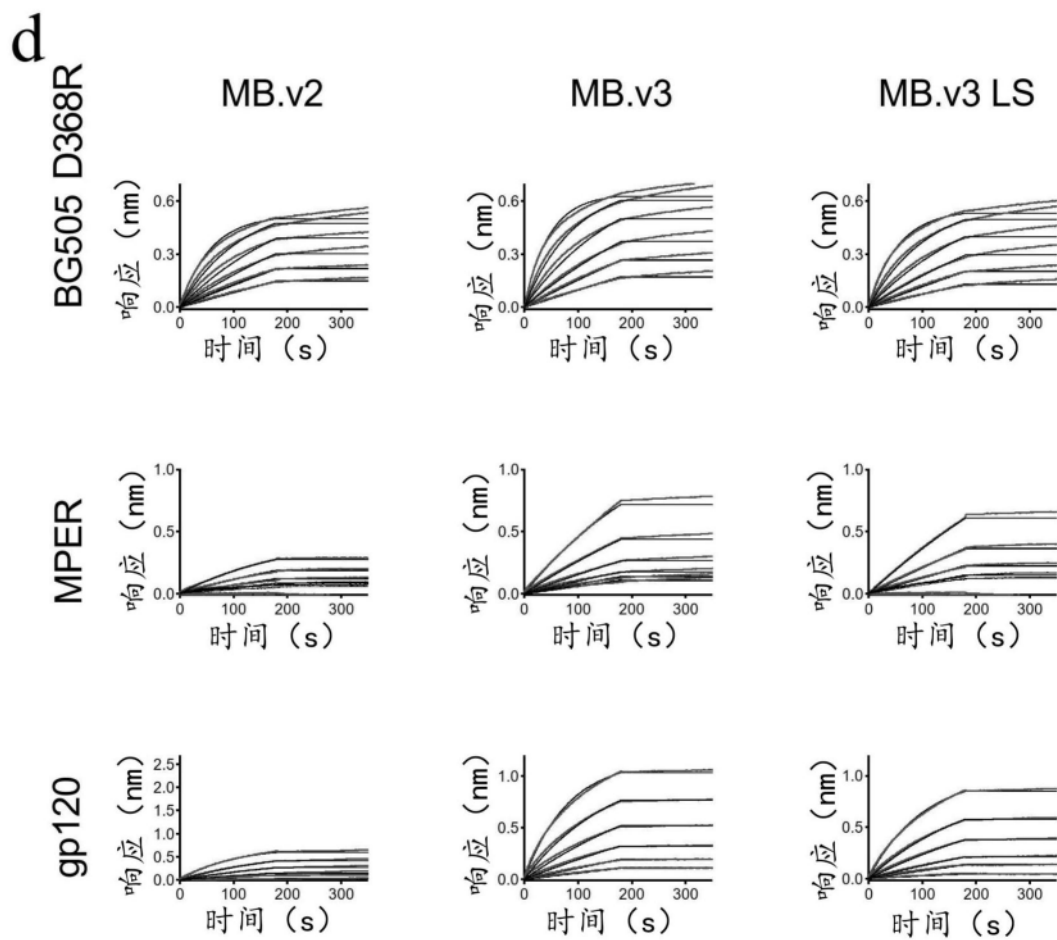


图8d

