(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119137148 A
(43)申请公布日 2024.12.13

(21)申请号 202380037993.7

(22)申请日 2023.05.04

(30)优先权数据
63/338,629 2022.05.05 US
63/351,362 2022.06.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066580 2023.05.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/215810 EN 2023.11.09

(71)申请人 印希比生物科学有限公司
地址 美国加利福利亚州

(72)发明人 A·霍兰德 M·马 J·C·蒂默 B·P·埃克尔曼

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

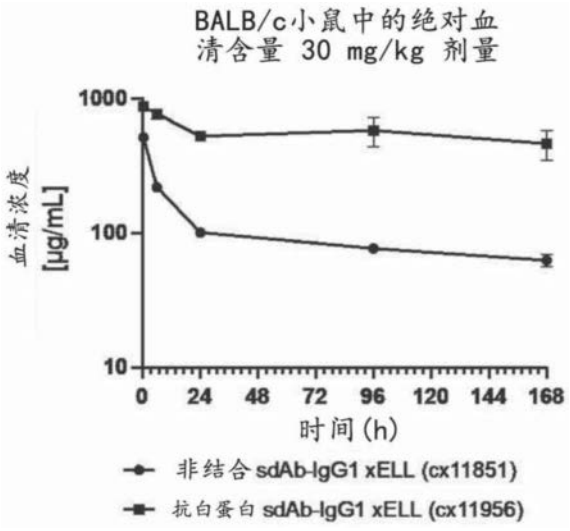
权利要求书3页 说明书38页
序列表（电子公布） 附图25页

(54)发明名称

结合白蛋白的多肽及其用途

(57)摘要

本发明提供结合白蛋白的含VHH的多肽。还提供含VHH的多肽的用途。



CN 119137148 A

1.一种包含至少一个结合白蛋白的VHH域的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:5-8的CDR1序列,选自SEQ ID NO:9-21的CDR2序列,及SEQ ID NO:22的CDR3序列。

2.根据权利要求1所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域独立地包含选自SEQ ID NO:5-8的CDR1序列,选自SEQ ID NO:9-21的CDR2序列,及SEQ ID NO:22的CDR3序列。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自以下的CDR1、CDR2及CDR3序列:SEQ ID NO:5、9及22;SEQ ID NO:5、10及22;SEQ ID NO:5、11及22;SEQ ID NO:5、12及22;SEQ ID NO:5、13及22;SEQ ID NO:5、14及22;SEQ ID NO:5、15及22;SEQ ID NO:6、15及22;SEQ ID NO:7、15及22;SEQ ID NO:8、15及22;SEQ ID NO:6、16及22;SEQ ID NO:6、17及22;SEQ ID NO:6、18及22;SEQ ID NO:6、19及22;SEQ ID NO:6、20及22;及SEQ ID NO:6、21及22。

4.根据权利要求3所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域独立地包含选自以下的CDR1、CDR2及CDR3序列:SEQ ID NO:5、9及22;SEQ ID NO:5、10及22;SEQ ID NO:5、11及22;SEQ ID NO:5、12及22;SEQ ID NO:5、13及22;SEQ ID NO:5、14及22;SEQ ID NO:5、15及22;SEQ ID NO:6、15及22;SEQ ID NO:7、15及22;SEQ ID NO:8、15及22;SEQ ID NO:6、16及22;SEQ ID NO:6、17及22;SEQ ID NO:6、18及22;SEQ ID NO:6、19及22;SEQ ID NO:6、20及22;及SEQ ID NO:6、21及22。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域经人源化。

6.根据权利要求5所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域经人源化。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含与选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

8.根据权利要求7所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域包含与选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域结合人类白蛋白及至少一种选自食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白的白蛋白。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域结合人类白蛋白及至少一种选自食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白的白蛋白。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域以小

于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类白蛋白。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白各者。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类白蛋白。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白各者。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域不结合白蛋白域3。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域不干扰白蛋白与FcRn的结合。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的多肽,其中该多肽包含至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域。

22.根据权利要求21所述的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域为VHH。

23.根据权利要求22所述的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域为VHH。

24.根据权利要求21所述的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域包含重链可变区及轻链可变区。

25.根据权利要求24所述的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域包含重链可变区及轻链可变区。

26.根据权利要求21至25中任一项所述的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域为治疗性抗体的结合域。

27.根据权利要求26所述的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域为治疗性抗体的结合域。

28.根据权利要求26或权利要求27所述的多肽,其中该治疗性抗体可用于治疗选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症的疾病或病症。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的多肽,其中该多肽包含治疗性蛋白质的氨基酸序列。

30.根据权利要求29所述的多肽,其中该治疗性蛋白质可用于治疗选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症的疾病或病症。

31.根据权利要求1至30中任一项所述的多肽,其中该多肽包含Fc区。

32.根据权利要求31所述的多肽,其中该Fc区结合FcRn。

33.根据权利要求31或权利要求32所述的多肽,其中该Fc区为IgG1 Fc区。

34.根据权利要求31至33中任一项所述的多肽,其中该Fc区包含一个或多个增强半衰期的取代。

35.根据权利要求34所述的多肽,其中该Fc区包含一个或多个在至少一种pH下增强FcRn结合及/或降低Fc及FcRn的解离率的取代。

36.根据权利要求31至35中任一项所述的多肽,其中该Fc区包含在一个或多个选自

252、254、256、428或434的氨基酸位置的取代。

37.根据权利要求36所述的多肽,其中该Fc区包含在氨基酸位置252、254及256;或氨基酸位置252及428;或氨基酸位置428及434的取代。

38.根据权利要求37所述的多肽,其中该Fc区包含取代M252Y、S254T及T256E;M252Y及M428V;或M428L及N434S。

39.根据权利要求31至38中任一项所述的多肽,其中该Fc区包含选自SEQ ID NO:47-68及85-87的序列。

40.根据权利要求1至39中任一项所述的多肽,其中该多肽的半衰期大于缺少结合白蛋白的VHH域的相同多肽的半衰期。

41.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至40中任一项所述的多肽及药学上可接受的载剂。

42.一种经分离的核酸,其编码根据权利要求1至40中任一项所述的多肽。

43.一种载体,其包含根据权利要求42所述的核酸。

44.一种宿主细胞,其包含根据权利要求42所述的核酸或根据权利要求43所述的载体。

45.一种宿主细胞,其表达根据权利要求1至40中任一项所述的多肽。

46.一种产生根据权利要求1至40中任一项所述的多肽的方法,其包括将根据权利要求44或权利要求45所述的宿主细胞在适于表达该多肽的条件下培育。

47.根据权利要求46所述的方法,其进一步包括将该多肽分离。

48.一种包括向受试者给药根据权利要求1至40中任一项所述的多肽或根据权利要求41所述的药物组合物的方法。

49.一种治疗疾病或病症的方法,其包括向患有该疾病或病症的受试者给药药学上有效量的根据权利要求1至40中任一项所述的多肽或根据权利要求41所述的药物组合物。

50.根据权利要求49所述的方法,其中该疾病或病症选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症。

结合白蛋白的多肽及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请主张2022年5月5日申请的美国临时申请案第63/338,629号及2022年6月11日申请的美国临时申请案第63/351,362号的权利,出于任何目的,其各自的全文以引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表以引用的方式并入

[0004] 本申请以引用的方式并入随本申请提交的序列表,其以2023年4月27日创建的命名为01202-0020-00PCT_ST26的电子格式,其大小为133,294字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及白蛋白结合多肽,及使用白蛋白结合多肽的方法,例如改善其他分子的半衰期的方法。

背景技术

[0006] 血浆蛋白通过两个主要机理自循环消除:低于60kDa的分子的肾过滤,及通过内皮细胞的微胞饮作用。低于肾临限值的蛋白质自循环快速清除,导致1天或更少的半衰期,而大于肾临限值的蛋白质主要透过微胞饮作用清除,具有约3至5天的半衰期。白蛋白及免疫球蛋白G(IgG)为具有约15至30天的长血浆半衰期的蛋白质,由于其大尺寸(各自66及150kDa)及其透过与新生Fc受体(FcRn)的pH依赖性结合自内皮微胞饮作用再循环的能力。

[0007] 长血浆半衰期可用于治疗剂以准确且精确控制血浆药物浓度,优化功效同时限制毒性,及降低所需药物的频率及量。具有短血浆半衰期的治疗性蛋白质由于小尺寸或缺少透过FcRn结合再循环的能力可与白蛋白结合实体融合以延长血浆半衰期。单域抗体VHH域为理想白蛋白结合实体,因为其为大小约12至15kDa的小域,其为由可容易通过重组方法融合至另一蛋白质或肽的单一多肽组成的单域,其容易经人源化以降低免疫原性的潜力,及许多天然结合用于亲和纯化的蛋白质A。

[0008] 因此,存在对结合白蛋白的VHH域的需求。

发明内容

[0009] 实施方案1.一种包含至少一个结合白蛋白的VHH域的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:5-8的CDR1序列,选自SEQ ID NO:9-21的CDR2序列及SEQ ID NO:22的CDR3序列。

[0010] 实施方案2.如实施方案1的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域独立地包含选自SEQ ID NO:5-8的CDR1序列,选自SEQ ID NO:9-21的CDR2序列及SEQ ID NO:22的CDR3序列。

[0011] 实施方案3.如实施方案1或实施方案2的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自以下的CDR1、CDR2及CDR3序列:SEQ ID NO:5、9及22;SEQ ID NO:5、10及22;SEQ ID NO:5、11及22;SEQ ID NO:5、12及22;SEQ ID NO:5、13及22;SEQ ID NO:5、14及22;SEQ ID NO:5、15及22;SEQ ID NO:6、15及22;SEQ ID NO:7、15及22;SEQ ID NO:8、15及22;SEQ ID

NO:6、16及22;SEQ ID NO:6、17及22;SEQ ID NO:6、18及22;SEQ ID NO:6、19及22;SEQ ID NO:6、20及22;及SEQ ID NO:6、21及22。

[0012] 实施方案4.如实施方案3的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域独立地包含选自以下的CDR1、CDR2及CDR3序列:SEQ ID NO:5、9及22;SEQ ID NO:5、10及22;SEQ ID NO:5、11及22;SEQ ID NO:5、12及22;SEQ ID NO:5、13及22;SEQ ID NO:5、14及22;SEQ ID NO:5、15及22;SEQ ID NO:6、15及22;SEQ ID NO:7、15及22;SEQ ID NO:8、15及22;SEQ ID NO:6、16及22;SEQ ID NO:6、17及22;SEQ ID NO:6、18及22;SEQ ID NO:6、19及22;SEQ ID NO:6、20及22;及SEQ ID NO:6、21及22。

[0013] 实施方案5.如实施方案1至4中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域经人源化。

[0014] 实施方案6.如实施方案5的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域经人源化。

[0015] 实施方案7.如实施方案1至6中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含与选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

[0016] 实施方案8.如实施方案7的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域包含与选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

[0017] 实施方案9.如实施方案1至7中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列。

[0018] 实施方案10.如实施方案1至9中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列。

[0019] 实施方案11.如实施方案1至10中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域结合人类白蛋白及至少一种选自食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白的白蛋白。

[0020] 实施方案12.如实施方案1至11中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域结合人类白蛋白及至少一种选自食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白的白蛋白。

[0021] 实施方案13.如实施方案1至12中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白。

[0022] 实施方案14.如实施方案1至13中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白。

[0023] 实施方案15.如实施方案1至14中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类白蛋白。

[0024] 实施方案16.如实施方案1至15中任一项的多肽,其中至少一个结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白各者。

[0025] 实施方案17.如实施方案1至16中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类白蛋白。

[0026] 实施方案18.如实施方案1至17中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域以小于5nM、小于2nM、小于1nM或小于0.5nM的亲和力结合人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠白蛋白各者。

[0027] 实施方案19.如实施方案1至18中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域不结合白蛋白域3。

[0028] 实施方案20.如实施方案1至19中任一项的多肽,其中各结合白蛋白的VHH域不干扰白蛋白与FcRn的结合。

[0029] 实施方案21.如实施方案1至20中任一项的多肽,其中该多肽包含至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域。

[0030] 实施方案22.如实施方案21的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域为VHH。

[0031] 实施方案23.如实施方案22的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域为VHH。

[0032] 实施方案24.如实施方案21的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域包含重链可变区及轻链可变区。

[0033] 实施方案25.如实施方案24的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域包含重链可变区及轻链可变区。

[0034] 实施方案26.如实施方案21至25中任一项的多肽,其中至少一个结合非白蛋白的蛋白质的结合域为治疗性抗体的结合域。

[0035] 实施方案27.如实施方案26的多肽,其中各结合非白蛋白的蛋白质的结合域为治疗性抗体的结合域。

[0036] 实施方案28.如实施方案26或实施方案27的多肽,其中该治疗性抗体可用于治疗选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症的疾病或病症。

[0037] 实施方案29.如实施方案1至28中任一项的多肽,其中该多肽包含治疗性蛋白质的氨基酸序列。

[0038] 实施方案30.如实施方案29的多肽,其中该治疗性蛋白质可用于治疗选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症的疾病或病症。

[0039] 实施方案31.如实施方案1至30中任一项的多肽,其中该多肽包含Fc区。

[0040] 实施方案32.如实施方案31的多肽,其中该Fc区结合FcRn。

[0041] 实施方案33.如实施方案31或实施方案32的多肽,其中该Fc区为IgG1 Fc区。

[0042] 实施方案34.如实施方案31至33中任一项的多肽,其中该Fc区包含一个或多个增强半衰期的取代。

[0043] 实施方案35.如实施方案34的多肽,其中该Fc区包含一个或多个在至少一种pH下增强FcRn结合及/或降低Fc及FcRn的解离率的取代。

[0044] 实施方案36.如实施方案31至35中任一项的多肽,其中该Fc区包含在一个或多个选自252、254、256、428或434的氨基酸位置处的取代。

[0045] 实施方案37.如实施方案36的多肽,其中该Fc区包含在氨基酸位置252、254及256;或氨基酸位置252及428;或氨基酸位置428及434处的取代。

[0046] 实施方案38.如实施方案37的多肽,其中该Fc区包含取代M252Y、S254T及T256E;M252Y及M428V;或M428L及N434S。

[0047] 实施方案39.如实施方案31至38中任一项的多肽,其中该Fc区包含选自SEQ ID NO:47-68及85-87的序列。

[0048] 实施方案40.如实施方案1至39中任一项的多肽,其中该多肽的半衰期大于缺少结合白蛋白的VHH域的相同多肽的半衰期。

[0049] 实施方案41.一种药物组合物,其包含如实施方案1至40中任一项的多肽及药学上可接受的载剂。

[0050] 实施方案42.一种经分离的核酸,其编码如实施方案1至40中任一项的多肽。

[0051] 实施方案43.一种载体,其包含如实施方案42的核酸。

[0052] 实施方案44.一种宿主细胞,其包含如实施方案42的核酸或如实施方案43的载体。

[0053] 实施方案45.一种宿主细胞,其表达如实施方案1至40中任一项的多肽。

[0054] 实施方案46.一种产生如实施方案1至40中任一项的多肽的方法,其包括将如实施方案44或实施方案45的宿主细胞在适于表达该多肽的条件下培育。

[0055] 实施方案47.如实施方案46的方法,其进一步包括将该多肽分离。

[0056] 实施方案48.一种方法,其包括向受试者给药如实施方案1至40中任一项的多肽或如实施方案41的药物组合物。

[0057] 实施方案49.一种治疗疾病或病症的方法,其包括向患有该疾病或病症的受试者给药药学上有效量的如实施方案1至40中任一项的多肽或如实施方案41的药物组合物。

[0058] 实施方案50.如实施方案49的方法,其中该疾病或病症选自自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症、感染及癌症。

附图说明

[0059] 图1A至1C.图1A为包含Fc与S364N、Y407N及K409T突变的结合白蛋白的单体单域抗体(sdAb-NNT-Fc)的示意图。图1B至1C显示4A01-NNT-hFc(SEQ ID NO:23及68)与人类血清白蛋白(HAS;1B)及鼠科血清白蛋白(MSA;1C)的单价结合。

[0060] 图2A至2B.图2A为显示评估与白蛋白域3结合的生物层干涉量度分析法(biolayer interferometry assessing)的实验设计的示意图。图2B显示生物层干涉量度分析法径迹,其显示4A01-NNT-hFc(SEQ ID NO:23及68)不结合至白蛋白域3,而1C04结合。

[0061] 图3A至3B.图3A为显示评估B2M-FcRn与白蛋白结合的生物层干涉量度分析法的实验设计的示意图。图3B为生物层干涉量度分析法径迹,其显示4A01-NNT-hFc(SEQ ID NO:23及68)及经人源化4A01v51-NNT-hFc不阻断B2m-FcRn结合至白蛋白,而1C04阻断。

[0062] 图4A至4I.图4A显示某些4A01人源化变体(SEQ ID NO:24-43)的比对。图4B至4C显示某些4A01人源化变体的人类白蛋白(HSA)结合ELISA。图4D至4E显示某些4A01人源化变体的食蟹猕猴白蛋白(CSA)结合ELISA。图4F至4G显示某些4A01人源化变体的鼠科白蛋白(MSA)结合ELISA。图4H至4I显示某些4A01人源化变体的大鼠白蛋白(RSA)结合ELISA。

[0063] 图5A至5D显示人源化hz4A01v51的人类白蛋白(HAS;图5A)、食蟹猕猴白蛋白(CSA;图5B)、鼠科白蛋白(MSA;图5C)及大鼠白蛋白(RSA;图5D)结合ELISA。

[0064] 图6显示各种单特异性及多特异性单域抗体形式。形式(i)包含经形式化为VHH-hIgG Fc(hIgG Fc以灰色显示)的两个白蛋白特异性VHH域(黑色)。形式(ii)为经形式化为VHH-hIgG-NNT-Fc(单体Fc,灰色)的单价白蛋白特异性VHH域(黑色)。形式(iii)为由白蛋白结合VHH域(黑色)及经由甘氨酸-丝氨酸接头连接的非白蛋白靶向VHH域(灰色)组成的双特异性多肽。形式(iv)包含经形式化为hIgG1 Fc-VHH(hIgG Fc以灰色显示)的两个白蛋白特

异性VHH域(黑色)。形式(v)为双特异性多肽,其针对各标靶为二价,包含融合至非白蛋白抗体(包含以灰色显示的轻链及重链)的重链的C端的白蛋白特异性VHH域(黑色),此多肽的重链可经形式化为VH-CH1-hIgG Fc-VHH。形式(vi)为双特异性多肽,其针对各标靶为二价,包含融合至非白蛋白抗体(包含以灰色显示的轻链及重链)的重链的N端的白蛋白特异性VHH域(黑色),此多肽的重链可经形式化为VHH-VH-CH1-hIgG Fc。形式(vii)为双特异性多肽,其针对各标靶为二价,包含融合至非白蛋白抗体(包含以灰色显示的轻链及重链)的CH1与Fc区之间的白蛋白特异性VHH域(黑色),此多肽的重链可经形式化为VH-CH1-VHH-hIgG Fc。形式(viii)为双特异性多肽,其针对各标靶为二价,包含融合至非白蛋白抗体(包含以灰色显示的轻链及重链)的轻链的N端的白蛋白特异性VHH域(黑色),此多肽的轻链可经形式化为VHH-VL-CL。形式(ix)为双特异性多肽,其针对各标靶为二价,包含融合至非白蛋白抗体(包含以灰色显示的轻链及重链)的轻链的C端的白蛋白特异性VHH域(黑色),此多肽的轻链可经形式化为VL-CL-VHH。

[0065] 图7A至7B显示白蛋白结合及非白蛋白结合sdAb多肽与人类白蛋白通过ELISA的结合。图7A显示在pH 7.4下的结合,而图7B显示在pH 6下的结合。图7A至7B中的构建体如图6(iii)中所述经形式化。

[0066] 图8显示单价sdAb多肽(cx5009)与人类、食蟹猕猴、小鼠或大鼠的白蛋白通过ELISA在pH 7.4下的结合。图8中的构建体如图6(ii)中所述经形式化。

[0067] 图9A至9D显示白蛋白结合二价VHH-hIgG1-xELL-Fc多肽(cx11956)与非靶向二价VHH-hIgG1-xELL-Fc多肽(cx11851)相比的活体内药物动力学(PK)谱。图9A及图9B显示利用30mg/kg试验物品给药的BALB/c小鼠的血清PK谱,如通过ELISA所测定,而图9C及图9D显示利用0.3mg/kg试验物品给药的小鼠的血清PK谱。图9A及图9C显示绝对血清浓度,单位μg/mL,而图9B及图9D显示标准化至给药后30分钟的浓度(cMax)的数据。图9A至9D中的构建体如图6(i)中所述经形式化。

[0068] 图10显示人类IgG1及人类IgG1-xELL与重组生物素化人类FCGRT(FcRn)/B2M异二聚体通过生物层干涉量度分析法(BLI)的结合。在pH 6及pH 8下检测与FcRn的缔合及解离。

[0069] 图11A至11B显示不同单特异性及双特异性白蛋白结合单域抗体形式与结合重组人类白蛋白在中性(7.4)pH下(图11A)及IL-4R(图11B)通过ELISA的结合。单特异性分子(cx12583及cx12584)如图6(iv)中所述经形式化,双特异性分子如图6(v)(cx12587及cx12594)或图6(vii)(cx12595及cx12596)中所述经形式化。

[0070] 图12A至12D显示经形式化为单价VHH-hIgG1-NNT-Fc多肽(图11A至11B)及二价VHH-hIgG1-xELL-Fc多肽(图12C至12D)的某些4A01人源化变体在pH 6(图12A及图12C)及pH 7.4(图12B及12D)下的人类白蛋白(HSA)结合ELISA。

具体实施方式

[0071] 本文中所提供的实施方案涉及白蛋白结合多肽及其用途。

[0072] 定义及各种实施方案

[0073] 本文中所用的节标题仅出于组织目的且不应解释为限制所述主题。

[0074] 本文中引用的所有参考文献(包含专利申请、专利公开及基因库寄存(Genback Accession)编号)以引用的方式并入本文中,正如明确且个别指示各个别参考文献的全文

以引用的方式并入一样。

[0075] 本文中描述或提及的技术及程序一般为本领域技术人员所熟知及通常由其使用熟知方法学,诸如,例如,下述广泛利用的方法学采用:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel等人编辑(2003));系列METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press,Inc.):PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson,B.D.Hames及G.R.Taylor编辑(1995)),Harlow及Lane编辑,(1988)ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL,and ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney编辑(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather及P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures(A.Doyle、J.B.Griffiths及D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir及C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller及M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway及P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd及C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow及D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti及J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995);及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编辑,J.B.Lippincott Company,1993);及其更新版本。

