



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202214307 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：110121471

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 11 日

(51)Int. Cl.：

*A61K47/69 (2017.01)**A61K47/64 (2017.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/06/11

美國

63/038,075

2021/02/19

美國

63/151,591

(71)申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：賓德 惠特利 BINDER, WHITNEY (US)；布蘭奇提 克雷格 D BLANCHETTE,

CRAIG D. (US)；達維許 馬婷 A DARWISH, MARTINE A. (US)；漢那許 拉

米 HANNOUSH, RAMI (US)；高 欣欣 GAO, XINXIN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：217 項 圖式數：14 共 232 頁

(54)名稱

奈米脂蛋白—多肽結合物及組成物、系統及其使用方法

(57)摘要

本發明概言之涉及包含至少一種多肽之奈米脂蛋白顆粒結合物及包含至少一種長度介於 20 至 60 個胺基酸之間的短肽的奈米脂蛋白顆粒結合物。亦提供相關組成物及系統以及其製備及使用方法。特定而言，提供具有抗原結合片段 (Fab) 之奈米脂蛋白顆粒 (NLP) 結合物，其中該 NLP 包含由支架蛋白質環繞之成膜脂質的雙層，且該等 Fab 結合至一個或兩個雙層表面。在一些實施例中，該等 (NLP) 結合物進一步包含長度為 20 至 60 個胺基酸之短肽。該等結合物以及相關組成物及系統通常展現良好的穩定性及可製造性，保留抗原結合活性，且可增強抗原結合效力，從而提供用於遞送 Fab 及基於 Fab 之治療劑及診斷劑之多功能平臺且提供用於遞送其他治療劑及/或診斷劑的穩定平臺。

The present invention generally relates to nanolipoprotein particle conjugates comprising at least one polypeptide and nanolipoprotein particle conjugates comprising at least one short peptide between 20-60 amino acids in length. Also provided are related compositions and systems, and methods of preparing and using same. In particular, nanolipoprotein particle (NLP) conjugates with antigen-binding fragments (Fabs) are provided, where the NLP comprises a bilayer of membrane-forming lipids encircled by scaffold proteins, and the Fabs are conjugated to one or both bilayer surfaces. In some embodiments, the (NLP) conjugates further comprise a short peptide 20-60 amino acids in length. The conjugates, and related compositions and systems, generally show good stability and manufacturability, retain antigen-binding activity, and can enhance antigen-binding potency, providing versatile platforms for delivery of Fab and Fab-based therapeutics and diagnostics, as well as providing stable platforms for delivering other therapeutic and/or diagnostic agents.

指定代表圖：

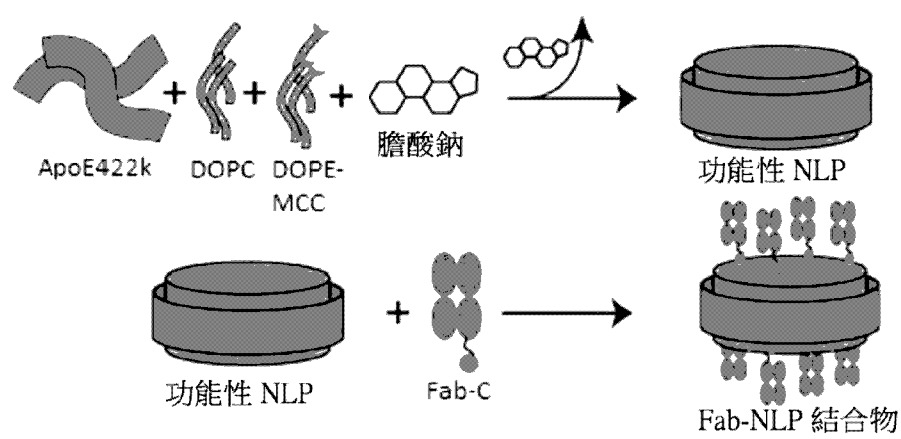


圖 1A

【發明摘要】

【中文發明名稱】 奈米脂蛋白-多肽結合物及組成物、系統及其使用方法

【英文發明名稱】 NANOLIPOPROTEIN-POLYPEPTIDE CONJUGATES

AND COMPOSITIONS, SYSTEMS, AND METHODS USING SAME

【中文】本發明概言之涉及包含至少一種多肽之奈米脂蛋白顆粒結合物及包含至少一種長度介於 20 至 60 個胺基酸之間的短肽的奈米脂蛋白顆粒結合物。亦提供相關組成物及系統以及其製備及使用方法。特定而言，提供具有抗原結合片段 (Fab) 之奈米脂蛋白顆粒 (NLP) 結合物，其中該 NLP 包含由支架蛋白質環繞之成膜脂質的雙層，且該等 Fab 結合至一個或兩個雙層表面。在一些實施例中，該等 (NLP) 結合物進一步包含長度為 20 至 60 個胺基酸之短肽。該等結合物以及相關組成物及系統通常展現良好的穩定性及可製造性，保留抗原結合活性，且可增強抗原結合效力，從而提供用於遞送 Fab 及基於 Fab 之治療劑及診斷劑之多功能平臺且提供用於遞送其他治療劑及/或診斷劑的穩定平臺。

【英文】The present invention generally relates to nanolipoprotein particle conjugates comprising at least one polypeptide and nanolipoprotein particle conjugates comprising at least one short peptide between 20-60 amino acids in length. Also provided are related compositions and systems, and methods of preparing and using same. In particular, nanolipoprotein particle (NLP) conjugates with antigen-binding fragments (Fabs) are provided, where the NLP comprises a bilayer of membrane-forming lipids encircled by scaffold proteins, and the Fabs are

conjugated to one or both bilayer surfaces. In some embodiments, the (NLP) conjugates further comprise a short peptide 20-60 amino acids in length. The conjugates, and related compositions and systems, generally show good stability and manufacturability, retain antigen-binding activity, and can enhance antigen-binding potency, providing versatile platforms for delivery of Fab and Fab-based therapeutics and diagnostics, as well as providing stable platforms for delivering other therapeutic and/or diagnostic agents.

【指定代表圖】

圖 1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 奈米脂蛋白-多肽結合物及組成物、系統及其使用方法

【英文發明名稱】 NANOLIPOPROTEIN-POLYPEPTIDE CONJUGATES

AND COMPOSITIONS, SYSTEMS, AND METHODS USING SAME

【技術領域】

【0001】 本發明概言之涉及包含至少一種結合多肽 (例如共價結合之多肽) 之奈米脂蛋白顆粒結合物、相關組成物及系統以及其製備及使用方法。特定而言，提供具有抗原結合片段 (Fab) 之奈米脂蛋白顆粒 (NLP) 結合物，其中該 NLP 包含由支架蛋白質環繞之成膜脂質的雙層，且該等 Fab 結合至一個或兩個雙層表面。NLP-Fab 結合物以及相關組成物及系統通常展示良好之穩定性及可製造性，保留抗原結合活性，且可增強抗原結合效力，從而提供用於 Fab 之遞送及基於 Fab 之治療及診斷之多功能平臺且提供用於遞送其他治療劑及/或診斷劑的穩定平臺。本發明亦涉及包含至少一種結合肽以例如附加於結合多肽或代替結合多肽之奈米脂蛋白顆粒結合物。

【先前技術】

【0002】 過去 10 年，奈米技術領域之進展已試圖解決習用藥物遞送系統的侷限性。在過去數十年亦已研發諸多奈米顆粒，包括無機奈米顆粒、基於聚合體之奈米顆粒、聚合體微胞、樹枝狀聚合物、脂質體、病毒奈米顆粒、碳奈米管及奈米脂蛋白顆粒 (NLP)。

【0003】 NLP 係通常由自組裝以形成盤形脂雙層之兩親性脂質及脂蛋白元組成的奈米級顆粒，其中藉由結合至脂蛋白元來穩定該盤形體之疏水性邊緣。已針對所選應用及藥物負荷對 NLP 進行探究。然而，先前研究尚未針對片段抗體 (Fab) 之遞送來評估此平臺。

【0004】 因此，業內仍需要用於遞送抗原結合多肽及/或用於靶向其他治療劑及診斷劑之具有良好可製造性的新穎 NLP 遞送平臺，尤其係穩定組成物及系統。本發明可滿足該等及其他需要。

【發明內容】

【0005】 本發明概言之涉及奈米脂蛋白-多肽結合物及組成物、系統以及製備及使用該等結合物之方法，其中奈米脂蛋白顆粒結合至多肽 (例如抗原結合多肽 (例如 Fab) 或半胱胺酸結肽 (CKP)) 以得到在一些實施例中具有令人意外之性質的結合物。本發明之結合物可提供各種優點及改良，例如低毒性、低免疫原性、良好穩定性 (無交聯劑)、良好可製造性 (包括可產生高度濃縮但黏度較低之調配物)、極少顆粒間交聯、相對較均質之 NLP 群體及/或增強之抗原結合效力。

【0006】 在一態樣中，本發明提供包含支架蛋白質、成膜脂質及抗原結合多肽之結合物，其中成膜脂質排列成脂雙層且支架蛋白質環繞雙層；且其中經由一種或多種成膜脂質上之官能化基團及抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，抗原結合多肽結合至雙層之一個或兩個表面上的一種或多種成膜脂質。在一些實施例中，抗原結合多肽係 Fab。在一些實施例中，間隔區連結官能化

基團與成膜脂質且/或間隔區連結互補官能基與抗原結合多肽。在一些實施例中，間隔區係 GSGS。

【0007】 在一些實施例中，官能化基團選自由以下項組成之群組：馬來醯亞胺衍生物、鹵基乙醯胺、吡啶二硫代-丙酸酯、硫代硫酸酯及其中之任一者或多者的組合；且在一些實施例中，互補官能基係游離硫醇基 (例如半胱胺酸硫醇基)，視情況其中半胱胺酸在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (例如 Cys-226 或 Cys-227，根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，支架蛋白質選自由以下項組成之群組：(a) 脂蛋白元 A、(b) 脂蛋白元 B、(c) 脂蛋白元 C、(d) 脂蛋白元 D、(e) 脂蛋白元 H、(f) 脂蛋白元 E、(g) 能夠穩定該雙層之 (a)-(f) 的截短形式及 (h) (a)-(g) 中之任一者或多者的組合；且/或成膜脂質係選自由以下項組成之群組：C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且脂肪醯基係結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【0008】 在一些實施例中，提供一種結合物，其包含： 支架蛋白質、成膜脂質及具有 20 至 60 個胺基酸之短肽，其中該等成膜脂質排列成脂雙層且該支架蛋白質環繞該雙層；且其中該短肽結合至該雙層之一個或兩個表面上之該等成膜脂質中之一者或多者。 在一些實施例中，成膜脂質選自由以下項組成之群組：C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，成膜脂質係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20-60 個胺基酸之短肽。

【0009】 在一些實施例中，脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。 在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含： (a) 相對於野生型 CKP 之相應

一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。

【0010】 在一些實施例中，結合物中 (例如包含短肽及抗原結合多肽之 NLP 結合物中) 之短肽活性高於不包含抗原結合多肽之結合物中的肽活性。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。在一些實施例中，短肽為具有生物活性之 CKP 或 CKP 變異體，且 80-90%、90-95% 或 95-99% 之該活性保留於該結合物中。在一些實施例中，該結合物增加該短肽之活性或親合性。在一些實施例中，該結合物 (例如肽-NLP 結合物) 進一步包含結合至該雙層之一個或兩個表面上之該等成膜脂質中之一者或多者的抗原結合多肽，該結合係經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基來達成；視情況其中間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽。在一些實施例中，該結合物包含該 Fab 之 1-100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5 至 30、10 至 25、15 至 20 或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40、10 至 35、15 至 30、20 至 25 或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30、5 至 20、10 至 15 或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80、25 至 70、30 至 60、35 至 50 或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，該結合物包含至少兩種不同肽-C₄₋₂₈

脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。在一些實施例中，至少兩個肽 (例如胺酸結肽) 結合不同靶、視情況兩個、三個、四個或八個不同靶。在一些實施例中，兩個或更多個短肽結合兩個不同靶。在一些實施例中，靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0011】 在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:60 至 1:100，諸如 1:80。在一些實施例中，20-35% 之成膜脂質攜載官能化基團 (例如 20%)。抗原結合多肽可選自由以下項組成之群組：Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、單鏈 Fab (scFab)、單鏈 Fv (scFv)、VH-VH 二聚體、VL-VL 二聚體、VH-VL 二聚體、單域、雙價抗體、線性抗體及其中之任一者或多者的組合。在特定實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子，例如人類或人源化 Fab。由抗原結合多肽 (例如 Fab) 結合之抗原可為 OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3 及/或淋巴毒素 β 受體。

【0012】 結合物可提供多價及/或多特異性構築體之形式。舉例而言，結合物可包含兩個或更多個抗原結合多肽分子 (例如兩個或更多個 Fab 分子)，例如 2-60、2-32、10-30 或 20 個分子。在一些實施例中，間隔區包含 PEG 或 GSGS 之胺基酸序列。在一些實施例中，結合物具有該抗原結合多肽之 1-160、10-120、20-100、40-80 或 60 個分子；其中該抗原結合多肽係 Fab 且該 Fab 藉由 PEG 間隔區連結至該成膜脂質。在一些實施例中，PEG 間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【0013】 該等形式可增加抗原結合多肽之活性及/或親合性、其血清穩定性及/或其血清半衰期 (與不結合至奈米脂蛋白顆粒 (NLP) 之抗原結合多肽相比)。在一些實施例中，抗原結合多肽之血清半衰期增加 2-20 倍、5-15 或 10 倍。在一些實施例中，該結合物具有該抗原結合多肽之 5-60、6-40 或 7-32 個分子。

【0014】 在一些實施例中，該結合物包含兩種或更多個結合不同之靶或表位 (例如兩個、三個、四個或八個不同之靶或表位) 的抗原結合多肽 (例如兩個或更多個 Fab)。該等形式可提供雙特異性構築體，舉例而言，其中靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。在一些實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子，視情況係人類或人源化 Fab。

【0015】 本發明之結合物可以包含結合物及醫藥上可接受之載體之醫藥組成物的形式來提供。

【0016】 本發明之另一態樣提供高濃度、低黏度液體調配物，例如包含 100-300 mg 結合物且黏度為 10-50 cP 之液體調配物。在一些實施例中，醫藥組成物或液體調配物係經皮下或經由眼部遞送來投予。在一些實施例中，將結合物、組成物或調配物，例如在海藻糖存在下凍乾；且視情況重構。在特定實施例中，凍乾係在 80 mM 海藻糖存在下及/或在 5 mg 結合物/mL 之濃度下發生。在一些實施例中，該結合物包含 18-20 個 Fab 分子/結合物。有利的是，在一些實施例中，抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 80-90%、90-95% 或 95-99% 之抗原結合活性在凍乾及重構後得以保留。

【0017】 本發明之另一態樣提供製備本發明之結合物之方法。在一些實施例中，該方法包含 a) 在容許組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及

成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中一種或多種成膜脂質在一個或兩個顆粒表面上呈現官能化基團；b) 使顆粒在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及 c) 視情況純化顆粒及抗原結合多肽之結合物。在一些實施例中，步驟 b) 緊跟步驟 a) 且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質之中間步驟。在特定實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺衍生物且官能基係半胱胺酸硫醇基，例如其中半胱胺酸在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (例如 Cys-226 或 Cys-227，根據 Kabat 編號)。

【0018】 在一些實施例中，在低 pH 下 (例如在 pH 5.5 - 6.5、pH 5-6 或 pH 6 下)，官能化基團不結合至支架蛋白質。

【0019】 在一些方法實施例中，間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽。在一些實施例中，間隔區係連結該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。在一些實施例中，PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【0020】 在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。在一些實施例中，脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，

相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，結合物中之短肽活性高於不包含抗原結合多肽之結合物中的肽活性。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。在一些實施例中，短肽為具有生物活性之 CKP 或 CKP 變異體，且 80-90%、90-95% 或 95-99% 之該活性保留於該結合物中。在一些實施例中，結合物包含該 Fab 之 1-100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5 至 30、10 至 25、15 至 20 或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40、10 至 35、15 至 30、20 至 25 或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30、5 至 20、10 至 15 或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80、25 至 70、30 至 60、35 至 50 或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，該結合物包含至少兩種不同肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。在一些實施例中，至少兩個肽 (例如肱胺酸結肽) 結合不同靶、視情況兩個、三個、四個或八個不同靶。在一些實施例中，兩個或更多個短肽結合兩個不同靶。在一些實施例中，靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0021】 在一些實施例中，提供製備奈米脂蛋白顆粒及具有 20 至 60 個胺基酸之短肽 (例如胱胺酸結肽) 之結合物的方法，其包含： a) 在容許(自-)組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層；其中該等成膜脂質中之一者或多者包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基) 且脂肪醯基結合至該短肽；及視情況純化肽結合物。在一些實施例中，短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含： (a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，該結合物包含至少兩種不同肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。在一些實施例中，至少兩個肽 (例如胱胺酸結肽) 結合不同靶、視情況兩個、三個、四個或八個不同靶。在一些實施例中，兩個或更多個短肽結合兩個不同靶。在一些實施例中，該等靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

在一些實施例中，短肽為具有生物活性之 CKP 或 CKP 變異體，且 80-90%、90-95%或 95-99% 之該活性保留於該結合物中。在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；且進一步包含以下步驟： b) 使該顆粒在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；其中該步驟 b) 緊跟該步驟 a) 且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質之中間步驟；且/或並無用以富集步驟 a) 之肽結合物之中間步驟。 在一些實施例中，該官能化基團係馬來醯亞胺衍生物且該官能基係半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基殘基在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (例如 Cys-226 或 Cys-227)。 在一些實施例中，該官能化基團在該低 pH 下不結合至該支架蛋白質。 在一些實施例中，該低 pH 為 pH 5.5 至 6.5、pH 5 至 6 或 pH 6。 在一些實施例中，間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽。 在一些實施例中，該間隔區係連結該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。 在一些實施例中，該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。 在一些實施例中，該結合物增加該短肽之活性或親合性。 在一些實施例中，該結合物包含該 Fab 之 1-100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5 至 30、10 至 25、15 至 20 或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40、10 至 35、15 至 30、20 至 25或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30、5 至 20、10 至 15 或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80、25 至 70、30 至 60、35 至 50或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。 在一些實施例中，結合物中短肽之活性高於不包含抗原結合多肽之結合物中肽的活性。 在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。 在一

些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【0022】 亦提供藉由本文之任一方法產生的結合物。

【0023】 據此，本發明之另一態樣提供減少製備奈米脂蛋白顆粒及抗原結合多肽之結合物時之脂質-支架蛋白質結合的方法。該方法可包含 a) 在容許組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由支架蛋白質環繞之成膜脂質的脂雙層，其中一種或多種成膜脂質在一個或兩個顆粒表面上呈現官能化基團；b) 在有益於結合官能化基團與官能基而非支架蛋白質之低 pH (例如約 5.55 至約 6.5、約 5 至約 6 或約 6 之 pH) 下，使顆粒接觸在 C 端具有互補官能基之抗原結合多肽 (例如 Fab)。在一些實施例中，步驟 b) 緊跟步驟 a) 且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質之中間步驟。在特定實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺衍生物且官能基係半胱胺酸硫醇基，例如其中半胱胺酸在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (例如 Cys-226 或 Cys-227，根據 Kabat 編號)。在一些實施例中，該成膜脂質係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。在一些實施例中，該脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，該短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之

至少一者或多者 (例如肽-C₁₆脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或 60 個分子。

【0024】 本發明之另一態樣提供增加抗原結合多肽 (例如 Fab) 之親合性、活性及/或效力 (與在不結合至 NLP 時多肽之親合性、活性及/或效力相比) 的方法。在一些實施例中，該方法包含 a) 在容許 (自-) 組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；b) 使該顆粒在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及 c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物，由此增加抗原結合多肽之親合性、活性及/或效力 (與在不結合至 NLP 時多肽之親合性、活性及/或效力相比)。在特定實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子；在特定實施例中，該結合物包含抗原結合多肽之至少 6 個分子 (例如 10-60、15-30或 20 個分子)。在一些實施例中，該抗原結合多肽係藉由 PEG 間隔區連結至該成膜脂質之 Fab 或 Fab 樣分子；且該結合物包含該抗原結合多肽之 1-160、10-120、20-100、40-80或 60 個分子。在一些實施例中，PEG 間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。在一些實施例中，該結合物較為穩定。在一些實施例中，與包含較少或不包含抗原結合多肽 (例如少於 7 個 Fab) 之結合物相比，該結合物較為穩定，例如包含該抗原結合多肽之 7-60、7-32、40-60或 50 個分子的結合物。在一些實施例中，該結合物進一步包含結合不同靶之第二抗原結合多肽的一個或多個分子；且/或該結合物係以包含 100-300 mg 該結合物且黏度為 10-50 cP 之液體調配物的形式來提供。

【0025】 在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽，且該方法增加短肽之親合性、活性及/或效力。在一些實施例中，該脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，該短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或(e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，該結合物包含至少兩種不同肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。在一些實施例中，該至少兩個肽 (例如胱胺酸結肽) 結合不同靶、視情況兩個、三個、四個或八個不同靶。在一些實施例中，該兩個或更多個短肽結合兩個不同靶。在一些實施例中，該等靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。在一些實施例中，該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之

5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，結合物中之短肽活性高於不包含抗原結合多肽之結合物中的肽活性。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【0026】 本發明之另一態樣提供增加抗原結合多肽 (例如 Fab) 之穩定性、儲存期限及/或半衰期 (與在不結合至 NLP 時多肽之親合性、活性及/或效力相比) 的方法。亦提供增加 NLP 之穩定性、儲存期限及/或半衰期 (與在不結合至抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 時 NLP 之穩定性、儲存期限及/或半衰期相比) 的方法。在一些實施例中，該方法包含 a) 在容許 (自-) 組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；b) 使該顆粒在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及 c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物，由此增加抗原結合多肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期 (與在不結合至 NLP 或結合至具有較少抗原結合多肽 (例如少於 7 個 Fab) 之 NLP 時多肽的穩定性、儲存期限及/或半衰期相比)。在一些實施例中，該結合物包含該抗原結合多肽之 5-60 個分子。在特定實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子；在特定實施例中，該結合物包含 7-32 個抗原結合多肽分子。

【0027】 在一些實施例中，一種或多種成膜脂質係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。在一些實施例中，該脂肪醯基係 C₁₆脂肪醯基。

【0028】 亦提供增加長度為 20-60 個胺基酸之短肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期的方法，該方法包含：a) 在容許(自-)組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層；該等成膜脂質中之一者或多者包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆脂肪醯基)且脂肪醯基結合至該短肽；及視情況純化肽結合物；b)修飾該等成膜脂質中之一者或多者以在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團，及c) 使該顆在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下粒接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；其中該步驟 c) 緊跟該步驟 b) 且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質之中間步驟；且/或並無用以富集步驟 b) 之肽結合物的中間步驟。在一些實施例中，間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽，由此增加該短肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期。 在一些實施例中，脂肪醯基係 C₁₆脂肪醯基。

【0029】 在一些實施例中，該短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相

對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。

【0030】 在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。

【0031】 在一些實施例中，該抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子且/或該結合物包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab) 之 5-60、6-40、7-32、40-60 或 50 個分子。在一些實施例中，結合物包含該 Fab 之 1-100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5-30、10-25、15-20 或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5-40、10-35、15-30、20-25 或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30、5 至 20、10 至 15 或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80、25 至 70、30 至 60、35 至 50 或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【0032】 在增加親合性、活性、效力、穩定性、儲存期限及/或半衰期之方法的一些實施例中，該結合物進一步包含生物活性劑或可偵測製劑。在特定實施例中，生物活性劑係選自由以下項組成之群組的細胞毒性劑：道諾黴素 (daunomycin)、阿黴素 (doxorubicin)、胺甲喋呤 (methotrexate)、長春地辛 (vindesine)、放射性核種、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格爾德黴素 (geldanamycin)、美登木素生物鹼 (maytansinoid)、卡奇黴素 (calicheamicin) 或其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，可偵測製劑選自由以下項組成之群組的標記：放射性同位素、螢光團、化學發光染料、發色團、酶、金屬離子、奈米顆粒及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，結合物係以液

體調配物形式來提供，該調配物包含 100-300 mg 該結合物且具有 10-50 cP 之黏度。

【0033】 本發明之其他態樣提供如本文所提供之結合物、醫藥組成物或調配物，其用為藥劑；用於治療癌症或眼部病症；用以製造用於治療癌症或眼部病症之藥劑；及/或用以製造用於抑制血管生成及/或腫瘤生長之藥劑。

【0034】 本發明之另一態樣提供使用抗原結合多肽 (例如 Fab) 及/或短肽治療個體的方法，其包含向個體投予有效量之如本文所提供之結合物、醫藥組成物或調配物。在一些實施例中，該方法進一步包含向個體投予另一治療劑。

【0035】 再一態樣提供將抗原結合多肽 (例如 Fab) 遞送至有需要之個體中的方法，其包含提供用於投予個體之本發明之結合物、醫藥組成物或調配物。有利的是，可以強效、穩定液體調配物形式來遞送抗原結合多肽 (例如 Fab)，例如其中結合物包含經由成膜脂質上之官能化基團及抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基結合至 5-60 個抗原結合多肽分子 (例如 5-60 個 Fab 分子) 的成膜脂質。在一些實施例中，間隔區連結官能化基團與成膜脂質且/或間隔區連結互補官能基與抗原結合多肽。有利的是，可以強效、低黏度調配物形式來遞送抗原結合多肽 (例如 Fab)，例如以黏度為 10-50 cP 且濃度為 100-300 mg 結合物/mL 之液體調配物的形式。

【0036】 在遞送抗原結合多肽之方法的一些實施例中，抗原結合多肽是 Fab，其結合選自由以下項組成之群組之靶：因子 D、VEGF、Tie2、DR4 及其中之任一者或多者的組合；且調配物係經由眼部遞送來投予。在遞送抗原結合多肽之方法的一些實施例中，抗原結合多肽是 Fab，其結合選自由以下項組成之群組之靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體及其中之任一者或多者的組合。在特定實施例中，抗原結合多肽 (例如 Fab) 結合至少兩個不同靶，例如其中兩個不同的靶選自由以下項組成之

群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；
CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0037】 本文亦提供以強效、穩定液體調配物形式將長度為 20-60 個胺基酸之短肽遞送至有需要之個體中的方法，該方法包含：

向個體投予包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab)、及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；其中該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽；其中經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5-100 個分子；視情況其中間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽，由此以穩定液體調配物形式將該抗原結合多肽遞送至個體中。

【0038】 亦提供以強效、低黏度調配物形式將長度為 20-60 個胺基酸之短肽遞送至有需要之個體中的方法，該方法包含：

向個體投予包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab) 及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；其中該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽；其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質中之一者或多者結合至該抗原結合多肽；視情況其中間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽；且其中該液體調配物具有 10-50 cP 之黏度及 100-300 mg 該結合物/mL 之濃度，由此以低黏度調配物形式將該抗原結合多肽遞送至個體中。

【0039】 在遞送方法之一些實施例中，該脂肪醯基係 C₁₆脂肪醯基。在一些實施例中，該短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N- 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，結合物中之短肽活性高於不包含抗原結合多肽之結合物中的肽活性。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。在一些實施例中，肽在結合物中之活性為肽在不包含抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。在一些實施例中，該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；視情況該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或視情況該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，該間隔區係連結該官能化基團與該成膜脂質之

PEG 間隔區。在一些實施例中，PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。在一些實施例中，該抗原結合多肽 (例如 Fab) 及該短肽各自結合相同靶。在一些實施例中，該抗原結合多肽 (例如 Fab) 及該胱胺酸結肽各自結合不同靶。在一些實施例中，該抗原結合多肽是 Fab，其結合選自由以下項組成之群組之靶：因子 D、VEGF、Tie2、DR4 及其中之任一者或多者的組合；且該調配物係經由眼部遞送來投予。在一些實施例中，該短肽結合選自由以下項組成之群組的靶：因子 D、VEGF、Tie2、DR4 及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，該抗原結合多肽是 Fab，其結合選自由以下項組成之群組之靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體、及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，該短肽結合選自由以下項組成之群組的靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體、及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，該抗原結合多肽結合至少兩個不同靶。在一些實施例中，該兩個不同靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。在一些實施例中，該短肽及該抗原結合多肽結合至少兩個不同靶。在一些實施例中，該兩個不同靶選自由以下項組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0040】 再一態樣提供以穩定液體調配物形式將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有需要之個體中的方法，該方法包含向個體投予包含本發明之結合物及生物活性劑或可偵測製劑之液體調配物，其中該結合物包含結合至 5-60 個抗原結合多肽分子 (例如 5-60 個 Fab 分子) 之成膜脂質，該結合係經由成膜脂質上之官能化基團及抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基來達成；且其中生物

活性劑或可偵測製劑結合至該結合物之支架蛋白質、成膜脂質及/或抗原結合多肽。在一些實施例中，間隔區連結官能化基團與成膜脂質且/或間隔區連結互補官能基與抗原結合多肽。

【0041】 再一態樣提供以低黏度調配物形式將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有需要之個體中的方法，該方法包含向個體投予包含本發明之結合物及生物活性劑或可偵測製劑之液體調配物，其中生物活性劑或可偵測製劑結合至該結合物之支架蛋白質、成膜脂質及/或抗原結合多肽；且其中液體調配物具有 10-50 cP 之黏度及 100-300 mg 結合物/mL 之濃度。在一些實施例中，間隔區連結官能化基團與成膜脂質且/或間隔區連結互補官能基與抗原結合多肽。

【0042】 再一態樣提供將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有需要之個體之腦或中樞神經系統中的方法，該方法包含向個體全身性投予包含本發明之結合物及生物活性劑或可偵測製劑之液體調配物，其中生物活性劑或可偵測製劑結合至支架蛋白質、成膜脂質及/或抗原結合多肽；且其中該結合物穿越血-腦障壁。在一些實施例中，間隔區連結官能化基團與成膜脂質且/或間隔區連結互補官能基與抗原結合多肽。在特定實施例中，支架蛋白質係 apoE2 及/或 apoE4。在特定實施例中，液體調配物係經靜脈內投予。

【0043】 在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者係 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。在一些實施例中，該脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，該短肽係胱胺酸結肽 (CKP)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N

端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在其 N- 端包含另外的離胺酸殘基。在一些實施例中，野生型 CKP 係 EETI-II。在一些實施例中，該等成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，該間隔區係連結該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。在一些實施例中，該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【0044】 在遞送生物活性劑或可偵測製劑之方法的一些實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子。在特定實施例中，生物活性劑係選自由以下項組成之群組的細胞毒性劑：道諾黴素 (daunomycin)、阿黴素 (doxorubicin)、胺甲喋呤 (methotrexate)、長春地辛 (vindesine)、放射性核種、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格爾德黴素 (geldanamycin)、美登木素生物鹼 (maytansinoid)、卡奇黴素 (calicheamicin) 或其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，可偵測製劑選自由以下項組成之群組的標記：放射性同位素、螢光團、化學發光染料、發色團、酶、金屬離子、奈米顆粒及其中之任一者或多者的組合。在特定實施例中，成膜脂質結合至 5-60 個抗原結合多肽分子。有利的是，液體調配物可具有 10-50 cP 之黏度及 100-300 mg 結合物/mL 之濃度。

【0045】 在一些實施例中，液體調配物係經靜脈內投予。在一些實施例中，經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5-100 個分子。在一些實施例中，該抗原結合多肽係 Fab 且該 Fab 經由 PEG 間隔區連結至該成膜脂質。在一些實施例中，該 PEG 間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且具有 1000 至 3000、

1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。在一些實施例中，該液體調配物具有 10-50 cP 之黏度及 100-300 mg 該結合物/mL 之濃度。

【0046】 另一態樣提供用於實施本文所闡述之方法 (例如用於將抗原結合多肽 (例如 Fab) 遞送至靶細胞中) 的系統或套組。在一些實施例中，在該系統或套組之一個或多個腔室中，該系統或套組包含一種或多種用於製備本文之 NLP-多肽結合物或肽-NLP-多肽結合物、本文之醫藥組成物或本文之調配物的組分。在一些實施例中，提供關於製備結合物、組成物或調配物或其用於根據本發明方法來遞送抗原結合多肽的說明書。在特定實施例中，抗原結合蛋白質為 Fab 或 Fab 樣分子。

【0047】 亦提供用於將具有 20 至 60 個胺基酸之短肽 (例如胺基酸結肽) 遞送至靶細胞中之系統或套組，該系統或套組包含：一種或多種用於製備本文之肽-NLP 結合物、本文之醫藥組成物或本文之調配物的組分，其中該等組分於該套組或系統之一個或多個腔室中提供，及視情況關於製備該結合物或組成物之說明書及/或關於遞送該短肽 (例如該胺基酸結肽) 之說明書。

【0048】 在一相關態樣中，提供增加附接至基於脂質之奈米顆粒之表面之短肽之生物活性的方法，其包含 (a) 提供包含表面附接有短肽之基於脂質之奈米顆粒，其中基於脂質之奈米顆粒的一種或多種脂質呈現官能化基團，及 (b) 使奈米顆粒與具有官能基之多肽在有益於結合該官能化基團與該官能基的條件下接觸。在一些實施例中，該方法進一步包含純化包含基於脂質之奈米顆粒、短肽及多肽之結合物。在一些實施例中，基於脂質之奈米顆粒包含脂雙層。在一些實施例中，基於脂質之奈米顆粒係脂質體、固體脂質奈米顆粒 (SLN) 或奈米結構化脂質載劑 (NLC)。在一些實施例中，間隔區連結該官能化基團與基於脂質之奈米顆粒之表面上的脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該多肽。在一

些實施例中，該多肽係抗原結合多肽。在一些實施例中，抗原結合多肽選自由以下項組成之群組：Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、單鏈 Fab (scFab)、單鏈 Fv (scFv)、VH-VH 二聚體、VL-VL 二聚體、VH-VL 二聚體、單域、雙價抗體、線性抗體及其中之任一者或多者的組合。在一些實施例中，短肽係 CKP 或包含以下各項之 CKP 變異體：(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(b) 相對於野生型 CKP 在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(c) 相對於野生型 CKP 在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；(d) 相對於野生型 CKP 在 N 端之化學修飾；及/或 (e) 相對於野生型 CKP 在 C 端之化學修飾。在一些實施例中，與短肽在多肽結合至基於脂質之奈米顆粒之前的活性相比，在多肽結合至基於脂質之奈米顆粒之後，該短肽在多肽之結合之後之活性係前者的 2 倍至 100 倍。

【圖式簡單說明】

【0049】 本專利或申請案檔案含有至少一個彩製圖式。在申請且支付必要費用後，專利局將提供具有彩色圖式之本專利或專利申請公開案的複本。

圖 1A-1D 繪示 DOPE-MCC 對 NLP 組裝之效應。圖 1A 繪示 DOPE-MCC NLP 組裝及 Fab 結合之示意圖。圖 1B 繪示在 NLP SEC 峰中隨 NLP 中之 mol% DOPE-MCC 而變化之 MW 及 R_h 的 MALS/QELS 分析。圖 1C 繪示僅 apoE422k (圓)、組裝於 pH 7.4 下之 NLP (平直線)及組裝於 pH 6.0 下之 NLP (三角形)的 TIC 層析圖。圖 1D 繪示 1D 中針對僅 apoE422k (圓)、組裝於 pH 7.4 下之 NLP

(平直線) 及組裝於 pH 6.0 下之 NLP (三角形) 所展示 TIC 光譜峰的解捲積質量。

圖 2A-2C 繪示 Fab-NLP 之結合、純化及表徵。**圖 2A** 繪示在以 20 之 Fab:NLP 比率結合之後 Fab-NLP 的 SEC 純化。第一峰對應於 Fab-NLP 結合物，第二峰對應於 Fab 二聚體且第三峰對應於游離未結合 Fab。插圖展示 Fab-NLP 峰之放大形式，其中 QELS 之 R_h 疊加於峰上。左 y 軸係吸光度且右 y 軸係跨越峰之不同 Fab-NLP 結合物部分的 R_h 。**圖 2B** 繪示游離 Fab (圓) 及 Fab-NLP 結合物 (三角形) 之 TIC 層析圖。**圖 2C** 繪示圖 2C 中針對游離 Fab (圓) 及 Fab-NLP 結合物 (三角形) 所展示之 TIC 光譜峰的解捲積質量。

圖 3A-3D 繪示 Fab 載量之最佳化。**圖 3A** 繪示以遞增 Fab 濃度組裝之 Fab-NLP 結合物的 SEC 純化層析圖。**圖 3B** 繪示在結合反應中隨 Fab 濃度而變化之 Fab 數/NLP (Fab:NLP)。**圖 3C** 繪示隨 Fab 數/NLP (Fab:NLP) 而變化之 Fab-NLP 結合物的 MW。**圖 3D** 繪示隨 Fab 數/NLP (Fab:NLP) 而變化之 Fab-NLP 結合物的 R_h 。

圖 4A-4B 繪示 Fab-NLP 調配物。**圖 4A** 繪示僅游離 Fab (圓)、Fab-NLP 結合物 (正方形) 及 Fab-PEG 結合物 (三角形) 之黏度與 Fab 濃度之間的關係。**圖 4B** 繪示 Fab-NLP 結合物在凍乾之前及之後的 R_h 及 MW 分析。左 y 軸及灰色條係 MW 且右 y 軸及黑色條係 R_h 。

圖 5A-5D 繪示 Fab-NLP 活性。**圖 5A** 繪示在因子 B 裂解之因子 D FRET 分析中僅抗因子 D Fab (十字形)、NLP 結合物 (Fab-NLP，正方形)、凍乾及重構後之 NLP 結合物 (三角形) 及陰性 Fab 對照 (圓) 的活性。展示四重複之平均及標準偏差，資料代表 $n=3$ 個獨立實驗。**圖 5B** 繪示在以介於 0 – 29.4 之間之 Fab 化合價結合至 NLP 平臺時抗 OX40 的激動劑活性，其中隨抗 OX40 fab 濃度之變化來繪圖。使用抗 OX40 huIgG1 作為陰性對照。展示三重複之平均及標準偏差。

圖 5C 繪示在以介於 0 – 29.4 之間之 Fab 化合價結合至 NLP 平臺時抗 OX40 的激動劑活性，其中隨抗 NLP 濃度之變化來繪圖。使用抗 OX40 huIgG1 作為陰性對照。展示三重複之平均及標準偏差。**圖 5D** 繪示在不同 Fab-NLP 化合價下自**圖 5C** 中之曲線擬合計算的 EC50 值。

圖 6A-6B 繪示 Fab-NLP 結合物在 50% 血清中之穩定性。**圖 6A** 繪示 NLP 在 50% 血清中培育之後之不同時間點的 SEC 跡線。NLP 主峰左側之肩峰係源於血清中之背景吸光度且在後續分析中扣除。**圖 6B** 繪示由不同 Fab 加載密度組成之 Fab-NLP 結合物隨時間而變化之 Fab-NLP 降解。該等曲線係藉由歸一化至 0 hr 時之 Fab-NLP 峰面積所生成。

圖 7A-7B 繪示 Fab-NLP 結合物之蛋白質組成物的量化。**圖 7A** 繪示 Fab-NLP 結合物之 HPLC 跡線。在 4.95 min 及 5.15 min 時觀察到兩個峰，其分別對應於 apoE422k 及 Fab。**圖 7B** 繪示 apoE422k 在不同注入量下之 HPLC 跡線 (左圖) 及相應標準曲線 (右圖)。使用 apoE422k 標準曲線來測定 Fab-NLP 結合物之 apoE422k 濃度。

圖 8A-8B 繪示 DOPE-MCC 對 NLP 組裝之效應。**圖 8A** 繪示在遞增之 DOPE-MCC 莫耳濃度下組裝之 NLP 的 SEC 分析。**圖 8B** 繪示在交聯條件 (pH 7.4) 及非交聯條件 (pH 6) 下組裝之 NLP 的 MW 及 Rh 分析。

圖 9A-9D 繪示 C16-EETI-II 之設計及產生。**圖 9A** 展示野生型 EETI-II 及 C16-EETI-II 之胺基酸序列。棕櫚酸經由 N 端離胺酸結合至 EETI-II。**圖 9B** 提供 C16-EETI-II 產生之製程流程圖。**圖 9C** 提供 EETI-II 之分析型 RP-HPLC (左圖) 及 LC-MS (右圖)。LC-MS 驗證了 C18-EETI-II 及 EETI-II 之屬性及其純度。**圖 9D** 提供分析型 RP-HPLC (左圖) 及 LC-MS (右圖)，其展示，在添加脂肪酸標籤之情形下，C16-EETI-II 之疏水性大於 EETI-II (藉由 C16-EETI-II 之較長滯留時間來指示)。

圖 10A-10D 繪示加載 CKP 之 NLP (NLP-CKP) 的組裝。**圖 10A** 繪示 CKP-NLP 組裝及 CKP 結合的示意圖。**圖 10B** 繪示 CKP-NLP 之 SEC 層析圖 (虛線展示匯集用於進一步分析之部分)。**圖 10C** 繪示使用 ELSD (蒸發光散射偵測器) 獲得之 CKP-NLP 的 RP-HPLC 層析圖。觀察到三個對應於 ApoE422k、CKP 及 DOPC 之峰，如藉由每一者之各別卡通圖所指示。**圖 10D** 繪示 MW 之 SEC-MALS 分析 (使用箭頭指示 MW)。280 nm 下之吸光度展示於右軸上。**圖 10E** 繪示 Rh 之 SEC-MALS 分析 (Rh (左軸) 係藉由跨越 CKP-NLP 峰之分散點指示)。280 nm 下之吸光度展示於右軸上。

圖 11A-11D 繪示 CKP 載量對 NLP 大小及組成以及對 CKP 活性之效應。**圖 11A** 繪示在遞增 CKP-C16 mol% 下組裝之 CKP-NLP 的 SEC 層析圖。**圖 11B** 繪示整個 CKP-NLP SEC 峰隨 CKP-NLP 組裝體中之 CKP mol% 而變化的平均 Rh 分析。**圖 11C** 繪示在純化之後隨包括於自組裝反應中之 CKP 分子數/NLP 而變化之 CKP 分子數/NLP 的 HPLC 量化。以二重複分析組裝體。**圖 11D** 展示納入不同 CKP 含量之 CKP-NLP (0 – 63 CKP/NLP) 之 CKP 活性分析的結果。三重複實施分析。

圖 12A-12B 繪示在 37°C 下儲存於 50% 血清中之後不同時間時 NLP 的 SEC 層析圖。**圖 12A** 繪示結果，其中使用 AF488 標記 NLP 且在 A495 下監測 SEC 跡線中之吸光度以限制來自生物基質的背景信號。**圖 12B** 繪示在 37°C 下於 50% 血清中培育時隨時間而變化之 CKP-NLP 的歸一化峰面積。

圖 13A-13D 繪示 Fab-CKP-NLP 結合物之組裝及表徵。**圖 13A** 繪示用於生成 Fab-CKP-NLP 結合物之策略的示意圖。使用反應性 DSPE-PEG-Mal 脂質組裝 CKP-NLPS 且經由游離半胱胺酸將經組裝 CKP-NLP 結合至 Fab。**圖 13B** 繪示在完成結合之後 Fab-CKP-NLP 結合物的 SEC 層析圖。觀察三個對應於 Fab-CKP-NLP 結合物、Fab 二聚體及未結合 Fab 之峰。**圖 13C** 繪示經 SEC 純化之

Fab-CKP-NLP 結合物的 HPLC 層析圖。偵測到 Fab-CKP-NLP 之所有組分，如藉由每一者之各別卡通圖所指示。**圖 13D** 繪示整個 Fab-CKP-NLP 結合物峰之 MW (上圖) 及 Rh (下圖) 的 SEC-MALS 分析。

圖 14A-14E 繪示 Fab-CKP-NLP 的 Fab 載量及穩定性。**圖 14A** 繪示在結合步驟期間以不同 Fab:CKP-NLP 比率 (0-150) 生成之 Fab-CKP-NLP 結合物的 SEC 層析圖。觀察三個對應於 Fab-CKP-NLP 結合物、Fab 二聚體及未結合 Fab 之峰。**圖 14B** 繪示對於低 CKP-NLP 及高 CKP-NLP 隨反應中 Fab 比率而變化之經純化 Fab-CKP-NLP 結合物中之 Fab 數/NLP 的 HPLC 分析。**圖 14C** 繪示對於低 CKP-NLP 及高 CKP-NLP 隨 Fab 載量而變化之 Fab-CKP-NLP 的 Rh。**圖 14D** 繪示對於低 CKP-NLP 及高 CKP-NLP 隨 Fab 載量而變化之 Fab-CKP-NLP 的 CKP 活性分析結果。三重複實施分析。**圖 14E** 繪示在 37°C 下於 50% 血清中培育時隨時間而變化之 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 的歸一化峰面積。

【實施方式】

相關申請之交叉引用

【0050】 本申請案主張 2020 年 6 月 11 日提出申請之美國臨時申請案第 63/038,075 號、2021 年 2 月 19 日提出申請之美國臨時申請案第 63/151,591 號的優先權權益，該等臨時申請案中之每一者之內容以全文引用方式併入本文中。

【0051】 I. 定義

【0052】 定義除非在下文中另外定義，否則本文所用的術語為本技術領域中的一般使用。

【0053】 本文之術語「抗體」係在最廣泛意義上使用且涵蓋各種抗體結構，包括 (但不限於) 單株抗體、多株抗體及抗體片段，只要其展現期望抗原結合活性即可。據此，在本發明之上下文中，術語抗體涉及完整免疫球蛋白分子以及該等免疫球蛋白分子之一部分。另外，該術語涉及經修飾及/或改變之抗體分子，尤其係經突變之抗體分子。該術語亦涉及以重組方式或以合成方式生成/合成之抗體。在本發明之上下文中，術語抗體可與術語免疫球蛋白互換使用。

【0054】 「抗體片段」係指除完整抗體以外的分子，其包含結合完整抗體所結合抗原之完整抗體的一部分。抗體片段之實例包括 (但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙價抗體、線性抗體、單鏈抗體分子 (例如 scFv) 及單域抗體 (例如奈米抗體、IgNAR)。關於某些抗體片段的綜述，參見 Hudson 等人，Nat Med 9，129-134 (2003)。關於 scFv 片段之綜述，例如參見 Pluckthün，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷，Rosenburg 及 Moore 編輯，Springer-Verlag，New York，pp. 269-315 (1994)；亦參見 WO 93/16185。雙價抗體係具有兩個抗原結合位點 (其可為二價或雙特異性) 之抗體片段。參見例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人，Nat Med 9，129-134 (2003)；及 Hollinger 等人，Proc Natl Acad Sci USA 90，6444-6448 (1993)。Hudson 等人，Nat Med 9，129-134 (2003) 中亦描述三功能抗體及四功能抗體。單域抗體係包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或抗體之輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段 (Domantis, Inc., Waltham, MA；例如參見美國專利第 6,248,516 B1 號)。包含各種抗體片段之抗體形式的其他實例包括 (但不限於) BiTE、BiTE-Fc、DART、DART-Fc、TriKE 及 TandAb 形式 (關於綜述，請參見 Suurs, F.V. 等人，A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges, Pharmacology & Therapeutics, 201 (2019) 103-

119)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括但不限於完整抗體之蛋白水解消解以及藉由重組宿主細胞 (例如大腸桿菌或噬菌體) 產生。

【0055】 如本文中所使用，術語「抗原結合多肽」在其最廣泛意義上係指特異性結合抗原決定子之分子。抗原結合多肽之實例係抗體、免疫球蛋白及其衍生物，例如抗體片段。抗原結合多肽亦可包括經設計錨蛋白重複蛋白 (darpin) 及/或包含蛋白質支架之蛋白質結合劑 (例如森特因 (Centyrin)、黏合素 (Affimer)、阿德奈汀 (AdNectin)、高親和性多聚物 (Avimer)、打結素 (Knottin)、單抗體、親和鉗 (Affinity clamp) 及諸如此類)。抗原結合多肽結合 (亦即特異性結合) 至抗原決定子。在一些實施例中，抗原結合多肽能夠將其所附接之實體 (例如奈米脂蛋白顆粒) 引導至靶位點，例如引導至具有抗原決定子之特定類型的腫瘤細胞或腫瘤間質。在一些實施例中，抗原結合多肽能夠經由其靶抗原來激活信號傳導，例如在抗原決定子結合至 T 細胞上之抗原結合受體時激活信號傳導。抗原結合多肽可包括抗原結合域，該抗原結合域通常包含免疫球蛋白重鏈可變區及免疫球蛋白輕鏈可變區。在某些實施例中，抗原結合多肽可包含如業內已知之免疫球蛋白恆定區。可用之重鏈恆定區包括五種同型： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 中之任一者；可用之輕鏈恆定區包括二種同型中之任一者： κ 及 λ 。在某些實施例中，抗原結合多肽不包含 Fc 區。在某些實施例中，抗原結合多肽包含鉸鏈區 (或免疫球蛋白之鉸鏈區的一部分)，但不包含 Fc 區或不包含 Fc 區之全部。舉例而言，在一些實施例中，抗原結合多肽不包括 IgG Fc 域之一個或多個亞單元，例如不包含 IgG CH2 恆定域；及/或不包含 IgG CH3 恆定域。