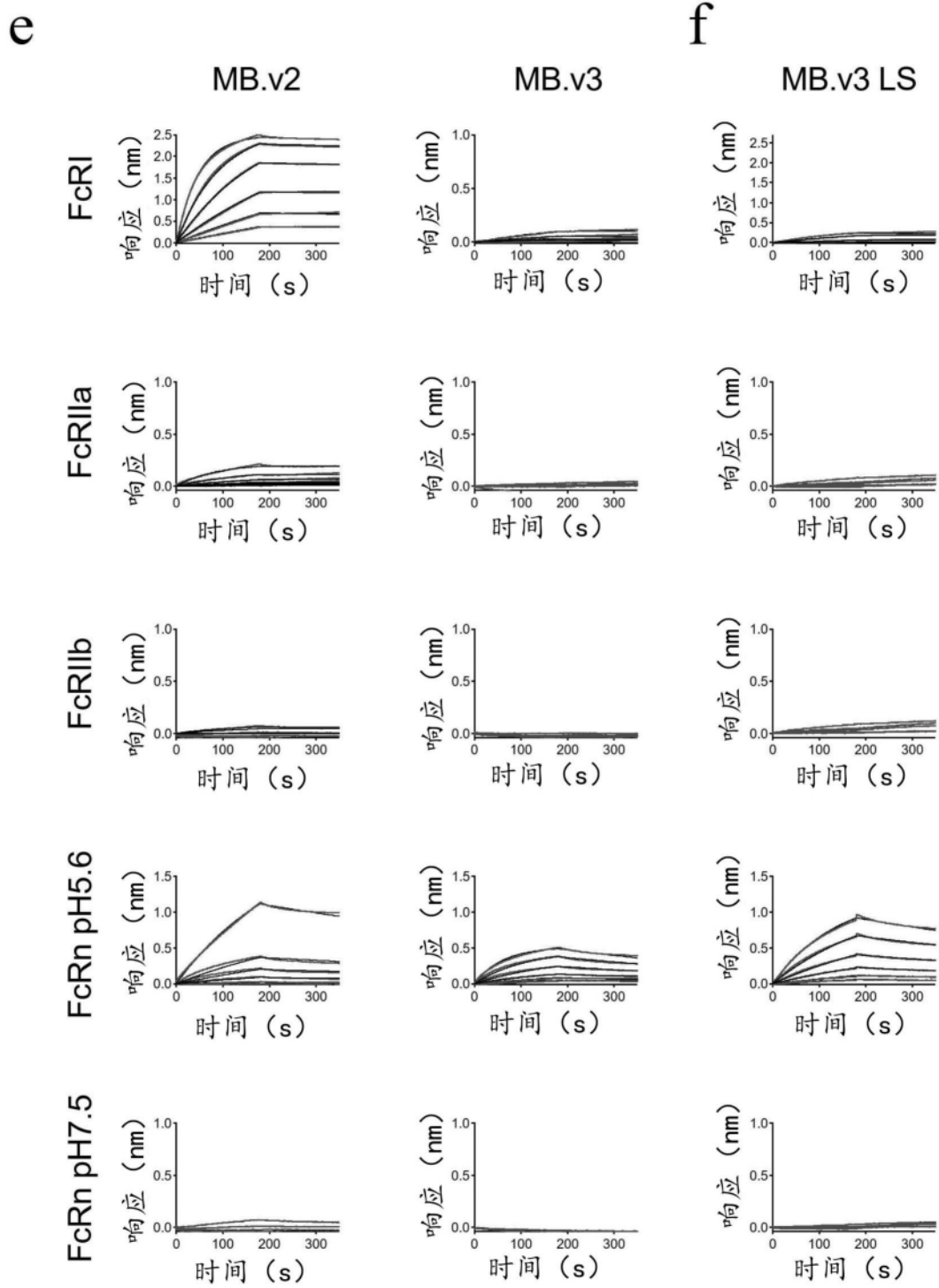


图8e, 8f

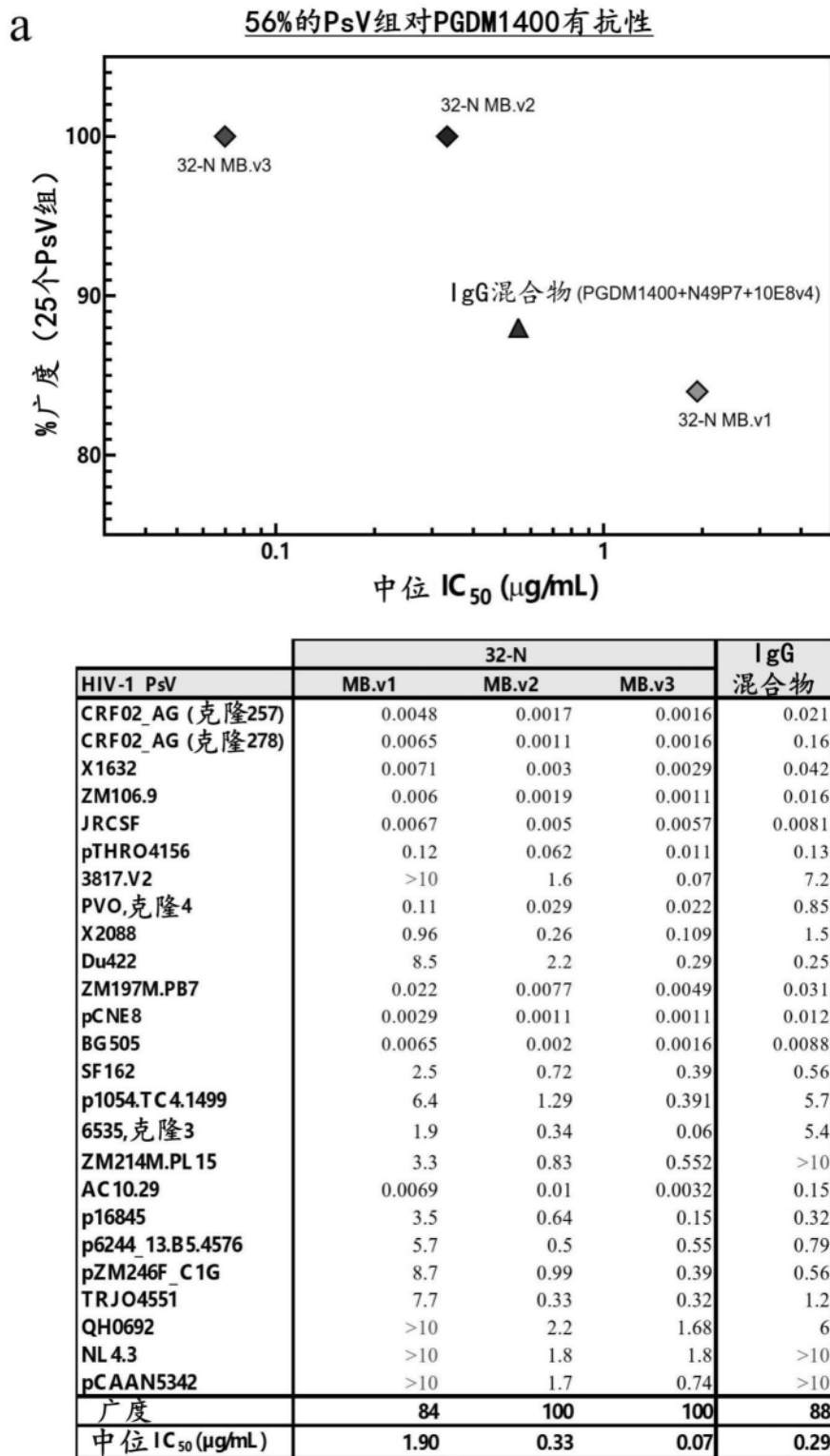