[0076] 除非另有定义,否则结合本发明所用的科学及技术术语应具有本领域一般技术人员通常所理解的含义。另外,除非上下文另有要求或明确指定,否则单数术语应包含复数且复数术语应包含单数。针对各种来源或参考文献之间的定义的任何冲突,以本文中提供的定义为准。

[0077] 一般而言,免疫球蛋白重链恒定区中的残基的编号为如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中的EU索引的编号。“如Kabat中的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0078] 应理解,本文中所述的本发明的实施方案包含“由实施方案组成”及/或“基本上由实施方案组成”。如本文中所用,除非另有指定,否则单数形式“一(a/an)”及“该”包含复数个提及物。本文中使用术语“或”不意欲暗示替代物相互排斥。

[0079] 于本申请中,除非由本领域技术人员明确指定或理解,否则使用“或”意指“及/或”。于多个附属技术方案的上下文中,使用“或”为指示回超过一个先前独立或附属的技术方案。

[0080] 短语“参考样品”、“参考细胞”或“参考组织”表示具有至少一个已知特征的样品，其可用作具有至少一个未知特征的样品的比较。在一些实施方案中，参考样品可用作阳性或阴性指示剂。参考样品可用于建立存在于(例如)健康组织中的蛋白质及/或mRNA的含量，与存在于具有未知特征的样品中的蛋白质及/或mRNA的含量相比。在一些实施方案中，该参考样品来自相同受试者，但是来自与正在测试的受试者不同的部分。在一些实施方案中，该参考样品来自癌症周围或与的相邻的组织区域。在一些实施方案中，该参考样品非来自正在测试的受试者，但是为来自已知患有或未患有所讨论病症的受试者的样品。在一些实施方案中，该参考样品来自相同受试者，但是来自在受试者发展癌症之前的时间点。在一些实施方案中，该参考样品来自相同或不同受试者的良性癌症样品。当阴性参考样品用于比较时，所讨论分子于阴性参考样品中的表达程度或量将指示本领域技术人员将理解的程度，鉴于本发明，不存在分子及/或存在低含量的分子。当阳性参考样品用于比较时，所讨论分子于阳性参考样品中的表达程度或量将指示本领域技术人员将理解的程度，鉴于本发明，存在某一含量的分子。

[0081] 如本文中所用，于自给药治疗剂受益或对给药治疗剂响应的上下文中，术语“效益”、“临床效益”、“响应性”及“治疗响应性”可通过评估各种终点，例如，在一定程度上抑制疾病进展，包括减慢及完全抑制；疾病发作及/或症状的数目减少；病变尺寸减少；抑制(即，减少、减慢或完全停止)疾病细胞浸润至相邻外周器官及/或组织；抑制(即，减少、减慢或完全停止)疾病传播；在一定程度上减轻与病症相关联的一种或多种症状；增加于治疗后无疾病呈现的长度，例如，无进展生存期；总生存期增加；更高响应率；及/或于治疗后在给定时间点的死亡率减少来测量。“非响应性”或“无法响应”的受试者或癌症为无法满足以上指定为“响应性”的资格者。

[0082] 术语“核酸分子”、“核酸”及“多核苷酸”可互换使用，及是指核苷酸的聚合物。此核苷酸的聚合物可含有天然及/或非天然核苷酸，及包括(但不限于)DNA、RNA及PNA。“核酸序列”是指包含于核酸分子或多核苷酸中的核苷酸的线性序列。

[0083] 术语“多肽”及“蛋白质”可互换使用，其是指氨基酸残基的聚合物，且不限于最小长度。此氨基酸残基的聚合物可含有天然或非天然氨基酸残基，及包括(但不限于)氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体及多聚体。全长蛋白质及其片段二者包含于该定义中。术语还包含多肽的表达后修饰，例如，糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化及类似者。此外，出于本发明的目的，“多肽”是指包含对天然序列的修饰，诸如缺失、新增及取代(一般本质上保留性)的蛋白质，只要该蛋白质维持所需活性。此修饰可为故意的，如透过定点诱变，或可为偶然的，诸如透过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增的误差所致。

[0084] 如本文中所用，“白蛋白”是指自细胞中的白蛋白前体的加工产生的任何初始成熟白蛋白。除非另有指定，否则该术语包含来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物，诸如灵长类动物(例如，人类及食蟹猕猴或恒河猴)及啮齿动物(例如，小鼠及大鼠)的白蛋白。该术语还包含白蛋白的天然产生的变体，诸如剪接变体或对偶基因变体。非限制性示例性成熟人类白蛋白氨基酸序列示于(例如)UniProt寄存编号P02768.2中。参见SEQ ID NO.1。非限制性示例性鼠科、食蟹猕猴及大鼠白蛋白氨基酸序列示于SEQ ID NO:2-4中。

[0085] 术语“特异性结合”至抗原或表位为本领域中熟知的术语，及测定此特异性结合的方法也为本领域中熟知。若分子与特定细胞或物质较其与替代细胞或物质更频繁更快速反

应或缔合,具有更大持续时间及/或更大亲和力,则认为其展示“特异性结合”或“优先结合”。若单域抗体(sdAb)或含VHH的多肽与标靶结合较其与其他物质结合具有更大亲和力、抗体亲抗原性、更快速及/或更大持续时间,则其与标靶“特异性结合”或“优先结合”。例如,特异性或优先结合至白蛋白表位的sdAb或含VHH的多肽为结合此表位的sdAb或含VHH的多肽,较其结合至其他白蛋白表位或非白蛋白表位具有更大亲和力、抗体亲抗原性、更快速及/或更大持续时间。通过阅读此定义亦应理解,例如,特异性或优先结合至第一标靶的sdAb或含VHH的多肽可或不可特异性或优先结合至第二标靶。因而,“特异性结合”或“优先结合”不一定要求(虽然其可包含)专门结合。一般地,但是不一定,提及结合意指优先结合。“特异性”是指结合蛋白质选择性结合抗原的能力。

[0086] 如本文中所用,关于靶蛋白的活性的术语“抑制”是指蛋白质的活性的减少。在一些实施方案中,“抑制”是指与在不存在调节剂下蛋白质相比的活性减少。

[0087] 如本文中所用,术语“表位”是指抗原结合分子(例如,sdAb或含VHH的多肽)结合的标靶分子(例如,抗原,诸如蛋白质、核酸、碳水化合物或脂质)的位点。表位通常包含分子(诸如氨基酸、多肽或糖侧链)的化学活性表面分组且具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。表位可自靶分子的相邻及/或并列非相邻残基(例如,氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)二者形成。自连续残基(例如,氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保留,然而由三级折迭形成的表位通常在利用变性溶剂处理后失去。表位可包含(但不限于)至少3个、至少5个或8至10个残基(例如,氨基酸或核苷酸)。在一些实施方案中,表位长度小于20个残基(例如,氨基酸或核苷酸),小于15个残基或小于12个残基。若两个抗体展示对抗原的竞争性结合,则其可结合该抗原内的相同表位。在一些实施方案中,表位可通过与抗原结合分子上的CDR残基的某个最小距离识别。在一些实施方案中,表位可通过以上距离识别,及进一步限于抗原结合分子的残基与抗原残基之间的键(例如,氢键)中涉及的那些残基。表位还可通过各种扫描识别,例如丙胺酸或精胺酸扫描可指示抗原结合分子可与的相互作用的一个或多个残基。除非明确指定,否则作为表位的一组残基不排除为特定抗原结合分子的表位的部分的其他残基。而是,此组的存在指定表位的最小系列(或物种的集)。因此,在一些实施方案中,识别为表位的一组残基指定与抗原相关的最少表位,而非抗原上的表位残基的排他性列表。

[0088] “非线性表位”或“构形表位”包含抗原蛋白内的非相邻多肽、氨基酸及/或糖,特异性对表位的抗原结合分子结合至该抗原蛋白。在一些实施方案中,残基中的至少一者将与表位的其他指定残基不相邻;然而,残基中的一者或多者还可与其他残基相邻。

[0089] “线性表位”包含抗原蛋白内的相邻多肽、氨基酸及/或糖,特异性对表位的抗原结合分子结合至该抗原蛋白。应注意,在一些实施方案中,并非线性表位内的残基中的每一者需要通过抗原结合分子直接结合(或于键中涉及)。在一些实施方案中,线性表位可来自与由线性表位的序列有效组成的肽的免疫,或来自与蛋白质的其余部分相对分离的蛋白质的结构部分(使得抗原结合分子可完整,至少主要地),仅具有该序列部分。

[0090] 术语“抗体”以最广泛含义使用及包含各种多肽,该等多肽包含类抗体抗原结合域,包括(但不限于)熟知抗体(通常包含至少一条重链及至少一条轻链)及其片段(例如,scFv、Fab)、单域抗体(sdAb,包含至少一个VHH域及Fc区)、含VHH的多肽(包含至少一个VHH域的多肽)及上述中任一者的片段,只要其展示所需抗原结合活性。在一些实施方案中,抗

体包含二聚域。此二聚域包括(但不限于)重链恒定域(包含CH1、铰链、CH2及CH3,其中CH1通常与轻链恒定域CL配对,而铰链介导二聚)及Fc区(包含铰链、CH2及CH3,其中铰链介导二聚)。

[0091] 术语抗体亦包括(但不限于)嵌合抗体、人源化抗体及各种物种(诸如骆驼(包括美洲驼)、鲨鱼、小鼠、人类、食蟹猕猴等)的抗体。

[0092] 如本文中所用,术语"抗原结合域"是指足以结合抗原的抗体的一部分。在一些实施方案中,熟知抗体的抗原结合域包含三个重链CDR及三个轻链CDR。因此,在一些实施方案中,抗原结合域包含包括CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3的重链可变区及维持结合至抗原所需的FR1及/或FR4的任何部分,及包括CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3的轻链可变区及维持结合至抗原所需的FR1及/或FR4的任何部分。在一些实施方案中,sdAb或含VHH的多肽的抗原结合域包含VHH域的三个CDR。因此,在一些实施方案中,sdAb或含VHH的多肽的抗原结合域包含包括CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3及维持结合至抗原所需的FR1及/或FR4的任何部分的VHH域。

[0093] 如本文中所用,术语"VHH"或"VHH域"或"VHH抗原结合域"是指单域抗体(诸如骆驼抗体或鲨鱼抗体)的抗原结合部分。在一些实施方案中,VHH包含三个CDR及四个框架区,指定为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。在一些实施方案中,VHH可在N端或C端处截短使得其仅包含部分FR1及/或FR4,或缺少那些框架区中的一者或二者,只要VHH实质上维持抗原结合及特异性。

[0094] 本文中术语"单域抗体"及"sdAb"可互换使用以是指包含至少一个单体域(诸如不具有轻链的VHH域)及Fc区的抗体。在一些实施方案中,sdAb为两种多肽的二聚体,其中各多肽包含至少一个VHH域及Fc区。如本文中所用,术语"单域抗体"及"sdAb"包含包含多个VHH域的多肽,诸如具有结构VHH_1-VHH_2-Fc或VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc的多肽,其中VHH_1、VHH_2及VHH_3可为相同或不同。

[0095] 术语"含VHH的多肽"是指包含至少一个VHH域的多肽。在一些实施方案中,VHH多肽包含两个、三个或四个或更多个VHH域,其中各VHH域可为相同或不同。在一些实施方案中,含VHH的多肽包含Fc区。于一些此实施方案中,含VHH的多肽可称作sdAb。另外,于一些此实施方案中,该VHH多肽可形成二聚体。含VHH的多肽(其亦为sdAb)的非限制性结构包括VHH_1-Fc、VHH_1-VHH_2-Fc及VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc,其中VHH_1、VHH_2及VHH_3可为相同或不同。于此结构的一些实施方案中,一个VHH可通过接头连接至另一VHH,或一个VHH可通过接头连接至Fc。于一些此实施方案中,该接头包含1至20个氨基酸,优选地1至20个主要由甘氨酸及任选地丝氨酸组成的氨基酸。非限制性接头于SEQ ID NO:88-93中呈现。在一些实施方案中,当含VHH的多肽包含Fc时,其形成二聚体。因此,若结构VHH_1-VHH_2-Fc形成二聚体,则认为其为四价(即,二聚体具有四个VHH域)。相似地,若结构VHH_1-VHH_2-VHH_3-Fc形成二聚体,则认为其为六价(即,二聚体具有六个VHH域)。

[0096] 术语"单克隆抗体"是指实质上同源抗体群体的抗体(包括sdAb或含VHH的多肽),即,包含个别抗体的群体为相同的,除了可以少量存在的可能天然产生的突变。单克隆抗体针对单一抗原位点高度特异性。此外,与通常包含针对不同决定子(表位)的不同抗体的多株抗体制剂相反,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。因此,单克隆抗体的样品可结合至抗原上的相同表位。修饰语"单克隆"指示如自实质上同源抗体群体获得的抗体的特征,且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,单克隆抗体可通过Kohler及

Milstein,1975,Nature 256:495首先所述的杂交瘤方法制备,或可通过诸如美国专利第4,816,567号中所述的重组DNA方法制备。单克隆抗体还可自使用例如McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554中所述的技术产生的噬菌体库分离。

[0097] 术语“CDR”表示互补决定区,如通过本领域技术人员的至少一种识别方式所定义。在一些实施方案中,CDR可根据Chothia编号方案、Kabat编号方案、Kabat及Chothia的组合、AbM定义及/或接触定义中的任一者定义。VHH包含三个CDR,指定为CDR1、CDR2及CDR3。

[0098] 如本文中所用,术语“重链恒定区”是指包含至少三个重链恒定域C_H1、铰链、C_H2及C_H3的区域。当然,除非另有指定,否则该等域内的非功能更改缺失及更改包含于术语“重链恒定区”的范围内。非限制性示例性重链恒定区包含γ、δ及α。非限制性示例性重链恒定区还包含ε及μ。各重链恒定区对应于抗体同型。例如,包含γ恒定区的抗体为IgG抗体,包含δ恒定区的抗体为IgD抗体,及包含α恒定区的抗体为IgA抗体。另外,包含μ恒定区的抗体为IgM抗体,及包含ε恒定区的抗体为IgE抗体。某些同型可进一步细分成亚型。例如,IgG抗体包括(但不限于)IgG1(包含γ_1恒定区)、IgG2(包含γ_2恒定区)、IgG3(包含γ_3恒定区)及IgG4(包含γ_4恒定区)抗体;IgA抗体包括(但不限于)IgA1(包含α_1恒定区)及IgA2(包含α_2恒定区)抗体;及IgM抗体包括(但不限于)IgM1及IgM2。

[0099] 如本文中所用,“Fc区”是指包含CH2及CH3的重链恒定区的一部分。在一些实施方案中,Fc区包含铰链、CH2及CH3。于各种实施方案方案中,当Fc区包含铰链时,该铰链介导两个含Fc的多肽之间的二聚。Fc区可为本文中所讨论的任何抗体重链恒定区同型。在一些实施方案中,Fc区为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,该Fc区源自人类Fc区且缺少C端赖氨酸残基。在一些实施方案中,该Fc区源自人类Fc区且包含C端赖氨酸残基。在一些实施方案中,该Fc区的C端氨基酸为除了赖氨酸的氨基酸。在一些实施方案中,该Fc区源自人类Fc区且缺少C端甘氨酸及赖氨酸残基。

[0100] 如本文中所用,“受体人类框架”为包含源自如本文中所讨论的人类免疫球蛋白框架或人类共有框架的重链可变域(V_H)框架的氨基酸序列的框架。源自人类免疫球蛋白框架或人类共有框架的受体人类框架可包含其相同氨基酸序列,或其可含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,跨单个抗原结合域(诸如VHH)的所有人类框架的氨基酸变化的数目小于10,或小于9,或小于8,或小于7,或小于6,或小于5,或小于4,或小于3。

[0101] “亲和力”是指分子(例如,抗体,诸如sdAb或含VHH的多肽)的单一结合位点与其结合搭档(例如,抗原)之间的非共价相互作用的加总的强度。分子X对其搭档Y的亲和力或表观亲和力一般可各自由解离常数(K_D)或$K_{D-表观}$表示。亲和力可通过本领域中已知的常见方法(诸如例如,ELISA K_D、KinExA、流动式细胞计数法及/或表面电浆共振装置),包含本文中所述那些测量。此方法包括(但不限于)涉及BIAcore®、Octet®或流动式细胞计数法的方法。

[0102] 如本文中所用,术语“K_D”是指抗原结合分子/抗原相互作用的平衡解离常数。当本文中使用术语“K_D”时,其包含K_D及$K_{D-表观}$。

[0103] 在一些实施方案中,抗原结合分子的K_D通过流动式细胞计数法使用抗原表达细胞系及将在各抗体浓度下测量的平均荧光拟合至非线性单位点结合方程(Prism软件graphpad)来测量。于一些此实施例中,K_D为$K_{D-表观}$。

[0104] 术语“生物活性”是指分子的任一种或多种生物性质(无论于活体内发现时是否天然存在,或通过重组方法提供或实现)。生物性质包括(但不限于)结合配位体、诱导或增加

细胞增殖及诱导或增加细胞激素的表达。

[0105] “激动剂”或“活化”抗体为增加及/或活化靶抗原的生物活性者。在一些实施方案中,激动剂抗体结合至抗原及增加其生物活性至少约20%、40%、60%、80%、85%或更多。

[0106] “拮抗剂”、“阻断”或“中和”抗体为抑制、减少靶抗原的生物活性及/或使其失活者。在一些实施方案中,该中和抗体结合至抗原及降低其生物活性至少约20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0107] “亲和力成熟的”sdAb或含VHH的多肽是指与不具有一个或多个更改的亲本sdAb或含VHH的多肽相比,于一个或多个CDR中具有此更改的sdAb或含VHH的多肽,此更改导致sdAb或含VHH的多肽对抗原的亲和力改善。

[0108] 如本文中所用,“人源化VHH”是指一个或多个框架区已经人类框架区实质上替代的VHH。于一些实施例中,人类免疫球蛋白的某些框架区(FR)残基经对应非人类残基替代。此外,人源化VHH可包含既不于原始VHH中也不于人类框架序列中发现,但是被包含以进一步改良及优化sdAb含VHH的多肽性能的残基。在一些实施方案中,人源化sdAb或含VHH的多肽包含人类Fc区。应理解,人源化序列可由其一级序列识别且不一定指示产生该抗体的方法。

[0109] “效应子阳性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包含Fc受体结合;Clq结合及补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B-细胞受体)的下调;及B-细胞活化等。此效应子功能一般要求Fc区与结合域(例如抗体可变域)组合及可使用各种分析评估。

[0110] “天然序列Fc区”包含与自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人类Fc区包含天然序列人类IgG1 Fc区(非A及A同种异型);天然序列人类IgG2 Fc区;天然序列人类IgG3 Fc区;及天然序列人类IgG4 Fc区以及其天然产生的变体。

[0111] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰与天然序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,“变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰与天然序列Fc区的氨基酸序列不同,但仍保留天然序列Fc区的至少一个效应子功能的氨基酸序列。在一些实施方案中,变体Fc区与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如于天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中约1至约10个氨基酸取代,及优选地约1至约5个氨基酸取代。在一些实施方案中,本文中变体Fc区将具有与天然序列Fc区及/或亲本多肽的Fc区至少约80%序列同一性,至少约90%序列同一性,至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性。

[0112] “Fc受体”或“FcR”描述结合至抗体的Fc区的受体。在一些实施方案中,Fcγ R为初始人类FcR。在一些实施方案中,FcR为结合IgG抗体者(γ 受体)及包含Fcγ RI、Fcγ RII及Fcγ RIII亚类的受体,包含对偶变体及那些受体的替代剪接形式。Fcγ RII受体包含Fcγ RIIA(“活化受体”)及Fcγ RIIB(“抑制受体”),其具有相似氨基酸序列,该等序列主要于其细胞质域中不同。活化受体Fcγ RIIA于其细胞质域中含有免疫受体基于酪胺酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fcγ RIIB于其细胞质域中含有免疫受体基于酪胺酸的抑制基序(ITIM)。(参见例如Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。例如,于Ravetch及Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);及de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中评论FcR。其他FcR(包含待将来识别的那

些)包含于本文中术语“FcR”内。例如,术语“Fc受体”或“FcR”还包含新生儿受体,FcRn,其负责将母亲IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)及Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))及免疫球蛋白的稳态调节。测量结合至FcRn的方法为已知的(参见例如Ghetie及Ward,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人))。

[0113] 如本文中所用,术语“实质上相似”或“实质上相同”表示两个或更多个数值之间的足够高程度相似性使得本领域技术人员将考虑两个或更多个值之间的差异微不足道或于通过该值所测量的生物特征的上下文中无生物及/或统计显著性。在一些实施方案中,两个或更多个实质上相似值差异不超过约5%、10%、15%、20%、25%或50%中的任一者。

[0114] 多肽“变体”意指于比对序列及引入空隙(若必要)以达成最大序列同一性%且不考虑任何保留性取代作为序列同一性的部分后,具有与天然序列多肽至少约80%氨基酸序列同一性的生物活性多肽。此变体包括(例如)其中在多肽的N端或C端处添加或缺失一个或多个氨基酸残基的多肽。在一些实施方案中,变体将具有至少约80%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,变体将具有至少约90%氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,变体将具有与天然序列多肽至少约95%氨基酸序列同一性。

[0115] 如本文中所用,关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”及“同源性”经定义为于比对序列及引入空隙(若必要)以达成最大序列同一性%且不考虑任何保留性取代作为序列同一性的部分后,与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的候补序列中的氨基酸残基的百分比。出于测定氨基酸序列同一性%的目的的比对可以本领域技术人员能力内的各种方式(例如,使用公共可用计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGNTM(DNASTAR)软件)达成。本领域技术人员可确定用于测量比对的适宜参数,包含达成跨正在比较的序列的全长的最大比对所需的任何算法。

[0116] 氨基酸取代可包括(但不限于)多肽中的一个氨基酸经另一氨基酸的替换。示例性取代示于表1中。可将氨基酸取代引入所关注抗体中及针对所需活性,例如,保留/改善的抗原结合、减少的免疫原性或改善的ADCC或CDC筛选产物。

[0117] 表1

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala

[0118]

Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0119] 氨基酸可根据常见侧链性质分组:

[0120] (1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0121] (2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0122] (3)酸性:Asp、Glu;

[0123] (4)碱性:His、Lys、Arg;

[0124] (5)影响链取向的残基:Gly、Pro;

[0125] (6)芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0126] 非保留性取代将涉及此类别中的一者的成员交换为另一类别。