【0056】 如本文中所使用，術語「多肽」係指由藉由醯胺鍵 (亦稱為肽鍵) 線性連接之單體 (胺基酸) 所構成的分子。術語多肽係指兩個或更多個胺基酸之任何鏈，且不係指產物之具體長度。因此，在多肽之定義中包括肽、二

肽、三肽、寡肽、蛋白質、胺基酸鏈或用於係指兩個或更多個胺基酸之鏈的任何其他術語，且可以使用術語多肽代替該等術語中之任一者或與其互換使用。術語多肽亦意欲係指多肽之表現後修飾的產物，該等修飾包括 (但不限於) 醮基化、乙醮化、磷酸化、醮胺化、藉由已知保護/阻斷基團衍生、蛋白水解裂解或非天然胺基酸修飾。多肽可以源自天然生物來源或透過重組技術產生，但不一定是從指定的核酸序列轉譯而來的。它可以以任何方式產生，包括透過化學合成。本發明多肽之大小可為 3、5、10、20、25、50、75、100、200、500、1,000 或 2,000 個胺基酸。

【0057】 「抗原結合位點」係指提供抗原相互作用之抗原結合多肽的位點，亦即一個或多個胺基酸殘基。舉例而言，抗體或抗原結合受體之抗原結合位點包含來自互補決定區 (CDR) 的胺基酸殘基。天然免疫球蛋白分子通常具有兩個抗原結合位點，Fab 或 scFv 分子通常具有單一抗原結合位點。

【0058】 術語「抗原結合域」係指抗體或抗原結合受體之一部分，其包含特異性結合至抗原之一部分或全部且與其互補的區域。抗原結合域可由例如一個或多個免疫球蛋白可變域 (亦稱為可變區) 提供。通常，抗原結合域包含免疫球蛋白輕鏈可變區 (VL) 及免疫球蛋白重鏈可變區 (VH)。

【0059】 術語「可變區」或「可變域」係指參與結合抗原之免疫球蛋白重鏈或輕鏈的域。天然抗體之重鏈及輕鏈 (分別為 VH 及 VL) 之可變域通常具有類似結構，其中每一域皆包含四個保守框架區 (FR) 及三個超變區 (HVR)。例如參見 Kindt 等人，Kuby Immunology，第 6 版，W.H. Freeman and Co，第 91 頁 (2007)。單一 VH 或 VL 域通常足以賦予抗原結合特異性。

【0060】 如抗原結合多肽之背景中所使用，術語「結合至」定義「抗原相互作用位點」及抗原彼此之結合 (相互作用)。術語「抗原相互作用位點」定義多肽中能夠與特定抗原或特定抗原組特異性相互作用之模體。該結合/相互作用

用亦理解為定義「特異性識別」。術語「特異性識別」意指，抗原結合多肽能夠與抗原特異性相互作用及/或結合。可使用業內已知技術來量測抗原結合多肽(例如 Fab 或 scFv 域)結合至特定靶抗原決定子之能力。一種技術涉及酶聯免疫吸附分析 (ELISA)。熟習此項技術者所熟知之其他技術包括例如表面電漿共振 (SPR) (分析於 BIAcore 儀器上) (Liljeblad 等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析 (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))。在一實施例中，抗原結合多肽結合不相關蛋白質/抗原之程度小於抗原結合多肽結合靶抗原的 10%，如尤其藉由 SPR 所量測。在某些實施例中，結合至靶抗原之抗原結合多肽的解離常數 (K_D) 為 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。如與抗原結合多肽結合所使用的術語「結合」或「特異性結合」意指，抗原結合多肽不與或基本上不與非靶抗原之結構交叉反應。

【0061】 「親和力」係指分子(例如抗原結合多肽)之單一結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間的非共價相互作用的總強度。除非另外指示，否則如本文中所使用，「結合親和力」係指反映結合對成員(例如抗原結合多肽及抗原及/或受體及其配體)之間之 1:1 相互作用的固有結合親和力。分子 X 對其配偶體 Y 之親和力通常可藉由解離常數 (K_D) 來表示，該解離常數係解離速率常數與締合速率常數(分別為 $k_{\text{解離}}$ 及 $k_{\text{締合}}$)之比率。因此，等效親和力可包括不同速率常數，只要速率常數比保持相同即可。可藉由此項技術中已知的既定方法測定親和力，包括彼等本文所述之方法。量測親和力之較佳方法係表面電漿共振 (SPR) 且較佳量測溫度為 25°C 。

【0062】 本文所用之術語「CDR」涉及業內所熟知之「互補決定區」。CDR 係免疫球蛋白或抗原結合受體中決定該等分子之特異性且與特定配體接觸的部分。CDR 通常係分子之最易變部分且有助於該等分子的抗原結合多樣性。

在可變域中存在以下三個 CDR 區：CDR1、CDR2 及 CDR3。CDR-H 描述可變重鏈之 CDR 區且 CDR-L 涉及可變輕鏈之 CDR 區。VH 意指可變重鏈且 VL 意指可變輕鏈。可如「Kabat」(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第 5 版，NIH 公開案第 91-3242 號，U.S. Department of Health and Human Services (1991)；Chothia J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) 或「Chothia」(Nature 342 (1989), 877-883) 中所闡述來確定 Ig-源區域之 CDR 區。

【0063】 本文所用之術語「高度可變區」或「HVR」係指抗體可變域中序列高度可變及/或形成結構確定之環(「超變環」)的每一區域。通常，天然四鏈抗體包含六個 HVR；三個在 VH 中 (H1、H2、H3)，且三個在 VL 中 (L1、L2、L3)。HVR 通常包含來自超變環之胺基酸殘基。除 VH 中的 CDR1 外，CDR 一般包含形成高度可變環的胺基酸殘基。超變區 (HVR) 亦稱為互補決定區 (CDR)，且該等術語在本文中提及形成抗原結合區之可變區部分時可互換使用。此特定區域闡述於 Kabat 等人，U.S. Dept. of Health and Huma Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) 及 Chothia 等人，J Mol Biol 196:901-917 (1987)中，其中定義包括在彼此比較時胺基酸殘基之重疊或子組。構成如由上文所引用參考文獻所定義之 CDR 的適當胺基酸殘基陳述於下文表 1 中以供比較。構成特定 CDR 之確切殘基數將端視 CDR 之序列及大小而有所變化。在給出抗體之可變區胺基酸序列下，熟習此項技術者可以常規方式確定構成特定 CDR 之殘基。

表 1.CDR 定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102

V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹表 1 中所有 CDR 定義之編號皆係根據由 Kabat 等人陳述的編號慣例 (參見下文)。

²表 1 中所用之具有小寫字母「b」之「AbM」係指如藉由 Oxford Molecular's 「AbM」抗體建模軟體所定義的 CDR。

【0064】 Kabat 等人亦定義可適用於任何抗體之可變區序列的編號系統。熟習此項技術者可明確地將此「Kabat 編號」系統指定給任何可變區序列，且除序列本身外不依賴於任何實驗資料。如本文中所使用，「Kabat 編號」係指由 Kabat 等人，U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983) 陳述之編號系統。除非另外指定，否則所提及之抗原結合部分可變區中之特定胺基酸殘基位置的編號係根據 Kabat 編號系統。

【0065】 「骨架 (framework)」或「FR」係指除高度可變區 (hypervariable region) (HVR) 殘基之外的可變域殘基。可變域之 FR 通常由四個 FR 域組成：FR1、FR2、FR3、及 FR4。因此，HVR 及 FR 序列通常以如下順序出現在 VH (或 VL) 中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0066】 「Fab」或「Fab 分子」係指由抗原結合多肽之重鏈 (「Fab 重鏈」) 之 VH 及 CH1 域及輕鏈 (「Fab 輕鏈」) 之 VL 及 CL 域組成的蛋白質。

【0067】 單鏈 Fv 片段 (或 scFv) 係由藉由肽連接體連結之抗體 VH 域及 VL 域組成的多肽。

【0068】 單鏈 Fab 片段 (或 scFab) 係由抗體重鏈可變域 (VH)、抗體恆定域 1 (CH1)、抗體輕鏈可變域 (VL)、抗體輕鏈恆定域 (CL) 及連接體組成之多肽，其中該等抗體域及該連接體在 N 端至 C 端方向上具有下列序列之一：a)

VH-CH1-連接體-VL-CL、b) VL-CL-連接體-VH-CH1、c) VH-CL-連接體-VL-CH1 或 d) VL-CH1-連接體-VH-CL；且其中該連接體係具有至少 30 個胺基酸，較佳地 32 至 50 個胺基酸之多肽。單鏈 Fab 片段經由 CL 域與 CH1 域之間的天然雙硫鍵達到穩定。

【0069】 「交叉 Fab 分子」(亦稱為「交叉 Fab」或「交叉 Fab 片段」) 意指其中 Fab 重鏈及輕鏈之可變區或恆定區發生交換的 Fab 分子，亦即，交叉 Fab 片段包含由輕鏈可變區及重鏈恆定區構成之肽鏈及由重鏈可變區及輕鏈恆定區構成之肽鏈。據此，交叉 Fab 片段包含由重鏈可變區及輕鏈恆定區構成之重鏈或輕鏈 (VH-CL) 及由輕鏈可變區及重鏈恆定區構成之重鏈或輕鏈 (VL-CH1)。與此相比，「習用 Fab」分子意指呈其自然形式 (亦即包含由重鏈可變區及恆定區構成之重鏈 (VH-CH1) 及由輕鏈可變區及恆定區構成之輕鏈 (VL-CL)) 之 Fab 分子。

【0070】 「交叉單鏈 Fab 片段」係由抗體重鏈可變域 (VH)、抗體恆定域 1 (CH1)、抗體輕鏈可變域 (VL)、抗體輕鏈恆定域 (CL) 及連接體組成之多肽，其中該等抗體域及該連接體在 N 端至 C 端方向上具有下列序列之一：a) VH-CL-連接體-VL-CH1 及 b) VL-CH1-連接體-VH-CL；且其中 VH 及 VL 一起形成特異性結合至抗原之抗原結合位點。通常，連接體係長度為至少 30 個胺基酸 (例如 30-40 個胺基酸) 之多肽。

【0071】 本文之術語「Fc 域」或「Fc 區」用於定義含有至少一部分恆定區之免疫球蛋白重鏈的 C 端區域。該術語包括天然序列 Fc 區域和變異體 Fc 區域。儘管 IgG 重鏈之 Fc 區的邊界可略有變化，但通常將人類 IgG 重鏈之 Fc 區定義為自 Cys-226 或 Pro-230 延伸至該重鏈的羧基末端。然而，Fc 區之 C 端離胺酸 (Lys-447) 可以存在或可以不存在。除非本文另外指定，否則 Fc 區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據「EU 編號」系統 (亦稱為 EU 指數)，如 Kabat 等

人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，國立衛生研究院 (National Institutes of Health), Bethesda, MD, 1991 中所闡述。

【0072】術語「全長抗體」表示由兩條「全長抗體重鏈」及兩條「全長抗體輕鏈」組成之抗體。「全長抗體重鏈」係由 N 端至 C 端方向之抗體重鏈可變域 (VH)、抗體恆定重鏈域 1 (CH1)、抗體鉸鏈區 (HR)、抗體重鏈恆定域 2 (CH2) 及抗體重鏈恆定域 3 (CH3) (縮寫為 VH-CH1-HR-CH2-CH3) 以及在 IgE 亞類抗體之情況下視情況抗體重鏈恆定域 4 (CH4) 組成的多肽。較佳的是，「全長抗體重鏈」係由 N 端至 C 端方向之 VH、CH1、HR、CH2 及 CH3 組成的多肽。「全長抗體輕鏈」係由 N 端至 C 端方向的抗體輕鏈可變域 (VL) 及抗體輕鏈恆定域 (CL) 組成的多肽，縮寫為 VL-CL。抗體輕鏈恆定域 (CL) 可以是 κ (kappa) 或 λ (lambda)。兩條全長抗體鏈通過 CL 域和 CH1 域之間以及全長抗體重鏈的鉸鏈區之間的多肽間雙硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例係天然抗體，如 IgG (例如 IgG 1 及 IgG2)、IgM、IgA、IgD 及 IgE)。本發明所用之全長抗體可來自單一物種 (例如人類)，或其可為嵌合或人源化抗體。

【0073】「個體」或「受試者」為哺乳動物。哺乳動物包括 (但不限於) 家養動物 (例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物 (例如人類及非人類靈長類動物，例如猴)、兔及嚙齒動物 (例如小鼠及大鼠)。特定而言，個體或受試者係人類，且可為臨床患者/臨床試驗志願者。

【0074】根據本發明，術語「醫藥組成物」係指以下製劑：其呈允許其中所含之活性成分之生物活性有效的形式，且不含對將投予調配物之受試者具有不可接受毒性的其他組分。

【0075】「經分離多肽」或其片段或衍生物係指非天然環境中之多肽。不需要特定純化程度。例如，一個分離的多肽可自其天然或自然環境中移除。

出於本發明目的，表現於宿主細胞中之重組產生之多肽及蛋白質可視為經分離的，且已藉由任何適宜技術分離、分級分離或部分或實質上純化之天然或重組多肽亦可視為經分離的。

【0076】 如本文中所使用，術語「胱胺酸結肽」或「CKP」係指長度介於 26-60 個胺基酸之間的肽，其含有 6 個形成三個雙硫鍵之保守半胱胺酸殘基。一個二硫化物滲入由兩個其他二硫化物及其互連主鏈形成之大環，由此產生其中多個環暴露於表面上之特徵性打結形態。環定義為側接於 6 個保守半胱胺酸殘基且介於高度可變性質之胺基酸區域。

【0077】 如本文中所使用，術語「靶抗原」與「靶抗原決定子」、「靶表位」及「靶細胞抗原」同義，且係指多肽大分子上之與抗原結合多肽結合以形成複合物的位點（例如鄰接胺基酸片段或由非鄰接胺基酸之不同區域構成的構形組態）。舉例而言，可用之靶抗原可發現於腫瘤細胞之表面上、受病毒感染之細胞之表面上、其他患病細胞之表面上、免疫細胞之表面上、游離於血清中及/或存在於細胞外基質 (ECM) 中。除非另外指示，否則在本文中稱為抗原之蛋白質（例如 CD20、CEA、FAP、TNC）可係來自任何脊椎動物來源之任何天然形式的蛋白質，該脊椎動物包括哺乳動物，例如靈長類動物（例如人類）及嚙齒類動物（例如小鼠及大鼠）。在特定實施例中，靶抗原係人類蛋白質。在本文中提及特定靶蛋白之情形下，該術語涵蓋「全長」、未處理之靶蛋白以及由在靶細胞中處理所產生的任何靶蛋白質形式。該術語亦涵蓋天然靶蛋白質變異體，例如剪接變異體或等位基因變異體。實例性人類靶抗原包括（但不限於）：CD20、CEA、FAP、TNC、MSLN、FolR1、HER1 及 HER2。

【0078】 術語「癌症」及「癌性」係指哺乳動物中通常以不受調控之細胞生長/增殖為特徵的生理學病狀。此定義包括良性及惡性癌症。癌症之實例包括（但不限於）癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實

例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌 (gastric or stomach cancer) (包括胃腸道癌)、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌 (例如腎細胞癌)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、黑色素瘤及各種類型之頭頸癌。「早期癌症」意指非侵襲性或轉移性或分類為 0、I 或 II 期癌症之癌症。術語「癌症前期」係指通常先於或發展成癌症病狀或腫塊。

「非轉移性」意指癌症係良性的，或保留於原發性位點處且尚未滲透至淋巴或血管系統或除原發性位點外之組織中。通常，非轉移性癌症係 0、I 或 II 期癌症及偶爾 III 期癌症中之任何癌症。

【0079】 本文所提供之數值應理解為係指確切數值以及由術語「約」限定的值。術語「約」藉由所用背景中如熟習此項技術者所理解之範圍來限定數值，該範圍係例如引述數值之 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 等。

【0080】 II. 包含多肽之奈米脂蛋白結合物

【0081】 本發明之一態樣涉及包含至少一種共價結合之多肽 (亦即除支架蛋白質外之納入 NLP 之多肽) 的奈米脂蛋白顆粒結合物。如本文中所使用，「奈米脂蛋白顆粒」或 NLP 係指包含脂質及支架蛋白質、尤其包含成膜脂質及支架蛋白質 (例如脂蛋白元) 之超分子複合物。NLP 亦可稱為納米盤或重構高密度脂蛋白 (rHDL)，且已闡述為內源性高密度脂蛋白 (HDL) 之模擬物(18)。NLP 通常經由自組裝過程形成，其中成膜脂質形成具有盤形形狀之脂雙層(19)，且其中藉由結合至環繞雙層盤形體之支架蛋白質來穩定該盤形體的疏水性邊緣。本段落中所引用之所有參考文獻皆可參見下文之實例 5。

【0082】 「成膜脂質」係指具有親水區 (極性頭部) 及疏水區 (一個或多個長烴尾部) 之兩親性脂質或極性脂質。成膜脂質在水性環境中自組裝以形成脂雙層，其中每一層之疏水性脂肪酸尾部面對面，且極性頭部暴露至水性環境。極性頭基通常係經衍生磷酸酯或醚基團。成膜脂質可包含例如烷基磷酸膽鹼、醚脂質、醚脂、溶血神經鞘脂、溶血甘油磷脂、磷脂、鞘脂及固醇。在一些實施例中，NLP 包含本文所闡述之兩種或更多種成膜脂質。更具體實例包括 (但不限於) 以下磷脂：二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼 (DMPC)、二油醯基磷酸-乙醇胺 (DOPE)、二油醯基磷脂醯膽鹼 (DOPC)、二油醯基磷酸絲胺酸 (DOPS) 及二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼 (DPPC)。在一特定實施例中，成膜脂質係 DOPE 及/或 DOPC。在一些實施例中，成膜脂質係非脂質兩親性分子，例如二甘油四醚、膽固醇、麥角固醇及諸如此類。在一些實施例中，NLP 包含 (例如進一步包含) C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基) 作為成膜脂質。

【0083】 在一些實施例中，成膜脂質係生物分子，亦即由活生物體 (例如細菌、酵母或哺乳動物) 產生之分子。

【0084】 在 NLP 中，由成膜脂質形成之雙層係由一種或多種支架蛋白質加以穩定。本文所用之「支架蛋白質」係可與成膜脂質在水性環境中自組裝 (例如 (實質上) 環繞或包圍脂雙層之疏水性核心) 的兩親性蛋白質。支架蛋白質通常具有 α 螺旋二級結構，其中若干疏水性胺基酸形成疏水面且若干親水性胺基酸在相對側形成親水面。該顆粒本身變得具有水溶性，且由此可攜載於例如血液或淋巴中。

【0085】 在一些實施例中，支架蛋白質包含例如脂蛋白元、攜脂蛋白或其衍生物或片段 (尤其維持與成膜脂質自組裝之能力的衍生物或片段) 中之一者或多者。在一些實施例中，支架蛋白質係經合理設計之蛋白質或肽。在一些實施例中，支架蛋白質係由活生物體 (例如哺乳動物，例如人類、非人類靈長類

動物、大鼠、小鼠、兔或天竺鼠) 產生之生物分子。在具體實施例中，支架蛋白質係以下各項中之至少一者：脂蛋白元 A (例如 apo A-I、apo A-II、apo A-IV、apo A-V)、脂蛋白元 B (例如 apo B48、apo B100)、脂蛋白元 C (例如 apo C-I、apo C-II、apo C-III、apo C-IV)、脂蛋白元 D、脂蛋白元 H、脂蛋白元 E (例如 apoE2、apoE4) 及/或攜脂蛋白 III。在一些實施例中，支架蛋白質係能夠穩定膜雙層 (例如具有疏水面及相對親水面) 之截短脂蛋白元形式。在一特定實施例中，使用截短 apoE4，例如 apoE4 之 22Kd 片段 (稱為「ApoE422k」)。在一些特定實施例中，支架蛋白質係人類源 ApoE422k。

【0086】 在一些實施例中，脂蛋白元係 apoE3 之截短形式 (例如 apoE322k)、apoE2 之截短形式 (例如 apoE222k) 或 apoA1 之截短形式 (例如 $\Delta 49$ ApoA1、MSP1、MSP1T2、MSP1E3D1)。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質組分皆係由活生物體產生之生物分子，且形成不含非生物源材料之 NLP。

【0087】 熟習此項技術者應理解，可以適宜莫耳比率來提供支架蛋白質及成膜脂質以促進 NLP 組裝。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:50 至 1:100、1:60 至 1:90 或 1:70 至 1:80。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90 或 1:100。在一具體實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:80。在一些實施例中，所用比率應使得大部分或所有成膜脂質排列為雙層，且沒有或較少成膜脂質保持未組裝。在一些實施例中，剩餘未組裝脂質變得附著於反應器皿壁，從而未留下、留下較少或極少可用於與多肽之官能基反應者。

【0088】 在本發明中，NLP 呈現一種或多種用於與例如抗原結合多肽上之互補官能基相互作用的官能化基團。在一些實施例中，官能化基團與多肽上之互補官能基進行反應且不結合至 NLP 之其他組分 (例如不結合至支架蛋白

質)。在一些實施例中，小於 25% 或 20-25%、小於 20% 或 10-20%、小於 15% 或 10-15%、小於 10% 或 5-10%、小於 5% 或 3-5% 或 0% 之官能化基團結合至本發明之結合物中的支架蛋白質。在一些實施例中，5%、4%、3%、2%、1% 或 0% 之官能化基團結合至本發明之結合物中的支架蛋白質。

【0089】 通常，並非所有成膜脂質皆發生官能化。熟習此項技術者應瞭解，擬使用之具有官能化基團之脂質的量將取決於例如官能化基團及/或成膜脂質之屬性及/或擬與其結合之多肽。舉例而言，在一些實施例中，小於 60% (例如 50-60%)、小於 50% (例如 40-50%)、小於 40% (例如 30-40%)、小於 30% (例如 20-30%) 或 小於 20% (例如 10-20%) 之成膜脂質發生官能化。在具體實施例中，10-40%、15-35%、20-35% 或 10%、15%、20%、25%、30% 或 35% 之成膜脂質發生官能化。在一特定實例中，20% 之成膜脂質攜載官能化基團。

【0090】 「官能」或「官能化」基團係指分子結構內產生該結構之化學反應特性的一組原子。在本文中簡明起見，術語「官能化基團」用於提及在 NLP 之成膜脂質上或藉由間隔區連結至該成膜脂質的此類基團。術語「官能基」用於提及在多肽 (例如抗原結合多肽) 上或藉由間隔區連結至該多肽的此類基團，其用於經由成膜脂質上之一種或多種相應官能化基團附接至 NLP。官能團/官能化基團之實例包括烴、具有雙鍵或三鍵之基團、含鹵素基團、含氨基團、含氧基團及諸如此類。在一些實施例中，官能化基團選自至少一種選自疊氮化物、胺基、酞、炔烴、羧基、鹵素、羥基、硫醇及磷酸的基之基團。通常，相應官能團與官能化基團之間的反應可形成鍵並使各別基團進行結合。

【0091】 a. NLP 與多肽之結合

【0092】 本文所用之術語「結合 (conjugation 或 binding)」係指緊鄰基團之間的相互作用，其可使得該等基團發生穩定締合。相互作用可涉及共價及/或非共價結合，例如靜電相互作用。可使用任何數量之官能化策略經由分別使用

NLP 脂質及抗原結合多肽上的一個或多個官能化基團/官能基對來達成結合，該等對已知在適宜條件下成功結合。

【0093】 可使用熟習此項技術者已知之技術來證實或量化如本文所闡述之多肽與 NLP 的成功結合。用於表徵本發明之結合物之技術實例包括 (但不限於) 螢光相關性光譜術、傅裡葉轉變紅外光譜術 (fourier transform infrared spectroscopy)、粒徑篩析層析、表面電漿共振、拉曼光譜術 (raman spectroscopy)、全內反射螢光、超旋過濾 (例如參見實例 2、圖 8A 及圖 1B)。

【0094】 圖 1A 繪示本發明之 NLP-Fab 之組裝及結合的示意圖。在本發明實施例中，奈米脂蛋白顆粒結合至至少一種多肽，其中多肽共價附接或另外結合或連接至 NLP 之一種或多種組分以形成 NLP-多肽結合物。多肽通常附接至一個或兩個雙層表面上之一種或多種成膜脂質上(例如極性頭部上)的官能化基團。官能化基團可為能夠結合至多肽上之相應或互補官能基的任何基團 (如上所述)。官能化成膜脂質之實例包括 (但不限於) 具有疊氮化物之脂質、具有羧酸酯之脂質、具有馬來醯亞胺之脂質、具有螯合金屬之脂質、具有炔丙基之脂質、具有四級胺之脂質、具有 S-蛋白質之脂質及諸如此類。通常，與非官能化成膜脂質相比，在 NLP 組裝期間所使用官能化成膜脂質之量決定了將結合至 NLP 雙層表面之多肽的量。

【0095】 官能化基團/官能基之結合對之實例包括 (但不限於) 酯與胺；羧酸與胺；疊氮化物與乙炔；二價金屬 (例如 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+}) 與聚組胺酸；異硫氰酸酯與胺；抗生物素蛋白與生物素；麩胱甘肽 S-轉移酶 (GST) 與麩胱甘肽；硫氫基與鹵代乙醯胺；硫氫基與吡啶基二硫化物；硫氫基與硫代硫酸酯；及馬來醯亞胺 (或馬來醯亞胺衍生物) 與硫氫基。熟習此項技術者應認識到，該等組分可藉由已知技術合成及/或市面有售。

【0096】 在具體實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺衍生物、鹵基乙醯胺、吡啶二硫代-丙酸酯及硫代硫酸酯中之一者或多者；且互補官能基係游離硫醇基，例如經還原硫氫基部分。在一特定實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺且互補功能基團係經還原半胱胺酸殘基。具有馬來醯亞胺之脂質市面有售或可由熟習此項技術者合成。硫醇反應性成膜脂質之一具體實例包含 1,2-二-十六烷醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[4-(對-馬來醯亞胺基苯基)丁醯胺](鈉鹽) (1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide] (sodium salt))。(例如參見**實例 1**、**圖 7A-7B**)。

【0097】 在一些實施例中，官能化基團直接位於成膜脂質之極性頭部上，或係該極性頭部之化學結構的一部分。在一些實施例中，間隔區連結官能化基團與成膜脂質。「間隔區」或「連接體」可由一種或多種連接體組分構成。實例性間隔區組分包括 6-馬來醯亞胺基己醯基 (6-maleimidocaproyl) (「MC」)、馬來醯亞胺基丙醯基 (maleimidopropanoyl) (「MP」)、對-胺基苄基氧羰基 (p-aminobenzyloxycarbonyl) (「PAB」)、4-(2-吡啶基硫代)戊酸 N-琥珀醯亞胺基酯 (N-Succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate) (「SPP」)、4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸 N-琥珀醯亞胺基酯 (N-Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) (「SMCC」) 及 (4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸 N-琥珀醯亞胺基酯 (N-Succinimidyl (4-iodo-acetyl) aminobenzoate) (「SIAB」)。其他間隔區組分為業內所已知且一些闡述於本文中。亦參見「Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands」，美國申請公開案第 2005/0238649 號，該申請公開案之內容以全文引用方式併入本文中。

【0098】 在一些實施例中，間隔區可包含胺基酸殘基。實例性胺基酸間隔區組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。實例性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸 (vc

或 val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸 (af 或 ala-phe)。實例性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸 (gly-val-cit) 及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸 (gly-gly-gly)。在一些實施例中，間隔區包含長度為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 個胺基酸之肽。在一些實施例中，間隔區具有 2-6 個胺基酸、3-5 個胺基酸或 4 個胺基酸。間隔區通常富含甘胺酸以達成撓性，且富含絲胺酸或蘇胺酸以達成溶解性。在一些實施例中，使用甘胺酸-絲胺酸間隔區，例如 (GS)_n，其中 G=甘胺酸，S=絲胺酸，且 n=2、3、4 或 5。在一特定實施例中，用於 Fab 結合之間隔區包含胺基酸序列 GSGS 或由其組成。在一些實施例中，使用提供與 GSGS 間隔區類似之撓性及溶解性的其他間隔區。

【0099】 b. 抗原結合多肽組分

【0100】 在本發明之 NLP-多肽結合物的一些實施例中，至少一種抗原結合多肽共價附接或另外結合或連接至 NLP 之一種或多種組分。通常，多肽係抗原結合多肽，例如抗體片段，例如 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、單鏈 Fab (scFab)、單鏈 Fv (scFv)、VH-VH 二聚體、VL-VL 二聚體、VH-VL 二聚體、單域、雙價抗體或線性抗體。在一些實施例中，多肽係 Fab。在一些實施例中，抗原結合多肽係交叉 Fab 或交叉單鏈 Fab。在一些實施例中，多肽係「Fab 樣分子」或「Fab 樣多肽」，其係與 Fab 具有類似大小及/或構形形狀但未必能夠結合至抗原之多肽。

【0101】 在某些實施例中，抗原結合多肽包含鉸鏈區 (或免疫球蛋白之鉸鏈區的一部分)，但不包括 Fc 區或不包括完整 Fc 區。在特定實施例中，抗原結合多肽包含鉸鏈區之至少一個 Cys 胺基酸殘基。在特定實施例中，Cys 殘基提供官能基，亦即提供用於與 NLP 脂質上之官能化基團結合的游離硫醇基。在具體實施例中，抗原結合多肽 (例如 Fab) 包含鉸鏈區之 Cys-226 及 Cys-227 中之至少一者。在一特定實施例中，Cys-227 提供用於結合之游離硫醇基。

【0102】 如上所述，本發明之 NLP-多肽結合物之多肽藉由多肽之一個或多個胺基酸殘基上的官能基共價附接或另外結合或連接至 NLP。在一些實施例中，官能基位於 C 端。「位於 C 端」意指，官能基之位置朝向多肽之 C 端。舉例而言，自 N 端至 C 端考慮，官能基可位於多肽鏈中之最後胺基酸殘基上。位於 C 端之基團可位於多肽之 C 端處的第二至最後、第三至最後、第四至最後或第五至最後胺基酸殘基上，或位於最後 1-2、1-3、2-3、1-4、2-4、1-5、3-5、1-6、2-6、3-6、1-7、3-7、4-7、1-8、3-8、5-8 或 1-10 個胺基酸殘基中之任一者上。

【0103】 在一些實施例中，官能基位於 N 端。「位於 N 端」意指，官能基之位置朝向多肽之 N 端。舉例而言，自 N 端至 C 端考慮，官能基可位於多肽鏈中之第一胺基酸殘基上。位於 N 端之基團可位於多肽之 N 端處的第二、第三、第四或第五胺基酸殘基上，或位於前 1-2、1-3、2-3、1-4、2-4、1-5、3-5、1-6、2-6、3-6、1-7、3-7、4-7、1-8、3-8、5-8 或 1-10 個胺基酸殘基中之任一者上。

【0104】 官能基經選擇以與 NLP 組分上 (例如 NLP 之成膜脂質上) 之相應或互補官能化基團進行反應，如上文所闡述。在一些實施例中，官能基選自由以下項組成之群組：馬來醯亞胺衍生物、鹵基乙醯胺、吡啶二硫代-丙酸酯及硫代硫酸酯；且該互補官能基係游離硫醇基。在具體實施例中，官能基係硫醇基，例如半胱胺酸硫醇基。在一些具體實施例中，半胱胺酸胺基酸殘基係在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵的殘基。舉例而言，硫醇基可由至少一種選自 Cys-226 及 Cys-227 (基於 Kabat 編號) 之基團提供。在一特定實施例中，C 端 Cys-227 (例如 Fab 之 C 端 Cys-227) 提供用於與 NLP 脂質上之官能化基團結合的游離硫醇基。

【0105】 在一些實施例中，官能基直接位於抗原結合多肽之胺基酸殘基上，或係該胺基酸殘基之化學結構的一部分。在一些實施例中，如上文所闡述之間隔區連結官能基與抗原結合多肽。在任一形式中，抗原結合多肽 (例如 Fab) 結合至 NLP，且在抑制及激動環境中不損失或不實質性損失抗原結合活性。亦參見**實例 4**、**圖 5B**，其中位點特異性 Fab 結合達成約 30 個 Fab/NLP 且對 NLP 流體動力學半徑之影響最小，從而指示粒度主要取決於 NLP 之盤形形狀。

【0106】 抗原結合肽通常衍生自一種或多種免疫球蛋白種類之抗體分子。抗體或免疫球蛋白之「種類」係指其重鏈所擁有之恆定域或恆定區的類型。有五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及 IgM，且該等種類中之幾種可進一步分成亞類 (同型)，例如、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及 IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。在一些實施例中，抗原結合多肽係衍生自 IgG 分子，例如 IgG 分子之 Fab。

【0107】 在本發明之一些態樣中，抗原結合多肽係治療劑且結合物可用為抗原結合多肽之遞送平臺。舉例而言，抗原結合多肽 (例如 Fab) 可用作用於中和靶或阻斷、激發或拮抗路徑之藥物負荷或生物活性分子。在本發明之一些態樣中，抗原結合多肽提供靶向抗原之遞送平臺。靶向 Fab 之附接例如可經由增強內化來使遞送藥物富集於所關注器官或組織處(37, 38, 39)。舉例而言，抗原結合多肽 (例如 Fab) 可識別特定細胞或疾病標記物以將結合物引導至特定靶。使抗原結合多肽結合至 NLP 可調介 NLP 之靶向，例如以有利於將抗原結合多肽或另一治療劑或診斷劑遞送至靶中。本段落中所引用之所有參考文獻可參見下文之實例 5。

【0108】 在某些實施例中，本發明之 NLP-多肽結合物克服了已研發用於活體內遞送治療藥(9-12)、診斷成像劑(13)以及疫苗及免疫調節治療劑(14-17)之

先前奈米脂蛋白方式的缺點。過去 10 年，已在奈米技術領域中嘗試解決習用藥物遞送系統之侷限性，包括非特異性生物分佈及靶向、較差水溶解性、有限口服生物可用性及低治療指數(1)。一些方式包括使用無機奈米顆粒(2)、基於聚合物之奈米顆粒(3)、聚合微胞(4)、樹枝狀聚合物(5)、脂質體(6)、病毒奈米顆粒(7)及碳奈米管(6)。其他策略包括基於脂質體(33-35)及聚合物之奈米顆粒(36)。然而，本發明之 NLP-結合物較其他基於奈米顆粒之遞送技術提供若干不同優點，包括低毒性及低免疫原性(20)。舉例而言，在一些實施例中，NLP-多肽結合物不含非生物源材料，包含天然產生及/或衍生自天然產生材料之脂質、支架蛋白質及抗原結合多肽，且由此引起較低免疫反應及/或毒性小於需要非生物源組分之先前遞送平臺。在某些實施例中，其他優點包括良好穩定性(例如不使用交聯劑)、良好可製造性(包括可產生高度濃縮但黏度較低之調配物)、極少顆粒間交聯、相對較均質之 NLP-多肽群體及/或增強之抗原結合效力，如本文所論述。本段落中所引用之所有參考文獻可參見下文之實例 5。

【0109】 在一些實施例中，抗原結合多肽(例如 Fab) 結合一種或多種腫瘤特異性抗原或腫瘤標記物，從而將結合物引導至腫瘤。舉例而言，表皮生長因子受體(EGFR) 由某些腫瘤細胞過度表現。在過度表現 EGFR 之活體內異種移植物腫瘤模型中，抗 EGFR 免疫脂質體在單一劑量之後於注射後 24 小時測量，所達成的細胞攝取為非靶向脂質體所達成的細胞攝取的 6 倍。另外，抗 EGFR 免疫脂質體-阿黴素(一種強效細胞毒素) 所展示之腫瘤消退顯著大於單獨阿黴素或非靶向脂質體-阿黴素。

【0110】 天然存在於腫瘤細胞表面上之腫瘤標記物之其他實例包含(但不限於) FAP (纖維母細胞活化蛋白質)、CEA (癌胚抗原)、p95 (p95HER2)、BCMA (B 細胞成熟抗原)、EpCAM (上皮細胞黏附分子)、MSLN (間皮素)、MCSP (黑色素瘤硫酸軟骨素蛋白聚醣)、HER-1 (人類表皮生長因子 1)、HER-2

(人類表皮生長因子 2)、HER-3 (人類表皮生長因子 3)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD52Flt3、葉酸鹽受體 1 (FOLR1)、人類滋養層細胞表面抗原 2 (Trop-2) 癌症抗原 12-5 (CA-12-5)、人類白血球抗原-抗原 D 相關蛋白 (HLA-DR)、MUC-1 (黏蛋白-1)、A33-抗原、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、FMS 樣酪胺酸激酶 3 (FLT-3)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、PSCA (前列腺幹細胞抗原)、轉鐵蛋白-受體、TNC (腱糖蛋白)、碳酸酐酶 IX (CA-IX)及/或結合至人類主要組織相容性複合物 (MHC) 之分子的肽。

【0111】 許多此類腫瘤抗原為業內所已知或易於由熟習此項技術者獲得。舉例而言，A33-抗原、BCMA (B 細胞成熟抗原)、癌症抗原 12-5 (CA-12-5)、碳酸酐酶 IX (CA-IX)、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CEA (癌胚抗原)、EpCAM (上皮細胞黏附分子)、FAP (纖維母細胞活化蛋白質)、FMS 樣酪胺酸激酶 3 (FLT-3)、葉酸鹽受體 1 (FOLR1)、HER-1 (人類表皮生長因子 1)、HER-2 (人類表皮生長因子 2)、HER-3 (人類表皮生長因子 3)、人類白血球抗原-抗原 D 相關蛋白 (HLA-DR)、MSLN (間皮素)、MCSP (黑色素瘤硫酸軟骨素蛋白聚醣)、MUC-1 (黏蛋白-1)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、PSCA (前列腺幹細胞抗原)、p95 (p95HER2)、轉鐵蛋白-受體、TNC (腱糖蛋白)、人類滋養層細胞表面抗原 2 (Trop-2) 之(人類)成員的序列可獲得於 UniProtKB/Swiss-Prot 資料庫中且可自 <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes> 檢索。熟習此項技術者可易於推斷該等資料庫條目中之該等 (蛋白質) 序列中的相關編碼區，該等資料庫條目亦可包含基因體 DNA 以及 mRNA/cDNA。

【0112】 (人類) FAP (纖維母細胞活化蛋白) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q12884 (條目版本：168，序列版本：5) 獲得；(人類) CEA (癌胚抗原) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P06731 (條目版本：171，序列版本：3) 獲

得；(人類) EpCAM (上皮細胞黏附分子) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P16422 (條目版本：117，序列版本：2) 獲得；(人類) MSLN (間皮素) 之序列可自 UniProt 條目號 Q13421 (版本號：132；序列版本：2) 獲得；(人類) FMS 樣酪胺酸激酶 3 (FLT-3) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P36888 (主要可引用登錄號) 或 Q13414 (次要登錄號) 以版本號 165 及序列版本 2 獲得；(人類) MCSP (黑色素瘤硫酸軟骨素蛋白聚醣) 之序列可自 UniProt 條目號 Q6UVK1 (版本號：118；序列版本：2) 獲得；(人類) 葉酸鹽受體 1 (FOLR1) 之序列可自 UniProt 條目號 P15328 (主要可引用登錄號) 或 Q53EW2 (次要登錄號) 以版本號 153 及序列版本 3 獲得；(人類) 滋養層細胞表面抗原 2 (Trop-2) 之序列可自 UniProt 條目號 P09758 (主要可引用登錄號) 或 Q15658 (次要登錄號) 以版本號 172 及序列版本 3 獲得；(人類) PSCA (前列腺幹細胞抗原) 之序列可自 UniProt 條目號 O43653 (主要可引用登錄號) 或 Q6UW92 (次要登錄號) 以版本號 134 及序列版本 1 獲得；(人類) HER-1 (表皮生長因子受體) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P00533 (條目版本：177，序列版本：2) 獲得；(人類) HER-2 (受體酪胺酸-蛋白質激酶 erbB-2) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P04626 (條目版本：161，序列版本：1) 獲得；(人類) HER-3 (受體酪胺酸-蛋白質激酶 erbB-3) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P21860 (條目版本：140，序列版本：1) 獲得；(人類) CD20 (B 淋巴球抗原 CD20) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P11836 (條目版本：117，序列版本：1) 獲得；(人類) CD22 (B 淋巴球抗原 CD22) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P20273 (條目版本：135，序列版本：2) 獲得；(人類) CD33 (B 淋巴球抗原 CD33) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P20138 (條目版本：129，序列版本：2) 獲得；(人類) CA-12-5 (黏蛋白 16) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q8WXI7 (條目版本：66，序列版本：2) 獲得；(人類) HLA-DR 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q29900 (條目版本：59，序列版本：1) 獲

得；(人類) MUC-1 (黏蛋白-1) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P15941 (條目版本：135，序列版本：3) 獲得；(人類) A33 (細胞表面 A33 抗原) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q99795 (條目版本：104，序列版本：1) 獲得；(人類) PSMA (麩胺酸羧肽酶 2) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q04609 (條目版本：133，序列版本：1) 獲得；(人類) 轉鐵蛋白受體之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q9UP52 (條目版本：99，序列版本：1) 及 P02786 (條目版本：152，序列版本：2) 獲得；(人類) TNC (腱糖蛋白) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 P24821 (條目版本：141，序列版本：3) 獲得；或 (人類) CA-IX (碳酸酐酶 IX) 之序列可自 Swiss-Prot 資料庫條目 Q16790 (條目版本：115，序列版本：2) 獲得。熟習此項技術者可易於推斷該等資料庫條目中之該等 (蛋白質) 序列中的相關編碼區，該等資料庫條目亦可包含基因體 DNA 以及 mRNA/cDNA。

【0113】 本發明之結合物可以多聚體及/或多價形式提供，例如如本文所闡述或業內已知之一個或多個抗原結合多肽，該等多聚體及/或多價形式更詳細地闡述於下文中。

【0114】 c. 多聚體形式

【0115】 如本文所闡述使多肽 (例如抗原結合多肽) 與 NLP 結合可促進抗原結合多肽之多聚化，例如其中結合物提供兩個或更多個抗原結合多肽分子，亦即其中同一分子之多個拷貝附接至 NLP。此形式可以確定方式增加抗原結合多肽之活性或親合性。舉例而言，在某些抗體治療方式中，化合價可為主要限制且重新關注對於擬有效激發或拮抗之路徑需要超過 2 之化合價的已知 mAb 靶。該等靶之實例包括需要群集受體以進行活化之 TNF 家族成員，例如 DR5 及 OX40(41, 42)。儘管已研發各種工程策略來使化合價擴展至 2 以上(例如使用 IgG 樣及非 IgG 樣形式(41, 42)，例如三功能抗體、四功能抗體、五功能抗體及自組裝性六聚體 IgG 抗體(43-45))，但該等形式具有若干侷限性。舉例而言，先

前使用之形式可負面地影響藥物動力學且不能達成超過 3-6 之化合價 (43)，且由此在許多情形下不能達成足夠之激發/拮抗活性。在某些態樣中，本發明提供用於遞送高密度之抗原結合多肽(例如 Fab) 的平臺，該等平臺能夠達成獲得與某些靶有關之臨床相關性治療指數所需的活體內效力。本段落中所引用之所有參考文獻可參見下文之實例 5。

【0116】 本發明之另一態樣涉及使用本文所闡述之結合物平臺來增加抗原結合多肽的親合性、活性或效力，其中本發明之 NLP-多肽結合物之抗原結合多肽係指向需要超過 2 之化合價的靶。舉例而言，靶可為一種或多種選自由以下項組成之群組者：TNF 家族成員、DR4、OX40、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3 及淋巴毒素 β 受體。在一具體實施例中，抗原結合多肽係結合 OX40 之 Fab。在一具體實施例中，抗原結合多肽係結合 DR4 之 Fab。在一些實施例中，抗原結合多肽係至少一種選自抗 OX40、抗 GITR、抗 Tie2、抗因子 D、抗 VEGF、抗 MERTK、抗 CD3、抗淋巴毒素 β 受體及抗 DR4 Fab 之 Fab。

【0117】 在一些實施例中，本發明之 NLP-多肽結合物提供抗原結合多肽(例如 Fab) 之兩個或更多個分子(例如 2-60 個分子/結合物)以增加抗原結合多肽的活性或親合性。在一些實施例中，該結合物包含抗原結合多肽(例如 Fab) 之 2-60、3-50、4-40、5-35、6-30 或 7-20 個分子。在特定實施例中，該結合物包含抗原結合多肽(例如 Fab) 之 2-32、6-32、10-30、10-60、15-30 或 20 個分子(例如參見實例 2、圖 3A-3D)。在一些具體實施例中，該結合物包含抗原結合多肽(例如 Fab) 之 3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 個分子。該等實施例通常增加抗原結合多肽之活性及/或親合性。舉例而言，具有 4-8 個抗 OX40 Fab 分子之結合物展示增加之抗 XO40 活性(例如參見實例 4、圖 5B)。

【0118】 在一些實施例中，如本文所闡述之多肽 (例如抗原結合多肽，例如 Fab) 與 NLP 之結合物增加抗原結合多肽及/或 NLP 的穩定性。舉例而言，抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 與 NLP 之結合物可在活體外 (例如增加儲存期限) 及/或在活體內 (例如改良血清半衰期) 改良抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 的穩定性。在一些實施例中，NLP 與抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之結合物在活體外 (例如增加儲存期限) 及/或在活體內 (例如改良血清半衰期) 改良了 NLP 顆粒的穩定性。據此，本發明之另一態樣涉及使用本文所闡述之結合物平臺來增加抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 或奈米脂蛋白顆粒的穩定性及/或半衰期。

【0119】 在一些實施例中，如本文所闡述之多肽 (例如抗原結合多肽，例如 Fab 或 Fab 樣分子) 與 NLP 之結合物增加多肽-NLP 複合物 (例如抗原結合多肽-NLP 複合物) 的穩定性。在一些實施例中，與不結合至多肽 (例如抗原結合多肽，例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之 NLP 相比，多肽-NLP 複合物 (例如抗原結合多肽-NLP 複合物) 之穩定性增加 30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80% 或 80-90%。在一些實施例中，與不結合至 NLP 之多肽 (例如抗原結合多肽，例如 Fab 或 Fab 樣分子) 相比，多肽-NLP 複合物 (例如抗原結合多肽-NLP 複合物) 之穩定性增加 30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80% 或 80-90%。在一些實施例中，與不包含抗原結合多肽之 NLP 相比，包含 NLP 及抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之結合物的穩定性增加 30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80% 或 80-90%，例如如本文所量測。穩定 NLP-多肽結合物通常包括 5-60、10-60、15-30 或 20 個抗原結合多肽分子/結合物，包括 7-60、7-40、7-32 或 8-30 個抗原結合多肽 (例如 Fab)/結合物。在具體實例中，NLP-多肽結合物包含 6、7、8、9 或 10 個抗原結合多肽 (例如 Fab)。在某些實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子。在一特定實例中，NLP-多肽

結合物包括 7-32 個 Fab 分子/結合物。(例如參見實例 5、圖 6A-6B，其證實了在生理相關溫度 (37°C) 下 Fab 載量對複雜生物基質 (50% 血清) 中之 Fab-NLP 穩定性的效應 (藉由分析型 SEC 量測)，其中 Fab-NLP 顯示增加之穩定性，且在 Fab/顆粒比率為 7 或更大之情形下 >63% 之 Fab-NLP 在 24 小時之後保持完整)。

【0120】 據此，在一些實施例中，本發明提供令人意外地穩定且幫助克服其他奈米顆粒遞送平臺之藥物動力學問題的 NLP-多肽結合物。舉例而言，已知奈米顆粒之活體內半衰期為約 1-3 天 (參見下文實例 5 之參考文獻 40)，且單株抗體治療劑通常依賴於 Fc-調介之藥物動力學經由 FcRn 再循環來延長半衰期。在一些實施例中，不使用 Fc-調介之藥物動力學且基於將多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之多個拷貝納入 NLP 盤形表面上，本發明之 NLP-多肽結合物可令人意外改良 NLP 穩定性。

【0121】 d. 多特異性形式

【0122】 本發明之另一態樣提供多特異性構築體，亦即包含結合兩個或更多個靶之一個或多個抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 的 NLP 結合物。在一些實施例中，該等靶包含不同抗原。在一些實施例中，該等靶包含相同抗原。在一些實施例中，該等靶包含同一抗原上之不同表位。在一些實施例中，結合物包含結合 2、3、4、5、6、7 或 8 個不同抗原或表位之 2、3、4、5、6、7 或 8 個不同抗原結合多肽，例如 2、3、4、5、6、7 或 8 個不同 Fab。在一些實施例中，該等結合物包含結合 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30 或 20-30 個不同抗原或表位之 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30 或 20-30 個不同抗原結合多肽，例如 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30 或 20-30 個不同 Fab。在一些實施例中，該等結合物包含結合 25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同抗原或表位之 25-30、25-50、

