(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119630697 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202380057256.3
(22)申请日 2023.06.15
(30)优先权数据
63/352,589 2022.06.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/066179 2023.06.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/242371 EN 2023.12.21
(71)申请人 阿根思有限公司
地址 比利时
(72)发明人 弗拉迪米尔·博布科夫
卡伦·西伦斯
若利恩·万圣贝尔根
勒内·比吉里马纳
朱迪斯·鲍迈斯特
乔纳斯·德哈德
克里斯托弗·布朗什托
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张珊珊 陈九洲
(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)

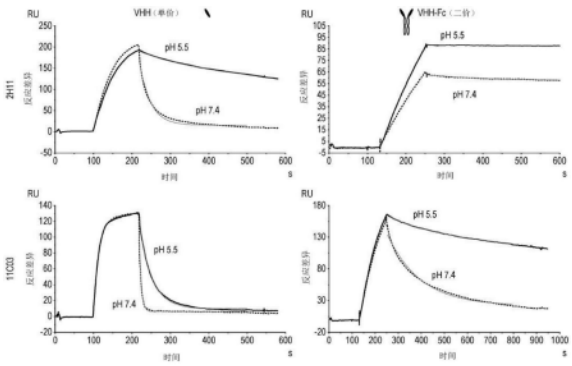
权利要求书2页 说明书37页
序列表（电子公布） 附图3页

(54)发明名称

PH依赖性HSA结合分子及使用方法

(57)摘要

本文提供了pH依赖性HSA结合分子。本文还提供了包含pH依赖性HSA结合分子和治疗性蛋白的融合蛋白。本文还提供了多核苷酸、载体、宿主细胞、使用方法和产生方法。



CN 119630697 A

1.一种特异性结合HSA的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子在pH 5.5和/或pH6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且所述抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的所述平衡解离常数为至少2.4Mm。

2.根据权利要求1所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的所述平衡解离常数小于0.03mM,并且所述抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的所述平衡解离常数为至少11.5mM。

3.一种特异性结合HSA的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子在pH 5.5和/或pH6.0下与HSA的结合亲和力为所述抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的结合亲和力的至少100倍。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的抗原结合分子,其中所述结合亲和力通过表面等离子体共振来测量。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的抗原结合分子,其中所述抗原结合分子选自Fab片段、sdAb、scFv、抗体模拟物、HSA或其抗原结合片段。

6.根据权利要求5所述的抗原结合分子,其中所述sdAb是VHH片段。

7.根据权利要求6所述的抗原结合分子,其进一步包含添加至所述VHH片段的C末端的一个或多个氨基酸。

8.根据权利要求7所述的抗原结合分子,其中所述一个或多个氨基酸选自由以下各项组成的组:

a)A;

b)AG;

c)GG;以及

d)PP。

9.一种融合蛋白,其包含根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子以及治疗性蛋白。

10.根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述治疗性蛋白是小肽治疗剂。

11.根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述治疗性蛋白是抗体或其片段,任选地是Fc区或抗原结合片段。

12.根据权利要求9至11中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗原结合分子经由接头与所述治疗性蛋白融合。

13.根据权利要求12所述的融合蛋白,其中所述接头是不可切割的接头。

14.根据权利要求12或13所述的融合蛋白,其中所述接头是肽接头。

15.根据权利要求14所述的融合蛋白,其中所述肽接头是GS接头,任选地长度为8至40个氨基酸,任选地长度为20个氨基酸。

16.根据权利要求11至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗原结合分子经由IgG铰链区或其部分与所述抗体或其片段融合。

17.根据权利要求11至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述治疗性蛋白是包含第一Fc结构域和第二Fc结构域的Fc区,并且其中所述抗原结合分子经由IgG铰链区或其部分与所述第一Fc结构域或所述第二Fc结构域融合。

18.一种或多种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求9至17中任一项所述的融合蛋白。

19.一种表达载体,其包含根据权利要求18所述的一种或多种分离的多核苷酸。

20.一种宿主细胞,其包含根据权利要求18所述的一种或多种分离的多核苷酸或根据权利要求18所述的表达载体。

21.一种用于产生抗原结合分子或融合蛋白的方法,所述方法包括在允许所述抗原结合分子或融合蛋白的表达的条件下培养根据权利要求19所述的宿主细胞。

22.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求9至17中任一项所述的融合蛋白以及至少一种药学上可接受的载剂。

23.根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子、或根据权利要求9至17中任一项所述的融合蛋白、或根据权利要求22所述的药物组合物,其用作药物。

24.一种增加治疗性蛋白的血清半衰期的方法,所述方法包括将根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子与所述治疗性蛋白融合。

25.根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子用于增加治疗性蛋白的血清半衰期的用途。

26.根据权利要求1至8中任一项所述的抗原结合分子或根据权利要求9至17中任一项所述的融合蛋白用于制造药物的用途。

PH依赖性HSA结合分子及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2022年6月15日提交的美国临时申请号63/352,589的权益,该临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及pH依赖性人血清白蛋白(HSA)结合分子及其制备和使用方法。

背景技术

[0004] HSA是最丰富的血浆蛋白,并且在常见治疗剂的结合和转运中发挥着重要作用。因此,HSA是用于探索和优化治疗剂的药代动力学和药效学的令人感兴趣的靶标。

[0005] 然而,需要注意将血液中HSA的水平保持在健康水平(正常范围为3.4至5.4g/dL(34至54g/L),因为HSA维持体内的液体平衡,有助于防止血管过多渗漏,具有修复组织和帮助身体生长的作用,同时将激素、营养物质和酶输送到全身。

[0006] 目前使用HSA结合来延长治疗剂的半衰期的技术是通过连续结合HSA(例如,在所有生理条件下)来实现的,从而显著增加治疗剂的总大小(HSA为约66kDa蛋白质),这可以通过组织和肿瘤渗透的空间位阻和减少的分布来影响功效和功能。

[0007] 因此,本领域需要改进的白蛋白结合分子,其延长治疗剂的半衰期而不干扰血清白蛋白功能或治疗功效。

发明内容

[0008] 本公开广泛涉及在酸性pH下优先结合HSA而在生理pH下减少或不结合HSA的HSA结合分子及其融合蛋白。

[0009] 在一方面,本文提供一种特异性结合HSA的抗原结合分子,其中抗原结合分子在pH5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。

[0010] 在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。

[0011] 在另一方面,本文提供一种特异性结合HSA的抗原结合分子,其中抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的结合亲和力为抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的结合亲和力的至少10倍。在一些实施例中,HSA结合分子在酸性pH下与HSA的结合亲和力为HSA结合分子在生理pH下与HSA的结合亲和力的至少约5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、175倍、200倍、225倍、250倍、275倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1000倍。在一些实施例中,酸性pH为pH 5.5和/或pH 6.0。在一些实施例中,生理pH为pH 7.4。

[0012] 在一些实施例中,结合亲和力通过表面等离子体共振测量。

[0013] 在一些实施例中,抗原结合分子选自Fab片段、sdAb、scFv、抗体模拟物或其抗原结合片段。在一些实施例中,sdAb是VHH片段,其任选地进一步包含添加至VHH片段的C末端的一个或多个氨基酸。在一些实施例中,一个或多个氨基酸选自由以下各项组成的组:A;AG;GG;以及PP。

[0014] 在一方面,提供了一种融合蛋白,其包含如本文所述的抗原结合分子以及治疗性蛋白。

[0015] 在一些实施例中,治疗性蛋白是小肽治疗剂。

[0016] 在一些实施例中,治疗性蛋白是抗体或其片段,任选地是Fc区或抗原结合片段。

[0017] 在一些实施例中,抗原结合分子经由接头融合至治疗性蛋白。在一些实施例中,接头是不可切割的接头。在一些实施例中,接头是肽接头,任选地是GS接头,任选地长度为8至40个氨基酸,任选地长度为20个氨基酸。

[0018] 在一些实施例中,抗原结合分子经由IgG铰链区或其部分融合至抗体或其片段。

[0019] 在一些实施例中,治疗性蛋白是包含第一Fc结构域和第二Fc结构域的Fc区,并且抗原结合分子经由IgG铰链区或其部分融合至第一Fc结构域或第二Fc结构域。

[0020] 还提供了一种或多种分离的多核苷酸,其编码本文所述的任何抗原结合分子或本文所述的任何融合蛋白。

[0021] 还提供了一种表达载体,其包含本文所述的任何一种或多种分离的多核苷酸。

[0022] 还提供了一种宿主细胞,其包含本文所述的任何一种或多种分离的多核苷酸或本文所述的任何表达载体。

[0023] 还提供了一种用于产生抗原结合分子或融合蛋白的方法,该方法包括在允许抗原结合分子或融合蛋白的表达的条件下培养如本文所述的宿主细胞。

[0024] 还提供了一种药物组合物,其包含本文所述的任何抗原结合分子或本文所述的任何融合蛋白以及至少一种药学上可接受的载剂。

[0025] 还提供了如本文所述的抗原结合分子、或如本文所述的融合蛋白、或其药物组合物,其用作药物。

[0026] 还提供了一种增加治疗性蛋白的血清半衰期的方法,该方法包括将如本文所述的抗原结合分子融合至治疗性蛋白。

[0027] 还提供了如本文所述的抗原结合分子用于增加治疗性蛋白的血清半衰期的用途。

[0028] 还提供了本文所述的任何抗原结合分子或本文所述的任何融合蛋白用于制造药物的用途。

附图说明

[0029] 图1是一系列传感图,显示了所选克隆2H11和11C03作为单价和二价(VHH-Fc)分子与Biacore上的HSA(pH 5.5)结合的特性。在pH 5.5下进行每次运行的缔合。在pH 5.5或7.4下进行解离,以研究所示的pH依赖性。

[0030] 图2是显示用于研究Albumus小鼠™中莫维珠单抗(Mota)-Fab融合蛋白的PK和HSA结合的方案的示意图。

[0031] 图3是显示Albumus小鼠™的血清中Mota-Fab融合蛋白的浓度随时间变化的线图。

[0032] 图4是显示抗HSA-VHH中内吞再循环的潜在机制的示意图,其中HSA在pH 7.4下的

结合较弱,而在pH 5.5下的结合较强。

具体实施方式

[0033] 本公开提供了在酸性pH下特异性结合HSA(HSA结合分子)并且在生理pH下不结合(或弱结合)HSA的经工程化的抗原结合分子及其融合蛋白。本文还提供了编码此类HSA结合分子或融合蛋白的核酸、载体、宿主细胞、制造方法及其使用方法。

[0034] 定义

[0035] 如本文所用,术语“抗原结合分子”是指特异性结合抗原的任何多肽。抗原结合结构域的实例包括来源于抗体的多肽,诸如Fab片段、F(ab')$_2$片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、单链Fv(scFv)、CDR、VH结构域(VH)、VL域(VL)、单域抗体(sdAb)、VHH片段、骆驼抗体以及上述任一者的抗原结合片段。该术语还涵盖合成的抗原结合蛋白或抗体模拟蛋白,诸如例如anticalin和DARPin。

[0036] 在一些实施例中,抗原结合分子是VHH片段。在一些实施例中,VHH片段在其C末端处具有一个或多个另外的氨基酸。在一些实施例中,一个或多个另外的氨基酸选自由以下各项组成的组:A、AG、GG和PP。