[0127] 术语“载体”为用于描述可经工程改造以含有可于宿主细胞中繁殖的经选殖多核苷酸的多核苷酸。载体可包含下列组件中的一者或多者:复制起源、一个或多个调节所关注多肽的表达的调节序列(诸如例如,启动子及/或增强子)及/或一个或多个可选择标记基因(诸如例如,抗生素抗性基因及可用于比色分析中的基因,例如,β-半乳糖苷酶)。术语“表达载体”是指用于表达宿主细胞中的所关注多肽的载体。

[0128] “宿主细胞”是指可为或已为载体或经分离多核苷酸的接受者的细胞。宿主细胞可为原核细胞或真核细胞。适宜性真核细胞包括哺乳动物细胞,诸如灵长类或非灵长类动物细胞;真菌细胞,诸如酵母;植物细胞及昆虫细胞。非限制性示例性哺乳动物细胞包括(但不限于)NSO细胞、PER.C6®细胞(Crucell)及293及CHO细胞及其衍生物,诸如293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S及CHO-DS细胞。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代,及该后代由于天然、偶然或故意突变,不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态上或基因组DNA补体上)。宿主细胞包括于活体内经本文中提供的多核苷酸转染的细胞

[0129] 如本文中所用,术语“经分离”是指已自组分中的至少一些分离的分子,利用该等组分该分子通常于自然中发现或产生。例如,当多肽自产生其的细胞的组分中的至少一些分离时,将多肽称作“经分离”。在多肽于表达后通过细胞分泌的情况下,认为将含有多肽的上清液自产生其的细胞物理分离为“分离”多肽。相似地,当多核苷酸非更大多核苷酸(诸如例如,于DNA多核苷酸的情况下,基因组DNA或粒线体DNA)的部分时,将多核苷酸称作“经分离”,于该更大多核苷酸中其通常于自然中发现,或自产生其的细胞的组分中的至少一些分离,例如,于RNA多核苷酸的情况下。因此,可将含于宿主细胞内部的载体中的DNA多核苷酸称作“经分离”。

[0130] 本文中术语“受试者”及“受试者”可互换使用以是指动物;例如哺乳动物。在一些实施方案中,提供治疗哺乳动物,包括(但不限于)人类、啮齿动物、猿、猫、犬、马、牛、猪、绵羊、山羊、哺乳动物实验室动物、哺乳动物农场动物、哺乳动物竞技类动物及哺乳动物宠物的方法。于一些实施例中,“受试者”或“受试者”是指需要治疗疾病或病症的受试者或受试者。在一些实施方案中,接受治疗的受试者可为指定受试者已经识别为患有待治疗的相关病症或有接触病症的适当风险的事实的患者。

[0131] 如本文中所用,“疾病”或“病症”是指需要及/或期望治疗的状况。

[0132] 术语“自体免疫性病症”是指通常与非过敏性过敏反应(II类、III类及/或IV类过敏反应)相关联的疾病或病症,其一般自受试者的自身体液及/或细胞介导的对内源外源起源的一种或多种免疫原性物质的免疫反应产生。

[0133] 术语“炎症性病症”是指与发炎相关联的病症,包括(但不限于)慢性或急性炎症性疾病及明确包括炎症性自体免疫性疾病及炎症性过敏病状。

[0134] 术语“感染”及“感染性疾病或病症”是指由外源感染性因子,诸如(但不限于)细菌、病毒、真菌、原生动物及寄生虫引起的疾病或病症。

[0135] 术语“癌症”及“肿瘤”包含实体癌症及血液癌/淋巴癌及还包含恶性、恶性前及良性生长,诸如发育不良。示例性癌症包括(但不限于):基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑及中枢神经系统癌、乳癌、腹膜癌、子宫颈癌、绒膜癌、结肠直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌)、胶质母细胞瘤、肝癌、肝细胞瘤、上皮内赘生物、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌及肺鳞状细胞癌)、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌(唇、舌、口及咽)、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌、唾腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌或子宫内膜癌、泌尿系统癌、外阴癌、淋巴瘤(包含霍奇金氏(Hodgkin's)及非霍奇金氏淋巴瘤,以及B-细胞淋巴瘤(包含低恶性度/滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中恶性度/滤泡性NHL、中恶性度扩散性NHL、高恶性度免疫母细胞性NHL、高恶性度淋巴母细胞性NHL、高恶性度小非裂解细胞NHL、大体积病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤及瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom's)巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性髓母细胞性白血病、以及其他癌症及肉瘤;及移植后淋巴增殖性病症(PTLD)以及与母斑细胞病相关联的异常血管增殖、水肿(诸如与脑瘤相关联者)及梅格耶氏(Meigs')综合征。

[0136] 在一些实施方案中,“增加”或“减少”各自是指统计上显著增加或减少。如对熟习者显然,“调节”还可涉及实现标靶或抗原对其配位体、结合搭档、缔合至同多聚体或杂多聚

体形式的搭档或底物中的一者或多者的亲和力、抗体亲抗原性、特异性及/或选择性的变化(其可为增加或减少);实现标靶或抗原对介质中的一种或多种条件或标靶或抗原存在的环境(诸如pH、离子强度、辅因子的存在等)的敏感性的变化(其可为增加或减少);及/或与相同条件但是不存在测试剂相比,细胞增殖或细胞激素产生。此可以任何适宜方式及/或使用本身已知或本文中所述的任何适宜分析测定,取决于所涉及的标靶。

[0137] 如本文中所用,“治疗”为获得有益或所需临床结果的方法。如本文中所用,“治疗”涵盖针对哺乳动物(包括人类)的疾病的治疗剂的任何给药或应用。出于本发明的目的,有益或所需临床结果包括(但不限于)下列中的任一者或多者:一种或多种症状减轻、疾病程度减少、预防或延迟疾病的传播(例如,转移,例如,转移至肺或淋巴结)、预防或延迟疾病复发、延迟或减慢疾病进展、疾病状态改善、抑制疾病或疾病进展、抑制或减慢疾病或其进展、停止其发展及缓解(无论部分或完全)。亦由“治疗”包含为增殖性疾病的病理学结果的减少。本文中提供的方法考虑治疗的此方面中的任一者或多者。与上述一致地,术语治疗不需要100%移除病症的所有方面。

[0138] “改善”意指如与不给药治疗剂相比,一种或多种症状的减轻或改善。“改善”还包含症状的持续时间的缩短或减少。

[0139] 本文中以其最广泛含义使用术语“抗癌剂”,是指用于治疗一种或多种癌症的剂。此剂的示例性类别包括(但不限于)化疗剂、抗癌生物剂(诸如细胞激素、受体细胞外域-Fc融合及抗体)、放射疗法、CAR-T疗法、治疗性寡核苷酸(诸如反义寡核苷酸及siRNA)及溶瘤病毒。

[0140] 术语“生物样品”意指来自生物或前生物的一定数量的物质。此物质包括(但不限于)血液(例如,全血)、血浆、血清、尿液、羊水、滑膜液、内皮细胞、白血球、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结及脾。

[0141] 术语“对照”或“参考物”是指已知不含有分析物(“阴性对照”)或含有分析物(“阳性对照”)的组合物。阳性对照可包含已知浓度的分析物。

[0142] 术语“抑制(inhibition/inhibit)”是指任何表达型特征的减少或停止或该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。“降低”或“抑制”为如与参考物相比减少、降低或抑制活性、功能及/或量。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指引起10%或更大的总体减少的能力。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指引起50%或更大的总体减少的能力。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指引起75%、85%、90%、95%或更大的总体减少的能力。在一些实施方案中,以上指定的量为一段时间内相对于相同时间段内的对照经抑制或减少。

[0143] 如本文中所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减慢、延迟、稳定、抑制及/或推迟疾病(诸如癌症)的发展。此延迟可为改变时间长度,取决于疾病史及/或正在治疗的受试者。如对本领域技术人员明显的是,充分或显著延迟实际上可包含预防,在于受试者不发展疾病。例如,可延迟晚期癌症,诸如转移的发展。

[0144] 如本文中所用,“预防”包含提供与可预先倾向于疾病但是尚未诊断患有疾病的受试者的疾病的发生或复发相关的预防。除非另有指定,否则术语“降低”、“抑制”或“预防”不表示或需要在所有时间内完全预防,但是仅在正测量的时间段内。

[0145] 物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗上有效量”可根据诸如受试者的疾病状态、年

龄、性别及体重,及物质/分子、激动剂或拮抗剂引起受试者的所需响应的能力的因素变化。治疗上有效量也为其中物质/分子、激动剂或拮抗剂的任何毒性或有害效应由治疗上有益效应超过者。治疗上有效量可以一或多次给药递送。治疗上有效量是指在剂量下及持续所需时间段有效达成所需治疗及/或预防结果的量。

[0146] 术语“药物制剂”及“药物组合物”可互换使用及是指以此形式以便允许该(等)活性成分的生物活性有效,且不含有对将给药制剂的受试者具有不可接受毒性的另外组分的制剂。此制剂可为无菌的。

[0147] “药学上可接受的载剂”是指并与治疗剂使用的本领域中熟知的无毒固体、半固体或液体填料、稀释剂、封装材料、调配助剂或载剂,其与治疗剂一起包括用于向受试者给药的“药物组合物”。药学上可接受的载剂在所采用的剂量及浓度下对接受者无毒且与制剂的其他成分兼容。药学上可接受的载剂适用于所采用的制剂。

[0148] “与一种或多种另外治疗剂组合”给药包括同时(合并)及以任何顺序依序给药。

[0149] 本文中使用术语“合并”以是指两种或更多种治疗剂的给药,其中至少部分的给药在时间上重叠,或其中一种治疗剂的给药相对于另一治疗剂的给药落入短时间段内,或其中两种剂的治疗效应重叠至少一段时间。

[0150] 本文中使用术语“依序”以是指两种或更多种治疗剂的给药,其在时间上不重叠,或其中该药剂的治疗效应不重叠。

[0151] 如本文中所用,“与…结合”是指一种治疗模态(modality)的给药,除了另一治疗模态以外。因而,“与…结合”是指一种治疗模态的给药,在向受试者给药另一治疗模态之前、期间或之后。

[0152] 使用术语“药品说明书”是指习惯包含于治疗产品的市售包装中,含有关于适应症、用途、剂量、给药、组合疗法、禁忌症及/或关于此治疗产品的使用的警告的信息的说明书。

[0153] “制品”为包含至少一种试剂,例如,用于治疗疾病或病症(例如,癌症)的药剂,或用于特异性检测本文中所述的生物标志物的探针的任何制造(例如,包装或容器)或试剂盒。在一些实施方案中,该制造或试剂盒作为进行本文中所述方法的单元促销、分发或销售。

[0154] 术语“标签”及“可检测标签”意指例如连接至抗体或抗原以致使特异性结合对的成员之间的反应(例如,结合)可检测的部分。特异性结合对的经标记成员被称作“经可检测地标记”。因此,术语“经标记的结合蛋白”是指具有并入的标签的蛋白质,该标签提供结合蛋白的识别。在一些实施方案中,该标签为可检测标志物,其可产生可通过视觉或仪器方法(例如,将经放射性标记的氨基酸并入或连接至可通过经标记的抗生物素(例如,含有可通过光学或比色方法检测的荧光标志物或酶促活性的链霉抗生物素(streptavidin))检测的生物素基部分的多肽)检测的信号。多肽的标签的实施例包括(但不限于)下列:放射性同位素或放射性核素(例如,^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I、^{177}Lu、^{166}Ho或^{153}Sm);色原、荧光标签(例如,FITC、罗丹明(rhodamine)、镧系荧光粉);酶标签(例如,辣根过氧化物酶、荧光素酶、碱性磷酸酶);化学发光标志物;生物素基;由二级报告子(例如,白胺酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签)识别的预定多肽表位;及磁性剂,诸如钆螯合物。针对免疫分析通常采用的标签的代表性实施例包括产生光的部分,例如,吖啶化合物,

及产生荧光的部分,例如,荧光素。就此而言,该部分自身不可可检测标记,但是可在与又一部分反应后变得可检测。

[0155] 示例性白蛋白结合多肽

[0156] 本文中提供包含结合白蛋白的VHH域的单域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域不干扰白蛋白结合至FcRn。在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域不结合白蛋白的域3。在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域以0.01nM与5nM之间,或0.01nM与2nM之间,或0.01nM与1nM之间,0.01nM与0.5nM之间、0.05nM与5nM之间,或0.05nM与2nM之间,或0.05nM与1nM之间,或0.05nM与0.5nM之间的亲和力(K_D)结合。

[0157] 于各种实施方案中,提供包含至少一个结合白蛋白的VHH域的多肽。在一些实施方案中,提供包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个结合白蛋白的VHH域的多肽。在一些实施方案中,本文中提供的多肽包含一个、两个、三个或四个结合白蛋白的VHH域。此多肽可包含一个或多个结合一个或多个非白蛋白的靶蛋白的另外VHH域。

[0158] 于各种实施方案中,包含一个或多个结合白蛋白的VHH域的多肽还包含治疗性抗原结合域及/或治疗性多肽。此治疗性抗原结合域包括(但不限于)包含重链可变区及轻链可变区的传统抗体抗原结合域,及单域抗体抗原结合域(诸如VHH域)。图6(v)至(ix)中提供包含一个或多个结合白蛋白的VHH域及一个或多个传统抗体域的多肽的非限制性形式。其他非限制性示例性治疗性多肽包括(例如)受体细胞外域、酶及配位体。于各种实施方案中,包含至少一个结合白蛋白的VHH域的多肽较不具有至少一个结合白蛋白的VHH域的相同多肽具有更长活体内半衰期。在一些实施方案中,该半衰期较不具有结合白蛋白的VHH域的多肽的半衰期长至少1.5x、至少2x、至少3x、至少4x或至少5x。

[0159] 在一些实施方案中,包含至少一个结合白蛋白的VHH域的多肽包含Fc区。在一些实施方案中,本文中提供的多肽包含一个、两个、三个或四个结合白蛋白的VHH域及Fc区。在一些实施方案中,Fc区介导多肽在生理条件下的二聚。

[0160] 于各种实施方案中,结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:5-8的CDR1序列,选自SEQ ID NO:9-21的CDR2序列及SEQ ID NO:22的CDR3序列。于各种实施方案中,结合白蛋白的VHH域包含选自以下的CDR1、CDR2及CDR3序列:SEQ ID NO:5、9及22;SEQ ID NO:5、10及22;SEQ ID NO:5、11及22;SEQ ID NO:5、12及22;SEQ ID NO:5、13及22;SEQ ID NO:5、14及22;SEQ ID NO:5、15及22;SEQ ID NO:6、15及22;SEQ ID NO:7、15及22;SEQ ID NO:8、15及22;SEQ ID NO:6、16及22;SEQ ID NO:6、17及22;SEQ ID NO:6、18及22;SEQ ID NO:6、19及22;SEQ ID NO:6、20及22;及SEQ ID NO:6、21及22。

[0161] 在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域包含氨基酸序列,其为与选自SEQ ID NO:23-43及71-74的序列至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的氨基酸序列。

[0162] 在一些实施方案中,提供结合白蛋白的VHH域,其与包含选自SEQ ID NO:23-43及71-74的氨基酸序列的VHH域竞争结合至白蛋白。

[0163] 在一些实施方案中,结合白蛋白的VHH域可经人源化。人源化抗体(诸如sdAb或含VHH的多肽)可用作治疗性分子,因为人源化抗体减少或消除对非人类抗体的人类免疫反应,其可导致对抗体治疗剂的免疫反应及治疗剂的有效性减少。一般而言,人源化抗体包含

一个或多个可变域,其中CDR(或其部分)源自非人类抗体,及FR(或其部分)源自人类抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人类抗体(例如,衍生CDR残基的抗体)的对应残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0164] 人源化抗体及其制备方法(例如)于Almagro及Fransson,(2008)Front.Biosci.13:1619-1633中评论,及进一步述于(例如)Riechmann等人,(1988)Nature 332:323-329;Queen等人,(1989)Proc.Natl Acad.Sci.USA 86:10029-10033;美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号及第7,087,409号;Kashmiri等人,(2005)Methods 36:25-34;Padlan,(1991)Mol.Immunol.28:489-498(描述"表面重修");Dall'Acqua等人,(2005)Methods 36:43-60(描述"FR改组");及Osbourn等人,(2005)Methods 36:61-68及Klimka等人(2000)Br.J.Cancer,83:252-260(描述FR改组的"导向选择"方法)中。

[0165] 可用于人源化的人类框架区包括(但不限于):使用"最佳拟合"方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296);源自特定子组的重链可变区的人类抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;及Presta等人(1993)J.Immunol,151:2623);人类成熟(体细胞突变)框架区或人类生殖系框架区(参见,例如,Almagro及Fransson,(2008)Front.Biosci.13:1619-1633);及源自筛选FR库的框架区(参见,例如,Baca等人,(1997)J.Biol.Chem.272:10678-10684及Rosok等人,(1996)J.Biol.Chem.271:22611-22618)。通常,VHH的FR区经人类FR区替换以制备人源化VHH。在一些实施方案中,人类FR的某些FR残基经替换以改善人源化VHH的一种或多种性质。具有此经替换的残基的VHH域于本文中仍称作"经人源化"。

[0166] 如本文中所提供,包含结合白蛋白的VHH域的sdAb可减慢连接其的分子(包括包含人类Fc区的分子)的清除。于各种实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区为人类Fc区,或源自人类Fc区。包含Fc区的非限制性sdAb形式示于图6中。

[0167] 在一些实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区源自人类Fc区,及包含对应于IgG1、E233、L234及L235的低碳数铰链中的三个氨基酸缺失,本文中称作"Fc xELL"。Fc xELL多肽不接合Fc γR及因此称作"效应子沉默"或"效应子零",然而在一些实施方案中,xELL Fc区结合FcRn及因此具有延长的半衰期及与FcRn介导的再循环相关联的转胞吞作用。

[0168] 在一些实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区源自人类Fc区及包含突变M252Y及M428V,其可称作"YV"。在一些实施方案中,此突变增强在核内体的酸性pH(6.5附近)下与FcRn的结合,同时失去在中性pH(约7.2)下的可检测结合,允许增强的FcRn介导的再循环及延长的半衰期。在一些实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区源自人类Fc区及包含突变M252Y、S254T及T256E,其可称作"YTE"。在一些实施方案中,此突变通过显著降低Fc及FcRn的解离速率来延长人类的血清半衰期。在一些实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区源自人类Fc区及包含突变M428L及N434S,其可称作"LS"。在一些实施方案中,此突变通过增加Fc对FcRn在pH 6下的结合亲和力及降低解离速率来延长人类的血清半衰期。可增强循环半衰期的各种Fc突变述于(例如)Saunders,Front.Immunol.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01296(2019)中。

[0169] 在一些实施方案中,包含于白蛋白结合多肽中的Fc区源自人类Fc区及包含经设计用于异二聚的突变,本文中称作“杵(knob)”及“臼(hole)”。在一些实施方案中,该“杵”Fc区包含突变T366W。在一些实施方案中,该“臼”Fc区包含突变T366S、L368A及Y407V。在一些实施方案中,用于异二聚的Fc区包含另外突变,诸如在异二聚Fc对的第一成员上的突变S354C,其与异二聚Fc对的第二成员上的对应突变Y349C形成不对称二硫化物。在一些实施方案中,异二聚Fc对的一个成员包含突变H435R或H435K以防止蛋白A结合,同时维持FcRn结合。在一些实施方案中,异二聚Fc对的一个成员包含突变H435R或H435K,而异二聚Fc对的第二成员未在H435处修饰。于各种实施方案中,臼Fc区包含修饰H435R或H435K(当修饰为H435R时,于一些实施例中称作“臼-R”),而杵Fc区不包含。于一些实施例中,臼-R突变改善可存在的异二聚臼Fc区上的异二聚体的纯化。

[0170] 可用于白蛋白结合多肽中的非限制性示例性Fc区包括包含SEQ ID NO:47-68及85-87的氨基酸序列的Fc区。

[0171] 白蛋白结合多肽的示例性活性

[0172] 于各种实施方案中,本文中提供的白蛋白结合多肽结合至域3外部的白蛋白的表位。在一些实施方案中,本文中提供的白蛋白结合多肽不干扰(即不抑制)白蛋白结合至FcRn。测定白蛋白结合多肽是否干扰白蛋白结合至FcRn的方法为本领域中已知的;本文中还提供非限制性示例性方法。

[0173] 在一些实施方案中,本文中提供的包含白蛋白结合域的多肽较缺少白蛋白结合域的多肽具有更长活体内半衰期。于各种实施方案中,本文中提供的包含白蛋白结合域的多肽具有较不具有白蛋白结合域的多肽的半衰期长至少1.5x、至少2x、至少3x、至少4x或至少5x的半衰期。

[0174] 多肽表达及产生

[0175] 提供包含编码包含白蛋白结合域的多肽的多核苷酸的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子还可编码指导包含白蛋白结合域的多肽的分泌的前导序列,该前导序列通常裂解使得其不存在于经分泌的多肽中。该前导序列可为初始重链(或VHH)前导序列,或可为另一异源前导序列。

[0176] 核酸分子可使用本领域中熟知的重组DNA技术构筑。在一些实施方案中,核酸分子为适用于在选定宿主细胞中表达的表达载体。

[0177] 提供包含编码包含白蛋白结合域的多肽的核酸的载体。此载体包括(但不限于)DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方案中,选择针对多肽于所需细胞类型(诸如CHO或CHO衍生细胞或NSO细胞)中的表达经优化的载体。示例性此载体述于(例如)Running Deer等人,Biotechnol.Prog.20:880-889(2004)中。

[0178] 在一些实施方案中,包含白蛋白结合域的多肽可于原核细胞(诸如细菌细胞)或真核细胞(诸如真菌细胞(诸如酵母)、植物细胞、昆虫细胞及哺乳动物细胞)中表达。此表达可(例如)根据本领域中已知的程序进行。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括(但不限于)COS细胞,包含COS 7细胞;293细胞,包含293-6E细胞;CHO细胞,包含CHO-S、DG44、Lec13 CHO细胞,及FUT8 CHO细胞;PER.C6®细胞(Crucell);及NSO细胞。在一些实施方案中,多肽可于酵母中表达。参见,例如,美国公开案第US2006/0270045 A1号。在一些实施方案中,基于其对多肽进行所需转译后修饰的能力选择特定真核宿主细胞。例如,在一些实施方案中,CHO

细胞产生较293细胞中产生的相同多肽具有更高唾液酸化程度的多肽。

[0179] 一个或多个核酸(诸如载体)至所需宿主细胞的引入可通过任何方法,包括(但不限于)磷酸钙转染、DEAE-葡聚醣介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等实现。非限制性示例性方法述于(例如)Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)中。核酸可于所需宿主细胞中根据任何适宜方法瞬时或稳定转染。