30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同抗原結合多肽，*例如* 25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同 Fab。

【0123】 在一些實施例中，本發明之 NLP-多肽結合物的抗原結合多肽係指向兩個不同靶以得到雙特異性結合物。儘管雙特異性抗體之觀念已超過 60 年，但與設計、穩定性及製造有關之難題最初延緩了其發展。最近，抗體改造技術之進展已使得愈加關注雙特異性方式，從而 FDA 最新批准三種雙特異性抗體治療劑 (瑞莫韋比 (Removab)，其靶向 EpCAM 及 CD3；布林賽特 (Blinicyto)，其靶向 CD19 及 CD3；及海姆布拉 (Hemlibra) (Chugai)，其靶向因子 IXa 及因子 X) 以及超過 100 種處於臨床試驗中的多特異性候選者 (*例如* 法瑞昔單抗 (Faricimab)，其靶向 VEGF-A 及 Ang-2)。雙特異性構築體促進了獨特作用機制，例如使免疫細胞銜接至腫瘤細胞、阻斷信號傳導路徑及/或將酬載 (payload) 特異性遞送至腫瘤中。

【0124】 本文所揭示之 NLP-多肽結合物提供了新穎及多功能之雙特異性平臺，其可易於擴展至多特異性形式及/或高化合價。舉例而言，在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含兩種不同 Fab 中之每一者的一個分子，從而提供二價、雙特異性結合物。在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含兩種不同 Fab 中之每一者的兩個分子，從而提供四價、雙特異性結合物。在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含第一 Fab 之一個分子及第二 Fab 之兩個分子，從而提供三價、雙特異性結合物。在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含兩種不同 Fab 中之每一者的三個拷貝，從而提供六價、雙特異性結合物。在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含三種不同 Fab 中之每一者的兩個拷貝，從而提供六價、三特異性結合物。在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含第一 Fab 之兩個拷貝及第二 Fab 之三個拷貝，從而提供五價、雙特異性結合物。在一些實施例中，

NLP-多肽結合物包含兩種不同 Fab 中之每一者的四個拷貝，從而提供八價、雙特異性結合物。熟習此項技術者應明瞭提供特定多價及多特異性之其他組態。

【0125】 在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含結合一對臨床相關靶之兩種抗原結合多肽中之每一者的至少一個分子。「臨床相關靶之對」、「臨床相關之靶抗原對」、「臨床相關對」或本文之類似表達係指兩種疾病媒介(例如細胞表面受體、可溶性配體或其他蛋白質)，其在特定疾病之病理生理學中發揮作用，從而雙特異性抗體或其他雙特異性構築體結合至兩個靶可在治療疾病時產生有益效應。舉例而言，在 T 細胞及腫瘤細胞例如由本發明之雙特異性 NLP-多肽結合物結合時，形成細胞溶解突觸，其中 T 細胞釋放成孔穿孔素及細胞毒性顆粒酶-B，繼而使得靶細胞死亡。作為另一實例，本文所闡述之雙特異性 NLP-多肽結合物可使用一個分子同時阻斷兩個靶之信號傳導路徑，此有利於抑制複雜路徑，例如血管生成。

【0126】 在一些實施例中，臨床相關之抗原對包含 T 細胞標記物及腫瘤抗原，例如本文所揭示及/或業內已知之腫瘤抗原中之任一者或多者。在一些實施例中，臨床相關之抗原對包含共刺激受體及腫瘤抗原，例如本文所揭示及/或業內已知之腫瘤抗原中之任一者或多者。在一些實施例中，臨床相關之抗原對包含天然殺手 (NK) 細胞標記物及腫瘤抗原，例如本文所揭示及/或業內已知之腫瘤抗原中之任一者或多者。

【0127】 「T 細胞標記物」係指可由抗原結合部分識別之任何靶，且在將抗原結合部分投予受試者後，該標記物將抗原結合部分較受試者之其他細胞或組織優先引導至 T 細胞。一實例性 T 細胞標記物包含 CD3。「NK 細胞標記物」係指可由抗原結合部分識別之任何靶，且在將抗原結合部分投予受試者後，該標記物將抗原結合部分較受試者之其他細胞或組織優先引導至 T 細胞。一實例性 NK 細胞標記物包含 CD316A。

【0128】 可由本文所提供之雙特異性或多特異性結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 靶向之分子的其他實例包括 (但不限於) 細胞介素、可溶性血清蛋白及其受體以及其他膜結合蛋白 (例如黏附素)。在具體實施例中，雙-或多特異性結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 結合一種、兩種或更多種選自由以下項組成之群組的細胞介素、細胞介素相關蛋白及細胞介素受體：8MPI、8MP2、8MP38 (GDF10)、8MP4、8MP6、8MP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (α FGF)、FGF2 (β FGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFN81、IFNG、IFNWI、FEL1、FEL1 (ϵ)、FEL1 (ζ)、IL 1A、IL 1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL 12A、IL 12B、IL 13、IL 14、IL 15、IL 16、IL 17、IL 17B、IL 18、IL 19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFBb3、LTA (TNF- β)、LTB、TNF (TNF- α)、TNFSF4 (OX40 配體)、TNFSF5 (CD40 配體)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27 配體)、TNFSF8 (CD30 配體)、TNFSF9 (4-1 BB 配體)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、HGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL 11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、

IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、
IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦素)、PTN及 THPO。

【0129】 在一些實施例中，靶抗原係趨化介素、趨化介素受體或趨化介素相關蛋白質。在具體實施例中，雙-或多特異性結合物結合一種、兩種或更多種選自由以下項組成之群組的趨化介素、趨化介素受體或趨化介素相關蛋白：

CCL1 (1-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-I α)、CCL4 (MIP-I β)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (科塔新 (cotaxin))、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-I δ)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MDP-3b)、CCL20 (MIP-3 α)、CCL21 (SLC/艾克杜斯-2 (exodus-2))、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2、嗜酸性粒細胞趨化因子-2 (eotaxin-2))、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸性粒細胞趨化因子-3 (eotaxin-3))、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GRO1)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP10)、CXCL11 (I-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL1 (SCYDI)、SCYE1、XCL1 (淋巴細胞趨化蛋白 (lymphotactin))、XCL2 (SCM-I β)、BLRI (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-IRB IRA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7 (CKR7/EBI2)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9 (GPR9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8R α)、IL8RB (IL8R β)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、

CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1、HDF1 α 、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SL1T2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2及VHL。

【0130】 在一些實施方式中，靶抗原為 CD 蛋白質。在具體實施例中，雙-或多特異性結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 結合一種、兩種或更多種以下靶：選自由 CD3、CD4、CD5、CD16、CD19、CD20、CD34、CD64、CD200 組成之群組的 CD 蛋白質；ErbB 受體家族之成員，例如 EGF 受體、HER2、HER3 或 HER4 受體；細胞黏附分子，例如 LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7 整聯蛋白及 α v/ β 3 整聯蛋白，包括其 α 或 β 亞單元 (例如抗 CD11a、抗 CD18或抗 CD11b 抗體)；生長因子，例如 VEGF-A、VEGF-C；組織因子 (TF)； α 干擾素 (α IFN)；TNF α ；介白素，例如 IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-S、IL-9、IL-13、IL 17 AF、IL-1S、IL-13R α 1、IL13R α 2、IL-4R、IL-5R、IL-9R、IgE；血型抗原；flk2/flt3 受體；肥胖症 (OB) 受體；mp1 受體；CTLA-4；RANKL、RANK、RSV F 蛋白、蛋白質 C 等。

【0131】 在特定實施例中，多特異性 NLP-多肽結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 結合低密度脂蛋白受體相關蛋白 (LRP)-1 或 LRP-8 或轉鐵蛋白受體及至少一種選自由以下項組成之群組的靶：1) β -分泌酶 (BACE1 或 BACE2)、2) α -分泌酶、3) γ -分泌酶、4) τ -分泌酶、5) 類澱粉前體蛋白質 (APP)、6) 死亡受體 6 (DR6)、7) 類澱粉 β 肽、8) α -突觸核蛋白、9) 帕金森蛋白 (Parkin)、10) 杭丁頓蛋白 (Huntingtin)、11) p75 NTR及 12) 半胱天冬酶 (caspase)-6。

【0132】 在特定實施例中，多特異性 NLP-多肽結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 結合選自由以下項組成之群組的一個或多個臨床相關對：IL-1 α 及 IL-1 β ；IL-12 及 IL-1S；IL-13 及 IL-9；IL-13 及 IL-4；IL-13 及 IL-5；IL-5 及 IL-4；IL-13 及 IL-1 β ；IL-13 及 IL-25；IL-13 及 TARC；IL-13 及 MDC；IL-13 及 MEF；IL-13 及 TGF；IL-13 及 LHR 激動劑；IL-12 及 TWEAK；IL-13 及 CL25；IL-13 及 SPRR2a；IL-13 及 SPRR2b；IL-13 及 ADAMS；IL-13 及 PED2；IL17A 及 IL17F；CD3 及 CD19；CD138 及 CD20；CD138 及 CD40；CD19 及 CD20；CD20 及 CD3；CD3S 及 CD13S；CD3S 及 CD20；CD3S 及 CD40；CD40 及 CD20；CD-S 及 IL-6；CD20 及 BR3；TNF- α 及 TGF- β ；TNF- α 及 IL-1 β ；TNF- α 及 IL-2；TNF- α 及 IL-3；TNF- α 及 IL-4；TNF- α 及 IL-5；TNF- α 及 IL-6；TNF- α 及 IL8；TNF- α 及 IL-9；TNF- α 及 IL-10；TNF- α 及 IL-11；TNF- α 及 IL-12；TNF- α 及 IL-13；TNF- α 及 IL-14；TNF- α 及 IL-15；TNF- α 及 IL-16；TNF- α 及 IL-17；TNF- α 及 IL-18；TNF- α 及 IL-19；TNF- α 及 IL-20；TNF- α 及 IL-23；TNF- α 及 IFN- α ；TNF- α 及 CD4；TNF- α 及 VEGF；TNF- α 及 MIF；TNF- α 及 ICAM-1；TNF- α 及 PGE4；TNF- α 及 PEG2；TNF- α 及 RANK 配體；TNF- α 及 Te38；TNF- α 及 BAFF；TNF- α 及 CD22；TNF- α 及 CTLA-4；TNF- α 及 GP130；TNF- α 及 IL-12p40；VEGF 及 HER2；VEGF-A 及 HER2；VEGF-A 及 PDGF；HER1 及 HER2；VEGFA 及 ANG2；VEGF-A 及 VEGF-C；VEGF-C 及 VEGF-D；HER2 及 DR5；VEGF 及 IL-8；VEGF 及 MET；VEGFR 及 MET 受體；EGFR 及 MET；VEGFR 及 EGFR；HER2 及 CD64；HER2 及 CD3；HER2 及 CD16；HER2 及 HER3；EGFR (HER 1) 及 HER2；EGFR 及 HER3；EGFR 及 HER4；IL-14 及 IL-13；IL-13 及 CD40L；IL4 及 CD40L；TNFR1 及 IL-1R；TNFR1 及 IL-6R；TNFR1 及 IL-18R；EpCAM 及 CD3；MAPG 及 CD28；EGFR 及 CD64；CSPG 及

RGM A ; CTLA-4 及 BTN02 ; IGF1 及 IGF2 ; IGF1/2 及 Erb2B ; MAG 及 RGM A ; NgR 及 RGM A ; NogoA 及 RGM A ; OMGp 及 RGM A ; POL-1 及 CTLA-4 ; 以及 RGM A 及 RGM B 。

【0133】 可由本發明之多特異性 NLP-多肽結合物 (例如 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab 樣分子結合物) 共靶向的其他臨床相關對包括 CD63 及 CD95 (死亡受體) ; HER2 及 CD63 (涉及溶酶體內化之受體) ; CD20 或 CD19 及 CD47 (中斷「Don't eat me」信號) ; LAG-3 及 PD1 ; CTLA4 及 PD1 ; 以及 LAG-3 及 PD-L1 。

【0134】 在一具體實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 (一般 T 細胞標記物) 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合靶向 CD19 (腫瘤抗原) 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在另一具體實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 EpCAM (腫瘤抗原) 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在再一具體實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 CEA 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在再一具體實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD16A (NK 細胞標記物) 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 CD30 或 CD33 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab) ; 及視情況結合 IL-15 之第三抗原結合多肽 (例如第三 Fab) 。

【0135】 在一特定實例中，NLP-多肽結合物包含結合 Ang-2 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 VEGF-A 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在另一特定實例中，NLP-多肽結合物包含結合δ樣配體 4 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 VEGF 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在再一特定實例中，NLP-多肽結合物包含結合 DR5 之第一抗原結合多肽 (例如第

一 Fab) 及結合 FAP (纖維母細胞活化蛋白質) 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。

【0136】 在一些特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab)；及結合 CD33、gp100、HER2、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3 (glypican-3) 及 TROP-2 中之至少一者之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)；及視情況結合至少一種選自 IL-2、CD137及 CD28 之共刺激分子之第三抗原結合多肽 (例如第三 Fab)。在一些特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab)；及結合 CD33、gp100、HER2、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3及 TROP-2 中之至少一者之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)；及視情況結合 PD1 及/或 PD-L1 之第三抗原結合多肽 (例如第三 Fab)。在一特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab)；結合 CEA 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)；及結合 PD1 及 PD-L1 中之至少一者之第三抗原結合多肽 (例如第三 Fab)。

【0137】 在一些特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 CD28 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 CD20 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在一些特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合 PD1 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 CTLA4 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在一些特定實施例中，NLP-多肽結合物包含結合兩個不同 HER2 表位之兩個抗原結合多肽。

【0138】 d. 短肽組分

【0139】 在一些實施例中，NLP-多肽結合物包含 (例如進一步包含) 至少一種共價附接至包含 1-80、10-70或 20-60 個胺基酸之短肽 (例如CKP 或 CKP 變異體) 的 C₄₋₂₈ 脂肪醯基。

【0140】 在一些實施例中，C₄₋₂₈ 脂肪醯基係 C₁₆ 脂肪醯基。在一些實施例中，C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含官能基 (例如闡述於本文其他處之官能基)。在一些實施例中，官能基直接位於 C₄₋₂₈ 脂肪醯基之烴尾部上，或係該烴尾部之化學結構的一部分。在一些實施例中，官能基與短肽之一個或多個胺基酸殘基上的相應或互補官能基 (例如如本文其他處所闡述) 發生反應。在一些實施例中，相應或互補官能基位於肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 C 端。在一些實施例中，相應或互補官能基位於肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 N 端。在一些實施例中，C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合至短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 N 端之離胺酸側鏈的 ε 胺基。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個短肽 (例如 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個 C₄₋₂₈ 脂肪醯基分子，每一分子共價附接至短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體))。在一些實施例中，短肽: NLP 之莫耳比率為 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60。在一些實施例中，NLP 中之短肽: 抗原結合多肽的莫耳比率介於 1-100、10-90、20-80、30-70 或 40-60 之間。在一些實施例中，包含短肽及抗原結合多肽之 NLP 中短肽: 抗原結合多肽的莫耳比率介於約 1:60 與 60:1 之間，包括此範圍內之任何比率。在一些實施例中，包含短肽及抗原結合多肽之 NLP 中短肽: 抗原結合多肽的莫耳比率為約 20。在一些實施例中，NLP 包含 1-50 個抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣多肽) 及 1-100 (例如約 60) 個短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 5-30、10-25、15-20 或 18 個分子及抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之 5 至 40、10 至 35、15 至 30、20 至 25 或 23 個分子。在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 3-30、5-20、10-15 或 13 個分子及抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含短多肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之

20-80、25-70、30-60、35-50或 40 個分子及抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 之 10 至 60 個分子。在一些實施例中，NLP 中之短肽:抗原結合多肽的莫耳比率介於 1-100、10-90、20-80、30-70或 40-60 之間。在一些實施例中，包含短肽及抗原結合多肽之 NLP 中短肽:抗原結合多肽的莫耳比率介於約 1:60 與 60:1 之間，包括此範圍內之任何比率。在一些實施例中，包含短肽及抗原結合多肽之 NLP 中短肽:抗原結合多肽的莫耳比率為約 20。

【0141】 在一些實施例中，將結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪鹽基納入肽-NLP-多肽結合物中會增加肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 的親合性、活性或效力，例如如上文針對抗原結合多肽所闡述。

【0142】 在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含兩個或更多個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) (例如 2、3、4、5、6、7、8、9或 10 個不同短肽，例如 CKP 或 CKP 變異體)，該等不同短肽例如顯示兩種或更多種不同活性，例如不同靶結合特異性及/或不同治療活性。本文所揭示之肽-NLP-多肽結合物提供可擴展至多特異性形式及/或高化合價的多特異性平臺，該擴展不僅係針對抗原結合多肽 (如上所述)，且亦係針對短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。舉例而言，在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含 2、3、4、5、6、7或 8 個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)，例如結合 2、3、4、5、6、7或 8 個不同抗原或表位之 2、3、4、5、6、7或 8 個不同肽。在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或 20-30 個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)，例如結合 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或 20-30 個不同抗原或表位之 10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或 20-30 個不同肽。在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含 25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。

異體)，例如結合 25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同抗原或表位之 25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60 或 40-60 個不同肽。

【0143】 在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 及抗原結合肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子)。在一些實施例中，短肽與抗原結合多肽結合相同靶。在一些實施例中，短肽與抗原結合多肽結合不同靶。在一些實施例中，短肽展現與抗原結合多肽之活性 (例如治療活性) 互補或協同之活性 (例如治療活性)。舉例而言，在一些實施例中，肽-NLP-多肽結合物包含結合兩種不同抗原之兩個短肽，其中兩種不同抗原選自下列對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。在一些實施例中，該結合物包含短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 及抗原結合多肽，其中短肽及抗原結合多肽結合兩種不同抗原。在一些實施例中，兩種不同抗原選自下列對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0144】 在一些實施例中，結合物包含結合選自 OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3 及淋巴毒素 β 受體之靶的短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，結合物包含結合前述靶之任何組合的至少兩個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 或短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 及抗原結合肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子)。在一些實施例中，結合物包含結合選自因子 D、VEGF、Tie2 及 DR4 之靶的短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，結合物包含結合前述靶之任何組合的至少兩個不同短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 或短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 及抗原結合肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子)。

【0145】 在一些實施例中，短肽係半胱胺酸結肽 (CKP)。半胱胺酸結肽通常長度為 20 至 60 個胺基酸且包含形成三個分子內雙硫鍵之 6 個保守半胱胺酸，該等分子內雙硫鍵排列成稱為胱胺酸結模體之打結構形，亦即藉由穿有第三雙硫鍵之兩個雙硫鍵所形成的環 (Craik 等人 (2001) *Toxicon* 39(1): 43-60)。該結構模體存在於來自各種物種之肽及蛋白質中，且賦予肽框架抵抗熱、化學及酶促降解之高穩定性 (Colgrave 等人 (2004) *Biochemistry* 43, 5965–5975)。實例性 CKP 包括 (例如但不限於) EETI-II (UniProt 登錄號：P12071)、環狀抗菌肽 (cyclopsychotride) A (UniProt 登錄號：P56872)、環紫菌素 (cycloviolacin) O1 (Uniprot 登錄號：P82230)、環紫菌素 O12 (UniProt 登錄號：P83836)、kalata (例如 kalata B1 (Uniprot 登錄號：P56254)、kalata B8 (Uniprot 登錄號：P85175) 等)、palicourein (Uniprot 登錄號：P84645)、tricyclon A (Uniprot 登錄號：B6E617)、木鱉子 (*Momordica cochinchinensis*) 胰蛋白酶抑制劑 (例如 MCoTI 1 (Uniprot 登錄號：P82408))、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 胰蛋白酶抑制劑 (例如 SOTI 1 (Uniprot 登錄號：P84779))、環狀桿菌素 A (Uniprot 登錄號：P56871)、環狀桿菌素 B (Uniprot 登錄號：56879)、環狀抗菌肽 (Uniprot 登錄號：P56872) 及 varv 肽 A (Uniprot 登錄號：P58446)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。EETI-II 之胺基酸序列係 GCPRILMRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 1)。

【0146】 存在於側接於 CKP 中之保守半胱胺酸殘基之環區域中的高胺基酸序列多樣性表明，非天然序列可耐受於該等區域中。已使用 CKP 主鏈作為用於肽接枝及親和力成熟之框架來生成結構及/或生物活性顯著不同於天然 CKP 的高度穩定肽。舉例而言，已使用噴瓜 (*Ecballium elaterium*) 胰蛋白酶抑制劑 II (EETI-II) 作為分子支架，其中使用針對諸如彈性蛋白酶、促血小板生成素及整聯蛋白等靶之經接枝生物活性肽合理取代此胰蛋白酶結合環

(PRILMR)。例如參見 Kimura 等人 (2009) *Proteins* 77, 359–369；Gunasekera 等人 (2008) *J. Med. Chem.* 51: 7697–7704；Krause 等人 (2007) *Proteins* 77, 359–369；Hilpert 等人 (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 24986–24993；及 Kimura 等人 (2011) *PLoS One* 6, e16112)。另外，已經由親和力成熟來生成結合所關注靶 (例如 VEGFA 及 LRP6) 之 EETI-II 的肽衍生物。參見 WO 2017/049009。在一些實施例中，該肽為 CKP 變異體。在一些實施例中，CKP 變異體相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環序列在一個或多個環序列中包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含化學修飾。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含化學修飾。在一些實施例中，CKP 變異體包含允許共價結合 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基) 與 CKP 變異體 (例如在 CKP 變異體之 N 端或其附近，或在 CKP 變異體之 C 端或其附近) 之修飾。在一些實施例中，CKP 變異體相對於衍生其之野生型 CKP 在其 N 端進一步包含 (例如經修飾以進一步包含) 另一離胺酸殘基。在一些實施例中，CKP 變異體結合至不同於由衍生其之野生型 CKP 結合之靶的靶。在一些實施例中，CKP 變異體顯示不同於由衍生其之野生型 CKP 結合之靶的活性 (例如治療活性)。在一些實施例中，CKP 變異體係衍生自 EETI-TT (SEQ ID NO: 1)。

【0147】 在一些實施例中，包含抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 及短肽之結合物 (例如肽-NLP-多肽結合物) 中短肽之活性為包含短肽之結合物 (例如肽-NLP 結合物，亦即不含抗原結合多肽) 中短肽之活性的例如約 2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-或 10 倍中的任一者。在一些實施例中，短肽之活性係

約 2 倍至 20 倍，例如約 5 倍。在一些實施例中，短肽係 CKP，例如 EETI-II。在一些實施例中，短肽係衍生自 EETI-II 之 CKP 變異體。

【0148】 III. 包含短肽之奈米脂蛋白結合物

【0149】 本發明之另一態樣涉及包含至少一種含有 1-80、10-70 或 20-60 個胺基酸之短肽 (亦即除支架蛋白質外之納入 NLP 之肽) 的奈米脂蛋白顆粒結合物。如本文其他處所論述，「奈米脂蛋白顆粒」或 NLP 係指包含脂質及支架蛋白質、尤其包含成膜脂質及支架蛋白質 (例如脂蛋白元) 之超分子複合物。NLP 通常經由自組裝過程形成，其中成膜脂質形成具有盤形形狀之脂雙層 (參見下文實例 5 之參考文獻 19)，且其中藉由結合至環繞雙層盤形體之支架蛋白質來穩定該盤形體的疏水性邊緣。在一些實施例中，成膜脂質包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)。在一些實施例中，成膜脂質包含烷基磷酸膽鹼、醚脂質、醣脂、溶血神經鞘脂、溶血甘油磷脂、磷脂、鞘脂及/或固醇。另外或替代地，在一些實施例中，成膜脂質係磷脂或不同磷脂之組合。實例性磷脂包括但不限於例如二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼 (DMPC)、二油醯基磷酸-乙醇胺 (DOPE)、二油醯基磷脂醯膽鹼 (DOPC)、二油醯基磷酸絲胺酸 (DOPS) 及二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼 (DPPC) 以及其組合。在一特定實施例中，成膜脂質係 DOPE 及/或 DOPC。在一些實施例中，成膜脂質係非脂質兩親性分子，例如二甘油四醚、膽固醇、麥角固醇及諸如此類。

【0150】 在一些實施例中，成膜脂質係生物分子，亦即由活生物體 (例如細菌、酵母或哺乳動物) 產生之分子。

【0151】 在該等肽-NLP 結合物中，由成膜脂質形成之雙層由一種或多種支架蛋白質 (亦即本文其他處所闡述之支架蛋白質) 穩定。在一些實施例中，支架蛋白質係脂蛋白元。在一些實施例中，支架蛋白質係脂蛋白元 A、脂蛋白元 B、脂蛋白元 C、脂蛋白元 D、脂蛋白元 H、脂蛋白元 E 或前述各項中之任一者

或多者的組合。在一些實施例中，支架蛋白質係能夠穩定該雙層之前述脂蛋白元中之任一者的截短形式。在一些實施例中，支架蛋白質係 apoE3 之截短形式 (例如 apoE322k)、apoE2 之截短形式 (例如 apoE222k) 或 apoA1 之截短形式 (例如 $\Delta 49$ ApoA1、MSP1、MSP1T2、MSP1E3D1)。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質組分皆係由活生物體產生之生物分子，且形成不含非生物源材料之 NLP。

【0152】 熟習此項技術者應理解，可以適宜莫耳比率來提供支架蛋白質及成膜脂質以促進肽-NLP 結合物組裝。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:50 至 1:100、1:60 至 1:90 或 1:70 至 1:80。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90 或 1:100。在一具體實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:80。在一些實施例中，所用比率應使得大部分或所有成膜脂質排列為雙層，且沒有或較少成膜脂質保持未組裝。

【0153】 在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含至少一種共價附接至包含 1-80、10-70 或 20-60 個胺基酸之短肽的 C_{4-28} 脂肪醯基成膜脂質。在一些實施例中， C_{4-28} 脂肪醯基係 C_{16} 脂肪醯基。在一些實施例中， C_{4-28} 脂肪醯基包含官能基 (例如闡述於本文其他處之官能基)。在一些實施例中，官能基直接位於 C_{4-28} 脂肪醯基之烴尾部上，或係該烴尾部之化學結構的一部分。在一些實施例中，官能基與短肽之一個或多個胺基酸殘基上的相應或互補官能基 (例如如本文其他處所闡述) 發生反應。在一些實施例中，相應或互補官能基位於肽之 C 端。在一些實施例中，相應或互補官能基位於肽之 N 端。在一些實施例中， C_{4-28} 脂肪醯基結合至短肽之 N 端之離胺酸側鏈的 ϵ 胺基。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個短肽 (例如 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個共價附接至短肽之 C_{4-28} 脂肪醯基 (例如 C_{16} 脂

肪醯基)成膜脂質)。在一些實施例中，短肽: NLP 之莫耳比率為1-100、10-90、20-80、30-70、40-60或60。可使用下文實例6及7中所闡述之技術來證實及/或量化如本文所闡述短肽在 NLP 中的成功納入，該等技術係例如液相層析-質譜、凝膠電泳、高效液相層析 (HPLC) 及核磁共振 (NMR)。圖 10A 繪示包含短肽之實例性 NLP 之組裝的示意圖。

【0154】 在一些實施例中，納入結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基成膜脂質會促進短肽的多聚化，例如其中結合物提供兩個或更多個短肽分子，亦即將同一肽之多個拷貝納入肽-NLP 結合物中。以此方式，肽之親合性、活性或效力有所增加，例如如本文其他處針對抗原結合多肽所闡述。

【0155】 在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含兩個或更多個不同短肽(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10個不同短肽)，該等不同短肽例如示兩種或更多種不同活性，例如不同靶結合特異性及/或不同治療活性。本文所揭示之肽-NLP 結合物提供可關於短肽擴展至多特異性形式及/或高化合價的多特異性平臺。舉例而言，在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含2、3、4、5、6、7或8個不同短肽，例如結合2、3、4、5、6、7或8個不同抗原或表位之2、3、4、5、6、7或8個不同肽。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30個不同短肽，例如結合10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30個不同抗原或表位之10-12、10-15、10-20、15-20、15-25、15-30或20-30個不同肽。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60個不同短肽，例如結合25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60個不同抗原或表位之25-30、25-50、30-45、30-50、40-50、30-60或40-60個不同肽。

【0156】 熟習此項技術者應明瞭關於短肽提供特定多價及多特異性之組態。舉例而言，在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含結合兩種不同抗原之兩

個短肽，其中兩種不同抗原選自下列對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【0157】 在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含結合選自 OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3及淋巴毒素 β 受體之靶的短肽。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含至少兩個結合前述靶之任何組合的不同短肽。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含結合選自因子 D、VEGF、Tie2及 DR4 之靶的短肽。在一些實施例中，肽-NLP 結合物包含至少兩個結合前述靶之任何組合的不同短肽。

【0158】 在一些實施例中，短肽係半胱胺酸結肽 (CKP)。實例性 CKP 包括 (例如但不限於) EETI-II (UniProt 登錄號：P12071)、環狀抗菌肽 A (UniProt 登錄號：P56872)、環紫菌素 O1 (Uniprot 登錄號：P82230)、環紫菌素 O12 (UniProt 登錄號：P83836)、kalata (例如 kalata B1 (Uniprot 登錄號：P56254)、kalata B8 (Uniprot 登錄號：P85175)等)、palicourein (Uniprot 登錄號：P84645)、tricyclon A (Uniprot 登錄號：B6E617)、木鱉子 (*Momordica cochinchinensis*) 胰蛋白酶抑制劑 (例如 MCoTI 1 (Uniprot 登錄號：P82408))、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 胰蛋白酶抑制劑 (例如 SOTI 1 (Uniprot 登錄號：P84779))、環狀桿菌素 A (Uniprot 登錄號：P56871)、環狀桿菌素 B (Uniprot 登錄號：56879)、環狀抗菌肽 (Uniprot 登錄號：P56872) 及 varv 肽 A (Uniprot 登錄號：P58446)。在一些實施例中，CKP 係 EETI-II。EETI-II 之胺基酸序列係 GCPRILMRCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO: 1)。

【0159】 在一些實施例中，該肽為 CKP 變異體。在一些實施例中，CKP 變異體相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環序列在一個或多個環序列中包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，

相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含化學修飾。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含化學修飾。在一些實施例中，CKP 變異體包含允許共價結合 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基) 與 CKP 變異體 (例如在 CKP 變異體之 N 端或其附近，或在 CKP 變異體之 C 端或其附近) 之修飾。在一些實施例中，CKP 變異體結合至不同於由衍生其之野生型 CKP 結合之靶的靶。在一些實施例中，CKP 變異體顯示不同於由衍生其之野生型 CKP 結合之靶的活性 (例如治療活性)。在一些實施例中，CKP 變異體係衍生自 EETI-TT (SEQ ID NO: 1)。

【0160】 在一些實施例中，包含短肽之肽-NLP 結合物 (例如 NLP 結合物) 中短肽之活性 (例如生物活性) 比游離短肽 (亦即尚未納入肽-NLP 結合物中之肽) 的活性低 (例如後者為前者的約 2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-或 10 倍中之任一者)。在一些實施例中，短肽之活性低約 5 倍。在一些實施例中，包含短肽之肽-NLP 結合物中短肽之活性 (例如生物活性) 係游離肽之活性的 80-90%、90-95% 或 95-99%。在一些實施例中，短肽係 CKP，例如 EETI-II。在一些實施例中，短肽係衍生自 EETI-II 之 CKP 變異體。

【0161】 增加 NLP 之穩定性 (例如活體外穩定性或活體內半衰期) 之方法為業內所已知且可用於增加肽-NKP 結合物的穩定性。例如參見 Gilmore SF, Carpenter TS, Ingolfsson HI, Peters SKG, Henderson PT, Blanchette CD, Fischer NO 「Lipid composition dictates serum stability of reconstituted high-density lipoproteins: implications for in vivo applications」 Nanoscale, 2018, 10 (16):7420-7430；及 Gilmore SF, Blanchette CD, Scharadin TM, Hura GL, Rasley A, Corzett

M, Pan CX, Fischer NO, Henderson PT. 「Lipid Cross-Linking of Nanolipoprotein Particles Substantially Enhances Serum Stability and Cellular Uptake」 ACS Applied Material Interfaces, 2016, 8:32。

【0162】 可將本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及 NLP-多肽結合物) 以其自身或作為醫藥組成物之一部分投予有需要之受試者。該等醫藥組成物論述於下文中。

【0163】 IV. 醫藥組成物及投予

【0164】 在另一態樣中，本發明提供醫藥組成物，例如包含至少一種本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物) 及醫藥上可接受之載體的醫藥組成物。醫藥組成物亦可稱為「藥劑」或「調配物」。可基於已知技術將本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及 NLP-多肽結合物)、尤其 NLP-Fab 結合物或肽-NLP-Fab 結合物製備成包含醫藥上可接受之載體的生理上可接受之調配物。舉例而言，組合結合物與醫藥上可接受之載體或載劑以形成醫藥組成物。

【0165】 「醫藥上可接受之載體」或「醫藥上可接受之載劑」係指醫藥組成物中之除活性成分外的成分，其對受試者無毒，且不以有害方式與組成物之其他成分相互作用。通常，將醫藥上可接受之載體納入醫藥組成物中並投予受試者，而不會引起勝過活性成分之預期有益效應的不期望生物效應。醫藥上可接受之載體包括 (但不限於) 緩衝劑、溶劑、賦形劑、穩定劑、稀釋劑、防腐劑及諸如此類。所用載體通常取決於醫藥組成物之形式及/或預期投予途徑。醫藥上可接受之載劑或賦形劑已較佳地滿足毒理學及製造測試之要求標準且/或包括於美國食品藥物監督管理局 (U.S. Food and Drug Administration) 編製的惰性成分指南 (Inactive Ingredient Guide) 中。

【0166】 可藉由靜脈內投予 (例如以濃注形式或藉由連續輸注一定時間段) 將醫藥組成物投予受試者。可藉由靜脈內、真皮內、肌內、腹膜腔內、腦脊髓內、關節內、滑膜內或皮下投予來投予醫藥組成物。在一些實施例中，藉由氣管內、陰道、口服、舌下或眼部投予途徑來投予醫藥組成物。在一些實施例中，將醫藥組成物投予腦或中樞神經系統。

【0167】 可以固體、液體或氣溶膠之形式在適宜劑量下將本發明組成物投予受試者。固體組成物之實例包括丸劑、乳霜及可植入劑量單元。可經口投予丸劑。可經局部投予治療性乳霜。可植入劑量單元可經局部 (例如在腫瘤位點處) 投予，或可植入以全身性釋放醫藥組成物，例如經皮下投予。液體組成物之實例包括適於經肌內、經皮下、經靜脈內、經動脈內注射之調配物及用於局部及眼內投予之調配物。氣溶膠調配物之實例包括用於投予肺之吸入式調配物。

【0168】 在某些實施例中，全身性投予醫藥組成物。醫藥組成物可非經腸或經腸投予。對於非經腸投予而言，醫藥組成物通常包含無菌水性或非水性之溶液、懸浮液及乳液。在一些實施例中，可在使用時間時 *例如* 藉由將粉末狀組成物 (例如以凍乾形式提供) 溶於適宜水性液體 (例如蒸餾水) 或非水性溶劑中來製備溶液或懸浮液。非水性溶劑包括 (但不限於) 丙二醇、聚乙二醇、植物油 (例如橄欖油) 及可注射有機酯 (例如油酸乙酯)。水性溶劑可選自水、醇/水溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水及緩衝介質。非經腸載體包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖 (Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉、乳酸化林格氏試劑 (lactated Ringer's) 或不揮發性油。亦可存在防腐劑，例如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑、惰性氣體等。

【0169】 在一些實施例中，將醫藥組成物投予腦或中樞神經系統以 *例如* 治療神經學疾病。在特定實施例中，在經局部或全身性投予後，結合物 (例如

NLP-Fab 結合物、NLP-Fab 樣分子結合物、肽-NLP-Fab 結合物或肽-NLP-Fab 樣分子結合物) 可穿越血-腦障壁，從而遞送 (例如靶向遞送) 至腦 (腦實質) 或中樞神經系統中。在用於遞送至腦或中樞神經系統之具體實施例中，支架蛋白質係脂蛋白元 (例如脂蛋白元 E、尤其 apoE2 及/或 apoE4)，且該結合物展示在全身性遞送 (例如靜脈內) 後生物分佈至腦實質中。

【0170】 a. 皮下及眼部製劑

【0171】 在一些實施例中，本發明提供呈高度濃縮但黏度較低之調配物形式的本發明結合物，如下文更詳細地所闡述。舉例而言，在投予途徑限制了可遞送調配物之體積之情形下 (例如在皮下及眼部投予途徑之情形下)，該等調配物是有利的。

【0172】 用於皮下遞送之醫藥組成物通常包括含有以下各項的賦形劑：醣穩定劑 (例如蔗糖或海藻糖) 及/或表面活性劑 (例如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80) 及/或胺基酸 (例如組胺酸、精胺酸、甘胺酸及/或丙胺酸)。對於皮下遞送而言，可經由以下設備遞送調配物：注射器 (例如預填充注射器)；自動注射器；注射裝置 (例如 INJECT-EASE™ 及 GENJECT™ 裝置)；注射筆 (例如 GENPEN™)；無針裝置 (例如 MediJector™ 及 BioJector™)；皮下貼劑遞送系統；或適於經皮下投予溶液或懸浮液調配物之其他裝置。

【0173】 對於眼部遞送而言，醫藥組成物可經調配以含有緩衝劑、穩定劑、防腐劑及/或增積劑以使組成物適於經眼部投予患者。用於眼部遞送之醫藥組成物通常包含：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑 (例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲基氯化銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量 (小於約 10 個殘基) 多肽；蛋白質，例如血清白蛋

白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烷基吡咯酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑 (例如 EDTA)；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物 (例如鋅蛋白錯合物)；及/或非離子表面活性劑，例如聚乙二醇 (PEG)。

【0174】 可以製備緩釋製劑。持續釋放製劑之適宜實例包括含有結合物之固體疏水性聚合物的持續釋放基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微膠囊。本文所用之持續釋放基質係由可藉由酶促或酸/鹼水解或藉由溶解降解之材料、通常聚合物製得的基質。一旦插入身體中，基質即由酶及體液施加作用。期望地，持續釋放基質選自生物相容材料，例如脂質體、聚交酯 (聚交酯酸)、聚乙醇酸交酯 (羥乙酸聚合物)、聚交酯-共-乙醇酸交酯 (乳酸及羥乙酸之共聚物)、聚酐、聚(原酸)酯、多肽、透明質酸、膠原、硫酸軟骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多醣、核酸、聚胺基酸、胺基酸 (例如苯丙胺酸、酪胺酸、異白胺酸)、多核苷酸、聚乙烯丙稀、聚乙烷基吡咯酮及聚矽氧。持續釋放基質之非限制性實例包括聚酯、水凝膠 (例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯或聚(乙烯醇))、聚交酯 (美國專利第 3,773,919 號)、L-麩穀胺酸及 γ -L-麩胺酸乙酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物 (例如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物及醋酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate) 構成之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

【0175】 在某些實施例中，醫藥組成物包含一種或多種允許本發明結合物滲透角膜之滲透性增強劑。該等滲透性增強劑之實例包括例如表面活性劑、膽汁酸、螯合劑、防腐劑、環糊精 (亦即與親脂性藥物形成複合物之具有親水性外表面及親脂性內表面的圓柱形寡核苷酸) 等。該等滲透性增強劑會增加化

學穩定性及生物可用性且降低局部刺激。在某些實施例中，本文所提供之醫藥組成物進一步包含增加本發明結合物在各個眼部部分中之吸收及分佈的試劑。

【0176】 在某些實施例中，將本文所提供之醫藥組成物調配為原位膠凝系統，例如在組成物與淚液接觸時在眼部表面上因特定物理化學參數(離子強度、溫度、pH或溶劑交換)之變化而展現溶膠至凝膠相變的基於聚合物之黏性液體。在某些實施例中，將本文所提供之醫藥組成物調配為眼噴霧。在某些實施例中，將本文所提供之醫藥組成物調配為微乳液。關於各種眼部醫藥調配物之其他細節提供於(例如)以下文獻中：Gaikwad 等人 (2013) Indo Amer J Pharm Res. 3, 3216-3232；Achouri 等人 (2012) Drug Dev Indust Pharm. 39, 1599-1617；Lu (2010) Recent Pat Drug Deliv Formul.4, 49-57；Baranowski 等人 (2014) Sci World J. doi.org/10.1155/2014/861904；Lang (1995) Adv Drug Deliv Rev. 16, 39-43；Short (2008) Toxicologic Path.36, 49-62；及其他文獻。

【0177】 對於眼部遞送而言，結合物可藉由注射(例如結膜下注射、角膜內注射或玻璃體內注射)投予；或經局部投予，例如以滴眼劑形式；或藉由將結合物連續遞送至眼睛中之玻璃體內裝置來投予。

【0178】 b. 劑量

【0179】 通常，醫藥組成物將包括有效量之本文所闡述之 NLP 結合物。藥劑(例如抗原結合多肽或其他藥物)之「有效量」係指在投予藥劑之細胞或組織中產生生理學變化(通常係使接受醫藥組成物之受試者產生有益效應)所需的量。

【0180】 醫藥組成物之劑量取決於各種因素，例如例如所治療病狀、病狀之嚴重程度及病程、投予結合物係用於預防目的或治療目的、其他臨床因素(例如受試者之體重、身材、性別及整體健康狀況、擬投予之特定 NLP 結合

物、同時投予之其他藥物、投予途徑、先前療法、受試者之臨床史及主治醫師之判斷)。

【0181】 通常，用於規則投予醫藥組成物之方案應在 1 μ g 至 5 g 單位/天之範圍內。可藉由週期性評價來監測進展。結合物可適宜地一次性或經一系列治療來投予且可在自診斷開始之任何時間投予受試者。可作為唯一治療或與其他可用於治療所論述病狀之治療劑或療法方式組合來投予結合物。

【0182】 c. 低黏度調配物

【0183】 本發明之另一態樣涉及包含本文所闡述之一種或多種結合物的低黏度液體調配物。「黏度」係指因剪切應力或拉伸應力而變形之流體之抗性的量度；其可使用黏度計或流變儀來評估。除非另外指示，否則在 25°C 下實施黏度量測 (厘泊，cP)。

【0184】 令人意外地，在一些實施例中，可以維持相對較低黏度之高濃度液體調配物形式來提供本文所闡述之結合物 (例如 NLP-多肽結合物及/或肽-NLP-多肽結合物)。通常，在高蛋白質濃度下，蛋白質-蛋白質相互作用會增加黏度。與之相比，本發明 NLP 結合物 (例如 NLP-多肽結合物及/或肽-NLP-多肽結合物) 在黏度實質性增加之前容許出人意料地高的蛋白質濃度 (例如參見**實例 3**、**圖 4A**，其中評估 Fab 載量對濃度/黏度關係之影響)。此關係係重要之化學、製造及控制 (CMC) 考慮因素，且在某些實施例中，本發明之 NLP 結合物可以出人意料地高的濃度提供於低黏度液體調配物中。實際上，相對於替代多價形式 (Fab-PEG 結合物)，使用 Fab-NLP 結合物可達成顯著更高之 Fab 濃度。

【0185】 「低黏度調配物」(或「低黏度液體調配物」)之黏度通常低於 50 cP，例如 40-50 cP；或低於 40 cP，例如 30-40 cP；或低於 30 cP，例如 20-30 cP；或低於 20 cP，例如 10-20 cP。在一些實施例中，黏度為 10-50 cP、15-45 cP、20-40 cP、25-35 cP 或 30 cP。在一些實施例中，低黏度調配物之濃度大

於 50 mg 結合物/mL，例如 50-75 mg/mL；大於 75 mg 結合物/mL，例如 75-100 mg/mL；大於 100 mg 結合物/mL，例如 100-150 mg/mL；大於 150 mg 結合物/mL，例如 150-200 mg/mL；大於 200 mg 結合物/mL，例如 200-250 mg/mL；大於 250 mg 結合物/mL，例如 250-300 mg/mL；大於 300 mg 結合物/mL，例如 300-350 mg/mL；大於 350 mg 結合物/mL，例如 350-400 mg/mL；或大於 400 mg 結合物/mL，例如 400-450 mg/mL。在一些實施例中，低黏度調配物之濃度為 100-200、200-300 或 100-300 mg 結合物/mL。在一些實施例中，該結合物係 NLP-多肽結合物或肽-NLP-多肽結合物。在特定實施例中，低黏度調配物之抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子。

【0186】 在一些實施例中，低黏度調配物包含具有 20-40、25-35、20-30、25-40、25-30 或 30 個抗原結合多肽 (例如 Fab)/結合物之結合物。在某些實施例中，抗原結合多肽係 Fab 或 Fab 樣分子。在某些實施例中，該結合物包含 25、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 個抗原結合多肽分子 (例如 Fab 或 Fab 樣分子)/結合物。在一些實施例中，低黏度調配物中之結合物進一步包含 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個短肽。實例性短肽進一步詳細論述於本文其他處。

【0187】 熟習此項技術者應認識到，以低黏度調配物形式提供高濃度之抗原結合多肽有利於經由可投予體積受限之途徑來遞送有效量的抗原結合多肽。舉例而言，對於眼部遞送而言，注射體積通常限於 100 μ l (58)；對於皮下遞送而言，注射體積通常限於 1-2 ml (59, 60)。據此，本發明之結合物 (例如 NLP-多肽結合物及/或肽-NLP-多肽結合物) 可 (例如) 用於以高濃度、低黏度調配物形式經由體積受限途徑 (例如經由眼部遞送及皮下投予) 進行投予。據此，在一些實施例中，本發明向有需要之受試者提供皮下及眼部調配物，亦即分別經皮下或經由眼部遞送投予之本發明的醫藥組成物。根據本文所闡述之低黏度

調配物，皮下或眼部調配物有利地在低黏度液體中包含高濃度之結合物 (例如 NLP-多肽結合物及/或肽-NLP-多肽結合物)。本段落中所引用之所有參考文獻可參見下文之實例 5。

【0188】 d. 凍乾調配物

【0189】 在一些實施例中，可凍乾本發明之醫藥組成物、調配物及任一結合物，並重構。「凍乾」係指幫助儲存易腐材料及/或使其更易於運輸之冷凍-乾燥過程。冷凍-乾燥涉及冷凍材料且然後降低周圍壓力，同時增加溫度以使材料中之冷凍水直接昇華成氣相。通常，凍乾會產生水分含量小於 5% (例如 3-5%) 或小於 3% (例如 2-3%) 或小於 2% (例如 1-2%) 之產物。隨後可在使用前通常於凍乾及儲存之相同容器或小瓶中重構凍乾產物。通常，藉由添加水性液體 (例如蒸餾水或水性緩衝液) 來重構 (再水化) 產物。此外，治療劑在凍乾期間之穩定性及其在重構後保留活性之能力係重要的化學、製造及控制 (CMC) 考慮因素。例如參見 Bjelosevic 等人「Excipients in Freeze-Dried Biopharmaceuticals: Contributions Toward Formulation Stability and Lyophilisation Cycle Optimisation」*Int J Pharm* 2020 Feb 25;576。

【0190】 令人意外地，在一些實施例中，可凍乾及重構 NLP 結合物 (例如 NLP-抗原結合多肽結合物及/或肽-NLP-抗原結合多肽結合物) 而不損失抗原結合活性 (例如參見實例 4、圖 4B 及圖 5A-5D，其中評估凍乾時之 Fab-NLP 穩定性以評價 Fab-NLP 的可製造性)。在一些實施例中，在凍乾及重構後，至少 80% (例如 80-90%)、至少 90% (例如 90-95%) 或至少 95% (例如 95-99%) 之抗原結合活性得以保留。在一些實施例中，98%、99% 或 100% 之抗原結合活性得以保留。

【0191】 對於凍乾而言，以預凍乾調配物形式來提供結合物 (例如 NLP-抗原結合多肽結合物及/或肽-NLP-抗原結合多肽結合物)，該預凍乾調配物通常

係包含結合物之 pH 緩衝溶液。pH 可為 4-8 或 5-7。實例性緩衝劑包括組胺酸、磷酸鹽、Tris、檸檬酸鹽、琥珀酸鹽及其他有機酸。在一些實施例中，將凍乾保護劑添加預凍乾調配物中。凍乾保護劑之非限制性實例包括非還原糖，例如蔗糖或海藻糖。在特定實施例中，將海藻糖添加至擬凍乾之含有本發明結合物的溶液中。預凍乾調配物中之凍乾保護劑的量通常使得在重構後所得調配物等滲。然而，高滲重構調配物亦可適宜。

【0192】 在一些實施例中，凍乾係在海藻糖存在下發生，例如其中結合物係在 40-200 mM 海藻糖存在下凍乾。在特定實施例中，在凍乾本發明結合物 (例如包含 Fab 作為抗原結合多肽之結合物) 期間，以 50-150 mM、60-100 mM 或 70-90 mM 之濃度使用海藻糖。在一些實施例中，凍乾係在 60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM 或 100 mM 海藻糖存在下發生，例如其中結合物包含 Fab 作為抗原結合多肽。在一些實施例中，凍乾係在 80 mM 海藻糖存在下發生。