[0037] 如本文所用,术语“HSA结合分子”是指特异性结合HSA的抗原结合分子。在一些实施例中,HSA包含与GenBank登录号:AAA98797.1中提供的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,HSA包含GenBank登录号:AAA98797.1中提供的氨基酸序列。

[0038] 如本文所用,术语“亲和力”或“结合亲和力”是指两个分子之间的结合相互作用的强度。如本文所用,术语“平衡解离常数”或“K_D”是指两个分子的结合复合物解离成两个游离分子的倾向。因此,随着结合亲和力的增加,K_D降低。

[0039] 如本文所用,术语“特异性结合”是指任何分子优先与给定靶标结合的能力。例如,特异性结合至给定靶标的分子可以结合至其他分子,通常具有较低的亲和力,如通过例如免疫测定、BIAcore™、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,Boise,同上)或本领域已知的其他测定所确定的。在一个具体的实施例中,特异性结合至给定靶标的分子以比当分子非特异性结合至另一靶标时的K_D至少2个对数、2.5个对数、3个对数、4个对数或更低的K_D结合至抗原。

[0040] 如本文所用,术语“酸性pH”是指小于7.0的pH,包括但不限于约5.5、5.8、6.0、6.2、6.5或6.8的pH。在一些实施例中,“酸性pH”是指内体pH。在一些实施例中,“酸性pH”是指约5.5至约6.0的pH。在一些实施例中,“酸性pH”是指5.5至6.0的pH。在一些实施例中,“酸性pH”是指约5.5或约6.0的pH。在一些实施例中,“酸性pH”是指5.5或6.0的pH。

[0041] 如本文所用,术语“生理pH”是指7.2至7.6的pH,包括但不限于约7.2、7.3、7.4、7.5或7.6的pH。在一些实施例中,“生理pH”是指血流中存在的pH。在一些实施例中,“生理pH”是指约7.35至约7.45的pH。在一些实施例中,“生理pH”是指7.35至7.45的pH。在一些实施例中,“生理pH”是指约7.4的pH。在一些实施例中,“生理pH”是指7.4的pH。

[0042] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指通过将本文所述的至少一种抗原结合分子与至少一种治疗性蛋白(或其片段或变体)融合而形成的蛋白质。

[0043] 如本文所用,术语“融合”是指两个肽通过肽键或肽接头的连接。在一些实施例中,两种蛋白质通过肽键直接且连续地融合在一起。在一些实施例中,两种蛋白质通过肽接头

间接且非连续地融合。在一些实施例中,一种蛋白质通过第一位置处的肽键融合至肽接头,并且第二蛋白质通过第二位置处的肽键融合至肽接头。

[0044] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指多核苷酸序列元件以功能关系连接。例如,当多核苷酸序列与另一多核苷酸序列处于功能关系时,该多核苷酸序列是可操作地连接的。在一些实施例中,如果转录调控多核苷酸序列(例如,启动子、增强子或其他表达控制元件)影响编码蛋白质的多核苷酸序列的转录,则该转录调控多核苷酸序列可操作地连接至编码该蛋白质的多核苷酸序列。可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。

[0045] 如本文所用,术语“治疗性蛋白”是指具有一种或多种治疗和/或生物活性的蛋白质、多肽、抗体、肽或其片段或变体。治疗性蛋白包括但不限于蛋白质、多肽、肽、抗体和生物制剂。术语肽、蛋白质和多肽在本文中可互换使用。术语“治疗性蛋白”涵盖抗体及其片段和变体。因此,本文公开的蛋白质可以含有治疗性蛋白的至少一个片段或变体,和/或抗体的至少一个片段或变体。另外,术语“治疗性蛋白”可以指治疗性蛋白的内源性或天然存在的相关物。

[0046] 表现出“治疗活性”的蛋白质或具有“治疗活性”的蛋白质是指蛋白质具有与治疗性蛋白相关的一种或多种已知的生物和/或治疗活性,诸如本文所述或本领域以其他形式已知的一种或多种治疗性蛋白。作为非限制性实例,“治疗性蛋白”是可用于治疗、预防或改善疾病、病症或疾患的蛋白质。作为非限制性实例,“治疗性蛋白”可以是特异性结合特定细胞类型(正常(例如,淋巴细胞)或异常(例如,癌细胞))的蛋白质,并且因此可用于将化合物(药物或细胞毒性剂)特异性靶向该细胞类型。“治疗性蛋白”的实例包括但不限于干扰素、酶、激素、生长因子、白细胞介素、凝血因子、抗体及其片段和变体。

[0047] 可以使用数学算法来实现对两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“同一性百分比”的测定。用于比较两个序列的数学算法的具体、非限制性实例是Karlin S和Altschul SF,(1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如Karlin S和Altschul SF,(1993)PNAS 90:5873-5877中进行修改,这些文献中的每一者均通过引用以其整体并入本文。此类算法被并入Altschul SF等人,(1990)J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中,该文献通过引用以其全文并入本文。可以用NBLAST核苷酸程序参数集(例如,以分数=100,字长=12)执行BLAST核苷酸搜索,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序参数集(例如,以分数=50,字长=3)执行BLAST蛋白搜索,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的间隙比对,可以利用如在Altschul SF等人,(1997)Nuc Acids Res 25:3389-3402中所述的间隙BLAST,该文献通过引用以其整体并入本文。可替代地,PSI BLAST可用于执行检测分子之间的距离关系的迭代搜索。同上。当利用BLAST、间隙BLAST和PSI BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如,万维网上的国家生物技术信息中心(NCBI),ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一具体、非限制性实例是Myers和Miller,(1988)CABIOS 4:11-17的算法,该文献通过引用以其全文并入本文。将这种算法并入到ALIGN程序(第2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12以及空位罚分4。

[0048] 在容许或不容许空位的情况下,可使用类似于以上所述的那些技术的技术,确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常仅对确切的匹配进行计数。

[0049] 如本文所用,术语“抗体(antibody/antibodies)”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段以及包含抗体CDR、VH结构域(VH)或VL结构域(VL)的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异缀合抗体、抗体药物缀合物、单域抗体(sdAb)、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、骆驼抗体、亲和抗体分子、VHH片段、Fab片段、F(ab')$_2$片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗个体遗传型(抗Id)抗体(包括例如,抗抗Id抗体)以及上述任一者的抗原结合片段。抗体可以是免疫球蛋白分子的任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何亚类(例如,IgG$_1$、IgG$_2$、IgG$_3$、IgG$_4$、IgA$_1$或IgA$_2$)或种类(例如,小鼠IgG$_{2a}$或IgG$_{2b}$)。

[0050] 如本文所使用,术语“Fc区”是指免疫球蛋白中由其两条重链的Fc结构域形成的部分。Fc区可以是野生型Fc区(天然Fc区)或变体Fc区。天然Fc区是同源二聚体的。Fc区可衍生自任何天然免疫球蛋白。在一些实施例中,Fc区由IgA、IgD、IgE或IgG重链恒定区形成。在一些实施例中,Fc区由IgG重链恒定区形成。在一些实施例中,IgG重链是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区。在一些实施例中,Fc区由IgG1重链恒定区形成。在一些实施例中,IgG1重链恒定区包含G1m1(a)、G1m2(x)、G1m3(f)或G1m17(z)同种异型。参见,例如,Jefferis和Lefranc(2009)mAbs 1(4):332-338,以及de Taeye等人,(2020)Front Immunol.11:740,这些文献通过引用以其整体并入本文。

[0051] 如本文所用,术语“变体Fc区”是指相对于天然Fc区具有一个或多个改变的Fc区的变体。改变可包括氨基酸取代、添加和/或缺失、额外部分的连接和/或天然聚糖的改变。该术语涵盖组成性Fc结构域中的每一者均不同的异源二聚体Fc区。该术语还涵盖组成性Fc结构域通过接头部分连接在一起的单链Fc区。

[0052] 如本文所用,术语“Fc结构域”是指包含抗体的CH2结构域和CH3结构域两者的单一免疫球蛋白重链的部分。在一些实施例中,Fc结构域包含铰链区(例如,上、中和/或下铰链区)的至少一部分、CH2结构域和CH3结构域。在一些实施例中,Fc结构域不包含铰链区。

[0053] 如本文所使用,术语“铰链区”是指重链分子中将CH1结构域与CH2结构域接合的部分。在一些实施例中,铰链区的长度为至多70个氨基酸残基。在一些实施例中,该铰链区包含大约11至17个氨基酸残基并且是柔性的,因此允许两个N末端抗原结合区独立地移动。在一些实施例中,铰链区的长度为12个氨基酸残基。在一些实施例中,铰链区的长度为15个氨基酸残基。在一些实施例中,铰链区的长度为62个氨基酸残基。铰链区可细分为三个不同的结构域:上、中和下铰链结构域。本公开的抗原结合分子或融合蛋白可包括铰链区的全部或任何部分。在一些实施例中,铰链区来自IgG1抗体。在一些实施例中,铰链区包含EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列。

[0054] 如本文所使用,术语“FcRn”是指新生儿Fc受体。示例性FcRn分子包括由如RefSeq NM 004107所示的FCGRT基因编码的人FcRn。对应的蛋白质的氨基酸序列示于RefSeq NP_004098中。

[0055] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指本文所描述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法采用向患有疾病或疾患或易患此类疾病或疾患的受试者施用多肽,以预防、治愈、延迟疾病或疾患或复发性疾病或疾患、减轻其严重程度或改善其一种

或多种症状,或以使受试者的存活期延长超出在不存在此类治疗的情况下预期的存活期。在一些实施例中,“治疗”的方法采用向患有疾病或疾患或易患此类疾病或疾患的受试者施用多肽,以预防、治愈、延迟疾病或疾患或复发性疾病或疾患、减轻其严重程度或改善疾病或疾患或复发性疾病或疾患。

[0056] 如本文所用,术语“有效量”在向受试者施用疗法的上下文中是指实现所需预防性或治疗性效果的疗法的量。

[0057] 如本文所使用,术语“剂量”或“给药”是指在单次施用中向受试者施用的药剂的量。

[0058] 如本文所用,术语“等效剂量”是指第一治疗剂和第二治疗剂的剂量,其中第一药剂和第二药剂的分子数大约相同。在一些实施例中,等效剂量是等摩尔剂量。如本文所用,术语“等摩尔剂量”是指第一治疗剂和第二治疗剂的剂量,其中第一药剂和第二药剂的摩尔数相同。在一些实施例中,使用第一药剂和第二药剂的观察分子量来计算等效剂量。在一些实施例中,使用第一药剂和第二药剂的预测分子量来计算等效剂量。在一些实施例中,使用第一药剂的观察分子量和第二药剂的预测分子量来计算等效剂量。在一些实施例中,使用第一药剂的预测分子量和第二药剂的观察分子量来计算等效剂量。

[0059] 如本文所用,术语“药代动力学”和“PK”是指生物体对施用于该生物体的治疗剂的效果。在一些实施例中,效果是治疗剂的代谢和/或清除。在一些实施例中,PK是指治疗剂的代谢率和/或清除率。如本文所用,术语“改善的药代动力学”或“改善的PK”是指生物体对施用于该生物体的治疗剂的期望效果的改善。在一些实施例中,改善的药代动力学包括治疗剂在受试者体内的半衰期($T_{1/2}$)、清除率或曲线下面积(AUC)的增加。在一些实施例中,治疗剂是如本文所述的融合蛋白或治疗性蛋白。

[0060] 如本文所使用,术语“受试者”或“患者”或“参与者”包括任何人或非人动物。在一个实施例中,受试者或患者或参与者是人或非人哺乳动物。在一个实施例中,受试者或患者或参与者是人。