[0180] 还提供包含本文中所述的核酸或载体中的任一者的宿主细胞。在一些实施方案中,提供表达本文中所述的包含白蛋白结合域的多肽的宿主细胞。于宿主细胞中表达的多肽可通过任何适宜方法纯化。此方法包括(但不限于)使用亲和基质或疏水相互作用层析法。适宜亲和配位体包括ROR1 ECD及结合Fc区的剂。例如,蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和管柱可用于结合Fc区及纯化包含Fc区的多肽。疏水相互作用层析法(例如,丁基或苯基管柱)还可适用于纯化一些多肽(诸如抗体)。离子交换层析法(例如,阴离子交换层析法及/或阳离子交换层析法)还可适用于纯化一些多肽(诸如抗体)。混合模式层析法(例如,逆相/阴离子交换、逆相/阳离子交换、亲水相互作用/阴离子交换、亲水相互作用/阳离子交换等)还可适用于纯化一些多肽(诸如抗体)。纯化多肽的许多方法为本领域中已知。

[0181] 在一些实施方案中,多肽于无细胞系统中产生。非限制性示例性无细胞系统述于(例如)Sitaraman等人,Methods Mol.Biol.498:229-44(2009);Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45(2004);Endo等人,Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)中。

[0182] 在一些实施方案中,提供通过上述方法制备的包含白蛋白结合域的多肽。在一些实施方案中,该多肽于宿主细胞中制备。在一些实施方案中,该多肽于无细胞系统中制备。在一些实施方案中,该多肽经纯化。在一些实施方案中,提供包含多肽的细胞培养基。

[0183] 在一些实施方案中,提供通过上述方法制备的包含抗体的组合物。在一些实施方案中,该组合物包含于宿主细胞中制备的包含白蛋白结合域的多肽。在一些实施方案中,该组合物包含于无细胞系统中制备的多肽。在一些实施方案中,该组合物包含经纯化的多肽。

[0184] 使用白蛋白结合多肽治疗疾病的示例性方法

[0185] 在一些实施方案中,提供治疗受试者的疾病的方法,其包括给药本文中提供的包含白蛋白结合域的治疗性多肽。此疾病包括将自利用治疗性多肽治疗受益的任何疾病。可利用本文中提供的包含白蛋白结合域的治疗性多肽治疗的非限制性示例性疾病包括感染性疾病、自体免疫性疾病或病症、炎症性疾病或病症及癌症。该方法包括向受试者给药有效量的本文中提供的包含白蛋白结合域的治疗性多肽。此治疗方法可于人类或动物中。在一些实施方案中,提供治疗人类的方法。

[0186] 本文中提供的包含白蛋白结合域的治疗性多肽可视需要向受试者给药。给药频率的确定可由本领域技术人员作出,诸如主治医师基于正在治疗的病状、正在治疗的受试者的年龄、正在治疗的病状的严重度、正在治疗的受试者的一般健康状态及类似者的考虑。在一些实施方案中,向受试者给药治疗性多肽的有效剂量一或多次。在一些实施方案中,每日、每半周、每周、每两周、每月一次等向受试者给药治疗性多肽的有效剂量。向受试者给药治疗性多肽的有效剂量至少一次。在一些实施方案中,可多次给药治疗性多肽的有效剂量,包括在至少一个月、至少六个月或至少一年的过程内多次。

[0187] 在一些实施方案中,以有效治疗疾病的量给药药物组合物。治疗上有效量通常取

决于正在治疗的受试者的体重、其身体或健康状况、待治疗的病状的广泛性或正在治疗的受试者的年龄。一般而言,抗体可以约0.05mg/kg体重至约100mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约10μg/kg体重至约100mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约50μg/kg体重至约5mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约100μg/kg体重至约10mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约100μg/kg体重至约20mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约0.5mg/kg体重至约10mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约0.05mg/kg体重至约20mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约0.05mg/kg体重至约10mg/kg体重/剂量的范围内的量给药。在一些实施方案中,抗体可以约5mg/kg体重或更低,例如小于4、小于3、小于2或小于1mg/kg的抗体的范围内的量给药。

[0188] 在一些实施方案中,治疗性多肽可于活体内通过各种途径,包括(但不限于)静脉内、动脉内、非经肠、腹膜内或皮下给药。适宜制剂及给药途径可根据预期应用选择。

[0189] 药物组合物

[0190] 在一些实施方案中,包含含白蛋白结合域的多肽的组合物于具有各种各样药学上可接受的载剂的制剂中提供(参见,例如,Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,第20版,(2003);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippencott Williams and Wilkins(2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Pharmaceutical Press(2000))。各种药学上可接受的载剂(其包括媒剂、佐剂及稀释剂)为可得的。此外,各种药学上可接受的辅助物质(诸如pH调节剂及缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂及类似者)还可得。非限制性示例性载剂包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。

[0191] 在一些实施方案中,药物组合物包含以至少10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、125mg/mL、150mg/mL、175mg/mL、200mg/mL、225mg/mL或250mg/mL的浓度的包含白蛋白结合域的多肽。

[0192] 非限制性示例性诊断及治疗方法

[0193] 在一些实施方案中,本文中所述的方法可用于评估受试者及/或来自受试者(例如癌症患者)的样本。在一些实施方案中,评估为诊断、预后及/或对治疗的响应中的一者或多者。

[0194] 在一些实施方案中,本文中所述的方法包括评估蛋白质的存在、不存在或含量。在一些实施方案中,本文中所述的方法包括评估核酸的存在、不存在或表达程度。本文中所述的组合物可用于此测量。在一些实施方案中,评估可指导治疗(包括用本文中所述的多肽治疗)。

[0195] 试剂盒

[0196] 还提供制品及试剂盒,其包含任一如本文中所述的包含白蛋白结合域的多肽及适宜包装。在一些实施方案中,本发明包含具有以下的试剂盒:(i)包含白蛋白结合域的多肽,及(ii)使用试剂盒向受试者给药该多肽的说明书。

[0197] 本文中所述组合物的适宜包装为本领域中已知的,及包括例如小瓶(例如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、罐、弹性包装(例如密封Mylar或塑料袋)及类似者。此制品可进一步经灭菌及/或密封。还提供包含本文中所述组合物的单位剂型。此单位剂型可以单一个或多个单位剂量储存于适宜包装中及还可进一步灭菌及/或密封。以本发明的试剂盒供应的说明书通常为标签或药品说明书的书面说明书(例如包含于试剂盒中的纸张),但是机器可读说明书(例如磁盘或光存储盘上携带的说明书)还可接受。与抗体使用相关的说明书一般包含用于预期治疗或工业用途的剂量、给药计划表及给药途径的信息。试剂盒可进一步包含选择适宜受试者或治疗的描述。

[0198] 容器可为单位剂量、散装包装(bulk package)(例如多剂量包装)或亚单位剂量。例如,还可提供含有本文中所公开分子的足够剂量以提供受试者的有效治疗持续延长时期,诸如约1周、2周、3周、4周、6周、8周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更久的任一者的试剂盒。试剂盒还可包含分子的多个单位剂量及使用说明书及以足以储存及用于药房(例如医院药房及调配药房)的量包装。在一些实施方案中,试剂盒包含干(例如冻干)组合物,其可经复水、再悬浮或再水合以通常形成抗体的稳定水性悬浮液。

[0199] 实施例

[0200] 以下讨论的实施例意欲纯粹为本发明的示例且不应认为以任何方式限制本发明。该等实施例不意欲表示以下实验为进行的所有或唯一实验。已作出努力确保关于使用数目(例如,量、温度等)的精确度,但是一些实验误差及偏差应考虑在内。除非另有指定,否则份数为重量份,分子量为平均分子量,温度为以摄氏度,且压力为在大气压下或接近大气压。

[0201] 实施例1:抗白蛋白单域抗体(sdAb)的开发

[0202] 靶向人类白蛋白的单域抗体经由美洲驼及羊驼与人类血清白蛋白(SEQ ID NO:1)的重组形式的免疫产生。

[0203] 在开发特异性抗白蛋白抗体效价后,将美洲驼/羊驼外周血单核细胞(PBMC)与来自经免疫动物的500mL血液分离及将总mRNA使用Qiagen RNeasy Maxi试剂盒分离及随后使用Thermo Superscript IV逆转录酶及寡聚-dT引发转化成第一股cDNA。将VHH序列经由PCR使用cDNA作为模板特异性扩增及选殖至酵母表面呈现载体作为VHH-Fc-AGA2融合蛋白。Fc为人类IgG1 Fc或在一些情况下,为具有减少的效应功能的变体IgG1 Fc。

[0204] 将呈现VHH-Fc-AGA2融合蛋白的酵母库使用人类白蛋白的重组形式经由磁珠分离接着荧光活化细胞分选(FACS)增浓。将经分选的酵母平板接种及将经分离的纯系挑选至96孔区块中及进行VHH-Fc-AGA2融合蛋白的酵母细胞表面表达的诱导。将经生物素化重组人类白蛋白或无关经生物素化蛋白(白蛋白阴性)直接施覆至经诱导的酵母中,洗涤,用经荧光团标记的链霉抗生物素处理,及通过96孔流动式细胞计数法分析。

[0205] 将结合至经生物素化重组人类白蛋白及不结合至无关经生物素化蛋白的编码VHH的核酸序列与人类Fc xELL编码区框架内选殖至哺乳动物表达载体中,及通过于HEK293自由式细胞(293F细胞)或CHO细胞中使用聚乙烯亚胺的瞬时转染表达。于3至7天后收集上清液,将分泌的重组蛋白通过蛋白A层析法纯化,及自在280nm下的吸亮度及消光系数计算浓度。

[0206] 选择抗白蛋白sdAb 4A01用于人源化。

[0207] 实施例2:抗白蛋白sdAb 4A01与人类及小鼠白蛋白的单价结合

[0208] 单体抗白蛋白sdAb 4A01通过将4A01 VHH融合至包含S364N、Y407N及K409T突变的人类Fc(4A01-NNT-hFc;SEQ ID NO:23及68;图1A)来制备。单体抗白蛋白sdAb 4A01的结合通过ELISA通过将单体sdAb滴定至来自指定物种的经固定白蛋白(Medisorp板)上,及使用抗人类Fc(HRP)检测来评估,如下。

[0209] 将板用指定物种的白蛋白(Sigma)以2μg/ml,50μl/孔涂覆,4℃过夜。将1x鱼胶(阻断剂,Biotium)添加至经涂覆的孔及在RT下培育1小时。添加4A01-NNT-hFc的滴定液(以100nM开始,1:3稀释,最后孔空白),且然后在RT下培育1小时。然后将板用0.1% D-PBST洗涤3次,之后添加抗人类Fc HRP抗体(1:2000于0.1% D-PBST中,Jackson)。将板在RT下培育30分钟,且然后用0.1% D-PBST洗涤3次。然后添加TMB底物及在板读取器(Molecular Devices)上读取在650nm下的吸亮度。将数据使用方程式单位点-总结合(Y=Bmax*X/(Kd+X)+NS*X+背景,GraphPad Prism)绘图。

[0210] 如图1B及图1C中所示,抗白蛋白sdAb 4A01以可相比拟的亲和力结合至人类及小鼠白蛋白二者。人类白蛋白的K_D为0.23nM及小鼠白蛋白的K_D为0.20nM。

[0211] 实施例3:抗白蛋白sdAb 4A01不结合白蛋白域3

[0212] 白蛋白主要透过域3结合至β-2微球蛋白FcRn复合体,及据信该结合涉及融合至抗白蛋白抗体或融合至白蛋白自身的蛋白质的半衰期提高。为测定抗白蛋白sdAb 4A01是否结合至白蛋白域3,4A01-NNT-hFc的结合通过生物层干涉量度分析法评估,如下。

[0213] 将白蛋白域3(小鼠Fc标记)固定在抗小鼠IgG Fc捕获生物传感器上。所有缓冲液/蛋白质制剂为于MBST5(50nM MES pH 5,150mM NaCl,0.025% Tween)中。利用仅缓冲液建立基线。将小鼠Fc标记的人类白蛋白域III(10μg/ml)装载至抗小鼠IgG Fc捕获传感器(ForteBio)上。然后装载抗白蛋白sdAbs 4A01(4A01-NNT-hFc)及1C04(相似形式)及允许与经捕获的生物素域3缔合,接着利用MBST5解离。已知sdAb 1C04结合至白蛋白域3,及用作阳性对照。参见图2A。

[0214] 如图2B中所示,1C04而不是4A01结合至经固定的白蛋白域3。

[0215] 然后测试抗白蛋白sdAb 4A01(4A01-NNT-hFc)、hz4A01v51及1C04干扰白蛋白-FcRn结合,如下。通过生物层干涉量度分析法使用固定在链霉抗生物素传感器上的经生物素化重组FcRn-B2M评估结合。然后将经固定的FcRn-B2M与重组人类白蛋白复合。所有缓冲液/蛋白质制剂为于MBST5(50nM MES pH 5,150mM NaCl,0.025% Tween)中。利用仅缓冲液建立基线。将经生物素化FcRn-B2M(10μg/ml,Acro Biosystems)装载至链霉抗生物素生物传感器(ForteBio)上,并进一步测定基线。然后添加50μM重组人类白蛋白(Sigma)及允许与经固定的FcRn-B2M缔合。然后装载抗白蛋白sdAbs 4A01及4A01v51及sdAb 1C04及允许与经捕获的生物素域3缔合,接着利用MBST5解离。参见图3A。

[0216] 如图2B中所示,4A01及hx4A01v51均结合至与FcRn-B2M缔合的白蛋白,但是1C04不结合。

[0217] 实施例4:抗白蛋白sdAb 4A01的人源化及物种交叉响应性

[0218] sdAb 4A01的各种人源化形式基于人类重链框架VH3-23*04制备。某些氨基酸回突变至供体氨基酸,及测试(例如)CDR2中的某些突变。图4A显示人类重链受体序列与4A01的人源化形式的比对。

[0219] 通过ELISA如下测定单体抗白蛋白sdAbs 4A01(“lm4A01”)及其人源化形式与人类

血清白蛋白、食蟹猕猴血清白蛋白、鼠科血清白蛋白及大鼠血清白蛋白的结合。将Medisorp板用白蛋白以2μg/ml,50μl/孔涂覆,在4℃下过夜(人类、鼠科及大鼠白蛋白-Sigma,食蟹猕猴白蛋白-Abcam)。将1x鱼胶(阻断剂,Bethyl Laboratories)添加至经白蛋白涂覆的孔中,接着在RT下培育1小时。添加sdAb融合蛋白的滴定液(以100nM开始,横向1:3或向下1:4)及在RT下培育1小时。将板用0.1% D-PBST洗涤3次,且然后添加抗人类Fc HRP抗体(1:2000于0.1% D-PBST中,Jackson)并在RT下培育30分钟。将板用0.1% D-PBST洗涤3次,且然后添加TMB底物。在板读取器(Molecular Devices)上读取在650nm下的吸亮度及将数据使用方程单位点-总结合(Y=Bmax*X/(Kd+X)+NS*X+背景,GraphPad Prism)绘图。

[0220] 4A01及4A01的人源化形式与人类白蛋白的结合示于图4B至4C中。所有sdAb以0.10与0.43nM之间的K_D结合人类白蛋白。4A01及4A01的人源化形式与食蟹猕猴白蛋白的结合示于图4D至4E中。所有sdAb以0.11与0.34nM之间的K_D结合食蟹猕猴白蛋白。4A01及4A01的人源化形式与鼠科白蛋白的结合示于图4F至4G中。所有sdAb以0.11与约0.25nM之间的K_D结合鼠科白蛋白。4A01及4A01的人源化形式与大鼠白蛋白的结合示于图4H至4I中。所有sdAb以0.14与约0.33nM之间的K_D结合大鼠白蛋白。

[0221] 图5A至5D显示4A01及人源化hz4A01v51与人类(5A)、食蟹猕猴(5B)、鼠科(5C)及大鼠(5D)白蛋白的结合。所测试的4A01及所有人源化变体以小于1nM的亲和力结合所有四个物种的白蛋白。人源化hz4A01v51以小于0.3nM的亲和力结合所有四个物种的白蛋白,并达成大于90%的最大结合。

[0222] 实施例5:单域抗体多肽与人类白蛋白的结合

[0223] 通过ELISA测试人源化单域抗体(sdAb)多肽与人类白蛋白在中性(7.4)或核内体(6)pH下的结合。将96-孔ELISA板用含2μg/mL重组白蛋白的PBS涂覆,在4℃下过夜,用PBS/0.05%Tween-20(PBS-T)洗涤且然后在室温下用含5%乳粉的PBS-T阻断2小时。于PBS pH 7.4或含有20mM His、150mM NaCl的缓冲液pH 6中制备测试物品的连续稀释液及添加至板中。将板在4℃下培育1小时。于培育后,将细胞于各自缓冲液中洗涤且然后在室温下用检测sdAb的辣根过氧化物酶(HRP)结合抗受试者遗传型抗体培育30分钟。将板于其各自缓冲液中洗涤及添加TMB底物。允许HRP-TMB反应显影6分钟且然后利用等体积的HCl基停止溶液停止。利用96孔板读取器测量在450nm下的吸亮度。将数据使用GraphPad Prism分析软件绘图及分析。结果示于图7中。

[0224] 如图7A及图7B中所示,如图6(iii)中所示经形式化的包含SEQ ID NO:43(hz4A01v51VHH)的白蛋白结合域及非哺乳动物靶向的结合域的二价双特异性sdAb多肽(cx11917)以低纳摩尔至亚纳摩尔亲和力结合白蛋白。表观亲和力仅受pH轻微影响,与在pH 6下2nM的K_d相比,在中性pH(7.4)下具有0.7nM的K_d。结合仅通过单价靶向白蛋白的sdAb亚单元介导,因为如图6(iii)中所述经形式化的包含两个非哺乳动物靶向的结合域的sdAb多肽(cx11916)在所测试的任何pH下不以可观亲和力结合白蛋白。

[0225] 实施例6:白蛋白结合单域抗体多肽的物种交叉响应性

[0226] 通过ELISA测试包含hz4A01v51 VHH(SEQ ID NO:43)及单体Fc区(具有S364N、Y407N及K409T取代的Fc区,SEQ ID NO:68)的人源化单域抗体(sdAb)多肽(cx5009,SEQ ID 69)与重组人类、食蟹猕猴、小鼠或大鼠白蛋白在中性(7.4)pH下的结合。将96-孔ELISA板用含2μg/mL重组白蛋白的PBS涂覆,在4℃下过夜,用PBS/0.05%Tween-20(PBS-T)洗涤且然后

在室温下用1x鱼胶阻断1小时。于PBS-T pH 7.4中制备测试物品的连续稀释液及添加至板中。将板在室温下培育1小时。在培育后,将细胞于PBS-T中洗涤且然后在室温下用特异性针对人类IgG1的HRP结合二级抗体培育30分钟。然后将板洗涤,之后添加TMB底物。允许HRP-TMB反应显影及利用96孔板读取器测量在650nm下的吸亮度。将数据使用GraphPad Prism分析软件绘图及分析。结果示于图8中。

[0227] 如图8中所示,cx5009,如图6(ii)中所示经形式化的单价白蛋白特异性sdAb,hz4A01v51 VHH-hIgG1-xELL-NNT-Fc(SEQ ID NO:69)结合至来自人类、食蟹猕猴、小鼠及大鼠的白蛋白。在中性pH(7.4)下的表观亲和力跨物种相似,具有亚纳摩尔范围(约0.2nM)的K_d。

[0228] 实施例7:白蛋白结合单域抗体多肽的活体内药物动力学谱

[0229] 在健康小鼠中,测试白蛋白结合单域抗体(sdAb)延长人类IgG的血清暴露的能力。将对小鼠白蛋白交叉响应性且经形式化为hz4A01v51 VHH-hIgG1-xELL-Fc的人源化二价sdAb多肽(cx11956,SEQ ID NO:70)的药物动力学(PK)谱与对小鼠非交叉响应性但是以相同VHH-hIgG1-xELL-Fc结构形式化的二价sdAb多肽(cx11851)的药物动力学(PK)谱相比。人类IgG1的xELL变体减少Fc γ受体结合,但是不影响FcRn结合。此于活体外使用生物层干涉量度分析法证实。人类IgG1与小鼠FcRn具有交叉响应性,使能人类抗体在小鼠中的FcRn介导的再循环。

[0230] 为测定sdAb-hIgG xELL-Fc测试物品的PK谱,将BALB/c小鼠用30mg/kg或0.3mg/kg单一剂量静脉内注射及于测试物品注射30分钟、6小时、24小时、96小时及168小时后抽取血清样品。通过ELISA测定小鼠血清中的测试物品浓度。针对PK ELISA,通过将含于PBS中的4μg/mL蛋白质溶液在4℃下培育12小时将人类FcRn/B2M异二聚体蛋白(His标签,Acro Biosystem)固定在96孔ELISA板上。第二天,将板用3% BSA TBS-T缓冲液阻断2小时,之后将此板上的血清样品培育2小时。使用能结合sdAb的HRP结合二级抗受试者遗传型检测抗体来检测血清样品中的测试物品与固定在ELISA板上的FcRn的结合。将二级抗体在板上培育1小时及将结合使用TMB底物溶液可视化,接着添加停止溶液(1M H_2SO_4)并在Emax分光亮度计(Molecular Devices)上测量在450nm下的吸亮度。于SoftMax Pro中使用具有已知浓度的蛋白质的标准曲线将吸亮度值转化成测试物品浓度。使用4-参数逻辑回归将标准曲线拟合。将数据使用GraphPad Prism分析软件输出及绘图。

[0231] 如图9中所示,靶向白蛋白的sdAb多肽可减慢人类IgG1的清除且当连接至IgG1时,延长血清暴露。于30mg/kg(图9A)或0.3mg/kg(图9C)的单剂量后,抗白蛋白hz4A01v51VHH-IgG1 xELL-Fc(cx11956)于血清中的绝对浓度显著高于不结合白蛋白的具相等大小的非靶向VHH-IgG1 xELL-Fc(cx11851)的浓度。尽管注射等量蛋白质cx11851,但是于注射30分钟后的CMax含量已低于cx11956的那些。另外,非靶向构建体(cx11851)的更快速清除于注射后之前6小时内继续,如标准化图(图9B及图9D)中所示。相对于cMax(30分钟)时间点,非靶向cx11851浓度于30mg/kg剂量水平队组中6小时下降几乎60%,然而白蛋白结合cx11956浓度仅下降约12%(图10B)。相似地,在低剂量水平(0.3mg/kg)下,与针对非白蛋白结合cx11851的CMax的约72%相比,白蛋白结合cx11956的浓度下降至Cmax的仅约87%。