【0193】 在一些實施例中，凍乾在 1-10 mg 結合物/mL 之濃度下發生。在特定實施例中，該結合物包含 Fab 作為抗原結合多肽，且在 2-8 mg 結合物/mL、3-6 mg 結合物/mL 或 5 mg 結合物/mL 下凍乾該結合物。在一些實施例中，該結合物包含 Fab，且凍乾係在 70 mM、75 mM、80 mM、85 mM 或 90 mM 海藻糖存在下及在 2-8 mg 結合物/mL、3-6 mg 結合物/mL 或 5 mg 結合物/mL 之濃度下發生。在一特定實施例中，該結合物包含 Fab，且凍乾係在 80 mM 海藻糖存在下及在 5 mg 結合物/mL 之濃度下發生。

【0194】 在一些實施例中，已發現，期望將表面活性劑添加至預凍乾調配物中。替代地或另外，可將表面活性劑添加至凍乾調配物及/或重構調配物中。實例性表面活性劑包括非離子型表面活性劑，例如聚山梨醇酯 (例如聚山梨醇酯 20 或 80)；泊洛沙姆 (poloxamer) (例如泊洛沙姆 188)；Triton；十二烷

基硫酸鈉 (SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-磺基甜菜鹼；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油基-或硬脂基-肌胺酸；亞油基-、肉豆蔻基-或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺丙基-、椰油醯胺丙基-、亞油醯胺丙基-、肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚油醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-甜菜鹼(例如月桂醯胺丙基甜菜鹼)；肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚油醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油醯基牛磺酸二鈉；及 MONAQUAT™系列 (Mona Industries Inc., Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇及乙二醇與丙二醇之共聚物 (例如 Pluronic、PF68 等)。所添加表面活性劑之量應使得其可減少重構結合物之聚集且最小化重構後的微粒形成。舉例而言，表面活性劑可以 0.001-0.5% 及較佳地 0.005-0.05% 之量存在於預凍乾調配物中。

【0195】 在某些實施例中，使用凍乾保護劑 (例如海藻糖) 及增積劑 (例如甘露醇或甘胺酸) 之混合物來製備預凍乾調配物。增積劑可容許產生均勻凍乾餅，且在其中並無過多凹穴，等等。

【0196】 在將結合物、緩衝劑、凍乾保護劑及其他可選組分混合至一起之後，凍乾調配物。許多不同冷凍-乾燥劑可用於此目的，例如 Hull150™ (Hull, USA) 或 GT20™ (Leybold-Heraeus, Germany) 冷凍-乾燥劑。在一些實施例中，可期望在擬重構結合物之容器中凍乾結合物調配物以避免轉移步驟。容器可為 (例如) 3、5、10、20、50 或 100 cc 小瓶。

【0197】 在期望後續時間時、通常在將結合物投予患者時，可使用稀釋劑重構凍乾調配物以在重構調配物中提供期望結合物濃度 (例如本文所提供之任一結合物濃度)。舉例而言，期望濃度可為 50-75 mg/mL、75-100 mg/mL、100-150 mg/mL、150-200 mg/mL、200-250 mg/mL、250-300 mg/mL、300-350 mg/mL、350-400 mg/mL 或 400-450 mg/mL。如上所述，重構調配物中之該等高結合物濃度尤其可用於意欲經皮下或經眼部遞送重構調配物的情形下。然而，

對於其他投予途徑 (例如靜脈內投予) 而言，可期望重構調配物中之結合物濃度較低 (例如 5-50 mg/mL、10-40 mg/mL)。

【0198】 重構通常發生於 25°C 之溫度下以促進水合作用，但可視需要採用其他溫度。重構所需時間將取決於例如稀釋劑類型、賦形劑量及結合物組分。實例性稀釋劑包括無菌水、注射用抑菌水 (BWFI)、pH 緩衝溶液 (例如磷酸鹽緩衝鹽水)、無菌鹽水溶液、林格氏溶液 (Ringer's solution) 或右旋糖溶液。稀釋劑視情況含有防腐劑。實例性防腐劑包括 (但不限於) 芳香族醇 (例如苄基醇或酚醇)。可藉由評價與結合物相容之不同防腐劑濃度來確定所採用防腐劑的量。

【0199】 V. 製備方法

【0200】 a. 製備包含抗原結合多肽之奈米脂蛋白結合物的方法

【0201】 本發明之另一態樣涉及製備包含多肽 (例如抗原結合多肽) 之結合物的方法。該等方法通常涉及 a) 在容許組裝 (例如自組裝) 奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及一種或多種成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中成膜脂質中之一者或多者在一個或兩個顆粒表面上呈現官能化基團；b) 使顆粒在低 pH 下接觸在 C 端具有結合至該官能化基團之互補官能基的抗原結合多肽；及 c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之結合物。

【0202】 在一些實施例中，成膜脂質包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)。在一些實施例中，C₄₋₂₈ 脂肪醯基共價附接至短肽 (例如本文所闡述之短肽)。可如實例 7 中所闡述來產生該結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基。產生結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基的其他方法為業內所已知。

【0203】 在一些實施例中，藉由活體外轉譯方法組裝 NLP (包括肽-NLP)，其中在自 mRNA 轉譯支架蛋白質的同時達成 NLP 之自組裝。在此製程

中，混合表現系統溶解物與成膜脂質及編碼支架蛋白質之質體 DNA。使反應進行 (例如大約 4-24 小時) 直至在表現支架蛋白質期間發生組裝為止。

【0204】 在一些實施例中，在預定支架蛋白質:脂質比率及/或可增加產率或控制所得 NLP (或肽-NLP) 之大小及組成的條件下實施該方法。舉例而言，可選擇支架蛋白質:脂質比率以提供具有上述比率之 NLP (或肽-NLP)。在一些實施例中，在結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基:其他成膜脂質的預定莫耳比率 (例如 10% 之莫耳比率，亦即 10% 結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基及 90% 其他成膜脂質) 下實施該方法。

【0205】 為形成本發明結合物，在容許官能化脂質與抗原結合多肽官能基之間發生結合的條件下，使 NLP (例如結合至短肽之 NLP 或不結合至短肽之 NLP) 及抗原結合多肽接觸適當時間。在一特定實施例中，使具有馬來醯亞胺官能化脂質 (1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺-N-[4-(對-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-甲醯胺] (鈉鹽)) ((1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine-N-[4-(p-maleimidomethyl)cyclohexane-carboxamide] (sodium salt))) (DOPE-MCC) 之 NLP 組裝體結合至含有 C 端半胱胺酸的 Fab (例如參見實例 1-2、圖 2A-2C 及 圖 8A-8B)。在另一實施例中，使包含結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如結合肽之 C₁₆ 脂肪醯基) 與馬來醯亞胺官能化脂質 (1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺-N-[4-(對-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-甲醯胺] (鈉鹽)) (DOPE-MCC) 之組裝體之 NLP 結合至含有 C 端半胱胺酸的 Fab。參見實例 10 及 圖 13A。

【0206】 通常，馬來醯亞胺 (或馬來醯亞胺衍生物) 與無硫醇緩衝水溶液中之硫氫基 (例如在介於 6.5 與 0.5 之間的 pH 下反應 1-24 小時以形成共價硫醚鍵聯。然後例如在反應完成時藉由添加游離硫醇來淬滅馬來醯亞胺。令人意外地，在一些實施例中，本發明方法利用低 pH 來結合包含游離硫醇之抗原結合多肽與馬來醯亞胺官能化脂質。低 pH 可為 4.5-6.5、5.5-6.5、5-6 或 6。低 pH

有利於官能化脂質結合至抗原結合多肽，而非結合至NLP之支架蛋白質(例如參見**實例 2**、**圖 1C-1D** 三角形)。實際上，令人意外地，在 pH 7.4 下組裝 NLP 時，馬來醯亞胺反應性脂質結合至脂蛋白元(例如參見**實例 2**、**圖 1B**、**圖 1C-1D** (圓) 及**圖 8A**)。然而，在 pH 6 下組裝時，未觀察到此不期望反應。該等組裝條件限制了支架蛋白質(例如 apoE422k 蛋白)上之游離離胺酸與馬來醯亞胺官能化脂質(例如 DOPE-MCC)之間的交聯。

【0207】 據此，在如上所述之一些實施例中，官能化基團與多肽(例如抗原結合多肽)上之互補官能基進行反應且不結合至 NLP 之其他組分(例如不結合至支架蛋白質)。舉例而言，使用如本發明方法中所闡述之低 pH(例如 pH 4.5-6.5、5.5-6.5、5-6或 6)，在形成本發明結合物時，小於 25% 或 20-25%、小於 20% 或 10-20%、小於 15% 或 10-15%、小於 10% 或 5-10%、小於 5% 或 3-5%或 0% 之官能化基團結合至支架蛋白質。在一些實施例中，在形成本發明結合物時，5%、4%、3%、2%、1%或 0% 之官能化基團結合至支架蛋白質。在特定實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺或馬來醯亞胺衍生物且官能基係游離硫醇基。

【0208】 據此，在一些態樣中，本發明提供減少製備奈米脂蛋白顆粒及抗原結合多肽之結合物時之脂質-支架蛋白質結合的方法。

【0209】 在一些實施例中，該等方法無需在結合至抗原結合多肽之前分離 NLP 與未反應組分。亦即，步驟 b)(使顆粒在低 pH 下接觸在 C 端具有結合至該官能化基團之互補官能基的抗原結合多肽)可緊跟步驟 a)(在容許組裝奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中成膜脂質中之一者或多者在一個或兩個顆粒表面上呈現官能化基團)，且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質或一些或所有未組裝支架蛋白質之中間步驟。令人意外地，如本文所闡

述，在使用特定比率之官能化成膜脂質與支架蛋白質時，較少官能化成膜脂質保持未組裝成 NLP，且彼等較少保持未組裝者變得附著於反應器皿壁，從而未留下、留下較少或極少可用於與抗原結合多肽之官能基反應者。據此，在如上所述之一些實施例中，以 1:50 至 1:100、1:60 至 1:90 或 1:70 至 1:80 之莫耳比率組合支架蛋白質及成膜脂質，且在結合至抗原結合多肽 (例如 Fab) 之前無需或不實施去除未組裝脂質的步驟。在一些實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:60、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90 或 1:100，且在結合至抗原結合多肽 (例如 Fab) 之前無需或不實施去除未組裝脂質的步驟。在一具體實施例中，支架蛋白質及成膜脂質之莫耳比率為 1:80，且在結合至抗原結合多肽 (例如 Fab) 之前無需或不實施去除未組裝脂質的步驟。

【0210】 在其中 NLP 包含結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基的一些實施例中，在自組裝後且在結合至抗原結合多肽 (例如 Fab) 之前，經由 (例如) 粒徑篩析層析純化 NLP-肽結合物，如上文所闡述。

【0211】 b.製備包含短肽之奈米脂蛋白結合物的方法

【0212】 在一相關態樣中，提供製備包含短肽之結合物 (亦即肽-NLP 結合物) 的方法。亦提供增加具有 20 至 60 個胺基酸之短肽之親合性、活性及/或效力的方法。在一些實施例中，該方法包含在容許組裝 (例如自組裝) 奈米脂蛋白顆粒之條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層；其中該等成膜脂質中之一者或多者包含結合至該短肽 (例如長度為 20 至 60 個胺基酸之肽) 的 C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)。在一些實施例中，該方法進一步包含純化肽-NLP 結合物 (例如經由粒徑篩析層析)。在一些實施例中，短肽係胱胺酸結肽 (CKP)，例如本文其他處所闡述之 CKP。在一些實施例中，短肽係 CKP 變異體。在一些實施例中，CKP 變異體相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環序列在一個或多個環序列

中包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 N 端包含化學修飾。另外或替代地，在一些實施例中，相對於野生型 CKP，CKP 變異體在 C 端包含化學修飾。在一些實施例中，成膜脂質以 1:3 至 1:15 或 1:6 至 1:12 或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)。在一些實施例中，該結合物包含該短肽之 1-100、10-90、20-80、30-70、40-60 或 60 個分子。在一些實施例中，該結合物包含至少兩種不同肽 (例如如本文其他處進一步所詳述)。

圖 10A 繪示包含短肽之實例性 NLP 之組裝的示意圖。

【0213】 在一些實施例中，該等成膜脂質中之一者或多者在該肽結合物的一個或兩個表面上呈現官能化基團，且該方法進一步包含使該肽-NLP 結合物在 pH 4.5 - 6.5 範圍內之低 pH 下接觸肽 (例如抗原結合多肽，例如 Fab 或 Fab 樣分子) 的步驟，該肽在 C 端具有結合至該官能化基團之互補官能基。在一些實施例中，多肽 (例如抗原結合多肽) 與肽-NLP 結合物之結合緊跟於肽-NLP 結合物的組裝 (例如自組裝) 之後且並無用以去除一些或所有未組裝成膜脂質之中間步驟。在一些實施例中，抗原結合多肽與肽結合物之結合緊跟於肽結合物之組裝 (例如自組裝) 之後且並無用以富集肽結合物之中間步驟。在一些實施例中，官能化基團係馬來醯亞胺衍生物且其中該官能基係半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基殘基在衍生抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (例如 Cys-226 或 Cys-227)。在一些實施例中，在該低 pH 下，官能化基團並不結合至該支架蛋白質。在一些實施例中，該低 pH 為 pH 5.5 至 6.5、pH 5 至 6

或 pH 6。在一些實施例中，間隔區連結該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連結該互補官能基與該抗原結合多肽。在一些實施例中，間隔區係連結該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。在一些實施例中，PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【0214】 本文之本發明方法可在工業上用於產生如本文所闡述之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及 NLP-多肽結合物)。該等結合物可用於例如活體外、離體及活體內治療方法中。本文提供基於使用本發明結合物中之一者或多者的各種方法。

【0215】 VI. 治療方法及用途

【0216】 本發明之另一態樣涉及本文所闡述結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及 NLP-多肽結合物) 用於治療的用途。擬治療之疾病、病症、病理學病狀將告知選擇用於結合物中的抗原結合多肽及/或短肽。更特定而言，在某些疾病、病症或病狀中，需要或期望使用多價及/或多特異性抗原結合構築體結合物 (例如 NLP-Fab 結合物、NLP-Fab 樣分子結合物、肽-NLP-Fab 結合物或肽-NLP-Fab 樣分子結合物)。本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及 NLP-多肽結合物) 提供了用於如上文所闡述之多價及/或多特異性抗原結合多肽及/或短肽的多功能平臺，其可用於各種目的，例如用作治療、防治、遞送及診斷。

【0217】 如本文中所使用，「治療」(及其語法變體，例如「治療 (treat 或 treating)」) 係指試圖改變所治療受試者之疾病自然病程以產生有益效應的臨床干預，且可以防治方式或在疾病病程期間實施。有益之治療效應包括 (但不限於) 預防疾病之發生或複發、減輕症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展之速率、改善或減輕疾病狀態、緩解、改良預後及諸如此類。在一些實施例中，使用包含抗原結合多肽 (包括例如 Fab 或 Fab

樣分子) 及/或短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 之 NLP 結合物來延遲疾病發生或減緩疾病進展，或減小疾病復發之可能性、頻率及/或嚴重程度。

【0218】 通常，將結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合及/或 NLP-多肽結合物) 以治療有效量提供至需要其益處之受試者。舉例而言，醫藥組成物中之藥劑的「治療有效量」係指如下量：在投予受試者時可將有效量之藥劑 (例如抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 及/或短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體) 及/或其他治療劑或診斷劑) 提供至靶細胞或組織以在細胞或組織中產生生理學變化，由此使接受醫藥組成物之受試者產生有益效應。通常以達成期望治療或防治結果之劑量及時間段來投予醫藥組成物。

【0219】 a. 惡性疾病之治療

【0220】 在一些實施例中，抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子) 結合在血管生成及/或腫瘤生長中發揮作用之靶；且該結合物 (例如 NLP-多肽結合物) 可用於抑制血管生成及/或腫瘤生長以治療惡性疾病。在一些實施例中，可用於抑制血管生成及/或腫瘤生長之結合物進一步包含結合在血管生成及/或腫瘤生長中發揮作用之靶的短肽 (亦即肽-NLP-多肽結合物)。在一些實施例中，短肽與抗原結合多肽結合相同靶。在一些實施例中，短肽與抗原結合多肽結合不同靶。在一些實施例中，短肽展現與抗原結合多肽之活性 (例如治療活性) 互補或協同之活性 (例如治療活性)。在特定實施例中，惡性疾病選自上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。本發明結合物可用於治療腫瘤 (包括癌前期、非轉移性、轉移性及癌性腫瘤，例如早期癌症) 或用於治療處於發生癌症之風險下的受試者。在其他態樣中，結合物 (例如 Fab) 之抗原結合多肽發揮靶向或穩定作用，例如使穩定 NLP-Fab 結合物或穩定肽-NLP-Fab 結合物靶向與下文更詳細地論述之疾病有關的抗原。

【0221】 在特定實施例中，癌症或癌瘤選自由以下項組成之群組：胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌、口腔癌、胃癌、子宮頸癌、B 及 T 細胞淋巴瘤、骨髓樣白血病、卵巢癌、白血病、淋巴白血病、鼻咽癌、結腸癌、前列腺癌、腎細胞癌、頭頸癌、皮膚癌(黑色素瘤)、泌尿生殖道癌(例如睪丸癌、卵巢癌、內皮癌、子宮頸癌及腎癌)、膽管癌、食管癌、唾液腺癌及甲狀腺癌或其他腫瘤性疾病(如血液學腫瘤、神經膠質瘤、肉瘤或骨肉瘤)。

【0222】 在腫瘤(例如癌性腫瘤)之情形下，治療有效量之藥劑可減少癌細胞之數量；減小原發性腫瘤之大小；抑制(亦即在某種程度上減緩或停止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在某種程度上減慢或停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕與病症有關之一種或多種症狀。對於癌症療法而言，可例如藉由評價存活持續時間、疾病進展時間(TTP)、反應率(RR)、反應持續時間及/或生活品質來量測活體內效能。

【0223】 「減小或抑制」意指使得總體降低例如 20%、50%、75%、85%、90%或 95% 之能力。減小或抑制可係指對以下各項之效應：所治療病症之一種或多種症狀、轉移之存在或大小、原發性腫瘤之大小或血管生成病症中之血管的大小或數量。

【0224】 腫瘤可為實體腫瘤或非實體或軟組織腫瘤。軟組織腫瘤之實例包括白血病(例如慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、成人急性淋巴母細胞性白血病、急性骨髓性白血病、成熟 B 細胞急性淋巴母細胞性白血病、慢性淋巴球性白血病、前淋巴細胞性白血病或毛細胞白血病)或淋巴瘤(例如非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、皮膚 T 細胞淋巴瘤或何傑金氏病(Hodgkin's disease))。實體腫瘤包括除血液、骨髓或淋巴系統外之身體組織的任何癌症。實體腫瘤可進一步分成彼等源自上皮細胞者及彼等源自非上皮細胞來

源者。上皮細胞實體腫瘤之實例包括胃腸道、結腸、乳房、前列腺、肺、腎、肝、胰腺、卵巢、頭頸、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、膽囊、唇、鼻咽、皮膚、子宮、男性生殖器官、泌尿器官、膀胱及皮膚的腫瘤。非上皮起源的實性瘤包括肉瘤、腦腫瘤、及骨腫瘤。

【0225】 在一些實施例中，NLP 結合物包含結合如上文所闡述之一對臨床相關靶之至少兩種抗原結合多肽的至少一個分子 (包括例如一個或多個 Fab 或 Fab 樣分子)。舉例而言，臨床相關對可包含 T 細胞標記物、共刺激受體或 NK 細胞標記物中之至少一者；及腫瘤抗原 (例如本文所揭示及/或業內已知之腫瘤抗原中之任一者或多者)。在一些實施例中，NLP 結合物包含 (例如進一步包含) 短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，短肽結合物中之抗原結合多肽展現相同活性 (例如結合活性及/或治療活性)。在一些實施例中，短肽與結合物中之抗原結合多肽展現不同 (例如互補或協同) 活性 (例如結合活性及/或治療活性)。在一些實施例中，該結合物包含至少兩個不同短肽中之每一者的至少一個分子。

【0226】 在一具體實例中，NLP 結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合靶向 CD19 (腫瘤抗原) 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療急性淋巴母細胞性白血病。在另一具體實例中，NLP 結合物包含結合 CD3 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 EpCAM (腫瘤抗原) 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療各種來源 (包括結腸、直腸、卵巢、胃、食管、肺、胰臟、乳房及頭頸) 之癌症。

【0227】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 HER1、較佳地人類 HER1 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二

Fab)，且用於治療胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌及/或口腔癌。

【0228】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 HER2、較佳地人類 HER2 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療胃癌、乳癌及/或子宮頸癌。

【0229】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 HER3、較佳地人類 HER3 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療胃癌及/或肺癌。

【0230】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CEA、較佳地人類 CEA 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0231】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 p95、較佳地人類 p95 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0232】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 BCMA、較佳地人類 BCMA 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0233】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 MSLN、較佳地人類 MSLN 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記

物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0234】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 MCSP、較佳地人類 MCSP 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0235】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CD19、較佳地人類 CD19 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0236】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CD20、較佳地人類 CD20 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療 B 細胞淋巴瘤及/或 T 細胞淋巴瘤。

【0237】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CD22、較佳地人類 CD22 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療 B 細胞淋巴瘤及/或 T 細胞淋巴瘤。

【0238】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CD38、較佳地人類 CD38 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0239】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CD52Flt3、較佳地人類 CD52Flt3 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合

NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0240】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 FolR1、較佳地人類 FolR1 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0241】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 Trop-2、較佳地人類 Trop-2 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌、神經膠母細胞瘤及/或口腔癌。

【0242】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CA-12-5、較佳地人類 CA-12-5 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療卵巢癌、肺癌、乳癌及/或胃腸道癌。

【0243】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 HLA-DR、較佳地人類 HLA-DR 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療胃腸道癌、白血病及/或鼻咽癌。

【0244】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 MUC-1、較佳地人類 MUC-1 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療結腸癌、乳癌、卵巢癌、肺癌及/或胰臟癌。

【0245】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 A33、較佳地人類 A33 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療結腸癌。

【0246】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 PSMA、較佳地人類 PSMA 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療前列腺癌。

【0247】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 PSCA、較佳地人類 PSCA 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0248】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合轉鐵蛋白受體、較佳地人類轉鐵蛋白受體之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0249】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合腱糖蛋白、較佳地人類腱糖蛋白之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，用於治療上皮、內皮或間皮來源之癌症及血液癌症。

【0250】 特定實施例提供本發明之 NLP 結合物，其包含結合 CA-IX、較佳地人類 CA-IX 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及視情況結合 NK 細胞標記物、T 細胞標記物或共刺激受體中之至少一者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，且用於治療腎癌。

【0251】 本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物)、醫藥組成物或調配物可單獨投予或與另一治療劑或可偵測製劑/標記組合投予。術語「組合」並不限制治療方案之各組分投予受試者的順序。舉例而言，可在投予其他療法之前、同時或之後投予醫藥組成物或藥劑。「組合」亦不限制各投予之間的時間。因此，在兩種組分並不同時或並行投予時，該等投予可間隔 1 分鐘、5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時或 72 小時或易於由熟習此項技術者確定及/或本文所闡述之任何適宜時間差。

【0252】 其他療法可包括一種或多種適於治療或預防疾病或其症狀之治療方案，如本文所闡述或業內所已知。該等治療方案之實例包括 (但不限於) 投予疼痛藥劑、投予化學治療劑、手術處理疾病或其症狀。用於與本發明結合物組合投予之其他治療劑的實例 (例如在治療惡性疾病之背景下) 包括作用於胃腸道系統之藥物、用作細胞生長抑制劑之藥物、預防高尿酸血症之藥物、抑制免疫反應之藥物 (例如皮質類固醇)、作用於循環系統之藥物及/或業內已知之藥劑 (例如 T 細胞共刺激分子或細胞介素)。

【0253】 本發明進一步構想與能夠提供用於免疫效應細胞、用於細胞增殖或用於細胞刺激之活化信號之分子的共投予方案。該等分子可為例如用於 T 細胞之一級活化信號 (例如共刺激分子：B7 家族分子、Ox40L、4.1 BBL、CD40L、抗 CTLA-4、抗 PD-1) 或細胞介素介白素 (例如 IL-2)。

【0254】 b. 眼部疾病之治療

【0255】 在某些實施例中，本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物) 可用於治療受試者的眼部疾病或病症。在某些實施例中，受試者被懷疑患有特徵在於異常血管生成及/或異常血管滲透性之眼部疾病或病症或處於患有該眼部疾病或病症的風險下。在某些實施

例中，受試者已經診斷患有特徵在於異常血管生成及/或異常血管滲透性之眼部疾病或病症。

【0256】 在一些實施例中，眼部疾病或病症係眼部血管增殖性疾病，例如選自由以下項組成之群組的眼部血管增殖性疾病：糖尿病性失明、視網膜病變、原發性糖尿病性視網膜病變、年齡相關性黃斑退化 (AMD)、增殖性糖尿病性視網膜病變 (PDR)、早產兒視網膜病變 (ROP)、脈絡膜新生血管形成 (CNV)、糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-林道病 (von Rippel-Lindau disease)、眼睛組織胞漿菌病、視網膜靜脈阻塞 (視網膜分支靜脈阻塞 (BRVO) 及 視網膜中央靜脈阻塞 (CRVO))、角膜新血管形成、視網膜新血管形成及皮膚發紅。在某些實施例中，角膜新血管形成會引起眼睛感染、眼睛發炎、眼睛創傷 (包括化學燒傷) 或角膜緣幹細胞障壁損失。在具體實施例中，角膜新血管形成源自皰疹性角膜炎、沙眼或盤尾絲蟲病。

【0257】 在特定實施例中，用於治療眼部疾病之結合物包含結合 VEGF (較佳地人類 VEGF)、因子 D (較佳地人類因子 D)、Tie2 (較佳地人類 Tie2) 及 DR4 (較佳地人類 DR4) 中之至少一者的抗原結合多肽 (例如 Fab)。在更特定實施例中，用於治療眼部疾病之結合物包含結合 VEGF (例如 VEGF-A，較佳地人類 VEGF-A) 之抗原結合多肽 (例如 Fab)。在甚至更特定實施例中，用於治療眼部疾病之結合物包含結合 VEGF (例如 VEGF-A，較佳地人類 VEGF-A) 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合因子 D (較佳地人類因子 D)、Tie2 (較佳地人類 Tie2) 及 DR4 (較佳地人類 DR4) 中之一者或多者的第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。在一具體實例中，該結合物包含結合 VEGF-A 之第一抗原結合多肽 (例如第一 Fab) 及結合 Ang-2 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)，其例如用於治療糖尿病性黃斑水腫。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 至少一種結合上文列示靶之短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例

中，Fab 及短肽結合至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0258】 在某些實施例中，將用於治療眼部疾病病症之本發明結合物與第二治療劑組合投予。對於眼部疾病或病症係由發炎性反應觸發之患者而言，可考慮使用抗發炎劑之組合療法。對於患有繼發於細菌、病毒、真菌或棘狀變形蟲感染之眼部疾病或病症的患者而言，組合療法可包含投予抗微生物劑及視情況抗發炎劑。

【0259】 在某些實施例中，將用於治療眼部疾病病症之本發明結合物與第二療法組合投予，該第二療法係諸如雷射光凝療法 (LPT) 及/或光動力學療法 (PDT)，其中可藉由光活化使光活化分子 (例如維替泊芬 (verteporfin)) 在局部損害新生血管內皮 (例如參見 WO 2014/033184)。在某些實施例中，第二療法係透熱療法及燒灼術，其中藉由經由單極透熱單元施加凝固電流或藉由使用電解針實施熱燒灼來阻塞血管。

【0260】 c. 其他疾病之治療

【0261】 本發明結合物亦可用於治療其他例如具有以下特徵之疾病：治療益處需要使用抗原結合多肽 (及在一些實施例中短肽) 之多聚體及/或多特異性形式，尤其穩定、高親合性形式或由其增強，及/或擬以小體積來投予高濃度之抗原結合多肽 (及在一些實施例中短肽)，如本文所闡述。

【0262】 舉例而言，本發明結合物可用於治療過敏性或發炎性病症，或用於治療自體免疫疾病，或用於治療處於發生過敏性或發炎性病症或自體免疫疾病之風險下的受試者。

【0263】 作為接受本文所提供組成物之候選者的其他受試者患有以下疾病或處於發生該等疾病的風險下：纖維血管組織異常增殖、紅斑痤瘡、獲得性免疫缺陷症候群、動脈阻塞、異位性角膜炎、細菌潰瘍、貝切特氏病 (Behets

disease)、血液性腫瘤、頸動脈阻塞性疾病、脈絡膜新生血管形成、慢性發炎、慢性視網膜脫離、慢性眼色素層炎、慢性玻璃體炎、隱形眼鏡超戴症、角膜移植排斥、角膜新生血管形成、角膜移植新生血管形成、克羅恩氏病 (Crohn's disease)、伊耳斯氏病 (Eales disease)、流行性角結膜炎、真菌潰瘍、單純疱疹感染、帶狀疱疹感染、高黏稠度症候群、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、白血病、脂質退化、萊姆氏病 (Lyme's disease)、邊緣性角質層分離、莫倫潰瘍 (Mooren ulcer)、除麻瘋病外之分枝桿菌 (Mycobacteria) 感染、近視、眼部新生血管疾病、視窩、奧斯勒-韋伯症候群 (Osler-Weber syndrome) (奧斯勒-韋伯-朗迪病 (Osler-Weber-Rendu))、骨關節炎、佩吉特氏病 (Paget's disease)、睫狀體扁平部炎、類天疱瘡、小水疱病、多動脈炎、雷射後併發症、原生動物感染、彈性纖維假黃瘤、翼狀胬肉乾燥性角膜炎、放射狀角膜切開術、視網膜新生血管形成、早產兒視網膜病變、晶狀體後纖維增生、類肉瘤、鞏膜炎、鎌狀細胞性貧血、薛格連氏症候群 (Sogren's syndrome)、實體腫瘤、斯特格氏病 (Stargart's disease)、史蒂文約翰遜病 (Steven's Johnson disease)、上緣角膜炎、梅毒、全身性狼瘡、特芮安氏角膜邊緣變性 (Terrien's marginal degeneration)、弓蟲症、尤恩氏肉瘤 (Ewing sarcoma)、神經母細胞瘤、骨肉瘤、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、潰瘍性結腸炎、靜脈阻塞、維他命 A 缺乏、韋格納氏類肉瘤病 (Wegener's sarcoidosis)、與糖尿病有關之不期望血管生成、寄生蟲病、傷口癒合異常、手術後肥大、損傷或創傷 (例如急性肺損傷 /ARDS)、毛髮生長抑制、排卵及黃體形成抑制、植入抑制及子宮中胚胎發育抑制。

【0264】 特定實施例提供用於治療血友病 (例如血友病 A) 之本發明結合物，其包含結合因子 IXa、較佳地人類因子 IXa 之第一抗原結合多肽 (例如 Fab) 及結合因子 X 之第二抗原結合多肽 (例如第二 Fab)。血友病 A 係嚴重遺傳性出

血病症，其中患者因促凝血輔因子蛋白質 (因子 VIII) 之缺陷或功能障礙而遭受大面積出血。在一些實施例中，本發明之雙特異性結合物與因子 IXa 及因子 X 之結合可模擬經活化因子 VIII 之一些功能，且可用於治療疾病。例如參見 Nogami 等人，New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors; Blood; 2019; 133(5):399-406。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 結合上文所列示靶之短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0265】 VII. 遞送方法及用途

【0266】 本發明之另一態樣提供用於遞送一種或多種其他治療劑或診斷劑之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物)。可以組成物形式 (例如以如本文所闡述之醫藥組成物形式) 來遞送結合物。在一些實施例中，以低黏度調配物形式來提供結合物，從而提供高濃度之 NLP-多肽結合或肽-NLP-多肽結合物，例如如上文所闡述。在一些實施例中，抗原結合多肽用作穩定劑以穩定包含例如短肽及/或一種或多種其他治療劑或診斷劑之結合物，從而例如增加儲存期限及/或血清半衰期，尤其可例如促進結合物之凍乾 (不實質性損失活性) 及/或促進包含高結合物濃度之低黏度調配物的製造，同樣例如如上文所論述。在一具體實施例中，本發明結合物容許跨越血-腦障壁來特異性或靶向遞送，從而容許其負荷 (例如一種或多種短肽及/或一種或多種其他治療劑或診斷劑) 接近腦或中樞神經系統中之靶，同樣例如如上文所論述。在某些實施例中，使用本發明結合物來遞送特定治療劑或診斷劑以及實現跨越血-腦障壁更詳細地闡述於下文中。

【0267】 a. 治療劑之遞送

【0268】 在一些實施例中，抗原結合多肽包含如上文所闡述之治療劑。在一些實施例中，抗原結合多肽更多地用作靶向部分，從而基於對特異性抗原之親和力將結合物引導至某些細胞或組織中，且除抗原結合多肽外，該結合物進一步包含一種或多種治療劑或診斷劑（例如分別為生物活性劑或可偵測製劑）。儘管 NLP 已經探究用於所選應用及藥物負荷（包括溶增溶膜蛋白(21-26)、生成蛋白質孔隙複合物 (27)、疏水性藥物 (14, 28, 29)、蛋白質 (14, 20, 30, 31)、癌症新抗原 (32)及免疫調節藥物(17))，但本揭露提供具有令人意外之特性之含有抗原結合多肽（尤其 Fab）的結合物，該等特性包括（如本文所論述）生理學條件下之穩定性、良好可製造性、在不損失（或不顯著損失）活性下凍乾及重構之能力及濃縮於低黏度調配物中之能力。在一些實施例中，該結合物包含（例如進一步包含）短肽（例如 CKP 或 CKP 變異體）。在一些實施例中，短肽結合物中之抗原結合多肽展現相同活性（例如結合活性及/或治療活性）。在一些實施例中，短肽與結合物中之抗原結合多肽展現不同（例如互補或協同）活性（例如結合活性及/或治療活性）。在一些實施例中，該結合物包含至少兩個不同短肽中之每一者的至少一個分子。本段落中所引用之所有參考文獻可參見下文之實例 5。

【0269】 據此，在一些態樣中，本發明提供以穩定及/或低黏度液體調配物形式將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有需要之個體中的方法，其包含向個體投予包含進一步包含生物活性劑及/或可偵測製劑之本發明結合物的液體調配物。在一些實施例中，抗原結合多肽（例如 Fab）提供本文所引述功能中之一者或多者，例如用作包含抗原結合多肽以及另一治療劑或診斷劑之結合物的靶向劑及穩定劑。在一些實施例中，抗原結合多肽係 Fab。在一些實施例中，抗原結合多肽係 Fab 樣分子，亦即與 Fab 具有類似大小及/或構形形狀但未必能夠結合至抗原之多肽。在一些實施例中，該結合物包含（例如進一步包含）短肽（例

如CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，短肽結合物中之抗原結合多肽展現相同活性 (例如結合活性及/或治療活性)。在一些實施例中，短肽與結合物中之抗原結合多肽展現不同 (例如互補或協同) 活性 (例如結合活性及/或治療活性)。在一些實施例中，該結合物包含至少兩個不同短肽中之每一者的至少一個分子。

【0270】 其他治療劑或診斷劑將藉由共價或非共價締合與本文所闡述之結合物進行締合。舉例而言，疏水性治療劑或診斷劑可與脂雙層之非極性區域締合，而任何親水性部分則延伸至內部區域及外部區域中之任一者或兩者。在一些實施例中，對治療劑或診斷劑實施官能化以直接及/或經由藥劑及/或脂質上之間隔區與 NLP 之成膜脂質上的相同或不同官能化基團相互作用，例如如本文所闡述 (亦例如參見 US 2009/0311276A1、US 2019/0142752A1、US 2018/0318218A1、US 2019/0307692A1、US 2010/0092567A1及 US 2011/0059549A1)。在一些實施例中，治療劑或診斷劑可直接及/或經由間隔區 (例如如本文所闡述) 與結合物之抗原結合多肽 (例如 Fab) 進行締合。替代地或另外，該結合物可進一步包含一個或多個結合治療劑或診斷劑 (或結合治療劑或診斷劑之半抗原) 之抗原結合多肽 (例如 Fab)，從而容許預靶向遞送。在預靶向遞送中，將本發明結合物投予受試者，其中該結合物包含結合腫瘤標記物 (例如 CEA、CD38) 之抗原結合多肽以及治療劑或診斷劑。在其中結合物包含短肽之一些實施例中，治療劑或診斷劑可與結合物之短肽進行締合。

【0271】 在特定實施例中，本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物) 靶向特定類型之癌症。舉例而言，可使用包含一個或多個抗原結合多肽 (例如 Fab) 及/或一個或多個結合 (人類) EpCAM (作為天然存在於腫瘤細胞表面上之腫瘤特異性抗原) 之短肽的結合物靶向胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌及/或口腔

癌。可使用包含一個或多個抗原結合多肽 (例如 Fab) 及/或一個或多個結合 HER1、較佳地人類 HER1 或 Trop-2、較佳地人類 Trop-2 之短肽的結合物靶向胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌及/或口腔癌。另外，可使用包含一個或多個結合 MCSP、較佳地人類 MCSP、FOLR1、較佳地人類 FOLR1、PSCA、較佳地人類 PSCA、EGFRvIII、較佳地人類 EGFRvIII 或 MSLN、佳地人類 MSLN 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌、神經膠母細胞瘤及/或口腔癌。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 結合上文所列示靶之短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0272】 可使用包含一個或多個結合 HER2、較佳地人類 HER2 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胃癌、乳癌及/或子宮頸癌。可使用包含一個或多個結合 HER3、較佳地人類 HER3 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胃癌及/或肺癌。可使用包含一個或多個結合 CD20、較佳地人類 CD20 及/或 CD22、較佳地人類 CD22 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向B 細胞淋巴瘤及/或 T 細胞淋巴瘤。可使用包含一個或多個結合 CD33、較佳地人類 CD33 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向骨髓樣白血病。可使用包含一個或多個結合 CA12-5、較佳地人類 CA12-5 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向卵巢癌、肺癌、乳癌及/或胃腸道癌。可使用包含一個或多個結合 HLA-DR、較佳地人類 HLA-DR 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胃腸道癌、白血病及/或鼻咽癌。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 結合上文所列示靶之短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，Fab 及短肽結合

至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0273】 可使用包含一個或多個結合 MUC-1、較佳地人類 MUC-1 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向結腸癌、乳癌、卵巢癌、肺癌及/或胰臟癌。可使用包含一個或多個結合 A33、較佳地人類 A33 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向結腸癌。可使用包含一個或多個結合 PSMA、較佳地人類 PSMA 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向前列腺癌。可使用包含一個或多個結合轉鐵蛋白受體、較佳地人類轉鐵蛋白受體之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胃腸道癌、胰臟癌、膽管細胞癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、皮膚癌及/或口腔癌。可使用包含一個或多個結合轉鐵蛋白受體、較佳地人類轉鐵蛋白受體之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向胰臟癌、肺癌及/或乳癌。可使用包含一個或多個結合 CA-IX、較佳地人類 CA-IX 之抗原結合多肽 (例如 Fab) 的結合物靶向腎癌。在一些實施例中，該結合物包含 (例如進一步包含) 結合上文所列示靶之短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0274】 用於遞送至靶組織 (例如如上文所提供) 之治療劑可為殺死或抑制腫瘤細胞的細胞毒性劑或細胞生長抑制劑 (Syrigos 及 Epenetos, Anticancer Research 19:605-614 (1999)；Niculescu-Duvaz 及 Springer, Adv. Drg.Del.Rev. 26:151-172 (1997)；美國專利第 4,975,278 號)，而全身性投予該等藥劑可對正常細胞以及試圖消除之腫瘤細胞產生不可接受程度的毒性。細胞毒性劑可為一種或多種選自以下各項者：道諾黴素、阿黴素、胺甲喋呤及長春地辛、放射性核種、細菌毒素 (例如白喉毒素)、植物毒素 (例如蓖麻毒蛋白)、小分子毒素 (例如格爾德黴素)、美登木素生物鹼及卡奇黴素。毒素可包括藉由微管蛋白結合、

DNA 結合或拓撲異構酶抑制在內之機制來施加其細胞毒性及細胞生長抑制效應。

【0275】 細胞毒性或細胞生長抑制劑亦可包括酶活性毒素及其片段，該等酶活性毒素及其片段包括白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈(來自銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 A 鏈、相思子毒素 A 鏈、莫迪素 A 鏈、 α -八疊球菌、油桐蛋白(Aleurites fordii protein)、香石竹毒蛋白、美洲商陸蛋白(Phytolacca americana protein)(PAPI、PAPII及 PAP-S)、苦瓜抑制劑、薑黃素、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹毒素、米托菌素(mitogellin)、侖限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯族毒素。例如參見 WO 93/21232。可使用之放射性核素之實例包括 ^{212}Bi 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 、Lu 放射性同位素及諸如此類。

【0276】 在一具體實例中，本發明結合物包含結合 CEA 之第一抗原結合多肽(例如 Fab)及結合經銨-111-標記之肽且(例如)用於預靶向遞送銨-111 的第二抗原結合多肽(例如第二 Fab)。在另一具體實例中，本發明結合物包含結合 CD38 之第一抗原結合多肽(例如 Fab)及結合 ^{90}Y 複合物且用於預靶向遞送 ^{90}Y 的第二抗原結合多肽(例如第二 Fab)。在再一具體實例中，本發明結合物包含結合 CD22 之第一抗原結合多肽(例如 Fab)及結合 CD19 的第二抗原結合多肽(例如第二 Fab)；且進一步包含直接附接至第一及/或第二抗原結合多肽之白喉。在一些實施例中，該等結合物包含(例如進一步包含)短肽(例如 CKP 或 CKP 變異體)。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至相同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽結合至不同靶。在一些實施例中，Fab 及短肽展現互補或協同之治療活性。

【0277】 在一些實施例中，使用 (例如) 已知蛋白質偶合劑使細胞毒性劑附接至本發明結合物之一個或多個抗原結合多肽 (或 (若存在) 一或多個短肽)。蛋白質偶合劑之實例包括 (但不限於) N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯 (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate) (SPDP)、亞胺基硫烷 (iminothiolane)(IT)、亞胺基酸酯之雙功能衍生物 (例如己二醯亞胺二甲酯鹽酸鹽 (dimethyl adipimidate HCl))、活性酯 (例如辛二酸二琥珀醯亞胺酯 (disuccinimidyl suberate))、醛 (例如戊二醛)、雙疊氮化合物 (例如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺 (bis (pazidobenzoyl) hexanediamine))、雙重氮衍生物 (例如雙-(對重氮基苯甲醯基)-乙二胺 (bis-(pdiazoniumbenzoyl)-ethylenediamine))、二異氰酸酯 (例如甲苯 2,6-二異氰酸酯) 及雙活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在一實施例中，經碳-14 標記之 1-異硫氰酸根合苄基-3-甲基二亞乙基三胺五乙酸 (carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyl-diethylene triaminepentaacetic acid) (MX-DTPA) 係用於將放射性核種結合至抗原結合多肽之實例性螯合劑。參見例如 WO 94/11026。

【0278】 在特定實施例中，細胞毒性劑選自由以下項組成之群組：卡奇黴素、美登木素生物鹼、多拉斯他汀 (dolastatin)、奧裡斯他汀 (aurostatin)、新月毒素 (trichothecene) 及 CC1065 以及該等毒素之具有毒素活性的衍生物。可用於本發明結合物中之其他抗腫瘤劑包括 BCNU、鏈佐黴素 (streptozotocin)、長春新鹼 (vincristine) 及 5-氟尿嘧啶，統稱為 LL-E33288 複合物之藥劑家族(闡述於美國專利第 5,053,394 號及第 5,770,710 號中)以及埃斯培拉黴素 (esperamicin) (美國專利第 5,877,296 號)。

【0279】 在一些實施例中，治療劑係核苷酸，例如 siRNA、干擾 RNA、CRISPR RNA、shRNA、適配體或核酶。

【0280】 b. 診斷劑之遞送

第 105 頁，共 160 頁(發明說明書)

【0281】 本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物) 可包含可偵測製劑，該可偵測製劑例如用於診斷或基礎研究、用於監測疾病進展及/或治療劑效能、用於鑑別某些患者亞群體 (例如更可能對治療劑具有反應之患者) 及諸如此類。

【0282】 可偵測製劑係一種標記，其可目測或另外偵測為定位於已遞送藥劑之細胞或組織處 (通常經由自該標記發出之信號)。信號可為例如放射性、螢光、化學發光、在酶促反應中最終產生化合物及諸如此類。用於本發明結合物之可偵測製劑的實例包括 (但不限於) 放射性同位素、螢光團、化學發光染料、發色團、酶、酶受質、酶輔因子、酶抑制劑、染料、金屬離子、奈米顆粒、金屬溶膠、配體 (例如生物素、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白 (streptavidin) 或半抗原) 及諸如此類。在一些實施例中，使用放射性原子作為例如用於閃爍研究之可偵測製劑。放射性原子之實例包括例如 ^{99m}Tc 或 ^{123}I 。在一些實施例中，使用自旋標記作為例如用於核磁共振 (NMR) 成像或磁共振成像 (MRI) 之可偵測製劑，其實例包括碘-123 (再次)、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

【0283】 在一些實施例中，可偵測製劑係螢光團。術語「螢光團」係指能夠在可偵測影像中展現螢光之物質或其部分。舉例而言，在一些實施例中，膜脂質可經螢光標記，例如 (1-油醯基-2-[12-[(7-硝基-2-1,3-苯并噁二唑-4-基)胺基] 十二烷醯基]-sn-甘油-3-磷酸膽鹼) (1-Oleoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-Glycero-3-Phosphocholine)。熟習此項技術者應認識到，在該等實施例中，可藉由用於組裝 NLP 結合物之經螢光標記之脂質之量來增強來自可偵測製劑的信號。

【0284】 可如上文所闡述或以業內已知之其他方式將可偵測製劑納入結合物中。舉例而言，可藉由化學胺基酸合成使用包含例如氟-19 以代替氫之胺

基酸前體來生物合成或合成抗原結合多肽 (例如 Fab)。可偵測藥劑(例如 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 及 ^{111}In) 可經由肽中之半胱胺酸殘基進行附接。 ^{90}Y 可經由離胺酸殘基進行附接。可使用 IODOGEN 法 (Fraker 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 (1978)) 來納入碘-123。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989) 詳細闡述了其他方法。另外或替代地, 可對短肽作出該等修飾, 其中該結合物包含短肽。

【0285】 c. 跨越血-腦障壁之遞送

【0286】 本發明之另一態樣涉及將生物活性劑或可偵測製劑遞送至腦或中樞神經系統中, 以(例如治療神經學疾病的方法。靶向腦及 CNS 之治療方式面臨特殊挑戰, 尤其調控分子輸送且可阻止藥物到達腦實質之血-腦障壁 (BBB)。據此, 藥物穿越 BBB 之能力在腦疾病的藥理學治療中至關重要 (Dal Margo 等人, 「Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting」 *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14 (2018) 429-438).