[0061] 如本文所使用,当提及可测量值,诸如剂量时,术语“约”或“大约”涵盖给定值或范围的±20%、±15%、±10%、±5%、±1%或±0.1%的变化,只要适于执行本文所公开的方法。

[0062] 如本文所用,术语“分子量”可以指“预测分子量”或“观察分子量”。蛋白质的“预测分子量”是蛋白质中所有氨基酸的分子量之和。在某些情况下,分子的“预测分子量”可能与“观察分子量”不同。在一些实施例中,这些差异可能由于蛋白质或其他蛋白质与给定蛋白质的复合物的糖基化、聚糖化、泛素化、磷酸化或蛋白质切割的变化而出现在蛋白质中。

[0063] 抗原结合分子

[0064] 在一方面,本公开提供了特异性结合HSA的抗原结合分子(即,HSA结合分子)。更具体地,本公开的HSA结合分子在酸性pH下优先结合HSA,而在生理pH下不结合或弱结合HSA。在一些实施例中,HSA结合分子在酸性pH下与HSA的结合亲和力为HSA结合分子在生理pH下与HSA的结合亲和力的至少约100倍。在一些实施例中,HSA结合分子在酸性pH下与HSA的结合亲和力为HSA结合分子在生理pH下与HSA的结合亲和力的至少约5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、175倍、200倍、225倍、250倍、275倍、300倍、350倍、

400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍或1000倍。在一些实施例中,酸性pH为pH 5.5和/或pH 6.0。在一些实施例中,生理pH为pH 7.4。

[0065] 在一些实施例中,HSA结合分子在酸性pH下与HSA结合的平衡解离常数小于0.001、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030、0.035、0.040、0.045、0.050、0.055、0.060、0.065、0.070、0.075、0.080、0.085、0.090、0.095、0.10、.0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.3、0.4或0.5mM。在一些实施例中,HSA结合分子在生理pH下与HSA结合的平衡解离常数为至少1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、13.0、14.0或15.0mM。在一些实施例中,酸性pH为pH 5.5和/或pH 6.0。在一些实施例中,生理pH为pH 7.4。

[0066] 在一些实施例中,HSA结合分子在酸性pH下与HSA结合的平衡解离常数小于0.001、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030、0.035、0.040、0.045、0.050、0.055、0.060、0.065、0.070、0.075、0.080、0.085、0.090、0.095、0.10、.0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.3、0.4或0.5mM,并且HSA结合分子在生理pH下与HSA结合的平衡解离常数为至少1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、13.0、14.0或15.0mM。在一些实施例中,酸性pH为pH 5.5和/或pH 6.0。在一些实施例中,生理pH为pH 7.4。

[0067] 在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。

[0068] 在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。

[0069] 在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少

11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4mM。

[0070] 在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA的平衡解离常数小于0.03至0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4至11.5mM。在一些实施例中,抗原结合分子在pH 5.5下与HSA的平衡解离常数小于0.03至0.140mM,并且抗原结合分子在pH 7.4下与HSA的平衡解离常数为至少2.4至11.5mM。

[0071] 在一些实施例中,特异性结合HSA的抗原结合分子的至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA结合,并且与HSA结合的抗原结合分子的最多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%在pH 7.4下是游离的。在一些实施例中,特异性结合HSA的抗原结合分子的至少75%-99%、80%-98%或85%-97%在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA结合,并且与HSA结合的抗原结合分子的最多1%-25%、2%-20%或3%-15%在pH 7.4下是游离的。

[0072] 在一些实施例中,特异性结合HSA的抗原结合分子的至少80%在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA结合,并且与HSA结合的抗原结合分子的最多20%在pH 7.4下是游离的。在一些实施例中,特异性结合HSA的抗原结合分子的至少95%在pH 5.5和/或pH 6.0下与HSA结合,并且与HSA结合的抗原结合分子的最多5%在pH 7.4下是游离的。

[0073] 在一些实施例中,HSA结合分子在生理pH下不结合HSA。在一些实施例中,HSA结合分子与HSA的结合在生理pH下不可检测。在一些实施例中,生理pH为pH 7.4。

[0074] HSA结合分子与HSA的结合亲和力可以通过任何已知的方法测量。在一些实施例中,HSA结合分子与HSA的结合亲和力通过表面等离子体共振测量。

[0075] 在一些实施例中,HSA结合分子不与FcRn竞争HSA结合。

[0076] 在一些实施例中,抗原结合分子是来源于抗体的多肽,包括但不限于sdAb(例如,VHH片段)、Fab片段、scFv、VH或VL。在一些实施例中,抗原结合分子是合成的抗原结合蛋白或抗体模拟蛋白,包括但不限于anticalin或DARPin。

[0077] 在一些实施例中,HSA结合分子与HSA的pH依赖性结合可以通过将一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸取代为组氨酸(H)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)或丙氨酸(A)来增强。在一些实施例中,一个或多个CDR中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,CDR1中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,CDR2中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,CDR3中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR1中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR2中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR3中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR1中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR2中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR3中的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。

[0078] 在一些实施例中,CDR1和CDR2中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,CDR2和CDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,CDR1和CDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些

实施例中,CDR1、CDR2和CDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。

[0079] 在一些实施例中,HCDR1和HCDR2中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR2和HCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR1和HCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,HCDR1、HCDR2和HCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。

[0080] 在一些实施例中,LCDR1和LCDR2中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR2和LCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR1和LCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。在一些实施例中,LCDR1、LCDR2和LCDR3中的每一者的1、2或3个氨基酸独立地被H、D、E或A取代。

[0081] 在一些实施例中,抗原结合分子进一步包含在其C末端处添加的一个或多个氨基酸。在一些实施例中,抗原结合分子进一步包含在C末端处添加的选自A、AG、GG和PP的一个或多个氨基酸。在一些实施例中,VHH的C末端是氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:195)。在一些实施例中,VHH的C末端由氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:195)组成。

[0082] 在一些实施例中,抗原结合分子特异性结合HSA并且选自Fab片段、scFv、sdAb及其抗原结合片段。在一些实施例中,抗原结合结构域特异性结合HSA并且是sdAb,诸如VHH片段。在一些实施例中,HSA包含与GenBank登录号:AAA98797.1中提供的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,HSA包含GenBank登录号:AAA98797.1中提供的氨基酸序列。

[0083] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含以下的VHH片段:包含选自SEQ ID NO:15-20、77-88、90-115和186-194的氨基酸序列的VHH片段的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0084] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含CDR1、CDR2和CDR3的组合或由其组成的VHH片段,其中1、2、3、4或5个氨基酸在选自以下的氨基酸序列的至少一者中不同:SEQ ID NO:5、6和8;5、6和9;5、6和10;5、6和11;5、6和12;5、6和13;5、6和21;5、6和22;5、6和23;5、6和24;5、6和25;5、6和26;5、6和27;5、6和28;5、6和29;5、6和30;5、6和31;5、6和32;33、34和36;33、34和37;33、34和38;33、34和39;33、34和40;33、34和41;33、34和42;33、34和43;33、34和44;33、34和45;33、34和46;33、34和47;33、34和48;33、34和49;33、34和50;33、34和51;33、34和52;33、34和53;177、34和35;178、34和35;33、179和35;33、180和35;33、181和35;33、182和35;33、183和35;33、184和35;33、185和35;54、55和56;54、57和58;59、60和61;62、63和64;65、66和67;68、69和70;71、72和73;74、75和76;以及173、174和175。

[0085] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3的组合或由其组成的VHH片段:SEQ ID NO:5、6和8;5、6和9;5、6和10;5、6和11;5、6和12;5、6和13;5、6和21;5、6和22;5、6和23;5、6和24;5、6和25;5、6和26;5、6和27;5、6和28;5、6和29;5、6和30;5、6和31;5、6和32;33、34和36;33、34和37;33、34和38;33、34和39;33、34和40;33、34和41;33、34和42;33、34和43;33、34和44;33、34和45;33、34和46;33、34和47;33、34和48;33、34和49;33、34和50;33、34和51;33、34和52;33、34和53;177、34和35;178、34和35;33、179和35;33、180和35;33、181和35;33、182和35;33、183和35;33、184和35;33、185和35;54、55和56;54、57和58;59、60和61;62、63和64;65、66和67;68、69和70;71、72和73;74、75和76;以及

173、174和175,其中CDR中的一者或多者内的一个或多个氨基酸被丙氨酸或组氨酸取代。

[0086] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3的组合或由其组成的VHH片段:SEQ ID NO:5、6和8;5、6和9;5、6和10;5、6和11;5、6和12;5、6和13;5、6和21;5、6和22;5、6和23;5、6和24;5、6和25;5、6和26;5、6和27;5、6和28;5、6和29;5、6和30;5、6和31;5、6和32;33、34和36;33、34和37;33、34和38;33、34和39;33、34和40;33、34和41;33、34和42;33、34和43;33、34和44;33、34和45;33、34和46;33、34和47;33、34和48;33、34和49;33、34和50;33、34和51;33、34和52;33、34和53;177、34和35;178、34和35;33、179和35;33、180和35;33、181和35;33、182和35;33、183和35;33、184和35;33、185和35;54、55和56;54、57和58;59、60和61;62、63和64;65、66和67;68、69和70;71、72和73;74、75和76;以及173、174和175。

[0087] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含与选自SEQ ID NO:15-20、77-88、90-115和186-194的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列或由其组成的VHH片段。在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自SEQ ID NO:15-20、77-88、90-115和186-194的氨基酸序列或由其组成的VHH片段。

[0088] 在一些实施例中,抗原结合结构域包含SEQ ID NO:15-20、77-88、90-115和186-194中任一者的氨基酸序列或其变体以及在C末端处添加的选自A、AG、GG和PP的一个或多个氨基酸。

[0089] 在一些实施例中,抗原结合结构域是Fab或scFv,其包含VH的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列并且包含VL的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,该VH包含SEQ ID NO:157、159、161、163、165、167、169或171的氨基酸序列,该VL包含SEQ ID NO:158、160、162、164、166、168、170或172的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含VH和VL的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的组合的Fab或scFv,其中1、2、3、4或5个氨基酸在选自以下的CDR的氨基酸序列中的至少一者中不同:SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172。在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自以下的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的组合的Fab或scFv:SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172。

[0091] 在一些实施例中,抗原结合结构域是由VH和VL的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的组合组成的Fab或scFv,其中1、2、3、4或5个氨基酸在选自以下的氨基酸序列中的至少一者中不同:SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172。在一些实施例中,抗原结合结构域是由选自以下的VH和VL的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3的组合组成的Fab或scFv:SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172。

[0092] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自以下的HCDR1、HCDR2和HCDR3的组合或由其组成的Fab或scFv:SEQ ID NO:116、117和118;119、120和121;122、120和121;123、124和125;126、127和128;129、130和131;132、133和134;以及135、136和137。在一些实施例中,抗原结合结构域是包含选自以下的LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合或由其组成的Fab或scFv:SEQ ID NO:138、139和140;141、142和143;144、145和146;141、142和143;147、148和149;150、151和152;153、148和154;以及155、151和156。在一些实施例中,抗原结合结构域

是包含选自以下的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合或由其组成的Fab或scFv:SEQ ID NO:116、117、118、138、139和140;119、120、121、141、142和143;122、120、121、144、145和146;123、124、125、141、142和143;126、127、128、147、148和149;129、130、131、150、151和152;132、133、134、153、148和154;以及135、136、137、155、151和156。