[0232] 此发现结果证实,白蛋白结合VHH域可增强IgG抗体的血清暴露。不意欲局限于任何特定理论,与IgG/FcRn介导的再循环无关地自白蛋白/FcRn再循环通道可导致增强的血

清暴露。

[0233] 为证实人类IgG1-xELL及野生型人类IgG与FcRn的等效结合,通过生物层干涉量度分析法使用Octet96 Red读取器(Sartorius)测试利用两种IgG1 Fc变体中的任一者形式化的sdAb多肽与重组人类FcRn/B2M的结合。简而言之,将经生物素化人类FcRn/B2m装载至链霉抗生物素生物传感器上。通过将传感器浸渍于100nM测试物品稀释液中来测量测试物品的缔合60秒。将测试物品于含有50mM MES、150mM NaCl及0.025％Tween-20的pH6的缓冲液或具有50mM Tris、150mM NaCl及0.025％Tween-20的pH 8的缓冲液稀释。通过将传感器浸渍于不具有测试物品的各自pH缓冲液中来进行测试物品解离300秒。使用Forte数据分析软件输出缔合及解离曲线。

[0234] 结果示于图10中。用于此研究中的IgG1 xELL Fc的FcRn结合与野生型IgG1 Fc的FcRn结合可相比拟。两种分子显示在pH 6下的相似缔合速率并在pH 8下具有对FcRn的不可观亲和力。因此,期望白蛋白结合VHH域增强具有野生型IgG1 Fc域的分子以及具有IgG1 xELL域的分子的血清暴露。

[0235] 实施例8:各种单域抗体形式与人类白蛋白的结合

[0236] 通过ELISA评价不同单特异性及双特异性白蛋白结合单域抗体形式在中性(7.4)pH下结合重组人类白蛋白及第二标靶(IL-4R)的能力。评价包含经由6或12个残基的甘氨酸-丝氨酸接头连接至xELL Fc区的C端末端的靶向白蛋白的sdAb(hz4A01v51 VHH)的单特异性抗体、包含IL-4R靶向抗体(度匹鲁单抗(dupilumab))的Fab域(VL-CL(SEQ ID NO:77)及VH-CH1(SEQ ID NO:76))、IgG1或IgG4 Fc区及位于不同位置的靶向白蛋白的sdAb(hz4A01v51 VHH)的双特异性抗体,及缺少靶向白蛋白的sdAb的单特异性对照IL-4R靶向分子。用于此研究中的测试物品名称及多肽的一般结构概述于表2中。针对ELISA,将96-孔ELISA板(MaxiSorb,Biolegend)于PBS中用人类白蛋白或IL4R以1μg/mL(100μL/孔)涂覆,在4℃过夜。将板于0.05％ PBST(150μL/孔)中洗涤3x次且然后在RT下用含酪蛋白的0.05％PBST(200μL/孔)阻断2小时。将板于0.05％ PBST中洗涤3x次,及将100μL含经滴定测试物品的0.05％ PBST添加至板的孔中(起始100nM,1:3稀释液,11-点滴定)并在4℃下培育1小时。于另一洗涤后,然后将板在室温下用特异性针对人类IgG1的含HRP结合二级抗体的0.05％PBST(100μL/孔)(Jackson ImmunoResearch)培育30分钟。然后将板再次洗涤,之后添加TMB底物(100μL/孔),其允许在添加至板中之前达到RT。允许将HRP-TMB反应显影约10分钟,然后添加TMB停止缓冲液(100μL/孔)并在板读取器上在450nm下测量吸亮度,其中减去在650nm下的吸亮度(Molecular Devices)。将数据使用GraphPad Prism分析软件绘图及分析。结果示于图11A至11B中。

[0237] 表2

[0238]

名称	一般结构†	Fc区的类型	SEQ ID NO:
cx12583^	Fc区-GS6-VHH	人类IgG1 xELL	77
cx12584^	Fc区-GS12-VHH	人类IgG1 xELL	78
cx12585*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-Fc区(重链)	人类 IgG1 xELL	79
cx12587*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-Fc区-VHH (重链)	人类IgG1 xELL	80
cx12596*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-VHH-Fc区(重链)	人类IgG1 xELL	81

[0239]

cx12590*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-Fc区(重链)	人类IgG4 (PYV)	82
cx12594*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-Fc区-VHH (重链)	人类IgG4 (PYV)	83
cx12595*	VL-CL (轻链)	n/a	75
	VH-CH1-VHH-Fc区(重链)	人类IgG4 (PYV)	84

VHH =白蛋白结合VHH 4A01v51
VL-CL =度匹鲁单抗的轻链
VH-CH1 =度匹鲁单抗的可变重链及恒定区1
^显示同二聚体的一条链；参见，例如，图6(iii)
*具有两条轻链及两条重链的四聚体的一条轻链及一条重链；参见，例如，图6(v)及6(vii)

[0240] 如图11A中所示,包含抗白蛋白VHH的所有分子展示与白蛋白的结合,其中包含CH1与Fc区之间的VHH的多肽展示较具有Fc区的抗白蛋白VHH C-端的分子对白蛋白稍微更高亲和力。针对缺少抗白蛋白VHH的分子(cx12585及cx12590)未观察到结合。如图11B中所示,包含第二标靶的结合域(即,度匹鲁单抗的Fab域)的所有分子展示与第二标靶IL-4R的结合,具有极相似亲和力,证实白蛋白结合域的存在不干扰与第二标靶的结合。针对缺少第二标靶的结合域的分子(cx12583及cx12584)未观察到结合。此数据连同实施例7中呈现的数据显示,当位于分子的N-端、C-端或多肽内(例如,域之间)时,靶向白蛋白的sdAb可介导白蛋白结合。因此,期望白蛋白结合VHH域增强分子(包括包含Fc的分子)的血清暴露,不管白蛋白结合VHH域定位在何处。

[0241] 实施例9:抗白蛋白sdAb Hz4A01v51的修饰

[0242] 将Hz4A01v51的框架区进一步修饰,包括通过回突变供体氨基酸的某些残基及/或引入替代带电残基。经修饰的VHH(Hz4A01v51.9、Hz4A01v51.11、Hz4A01v51.12及Hz4A01v51.13)为用于产生单价(融合至Fc NTT的VHH)抗白蛋白结合分子,其具有图6(ii)中所示的一般结构。若干(Hz4A01v51.9、Hz4A01v51.12及Hz4A01v51.13)也用于产生二价(融合至Fc xELL的VHH)抗白蛋白结合分子,其具有图6(i)中所示的一般结构。通过ELISA如下测定单价及二价抗白蛋白分子及单价Hz4A01v51-NNT-hFc与人类血清白蛋白在pH6.0下并在pH 7.0下的结合。将板(MaxiSorb,Biolegend)于PBS中用白蛋白以2μg/mL(100μL)涂覆,在4℃下过夜,或于20mM His-HCl,150mM NaCl pH 6中用白蛋白以2μg/mL(100μL)涂覆,在4℃下过夜。将板于0.05％ PBST中或用pH 6缓冲液洗涤3x次且然后在RT下用5％乳PBST阻断2小时。将板于0.05％ PBST中或用pH 6缓冲液洗涤3x次及将含于PBST中的测试物品的滴定液或pH 6缓冲液添加至板中(起始100nM,1:5稀释液)并在4℃下培育1小时。在另一洗

涤后,然后将板在室温下用特异性针对人类IgG1的HRP结合二级抗体培育30分钟。然后将板洗涤,之后添加TMB底物。允许HRP-TMB反应显影6分钟,添加TMB停止缓冲液并在板读取器(Molecular Devices)上在450nm下测量吸亮度。将数据使用GraphPad Prism分析软件绘图及分析。针对阴性对照及ELL样品,不测试0.16nM滴定点。

[0243] 在单价形式中,经修饰的抗白蛋白抗体展示在pH 6(图12A)及pH 7.4(图12B)下的相似结合谱且所有展示优于针对Hz4A01v51,特别在pH 6下观察到的结合改善的结合。在二价形式中,Hz4A01v51.9及Hz4A01v51.13展示优于Hz4A01v51在pH 6(图12C)及pH 7.4(图12D)下改善的相似结合谱。

[0244] 本发明可在不背离其精神或基本特征下以其他特定形式实施。因此,认为上述实施例于所有方面为说明性而非限制本发明。因此,本发明的范围通过随附申请专利范围而非通过上述描述指定,及因此位于申请专利范围的含义及等效范围内的所有变化意欲包含于本文中。

[0245] 某些序列的表

SEQ ID NO	描述	序列		
1	人类血清白蛋白(HSA); UniProtKB/ Swiss-Prot: P02768.2；成熟形式：氨基酸25-609	MKWVTFISLL VAHRFKDLGE EDHVKLVNEV HTLFGDKLCT ERNECFLQHK FHDNEETFLK FAKRYKAAFT DEGKASSAKQ ARLSQRFPKA HGDLLECADD ECCEKPLLEK ADFVESKDVC RHPDYSVVLL HECYAKVFDE QLGEYKFQNA SRNLGKVGSK LNQLCVLHEK CFSALEVDET SEKERQIKKQ VMDDFAAFVE AASQAALGL	FLFSSAYSRG ENFKALVLIA TEFAKTCVAD VATLRETYGE DDNPNLPRLV KYLYEIARRH ECCQAADKAA RLKCASLQKF EFAEVSKLVT RADLAKYICE SHCIAEVEND KNYAEAKDVF LRLAKTYETT FKPLVEEPQN LLVRYTKKVP CCKHPEAKRM TPVSDRVTKC YVPKEFNAET TALVELVKHK KCCKADDKET	VFRRDAHKSE FAQYLQQCPF ESAENCDKSL MADCCAKQEP RPEVDVMCTA PYFYAPELLF CLLPKLDELR GERAFKAWAV DLTKVHTECC NQDSISSKLK EMPADLPSLA LGMFLYEYAR LEKCCAAADP LIKQNCELFE QVSTPTLVEV PCAEDYLSVV CTESLVNRRP FTFHADICTL PKATKEQLKA CFAEEGKKLV
2	鼠科血清白蛋白(MSA); UniProtKB/ Swiss-Prot: P07724.3；成熟形式：氨基酸25-608	MKWVTFLLLL IAHRYNDLGE DEHAKLVQEV HTLFGDKLCA ERNECFLQHK FKENPTTFMG YAEQYNEILT EKALVSSVRQ ARLSQTFPNA HGDLLECADD TCCDKPLLKK ADFVEDQEVC RHPDYSVSLL PACYGTVLAE KLGEYGFQNA ARNLGRVGTK LNRVCLLHEK CFSALTVDET PEKEKQIKKQ VMDDFAQFLD TRCKDALA	FVSGSAFSRG QHFKGLVLIA TDFAKTCVAD IPNLRENYGE DDNPSLPPFE HYLHEVARRH QCCAEADKES RMKCSSMQKF DFAEITKLAT RAELAKYMCE AHCLSEVEHD KNYAEAKDVF LRLAKKYEAT FQPLVEEPKN ILVRYTQKAP CCTLPEDQRL TPVSEHVTKC YVPKEFKAET TALAELVKHK TCCKAADKDT	VFRREAHKSE FSQYLQKCSY ESAANCDKSL LADCCTKQEP RPEAEAMCTS PYFYAPELLY CLTPKLDGVK GERAFKAWAV DLTKVNKECC NQATISSKLQ TMPADLPAIA LGTFLYEYSR LEKCCAEANP LVKTNCDLYE QVSTPTLVEA PCVEDYLSAI CSGSLVERRP FTFHSDICTL PKATAEQLKT CFSTEGPNLV
3	食蟹猕猴血清白蛋白(CSA)；成熟形式：氨基酸25-608	MKWVTFISLL VAHRFKDLGE EEHVKLVNEV HTLFGDKLCT ERNECFLQHK FHDNEATFLK FAARYKAAFA DEGKASSAKQ ARLSQKFPKA HGDLLECADD ECCDKPLLEK ADYVESKDVC RHPDYSVMLL HECYAKVFDE	EHFKGLVLVA TEFAKTCVAD VATLRETYGE DDNPNLPPLV KYLYEVARRH ECCQAADKAA RLKCASLQKF EFAEVSKLVT RADLAKYMCE SHCLAEVEND KNYAEAKDVF LRLAKAYEAT FQPLVEEPQN	FSQYLQQCPF ESAENCDKSL MADCCAKQEP RPEVDVMCTA PYFYAPELLF CLLPKLDELR GDRAFKAWAV DLTKVHTECC NQDSISSKLK EMPADLPSLA LGMFLYEYAR LEKCCAAADP LVKQNCELFE

[0246]

		QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGAK CCKLPEAKRM PCAEDYLSVV LNRLCVLHEK TPVSEKVTKC CTESLVNRRP CFSALELDEA YVPKAFNAET FTFHADMCTL SEKEKQVKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKG VMDNFAAFVE KCCKADDKEA CFAEEGPKFV AASQAALA
4	大鼠血清白蛋白(RSA)；UniProtKB/ Swiss-Prot: P02770.2；成熟形式：氨基酸25-608	MKWVTFLLLL FISGSAFSRG VFRREAHKSE IAHRFKDLGE QHFKGLVLIA FSQYLQKCPY EEHIKLVQEV TDFAKTCVAD ENAENCDKSI HTLFGDKLCA IPKLRDNYGE LADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPPFQ RPEAEAMCTS FQENPTSFLG HYLHEVARRH PYFYAPELLY YAEKYNEVLT QCCTESDKAA CLTPKLDAVK EKALVAAVRQ RMKCSSMQRF GERAFKAWAV ARMSQRFPNA EFAEITKLAT DVTKINKECC HGDLLECADD RAELAKYMCE NQATISSKLQ ACCDKPVLQK SQCLAEIEHD NIPADLPSIA ADFVEDKEVC KNYAEAKDVF LGTFLYEYSR RHPDYSVSLL LRLAKKYEAT LEKCCAEGDP PACYGTVLAE FQPLVEEPKN LVKTNCELYE KLGEYGFQNA VLVRYTQKAP QVSTPTLVEA ARNLGRVGTK CCTLPEAQRL PCVEDYLSAI LNRLCVLHEK TPVSEKVTKC CSGSLVERRP CFSALTVDET YVPKEFKAET FTFHSDICTL PDKEKQIKKQ TALAELVKHK PKATEDQLKT VMGDFAQFVD KCCKAADKDN CFATEGPNLV ARSKEALA
5	4A01、Hz4A01v1、Hz4A01v3、Hz4A01v4、Hz4A01v5、Hz4A01v6、Hz4A01v8、Hz4A01v9、Hz4A01v3-5、Hz4A01v3-7、Hz4A01v3-8 CDR1	GFAFSTSGMV
6	Hz4A01v3-1、Hz4A01v3-7.1k-RITA、Hz4A01v3-7.1k-RITI、Hz4A01v3-7.1k-RITL、Hz4A01v3-7.1k-RITS、Hz4A01v3-7.1k-RITT、Hz4A01v3-7.1k-RITV、Hz4A01v51、Hz4A01v51.9、Hz4A01v51.11、Hz4A01v51.12、Hz4A01v51.13 CDR1	GFTFSTSGMV
7	Hz4A01v3-3 CDR1	GFAFSTSGMA
8	Hz4A01v3-4 CDR1	GFAFSTSGMS
9	4A01、Hz4A01v1 CDR2	TISDDSRIIR
10	Hz4A01v4 CDR2	TISDESRIIR
11	Hz4A01v5 CDR2	TISDEGRIIR
12	Hz4A01v6 CDR2	TISDSGRIIR
13	Hz4A01v8 CDR2	TISDNARIIR
14	Hz4A01v9 CDR2	TISDDTRIIR
15	Hz4A01v3	TISDDARIIR

[0247]

	Hz4A01v3-1、Hz4A01v3-3、Hz4A01v3-4、Hz4A01v3-5、Hz4A01v3-7、Hz4A01v3-8 CDR2	
16	Hz4A01v3-7.1k-RITA CDR2	TISDDARITA
17	Hz4A01v3-7.1k-RITI CDR2	TISDDARITI
18	Hz4A01v3-7.1k-RITL CDR2	TISDDARITL
19	Hz4A01v3-7.1k-RITS CDR2	TISDDARITS
20	Hz4A01v3-7.1k-RITT CDR2	TISDDARITT
21	Hz4A01v3-7.1k-RITV、Hz4A01v51、Hz4A01v51.9、Hz4A01v51.11、Hz4A01v51.12、Hz4A01v51.13 CDR2	TISDDARITV
22	4A01、Hz4A01v1、Hz4A01v3、Hz4A01v4、Hz4A01v5、Hz4A01v6、Hz4A01v8、Hz4A01v9、Hz4A01v3-1、Hz4A01v3-3、Hz4A01v3-4、Hz4A01v3-5、Hz4A01v3-7、Hz4A01v3-8、Hz4A01v3-7.1k-RITA、Hz4A01v3-7.1k-RITI、Hz4A01v3-7.1k-RITL、Hz4A01v3-7.1k-RITS、Hz4A01v3-7.1k-RITT、Hz4A01v3-7.1k-RITV、Hz4A01v51、Hz4A01v51.9、Hz4A01v51.11、Hz4A01v51.12、Hz4A01v51.13 CDR3	YRAGSRIGSYEDYY
23	4A01 VHH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QATGKGLEWVSTISDDSRIIRYADSVNGRFTISRDNAENT LYLLMNSLKPEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TQVTVSS
24	Hz4A01v1	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDSRIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
25	Hz4A01v3	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
26	Hz4A01v4	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDESRIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP

[0248]

27	Hz4A01v5	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDEGRIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
28	Hz4A01v6	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDSGRIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
29	Hz4A01v8	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDNARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
30	Hz4A01v9	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDTRIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
31	Hz4A01v3-1	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
32	Hz4A01v3-3	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMAWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
33	Hz4A01v3-4	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMSWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
34	Hz4A01v3-5	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWYR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQG TLVTVKP
35	Hz4A01v3-7	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
36	Hz4A01v3-8	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYWGQ GTLVTVKP
37	Hz4A01v3-7.1k-RITA	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITAYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
38	Hz4A01v3-7.1k-RITI	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITIYAESVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
39	Hz4A01v3-7.1k-RITL	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITLYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
40	Hz4A01v3-7.1k-RITS	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITSYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
41	Hz4A01v3-7.1k-RITT	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITTYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP

[0249]

42	Hz4A01v3-7.1k-RITV	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
43	Hz4A01v51 VHH	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKP
71	Hz4A01v51.9 VHH	QVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVEP
72	Hz4A01v51.11 VHH	QVQLLESGGGKVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVEP
73	Hz4A01v51.12 VHH	EVQLLESGGGKVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVEP
74	Hz4A01v51.13 VHH	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVRP
69	cx5009	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKPGGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVNLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLNSTLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSG GGGS
70	cx11956 (显示同二聚体的一条链)	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVR QAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQ GTLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
75	度匹鲁单抗VL-CL (cx12585、cx12587、cx12596、cx12590、cx12594、cx12595中的轻链)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSIGYNYLDW YLQKSGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	度匹鲁单抗VH-CH1	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
77	cx12583 (显示同二聚体的一条链)	GGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY

[0250]

		PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGG SEVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWV RQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAK NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRG QGTLVTVKP
78	cx12584 (显示同二聚体的一条链)	GGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSG GGSGGGSEVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTS GMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSY EDYYRGQGTLVTVKP
79	cx12585重链(显示四聚体的一条链)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVDKTHTCPPCP APGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
80	cx12587重链(显示四聚体的一条链)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVDKTHTCPPCP APGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGGSGGSEVQLVESGGGEVQ PGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTIS DDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAED TAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
81	cx12596重链(显示四聚体的一条链)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGSGGSEVQ LVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAP GKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTL VTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS P
82	cx12590重链(显示四聚体的	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR

[0251]

	一条链)	QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSLG
83	cx12594重链(显示四聚体的一条链)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSLGGSGGSEVQLVESGGG EVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWV STISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
84	cx12595重链(显示四聚体的一条链)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVR QAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGSGGSEVQ LVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAP GKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTL VTVKPGGGGESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLYISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLS LSLG
47	人类IgG1 Fc区	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	人类IgG1 Fc xELL	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	IgG1 Fc区M252Y及M428V (YV) S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0252]

50	IgG1 Fc区M252Y、M428V、H435R (YVR) T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
51	IgG1 Fc区xELL H435R	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
52	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428V (YV)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428L (YL)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428L、H435R (YLR)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
55	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428V、H435R (YVR)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
56	IgG1 Fc区xELL S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	IgG1 Fc区xELL H435R S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
58	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428V (YV) S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428L (YL) S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0253]

60	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428L、H435R (YLR) S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428V、H435R (YVR) S354C T366W杵	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
62	IgG1 Fc区xELL T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	IgG1 Fc区xELL H435R、T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
64	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428V (YV) T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	IgG1 Fc区xELL M252Y及M428L (YL) T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428L、H435R (YLR) T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
67	IgG1 Fc区xELL M252Y、M428V、H435R (YVR) T366S、L368A、Y407V白	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
68	IgG1 Fc区S364N、Y407N及K409T (NNT)	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVNLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLNSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG
85	人类IgG4 Fc区	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0254]

86	IgG4 Fc区S228P (P)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
87	IgG4 Fc区S228P、M252Y及M428V (PYV)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
88	接头1	GGGG
89	接头2	GSGGGS
90	接头3	GGSGGS
91	接头4	GGGSGGGSGGGS
92	接头5	GSGGS
93	接头6	GGSGGGSGGGS
94	VH3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC

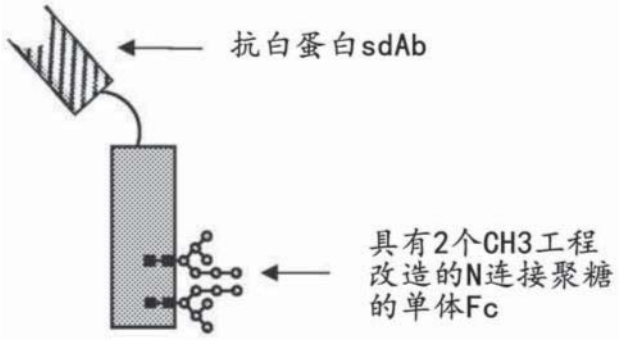

抗白蛋白sdAb
具有2个CH3工程
改造的N连接聚糖
的单体Fc

图1A

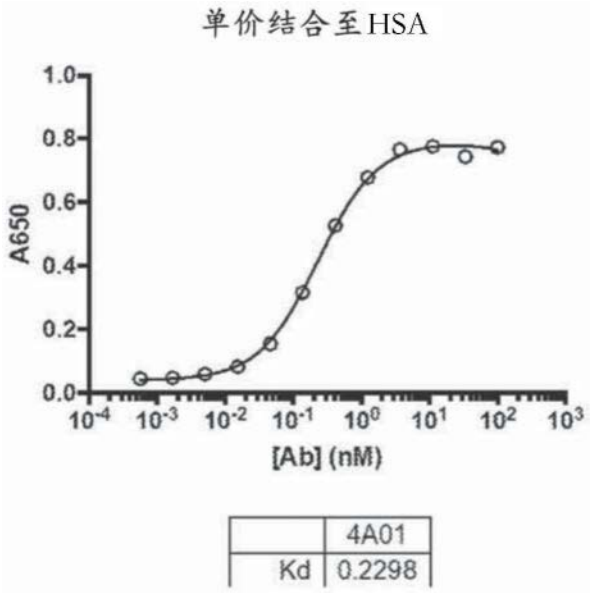

单价结合至HSA
A650
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10-4 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103
[Ab] (nM)
4A01
Kd 0.2298