【0287】 在一些實施例中, 本發明提供用於將生物活性劑或可偵測製劑遞送至腦或中樞神經系統中之結合物、醫藥組成物、調配物、方法、系統及套組。通常, 藉由例如靜脈內途徑將本發明結合物全身性投予個體, 從而容許結合物發生循環且最終穿越通過 BBB。舉例而言, 可使用液體調配物, 其包含醫藥上可接受之載體以及抗原結合多肽 (例如 Fab 或 Fab 樣分子)、奈米脂蛋白顆粒及生物活性劑或可偵測製劑的結合物。在一些實施例中, 該結合物進一步包含短肽 (例如 CKP 或 CKP 變異體)。可藉由靜脈內注射或其他適當全身性或局部途徑來投予調配物。

【0288】 對於腦/CNS 遞送而言, 結合物之奈米脂蛋白包含容許結合物跨越 BBB 的支架蛋白質。在一些實施例中, 支架蛋白質係脂蛋白元, 尤其係

apoE4、apoE2、任一者之截短形式或 apoE2、apoE2 截短形式、apoE4 及 apoE4 截短形式中之一者或多者的組合。舉例而言，ApoE 已展示在遞送奈米顆粒結合藥物跨越 BBB 時發揮突出作用 (Dal Margo 等人，「Artificial apolipoprotein corona enables nanoparticle brain targeting」 *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14 (2018) 429-438). 在一些實施例中，醫藥組成物進一步包含表面活性劑，例如聚山梨醇酯 80。與在未結合至本發明結合物時 (例如在時未與 NLP-Fab 結合物或 NLP-Fab-短肽結合物締合/共價結合時) 之情形相比，該等結合物可增加跨 BBB 易位及增加 (例如顯著增加) 生物活性劑或可偵測製劑至腦或中樞神經系統的遞送。

【0289】 可根據本發明治療之神經學疾病包括中樞及周邊神經系統的任何疾病。非限制性實例包括腦、脊髓、顱神經、周邊神經、神經根、自主神經系統、神經肌肉接頭及肌肉之疾病。在特定實施例中，本發明結合物可用於治療腦及中樞神經系統之神經學疾病。在具體實例中，本發明結合物可用於治療例如阿茲海默氏病 (Alzheimer disease)、其他失智症、腦腫瘤、腦血管疾病、癲癇、偏頭痛、其他頭痛病症、多發性硬化、神經感染、由營養不良所致之神經學病症、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、中風、由頭部創傷所致之創傷性神經系統病症及諸如此類。

【0290】 VIII. 系統及套組

【0291】 本發明之另一態樣涉及系統及/或套組，例如經設計以有利於實施本文所闡述之製程或使用方法中之一者或多者的系統及套組。通常，該系統或套組包含本發明之結合物 (例如肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物)、醫藥組成物或調配物及/或相關組分，其中該等結合物、組成物及組分提供於不同腔室或容器中。適宜容器包括例如瓶、小瓶 (例如雙室小瓶)、注射器 (諸如雙室注射器) 及測試管。容器可自各種材料 (諸如玻璃或塑

膠) 形成。腔室係指容器內例如用以使既定容器內之不同組分保持分開的分區，且可與容器包含相同或不同材料。

【0292】 在一些實施例中，成膜脂質、支架蛋白質、抗原結合多肽 (例如 Fab) 及在一些實施例中，結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基提供於套組之一個或多個不同腔室或容器中，並隨附關於製備本發明結合物的說明書。說明書可包括於包裝插頁中。包裝插頁亦可含有關於本發明之結合物例如用於治療、防治或診斷應用之適應症、用途、劑量、投予、組合療法、禁忌及/或警告的資訊。

【0293】 在一些實施例中，NLP 及抗原結合多肽 (例如 Fab) 以及 (在一些實施例中) 結合肽之 C₄₋₂₈ 脂肪醯基於套組的單獨腔室或容器中提供。在一些實施例中，該套組在套組之單獨腔室或容器中提供用於製備如本文所闡述醫藥組成物的肽-NLP 結合物、肽-NLP-多肽結合物及/或 NLP-多肽結合物以及醫藥上可接受之載劑。舉例而言，套組可包括關於製備例如用於經皮下或經眼部遞送低體積、高濃度結合物之低黏度結合物調配物的說明書。在一些實施例中，該結合物進一步包含另一治療劑或可偵測製劑 (標記)，或套組在一或多個其他腔室或容器中提供其他治療劑及/或可偵測製劑 (標記)，且視情況提供關於使用結合物之說明書。

【0294】 在一些實施例中，在套組中提供呈凍乾調配物形式之本發明結合物，視情況包括關於材料重構及/或使用之說明書。舉例而言，容器可容納凍乾調配物且在容器上具有或連有指示重構及/或使用說明之標記。標記可指示，將凍乾調配物重構至如上文所闡述之結合物濃度。標記可進一步指示，調配物可用或意欲用於皮下或眼部投予。容納調配物之容器可為多次使用性小瓶，其容許重複投予 (例如 2-6 次投予) 重構調配物。套組可進一步包含含有適宜稀釋劑 (例如 BWFI) 之第二容器或腔室。套組可進一步包含自商業及使用者角度考

慮期望之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及帶有使用說明書之包裝插頁。

【0295】 IX. 增加附接至奈米顆粒表面之短肽之生物活性的方法。

【0296】 本文亦提供增加附接至基於脂質之奈米顆粒之表面之短肽 (例如長度介於 20-60 個胺基酸之間的肽) 之活性 (例如生物活性) 的方法。在一些實施例中，該方法包含提供基於脂質之奈米顆粒，該基於脂質之奈米顆粒包含附接 (例如共價附接) 至奈米顆粒之表面的短肽，其中奈米顆粒之一種或多種脂質呈現官能化基團；及使奈米顆粒與具有官能基之多肽 (例如 Fab) 在有益於結合該官能化基團與該官能基之條件下接觸。在一些實施例中，該方法進一步包含純化包含基於脂質之奈米顆粒、短肽及多肽的結合物。在一些實施例中，奈米顆粒係脂質體。在一些實施例中，奈米顆粒包含脂雙層。在一些實施例中，基於脂質之奈米顆粒係固體脂質奈米顆粒 (SLN)。在一些實施例中，基於脂質之奈米顆粒係奈米結構化脂質載劑 (NLC)。在一些實施例中，間隔區連結該官能化基團與基於脂質之奈米顆粒之表面上的脂質。在一些實施例中，間隔區連結該互補官能基與該多肽。用於結合多肽與脂質之實例性官能化基團及互補官能基詳細闡述於本文其他處。在一些實施例中，該多肽是抗原結合多肽。用於結合至包含脂雙層之脂質體或奈米顆粒中之脂質的實例性抗原結合多肽詳細闡述於本文其他處。在一些實施例中，肽係 CKP。在一些實施例中，該肽為 CKP 變異體。在一些實施例中，與不含多肽之基於脂質之奈米顆粒上之短肽的活性 (例如生物活性) 相比，使多肽結合至奈米顆粒會將短肽之活性 (例如生物活性) 增加約 2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、20-、50-、100-或 150 倍中之任一者。

【0297】 本文所揭示之例如所有參考文獻、出版物及專利申請案中之每一者的全部內容皆以引用方式併入本文中。

實例

【0298】 以下為本發明之方法和組成物的實例。應當理解，鑒於上文給出的一般描述，可以實施各種其他實施例。

【0299】 實例 1：NLP-Fab 結合物之產生

【0300】 材料

【0301】 自 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 購買 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼 (DOPC) 及 DOPE-MCC。自 Thermo Fisher (Carlsbad, CA) 獲得人類血清、Alexa Fluor 488 NHS 酯 (AF488)。所有其他試劑皆係自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 訂購。

【0302】 apoE422k 及 Fab 之蛋白質表現及純化

【0303】 在大腸桿菌 (*E. coli*) 細胞中於搖瓶條件下使用確立之表現質體及方法來產生 ApoE422k(46, 47)。在收穫後，粉碎細胞，旋轉並收集上清液。在 Ni-NTA 管柱 (XK16/20 3 ml) 上純化 ApoE422k，隨後在 SEC (Superdex 75 16/60) 上純化。對於 Ni-NTA 純化而言，洗滌管柱並在 50 mM 磷酸鹽緩衝液、200 mM NaCl、10 mM 咪唑 (pH 8) (緩衝液 A) 中結合蛋白質。使用緩衝液 A + 0.2% Triton X114+0.2% Triton X100 深度洗滌蛋白質 (20 管柱體積) 並使用 50 mM 磷酸鹽緩衝液、200 mM NaCl、400 mM 咪唑 (pH 8) 洗脫。過濾匯集部分並使用 3 kDa 分子量截止旋轉濃縮器濃縮。然後經由煙草蝕紋病毒包-核內肽酶 (TEV 蛋白酶) 消解來去除 His 標籤 (將 TEV 標籤添加於 His 標籤與蛋白質序列之間的 N 端上)。以 100:1 之蛋白質重量對 TEV 重量比率將 TEV 蛋白酶添加至經純化蛋白質中。藉由使反應混合物通過 Ni-NTA 管柱 (XK 16/20 3 ml) 自含有 His 標籤之 TEV 蛋白酶來純化經裂解蛋白質。濃縮所匯集蛋白質並運行於 SEC (Superdex 75 16/60) 上之 PBS 中。收集 SEC 餾分並使用質譜分析屬性，且藉由

粒徑篩析層析 (SEC) 分析聚集。匯集具有正確分子量 (MW) 且聚集物含量 <5% 之餾分且藉由 280 下之吸光度測定蛋白質濃度。

【0304】 在此實驗中，設計具有 C 端半胱胺酸之 Fab 構築體 (簡稱為 Fab) 以使得能夠位點特異性地結合至 NLP。使用對不相關胞質抗原 (cMET) 具有特異性之物種匹配性非靶向兔 Fab 來實施實驗以評估 Fab 結合及結合對 Fab-NLP 穩定性的效應。如先前闡述來表現及純化兔 Fab(47, 48)。使用如先前闡述進行純化之人類抗 OX40 Fab 及人類抗因子 D (AFD) Fab 來實施實驗以評估結合至 NLP 平臺後的 Fab 活性(45)。使用 20 mM DTT 將所有經純化 Fab 去半胱胺酸化以還原半胱胺酸結合物並使用 6.5 mM 麩胱甘肽 (GSH) 再氧化。然後對樣本實施緩衝液交換並在 200 mM 精胺酸琥珀酸鹽 (pH 5) 中洗滌及儲存以限制進一步之半胱胺酸化。

【0305】 NLP 組裝

【0306】 根據先前所報導程序來組裝 NLP (20)。對於所有 NLP 組裝而言，總脂質對 apoE422k 之莫耳比率為 80:1，先前已展示此比率可產生相對均質之 NLP 群體(16, 19, 31, 46)。使用如結果章節中所闡述 DOPC 及 DOPE-MCC 脂質之組合來組裝 NLP。在氯仿中製備或獲得該等脂質並等分至玻璃小瓶中。然後使用 N₂ 流在攪動下去除氯仿以形成薄脂質膜。將脂質溶於 PBS 緩衝液 (137 mM 氯化鈉、2.7 mM 氯化鉀、10 mM 磷酸鹽緩衝液，pH 7.4) 或 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.0，150 mM NaCl 且使用 80 mM 膽酸鈉)。在添加 apoE422k (在最終組裝體積中 150 μ M) 之後，將樣本在 22°C 下培育至少 1 小時。為去除膽酸鹽，將樣本與洗滌劑去除生物珠粒 (Sigma-Aldrich) 在振盪下於 500 μ L costar 0.22 旋轉過濾器中一起培育 2h。在振盪兩小時之後，將樣本在 200 g 下離心 5 min 且收集含有 NLP 之濾液。藉由 SEC 使用 AKTA Avant 系統

及 S200 10/300 Increase 管柱來純化隨後不用於 Fab 結合的樣本。與之相比，在此階段並不純化用於結合至 Fab 之樣本，而係立即如下文所闡述進行結合。

【0307】 Fab-NLP 結合及純化

【0308】 在上述透析步驟之後，測定含有 DOPE-MCC 之 NLP 中之 apoE422k 濃度且將 NLP 與 Fab 在 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.0)、150 mM NaCl 中以介於 0 – 60 之間的 Fab:NLP 莫耳比率一起培育。在 NLP 組裝之同一天實施結合以限制馬來醯亞胺的水解。將樣本置於振盪器並培育 2-4 小時。在 2-4 小時反應培育期之後，在較 DOPE-MCC 2 倍莫耳過量下添加 n-乙醯基半胱胺酸 (NAC) 以淬滅任何未反應馬來醯亞胺。使用 AKTA Avant 系統及 S200 10/300 Increase 管柱來純化所得 Fab-NLP 結合物。藉由 SEC-MALS 如下文所闡述來分析 Fab-NLP 峰中之每一餾分，且基於 MW 及流體動力學半徑 (R_h) 分析來匯集餾分以產生均質 Fab-NLP 樣本。

【0309】 實例 1 之結果及論述

【0310】 最佳化 Fab-NLP 結合物條件

【0311】 此研究確立了利用 NLP 作為 Fab 遞送載體之適宜性。圖 1A 展示用於生成 Fab-NLP 結合物之研發策略的示意性概述。廣言之，此方式涉及藉由結合雙層形成脂質 (輔助脂質) 及官能化脂質 (具有官能化頭基之脂質) 與含有正交反應基團之 Fab 分子來組裝 NLP。在該等實驗中，選擇 DOPC 作為輔助脂質，此乃因其在先前展示可相對於含有 DMPC 之 NLP 形成較穩定顆粒(20)。

【0312】 在選擇用於結合 Fab 與 NLP 之適當官能化脂質時之一重要考慮因素在於，應選擇化學選擇性反應對以與避免與存在於 apoE422k 支架蛋白質上之天然官能基 (例如胺基及羧基) 發生反應。因 apoE422k 蛋白質不含半胱胺酸 (硫醇反應性基團)，故選擇採用含有馬來醯亞胺頭基之脂質 DOPE-MCC 的硫醇-馬來醯亞胺化學進行 Fab 結合。藉由保留 Cys-227 (通常涉及全長 IgG 中

之鏈間鉸鏈雙硫鍵的殘基) 作為 Fab C 端殘基 (在實例中簡稱為 Fab) 來實現位點特異性 Fab 結合。所得 Fab 含有具有游離、反應性硫醇之此未配對 Cys(48)。此策略容許藉由使用馬來醯亞胺反應性基團修飾 NLP 表面且隨後位點特異性地結合至硫醇反應性 Fab 來組裝 NLP (圖 1A)。

【0313】 實例 2：NLP-Fab 結合物之分析

【0314】 NLP 及 Fab-NLP 結合物之 SEC-MALS/QELS 分析

【0315】 使用 Acclaim SEC-1000 分析型 SEC 管柱 (Thermo Fisher Scientific) 測定 MW 及 R_h ，該管柱使用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 之等度梯度 (其中額外摻加 150 mM NaCl) 且耦合至多角度光散射系統 (MALS) (Wyatt Instruments)。另外，使用準彈性光散射 (QELS) 量測擴散係數 (D)，其中使用單光子計數模組 (在 99.0° 角度下偵測) 捕獲散射雷射光之強度波動。假設為球形形狀，使用斯托克斯-愛因斯坦關係 (Stokes-Einstein relationship) 自 D 計算 R_h 。

【0316】 NLP 及 Fab-NLP 結合物之 LCMS 分析

【0317】 使用 Agilent 6230 ESI-TOF LC/MS 對 NLP 及 NLP-Fab 結合物實施 LCMS 分析。使用加熱至 80°C 之 Kinetex 2.6 μ m XB-C18 管柱 (Phenomenex) 分析所注射 NLP 樣本。溶劑運行為自 30% 甲醇及 70% 水之混合物至 100% 2-丙醇的梯度。所有溶劑皆具有 0.05% 三氟乙酸。僅注射 ApoE422k 及 Fab 以提供基線質量。

【0318】 NLP、Fab-NLP 及 Fab 載量之 HPLC 分析

【0319】 使用 HPLC 分析及 280 nm 下吸光度之組合分析 Fab-NLP 結合物中的 ApoE422k 及 Fab 濃度。在 Agilent 1290 Infinity Bio-inert HPLC 上使用與上文在 LCMS 分析中所闡述相同之管柱及梯度來測定 apoE422k 濃度。NLP-Fab 結合物之樣本 A280 HPLC 層析圖展示於圖 7A 中。觀察到兩個對應於 apoE422k (4.95 min) 及結合至 DOPE-MCC 之 Fab (約 5.15 min) 的峰。基於藉由

注入 1 – 8 µg apoE422k 且積分曲線下面積所生成之標準曲線來測定 apoE422k 濃度 (圖 7B)。考慮到關於生成 Fab-DOPE-MCC 試劑之難題 (其主要係由脂質及蛋白質之不相容溶解性所致)，使用 apoE422k 濃度及 A280 總吸光度且使用下列方程式，而非使用 HPLC 標準曲線，來量化 Fab-DOPE-MCC 結合物：

$$[Fab] = (Abs280 - [apoE422k] \cdot \epsilon_{apoE422k}) / \epsilon_{Fab}$$

其中 [Fab]、Abs280、[apoE422k]、 $\epsilon_{apoE422k}$ 及 ϵ_{Fab} 分別係 Fab 濃度、280 nm 下吸光度、藉由 HPLC 分析測得之 apoE422k 濃度、apoE422k 之消光係數及 Fab 之消光係數。

【0320】 實例 2 之結果及論述

【0321】 Fab-NLP 結合條件之進一步最佳化

【0322】 為評估納入馬來醯亞胺-硫醇反應性之影響，評價 DOPE-MCC 對 NLP 組裝之效應。在多種 DOPE-MCC 濃度 (0、10、20 及 30 mol%) 下於 pH 7.4 PBS 中組裝 NLP 並藉由 SEC-MALS/QELS 進行分析 (圖 1B 及 8A)。跨越不同 DOPE-MCC 濃度之所得 SEC 層析圖 (圖 8A) 以及所量測 MW 及 R_h (圖 1B；黑點代表 MW，灰色正方形代表 R_h) 皆產生幾乎相同之結果，從而指示功能性脂質對整體 NLP 形狀及大小並不具有顯著影響。然而，進一步之 LCMS 分析揭示了未由初始分析捕獲之產物複雜性 (圖 1C – 1D)。針對單獨 apoE422k 在約 4.9 min 之洗脫時間下觀察到 TIC 單峰 (圖 1C，圓) 且解捲積質量 (約 22 kDa) (圖 1D，圓) 與 apoE422k 的預計質量一致，但針對組裝於 pH 7.4 PBS 中之 NLP 未觀察到明顯 apoE422k 峰。替代地，在所有 MCC 濃度 (資料未展示) 下皆存在滯留時間介於 4.8 – 6.5 min 之間的多個 TIC 峰 (圖 1C，平直線)，其中在解捲積後於約 23 kDa、24 kDa 及 25 kDa 下觀察到三個主峰之圖案 (圖 1D，平直線)。

【0323】 有趣的是，該等質量增加對應於 DOPE-MCC 脂質之 MW (960 kDa)，從而表明在 pH 7.4 下於 PBS 緩衝液中之組裝及純化過程期間，DOPE-MCC 結合至 apoE422k 支架蛋白質並使其脂質化且 23 kDa、24 kDa 及 25 kDa 分別對應於結合至 1、2 及 3 個脂質之 apoE422k。儘管馬來醯亞胺對硫醇之反應性在介於 6.5 - 7.5 之間的 pH 值下具有高度特異性，但已報告在鹼性 pH 值下與蛋白質上之胺基的反應性(50)。高濃度之緊鄰經暴露離胺酸殘基之馬來醯亞胺以及在此步驟處不存在硫氫基增加了發生此副反應的機會，如先前已觀察(51)。為接近此傾向，在 pH 6.0 下實施反應。該等條件對於馬來醯亞胺-硫醇化學而言並非最佳且需要延伸 Fab 結合之反應時間，但減小了未質子化、親核性胺之可能性。在 pH 6.0 下組裝亦可幫助最小化馬來醯亞胺水解，馬來醯亞胺水可較迅速地發生於較高 pH 值下且產生不可逆及非反應性之馬來酸(52)。因此，使用 20mol% DOPE-MCC 在 50 mM 磷酸鈉緩衝液、150 mM NaCl 中於 pH 6.0 下組裝 NLP 並在 SEC 純化後藉由 LCMS 進行分析。使用該等組裝條件，僅觀察到 LC 層析圖中之單峰 (圖 1C，三角形) 且將此峰解捲積至 apoE422k 的預期質量 (約 22 kDa) (圖 1D，三角形)。該等綜合發現強烈表明，DOPE-MCC 脂質結合至 apoE422k 上之經暴露離胺酸。

【0324】 有趣的是，在偵測到顯著 apoE422k – DOPE-MCC 結合之任一組裝中皆不存在聚集 (圖 8A)，從而表明交聯可為顆粒內事件而非顆粒間事件。為進一步評價 apoE422k-DOPE-MCC 結合對 NLP 聚集之效應，在 pH 7.4 及 6.0 下製備具有相同組成物 (20mol% DOPE-MCC) 之 NLP 並藉由 SEC-MALS 進行分析。與先前觀察一致，兩種樣本之 MW 及 R_h 相同 (圖 8B)，儘管在 pH 7.4 下製得之樣本發生深度 apoE422k 脂質化。該等資料進一步證實，DOPE-MCC:apoE422k 結合不產生顆粒間交聯，而係產生顆粒內交聯。

【0325】 可假設，駐留於支架蛋白質與脂質核心之界面上之離胺酸殘基的 pKa 發生改變，從而使其在 pH 7.4 下去質子化且能夠與毗鄰馬來醯亞胺進行反應。在 apoE422k 蛋白質中之 8 個離胺酸中，7 個位於包圍脂雙層之螺旋域上(53)且易於接近脂雙層中之 DOPE-MCC。另外，先前已報導離胺酸側鏈 pKa 在疏水性環境中之降低，其中離胺酸殘基埋入蛋白質及 DOPC 雙層中(54, 55)。在該等研究中，水不可及性離胺酸殘基展現低於正常 $pK_a \geq 10$ 之 pKa 值，且分別低至 5.2 及 6。僅面向 NLP 脂雙層之離胺酸殘基之 pKa 值的選擇性降低可將未觀察到分子間聚集物闡釋為，其親核性胺可能不能與附近 NLP 上之頭基相互作用。DOPE-MCC 對 apoE422K 之脂質化的偵測強調使用高級分析技術 (例如 LCMS) 來評估新治療遞送平臺的重要性。製程相關雜質之早期偵測及平臺問題之鑑別有利於成功研發新穎平臺技術。尚未使用傳統分析型 SEC 方法偵測到此交聯事件，且儘管尚未明瞭此副產物是否使穩定性或活性產生顯著差異，但可變性不可控制且可另外引起製造困難。

【0326】 Fab-NLP 結合物純化及 Fab 載量

【0327】 在確立組裝條件後，在極少 DOPE-MCC:apoE422k 交聯及相對均質之 NLP 群體的情形下，進一步最佳化 Fab-NLP 結合方法。使用對不相關胞質靶 (cMET) 具有特異性之兔 Fab 分子作為該等實驗的代用試劑。使用依序 NLP 組裝及結合步驟來產生 Fab-NLP 結合物並純化，其中 Fab 添加直接發生於自 NLP 去除基於生物珠粒之膽酸鹽之後，且並無 NLP 純化步驟。選擇此方案以最小化結合之前的馬來醯亞胺水解可能。基於報導介於 20-35 mol% 之間之功能性脂質組成物之最大結合效率的先前研究，選擇 20 mol% DOPE-MCC 以供放大(31)。最初在 Fab:NLP 莫耳反應比率為 20 下研發純化方案。將 Fab 與 NLP 一起培育 2-3 小時且以 2 倍於 DOPE-MCC 之莫耳濃度添加 NAC 以淬滅未反應馬來醯亞胺且防止 DOPE-MCC:apoE422k 交聯。

【0328】 然後在 S200 SEC 管柱上純化 Fab-NLP 且在 SEC 曲線中觀察到三個主峰；NLP-Fab 結合物 ($r_t \sim 10$ min)，Fab 二聚體 ($r_t \sim 14$ min)，未結合 Fab ($r_t \sim 16$ min) (圖 2A)。Fab 二聚體之出現係藉由在結合步驟期間經由在 Fab 之 C 端硫醇處成二硫化物形而發生二聚化所引起。有趣的是，起始材料不含任何 Fab 二聚體 (資料未展示)，因此此現象似乎發生於結合步驟期間且在其他 Fab 中沒有持續觀察到，從而表明可存在誘導此現象之獨特性質 (局部 PI)。然而，仍能證實 Fab 與 NLP 之成功結合。

【0329】 藉由 SEC-MALS 對 NLP 峰之深度分析指導了匯集策略 (圖 2A 插頁)。一般而言，NLP 峰相對較為對稱且該峰中之 R_h 值僅略有變化，其中最大變化 (12.9 – 10.5 nm) 位於峰前端 (9 – 9.5 min 滯留時間) 且最小變化 (10.3 – 9.6 nm) 位於峰之中間及末端 (9.5 – 10.25 min 滯留時間) (圖 2A 插頁)。因此，為生成最均質之 NLP-Fab 調配物，匯集 9.5 – 10.25 min 之間之樣本餾分並實施 LCMS 分析。單獨 Fab 之 LCMS 分析在 TIC 層析圖中產生單峰且滯留時間為約 5.4 min (圖 2B，圓)。此峰之解捲積質量為約 45.7 kDa，此對應於 Fab 之預期質量。在內此滯留時間內於 NLP-Fab 結合物池的 TIC 層析圖中觀察到兩個峰 (圖 2B，三角形)，其中該等峰之解捲積質量對應於 DOPE-MCC:Fab 結合物 (約 46.7 kDa) 及 apoE422k (圖 2C，三角形)。總而言之，該等結果表明，Fab 經由 DOPE-MCC 脂質成功地結合至 NLP。

【0330】 為進一步探究 NLP 平臺之 Fab 承載能力，使 NLP 與遞增濃度之 Fab 結合且在純化步驟後量測 Fab 數/NLP，如材料及方法中所闡述。在該等實驗中，Fab 反應濃度自 0 – 270 μ M 變化，此對應於 0 – 50 Fab/NLP。如圖 3A 中所展示，隨著 Fab 濃度增加至 216 μ M 之飽和值，NLP 峰逐漸增加。在最高 216 μ M 之飽和點時亦觀察到 Fab 二聚體及未結合 Fab 峰之逐漸增加，隨後在

較高濃度 (270 μM) 下顯著增加，從而指示 NLP 結合已經飽和且所添加超過 216 μM 之所有其他試劑皆不結合至 NLP。

【0331】 如上文所闡述來量化在每一條件下結合之 Fab 量 (圖 3B)。在較低 Fab 濃度 (0-200 μM) 下，觀察到 Fab 載量在 0-30 Fab/NLP 內之線性增加。然而，此趨勢在較高 Fab 濃度 (>200 μM) 下趨於平緩且不能在 NLP 上加載超出約 30 Fab/NLP 之額外 Fab。基於公開之晶體結構，典型 Fab 之橫截面直徑為約 4 nm (56)，此對應於約 12.6 nm^2 之表面積，而基於 SEC-QELS 分析，NLP 之 R_h 測定為約 7.5 nm，此對應於 350 nm^2 之總結合表面積，從而得到約 30 Fab/NLP。此最大承載能力證實了結果且與考慮 Fab 及 NLP 結合表面之尺寸時的理論最大承載能力一致。

【0332】 為進一步表徵 Fab 載量對 NLP 結構之效應，隨 Fab 載量變化量測 Fab-NLP 結合物之 MW 及 R_h 。基於跨越 Fab-NLP 結合物峰之 MALS 分析，Fab-NLP 結合物之 MW 在較高 Fab 載量下有所增加，其中 MW 自 0 Fab 載量下之約 225 kDa 增加至 Fab:NLP 比率為 30 時的約 900 kDa (圖 3C)。有趣的是，此 MW 增加暗示承載能力低於 HPLC 分析約 16 Fab/NLP。此偏差可源於 Fab-NLP 結合物相對於游離 Fab 之 dn/dc 值變化，該變化可影響計算。考慮到 HPLC 方法係 apoE422k 及 Fab 濃度之獨立量測，可認為該等值較準確地反映了 Fab 載量。

【0333】 儘管具有此偏差，但 MALS 分析明確指示，如所預計，MW 隨 Fab 載量線性增加。與 MW 分析不同， R_h 並不隨 Fab 載量增加顯著改變 (圖 3D)。該等結果與 NLP 之盤形性質一致且指示 NLP 表面積係控制 Fab 化合價之主導因素。此現象已觀察於其中球狀蛋白結合至 NLP 之兩個先前研究中(20, 31)。在兩個實例中，使加 His 標籤之蛋白質附接至含有鎳螯合脂質之 NLP，且所達成之最大載量數與基於蛋白質大小及 NLP 表面積的理論結合能力一致。值

得注意的是，Rh 分析假設具有球形形狀，此對於該等假定盤形奈米顆粒不可能完全準確。然而，先前已報導，溶液中之 NLP 形狀係動態的且 NLP 可採用除靜態盤形形狀外，更能反映球型顆粒的各種不同構形(57)；因此，合理確信上述 MALS 分析。

【0334】 實例 3：NLP-Fab 結合物之可製造性

【0335】 Fab-NLP 結合物之流變性分析

【0336】 使用 Anton Paar Physica MCR 501 旋轉流變儀利用 CP20-0.5 錐及板組態來量測黏度。CP20-0.5 幾何結構具有 20-mm 之直徑及 0.5° 之角度。在 25°C 下使用流變儀溫度控制器 (具有來自水浴之循環流體的帕爾貼板 (Peltier plate)) 來實施量測。將大約 20 μ L 之每一樣本加載於底板上以供量測，然後將椎體緩慢降至期望間隙寬度。所量測扭矩決定剪切應力，自該剪切應力計算黏度，如先前所闡述。

【0337】 NLP 及 Fab-NLP 結合物之凍乾

【0338】 使用 80 mM 海藻糖作為賦形劑來凍乾 Fab-NLP 結合物。此係用於蛋白質及脂質體調配物之常用賦形劑。在該等實驗中，在 PBS 中純化 Fab-NLP 結合物。添加海藻糖直至最終濃度為 80 mM。冷凍前之 Fab-NLP 蛋白質濃度為 2 mg/ml。藉由在乾冰上培育 60 min 來冷凍 300 μ L Fab-NLP 樣本。然後將樣本在 Labconco 凍乾器上凍乾過夜。在完成凍乾之後，在水中重構樣本並藉由 SEC 分析。

【0339】 實例 3 之結果及論述

【0340】 Fab-NLP 調配物

【0341】 關於產生奈米顆粒-蛋白質結合物之已知難題係製造期間的調配。特定而言，蛋白質濃度與黏度之間之關係可顯著影響藥物製造的關鍵參數。在因體積限制而需要高濃度藥物或蛋白質調配物(例如使用注射體積分別限

於 100 μ l (58)及 1 - 2 ml (59, 60)之眼部遞送及皮下投予) 時，此變得尤其重要。在高蛋白質濃度下，蛋白質-蛋白質相互作用可導致黏度增加，因排除體積之增加，其他結合部分之存在可加劇此情況(61)。因此，為評價基於 NLP 之遞送對黏度之效應，在裸 Fab、Fab-NLP 結合物及 Fab-PEG 結合物之間比較 Fab 濃度與黏度之間的關係(47) (圖 4A)。使用生物活性人類抗因子 D Fab 實施該等實驗以改良可轉變性。為允許較佳地直接比較 Fab 化合價，選擇市售 PEG 支架，其中該支架具有 8 個含有馬來醯亞胺反應性末端之 PEG 臂以容許結合 8 個 Fab/PEG。生成及表徵 8 臂 PEG 結合物之細節已闡述於其他處 (47)。對於 Fab-NLP 結合物而言，Fab 載量為約 30 Fab/NLP，選擇該載量以最大化 NLP 上之 Fab 密度。

【0342】 在該等實驗中，在整個所測試濃度範圍中，單獨 Fab 之黏度保持相對恆定 (圖 4A，圓)。與之相比，在 Fab 濃度達到 80-100 mg/ml 之間時，Fab-PEG 結合物之黏度特徵突然增加至約 1000 cP (圖 4A，三角形)。儘管針對 Fab-NLP 結合物觀察到類似特徵，但黏度發生指數性增加之 Fab 濃度極高 (> 300 mg/ml) (圖 4A，正方形)。該等結果指示，相對於較傳統之基於 PEG 之方式，可使用 NLP 平臺達成極高 Fab 調配物濃度。在 NLP 調配物中 Fab 僅構成整體藥品的約 30% (質量)，而 Fab-PEG 結合物中之 Fab 含量為約 90% (質量)，該等發現令人意外。此觀察現象之一種可能原因在於 Fab 在 NLP 表面上之排序。因高蛋白質濃度下之黏度係藉由分子內蛋白質相互作用及蛋白質之包裝能力，故似乎可能的是，高密度 Fab 與 NLP 表面之結合可誘導在 PEG 八聚體形式中不能達成的排序。

【0343】 除與高濃度調配物相容外，Fab-NLP 結合物亦在凍乾後顯示穩定行為。在該等實驗中，在約 18 Fab/NLP 之 Fab 載量下生成 Fab-NLP 結合物，在 80 mM 海藻糖存在下於 5 mg/ml 之濃度下凍乾並藉由 SEC-MALS 分

析。選擇海藻糖作為賦形劑，此乃因其已廣泛用於凍乾脂質體以及紅血球(62, 63)。如圖 4B 中所展示，凍乾前後之 MW 及 R_h 展現較小變化，從而證實了 Fab-NLP 結合物高度穩定之觀點。因與確立之製造製程相容，故除延長之儲存期限外，凍乾穩定性亦係期望調配物性質(64)。該等結果與海藻糖係用於基於脂質之奈米顆粒調配物之極佳賦形劑的先前報導一致，且證實 Fab-NLP 結合物可與需要基於凍乾之調配的製造製程相容。

【0344】 實例 4：NLP-Fab 結合物之活性

【0345】 抗因子 D Fab 阻斷活性分析

【0346】 使用如先前所闡述之因子 B 裂解 TR-FRET 分析來測定 Fab-NLP 結合物之活性(47, 49)。考慮到 Fab 抑制因子 D 之預期 1:1 化學計量學，使用 Fab MW 代替多聚體 MW 來計算結合物莫耳濃度。

【0347】 抗 OX40 Fab 激動劑活性分析

【0348】 如先前闡述來實施 OX40 激動劑分析(45)。簡言之，將經 NF κ B 螢光素酶報告基因改造之過度表現 OX40 之 Jurkat 細胞以 80,000 個細胞/孔接種於 384-孔組織培養板 (Corning Inc.，目錄號：3985BC) 中之 20 μ l 含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培養基中。以 4X 濃度將抗 OX40 形式連續稀釋於培養基中且將 10 μ l 經濃縮抗體添加至每一孔中。使所有孔體積皆達到 40 μ l 並在 37°C、5% CO₂ 下於 CO₂ 培育器中培育 16–18 h。然後將 40 μ l Bright Glo (Promega 目錄號：E2610) 添加至每一孔中並在振盪及室溫下培育 10 min。使用 Perkin Elmer Envision 讀板儀偵測發光。

【0349】 實例 4 之結果及論述

【0350】 Fab-NLP 結合物之抑制及激發活性

【0351】 在一些情況下，蛋白質至奈米顆粒之結合及固定可負面地影響蛋白質活性(65, 66)。該等負效應可歸因於各種不同因素，包括 (但不限於) 結合

時之構形變化、失去活動自由及蛋白質變形。對於 Fab-NLP 結合而言，意欲藉由以下方式來緩解該等問題：使用位點特異性化學防止以隨機定向進行結合，及將結合手柄置於 Fab 活性區 (重鏈及輕鏈之可變域) 的相對端 (重鏈之 C 端區域)。然而，此不能保證，Fab 與 NLP 之結合對活性並無任何影響。因此，為評價 Fab 結合之效應，使用補體因子 D-依賴性因子 B 裂解之時間解析螢光能量轉移 (TR-FRET) 分析來量測抗因子 D Fab 的抑制活性。最大 TR-FRET 信號出現於因子 B 在不存在因子 D 活性下保持完整時。在此分析中，藉由單獨抗因子 D Fab、Fab-NLP 結合物及凍乾並重構之 Fab-NLP 結合物來量測因子 D 抑制 (圖 5A)。在所有三種試劑中未觀察到抑制活性之顯著差異，從而證實結合及凍乾並不損失抑制。該等發現指示，一般而言，經由 C 端半胱胺酸標籤來結合 Fab 並不顯著影響重鏈及輕鏈之 CDR 區的活性。

【0352】 除評估結合對 Fab 之抑制活性的效應外，亦評價使用此平臺經由較高化合價來增強激動劑 Fab 活性之可能。若干在臨床上有價值之激動劑路徑 (包括 TNF 家族成員) 需要超過 2 之化合價方達成強效活性(41, 42)。mAb 領域已試圖使用各種工程策略來解決此限制性，該等工程策略包括研發三功能抗體、四功能抗體、五功能抗體以及自組裝六聚體 IgG1(43-45)。然而，已報導，該等工程策略會負面地影響 PK 且難以達成超過 3-6 之化合價(43)，此可能不足以激發/拮抗所關注路徑。

【0353】 因此，接下來意欲測試使用 Fab-NLP 結合物平臺來激發已知需要較高化合價之路徑的可能。已報導，OX40 TNF 家族受體需要較高化合價來誘導激動劑活性。在最新公開案中，針對化合價 4 報導了中等激發活性且僅針對六聚體 IgG 形式 (其具有化合價 12) 觀察到高效活性(45)。因此，使用 OX40 受體作為模型系統來評估 Fab-NLP 化合價對激動劑活性之效應。以介於 0 至 30 之間之 OX40 Fab:NLP 莫耳比率生成 Fab-NLP 結合物且在過度表現 OX40 之

Jurkat NFκB 螢光素酶報告基因分析中量測激動劑活性 (圖 5B)。使用全長抗 OX40 huIgG1 mAb (化合價 2) 作為陰性對照。如所預計，在所測試整個濃度範圍內，針對單獨之抗 OX40 huIgG 或 NLP 未發現活性 (圖 5B –分別係三角形及十字形)。對於 Fab-NLP 結合物而言，在 3.8 之 Fab 化合價下觀察到低激動劑活性程度 (圖 5B –星形)，與之相比，在化合價增加至 8.3 Fab/NLP 時觀察到高效活性 (圖 5B –正方形) 且在化合價高於該值時僅觀察到輕微活性增加。該等結果表明，強烈效力之最小化合價為約 8 且與比較化合價為 4 及 12 之分子之激動劑活性的上文所提及研究一致(45)。值得注意的是，圖 5B 中之資料係相對於 Fab 濃度而非 NLP 濃度來顯示。在基於 NLP 濃度分析資料時，隨著 Fab 化合價自 3.8 增加至 29.4，Fab/NLP 複合物之曲線 (圖 5C) 及相應 EC50 (圖 5D) 降低約 4 倍。該等發現表明，Fab-NLP 結合物之整體效力隨化合價的增加而增加。總而言之，該等發現證實，已成功地使用此平臺來強效活化需要高化合價之路徑，此結果不能使用經工程化 mAb 平臺達成。

【0354】 實例 5：NLP-Fab 結合物之血清穩定性

【0355】 使用 AF488 標記 NLP 及 Fab-NLP

【0356】 如上文所闡述來生成 NLP 及 Fab-NLP 結合物。在裸 NLP 或 Fab-NLP 結合物之 SEC 純化之前，使用 AF488 經由游離離胺酸藉由與經 NHS 活化之 AF488 一起在 NHS-AF488:總蛋白質比率為 5 下培育 2-4 小時來標記樣本。在此培育期之後，藉由相對於反應中之總 NHS-AF488 添加 2X 莫耳過量的 Tris 來淬滅未反應 NHS-AF488。然後藉由 SEC 在 AKTA Avant 系統上使用 S200 10/300 Increase 管柱自未反應 AF488 純化經 AF488 標記之 NLP。

【0357】 50% 血清中之 NLP 及 Fab-NLP 結合物的 SEC 分析

【0358】 在含有 50% 血清之 PBS 緩衝液中培育經 AF488 標記之 NLP 及 Fab-NLP 結合物並藉由 SEC (Acclaim SEC 1000, Thermo Fisher Scientific) 在

PBS 緩衝液培育後的不同時間點進行分析。在 495 nm 波長下監測經標記 NLP 樣本之吸光度以避免來自血清蛋白及組分的干擾吸光度。觀察於 6-9 分鐘之間之峰歸因於 NLP 及 NLP-Fab 結合物，且 10-13 分鐘之間之峰歸因於已自 NLP 解離的游離未結合 Fab 或 apoE422k。將所測試不同時間點下之 NLP 峰面積正規化至時間 0hr 下之峰面積且使用該等歸一化值來測定 NLP 降解的動力學。

【0359】 實例 5 之結果及論述

【0360】 Fab-NLP 血清穩定性

【0361】 本文之 NLP 平臺可用作活體內遞送載體，儘管已報導其他 NLP 結構在複雜生物基質中具有低穩定性(20, 67, 68)。在一先前研究中，DOPC NLP 在 37°C 下於 50% 血清中之半衰期報導為介於 3-6 小時之間(20)，此顯著低於奈米顆粒之全身性半衰期 (24 - 48 小時)。為解決此限制性，先前研究評估了可交聯脂質組分對整體 NLP 穩定性之效應且證實使雙層核心交聯會顯著改良穩定性(68)。更具體而言，在 100% 血清中於 48 小時時間段中未觀察到 NLP 降解，而在不存在交聯下觀察到極快降解 (約10 min)(68)。儘管前景良好，但此方法之缺點之一在於，添加不具有已知天然降解或生物轉變路徑之非天然交聯脂質會增加安全風險。

【0362】 考慮到 NLP 穩定性對其用作活體內遞送載體之重要性，在經選擇以模擬活體內條件之 50% 血清中使用兔 Fab 代用分子來評價 NLP-Fab 結合物穩定性。為評估 NLP 之穩定性及完整性，使用 AF488 標記 Fab-NLP 結合物並藉由 SEC 在 495 nm 之吸光度下進行分析，選擇該吸光度係因為其分光光度特徵與血清/NLP-Fab 樣本中之血清蛋白及組分的固有吸光度不重疊。單獨 NLP 之實例性 SEC 跡線展示於圖 6A 中。完整 NLP 之滯留時間 (~8 min) 不同於自解離 NLP 釋放的游離 apoE422k (分別為 8 min 與 11.75 min)，且由此可易於藉由

SEC 隨時間追蹤 NLP 之穩定性及完整性。值得注意的是，在滯留時間為約 6.25 min 下觀察到之次要肩峰係源於血清中的聚集物且扣除背景以供分析。

【0363】 為評估 Fab 載量對穩定性之效應，使用 AF488 標記具有不同量 Fab (0、2、7、16 及 32 Fab/NLP) 之 Fab-NLP 結合物，在 37°C 下於 50% 血清中進行培育並藉由 SEC 在介於 0 – 24h 之間的不同時間點下進行分析。相對於時間 0h 下之峰面積來歸一化 Fab-NLP SEC 峰面積以容許比較不同 Fab-NLP 結合物。與先前之公開研究一致(20, 67)，單獨 NLP (圖 6B，三角形) 最初快速降解且在 3 小時之後僅剩餘 50% 的材料，隨後在剩餘 24 小時培育期中較緩慢地降解。亦針對 Fab:NLP 加載密度為 2 之 Fab-NLP 結合物觀察到極類似趨勢 (圖 6B，圓)。然而，在 Fab:NLP 加載密度增加至 7 時觀察到 NLP 穩定性顯著改良 (圖 6B，正方形)，其中未觀察到穩定性之初始特徵快速降低，而在整個 24 小時中主要係逐漸緩慢降低，其中在 37°C 下於 50% 血清中培育之後 63% 的 Fab-NLP 保持完整。在 Fab:NLP 加載密度為 16 及 32 時亦觀察到類似趨勢 (圖 6B，分別係星形及菱形)，且所偵測穩定性進一步增加，其中大於 70% 之 Fab-NLP 結合物在 24 小時培育期結束時保持完整。

【0364】 Fab-NLP 結合物之改良穩定性表明，進入 NLP 表面與降解有關且所結合 Fab 可保護 NLP 免受血清蛋白影響。據信，血清蛋白 (例如白蛋白) 以及天然 HDL 及 LDL 顆粒與 NLP 之疏水性脂雙層核心的相互作用係活體內或活體外血清條件下之 NLP 降解的主要驅動因素。據信，該等相互作用會破壞使 NLP 保持組裝及完整之脂質-脂質及脂質-脂蛋白元疏水性凡得瓦相互作用 (van der Waals interaction)。此假設進一步得到先前研究之支持，其中展示使脂雙層核心(68)或脂蛋白元(69)交聯可顯著改良 NLP 穩定性。儘管具有該等發現，但關於血清蛋白酶活性對 NLP 穩定性之影響知之甚少。脂蛋白元可由血清蛋白裂解，從而導致奈米顆粒分解。然而，考慮到使 Fab 結合至 NLP 表面且使脂雙層

核心及脂蛋白元交聯已展示可改良穩定性，NLP 分解之主要驅動因素似乎可能在於凡得瓦相互作用的破壞，此與脂蛋白元之血清蛋白酶裂解不同。令人意外地，在 7 之相對較低 Fab 密度下觀察到穩定性顯著改良，該密度對應於約 25% 之表面積覆蓋率 (假設 Fab 表面積為約 2.2 nm²)。該等資料表明，最小數量之表面保護蛋白即足以顯著影響 NLP 穩定性。重要的是，此係在不使用非天然交聯劑下所達成。

【0365】 使用 NLP 作為活體內藥物遞送載體之預期困難之一在於顆粒於複雜生物基質 (例如血清) 中的整體穩定性。然而，基於上述結果，令人意外地，在以高於值約 7 Fab:NLP 臨限值之 Fab 加載密度下組裝為 Fab-NLP 結合物時，此問題似乎有所緩解。因此，無需修飾 (例如可能引入額外毒性傾向之脂質交聯) 即可達成遞送 Fab-NLP 結合物期間之穩定性。

【0366】 匯總：

【0367】 在此研究中，闡述 Fab-NLP 結合物之研發、最佳化及表徵。使用結合至具有 C 端半胱胺酸之 Fab 的馬來醯亞胺反應性脂質來生成 NLP。在 pH 7.4 下組裝時，馬來醯亞胺反應性脂質展示最可能經由離胺酸殘基結合至脂蛋白元、然而，在 pH 6 下組裝 NLP 時，未觀察到此不期望反應。將位點特異性 Fab 結合條件最佳化且證實在最高 30 Fab/NLP 下之結合。有趣的是，較高數量 Fab 之結合對 NLP 流體動力學半徑 (亦即 NLP 直徑) 具有最小影響且對 NLP 分子量 具有顯著影響，從而指示粒度主要取決於 NLP 之盤形形狀。

【0368】 亦評估凍乾後之 Fab-NLP 黏度及其穩定性以評價 Fab-NLP 的可製造性。亦即，以下列兩種方式來評估 Fab-NLP 平臺與所確立製造製程之相容性：藉由在製造期間之多個相關 Fab 濃度中比較其與另一多聚化技術 (Fab-PEG 八聚體結合物) 的黏彈性行為；及藉由評價其凍乾後穩定性。Fab-NLP 結合物可相對於另一多價形式 (Fab-PEG 結合物) 達成顯著較高之 Fab 濃度且凍乾並無

顯示任何穩定性或活性問題。此外，在抑制及激發背景中未發現 Fab 結合至 NLP 可影響 Fab 活性，且能夠利用 Fab 承載能力來活化需要高效力化合價之激動劑路徑。最後，在 50% 血清中評估 Fab-NLP 結合物之穩定性且 Fab-NLP 顯示增加之穩定性，其中在 Fab/顆粒比率為 7 或更大時 >63% 之 Fab-NLP 在 24 小時之後保持完整。該等發現將 Fab-NLP 確立為用於以多價形式靶向遞送 Fab 之平臺且 Fab-NLP 與所確立製造製程相容。

【0369】 此研究之綜合結果證實，NLP 係性能良好之多功能平臺，其極適於 Fab 或 Fab 樣分子之多聚化。該等結果證實，NLP 係用於以多價形式靶向遞送 Fab 之令人意外的有用平臺且與所確立製造製程相容。

【0370】 實例 1-5 之參考文獻

- (1) Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. 及 Shin, D. M. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1310-6.
- (2) Mareeva, T., Wanjalla, C., Schnell, M. J. 及 Sykulev, Y. (2010) A novel composite immunotoxin that suppresses rabies virus production by the infected cells. *J Immunol Methods* 353, 78-86.
- (3) Bhatt, R., de Vries, P., Tulinsky, J., Bellamy, G., Baker, B., Singer, J. W. 及 Klein, P. (2003) Synthesis and in vivo antitumor activity of poly (l-glutamic acid) conjugates of 20S-camptothecin. *J Med Chem* 46, 190-3.
- (4) Kim, T. Y., Kim, D. W., Chung, J. Y., Shin, S. G., Kim, S. C., Heo, D. S., Kim, N. K. 及 Bang, Y. J. (2004) Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 10, 3708-16.

- (5) Malik, N., Evagorou, E. G., and Duncan, R. (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 10, 767-76.
- (6) Markman, M. (2006) Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of cancers of the breast and ovary. *Expert Opin Pharmacother* 7, 1469-74.
- (7) Manchester, M. Singh, P. (2006) Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1505-22.
- (8) Wu, W., Wieckowski, S., Pastorin, G., Benincasa, M., Klumpp, C., Briand, J. P., Gennaro, R., Prato, M. 及 Bianco, A. (2005) Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 6358-62.
- (9) Tufteland, M., Ren, G., and Ryan, R. O. (2008) Nanodisks derived from amphotericin B lipid complex. *J Pharm Sci* 97, 4425-32.
- (10) Yuan, Y., Wang, W., Wang, B., Zhu, H., Zhang, B. 及 Feng, M. (2013) Delivery of hydrophilic drug doxorubicin hydrochloride-targeted liver using apoAI as carrier. *J Drug Target* 21, 367-74.
- (11) Ding, Y., Wang, W., Feng, M., Wang, Y., Zhou, J., Ding, X., Zhou, X., Liu, C., Wang, R. 及 Zhang, Q. (2012) A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA delivery for tumor gene therapy. *Biomaterials* 33, 8893-905.
- (12) Gaidukov, L., Bar, D., Yacobson, S., Naftali, E., Kaufman, O., Tabakman, R., Tawfik, D. S. 及 Levy-Nissenbaum, E. (2009) In vivo

administration of BL-3050: highly stable engineered PON1-HDL complexes. *BMC Clin Pharmacol* 9, 18.