[0093] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含VH和VL的Fab或scFv,其中VH包含与选自SEQ ID NO:157、159、161、163、165、167、169或171的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且VL包含与选自SEQ ID NO:158、160、162、164、166、168、170或172的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,抗原结合结构域是包含VH和VL的Fab或scFv,其中VH包含选自SEQ ID NO:157、159、161、163、165、167、169或171的氨基酸序列,并且其中VL包含选自SEQ ID NO:158、160、162、164、166、168、170或172的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施例中,抗原结合结构域是包含VH和VL的Fab或scFv,其中VH和VL包含与选自以下的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172。在一些实施例中,抗原结合结构域是包含VH和VL的Fab或scFv,其中VH和VL包含SEQ ID NO:157和158、159和160、161 162、163和164、165和166、167和168、169和170、或171和172的氨基酸序列。

[0095] 治疗性蛋白

[0096] 治疗性蛋白可以与本公开的HSA结合分子融合以延长其半衰期。治疗性蛋白的实例包括但不限于干扰素、酶、激素、生长因子、白细胞介素、凝血因子、抗体及其片段和变体。在一些实施例中,治疗性蛋白是人蛋白质或来源于人蛋白质。

[0097] 在一些实施例中,治疗性蛋白是治疗性抗体或其片段。

[0098] 在一些实施例中,本文公开的治疗性蛋白包含与一个或多个抗原结合结构域(例如,VH、VL、sdAb、Fab片段、scFv或抗体模拟物)组合的一个或多个Fc区或其片段。在一些实施例中,本文公开的治疗性蛋白包含一个或多个抗原结合结构域(例如,VH、VL、sdAb、Fab片段、scFv或抗体模拟物)。

[0099] 一般而言,治疗性抗体或其片段是人免疫球蛋白。然而,应当理解,治疗性抗体可来源于任何其他哺乳动物物种的免疫球蛋白,包括例如骆驼物种、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)或非人灵长类动物(例如,猩猩、猕猴)物种。此外,治疗性抗体或其片段可来源于任何免疫球蛋白类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何免疫球蛋白同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0100] 为了增强如本文所公开的治疗性抗体和含有其的融合蛋白的可制造性,优选组成性Fc区不包含任何非二硫键键合的半胱氨酸残基。因此,在一个实施例中,Fc区不包含游离半胱氨酸残基。

[0101] 融合蛋白

[0102] 本公开提供了融合蛋白,其包含至少一种特异性结合HSA的抗原结合分子以及至少一种治疗性蛋白。已经有利地发现,将本公开的HSA结合分子与治疗性蛋白融合增加了治疗性蛋白的半衰期,这是由于HSA结合分子在内体(酸性pH)中与HSA结合并因此与HSA一起

再循环的能力。然而,由于HSA结合分子在血流中的生理pH下不结合或弱结合HSA,因此融合蛋白不干扰白蛋白功能。同样,融合蛋白保留了其功效,因为它在血流中不被HSA结合。

[0103] 治疗性蛋白可以是本文所述的或本领域已知的任何治疗性蛋白。抗原结合分子可以是本文所述的任何抗原结合分子。在一些实施例中,融合蛋白仅包含一种抗原结合分子。在一些实施例中,融合蛋白包含两种或更多种抗原结合分子。在一些实施例中,融合蛋白仅包含一种治疗性蛋白。在一些实施例中,融合蛋白包含两种或更多种治疗性蛋白。在一些实施例中,融合蛋白包含一种抗原结合分子和一种治疗性蛋白。

[0104] 在一些实施例中,抗原结合分子融合至治疗性蛋白的C末端。在一些实施例中,抗原结合分子融合至治疗性蛋白的N末端。

[0105] 在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的N末端,并且另一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的C末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的N末端或C末端以外的位置,并且另一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的N末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的N末端或C末端以外的位置,并且另一种抗原结合分子融合至治疗性蛋白的C末端。

[0106] 在一些实施例中,一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的N末端,并且另一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的C末端。在一些实施例中,一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的N末端或C末端以外的位置,并且另一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的N末端。在一些实施例中,一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的N末端或C末端以外的位置,并且另一种治疗性蛋白融合至抗原结合分子的C末端。

[0107] 在一些实施例中,治疗性蛋白是包含Fc区的治疗性抗体或其片段。在一些实施例中,抗原结合分子融合至Fc区的一个或两个Fc结构域的C末端。在一些实施例中,抗原结合分子融合至Fc区的一个或两个Fc结构域的N末端。在一些实施例中,抗原结合分子“替换”治疗性抗体的抗原结合结构域(例如,VHH、VH、VL、Fab片段、scFv等)中的一者或两者。在一些实施例中,抗原结合分子融合至治疗性抗体的抗原结合结构域的N末端。

[0108] 在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至Fc区的Fc结构域中的一者的C末端,并且另一种抗原结合分子融合至Fc区的另一个Fc结构域的C末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至Fc区的Fc结构域中的一者的N末端,并且另一种抗原结合分子融合至Fc区的另一个Fc结构域的N末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至Fc区的Fc结构域中的一者的N末端,并且另一种抗原结合分子融合至Fc区的另一个Fc结构域的C末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至Fc区的Fc结构域中的一者的N末端或C末端以外的位置,并且另一种抗原结合分子融合至Fc区的另一个Fc结构域的N末端。在一些实施例中,一种抗原结合分子融合至Fc区的Fc结构域中的一者的N末端或C末端以外的位置,并且另一种抗原结合分子融合至Fc区的另一个Fc结构域的C末端。

[0109] 在一些实施例中,抗原结合分子可以直接融合至治疗性蛋白的N末端或C末端。在一些实施例中,抗原结合分子经由接头融合至治疗性蛋白的N末端或C末端。在一些实施例中,接头是不可切割的接头。

[0110] 在一些实施例中,抗原结合分子可以直接融合至Fc结构域的N末端或C末端。在一些实施例中,抗原结合分子经由接头融合至Fc结构域的N末端或C末端。接头可以是任何合适的接头,包括本文描述的那些。

[0111] 接头

[0112] 抗原结合分子可以融合至治疗性蛋白(例如,抗体或其片段)的N末端或C末端。

[0113] 在一些实施例中,抗原结合分子可以直接融合至治疗性蛋白的N末端或C末端。在一些实施例中,抗原结合分子经由接头连接至治疗性蛋白的N末端或C末端。在一些实施例中,接头是不可切割的接头。

[0114] 在一些实施例中,抗原结合分子可以直接融合至Fc结构域的N末端或C末端。在一些实施例中,抗原结合分子经由接头连接至Fc结构域的N末端或C末端。在一些实施例中,接头是不可切割的接头。如本文所用,术语"不可切割的接头"是指不易被给定的酶、化学药剂或光照射中的一者或多者切割的接头。在一些实施例中,酶是蛋白酶。

[0115] 在一些实施例中,接头是合成化合物接头,诸如例如化学交联剂。市场上可获得的合适交联剂的非限制性实例包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰基氧基)乙基]砜(BSOCOES)和双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砜(磺基-BSOCOES)。

[0116] 本文公开的Fc结构域可包含铰链区的一部分。因此,抗原结合分子可以经由该铰链区连接至Fc结构域的N末端。在一些实施例中,抗原结合分子的C末端与Fc结构域的N末端之间包含一个或多个氨基酸。在一些实施例中,抗原结合分子的C末端与Fc结构域的N末端之间包含的一个或多个氨基酸是天然铰链区的氨基酸。在一些实施例中,抗原结合分子的C末端经由铰链区或其部分融合至Fc结构域的N末端。在一些实施例中,铰链区是IgG铰链区,诸如人IgG铰链区。

[0117] 在一些实施例中,接头是肽接头。肽接头的实例是众所周知的,并且本领域技术人员可以选择合适的肽接头用于将抗原结合分子连接至治疗性蛋白。

[0118] 肽接头可以是任何长度。在一些实施例中,可优化接头肽序列的长度和氨基酸组成以改变抗原结合分子和治疗性蛋白彼此的定向和/或接近度,以实现融合蛋白的所需活性。在一些实施例中,肽接头的长度介于约1与约100个氨基酸之间、长度介于约8与约40个氨基酸之间、或长度介于约15个氨基酸与约25个氨基酸之间。在一些实施例中,肽接头的长度介于1与100个氨基酸之间、长度介于8与40个氨基酸之间、或长度介于15与25个氨基酸之间。在一些实施例中,肽接头的长度为约8个氨基酸、长度为约9个氨基酸、长度为约10个氨基酸、长度为约11个氨基酸、长度为约12个氨基酸、长度为约13个氨基酸、长度为约14个氨基酸、长度为约15个氨基酸、长度为约16个氨基酸、长度为约17个氨基酸、长度为约18个氨基酸、长度为约19个氨基酸、长度为约20个氨基酸、长度为约21个氨基酸、长度为约22个氨基酸、长度为约23个氨基酸、长度为约24个氨基酸、长度为约25个氨基酸、长度为约26个氨基酸、长度为约27个氨基酸、长度为约28个氨基酸、长度为约29个氨基酸、长度为约30个氨基酸、长度为约31个氨基酸、长度为约32个氨基酸、长度为约33个氨基酸、长度为约34个氨基酸、长度为约35个氨基酸、长度为约36个氨基酸、长度为约37个氨基酸、长度为约38个氨基酸、长度为约39个氨基酸或长度为约40个氨基酸。在一些实施例中,肽接头的长度为8个氨基酸、长度为9个氨基酸、长度为10个氨基酸、长度为11个氨基酸、长度为12个氨基酸、长

度为13个氨基酸、长度为14个氨基酸、长度为15个氨基酸、长度为16个氨基酸、长度为17个氨基酸、长度为18个氨基酸、长度为19个氨基酸、长度为20个氨基酸、长度为21个氨基酸、长度为22个氨基酸、长度为23个氨基酸、长度为24个氨基酸、长度为25个氨基酸、长度为26个氨基酸、长度为27个氨基酸、长度为28个氨基酸、长度为29个氨基酸、长度为30个氨基酸、长度为31个氨基酸、长度为32个氨基酸、长度为33个氨基酸、长度为34个氨基酸、长度为35个氨基酸、长度为36个氨基酸、长度为37个氨基酸、长度为38个氨基酸、长度为39个氨基酸或长度为40个氨基酸。

[0119] 在一些实施例中,肽接头仅含有甘氨酸和/或丝氨酸残基(例如,甘氨酸-丝氨酸接头或GS接头)。此类肽接头的实例包括:Gly(x)Ser,其中x为0至6;或Ser Gly(x),其中x为0至6;(Gly Gly Gly Gly Ser)n,其中n为1或更大的整数;以及(Ser Gly Gly Gly Gly)n,其中n为1或更大的整数。在一些实施例中,肽接头包括选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:(GGGGS)n和(SGGGG)n,其中n为1至8。在一些实施例中,接头肽被修饰,使得氨基酸序列GSG(其出现在传统Gly/Ser接头肽重复的连接处)不存在。例如,在一些实施例中,肽接头包括选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:(GGGXX)nGGGGS和GGGGS(XGGGS)n,其中X是可以插入到序列中并且不产生包括序列GSG的多肽的任何氨基酸,并且n为0至4。在一些实施例中,接头肽的序列是(GGGX1X2)nGGGGS,并且X1为P且X2为S且n为0至4。在一些其他实施例中,接头肽的序列是(GGGX1X2)nGGGGS,并且X1为G且X2为Q且n为0至4。在一些其他实施例中,接头肽的序列是(GGGX1X2)nGGGGS,并且X1为G且X2为A且n为0至4。在又其他实施例中,接头肽的序列是GGGGS(XGGGS)n,并且X为P且n为0至4。在一些实施例中,本公开的接头肽包含氨基酸序列$(GGGGA)_2GGGGS$或由其组成。在一些实施例中,接头肽包含氨基酸序列$(GGGGQ)_2GGGGS$或由其组成。在另一个实施例中,接头肽包含氨基酸序列$(GGGPS)_2GGGGS$或由其组成。在另一个实施例中,接头肽包含氨基酸序列$GGGGS(PGGGS)_2$或由其组成。在又一个实施例中,接头肽包含氨基酸序列GSGGS或SGGSGS或由其组成。在一些实施例中,接头肽包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:2)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:3)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:4)或由其组成。