图1B

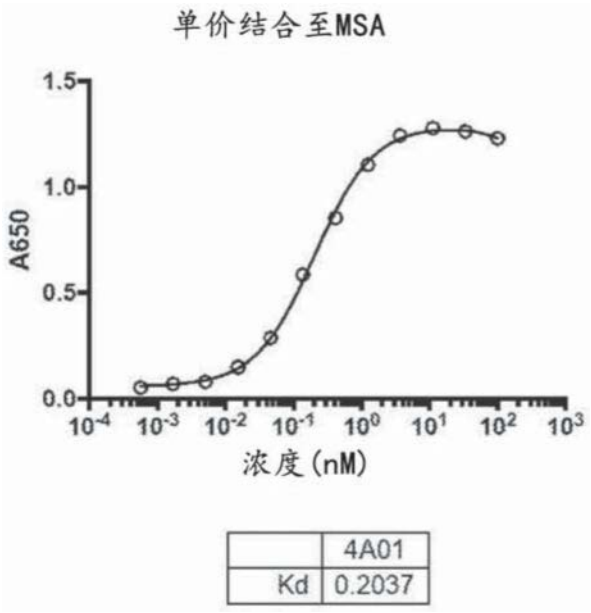

单价结合至MSA
A650
1.5
1.0
0.5
0.0
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
浓度(nM)
4A01
Kd
0.2037

图1C

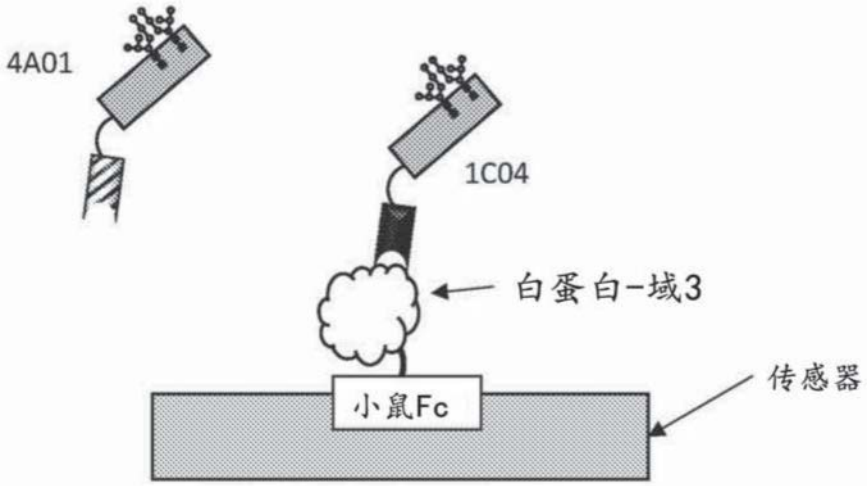

4A01
1C04
白蛋白-域3
小鼠Fc
传感器

图2A

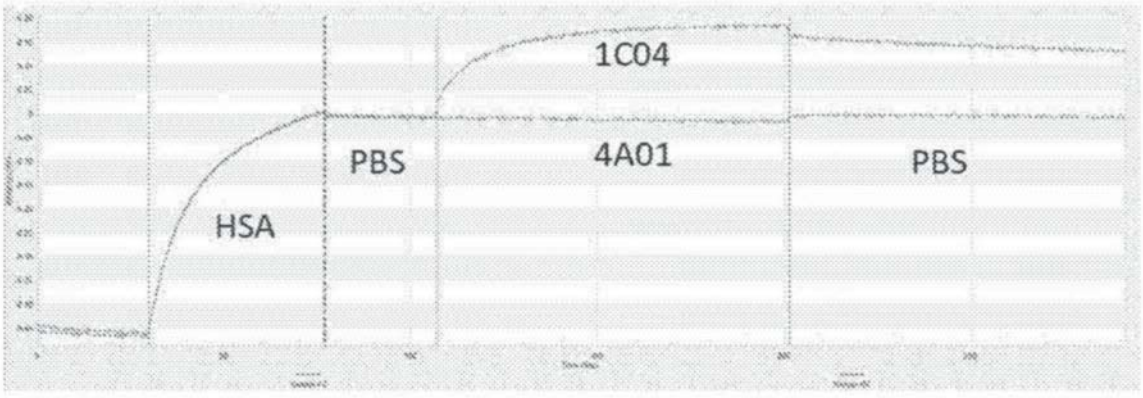

1C04
PBS
4A01
PBS
HSA

图2B

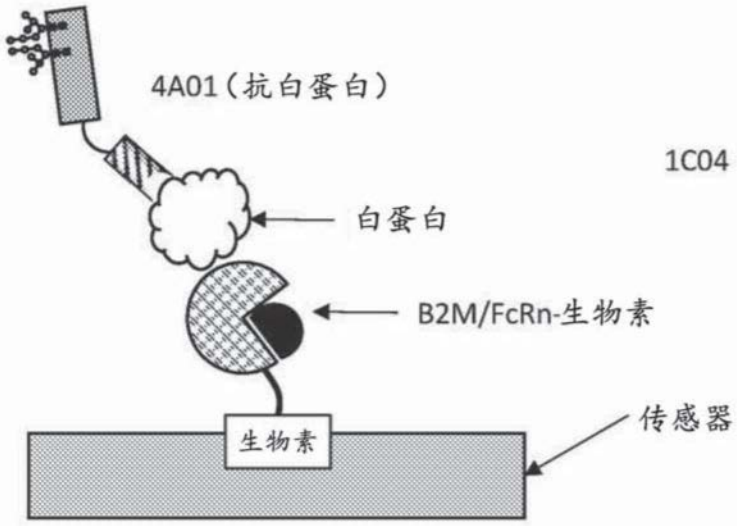

4A01(抗白蛋白)
1C04
白蛋白
B2M/FcRn-生物素
传感器
生物素

图3A

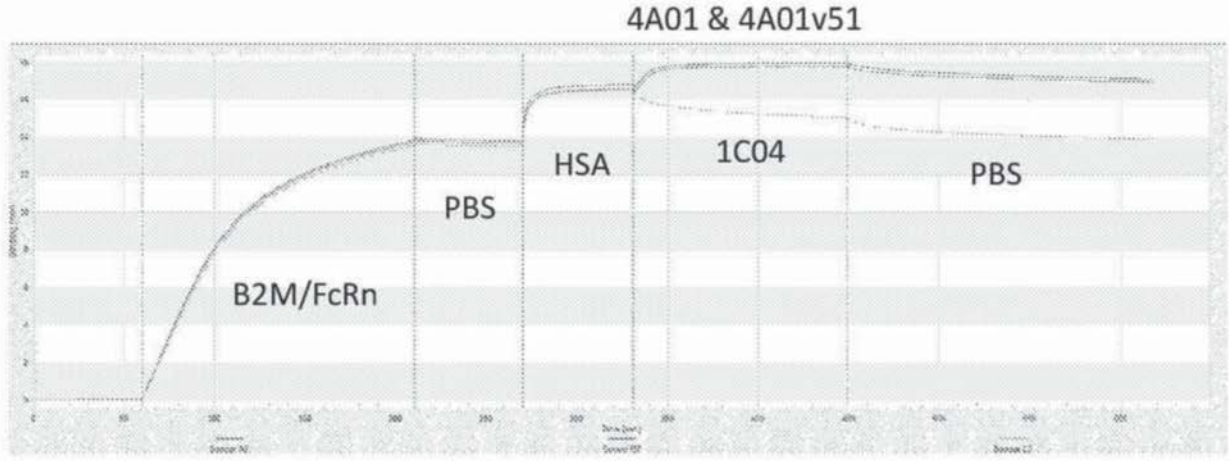
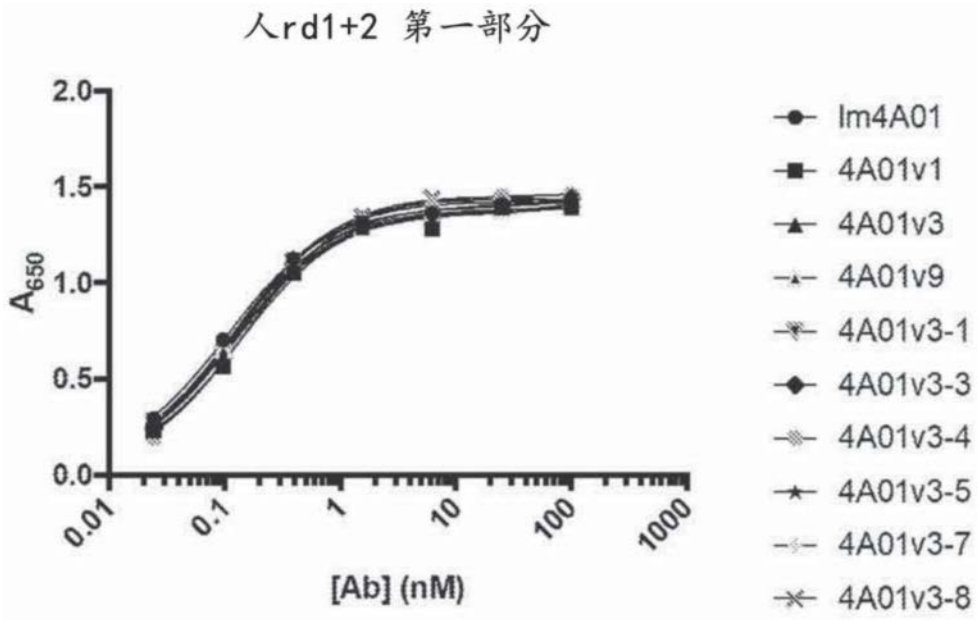

4A01 & 4A01v51
HSA
1C04
PBS
PBS
B2M/FcRn

图3B

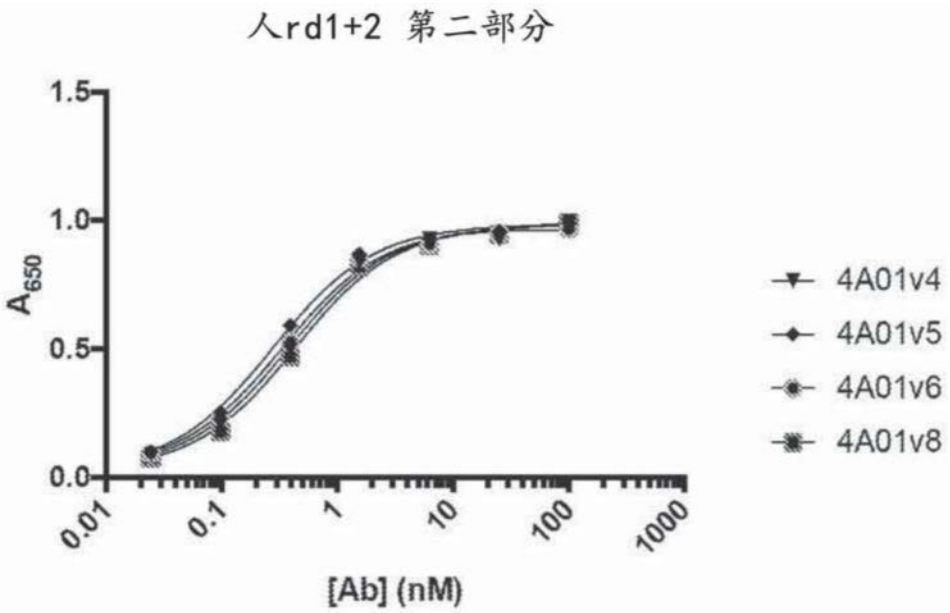
```
4A01v3-7.1k-RITA      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITAY
4A01v3-7.1k-RITI      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITIY
4A01v3-7.1k-RITL      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITLY
4A01v3-7.1k-RITS      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITSY
4A01v3-7.1k-RITT      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITTY
4A01v3-7.1k-RITV      EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVY
4A01v51               EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVY
4A01v4                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDESRIIRY
4A01v5                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDEGRIIRY
4A01v6                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDSGRIIRY
4A01v1                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDSRIIRY
4A01v9                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDTRIIRY
4A01v8                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDNARIIRY
4A01v3                EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-5              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWYRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-8              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-3              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMAWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-4              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMSWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-7              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
4A01v3-1              EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARIIRY
VH3-23*04             EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY
                      ********** **** ***********:**; .* * ************:**..     *

4A01v3-7.1k-RITA      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7.1k-RITI      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7.1k-RITL      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7.1k-RITS      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7.1k-RITT      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7.1k-RITV      AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v51               AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v4                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v5                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v6                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v1                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v9                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v8                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3                AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-5              AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-8              AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYWGQGTLVT
4A01v3-3              AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-4              AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-7              AESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
4A01v3-1              AESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVT
VH3-23*04             ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                      *;************;***;******************
```

图4A



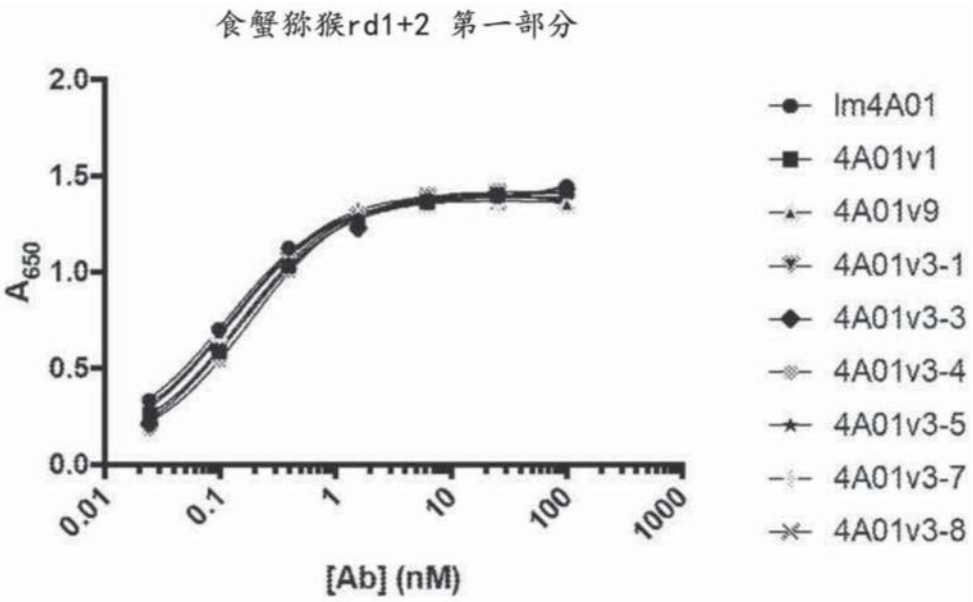
	Bmax	Kd
Im4A01	1.341	0.1047
4A01v1	1.338	0.1391
4A01v3	1.321	0.1245
4A01v9	1.351	0.1145
4A01v3-1	1.321	0.123
4A01v3-3	1.362	0.1287
4A01v3-4	1.427	0.1515
4A01v3-5	1.394	0.1215
4A01v3-7	1.398	0.1213
4A01v3-8	1.414	0.1355

图4B



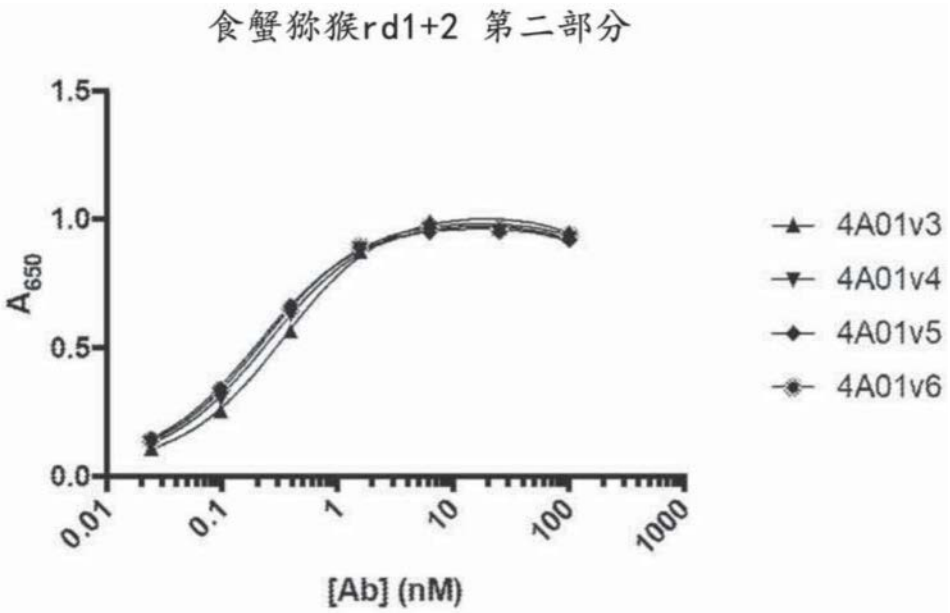
	Bmax	Kd
4A01v4	0.947	0.3783
4A01v5	0.9567	0.2763
4A01v6	0.9403	0.3321
4A01v8	0.9545	0.4283

图4C



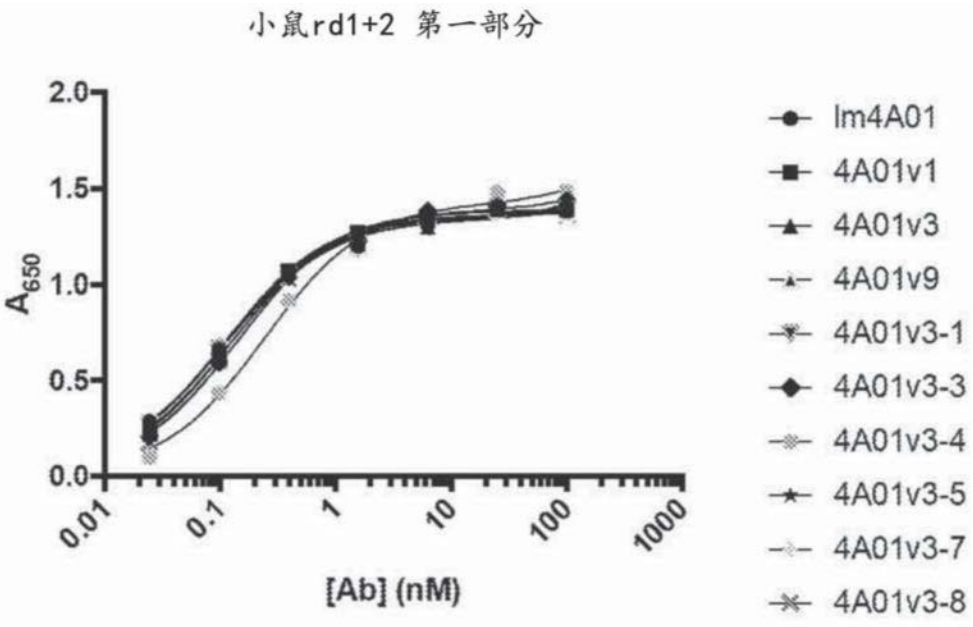
	Bmax	Kd
lm4A01	1.268	0.1126
4A01v1	1.309	0.1572
4A01v9	1.294	0.117
4A01v3-1	1.295	0.1272
4A01v3-3	1.35	0.1417
4A01v3-4	1.37	0.181
4A01v3-5	1.34	0.1262
4A01v3-7	1.312	0.1178
4A01v3-8	1.347	0.1467

图4D



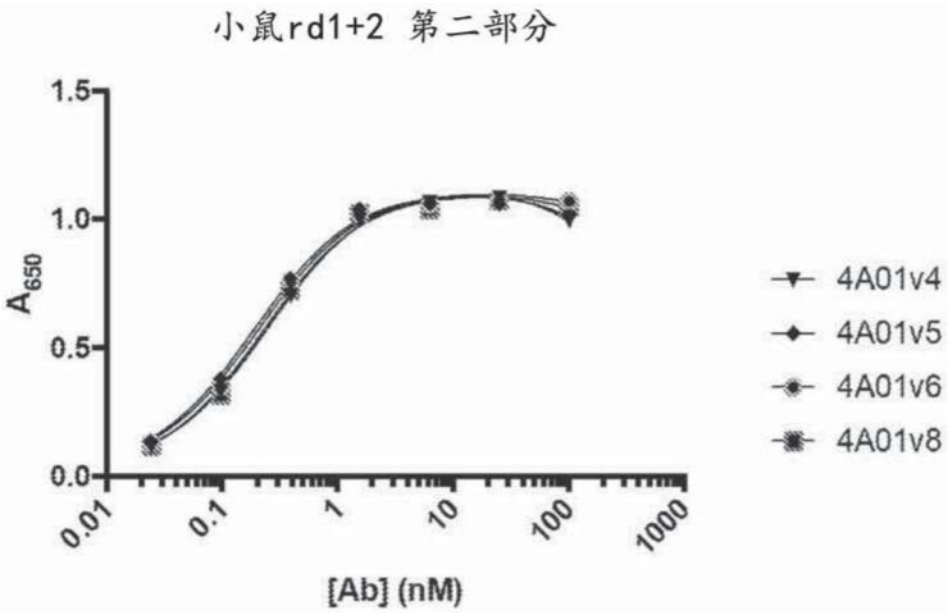
	Bmax	Kd
4A01v3	0.9943	0.3381
4A01v4	0.9542	0.2474
4A01v5	0.9393	0.2032
4A01v6	0.9607	0.2253