- (13) Frias, J. C., Ma, Y., Williams, K. J., Fayad, Z. A. 及 Fisher, E. A. (2006) Properties of a versatile nanoparticle platform contrast agent to image and characterize atherosclerotic plaques by magnetic resonance imaging. *Nano Lett* 6, 2220-4.
- (14) Fischer, N. O., Rasley, A., Corzett, M., Hwang, M. H., Hoeprich, P. D. 及 Blanchette, C. D. (2013) Colocalized delivery of adjuvant and antigen using nanolipoprotein particles enhances the immune response to recombinant antigens. *J Am Chem Soc* 135, 2044-7.
- (15) Bhattacharya, P., Grimme, S., Ganesh, B., Gopisetty, A., Sheng, J. R., Martinez, O., Jayarama, S., Artinger, M., Meriggioli, M. 及 Prabhakar, B. S. (2010) Nanodisc-incorporated hemagglutinin provides protective immunity against influenza virus infection. *J Virol* 84, 361-71.
- (16) Fischer, N. O., Infante, E., Ishikawa, T., Blanchette, C. D., Bourne, N., Hoeprich, P. D. 及 Mason, P. W. (2010) Conjugation to nickel-chelating nanolipoprotein particles increases the potency and efficacy of subunit vaccines to prevent West Nile encephalitis. *Bioconjug Chem* 21, 1018-22.
- (17) Weilhammer, D. R., Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Alam, S., Loots, G. G., Corzett, M., Thomas, C., Lychak, C., Dunkle, A. D., Ruitenberg, J. J., Ghanekar, S. A., Sant, A. J. 及 Rasley, A. (2013) The use of nanolipoprotein particles to enhance the immunostimulatory properties of innate immune agonists against lethal influenza challenge. *Biomaterials* 34, 10305-18.

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

(19) Blanchette, C. D., Law, R., Benner, W. H., Pesavento, J. B., Cappuccio, J. A., Walsworth, V., Kuhn, E. A., Corzett, M., Chromy, B. A., Segelke, B. W., Coleman, M. A., Bench, G., Hoeprich, P. D. 及 Sulchek, T. A. (2008) Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations. *J Lipid Res* 49, 1420-30.

(20) Fischer, N. O., Weilhammer, D. R., Dunkle, A., Thomas, C., Hwang, M., Corzett, M., Lychak, C., Mayer, W., Urbin, S., Collette, N., Chiun Chang, J., Loots, G. G., Rasley, A. 及 Blanchette, C. D. (2014) Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One* 9, e93342.

(21) Cappuccio, J. A., Blanchette, C. D., Sulchek, T. A., Arroyo, E. S., Kralj, J. M., Hinz, A. K., Kuhn, E. A., Chromy, B. A., Segelke, B. W., Rothschild, K. J., Fletcher, J. E., Katzen, F., Peterson, T. C., Kudlicki, W. A., Bench, G., Hoeprich, P. D. 及 Coleman, M. A. (2008) Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles. *Mol Cell Proteomics* 7, 2246-53.

(22) Cappuccio, J. A., Hinz, A. K., Kuhn, E. A., Fletcher, J. E., Arroyo, E. S., Henderson, P. T., Blanchette, C. D., Walsworth, V. L., Corzett, M. H., Law, R. J., Pesavento, J. B., Segelke, B. W., Sulchek, T. A., Chromy, B. A., Katzen, F., Peterson, T., Bench, G., Kudlicki, W., Hoeprich, P. D., Jr. 及 Coleman, M. A.

(2009) Cell-free expression for nanolipoprotein particles: building a high-throughput membrane protein solubility platform. *Methods Mol Biol* 498, 273-96.

(23) Wadsater, M., Laursen, T., Singha, A., Hatzakis, N. S., Stamou, D., Barker, R., Mortensen, K., Feidenhans'l, R., Moller, B. L. 及 Cardenas, M.

(2012) Monitoring shifts in the conformation equilibrium of the membrane protein cytochrome P450 reductase (POR) in nanodiscs. *J Biol Chem* 287, 34596-603.

(24) Justesen, B. H., Laursen, T., Weber, G., Fuglsang, A. T., Moller, B. L. 及 Pomorski, T. G. (2013) Isolation of monodisperse nanodisc-reconstituted membrane proteins using free flow electrophoresis. *Anal Chem* 85, 3497-500.

(25) Baylon, J. L., Lenov, I. L., Sligar, S. G. 及 Tajkhorshid, E. (2013) Characterizing the membrane-bound state of cytochrome P450 3A4: structure, depth of insertion, and orientation. *J Am Chem Soc* 135, 8542-51.

(26) Gao, T., Petrlova, J., He, W., Huser, T., Kudlick, W., Voss, J. 及 Coleman, M. A. (2012) Characterization of de novo synthesized GPCRs supported in nanolipoprotein discs. *PLoS One* 7, e44911.

(27) Akkaladevi, N., Hinton-Chollet, L., Katayama, H., Mitchell, J., Szerszen, L., Mukherjee, S., Gogol, E. P., Pentelute, B. L., Collier, R. J. 及 Fisher, M. T. (2013) Assembly of anthrax toxin pore: lethal-factor complexes into lipid nanodiscs. *Protein Sci* 22, 492-501.

(28) Tufteland, M., Pesavento, J. B., Bermingham, R. L., Hoeprich, P. D., Jr. 及 Ryan, R. O. (2007) Peptide stabilized amphotericin B nanodisks. *Peptides* 28, 741-6.

- (29) Jia, J., Xiao, Y., Liu, J., Zhang, W., He, H., Chen, L. 及 Zhang, M. (2012) Preparation, characterizations, and in vitro metabolic processes of paclitaxel-loaded discoidal recombinant high-density lipoproteins. *J Pharm Sci* 101, 2900-8.
- (30) Weilhammer, D., Dunkle, A. D., Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Corzett, M., Lehmann, D., Boone, T., Hoeprich, P., Driks, A. 及 Rasley, A. (2017) Enhancement of antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses using a self-assembled biologic nanolipoprotein particle vaccine. *Vaccine* 35, 1475-1481.
- (31) Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Corzett, M., Bench, G. 及 Hoeprich, P. D. (2010) Kinetic analysis of his-tagged protein binding to nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 21, 1321-30.
- (32) Kuai, R., Sun, X., Yuan, W., Xu, Y., Schwendeman, A. 及 Moon, J. J. (2018) Subcutaneous Nanodisc Vaccination with Neoantigens for Combination Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem* 29, 771-775.
- (33) Merino, M., Zalba, S. 及 Garrido, M. J. (2018) Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *J Control Release* 275, 162-176.
- (34) Eloy, J. O., Petrilli, R., Trevizan, L. N. F. 及 Chorilli, M. (2017) Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 159, 454-467.
- (35) Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. 及 Bilgicer, B. (2014) Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol* 32, 32-45.

(36) Alibakhshi, A., Abarghooi Kahaki, F., Ahangarzadeh, S., Yaghoobi, H., Yarian, F., Arezumand, R., Ranjbari, J., Mokhtarzadeh, A. 及 de la Guardia, M. (2017) Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *J Control Release* 268, 323-334.

(37) Ohradanova-Repic, A., Nogueira, E., Hartl, I., Gomes, A. C., Preto, A., Steinhuber, E., Muhlgrabner, V., Repic, M., Kuttke, M., Zwirzitz, A., Prouza, M., Suchanek, M., Wozniak-Knopp, G., Horejsi, V., Schabbauer, G., Cavaco-Paulo, A. 及 Stockinger, H. (2018) Fab antibody fragment-functionalized liposomes for specific targeting of antigen-positive cells. *Nanomedicine* 14, 123-130.

(38) Hoang, B., Ekdawi, S. N., Reilly, R. M. 及 Allen, C. (2013) Active targeting of block copolymer micelles with trastuzumab Fab fragments and nuclear localization signal leads to increased tumor uptake and nuclear localization in HER2-overexpressing xenografts. *Mol Pharm* 10, 4229-41.

(39) Mamot, C., Drummond, D. C., Noble, C. O., Kallab, V., Guo, Z., Hong, K., Kirpotin, D. B. 及 Park, J. W. (2005) Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res* 65, 11631-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(49) Tesar, D., Luoma, J., Wyatt, E. A., Shi, C., Shatz, W., Hass, P. E., Mathieu, M., Yi, L., Corn, J. E., Maass, K. F., Wang, K., Dion, M. Z., Andersen, N., Loyet, K. M., van Lookeren Campagne, M., Rajagopal, K., Dickmann, L., Scheer, J. M. 及 Kelley, R. F. (2017) Protein engineering to increase the potential of a therapeutic antibody Fab for long-acting delivery to the eye. *MAbs* 9, 1297-1305.

(50) Hermanson, G. T. (2008) Bioconjugate Techniques, pp 283 °

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

(52) Hermanson, G. T. (2008) Bioconjugate Techniques, pp 767 °

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

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

- (55) Panahi, A., and Brooks, C. L., 3rd.(2015) Membrane environment modulates the pKa values of transmembrane helices.*J Phys Chem B* 119, 4601-7.
- (56) Strong, R. K., Campbell, R., Rose, D. R., Petsko, G. A., Sharon, J., and Margolies, M. N. (1991) Three-dimensional structure of murine anti-p-azophenylarsonate Fab 36-71.1.X-ray crystallography, site-directed mutagenesis, and modeling of the complex with hapten. *Biochemistry* 30, 3739-48.
- (57) Gao, T., Blanchette, C. D., He, W., Bourguet, F., Ly, S., Katzen, F., Kudlicki, W. A., Henderson, P. T., Laurence, T. A., Huser, T. 及 Coleman, M. A. (2011) Characterizing diffusion dynamics of a membrane protein associated with nanolipoproteins using fluorescence correlation spectroscopy. *Protein Sci* 20, 437-47.
- (58) Henein, C., Awwad, S., Ibeanu, N., Vlatakis, S., Brocchini, S., Tee Khaw, P. 及 Bouremel, Y. (2019) Hydrodynamics of Intravitreal Injections into Liquid Vitreous Substitutes.*Pharmaceutics* 11.
- (59) Dias, C., Abosaleem, B., Crispino, C., Gao, B. 及 Shaywitz, A. (2015) Tolerability of High-Volume Subcutaneous Injections of a Viscous Placebo Buffer: A Randomized, Crossover Study in Healthy Subjects.*AAPS PharmSciTech* 16, 1101-7.
- (60) Mathaes, R., Koulov, A., Joerg, S. 及 Mahler, H. C. (2016) Subcutaneous Injection Volume of Biopharmaceuticals-Pushing the Boundaries.*J Pharm Sci* 105, 2255-9.
- (61) Zarzar, J., Shatz, W., Peer, N., Taing, R., McGarry, B., Liu, Y., Greene, D. G. 及 Zarraga, I. E. (2018) Impact of polymer geometry on the interactions of protein-PEG conjugates.*Biophys Chem* 236, 22-30.

- (62) Chen, C., Han, D., Cai, C. 及 Tang, X. (2010) An overview of liposome lyophilization and its future potential.*J Control Release* 142, 299-311.
- (63) Fernandez-Moure, J., Maisha, N., Lavik, E. B. 及 Cannon, J. W. (2018) The Chemistry of Lyophilized Blood Products.*Bioconjug Chem* 29, 2150-2160.
- (64) Franze, S., Selmin, F., Samaritani, E., Minghetti, P. 及 Cilurzo, F. (2018) Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging.*Pharmaceutics* 10.
- (65) Rusmini, F., Zhong, Z. 及 Feijen, J. (2007) Protein immobilization strategies for protein biochips.*Biomacromolecules* 8, 1775-89.
- (66) Abad, J. M., Mertens, S. F., Pita, M., Fernandez, V. M. 及 Schiffrin, D. J. (2005) Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins.*J Am Chem Soc* 127, 5689-94.
- (67) Gilmore, S. F., Carpenter, T. S., Ingolfsson, H. I., Peters, S. K. G., Henderson, P. T., Blanchette, C. D. 及 Fischer, N. O. (2018) Lipid composition dictates serum stability of reconstituted high-density lipoproteins: implications for in vivo applications.*Nanoscale* 10, 7420-7430.
- (68) Gilmore, S. F., Blanchette, C. D., Scharadin, T. M., Hura, G. L., Rasley, A., Corzett, M., Pan, C. X., Fischer, N. O. 及 Henderson, P. T. (2016) Lipid Cross-Linking of Nanolipoprotein Particles Substantially Enhances Serum Stability and Cellular Uptake.*ACS Appl Mater Interfaces* 8, 20549-57.
- (69) Nasr, M. L., and Wagner, G. (2018) Covalently circularized nanodiscs; challenges and applications.*Curr Opin Struct Biol* 51, 129-134.

【0371】 實例 6：實例 7-11 之材料及方法

【0372】 材料

【0373】 如實例 1 中所論述來獲得用於實例 7-11 中之試劑。

【0374】 apoE422k 及 Fab 之蛋白質表現及純化

【0375】 如先前所闡述 (參見下文之參考文獻 18 及 19) 使用所確立表現質體及方法在搖瓶條件下於大腸桿菌細胞中來表現ApoE422k。簡言之，使用 6x His 標籤表現 apoE422k 並在 Ni-NTA 管柱 (XK16/20 3 ml) 上純化，隨後實施粒徑篩析層析 (SEC) (Superdex 75 16/60)。洗滌管柱且在 50 mM 磷酸鹽緩衝液、200 mM NaCl、10 mM 咪唑 (pH 8，緩衝液 A) 中結合蛋白質。使用緩衝液 A + 0.2% Triton X114+0.2% Triton X100 充分洗滌管柱結合蛋白質 (20 個管柱體積) 並使用 50 mM 磷酸鹽緩衝液、200 mM NaCl、400 mM 咪唑 (pH 8) 洗脫。過濾自洗脫峰收集之餾分並使用 3 kDa 分子量截止旋轉濃縮器濃縮。經由煙草蝕紋病毒包-核內肽酶 (TEV 蛋白酶) 消解來去除 His 標籤 (將 TEV 標籤添加於 His 標籤與蛋白質序列之間的 N 端上)。以 100:1 之 apoE422k:TEV 重量比率添加 TEV 蛋白酶。藉由使反應混合物通過 Ni-NTA 管柱 (XK 16/20 3 ml) 自含有 His 標籤之 TEV 蛋白酶來純化經裂解蛋白質。濃縮所匯集蛋白質並運行於 SEC (Superdex 75 16/60) 上之 PBS 中。收集 SEC 餾分並分別藉由質譜及 SEC 分析蛋白質之屬性及聚集。匯集具有正確分子量 (MW) 且聚集 (<5%) 之餾分且藉由 280 下之吸光度測定蛋白質濃度。

【0376】 設計具有 C 端半胱胺酸之 Fab 構築體 (簡稱為「Fab」) 以使得能夠位點特異性地結合至 CKP-NLP。使用如先前闡述進行純化之人類抗因子 D (AFD) Fab 作為代用品來評估 Fab 與 CKP-NLP 的結合 (參見下文之參考文獻 18)。使用 20 mM DTT 將所有經純化 Fab 去半胱胺酸化以還原半胱胺酸結合物

並使用 6.5 mM 麩胱甘肽 (GSH) 再氧化。然後對樣本實施緩衝液交換並在 200 mM 精胺酸琥珀酸鹽 (pH 5) 中洗滌及儲存以限制進一步之半胱胺酸化。

【0377】 C16-EETI-II 之合成及表徵。

【0378】 使用標準 9-苄基甲氧基羰基 (9-fluorenylmethoxycarbonyl) 方案在固相上以化學方式來合成線性 EETI-II 或 EETI-II-C16 肽，如下文之參考文獻 20 中所闡述。使用小規模摺疊分析及 LC-MS 分析鑑別最佳摺疊條件。在室溫及振盪下，將所獲得粗製線性肽在 0.5 mg/ml 下於最佳摺疊緩衝液 (0.1 M 碳酸氫銨 (pH 9.0)、2 mM 還原麩胱甘肽、0.5 mM 氧化麩胱甘肽、4 % DMSO，此係用於 EETI-II；0.1 M 碳酸氫銨 (pH 9.0)、1 mM 還原麩胱甘肽、50 % DMSO，此係用於 C16-EETI-II) 中氧化 24 小時。使用 C18 Sep-Pak (Waters，目錄號：WAT043345) 去除過量鹽且藉由 RP-HPLC (Agilent 技術, Santa Clara, CA) 使用 C18 管柱 (用於 EETI-II (簡稱為「CKP」)) 及 C4 管柱 (用於 EETI-II-C16 (簡稱為「CKP-C16」)) 純化凍乾產物。使用 LC-MS 系統 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 證實純化肽之屬性且其純度經證實 > 95%。

【0379】 CKP-NLP 組裝及純化

【0380】 為允許將 CKP 納入 NLP 中，如上文所闡述向 CKP 附加 C16 脂肪酸標籤 (CKP-C16)。如先前所闡述，基於以下原理向 NLP 中納入使用疏水性標籤合成之分子：疏水性標籤在脂雙層之核心內的分配可將該分子有效錨定至 NLP 表面 (參見下文之參考文獻 9、10)。如所先前闡述來組裝 CKP-NLP 且略微修改 (參見下文之參考文獻 9、10、18)。簡言之，組裝期間之總脂質對 apoE422k 莫耳比率為 80:1，先前已展示該比率會產生相對均質之 NLP 群體 (參見下文之參考文獻 6、11、19、21)。使用指示莫耳比率之 DOPC 及 CKP-C16 (無 Fab 結合) 或 DOPC、DSPE-PEG-Mal (Fab 結合) 及 CKP-C16 來組裝 CKP-NLP，如下文實例中所闡述。在氯仿或甲醇中製備或獲得該等脂質且以等分樣

本形式儲存於埃彭道夫管 (Eppendorf tube) 中。在 N_2 流及攪動下去除氯仿以形成薄脂質膜。將脂質溶於 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.0, 150 mM NaCl 且使用 80 mM 膽酸鈉) 中。在添加 apoE422k (在最終組裝體積中 150 μ M) 之後，將樣本在室溫下培育至少 1 小時。然後藉由與生物珠粒 (Sigma-Aldrich) 在振盪下於 500 μ L costar 0.22 μ M 旋轉過濾器中一起培育 2h 來去除膽酸鹽。在振盪兩小時之後，將樣本在 200 g 下離心 5 分鐘且收集含有 NLP 之濾液。藉由 SEC 使用 AKTA Avant 系統及 S200 10/300 Increase 管柱來純化不用於 Fab 結合的 CKP-NLP。在 SEC 純化之前，首先使擬用於生成 Fab-CKP-NLP 結合物之 CKP-NLP 結合至 Fab，如下文所闡述。

【0381】 Fab-CKP-NLP 結合及純化

【0382】 如先前所闡述使 Fab 結合至 CKP-NLP 且略微修改 (參見下文之參考文獻 18)。簡言之，在膽酸鹽去除步驟之後，如下文所闡述藉由 HPLC 來測定 CKP-NLP 之 apoE422k 濃度。在介於 0 – 160 之間之 Fab:NLP 莫耳比率下於 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.0)、150 mM NaCl 中使含硫醇 Fab 結合至馬來醯亞胺官能化 CKP-NLP，該莫耳比率係基於 apoE422k 濃度且假設 4 apoE422k/NLP 所計算 (參見下文之參考文獻 6)。選擇此結合緩衝液以限制馬來醯亞胺與 apoE422k 之間的 NLP 內交聯，如先前所闡述 (參見下文之參考文獻 18)。結合反應總是與 CKP-NLP 組裝在同一天實施以限制馬來醯亞胺水解。在 2-4 小時之反應培育期之後，以相對於 DSPE-PEG-MCC 2 倍莫耳過量來添加 n-乙醯基半胱胺酸 (NAC) 以淬滅任何未反應馬來醯亞胺。使用 AKTA Avant 系統及 S200 10/300 Increase 管柱純化所得 Fab-CKP-NLP 結合物。藉由 SEC-MALS 如下文所闡述來分析 Fab-CKP-NLP 峰中之每一餾分。基於 MW 及流體動力學半徑 (R_h) 分析來匯集餾分以產生最均質之 Fab-CKP-NLP 樣本。

【0383】 使用經 C 端半胱胺酸改造以使得能夠位點特異性地結合至 CKP-NLP 之人類抗因子 D (AFD) Fab (簡稱為「Fab」) 作為模型 Fab。表現 Fab 並如先前闡述進行純化 (下文之參考文獻 18、22)。使用 20 mM DTT 還原經純化 Fab 以去除半胱胺酸或在表現期間形成之 GSH 結合物並純化，且然後使用 6.5 mM 麩胱甘肽 (GSH) 再氧化以確保半胱胺酸係游離的以結合至馬來醯亞胺官能化 CKP-NLP。對樣本實施緩衝液交換，在 200 mM 精胺酸琥珀酸鹽 (pH 5) 中洗滌及儲存以限制進一步之半胱胺酸化。

【0384】 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物之 HPLC 分析

【0385】 藉由 HPLC 使用 Agilent 1290 Infinity Bio-inert HPLC 來分析 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物中之 ApoE422k、CKP 及 Fab 濃度。使用加熱至 80°C 之 Kinetex 2.6 μ m XB-C16 管柱 (Phenomenex) 分析所注射 NLP 樣本。溶劑運行為自 30% 甲醇、70% 水及 0% 2-丙醇之混合物至 100% 2-丙醇的梯度。所有溶劑皆具有 0.05% 三氟乙酸。最佳化梯度以容許分離所有組分。對於 Fab-CKP-NLP 結合物而言，需要還原條件，此乃因使用該等梯度及緩衝液條件不能分離完整 Fab 與游離 apoE422k。基於藉由注入 1 – 16 μ g 每一組分且積分曲線下面積所生成之標準曲線來測定 apoE422k、Fab 及 CKP-C16 濃度。基於 A280 UV 信號及蒸發光散射式偵測器 (ELSD) 信號來生成標準曲線。

【0386】 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物之 LCMS 分析

【0387】 使用 Agilent 6230 ESI-TOF LC/MS 實施 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物之 LCMS 分析。使用加熱至 80°C 之 Kinetex 2.6 μ m XB-C18 管柱 (Phenomenex, Torrance, CA) 來分析所注射 NLP 樣本。溶劑運行為自 30% 甲醇及 70% 水之混合物至 100% 2-丙醇的梯度。所有溶劑皆具有 0.05% 三氟乙酸。

【0388】 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物之 SEC-MALS/QELS 分析

【0389】 如先前所闡述來測定 MW 及 R_h (下文之參考文獻 18)。簡言之，將樣本注射於 Acclaim SEC-1000 分析型 SEC 管柱 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 上，該管柱使用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 之等度梯度 (使用額外之 150 mM NaCl) 且耦合至多角度光散射系統 (MALS) (Wyatt Instruments, Santa Barbara, CA)。使用準彈性光散射 (QELS) 量測擴散係數 (D)，其中使用單光子計數模組 (在 99.0° 角度下偵測) 捕獲散射雷射光之強度波動。使用斯托克斯-愛因斯坦關係自 D 來計算 R_h 。斯托克斯-愛因斯坦關係假設為球形形狀且藉由 TEM 及 AFM 分析測得 NLP 係盤形而非球形 (參見下文之參考文獻 6)。估計 R_h 由此對應於與 NLP 具有相同擴散係數之球體。然而，最近已報導，溶液中之 NLP 形狀係高度動態的，其中 NLP 可採用除靜態盤形形狀外之更能反映球型顆粒的各種不同構形 (下文之參考文獻 18、23)。出於該等原因，假定自此分析獲得之 R_h 值係準確的。

【0390】 胰蛋白酶酶促分析

【0391】 如先前所闡述來實施分析且略微修改 (參見下文之參考文獻 2)。簡言之，在室溫下，將肽 NLP 結合物在指示濃度下與胰蛋白酶 (2 nM) 一起培育 30 min。將受質 L-精胺酸-7-醯胺基-4-甲基香豆素 (L-Arg-AMC) (75 μ M) 添加至混合物中且立即量測蛋白水解活性。三重複運行樣本並重複兩次。使用 KaleidaGraph 軟體分析資料。

【0392】 使用 AF488 標記 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物

【0393】 如上文所闡述來生成 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物且在 SEC 純化之前 (在膽酸鹽去除之後)，使用 AF488 經由游離離胺酸藉由與經 NHS 活化之 AF488 一起在 NHS-AF488:總蛋白質比率為 5 下培育 2-4 小時來標記樣本。藉由相對於反應中之總 NHS-AF488 添加 10X 莫耳過量的 Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) 來淬滅未反應 NHS-AF488。然後藉由 SEC 在 AKTA Avant 系統上

使用 S200 10/300 Increase 管柱自未反應 AF488 純化經 AF488 標記之 NLP，如上文所闡述。

【0394】 50% 血清中之 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物的 SEC 分析

【0395】 如先前闡述來分析經 AF488 標記之 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 的降解 (參見下文之參考文獻 9、18、24 及 25)。在含有 50% 血清之 PBS 緩衝液 (pH 7.4) 中培育經 AF488 標記之 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物並藉由 SEC (Acclaim SEC 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 分析。在 495 nm 波長下監測經標記 NLP 樣本之吸光度以避免來自血清蛋白及組分的干擾吸光度。觀察於 5-5.5 分鐘之間之峰歸因於 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物，且 6-6.5 分鐘之間之峰歸因於已自 NLP 解離的未結合 Fab 或 apoE422k。將所測試不同時間點下之 NLP 峰面積歸一化至時間 0hr 下之峰面積且使用該等歸一化值來測定 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 降解的動力學。

【0396】 實例 7：CKP-NLP 之組裝、純化及表徵

【0397】 胰凝乳蛋白酶結肽 EETI-II (噴瓜 (Ecballium elaterium) 胰蛋白酶抑制劑 -II) 係發現於噴瓜中之強效胰蛋白酶抑制劑。為生成 CKP-NLP，設計 EETI-II 之脂肪醯化形式，其中棕櫚酸結合至在 EETI-II 之 N 端經改造之離胺酸側鏈的 ϵ 胺基 (圖 9A)。首先，藉由固相肽合成來生成線性 C16-EETI-II。在肽合成期間之最後步驟中納入脂肪酸，然後自樹脂裂解肽並去保護。然後在不同緩衝液中篩選所獲得線性粗產物以鑑別用以生成三雙硫鍵產物之最佳摺疊條件，如藉由分析 LC-MS 所評價。此產生策略簡化了純化過程 (而非在 CKP 摺疊之後結合脂肪酸)。參見圖 9B。摺疊 EETI-II-C16 並純化至接近均質，從而產生幾毫克級之 EETI-II-C16。藉由 LC-MS 證實 EETI-II-C16 之屬性及其純度 (圖 9C)。分析型 RP-HPLC 跡線指示，EETI-II-C16 之疏水性大於 EETI-II，如藉由其滯留時間長於天然 EETI-II 所反映 (圖 9D)。此係由於脂肪酸部分之結合。EETI-II-C16

在水性緩衝液 (> 0.5 mM，於 60 mM 磷酸鹽緩衝液中，pH 7.4) 中仍展示溶解性。經純化 EETI-II-16 顯示針對胰蛋白酶之抑制效力，此與結構研究中 N 端處之化學修飾應對 EETI-II 活性具有最小破壞的預測一致。為簡單起見，EETI-II 及 EETI-II-C16 在本文中分別稱為「CKP」及「CKP-C16」。

【0398】經由自發性自組裝使用 DOPC 作為輔助脂質且使用膽酸鹽進行脂質溶解來生成 CKP-NLP，如圖 10A 中所展示之示意圖中所圖解說明。在去除膽酸鹽之後，藉由 SEC 純化自組裝 CKP-NLP。CKP-NLP 之典型 SEC 層析圖展示於圖 10B 中。此 CKP-NLP 樣本係在 CKP-C16 相對於 DOPC 之莫耳比率為 10% (例如 90 mol% DOPC、10 mol% CKP-C16) 下所組裝，該莫耳比率對應於 40 CKP/NLP 且假設 4 apoE422k 支架/NLP (參見下文之參考 6)。收集對應於 SEC 峰之中段的餾分，匯集並實施反相 HPLC 分析。圖 10C 展示使用 10 mol% CKP-C16 組裝之 CKP-NLP 樣本在 SEC 純化之後的 HPLC ELSD 層析圖。在對應於 4.8 min、5.3 min 及 8.5 min 之滯留時間下觀察三個峰。使用標準曲線及 LC/MS 分析來驗證觀察於 4.8 min、5.3 min 及 8.5 min 下之峰分別對應於 apoE422k (22.3 kDa)、CKP-C16 (3.7 kDa) 及 DOPC (0.79 kDa)。該等發現展示，上述策略可將 CKP-C16 納入 NLP 中。生成每一組分之標準曲線且使用其來計算納入經純化 CKP-NLP 中之 CKP-C16 的量。對於 10mol% CKP-C16 樣本而言，所納入 CKP-C16 經計算為 8.4 mol%，此指示在組裝及純化過程期間材料略有損失。除 CKP-NLP 組成物之 HPLC 分析外，亦藉由 SEC-MALS 量測 NLP 分子量 (圖 10D-10E)。CKP-NLP 峰之 MW 自 200 kDa 變至 400 kDa，其中整個峰中之平均 MW 為 266 kDa (滯留時間為 9-10 min) (圖 10D)。類似地，CKP-NLP 峰之流體動力學大小 (R_h) 自 5.8 nm 變至 7.3 nm，其中整個峰中之平均 R_h 為 6.2 nm (滯留時間為 9-10 min) (圖 10E)，該等綜合結果表明，CKP-NLP 顆粒係多分散性的。該等發現與自整體及單分子量測來評估 NLP 大小之先前報導一

致。例如參見下文所列示之參考文獻 6。參考文獻 6報導，發現 NLP 之多分散性性質取決於多個離散 NLP 大小，該等離散 NLP 大小取決於與 NLP 締合之 apoE422k 支架蛋白質數 (其可在 4-7 之間變化)，且 NLP 多分散性代表了該等離散大小之隨機高斯分佈 (Gaussian distribution)。基於 SEC 分析，滯留時間、Rh 及 MW 與平均含有 4 個apoE422k/NLP 之 NLP 一致。該等綜合發現證實，可成功地生成 CKP-NLP、純化並表徵，如藉由模型脂質化肽 CKP-C16 所例示。

【0399】 實例 8：CKP 納入對 NLP 大小、加載效率及 CKP 活性之效應的分析

【0400】 接下來，如下所述來評估 CKP 納入對 NLP 大小之效應。藉由在前體有機相中組裝 CKP-NLP 與 mol% 介於 0-40% 之間的 CKP-C16 來量測最大 CKP 載量。使用 0、5%、10%、20% 及 40% CKP-C16 組裝之 CKP-NLP 的歸一化分析型 SEC 層析圖展示於圖 11A 中。隨著 CKP 含量自 0% 增加至 20%，觀察到滯留時間輕微增加，從而指示粒度略有降低。在 CKP-C16 濃度自 20% 增加至 40% 時，觀察到滯留時間大幅增加且出現對應於游離 apoE422k 蛋白質之大峰。該等結果亦反映於 SEC-MALS 跡線中之 CKP-NLP 峰的Rh分析中 (圖 11B)。在不存在 CKP 下 NLP 之 Rh 為約 7 nm 且在 5% CKP 下降低至約 6.3 nm。隨著 CKP-C16 含量自 5% 增加至 20%，未觀察到Rh發生進一步變化；然而，在 CKP-C16 濃度增加至 40% 時，觀察到劇降至 4.5 nm。如上文所提及，先前已報導 (參見下文之參考文獻 6)，NLP 之大小分佈主要取決於離散 NLP 大小之隨機高斯分佈，其中離散大小取決於 apoE422k/NLP 數。基於經驗單分子量測及分子動態模擬，向 NLP 中添加 apoE422k 蛋白質使得直徑增加約 2.5 nm (參見下文之參考文獻 6)。不受限於理論，在 CKP-C16 含量自 0 % 增加至 20% 時觀察到直徑降低約 0.7 nm 表明，此變化並非由 apoE422k/NLP 平均數之差異

所致。亦已報導，對於具有既定離散大小之 NLP 而言，NLP 大小存在可取決於組成物之一定程度之靈活性 (參見下文之參考文獻 6)。不受限於理論，NLP 大小之此輕微降低可由 NLP 組成物改變所致。CKP-C16 僅含單一脂肪醯基鏈且表面積小於 DOPC，且 NLP 直徑隨 CKP-C16 含量增加之此輕微降低可源於 CKP-C16 之橫截面表面積小於 DOPC。此原理不能闡釋在 40% CKP-C16 組成物所觀察之 R_h 快速下降及出現游離 apoE422k 峰。此直徑變化與在平均 apoE422k 數量/NLP 降低一時之預計變化密切匹配 (參見下文之參考文獻 6)。該等發現表明，在 CKP-C16 含量增加至 40% 時，不再有足夠之脂質內容物/表面積可容納 4 個 apoE422k/NLP (針對具有較低 CKP-C16 含量之 NLP 所觀察) 且該等顆粒係由 3 個 apoE422k/NLP 組成。然而，若此屬實，則游離 apoE422k 預計會增加 25%，而非基於 SEC 層析圖中之曲線下面積所觀察的 50% 增加。另一解釋為，CKP-NLP 可能不再形成，且 CKP-C16-DOPC 混合物可形成球形微胞。在較高洗滌劑比率下混合雙層形成脂質與洗滌劑可形成微胞 (參見下文之參考文獻 26)。類似現象可發生於具有較高 CKP-C16 濃度之 CKP-NLP 中。因 CKP-C16 與具有較大極性頭基及單一脂肪醯基鏈之洗滌劑分子具有類似結構，故較高比率之 CKP-C16 可誘導形成微胞而非雙層，此係形成 NLP 之必要條件。在較高 CKP 莫耳比率下，NLP 之基本結構及生物物理性質有所改變。

【0401】 為評價將 CKP 納入 NLP 平臺中之效率，藉由反相 HPLC 量化納入經純化 CKP-NLP 中之 CKP 的量。圖 11C 展示隨在 CKP-NLP 組裝期間添加之 CKP 含量 (X 軸) 而變化之經純化 CKP-NLP 中所量化的 CKP/NLP 比率 (Y 軸)，假設 4 apoE422k/NLP。虛線代表在反應中之所有 CKP 皆納入 NLP 中時之理論限值。在較低 CKP 濃度 (16 及 32 CKP/NLP，分別對應於 5 及 10 mol% CKP) 下，添加至反應中之幾乎所有 CKP 皆已納入 (分別係 13.3 及 27.6 CKP/NLP)，如點與虛線之接近程度所證實 (理論限值)。然而，在較高濃度下，

CKP 加載效率開始偏離理論上限 (圖 11C)。不受限於理論，該等發現表明，在較高 CKP 濃度下加載效率之回報遞減。NLP 能夠容納最多約 60 個 CKP-C16 分子而不影響 NLP 組裝過程。(圖 11C)。為達成此結論，假設在 40% CKP 濃度下為 4 apoE422k/NLP (128 CKP/NLP)。然而，情況可能並非如此，此乃因較高 CKP 濃度改變了 apoE422k/NLP 數或誘導形成微胞/NLP 雜合體。儘管具有此潛在傾向，但該等綜合結果表明，較高 CKP 載量條件下之納入效率有所降低。

【0402】 如下所述來評估 CKP-NLP 中之 CKP 納入對 CKP 活性之效應：在此分析中，在游離 CKP、CKP-C16 及 CKP-NLP 之不同濃度下以不同 CKP:NLP 莫耳比率 (0、13.4、28.6 及 63) 使用基於胰蛋白酶之分析來量測 CKP 活性 (圖 11D)。儘管 NLP-CKP 組裝相對可重現，但通常在最終組成物之間觀察到可變性。本發明製劑之 CKP:NLP 莫耳比率與上述樣本略有不同。游離 CKP (三角形，圖 11D) 及 CKP-C16 (圓，圖 11D) 分子具有相等效力以及幾乎相等之 K_i^{app} (0.16)，且具有 0 CKP 之 CKP-NLP 樣本並無活性 (十字形，圖 11D)。CKP-NLP 亦具有幾乎相等之功效，不論 CKP 加載密度如何 (星形及正方形，圖 11D)。然而，CKP-NLP 中之 CKP 之整體效力小於游離 CKP 及 CKP-C16 約 5 倍。不受限於理論，此可係由於 ($K_i^{app} \sim 0.4$ nM) 或使 CKP 錨定至 NLP 表面之立體阻礙效應。眾所周知，固定活性配體可因立體效應而影響活性(參見下文之參考文獻 27、28)。或者，CKP-C16 可因脂質與 CKP-C16 之間的化學電位差而發生相分離過程以變成團簇，且該等團簇會負面地影響 CKP 活性。儘管對活性具有此負面影響，但 CKP 在加載於 NLP 平臺上時仍較為高效。

【0403】 實例 9：CKP 載量對 CKP-NLP 穩定性之效應

【0404】 NLP 作為藥物遞送平臺之限制性之一在於複合物生物環境中的低穩定性 (參見下文之參考文獻 9、24、25)。舉例而言，DOPC NLP 在 37°C 下

於 50% 血清中之半衰期報導為介於 3-6 小時之間 (參見下文之參考文獻 9)，此低於奈米顆粒之潛在全身性半衰期 (24-48 小時)。最近證實，使雙層核心交聯可顯著改良穩定性 (參見下文之參考文獻 24)，其中針對經交聯 NLP 在 48 小時時間段內於 100% 血清中未觀察到 NLP 降解，且在不存在交聯下觀察到極快降解 (約 10 min) (參見下文之參考文獻 24)。然而，此方式可涉及增加安全風險，此乃因添加了並無已知天然降解或生物轉變路徑之非天然交聯脂質。最近報導，使 Fab 結合至 NLP 平臺會顯著改良 NLP 穩定性 (參見下文之參考文獻 18)。如下所述來評估 CKP 納入對 CKP NLP 穩定性之效應。藉由 SEC 在 50% 血清中使用螢光團標籤 (用以監測隨時間而變化之降解) 來評價 CKP-NLP 之穩定性。選擇 50% 血清以模擬活體內條件。在該等研究中，以不同時間間隔將經 AF488 之標記 CKP-NLP 注射於 SEC 上且在 495 nm 之吸光度下監測所洗脫 CKP-NLP。選擇此螢光團及吸光度特徵係因為其分光光度特徵與血清/CKP-NLP 樣本中之血清蛋白及組分的固有吸光度不重疊。圖 12A 展示不具有 CKP 之裸 NLP 在不同時間點下的 SEC 層析圖。SEC 層析圖中觀察於滯留時間 5.25 min 時之第一峰對應於 CKP-NLP 且在滯留時間 7.1 min 時之第三峰對應於游離 apoE422k。隨著培育時間增加，觀察到 CKP-NLP 峰減少且游離 apoE422k 峰增加。NLP 峰減少可直接量度 NLP 降解且藉由計算曲線下面積來加以量化。在所有樣本中，在滯留時間 6.2 min 時觀察到中間峰，且此峰不隨培育時間變化。考慮到所有樣本中之此峰及時間點之一致性，峰可能源於血清中之背景污染物。

【0405】 為系統地評估 CKP 載量對穩定性之效應，使用含有不同量之 CKP-C16 (0、10 及 36 CKP/NLP) 的 CKP-NLP 來實施該等實驗。相對於時間 0h 下之峰面積來歸一化 CKP-NLP SEC 峰面積以容許比較不同 CKP-NLP。與針對 Fab 與 NLP 之結合所報告的效應不同，納入 CKP-C16 似乎並不影響整體 NLP

穩定性(圖 12B)。所有 CKP-NLP 樣本皆顯示初始快速降解，其中僅 50% 之材料在 37°C 下於 2-4 小時之後剩餘，隨後在剩餘 24 小時培育期內較緩慢地降解。此降解模式與關於 NLP 之先前報導極其一致(參見下文之參考文獻 18、24)。該等發現表明，先前針對 Fab 與 NLP 表面之結合所觀察之穩定效應(如**實例 5**中所闡述)並不轉化為具有較小尺寸的分子(Fab 為約 45 kDa 且 CKP 為約 3 kDa)。不受限於理論，Fab 可形成防止與血清蛋白相互作用之物理障壁，該等相互作用可使兩親性奈米顆粒去穩定(Darwish M, Shatz W, Leonard B, Loyet K, Barrett K, Wong JL, Li H, Abraham R, Lin M, Franke Y, Tam C, Mortara K, Zilberleyb I, Blanchette CD, 「Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics」 Bioconjugate Chemistry, 2020, 31, 8 1995-2007)。先前已報導，需要 7 之 Fab 莫耳載量方觀察到之 Fab 結合之穩定效應，該載量對應於向 NLP 表面添加約 315 kDa MW。與之相比，86 CKP/NLP 之最高 CKP 載量僅構成約 260 kDa 之額外 MW。因此，若由 Fab 結合所致之穩定化增加主要係藉由添加至 NLP 表面上之 MW 驅動，則即使在最高 CKP 載量下亦不能達到穩定該 NLP 所需之 MW 量。此可闡釋針對 CKP 納入未觀察到穩定化效應之原因。或者，穩定化效應不僅源於添加之 MW，且亦源於結合實體之流體動力學大小。即使可在不破壞整體 NLP 結構下於表面上加載較多 CKP，亦可能觀察不到穩定化效應。該等綜合發現表明，CKP 之活體內遞送之循環半衰期及穩定性存在限制且在應用此技術來治療疾病時必須考慮該等限制。

【0406】 實例 10：Fab-CKP-NLP 結合物之組裝、純化及表徵

【0407】 將 CKP 及 Fab 二者納入 NLP 中將允許研發具有一種以上功能活性之奈米顆粒平臺。舉例而言，NLP 可包含展現靶向活性(例如 HER2、CD20 等)之 Fab 及展現治療活性之 CKP。或者，NLP 可包含展現協同治療活性或互補治療活性之 Fab 及 CKP。如下所述來評估將 CKP 及 Fab 二者納入 NLP

中之可能。經研發用於將 CKP 及 Fab 二者納入 NLP 平臺中之策略闡述於圖 13A 中。採用相同之 CKP-NLP 組裝方法，且添加官能化 PEG 脂質以隨後結合至含有功能反應性標籤之 Fab (圖13A)。使用馬來醯亞胺-硫醇生物結合策略使 Fab 結合至 NLP，其中 PEG 脂質頭基具有末端反應性馬來醯亞胺且 Fab 含有 C 端半胱氨酸胺基酸 (參見下文之參考文獻 18)。用於經由硫醇-馬來醯亞胺化學使用經甲基環己烷-1-甲酸馬來醯亞胺基酯 (DOPE-MCC) 頭基官能化之 DOPE 脂質來結合 Fab 的策略闡述於**實例 1** 中。使用 DOPE-MCC 脂質實施初始先導 NLP 組裝且在將 CKP-C16 添加至脂質混合物中時始終觀察到沈澱，而此現象在使用 DSPE-PEG-Mal 時未觀察到。因此，使用 DSPE-PEG-Mal 來進一步最佳化 Fab 與 NLP 平臺之結合。使用 10% mol DSPE-PEG-Mal 脂質組裝 CKP-NLP 以確保在 NLP 表面上具有足夠之馬來醯亞胺配體密度以供 Fab 結合。使用含有 C 端半胱氨酸之人類抗因子 D Fab 作為代用 Fab，此乃因此分子先前已經由硫醇-馬來醯亞胺結合成功地結合至 PEG 聚合物支架 (參見下文之參考文獻 22) 及 NLP (參見下文之參考文獻 18)。在基於生物珠粒之膽酸鹽去除步驟之後即刻使 Fab 結合至馬來醯亞胺官能化 CKP-NLP，且並無 CKP-NLP 純化步驟。使用此方式來最小化結合之前的馬來醯亞胺水解可能。在 Fab:CKP-NLP 莫耳比率為 20 下實施初始先導結合。將 Fab 與 CKP-NLP 一起培育 2-3 小時且較 DSPE-PEG-Mal 以 2 倍莫耳濃度添加 NAC 以淬滅未反應馬來醯亞胺並防止 DOPE-MCC:apoE422k 交聯，如先前所闡述 (參見下文之參考文獻 16)。藉由 SEC 純化 Fab-CKP-NLP 且在 SEC 層析圖中觀察到以下三個主峰：Fab-CKP-NLP 結合物 (rt ~10 min)、Fab 二聚體 (rt ~14 min) 及未結合 Fab (rt ~16 min) (圖 13B)。在結合反應之後存在 Fab 二聚體係由於在結合步驟期間經由二硫化物形成在 C 端硫醇處發生二聚化，如先前所闡述 (參見下文之參考文獻 18)。收集跨越 NLP 峰中心之餾分，匯集並實施 HPLC 及 SEC-MALS 分析。經純化及還原之 Fab-

CKP-NLP 樣本的實例性 HPLC 層析圖展示於圖 13C 中。在 1.75、2.05、2.8、3.1、3.4 及 3.95 min 之滯留時間下觀察到峰且分別對應於 Fab 輕鏈、DSPE-PEG-Mal、apoE422k、CKP-C16、Fab 重鏈-DSPE-PEG-Mal 結合物及 DOPC。生成每一組分之標準曲線並使用其來量化 CKP-C16 納入及 Fab 結合。圖 13C 中所展示之實例性 HPLC 層析圖對應於 18 CKP/NLP 及 23 Fab/NLP。如針對 CKP-NLP 所闡述，亦藉由 SEC-MALS 量測粒度 (圖 13D-13E)。Fab-CKP-NLP 峰之 MW 可變性 (220 kDa 至 1500 kDa，其中平均 MW 為 700 kDa) 顯著寬於 CKP-NLP (200 kDa 至 400 kDa，其中整個峰中之平均 MW 為 266 kDa) (圖 13D)。亦觀察到整個 Fab-CKP-NLP 峰中之 R_h 具有類似可變性趨勢。不受限於理論，Fab-CKP-NLP 之 MW 及 R_h 之可變性增加可能係因為所結合 Fab 數/NLP 的分佈。基於此 Fab-CKP-NLP 樣本之 HPLC 分析，每 NLP 平均具有 20 個 Fab；然而，Fab/NLP 之分佈係高斯分佈且預計可看到 Fab 介於 0 (MW ~300 kDa) 至 30 (MW ~1500 kDa) 的 CKP-NLP。整個 Fab-CKP-NLP 峰中之 R_h 可變性 (圖 13E) 類似於 CKP-NLP (約 2 倍) (圖 10E)。先前已報導，使 Fab 及蛋白質結合至 NLP 對 R_h 之影響顯著小於 MW，此乃因盤形 NLP 之大小主要取決於直徑而非雙層高度，雙層高度最受蛋白質與 NLP 表面之結合影響 (參見下文之參考文獻 18)。該等發現與此假設一致。

【0408】 實例 11：CKP 及 Fab 載量對最大 Fab 結合、Fab-CKP-NLP 大小、CKP 活性及 Fab-CKP-NLP 穩定性之效應

【0409】 如下所述來檢驗 CKP 加載密度及 Fab 加載密度對 Fab-CKP-NLP 大小、活性及血清穩定性之影響。使用 10 mol% DOPE-PEG-Mal 在兩個 CKP 加載密度：12.7 CKP/NLP (稱為「低 CKP-NLP」) 及 40 CKP/NLP (稱為「高 CKP-NLP」) 下組裝 CKP-NLP 且以不同 Fab:CKP-NLP 比率結合至 Fab。圖 14A 展示以介於 0 至 150 之間之 Fab:CKP-NLP 比率結合物 Fab 之低 CKP-NLP 的

SEC 層析圖。最高 Fab:NLP 比率 150 對應於約 1 Fab: 1 DSPE-PEG-Mal。隨著 Fab 濃度增加，CKP-NLP 峰逐漸增加直至在約150 下達到飽和值。隨著 Fab 結合比率之增加，觀察到 Fab 二聚體及未結合 Fab峰之逐漸增加。此結果可重複於高 CKP-NLP 中且如**實例 6**中所闡述來量化 Fab 結合量 (圖 14B)。對於兩種 CKP 組成物而言，在反應中之 Fab:NLP 比率自 0 增加至 100 時，觀察到結合 Fab 載量 (實際上附接至 NLP 之量) 發生線性增加。然而，在較高比率下觀察到極小 Fab 載量增加且結合至 NLP 表面之飽和 Fab 量經測定為約 50 Fab/NLP (圖 14B)。與之相比，先前已報導，在經由 DOPE-MCC 脂質在 10 mol% DOPE-MCC-脂質組成物下直接結合至 NLP 表面時，最大 Fab 承載能力為 30。此最大承載能力經證實取決於可用 NLP 表面積，且在 NLP 表面積與由 30 個 Fab 佔據之總表面積之間存在強烈相關性。CKP-NLP 之表面積類似於 Darwish M, Shatz W, Leonard B, Loyet K, Barrett K, Wong JL, Li H, Abraham R, Lin M, Franke Y, Tam C, Mortara K, Zilberleyb I, Blanchette CD, 「Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics」 Bioconjugate Chemistry, 2020, 31, 8 1995-2007 中所闡述者，且由此 Fab 載量增加可能不歸因於表面積增加。觀察到在不存在 CKP 下 Fab 結合能力之類似增加，從而表明此效應並非因為在 NLP 表面上存在 CKP。在此研究中，Fab 並不直接結合至表面，而係結合至自 NLP 表面延伸之 PEG2000 連接體。因此，似乎可能的是，間隔區增加整體結合物積且限制立體阻礙，從而與直接結合至 NLP 表面相比容許較高數量之 Fab 結合至 NLP。CKP 密度對 Fab 載量並無顯著影響 (圖 14B)。因此，考慮到在較高 CKP 載量下可能具有較大立體阻礙，此結果較為意外。不受限於理論，PEG 連接體可消除來自 CKP 之任何立體影響，此乃因其在 NLP 表面與用於 Fab 加載之結合手柄之間產生間隔區。

【0410】 為進一步評估 Fab 載量對 NLP 大小之影響，藉由 SEC-MALS 在不同 Fab 載量下量測高 CKP NLP 及低 CKP NLP 的 R_h (圖 14C)。在 Fab 載量自 0 Fab/NLP 增加至 10 Fab/NLP 時觀察到 R_h 增加且隨著 Fab 載量自 10 Fab/NLP 增加至 50 Fab/NLP 僅觀察到極小增加。該等結果與先前發現一致 (參見下文之參考文獻 9、11、18) 且表明，Fab 結合併不改變 NLP 之盤形性質且 NLP 直徑及表面積(而非 Fab 載量)係 R_h 之驅動因素。

【0411】 Fab 與 NLP 表面之結合可產生分析物與 CKP 之相互作用的潛在物理障壁。因此，為評估 Fab 載量對 CKP 活性之影響，評估具有不同 Fab 密度之低 CKP-NLP 及高 CKP-NLP 中的 CKP 活性 (圖 14D)。Fab 密度並不影響高 CKP-NLP 調配物及低 CKP-NLP 調配物中之 CKP 活性，且樣本之間之受質抑制常數 (K_i^{app}) 的差異在分析誤差內 (0.3 – 0.05 nM)。與之相比且如**實例 8**中所論述，在不存在 Fab 結合下觀察到 CKP 活性降低。觀察於 Fab-CKP-NLP 中之該等意外結果可高度重現。該等結果指示，Fab 載量可可靠地控制於 1-50 Fab/CKP-NLP，Fab 加載程度並不依賴於 CKP 密度，且 Fab 結合似乎並不影響 CKP 活性，不論 Fab 密度如何。不受限於理論，Fab 可能非特異性地結合至胰蛋白酶，從而增加 NLP 表面處之有效胰蛋白酶濃度。亦似乎可能的是，若 CKP-C16 相分離成斑塊而導致在不存在 Fab 結合下活性降低，則在 Fab 結合之後此效應得以減輕以恢復活性。

【0412】 如**實例 5** 中所闡述，Fab 結合可對 NLP 穩定性具有顯著影響，此可能因為提供了抵抗血清蛋白之立體障壁。為測定該等發現是否可擴展至 CKP-NLP 平臺，在 50% 血清中對 Fab-CKP-NLP (50 Fab/NLP 及 20 CKP/NLP) 與 CKP-NLP (20 CKP/NLP) 之穩定性進行比較 (圖 14E)。如已針對「空」NLP (亦即尚未加載 CKP 及/或 Fab 之 NLP) 所觀察，Fab 結合對 CKP-NLP 穩定性具有顯著影響。CKP-NLP 可快速降解且在前 4 h 內超過 50% 之顆粒已降解。與

之相比，Fab-CKP-NLP 令人意外地穩定且超過 75% 之材料在 24 h 內保持完整。不受限於理論，該等發現表明，即使在 Fab 經由 PEG 間隔區且在其他分子肽實體存在下附接於 NLP 表面上時，Fab 層之穩定效應亦得以維持。

【0413】 實例 7-11 之結論

【0414】 實例 7-11 闡述 CKP-NLP 及 Fab-CKP-NLP 結合物之研發及表徵。對於 CKP 納入而言，研發自組裝策略，其中向 CKP 附加 C16 烴尾，從而使得能夠在組裝過程期間分配至雙層核心中且將 CKP 顯示於 NLP 表面上。NLP 能夠容納最多約 60 個 CKP-C16 分子而不影響 NLP 組裝過程。CKP-C16 納入至 NLP 輕微降低 CKP 胰蛋白酶抑制活性，但分子仍然高效 (亞奈米莫耳結合劑)。發現 CKP-NLP 穩定性與單獨 NLP 相當且在 37°C 下於 50% 血清中具有相對較短之半衰期 (約 1 h)。藉由引入硫醇反應性馬來醯亞胺脂質來使 Fab 結合至 NLP 平臺，其中馬來醯亞胺基團附接至 PEG 間隔區。使用此結合策略，Fab 載量可可靠地控制於 1-50 Fab/CKP-NLP 且 Fab 加載程度並不依賴於 CKP 密度。Fab 結合亦不影響 CKP 活性，不論 Fab 密度如何。最後，Fab 結合對於改良 CKP-NLP 穩定性具有顯著影響且超過 75% 之 Fab-CKP-NLP 在 37°C 下培育 24 h 之後保持完整。該等綜合發現表明，NLP 係用於潛在遞送肽樣候選藥物之有前景平臺。此外，可經由使靶向或治療性 Fab 結合至 CKP-NLP 來達成靶向或多藥物遞送。

【0415】 實例 6-11 之參考文獻

(1) Ackerman, S. E., Currier, N. V., Bergen, J. M. 及 Cochran, J. R.