[0120] 在一些实施例中,肽接头是长度为约20或约30个氨基酸的GS接头。在一些实施例中,肽接头是长度为20或30个氨基酸的GS接头。

[0121] 多核苷酸、载体和产生方法

[0122] 本公开还提供了编码本文公开的抗原结合分子或其片段的多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸编码本公开的治疗性蛋白。在一些实施例中,多核苷酸编码本公开的融合蛋白。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子、治疗性蛋白和接头中的一者或多者。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子和治疗性蛋白,以及任选地接头。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子、Fc区和接头中的一者或多者。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子和Fc区,以及任选地接头。在一些实施例中,多核苷酸编码包含一种或多种抗原结合分子和治疗性蛋白的融合蛋白。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子、Fc结构域和接头中的一者或多者。在一些实施例中,多核苷酸编码抗原结合分子和Fc结构域,以及任选地接头。在一些实施例中,多核苷酸编码包含一种或多种抗原结合分子和一种或多种治疗性蛋白的融合蛋白。

[0123] 如本文所用,“经分离的”多核苷酸或核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源

(例如,在小鼠或人中)中的其他核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外,“经分离的”核酸分子,诸如cDNA分子,当通过重组技术产生时可以基本上不含其他细胞物质或培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。例如,措辞“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特别是少于约10%)的其他物质(例如,细胞物质、培养基、其他核酸分子、化学前体和/或其他化学物质)的多核苷酸或核酸分子的制剂。在一个实施例中,编码本文所述的多肽的核酸分子是分离或纯化的。

[0124] 在一方面,本文提供了包含编码本文所述的治疗性蛋白或融合蛋白的核苷酸序列的多核苷酸。在另一方面,本文提供了包含编码本文所述的抗原结合分子的核苷酸序列的多核苷酸。在另一方面,本文提供了包含编码本文所述的融合蛋白的核苷酸序列的多核苷酸。

[0125] 多核苷酸可包含编码包含本文所述的抗原结合分子的FR和CDR的sdAb(例如,VHH片段)、Fab片段、scFv、VH或VL的核苷酸序列。多核苷酸还可以包含编码如本文所述的抗体模拟物的核苷酸序列。在一些实施例中,多核苷酸可包含编码包含本文所述的抗原结合分子的FR和CDR的VHH片段的核苷酸序列。在一些实施例中,多核苷酸可包含编码包含本文所述的抗原结合分子的VL FR和CDR的轻链的核苷酸序列或编码包含本文所述的抗原结合分子的VH FR和CDR的重链和/或如本文所述的Fc结构域的核苷酸序列。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的VH、VL、重链和/或轻链。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的第一VH和第一VL。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的第二VH和第二VL。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的第一重链和第一轻链。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的第二重链和第二轻链。在一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗原结合分子的VH和/或VL、或重链和/或轻链。

[0126] 在一些实施例中,多核苷酸包含编码两个或更多个Fc结构域的核苷酸序列。在一些实施例中,多核苷酸包含编码两个Fc结构域的核苷酸序列。在一些实施例中,多核苷酸包含编码第一Fc结构域的第一核苷酸序列和编码第二Fc结构域的第二核苷酸序列。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列包含在不同的核酸分子中。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列包含在相同的核酸分子中。

[0127] 在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列还编码抗原结合分子。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码相同的抗原结合分子。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码不同的抗原结合分子。在一些实施例中,第一核苷酸序列编码治疗性抗体的Fc结构域和抗原结合分子,并且第二核苷酸序列编码治疗性抗体的Fc结构域和抗原结合结构域。由第一核苷酸序列和/或第二核苷酸序列编码的抗原结合分子可以是本文所述的任何抗原结合分子。

[0128] 在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列还编码肽接头。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码相同的肽接头。在一些实施例中,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列编码不同的肽接头。在一些实施例中,第一核苷酸序列编码Fc结构域、肽接头和抗原结合分子,并且第二核苷酸序列编码来自治疗性抗体的Fc结构域和抗原结合结构域。在一些实施例中,第一核苷酸序列编码抗原结合分子、肽接头和Fc结构域,并且第二核苷酸序列编码来自治疗性抗体的Fc结构域和抗原结合结构域。由第一核苷酸序列

和/或第二核苷酸序列编码的肽接头可以是本文所述的任何肽接头。在一些实施例中,接头包含SEQ ID NO:2、3或4的氨基酸序列。

[0129] 本文还提供了编码如上文提供的多肽的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换和消除mRNA不稳定性元件来进行优化。通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制区来生成用于重组表达的经优化的核酸的方法可以通过相应地调整例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;和6,794,498中所述的优化方法来进行,所有这些文献通过引用以其整体并入本文。例如,RNA内的潜在剪接位点和不稳定元件(例如,富含A/T或A/U的元件)可以在不改变核酸序列编码的氨基酸的情况下进行突变,以增加用于重组表达的RNA的稳定性。这些改变利用遗传密码的简并性,例如,使用相同氨基酸的替代密码子。在一个实施例中,可能需要改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如,具有与原始氨基酸相似的化学结构和特性和/或功能的相似氨基酸。

[0130] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸,并确定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述的蛋白质的核苷酸序列和这些抗体的修饰形式可以使用本领域熟知的方法确定,即已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以生成编码蛋白质的核酸的方式组装。这种编码蛋白质的多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸组装而成(例如,如描述于Kutmeier G等人,(1994)BioTechniques 17:242-6,其通过引用以其整体并入本文),简而言之,其涉及合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,这些寡核苷酸的退火和连接,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0131] 可替代地,可以使用本领域熟知的方法(例如,PCR和其他分子克隆方法)从来自合适来源(例如,杂交瘤)的核酸生成编码本文所述的蛋白质的多核苷酸。例如,使用可与已知序列的3'和5'端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生感兴趣的多肽的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。此类PCR扩增方法可用于获得包含编码多肽的序列的核酸。扩增的核酸可以克隆到载体中以在宿主细胞中表达并用于进一步克隆。

[0132] 如果无法获得含有编码特定多肽的核酸的克隆,但该多肽的序列是已知的,则通过使用可与序列的3'和5'端杂交的合成引物进行PCR扩增,或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针进行克隆以鉴定例如来自编码多肽的cDNA文库的cDNA克隆,可以化学合成编码该多肽的核酸或从合适的来源(例如,从表达本文所述的多肽的任何组织或细胞分离的核酸(优选地聚A+RNA)生成的cDNA文库)获得。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR生成的扩增核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0133] 编码本文所述的蛋白质的DNA可以使用常规方法容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以作为此类DNA的来源。一旦分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将其转染到宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞)或骨髓瘤细胞,这些细胞不以其他方式产生本文所述的蛋白质。

[0134] 还提供了在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文所述的蛋白质的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0135] 杂交条件已在本领域中描述并且为本领域技术人员已知。例如,在严格条件下的杂交可以包括在约45℃下在6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与滤膜结合的DNA杂交,随后在约50℃-65℃下在0.2xSSC/0.1% SDS中洗涤一次或多次;在高度严格条件下的杂交可涉及在约45℃下在6xSSC中与滤膜结合的核酸杂交,随后在约68℃下在0.1xSSC/0.2% SDS中洗涤

一次或多次。在其他严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知并且已有描述,参见,例如,Ausubel FM等人主编,(1989)Current Protocols in Molecular Biology,第I卷,Green Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.,New York,第6.3.1-6.3.6和2.10.3页,其通过引用以其整体并入本文。

[0136] 在一方面,本文提供了表达(例如,重组地)本文所述的蛋白质的细胞(例如,宿主细胞),以及相关的多核苷酸和表达载体。本文提供了包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),该多核苷酸包含编码本文所述的蛋白质的核苷酸序列,用于在宿主细胞、优选地在哺乳动物细胞(例如,CHO细胞)中重组表达。本文还提供了包含用于重组表达本文所述的蛋白质的此类载体的宿主细胞。在一方面,本文提供了用于产生本文所述的蛋白质的方法,该方法包括从宿主细胞表达多肽。

[0137] 本文所述的蛋白质的重组表达通常涉及构建含有编码多肽的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本文所述的多肽的多核苷酸,就可以使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术产生用于产生多肽的载体。因此,本文描述了通过表达含有多肽编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有多肽编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了可复制的载体,其包含可操作地连接至启动子的编码本文所述的多肽的核苷酸序列。此类载体可以例如包括编码多肽的恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开号WO 86/05807和WO 89/01036;和美国专利号5,122,464,其通过引用以其整体并入本文),并且可以将多肽的可变区克隆到此载体中,用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0138] 在一个实施例中,载体包含编码本文所述的多肽的sdAb、Fab片段、scFv、VHH片段、VH、VL、重链和/或轻链的多核苷酸。在另一个实施例中,载体包含编码本文所述的多肽的VH和VL的多核苷酸。在另一个实施例中,载体包含编码本文所述的多肽的重链和轻链的多核苷酸。

[0139] 可以通过常规技术将表达载体转移至细胞(例如,宿主细胞),然后可通过常规技术培养所得细胞以产生本文所述的多肽或其片段。因此,本文提供了含有编码含有本文所述的多肽或其片段、或其重链或轻链、或其片段、或本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞,多核苷酸可操作地连接至用于在宿主细胞中表达此类序列的启动子。

[0140] 在一个实施例中,宿主细胞包含含有上述第一核苷酸序列中的一者和第二核苷酸序列中的一者的多核苷酸。在另一个实施例中,宿主细胞包含含有上述第一核苷酸序列中的一者的第一多核苷酸和含有上述第一核苷酸序列中的一者的第二多核苷酸。在另一个实施例中,宿主细胞包含含有上述第一核苷酸序列中的一者和第二核苷酸序列中的一者的第一载体。在另一个实施例中,宿主细胞包含含有上述第一核苷酸序列中的一者和第二核苷酸序列中的一者的第一载体,以及含有第二多核苷酸的第二载体,第二多核苷酸包含上述第一核苷酸序列中的一者。

[0141] 在一些实施例中,由第一宿主细胞表达的抗原结合分子或融合蛋白与由第二宿主细胞表达的抗原结合分子或融合蛋白缔合以形成二聚体。在一些实施例中,本文提供了包含此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞的宿主细胞群体。