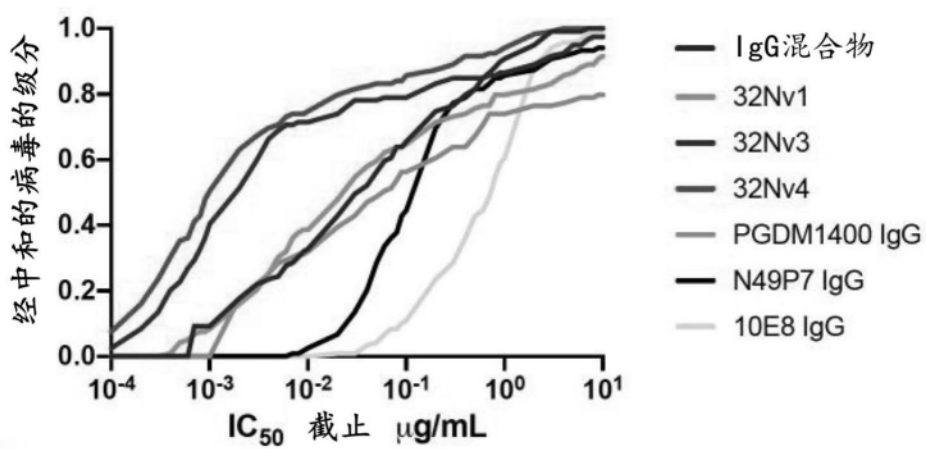