(2014) Cystine-knot peptides: emerging tools for cancer imaging and therapy.

Expert Rev Proteomics 11, 561-72。

- (2) Gao, X., Stanger, K., Kaluarachchi, H., Maurer, T., Ciepla, P., Chalouni, C., Franke, Y. 及 Hannoush, R. N. (2016) Cellular uptake of a cystine-knot peptide and modulation of its intracellular trafficking.*Sci Rep* 6, 35179 °
- (3) Reinwarth, M., Nasu, D., Kolmar, H. 及 Avrutina, O. (2012) Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design.*Molecules* 17, 12533-52 °
- (4) Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S. 及 Refaat, T. (2015) Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature.*J Cancer Res Clin Oncol* 141, 769-84 °
- (5) Fischer, N. O., Blanchette, C. D., Segelke, B. W., Corzett, M., Chromy, B. A., Kuhn, E. A., Bench, G. 及 Hoeprich, P. D. (2010) Isolation, characterization, and stability of discretely-sized nanolipoprotein particles assembled with apolipoprotein III.*PLoS One* 5, e11643.
- (6) Blanchette, C. D., Law, R., Benner, W. H., Pesavento, J. B., Cappuccio, J. A., Walsworth, V., Kuhn, E. A., Corzett, M., Chromy, B. A., Segelke, B. W., Coleman, M. A., Bench, G., Hoeprich, P. D. 及 Sulchek, T. A. (2008) Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations.*J Lipid Res* 49, 1420-30.
- (7) Martinez, D., Decossas, M., Kowal, J., Frey, L., Stahlberg, H., Dufourc, E. J., Riek, R., Habenstein, B., Bibow, S. 及 Loquet, A. (2017) Lipid Internal Dynamics Probed in Nanodiscs.*Chemphyschem* 18, 2651-2657 °

- (8) Mors, K., Roos, C., Scholz, F., Wachtveitl, J., Dotsch, V., Bernhard, F. 及 Glaubitz, C. (2013) Modified lipid and protein dynamics in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1222-9。
- (9) Fischer, N. O., Weilhammer, D. R., Dunkle, A., Thomas, C., Hwang, M., Corzett, M., Lychak, C., Mayer, W., Urbin, S., Collette, N., Chiun Chang, J., Loots, G. G., Rasley, A. 及 Blanchette, C. D. (2014) Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One* 9, e93342.
- (10) Fischer, N. O., Rasley, A., Corzett, M., Hwang, M. H., Hoeprich, P. D. 及 Blanchette, C. D. (2013) Colocalized delivery of adjuvant and antigen using nanolipoprotein particles enhances the immune response to recombinant antigens. *J Am Chem Soc* 135, 2044-7.
- (11) Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Corzett, M., Bench, G. 及 Hoeprich, P. D. (2010) Kinetic analysis of his-tagged protein binding to nickel-chelating nanolipoprotein particles. *Bioconjug Chem* 21, 1321-30.
- (12) He, W., Felderman, M., Evans, A. C., Geng, J., Homan, D., Bourguet, F., Fischer, N. O., Li, Y., Lam, K. S., Noy, A., Xing, L., Cheng, R. H., Rasley, A., Blanchette, C. D., Kamrud, K., Wang, N., Gouvis, H., Peterson, T. C., Hubby, B. 及 Coleman, M. A. (2017) Cell-free production of a functional oligomeric form of a Chlamydia major outer-membrane protein (MOMP) for vaccine development. *J Biol Chem* 292, 15121-15132.
- (13) Tufte land, M., Pesavento, J. B., Bermingham, R. L., Hoeprich, P. D., Jr. 及 Ryan, R. O. (2007) Peptide stabilized amphotericin B nanodisks. *Peptides* 28, 741-6.

- (14) Jia, J., Xiao, Y., Liu, J., Zhang, W., He, H., Chen, L. 及 Zhang, M. (2012) Preparation, characterizations, and in vitro metabolic processes of paclitaxel-loaded discoidal recombinant high-density lipoproteins. *J Pharm Sci* 101, 2900-8.
- (15) Weilhammer, D., Dunkle, A. D., Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Corzett, M., Lehmann, D., Boone, T., Hoeprich, P., Driks, A. 及 Rasley, A. (2017) Enhancement of antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses using a self-assembled biologic nanolipoprotein particle vaccine. *Vaccine* 35, 1475-1481.
- (16) Kuai, R., Sun, X., Yuan, W., Xu, Y., Schwendeman, A. 及 Moon, J. J. (2018) Subcutaneous Nanodisc Vaccination with Neoantigens for Combination Cancer Immunotherapy. *Bioconjug Chem* 29, 771-775.
- (17) Weilhammer, D. R., Blanchette, C. D., Fischer, N. O., Alam, S., Loots, G. G., Corzett, M., Thomas, C., Lychak, C., Dunkle, A. D., Ruitenberg, J. J., Ghanekar, S. A., Sant, A. J. 及 Rasley, A. (2013) The use of nanolipoprotein particles to enhance the immunostimulatory properties of innate immune agonists against lethal influenza challenge. *Biomaterials* 34, 10305-18.
- (18) Darwish, M., Shatz, W., Leonard, B., Loyet, K., Barrett, K., Wong, J. L., Li, H., Abraham, R., Lin, M., Franke, Y., Tam, C., Mortara, K., Zilberleyb, I. 及 Blanchette, C. (2020) Nanolipoprotein Particles as a Delivery Platform for Fab Based Therapeutics. *Bioconjug Chem* 31, 1995-2007.
- (19) Fischer, N. O., Blanchette, C. D., Chromy, B. A., Kuhn, E. A., Segelke, B. W., Corzett, M., Bench, G., Mason, P. W. 及 Hoeprich, P. D. (2009)

Immobilization of His-tagged proteins on nickel-chelating nanolipoprotein particles.*Bioconjug Chem* 20, 460-5.

(20) Zhang, Y. N., Appleton, B. A., Wiesmann, C., Lau, T., Costa, M., Hannoush, R. N. 及 Sidhu, S. S. (2009) Inhibition of Wnt signaling by Dishevelled PDZ peptides.*Nat Chem Biol* 5, 217-219 .

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

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

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

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

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

(26) Lichtenberg, D., Ahyayauch, H. 及 Goni, F. M. (2013) The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophys J* 105, 289-99 °

(27) Shuai, W., Das, R. K., Naghdi, M., Brar, S. K. 及 Verma, M. (2017) A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnol Appl Biochem* 64, 496-508 °

(28) Bagheri, M., Beyermann, M. 及 Dathe, M. (2009) Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1132-41 °

【序列表】

<110> 美商建南德克公司(Genentech, Inc.)

<120> 奈米脂蛋白-多肽結合物及組成物、系統及其使用方法

<130> 14639-20528.40

<140> 尙未指派

<141> 同上

<150> US 63/151,591

<151> 2021-02-19

<150> US 63/038,075

<151> 2020-06-11

<160> 1

<170> 用於 Windows 4.0 版之 FastSEQ

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> 噴瓜

<400> 1

Gly	Cys	Pro	Arg	Ile	Leu	Met	Arg	Cys	Lys	Gln	Asp	Ser	Asp	Cys	Leu
1				5				10					15		
Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys	Gly				
			20				25								

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合物，該結合物包含：

支架蛋白質、成膜脂質及抗原結合多肽，

其中該等成膜脂質排列成脂雙層且該支架蛋白質環繞該雙層；且

其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該抗原結合多肽結合至該雙層之一個或兩個表面上之該等成膜脂質中之一者或多者；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽。

【請求項2】

如請求項 1 之結合物，其中該官能化基團選自由以下所組成之群組：馬來醯亞胺衍生物、鹵基乙醯胺、吡啶二硫代-丙酸酯、硫代硫酸酯及其中之任一者或多者的組合；且該互補官能基係游離硫醇基。

【請求項3】

如請求項 2 之結合物，其中該硫醇基為半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基酸殘基在衍生該抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵（例如 Cys-226 或 Cys-227）。

【請求項4】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該官能化基團不結合至該支架蛋白質。

【請求項5】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該支架蛋白質選自由以下所組成之群組：(a) 脂蛋白元 A；(b) 脂蛋白元 B；(c) 脂蛋白元 C；(d) 脂蛋白

元 D；(e) 脂蛋白元 H；(f) 脂蛋白元 E；(g) 能夠穩定該雙層之 (a) 至 (f) 的截短形式；及 (h) (a) 至 (g) 中之任一者或多者的組合。

【請求項6】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該等成膜脂質選自由以下所組成之群組：C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 及其中之任一者或多者的組合。

【請求項7】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項8】

一種結合物，該結合物包含：

支架蛋白質、成膜脂質及具有 20 至 60 個胺基酸之短肽，

其中該等成膜脂質排列成脂雙層且該支架蛋白質環繞該雙層；且

其中該短肽結合至該雙層之一個或兩個表面上之該等成膜脂質中之一者或多者。

【請求項9】

如請求項 8 之結合物，其中該等成膜脂質選自由以下所組成之群組：C₄₋₂₈ 脂肪醯基 (例如 C₁₆ 脂肪醯基)、DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 及其中之任一者或多者的組合。

【請求項10】

如請求項 8 或 9 之結合物，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之該短肽。

【請求項11】

如請求項 7 或 10 之結合物，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項12】

如請求項 7 至 11 中任一項之結合物，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項13】

如請求項 12 之結合物，其中該 CKP 為 EETI-II、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 (cycloviolacin) O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項14】

如請求項 7 至 11 中任一項之結合物，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項15】

如請求項 14 之結合物，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項16】

如請求項 14 或 15 之結合物，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項17】

如請求項 7 至 16 中任一項之結合物，其中該短肽在該結合物中之活性高於該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中的活性。

【請求項18】

如請求項 17 之結合物，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。

【請求項19】

如請求項 15 之結合物，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【請求項20】

如請求項 12 至 16 中任一項之結合物，其中該短肽為具有生物活性之 CKP 或 CKP 變異體，其中 80% 至 90%、90% 至 95%、或 95% 至 99% 之該活性保留於該結合物中。

【請求項21】

如請求項 7 至 20 中任一項之結合物，其中該結合物增加該短肽之活性或親合性。

【請求項22】

如請求項 7 至 21 中任一項之結合物，該結合物進一步包含結合至該雙層之一個或兩個表面上之該等成膜脂質中之一者或多者的抗原結合多肽，該結合係經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基來達成；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽。

【請求項23】

如請求項 7 至 22 中任一項之結合物，其中該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【請求項24】

如請求項 7 至 23 中任一項之結合物，該結合物包含至少兩種不同的肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。

【請求項25】

如請求項 24 之結合物，其中該至少兩種肽 (例如胺酸結肽) 結合不同的靶，視情況結合兩種、三種、四種或八種不同的靶。

【請求項26】

如請求項 25 之結合物，其中該兩種或更多種短肽結合兩種不同的靶。

【請求項27】

如請求項 26 之結合物，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項28】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該支架蛋白質及該等成膜脂質之莫耳比率為 1:60 至 1:100，諸如 1:80；且/或

其中 20% 至 35%、諸如 20% 之該等成膜脂質攜載官能化基團。

【請求項29】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該抗原結合多肽選自由以下所組成之群組：Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、單鏈 Fab (scFab)、單鏈 Fv (scFv)、VH-VH 二聚體、VL-VL 二聚體、VH-VL 二聚體、單域、雙價抗體、線性抗體及其中之任一者或多者的組合，特定而言其中該抗原結合多肽係 Fab；

視情況其中該 Fab 結合選自由以下所組成之群組的靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體及其中之任一者或多者的組合。

【請求項30】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該結合物包含該抗原結合多肽之兩個或更多個分子，視情況包含該抗原結合多肽之 2 至 60 個、2 至 32 個、10 至 30 個、或 20 個分子。

【請求項31】

如請求項 30 之結合物，其中該結合物具有該抗原結合多肽之 1 至 160 個、10 至 120 個、20 至 100 個、40 至 80 個、或 60 個分子；

其中該抗原結合多肽為 Fab 且該 Fab 藉由 PEG 間隔區連接至該成膜脂質。

【請求項32】

如請求項 31 之結合物，其中該 PEG 間隔區連接該官能化基團與該成

膜脂質且具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項33】

如請求項 30 至 32 中任一項之結合物，其中該結合物增加了該抗原結合多肽之活性或親合性。

【請求項34】

如請求項 32 之結合物，其中該活性為 OX40 結合且該結合物具有該抗原結合多肽，諸如 Fab 之 4 至 8 個分子。

【請求項35】

如請求項 30 至 34 中任一項之結合物，其中該抗原結合多肽增加了該結合物之血清穩定性及/或血清半衰期；

視情況其中該血清半衰期增加 2 至 20 倍、5 至 15 倍或 10 倍。

【請求項36】

如請求項 35 之結合物，其中該結合物具有該抗原結合多肽之 5 至 60 個、6 至 40 個或 7 至 32 個分子。

【請求項37】

如請求項 30 至 36 中任一項之結合物，其中該兩種或更多種抗原結合多肽結合不同的靶或表位，視情況結合兩種、三種、四種或八種不同的靶或表位。

【請求項38】

如請求項 37 之結合物，其中該兩種或更多種抗原結合多肽結合兩種不同的靶或表位。

【請求項39】

如請求項 37 之結合物，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：

CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項40】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該抗原結合多肽為 Fab 或 Fab 樣分子，視情況為人類或人源化 Fab。

【請求項41】

如前述請求項中任一項之結合物，其中該間隔區包含 PEG 或 GSGS 之胺基酸序列。

【請求項42】

一種醫藥組成物，該醫藥組成物包含如前述請求項中任一項之結合物及醫藥上可接受之載體。

【請求項43】

如請求項 42 之醫藥組成物，其中該組成物為具有 10 cP 至 50 cP 之黏度及 100 mg 至 300 mg 該結合物/mL 之濃度的液體組成物。

【請求項44】

如請求項 1 至 41 中任一項之結合物或如請求項 42 或 43 之醫藥組成物，其中該結合物或組成物經皮下或經由眼部遞送來投予。

【請求項45】

如請求項 44 之結合物或醫藥組成物，其中將該結合物或組成物諸如在海藻糖存在下凍乾；且視情況重構。

【請求項46】

如請求項 45 之結合物或醫藥組成物，其中該結合物包含每結合物 18 至 20 個 Fab 分子；且/或

其中凍乾在 80 mM 海藻糖存在下發生；且/或

其中凍乾在 5 mg 結合物/mL 之濃度下發生。

【請求項47】

如請求項 45 或 46 之結合物或醫藥組成物，其中該抗原結合多肽之 80% 至 90%、90% 至 95% 或 95% 至 99% 之抗原結合活性在凍乾及重構後得以保留。

【請求項48】

一種液體調配物，該液體調配物包含 100 mg 至 300 mg 之如請求項 1 至 41 中任一項之結合物且具有 10 cP 至 50 cP 之黏度，視情況其中該調配物經皮下或經由眼部遞送來投予。

【請求項49】

一種製備奈米脂蛋白顆粒及抗原結合多肽之結合物的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之（自-）組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；

b) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及

c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物。

【請求項50】

如請求項 49 之方法，其中該步驟 b) 緊跟該步驟 a) 並且沒有用以去除一些或所有未組裝之成膜脂質的中間步驟。

【請求項51】

如請求項 49 或 50 之方法，其中該官能化基團為馬來醯亞胺衍生物且其中該官能基為半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基酸殘基在衍生該抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵（諸如 Cys-226 或 Cys-227）。

【請求項52】

如請求項 49 至 51 中任一項之方法，其中該官能化基團在該低 pH 下不結合至該支架蛋白質。

【請求項53】

如請求項 52 之方法，其中該低 pH 為 pH 5.5 至 6.5、pH 5 至 6 或 pH 6。

【請求項54】

如請求項 49 至 53 中任一項之方法，其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽。

【請求項55】

如請求項 54 之方法，其中該間隔區為連接該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。

【請求項56】

如請求項 55 之方法，其中該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項57】

如請求項 49 至 56 中任一項之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項58】

如請求項 57 之方法，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項59】

如請求項 57 或 58 之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項60】

如請求項 59 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項61】

如請求項 57 或 58 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項62】

如請求項 61 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項63】

如請求項 61 或 62 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項64】

如請求項 57 至 63 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項65】

如請求項 57 至 64 中任一項之方法，其中該短肽在該結合物中之活性高於該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中的活性。

【請求項66】

如請求項 65 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。

【請求項67】

如請求項 66 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【請求項68】

如請求項 57 至 64 中任一項之方法，其中該短肽為具有生物活性之 CKP 或 CKP 變異體，其中 80% 至 90%、90% 至 95%、或 95% 至 99% 之該活性保留於該結合物中。

【請求項69】

如請求項 57 至 68 中任一項之方法，其中該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35

個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【請求項70】

如請求項 69 之方法，其中該 Fab 及該短肽結合兩種不同的靶。

【請求項71】

如請求項 57 至 70 中任一項之方法，其包含至少兩種不同的肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。

【請求項72】

如請求項 71 之方法，其中該至少兩種肽 (例如胺基酸結肽) 結合不同的靶，視情況結合兩種、三種、四種或八種不同的靶。

【請求項73】

如請求項 72 之方法，其中該兩種或更多種短肽結合兩種不同的靶。

【請求項74】

如請求項 70 或 73 之方法，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項75】

一種製備奈米脂蛋白顆粒及具有 20 至 60 個胺基酸之短肽 (例如胺基酸結肽) 之結合物的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之(自-)組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層；

其中該等成膜脂質中之一者或多者包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基(例如 C₁₆ 脂肪醯基)且脂肪醯基結合至該短肽；及

視情況純化該肽結合物。

【請求項76】

如請求項 75 之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項77】

如請求項 76 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項78】

如請求項 77 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項79】

如請求項 78 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項80】

如請求項 78 或 79 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項81】

如請求項 75 至 80 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項82】

如請求項 75 至 81 中任一項之方法，該方法包含至少兩種不同的肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。

【請求項83】

如請求項 82 之方法，其中該至少兩種肽 (例如胺基酸結肽) 結合不同的靶，視情況結合兩種、三種、四種或八種不同的靶。

【請求項84】

如請求項 82 之方法，其中該兩種或更多種短肽結合兩種不同的靶。

【請求項85】

如請求項 84 之方法，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項86】

如請求項 75 至 85 中任一項之方法，其中該短肽為具有生物活性之 CKP 或CKP 變異體，其中 80% 至 90%、90% 至 95%、或 95% 至 99% 之該活性保留於該結合物中。

【請求項87】

如請求項 75 至 86 中任一項之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；且該方法進一步包含以下步驟：

b) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽 (例如 Fab)，該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；

其中該步驟 b) 緊跟該步驟 a) 並且沒有用以去除一些或所有未組裝之成膜脂質的中間步驟；且/或沒有用以富集步驟 a) 之該肽結合物的中間步驟。

【請求項88】

如請求項 87 之方法，其中該官能化基團為馬來醯亞胺衍生物且其中該官能基為半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基酸殘基在衍生該抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵 (諸如 Cys-226 或 Cys-227)。

【請求項89】

如請求項 87 或 88 之方法，其中該官能化基團在該低 pH 下不結合至該支架蛋白質。

【請求項90】

如請求項 89 之方法，其中該低 pH 為 pH 5.5 至 6.5、pH 5 至 6 或 pH 6。

【請求項91】

如請求項 87 至 90 中任一項之方法，其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽。

【請求項92】

如請求項 91 之方法，其中該間隔區為連接該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。

【請求項93】

如請求項 92 之方法，其中該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項94】

如請求項 87 至 93 中任一項之方法，其中該結合物增加了該短肽之活性或親合性。

【請求項95】

如請求項 87 至 94 中任一項之方法，其中該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【請求項96】

如請求項 95 之方法，其中該 Fab 及該短肽結合兩種不同的靶。

【請求項97】

如請求項 96 之方法，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：
CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16
及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項98】

如請求項 87 至 97 中任一項之方法，其中該短肽在該結合物中之活性高於該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中的活性。

【請求項99】

如請求項 98 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。

【請求項100】

如請求項 99 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【請求項101】

一種結合物，該結合物藉由如請求項 49 至 100 中任一項之方法產生。

【請求項102】

一種增加抗原結合多肽之親合性、活性及/或效力的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之（自-）組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；

b) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的

互補官能基；及

- c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物，
由此增加該抗原結合多肽之親合性、活性及/或效力。

【請求項103】

如請求項 102 之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab 或 Fab 樣分子且/
或其中該結合物包含該抗原結合多肽之 10 至 60 個、15 至 30 個、或 20
個分子。

【請求項104】

如請求項 103 之方法，其中該抗原結合多肽為藉由 PEG 間隔區連接
至該成膜脂質之 Fab 或 Fab 樣分子；且

其中該結合物包含該抗原結合多肽之 1 至 160 個、10 至 120 個、20
至 100 個、40 至 80 個、或 60 個分子。

【請求項105】

如請求項 104 之方法，其中該 PEG 間隔區連接該官能化基團與該成
膜脂質且具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之
MW。

【請求項106】

如請求項 102 至 105 中任一項之方法，其中該結合物經穩定化，
視情況其中該結合物包含該抗原結合多肽之 7 至 60 個、7 至 32 個、
40 至 60 個、或 50 個分子。

【請求項107】

如請求項 102 至 106 中任一項之方法，其中該結合物進一步包含結
合不同的靶之第二抗原結合多肽的一個或多個分子。

【請求項108】

如請求項 102 至 107 中任一項之方法，其中該結合物以液體調配物形式來提供，該調配物包含 100 mg 至 300 mg 之該結合物且具有 10 cP 至 50 cP 之黏度。

【請求項109】

如請求項 102 至 108 中任一項之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽，且其中該方法增加了該短肽之親合性、活性及/或效力。

【請求項110】

如請求項 109 之方法，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項111】

如請求項 109 或 110 之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項112】

如請求項 111 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II I、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項113】

如請求項 109 或 110 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及

/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項114】

如請求項 113 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項115】

如請求項 113 或 114 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項116】

如請求項 109 至 115 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項117】

如請求項 109 至 116 中任一項之方法，其包含至少兩種不同的肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物，其中第一肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物包含第一短肽，且其中第二肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基包含不同於該第一短肽之第二短肽。

【請求項118】

如請求項 117 之方法，其中該至少兩種肽 (例如胺胺酸結肽) 結合不同的靶，視情況結合兩種、三種、四種或八種不同的靶。

【請求項119】

如請求項 118 之方法，其中該兩種或更多種短肽結合兩種不同的靶。

【請求項120】

如請求項 119 之方法，其中該等靶為選自由以下所組成之群組的對：
CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16
及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項121】

如請求項 109 至 120 中任一項之方法，其中該結合物包含該 Fab 之
1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20
個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35
個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15
個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60
個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60
個分子。

【請求項122】

如請求項 110 至 121 中任一項之方法，其中該短肽在該結合物中之
活性高於該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中的活性。

【請求項123】

如請求項 122 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含
該抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。

【請求項124】

如請求項 123 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含
該抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【請求項125】

一種增加抗原結合多肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之（自-）組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；

b) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及

c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物，

由此增加該抗原結合多肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期。

【請求項126】

一種增加奈米脂蛋白顆粒之穩定性、儲存期限及/或半衰期的方法，該方法包含

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之（自-）組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；

b) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；及

c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物，

由此增加該奈米脂蛋白顆粒之穩定性、儲存期限及/或半衰期。

【請求項127】

如請求項 125 或 126 之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項128】

如請求項 127 之方法，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項129】

一種增加長度為 20 至 60 個胺基酸之短肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之（自-）組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層；

其中該等成膜脂質中之一者或多者包含 C₄₋₂₈ 脂肪醯基（例如 C₁₆ 脂肪醯基）且脂肪醯基結合至該短肽；及

視情況純化該肽結合物；

b) 修飾該等成膜脂質中之一者或多者以在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；及

c) 在 pH 4.5 至 6.5 範圍內之低 pH 下使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有結合至該官能化基團之位於 C 端的互補官能基；

其中該步驟 c) 緊跟該步驟 b) 並且沒有用以去除一些或所有未組裝之成膜脂質的中間步驟；且/或沒有用以富集步驟 b) 之該肽結合物的中間步驟

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽，

由此增加該短肽之穩定性、儲存期限及/或半衰期。

【請求項130】

如請求項 127 至 129 中任一項之方法，其中該脂肪鹽基為 C₁₆ 脂肪鹽基。

【請求項131】

如請求項 127 至 130 中任一項之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項132】

如請求項 131 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II I、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項133】

如請求項 127 至 130 中任一項之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項134】

如請求項 133 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其

N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項135】

如請求項 133 或 134 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項136】

如請求項 127 至 135 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項137】

如請求項 125 至 136 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab 或 Fab 樣分子且/或其中該結合物包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab) 之 5 至 60 個、6 至 40 個、7 至 32 個、40 至 60 個、或 50 個分子。

【請求項138】

如請求項 127 至 136 中任一項之結合物，其中該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【請求項139】

如請求項 125 至 138 中任一項之方法，其中該結合物進一步包含生物活性劑或可偵測製劑，

視情況其中該生物活性劑為選自由以下所組成之群組的細胞毒性劑：道諾黴素(daunomycin)、阿黴素(doxorubicin)、胺甲喋呤(methotrexate)、長春地辛(vindesine)、放射性核種、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格爾德黴素(geldanamycin)、美登木素生物鹼、卡奇黴素(calicheamicin)及其中之任一者或多者的組合；且/或

視情況其中該可偵測製劑為選自由以下所組成之群組的至少一種標記：放射性同位素、螢光團、化學發光染料、發色團、酶、金屬離子、奈米顆粒及其中之任一者或多者的組合。

【請求項140】

如請求項 125 至 139 中任一項之方法，其中該結合物以液體調配物形式來提供，該調配物包含 100 mg 至 300 mg 之該結合物且具有 10 cP 至 50 cP 之黏度。

【請求項141】

如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物，其用為藥劑。

【請求項142】

如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物，其用於治療癌症或眼部病症。

【請求項143】

一種如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47

中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物之用途，其用於製造供治療癌症或眼部病症之藥劑。

【請求項144】

一種如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物之用途，其用於製造供抑制血管生成及/或腫瘤生長之藥劑。

【請求項145】

一種使用抗原結合多肽 (例如 Fab) 治療受試者之方法，該方法包含向該受試者投予有效量之如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物；
視情況進一步包含向該受試者投予另外的治療劑。

【請求項146】

一種將抗原結合多肽 (例如 Fab) 遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含

提供如請求項 1 至 41 及 101 中任一項之結合物或如請求項 42 至 47 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 48 之調配物；及

向該受試者投予該結合物、組成物或調配物，

由此將該抗原結合多肽遞送至該受試者體內。

【請求項147】

一種以強效、穩定液體調配物形式將抗原結合多肽 (例如 Fab) 遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含：

向受試者投予包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab) 及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5 至 100 個分子；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽，

由此以穩定的液體調配物之形式將該抗原結合多肽遞送至受試者體內。

【請求項148】

一種以強效、低黏度調配物形式將抗原結合多肽 (例如 Fab) 遞送至有此需要之受試者體內之方法，該方法包含：

向受試者投予包含該抗原結合多肽 (例如該 Fab) 及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質中之一者或多者結合至該抗原結合多肽；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽；且

其中該液體調配物具有 10 cP 至 50 cP 之黏度及 100 mg 至 300 mg 該結合物/mL 之濃度，

由此以低黏度調配物形式將該抗原結合多肽遞送至受試者體內。

【請求項149】

如請求項 147 或 148 之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項150】

一種以強效、穩定液體調配物形式將長度為 20 至 60 個胺基酸之短肽遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含：

向受試者投予包含該抗原結合多肽（例如該 Fab）及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽；

其中經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5 至 100 個分子；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽，

由此以穩定的液體調配物之形式將該抗原結合多肽遞送至受試者體內。

【請求項151】

一種以強效、低黏度調配物形式將長度為 20 至 60 個胺基酸之短肽遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含：

向受試者投予包含該抗原結合多肽（例如該 Fab）及奈米脂蛋白顆粒之結合物的液體調配物；

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪

鹽基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽；

其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質中之一者或多者結合至該抗原結合多肽；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽；且

其中該液體調配物具有 10 cP 至 50 cP 之黏度及 100 mg 至 300 mg 該結合物/mL 之濃度，

由此以低黏度調配物形式將該抗原結合多肽遞送至受試者體內。

【請求項152】

如請求項 149 至 151 中任一項之方法，其中該脂肪鹽基為 C₁₆ 脂肪鹽基。

【請求項153】

如請求項 149 至 152 中任一項之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項154】

如請求項 153 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項155】

如請求項 149 至 152 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個

環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項156】

如請求項 155 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項157】

如請求項 155 或 156 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項158】

如請求項 149 至 157 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項159】

如請求項 149 至 158 中任一項之方法，其中該短肽在該結合物中之活性高於該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中的活性。

【請求項160】

如請求項 159 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的 2 倍至 10 倍。

【請求項161】

如請求項 160 之方法，其中該肽在該結合物中之活性為該肽在不包含該抗原結合多肽之結合物中之活性的約 5 倍。

【請求項162】

如請求項 149 至 161 中任一項之方法，其中該結合物包含該 Fab 之 1 至 100 個分子；

視情況其中該結合物包含該肽之 5 至 30 個、10 至 25 個、15 至 20 個、或 18 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 5 至 40 個、10 至 35 個、15 至 30 個、20 至 25 個、或 23 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 3 至 30 個、5 至 20 個、10 至 15 個、或 13 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子；或

視情況其中該結合物包含該肽之 20 至 80 個、25 至 70 個、30 至 60 個、35 至 50 個、或 40 個分子及該抗原結合多肽 (例如 Fab) 之 10 至 60 個分子。

【請求項163】

如請求項 147 至 162 中任一項之方法，其中該間隔區為連接該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。

【請求項164】

如請求項 163 之方法，其中該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項165】

如請求項 149 至 164 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽 (例如 Fab) 及該短肽各自結合相同的靶。

【請求項166】

如請求項 149 至 164 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽（例如 Fab）及該短肽各自結合不同的靶。

【請求項167】

如請求項 147 至 166 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab，該 Fab 結合選自由因子 D、VEGF、Tie2、DR4 及其中之任一者或多者之組合組成之群組的靶；且該調配物經由眼部遞送來投予。

【請求項168】

如請求項 149 至 167 中任一項之方法，其中該短肽結合選自由以下所組成之群組的靶：因子 D、VEGF、Tie2、DR4 及其中之任一者或多者之組合。

【請求項169】

如請求項 147 至 166 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab，該 Fab 結合選自由以下所組成之群組的靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體及其中之任一者或多者的組合。

【請求項170】

如請求項 150 至 166 及 169 中任一項之方法，其中該短肽結合選自由以下所組成之群組的靶：OX40、DR4、GITR、Tie2、因子 D、VEGF、MerTK、CD3、淋巴毒素 β 受體及其中之任一者或多者的組合。

【請求項171】

如請求項 147 至 166 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽結合至少兩種不同的靶。

【請求項172】

如請求項 171 之方法，其中該兩種不同的靶為選自由以下所組成之群

組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；
CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項173】

如請求項 149 至 164 中任一項之方法，其中該短肽及該抗原結合多肽結合至少兩種不同的靶。

【請求項174】

如請求項 173 之方法，其中該兩種不同的靶為選自由以下所組成之群組的對：CD3 及 CD19；CD3 及 EpCAM；CD3 及 CEA；CD16 及 CD30；CD16 及 CD33；Ang-2 及 VEGF-A；以及因子 X 及因子 IXa。

【請求項175】

一種以穩定液體調配物形式將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含：

向受試者投予包含抗原結合多肽 (例如 Fab)、奈米脂蛋白顆粒及生物活性劑或可偵測製劑之結合物的液體調配物，

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5 至 100 個分子；

其中該生物活性劑或該可偵測製劑結合至該支架蛋白質、該成膜脂質或該抗原結合多肽中之至少一者；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽，

由此以穩定液體調配物形式將該生物活性劑或該可偵測製劑遞送

至有此需要之受試者體內。

【請求項176】

一種以低黏度調配物形式將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有此需要之受試者體內的方法，該方法包含：

向受試者投予包含抗原結合多肽（例如 Fab）、奈米脂蛋白顆粒及生物活性劑或可偵測製劑之結合物的液體調配物，

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質中之一者或多者結合至該抗原結合多肽；

其中該生物活性劑或該可偵測製劑結合至該支架蛋白質、該成膜脂質或該抗原結合多肽中之至少一者；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽；且

其中該液體調配物具有 10 cP 至 50 cP 之黏度及 100 mg 至 300 mg 該結合物/mL 之濃度，

由此以低黏度調配物形式將該生物活性劑或該可偵測製劑遞送至有此需要之受試者體內。

【請求項177】

一種將生物活性劑或可偵測製劑遞送至有此需要之受試者的腦或中樞神經系統的方法，該方法包含：

向受試者全身性投予包含抗原結合多肽（例如 Fab）、奈米脂蛋白顆粒及生物活性劑或可偵測製劑之結合物的液體調配物，

其中該奈米脂蛋白顆粒包含環繞成膜脂質之雙脂質層的支架蛋白質；

其中經由該一種或多種成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質中之一者或多者結合至該抗原結合多肽；

其中該生物活性劑或該可偵測製劑結合至該支架蛋白質、該成膜脂質或該抗原結合多肽中之至少一者；

視情況其中間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且/或間隔區連接該互補官能基與該抗原結合多肽；且

其中該結合物跨越血-腦障壁，

由此將該生物活性劑或該可偵測製劑遞送至有此需要之受試者的腦或中樞神經系統。

【請求項178】

如請求項 175 至 177 中任一項之方法，其中該支架蛋白質為 apoE2 及/或 apoE4。

【請求項179】

如請求項 175 至 178 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab 或 Fab 樣分子。

【請求項180】

如請求項 175 至 179 中任一項之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項181】

如請求項 180 之方法，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項182】

如請求項 180 或 181 之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項183】

如請求項 182 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II I、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項184】

如請求項 180 或 181 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項185】

如請求項 184 之方法，其中相對於野生型 CKP，該 CKP 變異體在其 N 端包含另外的離胺酸殘基。

【請求項186】

如請求項 184 或 185 之方法，其中該野生型 CKP 為 EETI-II。

【請求項187】

如請求項 175 至 186 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項188】

如請求項 175 至 187 中任一項之方法，其中該間隔區為連接該官能化基團與該成膜脂質之 PEG 間隔區。

【請求項189】

如請求項 188 之方法，其中該 PEG 間隔區具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項190】

如請求項 175 至 189 中任一項之方法，其中該生物活性劑為選自由以下所組成之群組的細胞毒性劑：道諾黴素、阿黴素、胺甲喋呤、長春地辛、放射性核種、白喉毒素、蓖麻毒蛋白、格爾德黴素、美登木素生物鹼、卡奇黴素及其中之任一者或多者的組合。

【請求項191】

如請求項 175 至 190 中任一項之方法，其中該診斷劑為選自由以下所組成之群組的標記：放射性同位素、螢光團、化學發光染料、發色團、酶、金屬離子、奈米顆粒及其中之任一者或多者的組合。

【請求項192】

如請求項 175 至 191 中任一項之方法，其中該液體調配物經靜脈內投予。

【請求項193】

如請求項 175 至 192 中任一項之方法，其中經由該成膜脂質上之官能化基團及該抗原結合多肽上位於 C 端之互補官能基，該等成膜脂質結合至該抗原結合多肽之 5 至 100 個分子。

【請求項194】

如請求項 175 至 193 中任一項之方法，其中該抗原結合多肽為 Fab 且該 Fab 經由 PEG 間隔區連接至該成膜脂質，

視情況其中該 PEG 間隔區連接該官能化基團與該成膜脂質且具有 1000 至 3000、1500 至 2500、1900 至 2200、或 2000 之 MW。

【請求項195】

如請求項 175 至 194 中任一項之方法，其中該液體調配物具有 10 cP 至 50 cP 之黏度及 100 mg 至 300 mg 該結合物/mL 之濃度。

【請求項196】

一種用於將抗原結合多肽遞送至靶細胞之系統或套組，該系統或套組包含：

一種或多種組分，其用於製備如請求項 1 至 7、11 至 41 中任一項之結合物或如請求項 42 至 46 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 47 之調配物，其中該等組分提供於該套組或系統之一個或多個隔室中，且

視情況包含關於製備該結合物、組成物或調配物之說明及/或關於遞送該抗原結合多肽之說明。

【請求項197】

一種用於將具有 20 至 60 個胺基酸之短肽（例如胱胺酸結肽）遞送至靶細胞之系統或套組，該系統或套組包含：

一種或多種組分，其用於製備如請求項 8 至 41 中任一項之結合物

或如請求項 42 至 46 中任一項之結合物或醫藥組成物或如請求項 47 之調配物，其中該等組分提供於該套組或系統之一個或多個隔室中，且

視情況包含關於製備該結合物或組成物之說明及/或關於遞送該短肽（例如該胱胺酸結肽）之說明。

【請求項198】

一種減少製備奈米脂蛋白顆粒及抗原結合多肽之結合物之脂質-支架蛋白質結合的方法，該方法包含：

a) 在允許奈米脂蛋白顆粒之組裝的條件下提供支架蛋白質及成膜脂質，該奈米脂蛋白顆粒包含由該支架蛋白質環繞之該等成膜脂質的脂雙層，其中該等成膜脂質中之一者或多者在該顆粒之一個或兩個表面上呈現官能化基團；

b) 在有益於該官能化基團結合至該官能基而非該支架蛋白質之低 pH 下，使該顆粒接觸抗原結合多肽（例如 Fab），該抗原結合多肽具有位於 C 端的互補官能基；及

c) 視情況純化該顆粒及該抗原結合多肽之該結合物。

【請求項199】

如請求項 198 之方法，其中該官能化基團在該低 pH 下不結合至該支架蛋白質。

【請求項200】

如請求項 198 或 199 之方法，其中該低 pH 為 pH 5.5 至 6.5、pH 5 至 6 或 pH 6。

【請求項201】

如請求項 198 至 200 中任一項之方法，其中該步驟 b) 緊跟該步驟 a)

並且沒有用以去除一些或所有未組裝之成膜脂質的中間步驟。

【請求項202】

如請求項 198 至 201 中任一項之方法，其中該官能化基團為馬來醯亞胺衍生物且其中該官能基為半胱胺酸硫醇基，視情況其中該半胱胺酸胺基酸殘基在衍生該抗原結合多肽之抗體中形成鉸鏈雙硫鍵（諸如 Cys-226 或 Cys-227）。

【請求項203】

如請求項 198 至 202 中任一項之方法，其中該等成膜脂質中之一者或多者為 C₄₋₂₈ 脂肪醯基且其中該脂肪醯基結合至具有 20 至 60 個胺基酸之短肽。

【請求項204】

如請求項 203 之方法，其中該脂肪醯基為 C₁₆ 脂肪醯基。

【請求項205】

如請求項 203 或 204 之方法，其中該短肽為胱胺酸結肽 (CKP)。

【請求項206】

如請求項 203 之方法，其中該 CKP 為 EETI-II I、環狀桿菌素 A、環狀抗菌肽 A、環紫菌素 O1、環紫菌素 O12、kalata B1、kalata B8、palicourein、tricyclon A、MCoTI 1、SOTI 1、環狀桿菌素 B、環狀抗菌肽或 varv 肽 A。

【請求項207】

如請求項 203 或 204 之方法，其中該短肽為 CKP 變異體，該 CKP 變異體包含：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項208】

如請求項 203 至 207 中任一項之方法，其中該等成膜脂質以 1:3 至 1:15、或 1:6 至 1:12、或 1:9 之莫耳比率包含肽-C₄₋₂₈ 脂肪醯基結合物及 DMPC、DOPC、DOPS、DOPE、DPPC 中之至少一者或多者 (例如肽-C₁₆ 脂肪醯基結合物及 DOPC)；且/或其中該結合物包含該短肽之 1 至 100 個、10 至 90 個、20 至 80 個、30 至 70 個、40 至 60 個、或 60 個分子。

【請求項209】

一種增加接附至基於脂質之奈米顆粒之表面之短肽之生物活性的方法，該方法包含

(a) 提供包含接附於其表面之短肽的基於脂質之奈米顆粒，其中該基於脂質之奈米顆粒的一種或多種脂質呈現官能化基團，及

(b) 在有益於該官能化基團結合至該官能基的條件下使該奈米顆粒與具有官能基之多肽接觸。

【請求項210】

如請求項 209 之方法，該方法進一步包含純化該包含該基於脂質之奈米顆粒、該短肽及該多肽的結合物。

【請求項211】

如請求項 209 或 210 之方法，其中該基於脂質之奈米顆粒包含脂雙

層。

【請求項212】

如請求項 209 或 210 之方法，其中該基於脂質之奈米顆粒為脂質體、固體脂質奈米顆粒 (SLN) 或奈米結構脂質載劑 (NLC)。

【請求項213】

如請求項 209 至 212 中任一項之方法，其中間隔區連接該官能化基團與該基於脂質之奈米顆粒之表面上的脂質且/或其中間隔區連接該互補官能基與該多肽。

【請求項214】

如請求項 209 至 213 中任一項之方法，其中該多肽為抗原結合多肽。

【請求項215】

如請求項 214 之方法，其中該抗原結合多肽選自由以下所組成之群組：Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、單鏈 Fab (scFab)、單鏈 Fv (scFv)、VH-VH 二聚體、VL-VL 二聚體、VH-VL 二聚體、單域、雙價抗體、線性抗體及其中之任一者或多者的組合。

【請求項216】

如請求項 209 至 215 中任一項之方法，其中該短肽為 CKP 或包含以下之 CKP 變異體：

(a) 相對於野生型 CKP 之相應一個或多個環型序列，在一個或多個環型序列中之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(b) 相對於野生型 CKP，在 N 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(c) 相對於野生型 CKP，在 C 端之一個或多個胺基酸插入、缺失及/或取代；

(d) 相對於野生型 CKP，在 N 端之化學修飾；及/或

(e) 相對於野生型 CKP，在 C 端之化學修飾。

【請求項217】

如請求項 209 至 216 中任一項之方法，其中與該短肽在該多肽結合至該基於脂質之奈米顆粒之前的活性相比，在該多肽結合至該基於脂質之奈米顆粒之後，該短肽在該多肽之結合之後的活性為前者的 2 倍至 100 倍。

(發明圖式)