[0142] 在一些实施例中,本文提供了包含第一载体和第二载体的载体群体,第一载体包

含编码抗原结合分子或融合蛋白的多核苷酸,第二载体包含编码抗原结合分子或融合蛋白的多核苷酸。在一些实施例中,本文提供了包含第一载体和第二载体的载体群体,第一载体包含编码融合蛋白的多核苷酸,第二载体包含编码治疗性蛋白的多核苷酸。在一些实施例中,本文提供了包含第一载体和第二载体的载体群体,第一载体包含编码融合蛋白的多核苷酸,第二载体包含编码抗原结合分子的多核苷酸。在一些实施例中,本文提供了包含第一载体和第二载体的载体群体,第一载体包含编码抗原结合分子的多核苷酸,第二载体包含编码治疗性蛋白的多核苷酸。

[0143] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文所述的多肽(参见,例如,美国专利号5,807,715,其通过引用以其整体并入本文)。此类宿主表达系统代表可以产生并随后纯化感兴趣的编码序列的媒剂,但也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的多肽的细胞。这些包括但不限于用例如含有蛋白质编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物,诸如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用例如含有蛋白质编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母属和毕赤酵母属);用例如含有蛋白质编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用例如重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒TMV)感染或用例如含有蛋白质编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻,诸如莱茵衣藻);或哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞),其含有例如重组表达构建体,该重组表达构建体含有衍生自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或衍生自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。在一个实施例中,用于表达本文所述的蛋白质的细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在一个实施例中,由CHO细胞产生的抗体的重链和/或轻链可以具有被焦谷氨酸替换的N末端谷氨酰胺或谷氨酸残基。在一个实施例中,用于表达本文所述的多肽的细胞是人细胞,例如人细胞系。在一个实施例中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一个实施例中,细菌细胞诸如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于表达重组多肽。例如,哺乳动物细胞诸如CHO细胞,与载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件结合,是抗体的有效表达系统(Foecking MK和Hofstetter H(1986)Gene 45:101-5;和Cockett MI等人,(1990)Biotechnology 8(7):662-7,这些文献中的每一者均通过引用以其整体并入本文)。在一个实施例中,本文所述的多肽由CHO细胞或NS0细胞产生。在一个实施例中,编码本文所述的多肽的核苷酸序列的表达受组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0144] 在细菌系统中,可以根据待表达的分子的预期用途有利地选择许多表达载体。例如,当要产生大量此类多肽时,为了产生抗体分子的药物组合物,可能需要指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruether U和Mueller-Hill B(1983)EMBO J 2:1791-1794),其中编码序列可以单独连接到具有lac Z编码区的框架中的载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye S和Inouye M(1985)Nuc Acids Res 13:3101-3109;Van Heeke G和Schuster SM(1989)J Biol Chem 24:5503-5509);等,所有这些文献通过引用以其整体并入本文。例如,pGEX载体也可用于表

达外源多肽作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,此类融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从裂解的细胞中纯化。pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0145] 例如,在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)可以用作表达外源基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可以将编码序列单独克隆到病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中,并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0146] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可以将感兴趣的编码序列连接至腺病毒转录/翻译控制复合物,例如,晚期启动子和三联前导序列。然后可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区(例如,E1区或E3区)的插入将产生一种重组病毒,该病毒是有活力的,并且能够在受感染的宿主中表达该分子(参见,例如,Logan J和Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9,其通过引用以其整体并入本文)。插入编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源,包括天然的和合成的。可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见,例如,Bitter G等人,(1987)Methods Enzymol.153:516-544,其通过引用以其整体并入本文)。

[0147] 另外,可以选择调节插入序列的表达或以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能很重要。不同的宿主细胞具有用于对蛋白质和基因产物进行翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具有适当加工初级转录物、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在一个实施例中,本文所述的蛋白质在哺乳动物细胞诸如CHO细胞中产生。

[0148] 在一个实施例中,本文所述的多肽包含具有降低的岩藻糖含量或无岩藻糖含量的抗体的一部分。此类蛋白质可以使用本领域技术人员已知的技术来产生。例如,蛋白质可以在缺乏或缺少岩藻糖基化能力的细胞中表达。在一个实例中,具有α1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因敲除的细胞系可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体。Potelligent® 系统(Lonza)是可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体的此类系统的实例。

[0149] 对于重组蛋白的长期、高产量生产,可以产生稳定的表达细胞。例如,可以工程化稳定表达本文所述的蛋白质的细胞系。在一个实施例中,本文提供的细胞稳定地表达抗原结合分子、融合蛋白或治疗性蛋白,它们缔合以形成本文所述的多肽。

[0150] 在某些方面,不是使用含有病毒复制起点的表达载体,而是可以用受适当表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等等)控制的DNA和可选择标记转化宿主细胞。在引入外源DNA/多核苷酸后,可以允许经工程化的细胞在富集培养

基中生长一至两天,并且然后切换到选择性培养基。重组质粒中的可选标志物赋予对选择的抗性,并且允许细胞稳定地将质粒整合到它们的染色体中并且生长形成病灶,该病灶进而可以被克隆并扩增到细胞系中。该方法可以有利地用于工程化表达本文所述的多肽或其片段的细胞系。此类经工程化的细胞系可特别用于筛选和评估与多肽直接或间接相互作用的组合物。

[0151] 可以使用许多选择系统,包括但不限于分别在tk细胞、hgprt细胞或aprt细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等人,(1977)Cell 11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska EH和Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等人,(1980)Cell 22(3):817-23)基因,所有这些文献通过引用以其整体并入本文。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler M等人,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K等人,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan RC和Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Wu GY和Wu CH(1991)Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596;Mulligan RC(1993)Science 260:926-932;以及Morgan RA和Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191-217;Nabel GJ和Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211-5);以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre RF等人,(1984)Gene 30(1-3):147-56),所有这些文献通过引用以其整体并入本文。可以常规地应用重组DNA技术领域中公知的方法来选择所需的重组克隆,并且此类方法描述于例如Ausubel FM等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler M,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);并在第12章和第13章中,Dracopoli NC等人(编辑),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colbère-Garapin F等人,(1981)J Mol Biol 150:1-14,所有这些文献通过引用以其整体并入本文。

[0152] 多肽的表达水平可以通过载体扩增来增加(有关综述,参见,Bebbington CR和Hentschel CCG,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第163-188页载于DNA Cloning,第III卷,A Practical Approach.D.M.Glover(编辑)(Academic Press,New York,1987),其通过引用以其整体并入本文)。当载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与感兴趣的基因相关,因此多肽的产量也将增加(Crouse GF等人,(1983)Mol Cell Biol 3:257-66,其通过引用以其整体并入本文)。

[0153] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染。这两种载体可以含有相同的可选标志物,其使得多肽(诸如第一重链和第二重链多肽)能够同等地表达。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。例如,宿主细胞可以用以下比例中的任一者的第一表达载体和第二表达载体转染:约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45或1:50。

[0154] 可替代地,可以使用编码并能够表达两种多肽的单一载体。编码序列可包含cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子或多顺反子。多顺反子核酸构建体可编码2、3、4、5、

6、7、8、9、10或更多个基因/核苷酸序列,或在2-5、5-10或10-20个基因/核苷酸序列的范围内。例如,双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因和第二基因。在这种表达载体中,两个基因的转录可以由启动子驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以通过帽依赖性扫描机制进行,并且来自第二基因的mRNA的翻译可以通过帽非依赖性机制,例如,通过IRES进行。

[0155] 一旦通过重组表达产生了本文所述的多肽,就可以通过本领域已知的用于纯化蛋白质的任何方法对其进行纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换、亲和力,特别是通过在蛋白A后对特定抗原的亲和力,以及定径柱色谱法)、离心、差别溶解度,或通过任何其他用于纯化蛋白质的标准技术。此外,本文所述的多肽可以融合至本文所述的或本领域已知的异源多肽序列以促进纯化。

[0156] 在一个实施例中,本文所述的多肽是分离的或纯化的。在一个实施例中,分离的多肽是基本上不含与该分离的多肽具有不同抗原特异性的其他多肽的多肽。例如,在某些实施例中,本文所述的蛋白质制剂基本上不含细胞物质和/或化学前体。措辞“基本上不含细胞物质”包括多肽制剂,其中多肽与分离或重组产生多肽的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的多肽包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(本文也称为“污染蛋白质”)和/或多肽变体(例如,多肽的不同翻译后修饰形式或多肽的其他不同版本(例如,多肽片段))的多肽制剂。当重组产生多肽时,其通常也基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当通过化学合成产生多肽时,其通常基本上不含化学前体或其他化学物质,即其与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物质分离。因此,此类蛋白质制剂具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的除感兴趣的分子之外的化学前体或化合物。在一个实施例中,本文所述的多肽是分离的或纯化的。

[0157] 本文所述的多肽可以通过本领域已知的用于合成蛋白质的任何方法产生,例如通过化学合成或通过重组表达技术。除非另有说明,否则本文所述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交以及本领域技术范围内的相关领域中的常规技术。例如,在本文引用的参考文献中描述了这些技术,并且在文献中对其进行了充分解释。参见,例如,Maniatis T等人,(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(1989),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel FM等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1987年和年度更新);Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons(1987年和年度更新);Gait(编辑)(1984)Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press;Eckstein(编辑)(1991)Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,IRL Press;Birren B等人(编辑)(1999)Genome Analysis:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,所有这些文献通过引用以其整体并入本文。

[0158] 在一个实施例中,本文所述的多肽通过涉及产生的任何方式来制备、表达、产生或分离,例如,经由DNA序列的合成、基因工程。在一个实施例中,此类多肽包含在动物或哺乳

动物(例如,人)体内的抗体种系库中天然不存在的序列(例如,DNA序列或氨基酸序列)。

[0159] 药物组合物

[0160] 在一方面,本公开提供了包含如本文所公开的融合蛋白的药物组合物,该药物组合物用于在治疗疾病或疾患的方法中使用。在另一方面,本公开提供了包含如本文所公开的抗原结合分子的药物组合物,该药物组合物用于在治疗疾病或疾患的方法中使用。

[0161] 本文所公开的调配物包括可用于制造药物组合物(例如,适于向受试者或患者施用的组合物)的散装药物组合物,这些药物组合物可用于制备单位剂型。在一个实施例中,本发明的组合物是药物组合物。此类组合物包含预防或治疗有效量的一种或多种本发明的预防剂或治疗剂(例如,融合蛋白)(或其他预防剂或治疗剂)以及药学上可接受的载剂。

[0162] 在一些实施例中,药物组合物被调配用于通过任何合适的施用途径施用于受试者,施用途径包括但不限于肌内、静脉内、皮内、腹膜内、皮下、硬膜外、经鼻、口服、直肠、局部、吸入、含服(例如,舌下)和透皮施用。在一个实施例中,这些药物组合物调配成适于向受试者静脉内施用。在一个实施例中,这些药物组合物调配成适于向受试者皮下施用。

[0163] 方法

[0164] 本公开提供了用于增加治疗性蛋白的血清半衰期的方法,该方法包括将本发明的抗原结合分子与治疗性蛋白融合。治疗性蛋白可以是本文所述的或本领域已知的任何治疗性蛋白。

[0165] 在一些实施例中,与单次治疗性施用治疗性蛋白后的治疗性蛋白的清除率相比,在单次治疗性施用融合蛋白(包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白)后,在受试者体内融合蛋白的清除率降低。在一些实施例中,与单次治疗性施用治疗性蛋白后的治疗性蛋白的清除率相比,在单次治疗性施用融合蛋白后,在受试者体内融合蛋白的清除率降低至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍或至少20倍。