图4E



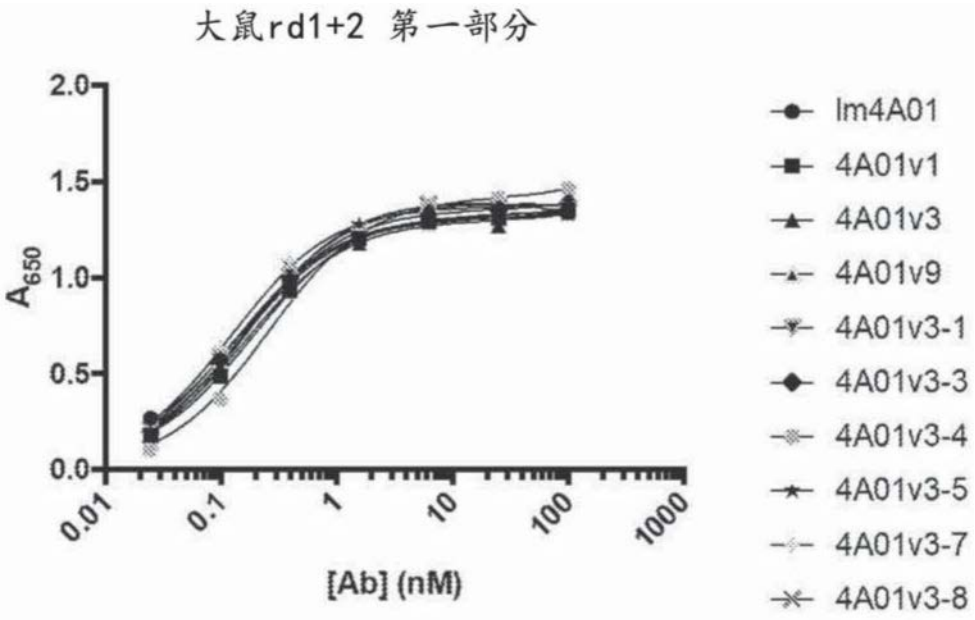
	Bmax	Kd
Im4A01	1.264	0.1141
4A01v1	1.352	0.1285
4A01v3	1.296	0.1207
4A01v9	1.303	0.1121
4A01v3-1	1.289	0.109
4A01v3-3	1.35	0.1417
4A01v3-4	1.401	0.2409
4A01v3-5	1.31	0.1117
4A01v3-7	1.317	0.1105
4A01v3-8	1.357	0.1427

图4F



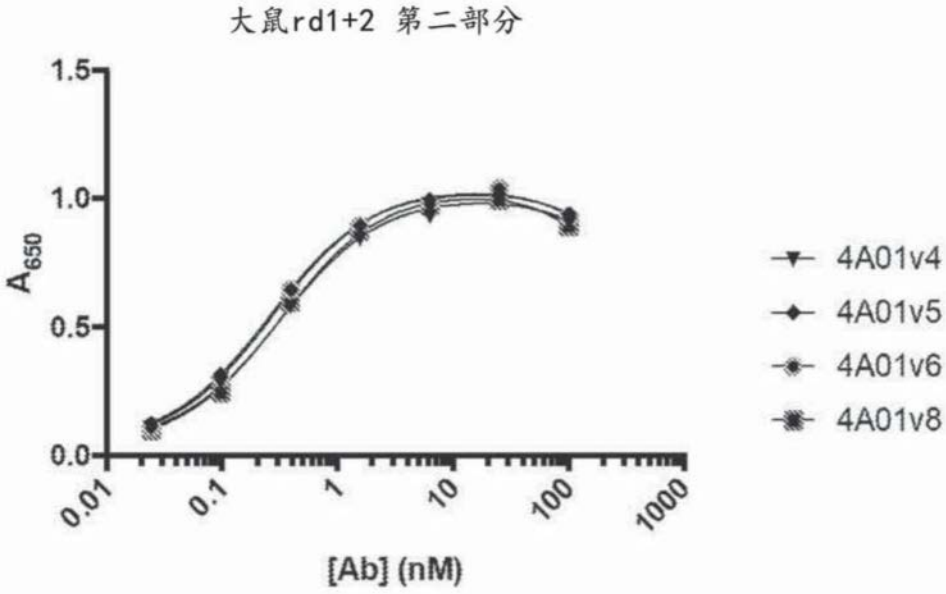
	Bmax	Kd
4A01v4	1.103	0.2503
4A01v5	1.095	0.1888
4A01v6	1.089	0.2064
4A01v8	1.097	0.2257

图4G



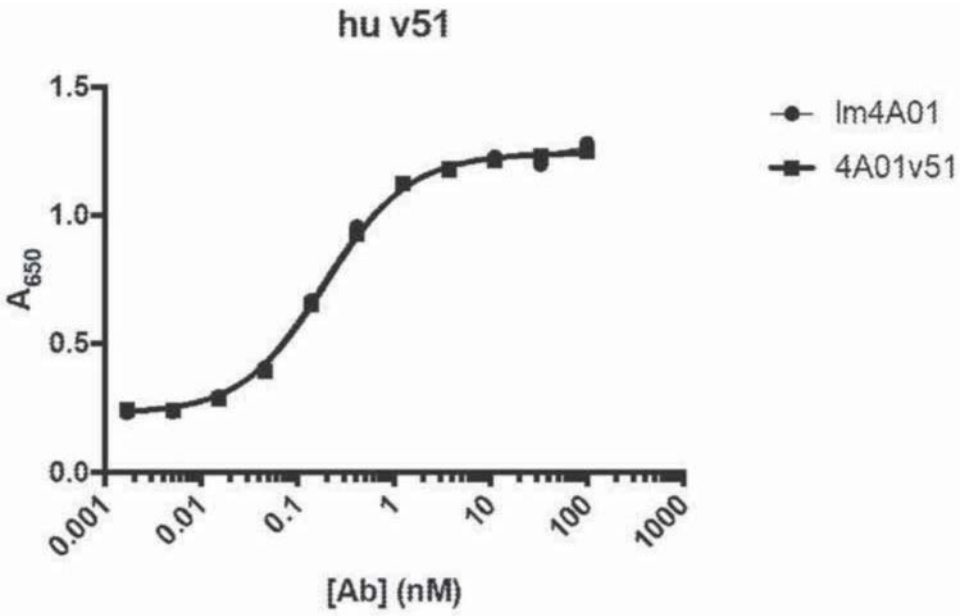
	Bmax	Kd
Im4A01	1.241	0.1444
4A01v1	1.285	0.1836
4A01v3	1.25	0.1617
4A01v9	1.269	0.1441
4A01v3-1	1.276	0.1296
4A01v3-3	1.32	0.1516
4A01v3-4	1.407	0.2518
4A01v3-5	1.347	0.1621
4A01v3-7	1.347	0.1226
4A01v3-8	1.389	0.1689

图4H



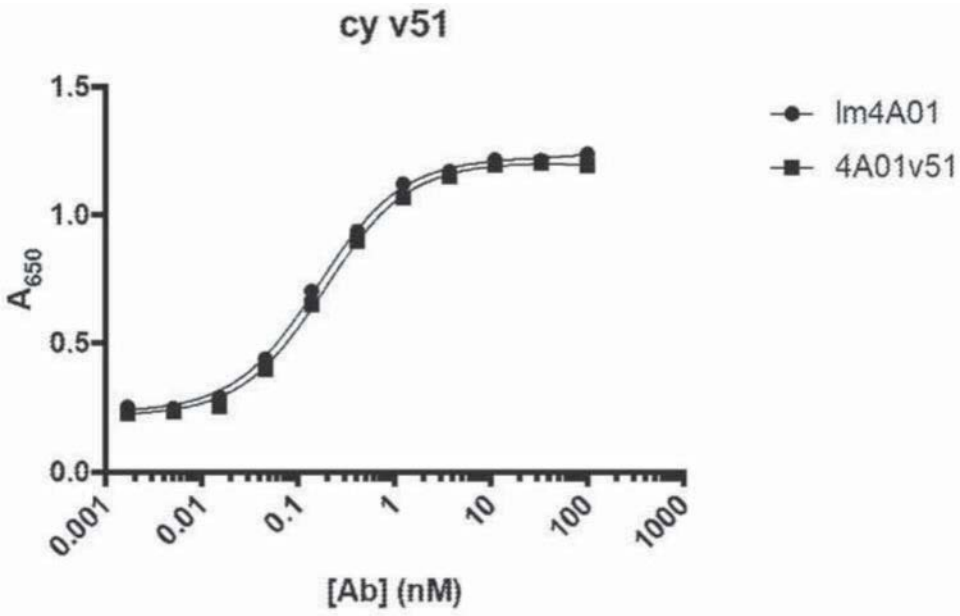
	Bmax	Kd
4A01v4	0.9724	0.3203
4A01v5	1.005	0.2599
4A01v6	1.016	0.2731
4A01v8	1.006	0.3279

图4I



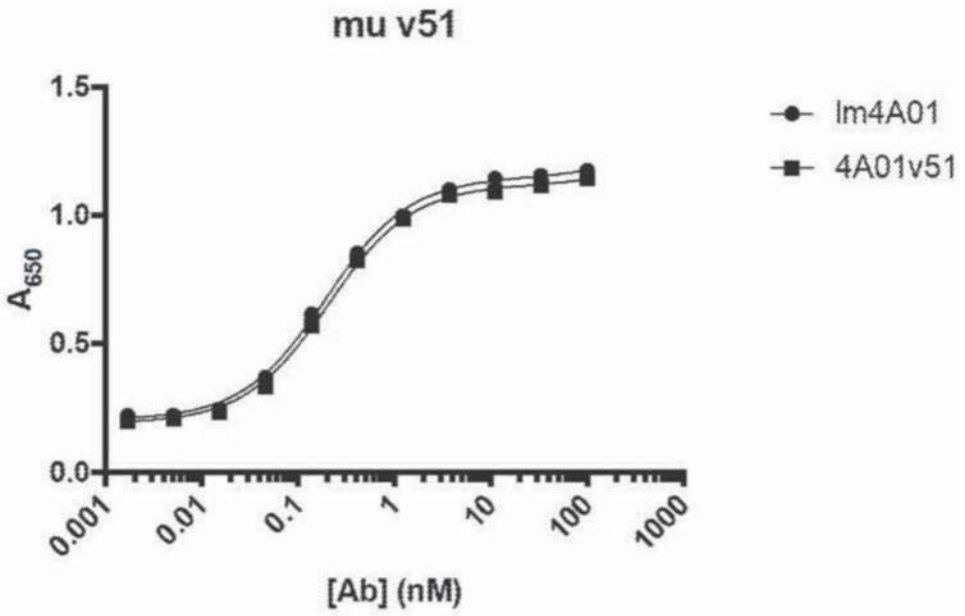
	Bmax	Kd
Im4A01	1.011	0.1705
4A01v51	1.014	0.195

图5A



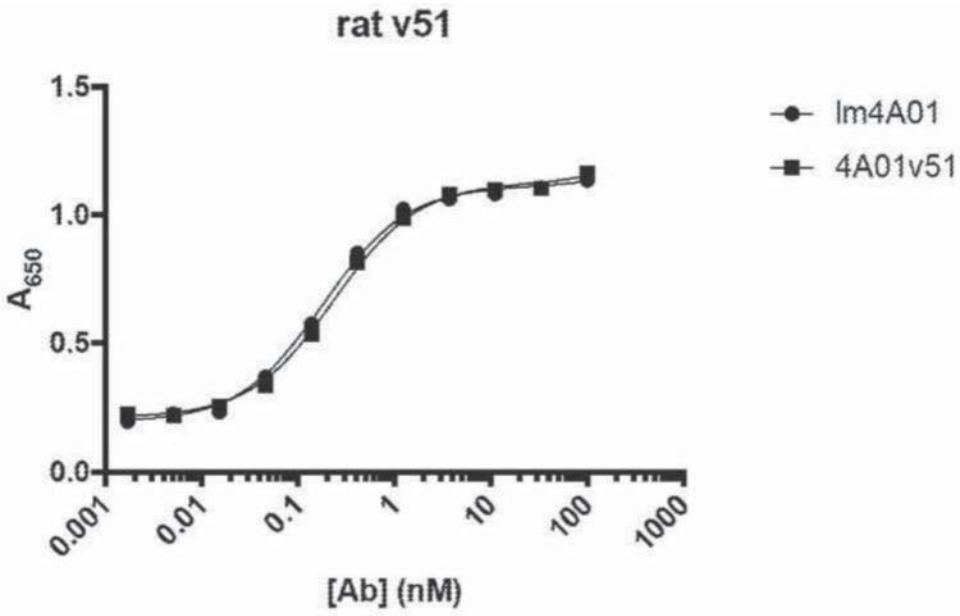
	Bmax	Kd
Im4A01	0.991	0.1616
4A01v51	0.9896	0.1889

图5B



	Bmax	Kd
Im4A01	0.9447	0.193
4A01v51	0.9286	0.2066

图5C



	Bmax	Kd
lm4A01	0.9176	0.1817
4A01v51	0.9116	0.2339

图5D

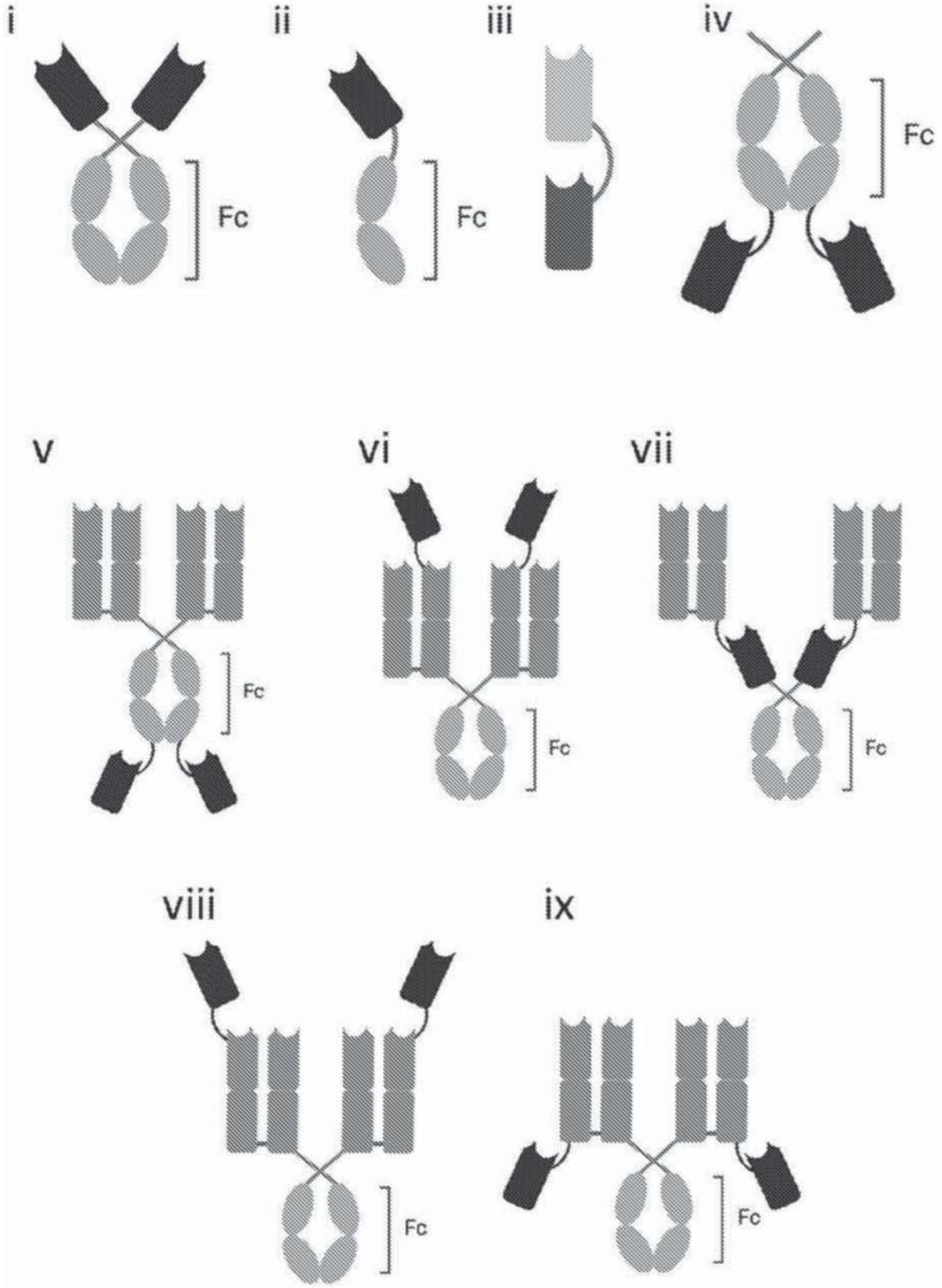


图6

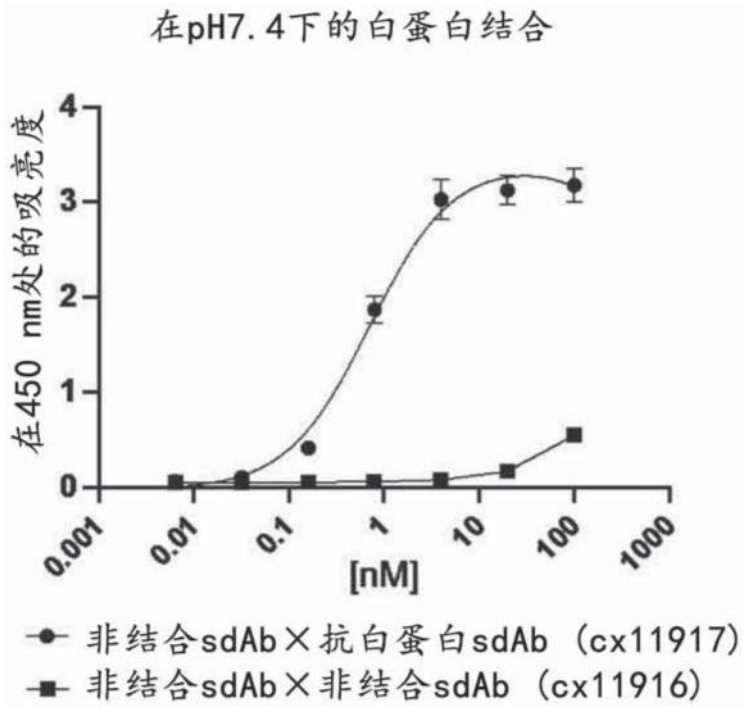

在pH7.4下的白蛋白结合
在450 nm处的吸亮度
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[nM]
非结合sdAb×抗白蛋白sdAb (cx11917)
非结合sdAb×非结合sdAb (cx11916)

图7A

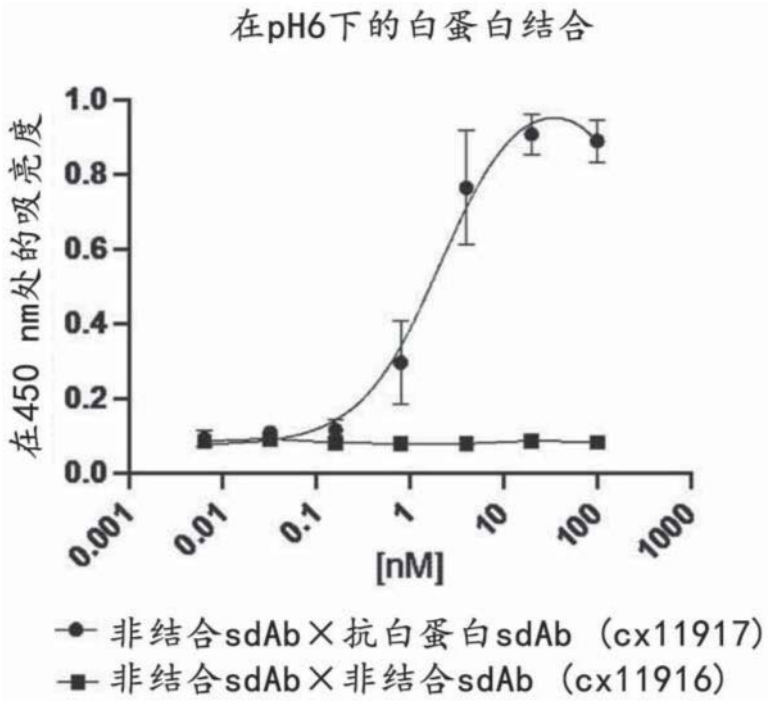

在pH6下的白蛋白结合
在450 nm处的吸亮度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[nM]
非结合sdAb×抗白蛋白sdAb (cx11917)
非结合sdAb×非结合sdAb (cx11916)

图7B

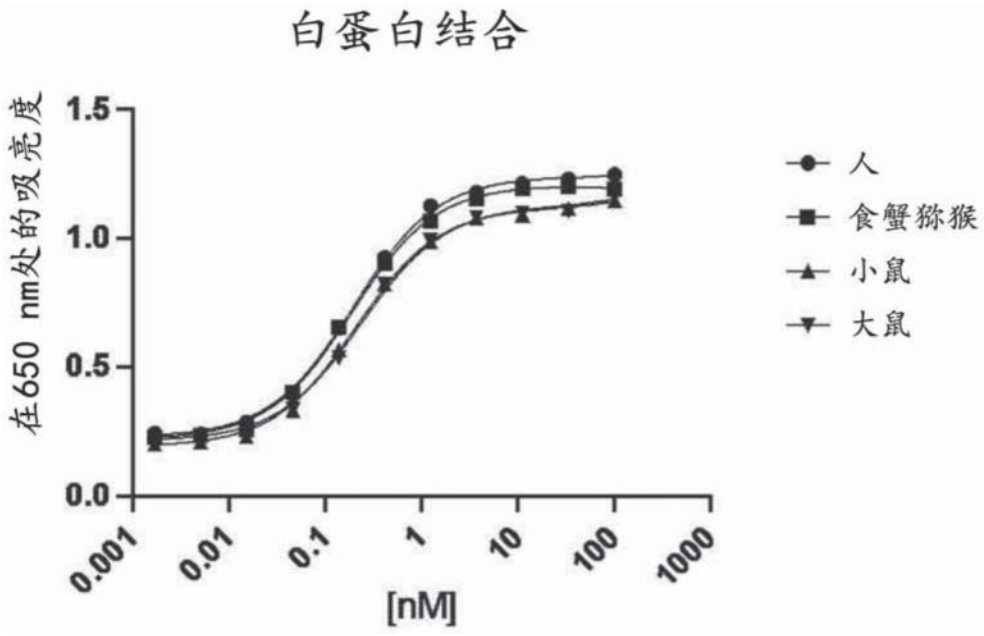

白蛋白结合
在650 nm处的吸亮度
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[nM]
人
食蟹猕猴
小鼠
大鼠