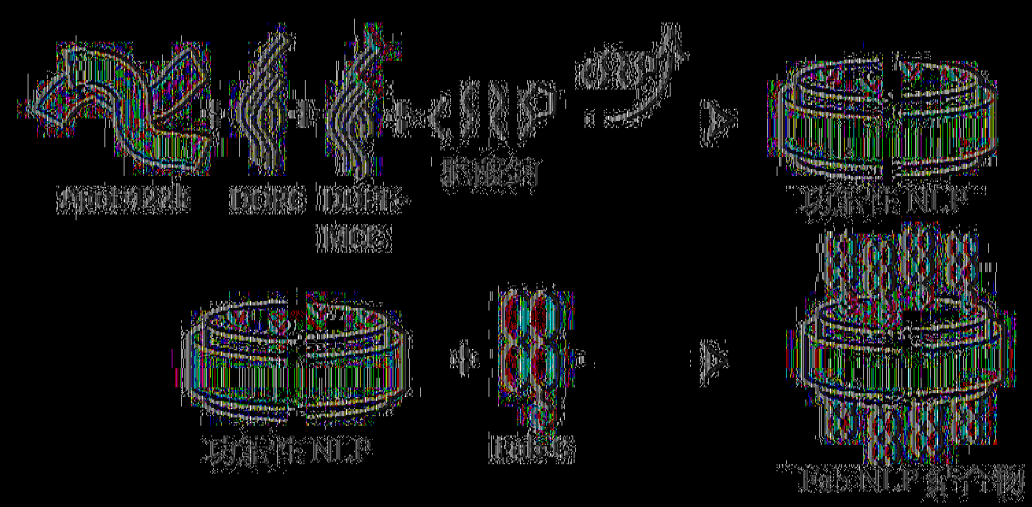


圖 1A

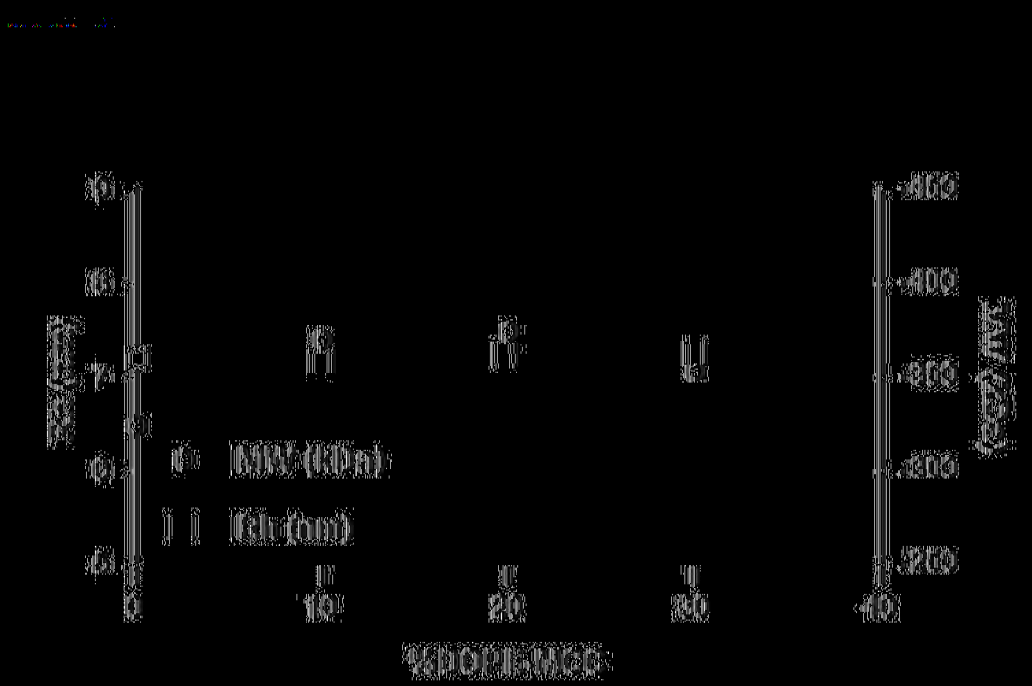


圖 1B

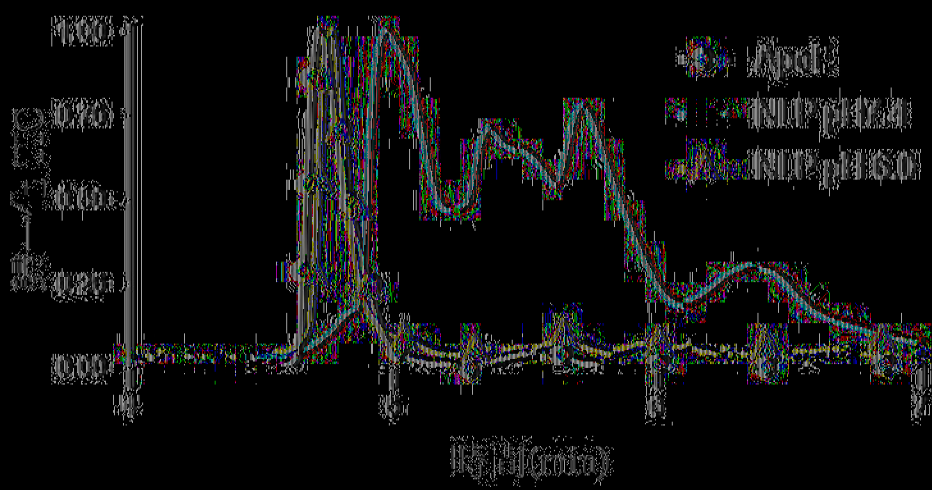


圖 1C

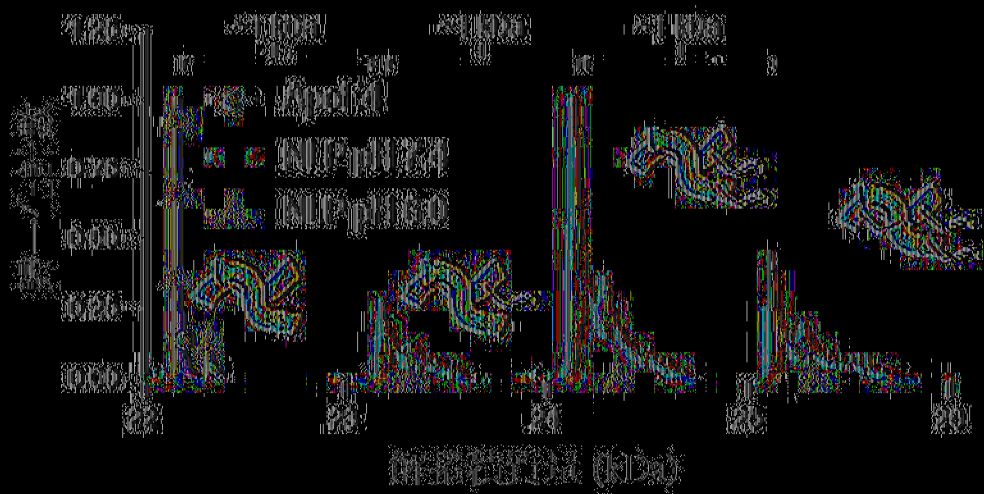


圖 1D

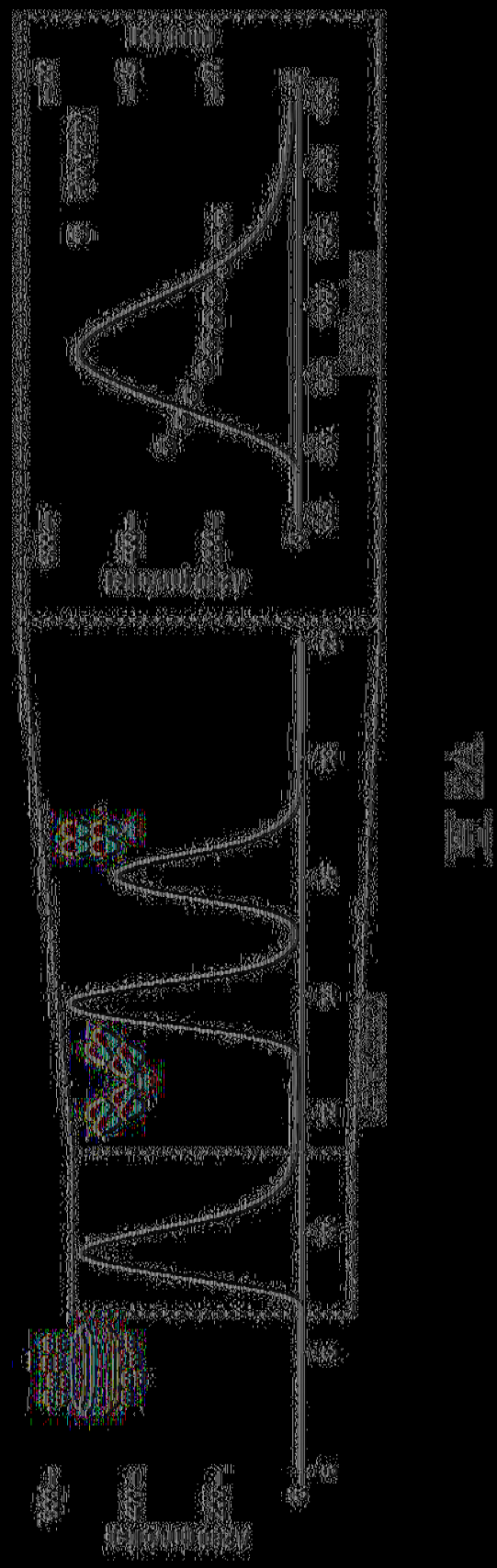
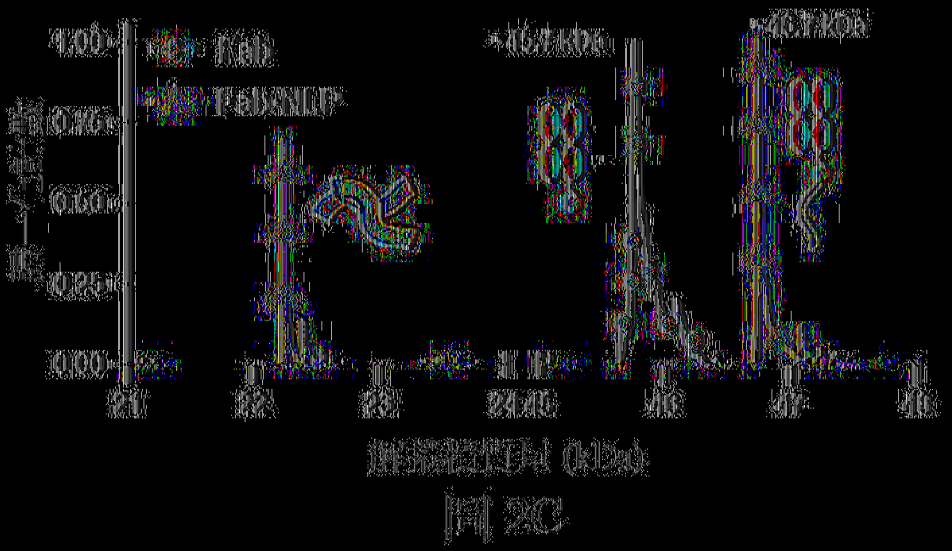
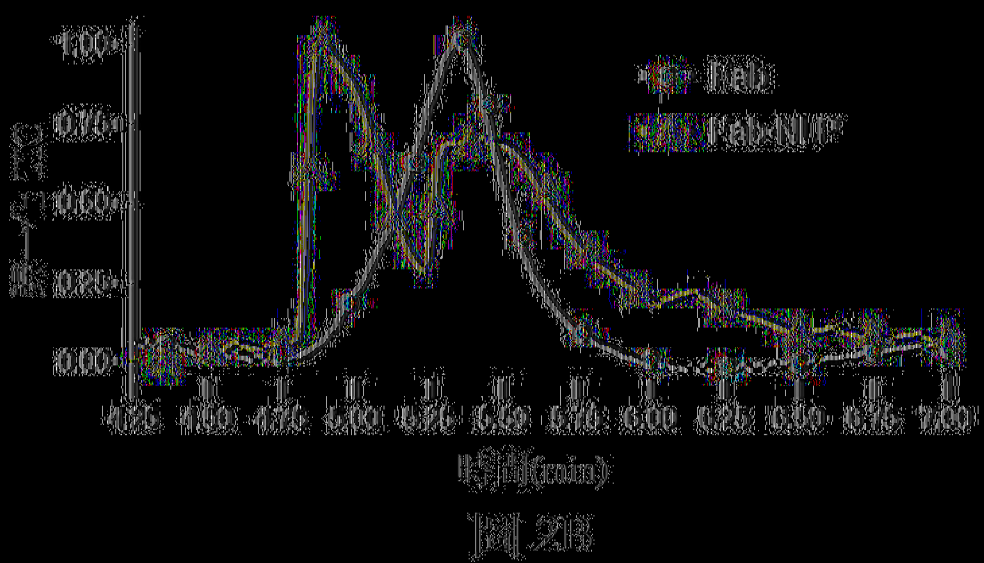
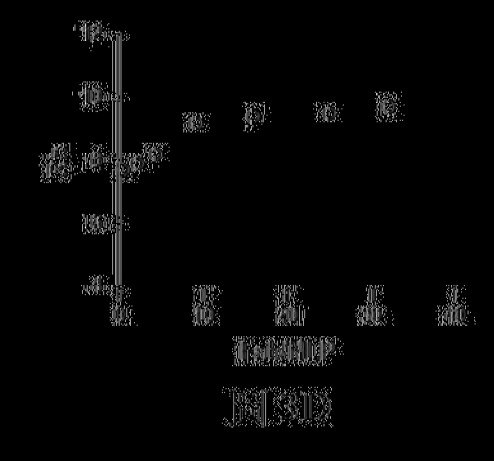
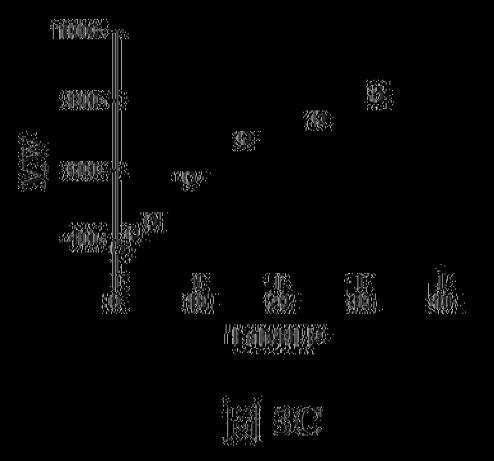
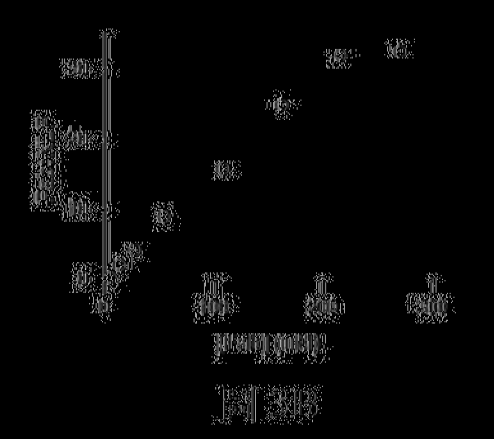
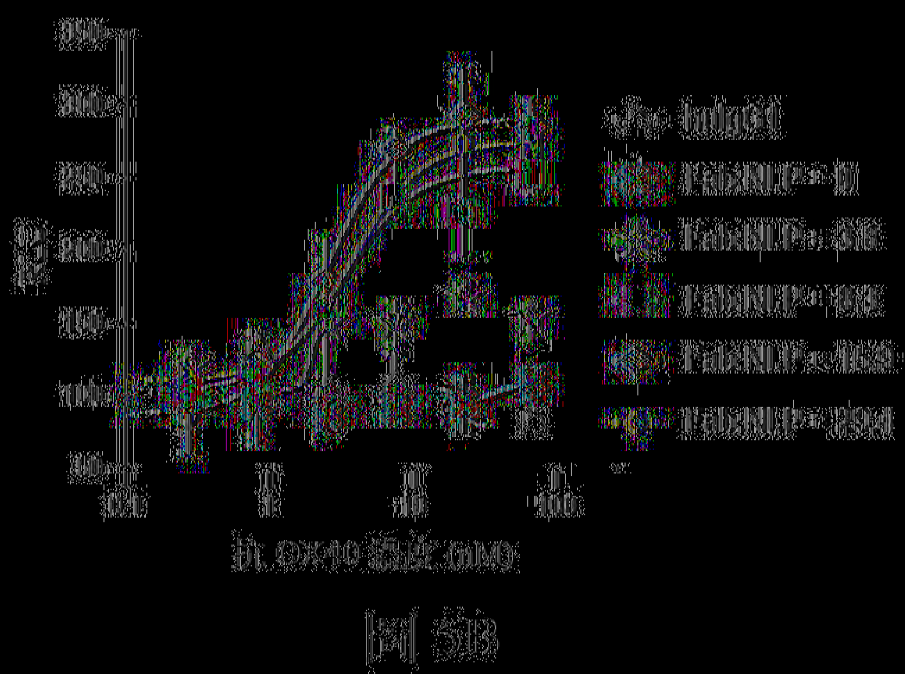
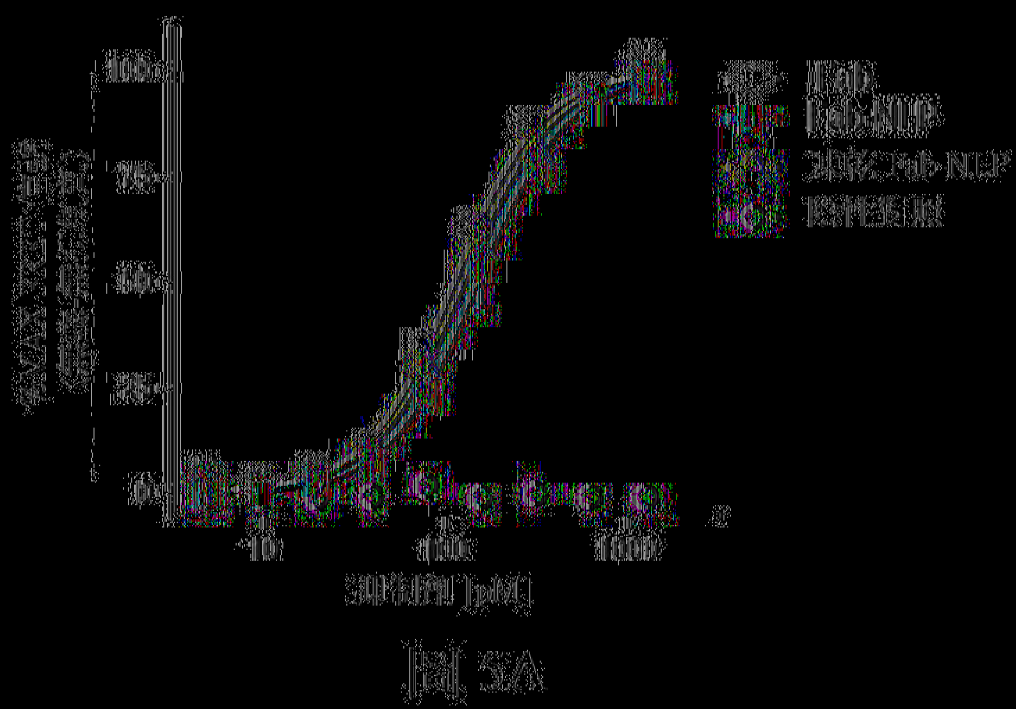


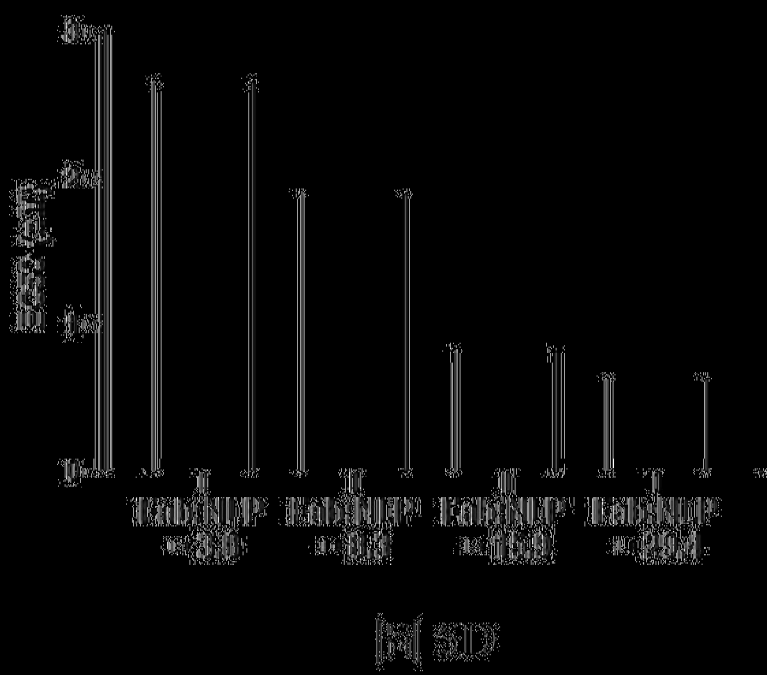
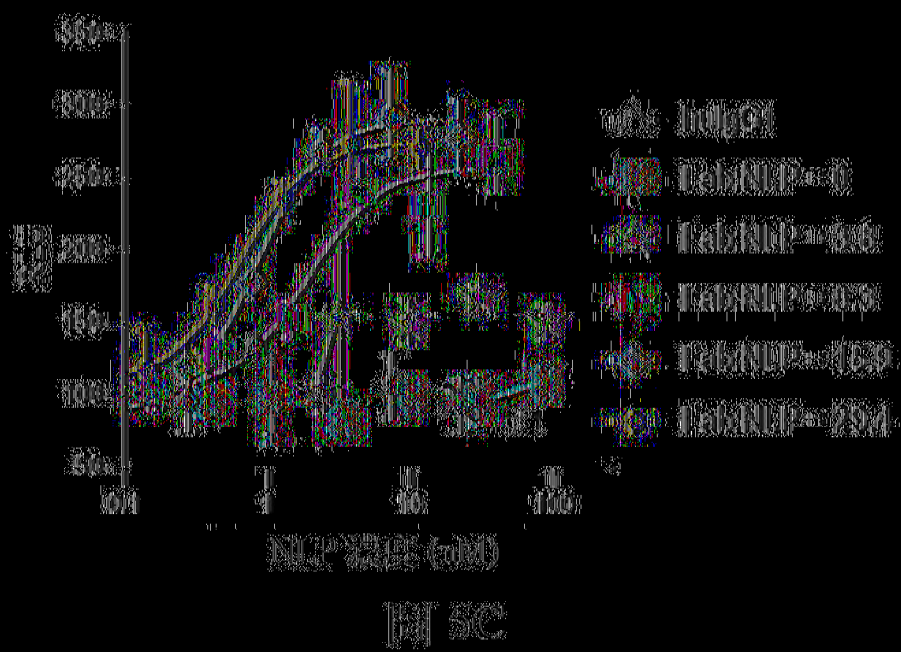
圖 1











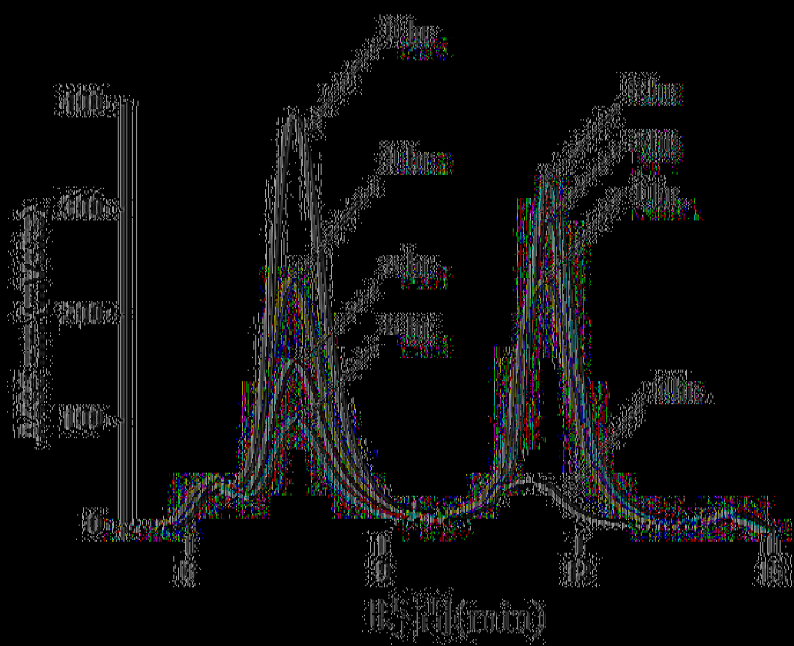


圖 6A

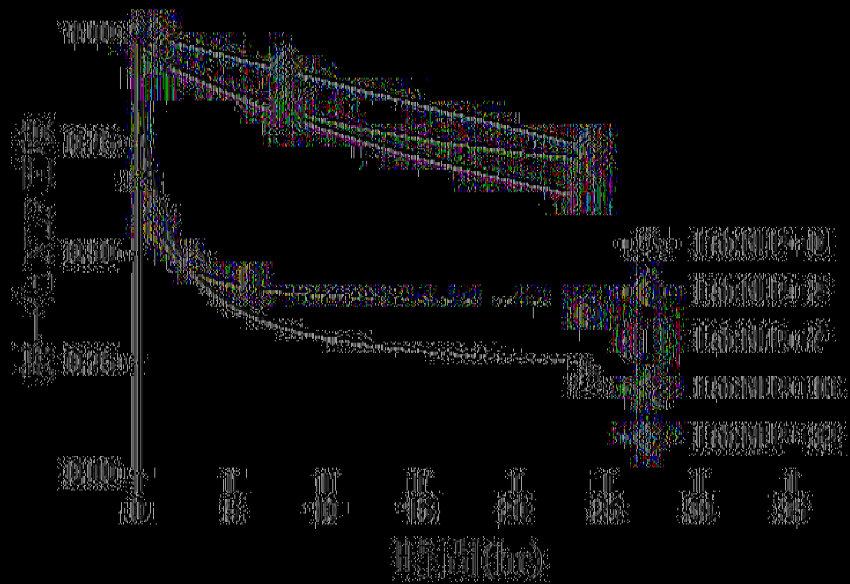
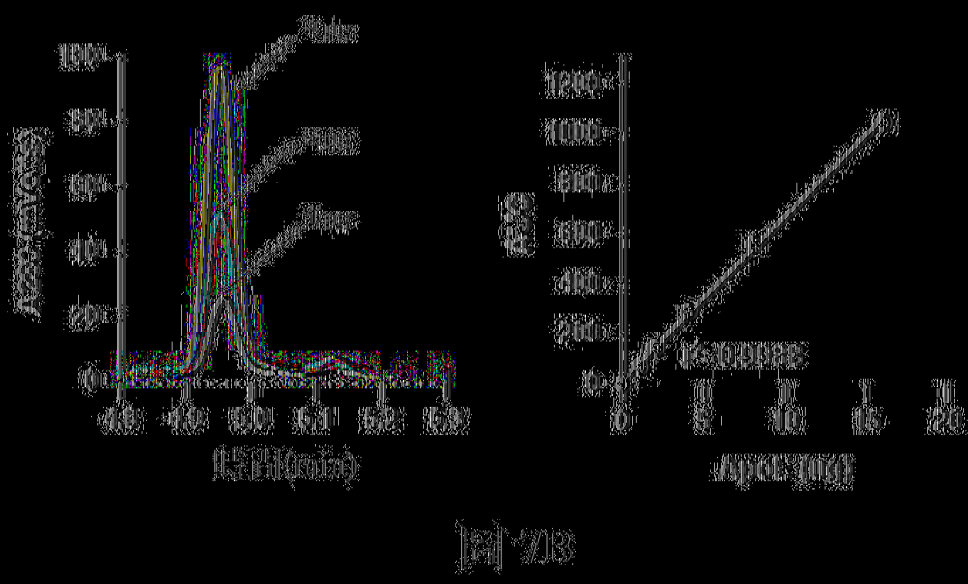
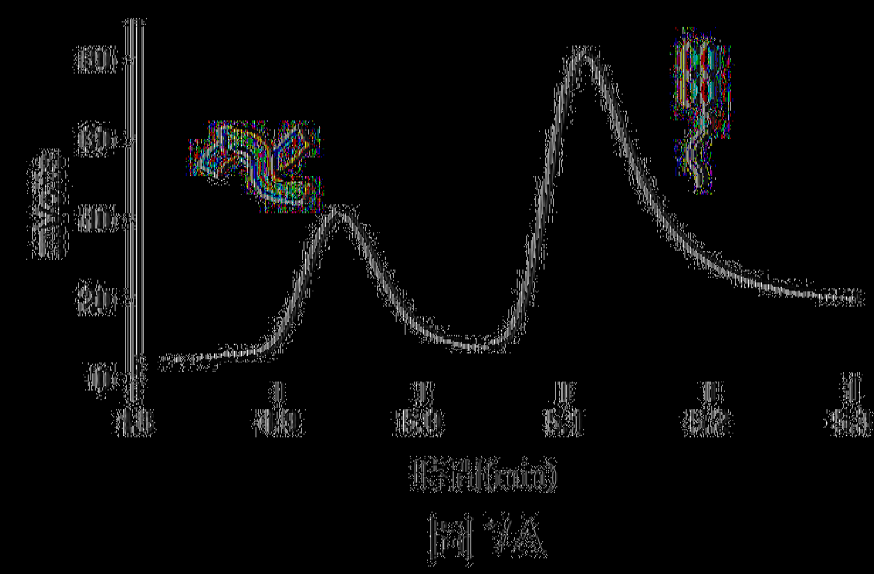


圖 6B



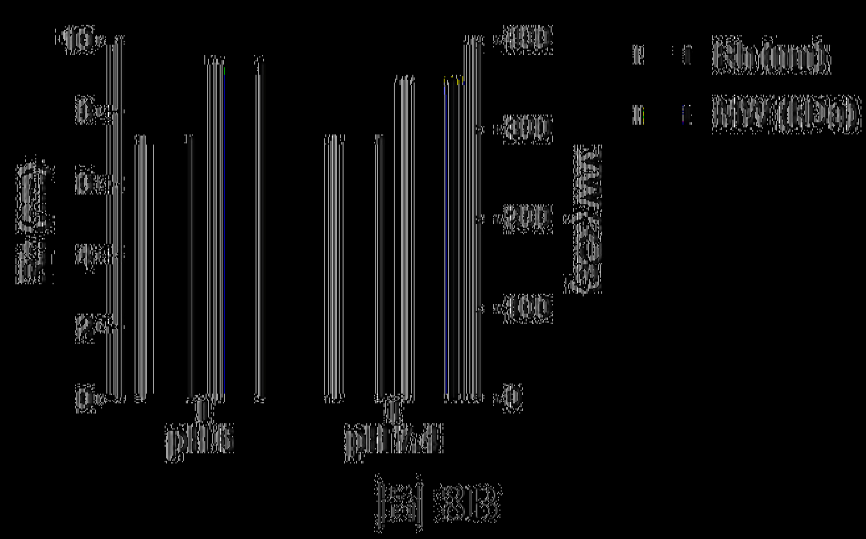
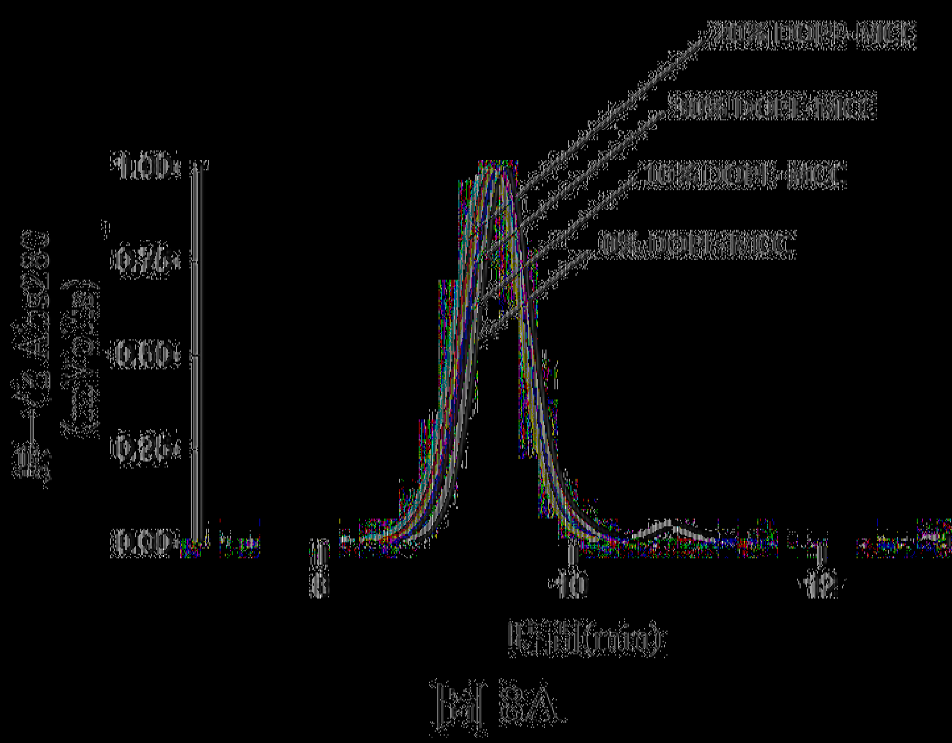




圖 10



圖 11

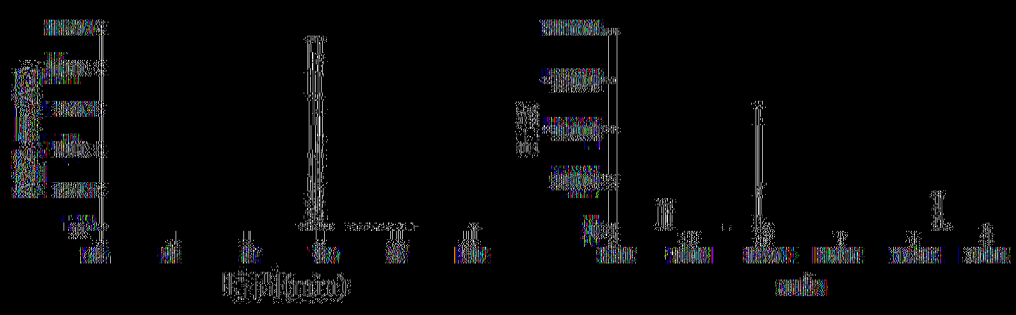


Figure 14

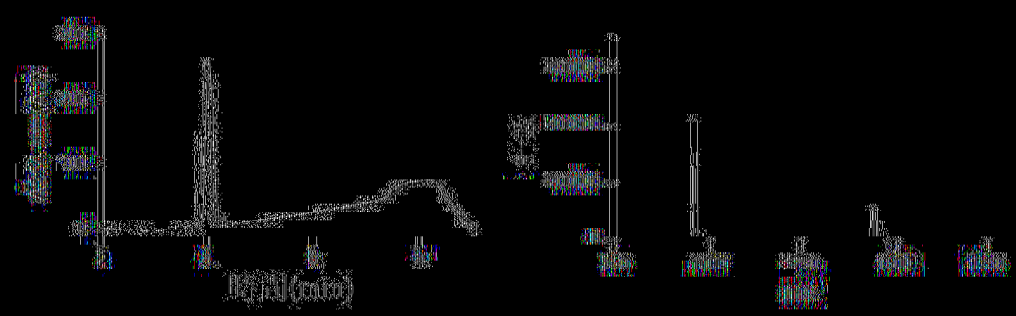


Figure 15



圖 10A

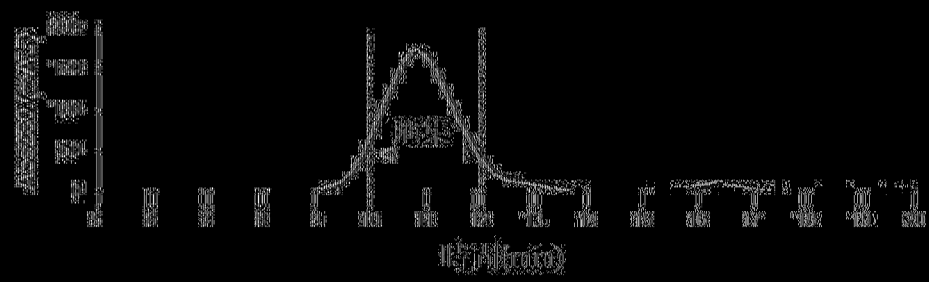
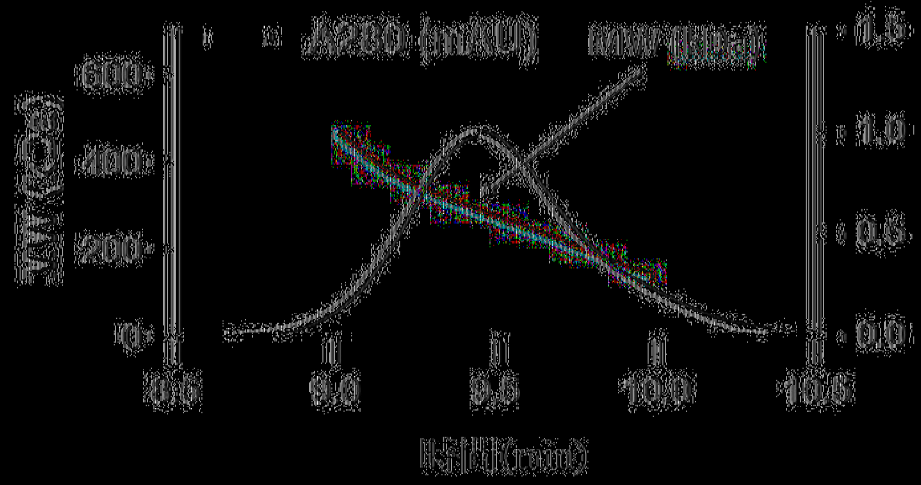


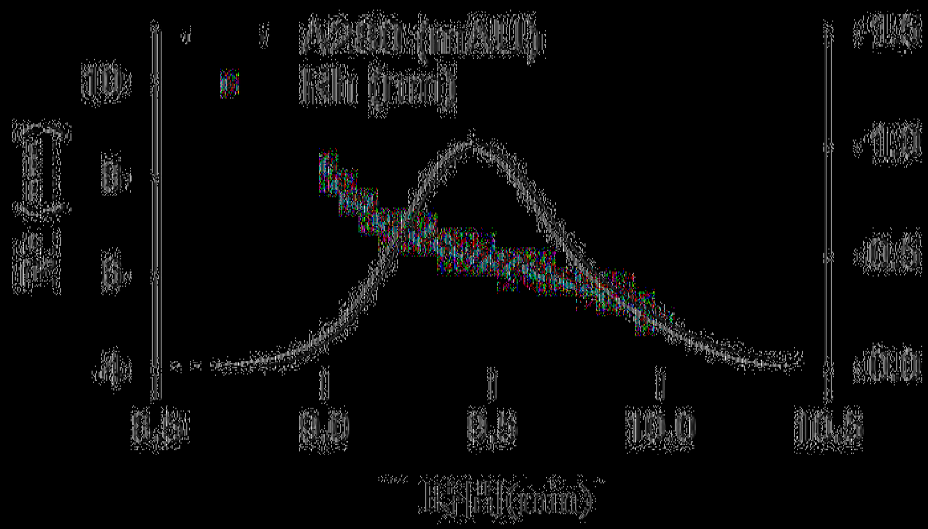
圖 10B



圖 10C



101b



101c

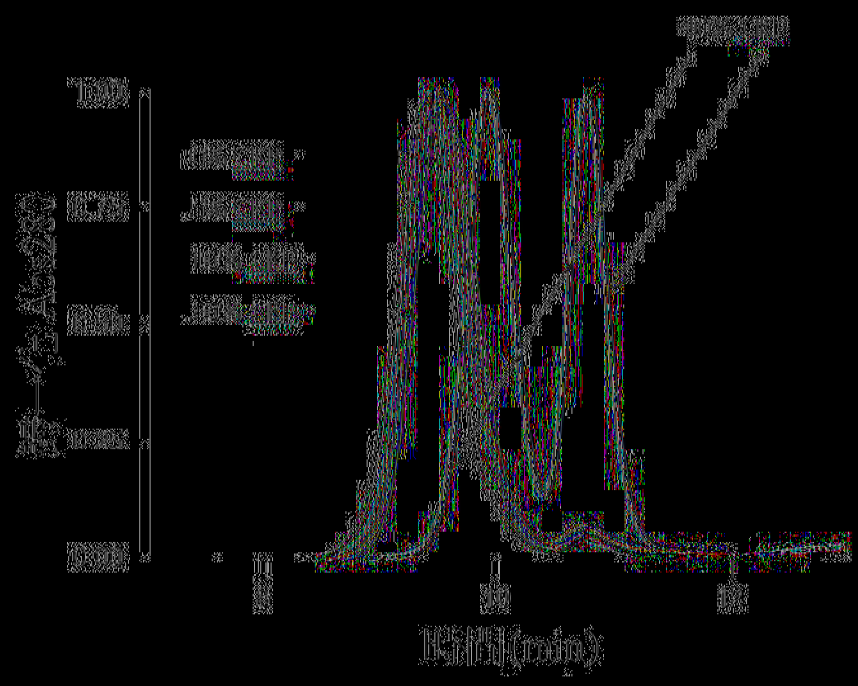


圖 11A

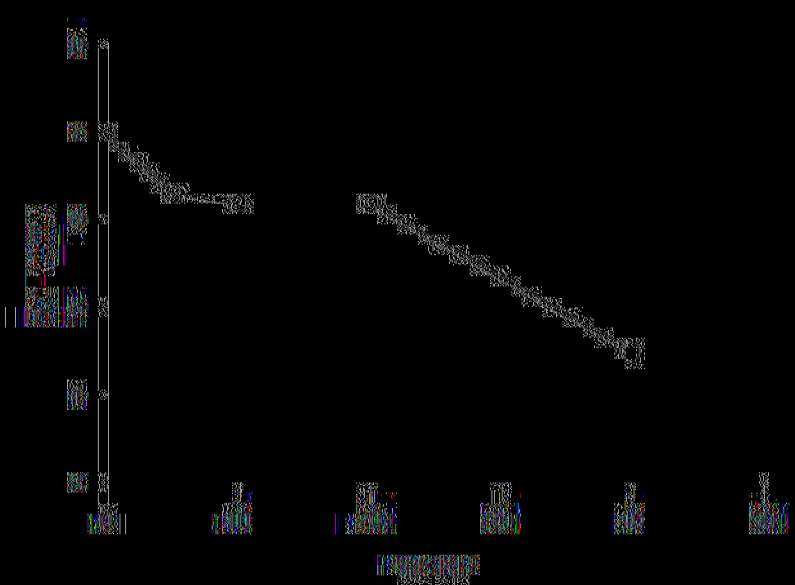
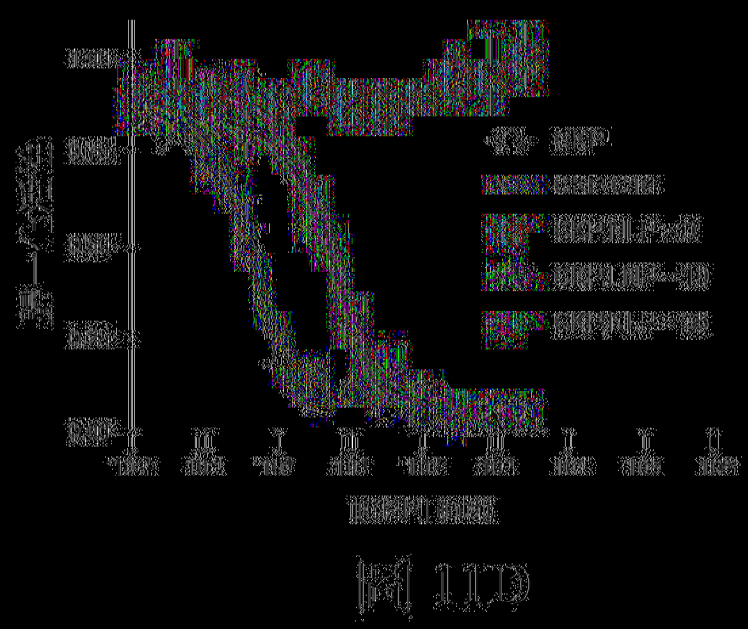
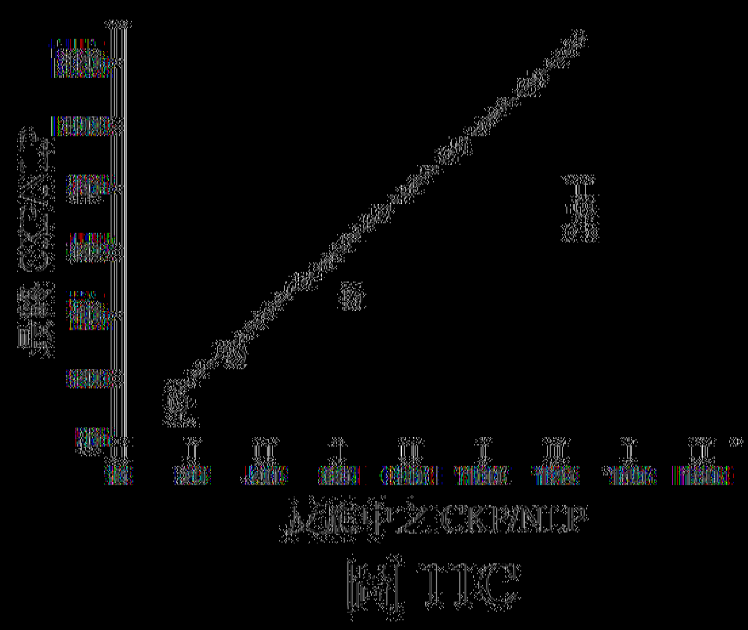


圖 11B



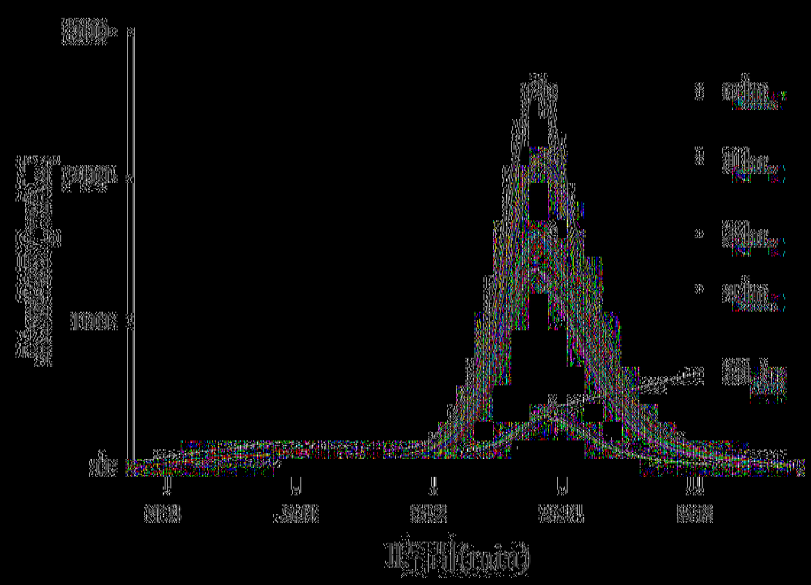


圖 12A

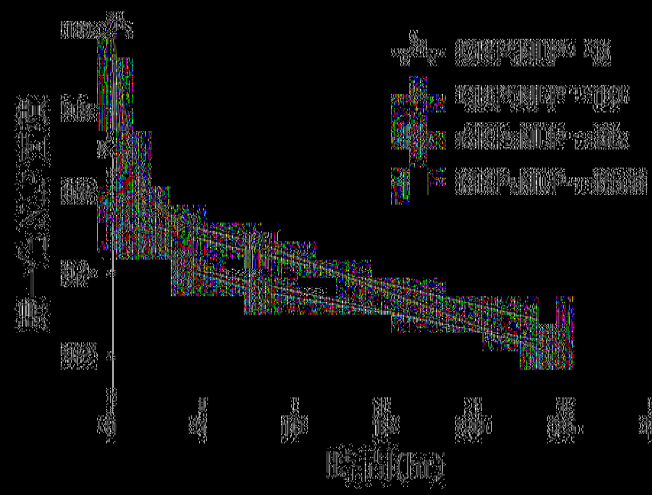


圖 12B

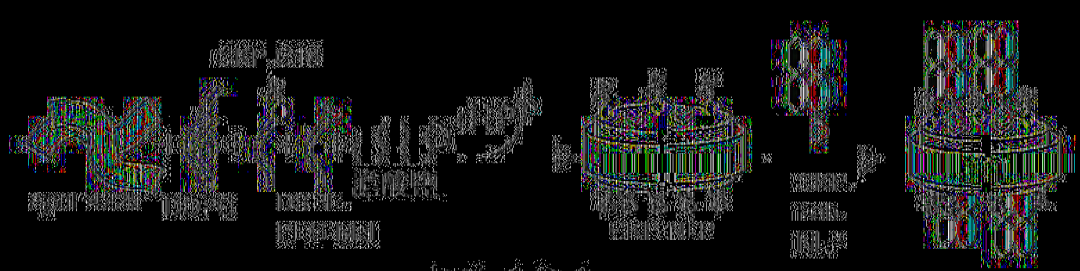


圖 13A

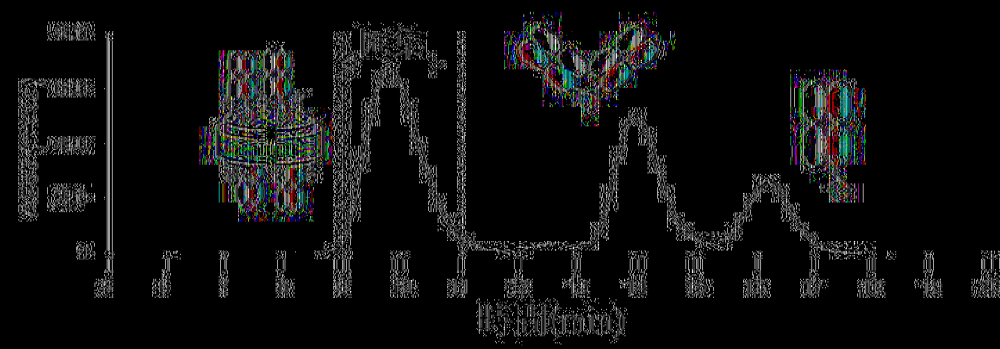


圖 13B



圖 13C