[0166] 在一些实施例中,与单次施用等效剂量的治疗性蛋白后的治疗性蛋白的清除率相比,在单次施用融合蛋白(包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白)后,在受试者体内融合蛋白的清除率降低。在一些实施例中,与单次施用等效剂量的治疗性蛋白后的治疗性蛋白的清除率相比,在单次施用融合蛋白后,在受试者体内融合蛋白的清除率降低至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍或至少20倍。

[0167] 在一些实施例中,与单次治疗性施用治疗性蛋白后的治疗性蛋白的终末半衰期($t_{1/2,z}$)相比,在单次治疗性施用融合蛋白(包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白)后,在受试者体内融合蛋白的$t_{1/2,z}$有所增加。在一些实施例中,与单次治疗性施用治疗性蛋白后的治疗性蛋白的$t_{1/2,z}$相比,在单次治疗性施用融合蛋白后,在受试者体内融合蛋白的$t_{1/2,z}$增加至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍或至少20倍。

[0168] 在一些实施例中,与单次施用等效剂量的治疗性蛋白后的治疗性蛋白的$t_{1/2,z}$相比,在单次施用融合蛋白(包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白)后,在受试者体内融合蛋白的$t_{1/2,z}$有所增加。在一些实施方例中,与单次施用等效剂量的治疗性蛋白后的治疗性蛋白的$t_{1/2,z}$相比,在单次施用融合蛋白后,在受试者体内融合蛋白的$t_{1/2,z}$增加至少0.5

倍、至少1倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少15倍或至少20倍。

[0169] 在一些实施例中,包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白的融合蛋白的功效与治疗性蛋白的功效相同或基本上相同。在一些实施例中,与治疗性蛋白的功效相比,融合蛋白的功效降低不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0170] 在一些实施例中,包含本发明的抗原结合分子和治疗性蛋白的融合蛋白的剂量的功效与等效剂量的治疗性蛋白的功效相同或基本上相同。在一些实施例中,与等效剂量的治疗性蛋白的功效相比,融合蛋白剂量的功效降低不超过10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0171] 在一个实施例中,融合蛋白或抗原结合分子不拮抗FcRn与白蛋白的结合。

[0172] 在一个实施例中,在施用融合蛋白或抗原结合分子后,在受试者体内白蛋白的水平与白蛋白的基线水平相比没有降低。在一个实施例中,观察到与基线白蛋白水平相比小于约1%、2%、3%、4%或5%的白蛋白降低。在一个实施例中,观察到与基线白蛋白水平相比小于约10%的白蛋白降低。

[0173] 本公开还提供了用于治疗受试者的疾病或疾患的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的根据本公开的融合蛋白或包含其的药物组合物。

[0174] 在一个实施例中,将融合蛋白与另外的治疗剂同时或依次施用于受试者。在一个实施例中,另外的治疗剂是抗炎剂。在一个实施例中,另外的治疗剂是皮质类固醇。在一个实施例中,另外的治疗剂是利妥昔单抗、达利珠单抗、巴利昔单抗、莫罗单抗-CD3、英夫利昔单抗、阿达木单抗、奥马珠单抗、依法利珠单抗、那他珠单抗、托珠单抗、依库珠单抗、戈利木单抗、卡那单抗、优特克单抗或贝利木单抗。在一个实施例中,另外的治疗剂是白细胞耗竭剂。

[0175] 在一个实施例中,另外的治疗剂是B细胞耗竭剂。在一个实施例中,B细胞耗竭剂是抗体。在一个实施例中,B细胞耗竭抗体是特异性结合至CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD70、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85或CD86的抗体。

[0176] 在一些实施例中,经静脉内施用融合蛋白。在一些实施例中,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每六周一次经静脉内施用融合蛋白。

[0177] 在一些实施例中,经皮下施用融合蛋白。在一些实施例中,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次或每六周一次经皮下施用融合蛋白。

[0178] 实例

[0179] 以下实例是以说明而非限制的方式提供。

[0180] 实例1:pH依赖性抗白蛋白VHH/scFV的生成

[0181] 简而言之,用人免疫两只美洲驼,并使用标准程序生成噬菌体展示文库(VHH/scFv)。在pH 5.5下用噬菌体结合HSA和MSA进行选择,并在pH 7.4下进行洗脱(使用胰蛋白酶作为对照)。通过ELISA和Biacore(人、小鼠和食蟹猴血清白蛋白)使用pH 5.5或7.4进行所选克隆的筛选。通常,pH依赖性克隆是基于其在pH 7.4时结合减少的情况来选择的。选择生成的克隆的特征如表S1所示。

[0182] 表S1.所选VHH克隆的结合和序列特征。

[0183]

克隆	物种反应性	DII 结合剂	Alb23 竞争	K_D pH 5.5 [nM]	Kd pH 5.5 [1/s]	Kd pH 7.4 [1/s]	比率 Kd
2A10	H、C	否	部分地	96.9	3.4E-03	1.1E-02	3.3
2C10	H	否	否	*49.3*	4.5E-03	5.6E-03	1.3
2H11	H	否	否	**6.84**	6.3E-04	5.2E-02	**81.9**
9F02	H、C、M	是	是	**0.575**	7.8E-05	1.3E-04	1.6
2B03	H、C	否	部分地	**16.6**	2.9E-03	2.5E-02	8.7
1E04	H、C	否	否	*55.2*	2.6E-03	5.4E-03	2.1
4G12	H、C	否	否	**12.4**	1.9E-03	3.3E-03	1.8
11C03	H、C、M	是	是	**4.12**	5.1E-04	3.9E-03	7.7
9E10	H、C、M	是	是	**15.4**	2.46E-03	4.12E-03	1.7
12G03	H、C、M	否	否	**8.14**	1.26E-03	5.22E-03	4.1

[0184] 传感图显示所选克隆2H11和11C03作为单价(VHH)和二价(VHH-Fc)分子与Biacore上的HSA(pH 5.5)结合的特性,如图1所示。在pH 5.5下进行每次运行的缔合。一个克隆2H11显示出良好的pH依赖性,与小鼠和食蟹猴血清白蛋白无交叉反应性,不与分离的DII结合,也不与Alb23竞争。

[0185] 为了使VHH仅在内体(酸性pH)中与白蛋白进行结合,并且在循环(pH 7.4)中非常有限(至多没有),需要调整VHH的亲和力。事实上,复合物VHH:白蛋白的百分比主要取决于特定pH下的亲和力。假设循环中和内体中白蛋白浓度在34至54mg/mL之间,则可以计算出,如果VHH对白蛋白的亲和力为约2.4mM(针对40mg/ml的白蛋白浓度计算),80%的VHH将不会结合(游离)。类似地,为了使至少80%的VHH与白蛋白(在内体中)结合,pH 5.5时的亲和力必须为0.12mM(或更低)。理想情况下,小于5%的VHH在pH 7.4下与白蛋白结合(亲和力为11.5mM及以上),而超过95%的VHH在酸性pH下与白蛋白结合(亲和力为30nM及以下)

[0186] 为了降低其在pH 7.4下的亲和力,对2H11的所有三个CDR进行丙氨酸扫描。所得的变体VHH作为双臂Fc-ABDEG-20GS-C末端融合体产生,并通过FcRn ELISA QC;芯片上具有人、食蟹猴和小鼠白蛋白的Biacore(3000)(选择标准:在pH 5.5下的结合保持,在pH 7.4下的结合降低);以及芯片上具有Fc-ABDEG-VHH的Biacore T200(选择标准:在pH 7.4下亲和力最低,在pH 5.5下亲和力最高)进行分析。

[0187] 有趣的是,2H11的CDR3区中的突变通过在pH 7.4下降低结合同时在pH 5.5下保持良好的结合而增加pH依赖性。

[0188] 选择用于丙氨酸扫描的另一个克隆11C03与小鼠和食蟹猴血清白蛋白发生交叉反应,并且还显示出pH依赖性结合。对于该克隆,CDR3中的丙氨酸突变对pH依赖性没有明显影响。因此,CDR1和CDR2中的丙氨酸扫描也改变了与HSA的结合。在与人(HSA)和食蟹猴白蛋白(CSA,表S3)的结合上鉴定出在pH 7.4与pH 5.5下表现出降低的结合和不同结合的一组变

体。

[0189] 表S2中提供了来自所选2H11和11C03 CDR3变体的数据。

[0190] 表S2:在芯片(Biacore 3000)上对在Fc-ABDEG的C末端与白蛋白融合的2H11和11C03CDR3变体的分析。

[0191]

克隆	HSA				
	Kd pH 5.5, 1/s	**R0 pH 5.5, RU**	**Kd pH 7.4, 1/s**	**R0 pH 7.4, RU**	**R0 5.5/7.4**
2H11 亲代	**1,60E-04**	**351**	**7,2E-04**	**115**	**3**
2H11-v15	1,74E-03	235	2,5E-03	0,635	370
2H11-v3	1,35E-04	164	2,9E-03	8,24	19,9
2H11-v12	9,72E-05	93,9	1,2E-03	6,32	14,9
2H11-v9	0,0389*	77,9	1,1E-02*	0,26	300
2H11-v16	3,01E-03	8,91	1,93E-03	0,571	16
2H11-v8	1,39E-03	1,16	NA	0,57	2
11C03 亲代		**177,21**		**42,22**	**4,22**
11C03-v6		39,33		12,08	3,26

[0192] *注意到解离速率的差异。

[0193] 表S3中提供了来自所选2H11和11C03 CDR1-2变体的数据。

[0194] 表S3:在芯片(Biacore 3000)上对在Fc-ABDEG的C末端与白蛋白融合的2H11(CDR3)和11C03(CDR1-2)丙氨酸变体与人和食蟹猴白蛋白的结合的分析。

[0195]

克隆	人血清白蛋白					食蟹猴血清白蛋白		
	Kd pH 5.5	R0 pH 5.5	Kd pH 7.4	R0 pH 7.4	R0 5.5/7.4	R0 pH 5.5	R0 pH 7.4	R0 5.5/7.4
11C03 亲代		229		57	4	220	33	6,7
11C03 CDR2-V10		136		8,6	16	105	5,65	18,6
11C03 CDR1-V3		109		5,1	21	103	5,2	19,8
11C03 CDR2-V3		68,5		2,4	28	54,2	2,6	20,8
11C03 CDR2-V12		38,7		1,5	26	26	1,35	19,3
11C03 CDR2-V4		12,3		0,826	15	0	2,77	x
11C03 CDR2-V7		4,57		1,12	4	0	1,09	x
11C03 CDR1-V2		108		5,82	19	37,8	2,11	17,9
11C03 CDR2-V2		15,1		1,22	12	5,22	1,2	4,35
11C03 CDR2-V5		12,3		1,06	12	0	1.1	x
2H11 亲代	1,60E-04	351	7,2E-04	115	3	对食蟹猴或小鼠白蛋白无交叉反应		
2H11-v15	1,74E-03	235	2,5E-03	0,635	370			
2H11-v3	1,35E-04	164	2,9E-03	8,24	19,9			
2H11-v12	9,72E-05	93,9	1,2E-03	6,32	14,9			
2H11-v9	0,0389*	77,9	1,1E-02*	0,26	300			
2H11-v16	3,01E-03	8,91	1,93E-03	0,571	16			
2H11-v8	1,39E-03	1,16	-4,91E-04	0,57	2			