图8

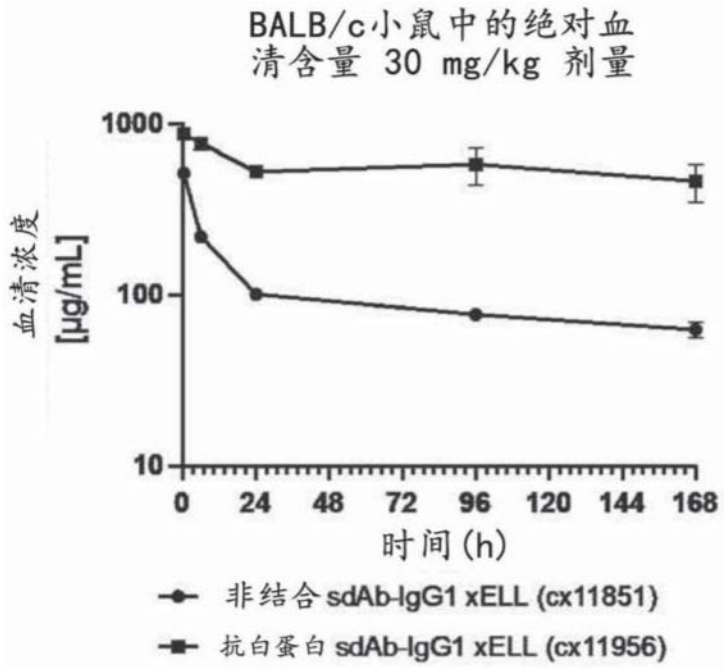

BALB/c小鼠中的绝对血清含量 30 mg/kg 剂量
血清浓度 [μg/mL]
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
时间 (h)
非结合 sdAb-IgG1 xELL (cx11851)
抗白蛋白 sdAb-IgG1 xELL (cx11956)

图9A

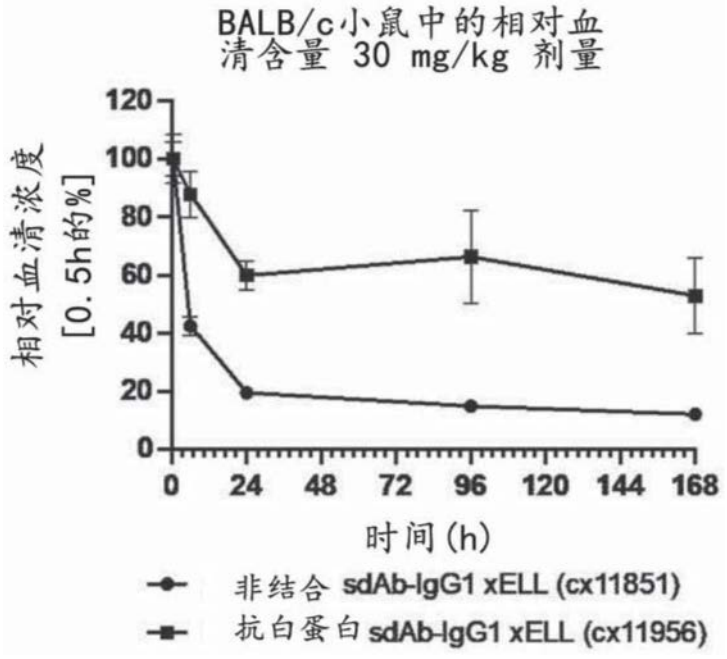

BALB/c小鼠中的相对血清含量 30 mg/kg 剂量
相对血清浓度 [0.5h的%]
120
100
80
60
40
20
0
0 24 48 72 96 120 144 168
时间(h)
非结合 sdAb-IgG1 xELL (cx11851)
抗白蛋白 sdAb-IgG1 xELL (cx11956)

图9B

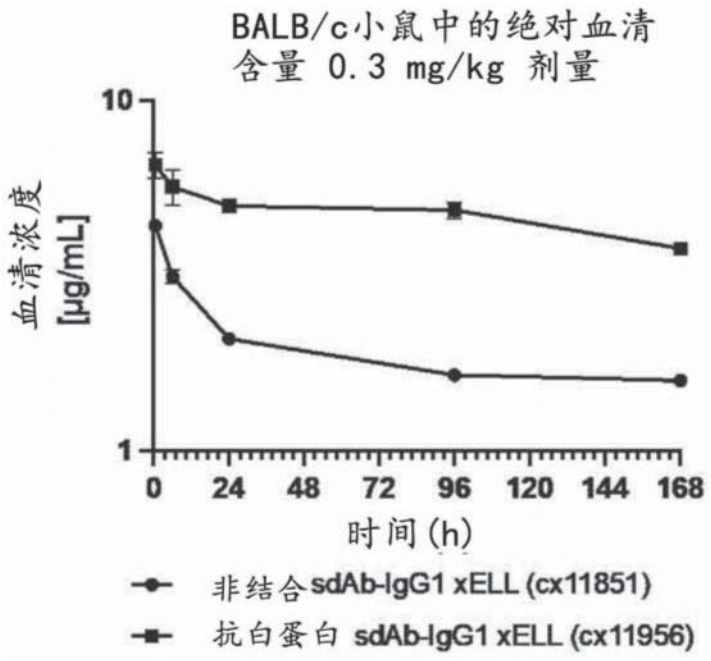

BALB/c小鼠中的绝对血清含量 0.3 mg/kg 剂量
血清浓度 [μg/mL]
10
1
0 24 48 72 96 120 144 168
时间(h)
非结合sdAb-IgG1 xELL (cx11851)
抗白蛋白 sdAb-IgG1 xELL (cx11956)

图9C

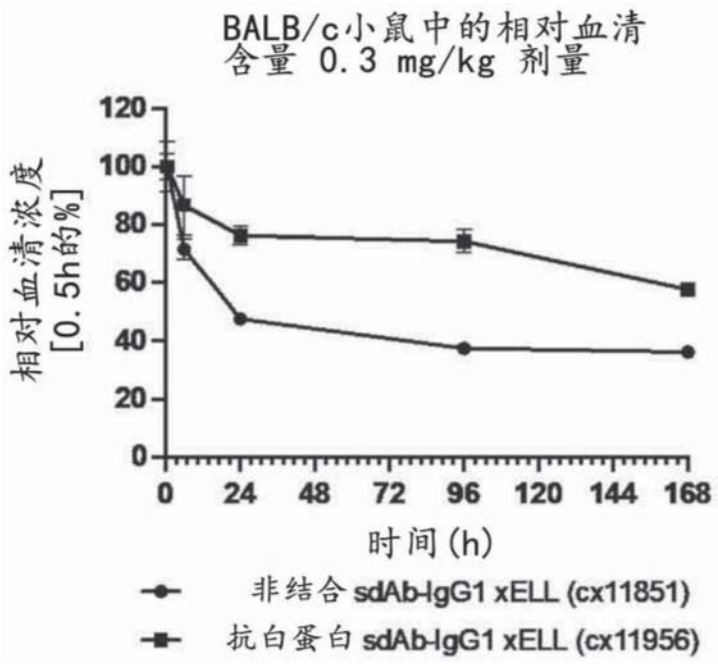

BALB/c小鼠中的相对血清
含量 0.3 mg/kg 剂量
相对血清浓度
[0.5h的%]
120
100
80
60
40
20
0
0 24 48 72 96 120 144 168
时间(h)
非结合 sdAb-IgG1 xELL (cx11851)
抗白蛋白 sdAb-IgG1 xELL (cx11956)

图9D

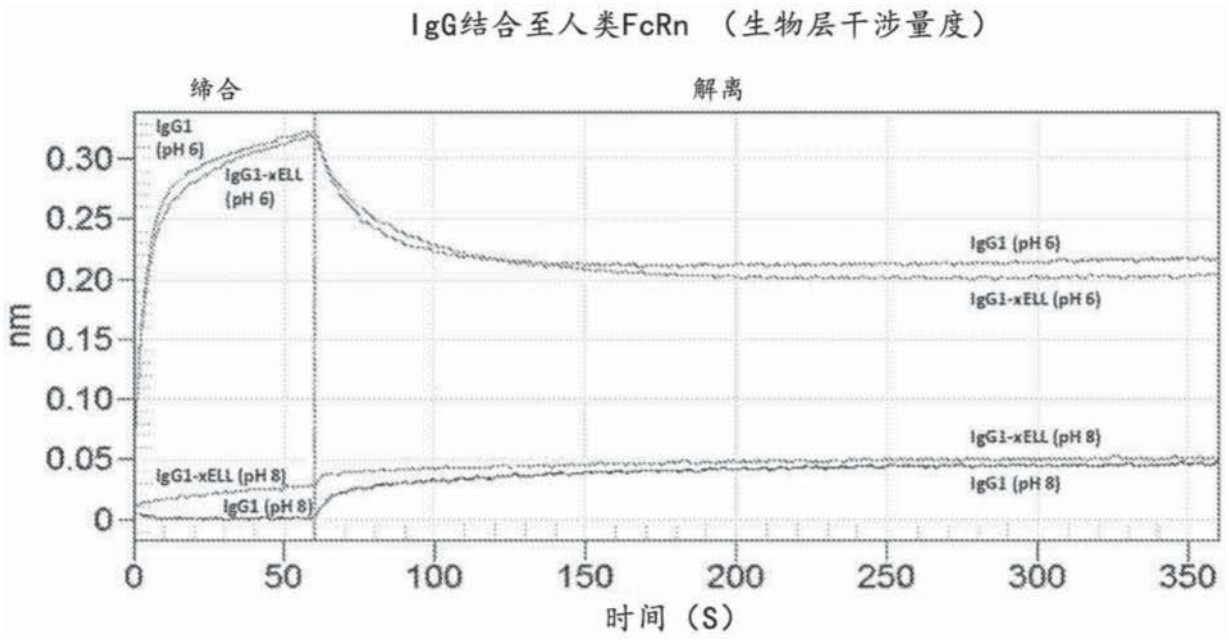
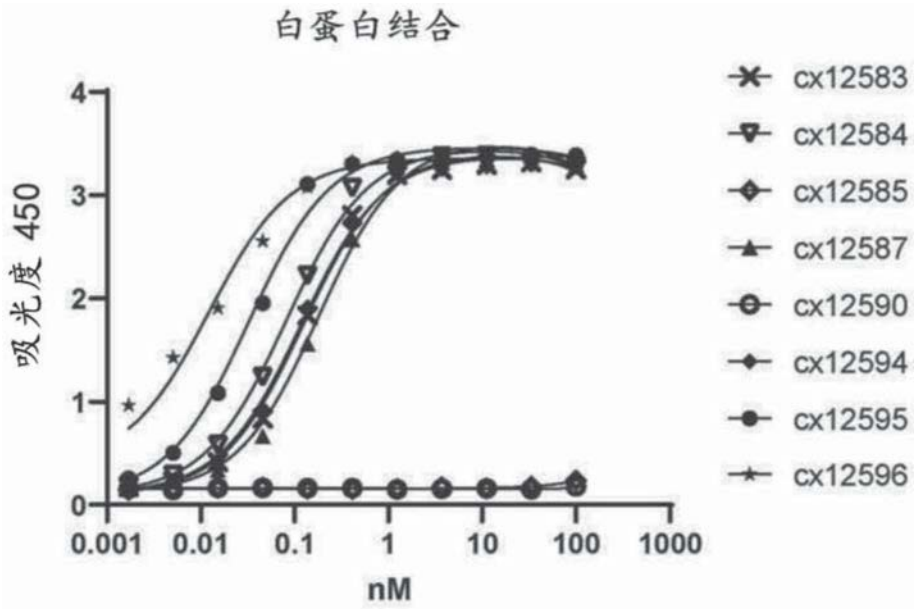
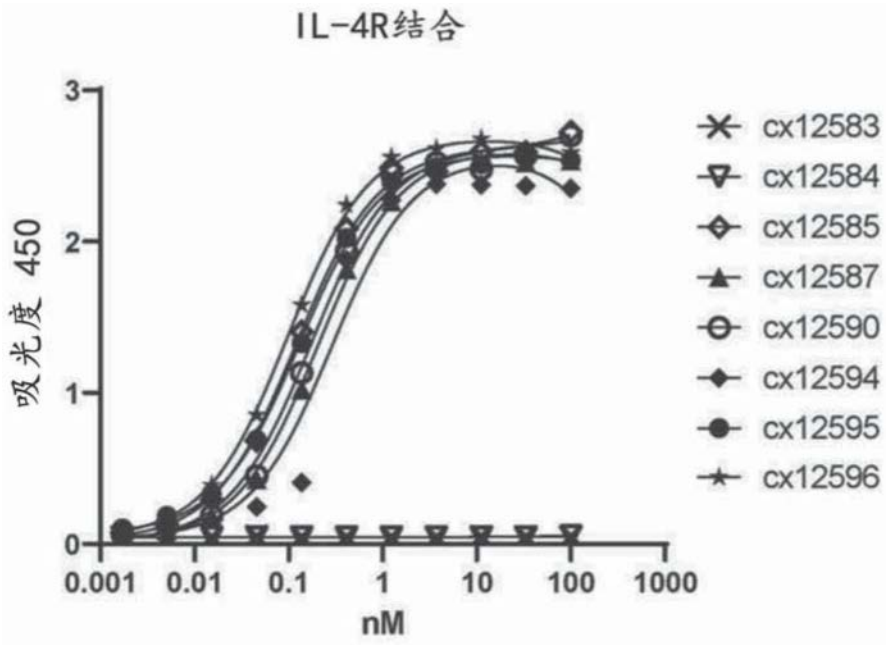

IgG结合至人类FcRn （生物层干涉量度）
缔合
解离
IgG1 (pH 6)
IgG1-xELL (pH 6)
IgG1 (pH 6)
IgG1-xELL (pH 6)
IgG1-xELL (pH 8)
IgG1-xELL (pH 8)
IgG1 (pH 8)
nm
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
0 50 100 150 200 250 300 350
时间 (S)

图10



	Bmax	Kd
cx12587	3.441	0.1801
cx12594	3.299	0.1176
cx12595	3.396	0.03256
cx12596	2.981	0.01221
cx12583	3.339	0.1255
cx12584	3.371	0.08132

图11A



	Bmax	Kd
cx12585	2.597	0.1195
cx12587	2.606	0.2064
cx12590	2.620	0.1716
cx12594	2.560	0.2892
cx12595	2.528	0.1307
cx12596	2.661	0.09747

图11B

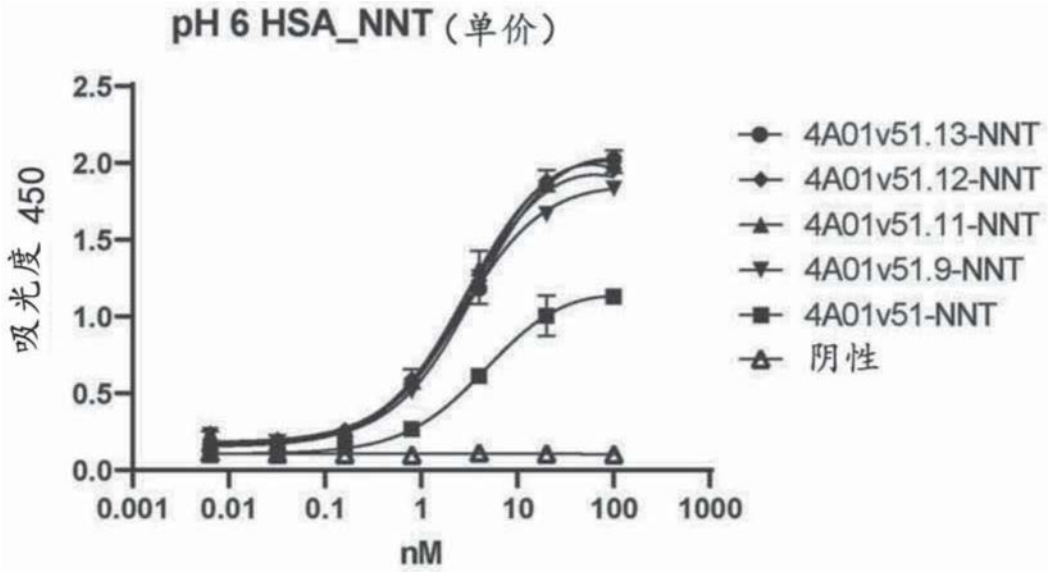


图12A

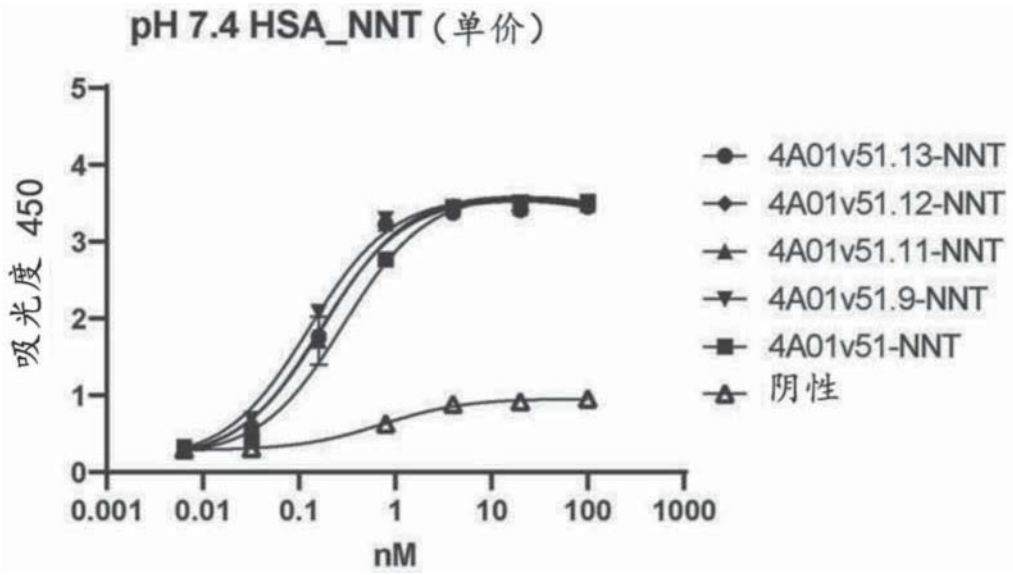

pH 7.4 HSA_NNT（单价）
吸光度 450
nM
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
1
2
3
4
5
4A01v51.13-NNT
4A01v51.12-NNT
4A01v51.11-NNT
4A01v51.9-NNT
4A01v51-NNT
阴性

图12B

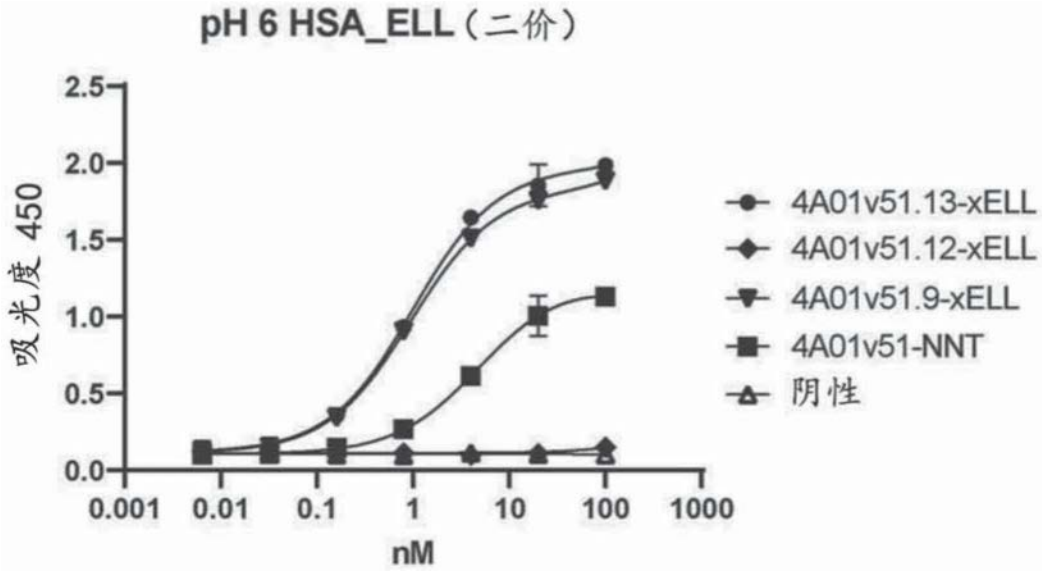

pH 6 HSA_ELL（二价）
吸光度 450
nM
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
4A01v51.13-xELL
4A01v51.12-xELL
4A01v51.9-xELL
4A01v51-NNT
阴性

图12C

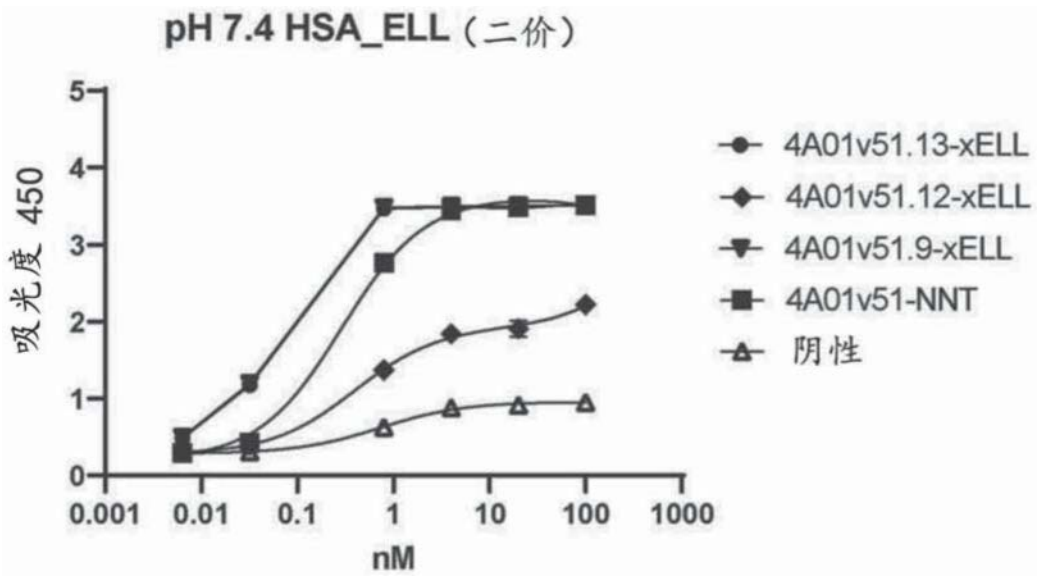

pH 7.4 HSA_ELL（二价）
吸光度 450
5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM
4A01v51.13-xELL
4A01v51.12-xELL
4A01v51.9-xELL
4A01v51-NNT
阴性

图12D