图9a

b

克量比较



克量比较

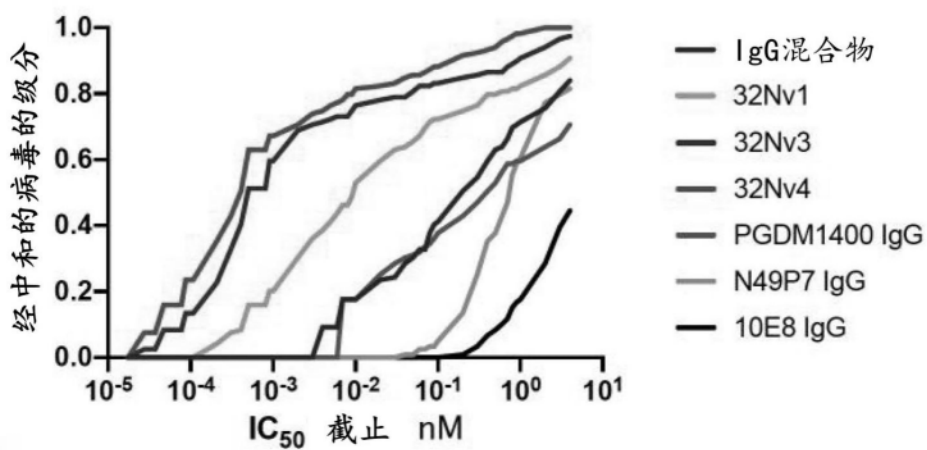


图9b

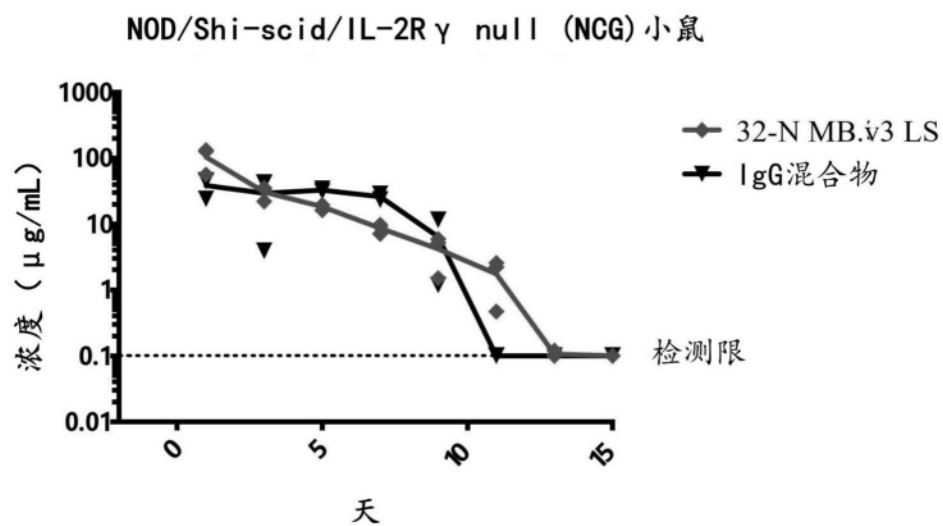


图10