[0196] *注意到解离速率的差异

[0197] 下表S4-S8中提供了从噬菌体展示文库生成的2H11亲代VHH和选择变体、11C03亲代VHH和选择变体、额外的VHH克隆和scFv克隆以及Alb23 VHH的序列。

[0198]

表 S4：VHH 与白蛋白结合的 CDR 序列。

克隆	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
2H11 亲代	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYHPADFGS	7
2H11-v9	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPW**A**GIYHPADFGS	8
2H11-v8	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEP**A**NGIYHPADFGS	9
2H11-v15	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYHPA**A**FGS	10
2H11-v3	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EG**A**KWEPWNGIYHPADFGS	11
2H11-v12	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGI**A**HPADFGS	12
2H11-v16	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYHPAD**A**GS	13
2H11-v1	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	**A**GPKWEPWNGIYHPADFGS	21
2H11-v2	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	E**A**PKWEPWNGIYHPADFGS	22
2H11-v4	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGP**A**WEPWNGIYHPADFGS	23
2H11-v5	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPK**A**EPWNGIYHPADFGS	24
2H11-v6	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKW**A**PWNGIYHPADFGS	25
2H11-v7	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWE**A**WNGIYHPADFGS	26
2H11-v10	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWN**A**IYHPADFGS	27
2H11-v11	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNG**A**YHPADFGS	28
2H11-v13	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIY**A**PADFGS	29
2H11-v14	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYH**A**ADFGS	30
2H11-v17	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYHPADF**A**S	31
2H11-v18	SNTMG	5	AITWSGGTTYYADSVKG	6	EGPKWEPWNGIYHPADFG**A**	32
11C03 亲代	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-v1	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	**A**HQLPGGRPGRDMDSYSY	36
11C03-v2	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	S**A**QLPGGRPGRDMDSYSY	37
11C03-v3	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHALPGGRPGRDMDSYSY	38
11C03-v4	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQ**A**PGGRPGRDMDSYSY	39
11C03-v5	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQL**A**GGRPGRDMDSYSY	40

[0199]

11C03-v6	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLP**A**GRPGRDMDSYSY	41
11C03-v7	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPG**A**RPGRDMDSYSY	42
11C03-v8	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGG**A**PGRDMDSYSY	43
11C03-v9	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGR**A**GRDMDSYSY	44
11C03-v10	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRP**A**RDMDSYSY	45
11C03-v11	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPG**A**DMDSYSY	46
11C03-v12	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGR**A**MDSYSY	47
11C03-v13	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRD**A**DSYSY	48
11C03-v14	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDM**A**SYSY	49
11C03-v15	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMD**A**YSY	50
11C03-v16	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDS**A**SY	51
11C03-v17	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDSY**A**Y	52
11C03-v18	AYPMG	33	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDSYS**A**	53
11C03-CDR1-V2	**AA**PMG	177	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR1-V3	AY**A**MG	178	GISWFAGATTDYADSVEG	34	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V2	AYPMG	33	G**A**SWFAGATTDYADSVEG	179	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V3	AYPMG	33	GI**A**WFAGATTDYADSVEG	180	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V4	AYPMG	33	GIS**A**FAGATTDYADSVEG	181	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V5	AYPMG	33	GISW**A**AGATTDYADSVEG	182	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V7	AYPMG	33	GISWFA**A**ATTDYADSVEG	183	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V10	AYPMG	33	GISWFAGAT**A**DYADSVEG	184	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
11C03-CDR2-V12	AYPMG	33	GISWFAGATTD**A**ADSVEG	185	SHQLPGGRPGRDMDSYSY	35
2A10	SYAMG	54	TINWSGGSTYYADSVKG	55	DLYGPGFVLSMEYDY	56
2C10	SYAMG	54	VISWSGGSTYYADSVKG	57	EGPKWEPYNGIYSPADFGS	58
9F02	GYAMG	59	AISWFAGDTTDYADSVKG	60	SSARPMSGRSDEYHY	61
2B03	SYVMA	62	SINWSGGSTYYAHSVKG	63	DLYGLGYEVMSYDY	64
1E04	NYNAG	65	AINWSGGTTYYADSVKG	66	DPDWSILNPREYDY	67
4G12	TYGMG	68	AINWKGDRYYADSVKG	69	DSDGSAFSRRLEYDY	70

[0200]

9E10	GYAMG	71	AISWFAGDTTDYANSVKG	72	SSARPLSSRSDEYHY	73
12G03	HSNMA	74	HIHWRGSTTYLDSVKG	75	DSARRILVTVSTSYDY	76
Alb23	SFGMS	173	SISGSGSDTLYADSVKG	174	GGSLSR	175

表 S5：白蛋白结合 VHH 序列。

克隆	VHH	SEQ ID NO.
2H11 亲代	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	14
2H11-v9	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWAGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	15
2H11-v8	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPANGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	16
2H11-v15	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYHPAAFGSWGQGTQVTVSS	17
2H11-v3	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGAKWEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	18
2H11-v12	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIAHPADFGSWGQGTQVTVSS	19
2H11-v16	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYHPADAGSWGQGTQVTVSS	20
2H11-v1	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAGPKWEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	77
2H11-v2	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEAPKWEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	78
2H11-v4	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPAWEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	79
2H11-v5	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKAEPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	80
2H11-v6	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWAPWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	81
2H11-v7	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEAWNGIYHPADFGSWGQGTQVTVSS	82

[0201]

2H11-v10	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWN**A**IYHPADFGSWGQGTQVTVSS	83
2H11-v11	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNG**A**YHPADFGSWGQGTQVTVSS	84
2H11-v13	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIY**A**PADFGSWGQGTQVTVSS	85
2H11-v14	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYH**A**ADFGSWGQGTQVTVSS	86
2H11-v17	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYHPADF**A**SWGQGTQVTVSS	87
2H11-v18	ELQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSNTMGWFRQAPGKEREFVAAITWSGGTTYYADSVK GRFAISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEGPKWEPWNGIYHPADFG**A**WGQGTQVTVSS	88
11C03 亲代	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	89
11C03-v1	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAI**A**HQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	90
11C03-v2	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAIS**A**QLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	91
11C03-v3	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISH**A**LPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	92
11C03-v4	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQ**A**PGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	93
11C03-v5	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQL**A**GGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	94
11C03-v6	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLP**A**GRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	95
11C03-v7	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPG**A**RPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	96
11C03-v8	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGG**A**PGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	97
11C03-v9	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGR**A**GRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	98
11C03-v10	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV	99

[0202]

	EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRP**A**RDMDSYSYWGHGTQVTVSS	
11C03-v11	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGADMDSYSYWGHGTQVTVSS	100
11C03-v12	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRAMDSYSYWGHGTQVTVSS	101
11C03-v13	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDADSYSYWGHGTQVTVSS	102
11C03-v14	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMASYSYWGHGTQVTVSS	103
11C03-v15	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDAYSYWGHGTQVTVSS	104
11C03-v16	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSASYWGHGTQVTVSS	105
11C03-v17	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYAYWGHGTQVTVSS	106
11C03-v18	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSAWGHGTQVTVSS	107
11C03-CDR 1-V2	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAAPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	186
11C03-CDR 1-V3	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYAMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	187
11C03-CDR 2-V2	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGASWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	188
11C03-CDR 2-V3	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGIAWFAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	189
11C03-CDR 2-V4	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISAFAGATTDYADSVE GRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	190
11C03-CDR 2-V5	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWAAGATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	191
11C03-CDR 2-V7	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAAATTDYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	192
11C03-CDR 2-V10	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATADYADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	193

[0203]

11C03-CDR 2-V12	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERTFVAYPMGWFRQAPEKEREFVAGISWFAGATTDAADSV EGRFTISRDNAKNTAYLQMNNLKPEDTAVYYCAISHQLPGGRPGRDMDSYSYWGHGTQVTVSS	194
2A10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVATINWSGGSTYYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLYGPGFVLSMEYDYWGQGTQVTVSS	108
2C10	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAVISWSGGSTYYADSVK GRFTISGDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATEGPKWEPYNGIYSPADFGSWGQGTQVTVSS	109
9F02	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASRRAFIGYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWFAGDTTDYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNGLKPEDTAVYVCAASSARPMSGRSDEYHYWGQGTQVTVSS	110
2B03	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAISSYVMAWFRQAPGKEREFVTSINWSGGSTYYAHSVKG RFTISRDNAKNTVYLQMNTLKPEDTAVYYCAADLYGLGYEVMSYDYWGQGTQVTVSS	111
1E04	QLQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTFSNYNAGWFRQVPGKEPEFVAAINWSGGTTYYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADPDWSILNPREYDYWGQGTRVTVSS	112
4G12	QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRSFSTYGMGWFRQAPGAEREFAAAINWKGDRYYADSVKG RFTISRDNAKNTVFLEMNSLKPEDTGVYYCAADSDGSAFSRRLEYDYWGQGTQVTVSS	113
9E10	QLQVVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRAFIGYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWFAGDTTDYANSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYVCAASSARPLSSRSDEYHYWGQGTQVTVSS	114
12G03	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERAFSHSNMAWFRQAPGKEREFVAHIHWRGSTTYLDSVKG RFTISRDNAKNTVYLQMNGLRLEDTAVYYCAADSARRILVTVSTSYDYWGQGTQVTVSS	115
A1b23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	176

表 S6：VH 与白蛋白结合的 CDR 序列。

克隆	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
267	SYWMY	116	VINTSGGSTYYADSVKG	117	GGLVVAGGLGS	118
405	MYWMY	119	AIDTRGGSTYYADSVKG	120	GGLVRVGGLGS	121
408	YYWMY	122	AIDTRGGSTYYADSVKG	120	GGLVRVGGLGS	121
415	HYYMN	123	GINTGGGTTYYADSVKG	124	GGIVAVGGFGS	125
438	RYWIH	126	GISIGDGTTYYADSVRG	127	GGIVYFGAYDS	128
442	DFVMH	129	AIRWDDGSTYYAESMKG	130	SVSASSNY	131
462	RYWMH	132	GINTGTGSTAYADSVKG	133	GGLVVGGGYSD	134
476	RYWIH	135	GISIGDGTTYYADSVRG	136	GGIVYFGAYDS	137

[0204]

表 S7：VL 与白蛋白结合的 CDR 序列。

克隆	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
267	TGSSSNIGDNYVN	138	DNTKRAS	139	SSWDDSLSGLV	140
405	GGDNIGSKNAH	141	KDSNRPS	142	QVWDSSANAAV	143
408	AGTSSDVGYGNYVS	144	DVSKRAS	145	ASYRSGTTV	146
415	GGDNIGSKNAH	141	KDSNRPS	142	QVWDSSANAAV	143
438	KSSQSVVSGSNQKSLLN	147	LASTRES	148	QQGYGTPFS	149
442	QASQNIISYLA	150	GASRLQT	151	LQHLTYPLT	152
462	KSSRSVLYSSNQKNYLA	153	LASTRES	148	QQGYDVPVT	154
476	QASQSISSYLA	155	GASRLQT	151	LQQKLPVT	156

表 S8：白蛋白结合 VH/VL 序列。

克隆	VH/VL	SEQ ID NO.
267 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQAPGKGLEWVSVINTSGGSTYYADSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKSEDTAVYYCAKGGLVVAGGLGSWGQGTQVTVSS	157
267 VL	QPVLNQPPSVSGSPGQKFTISCTGSSSNIGDNYVNWYQHLPGTAPKLLIYDNTKRASGVPDRFSGS KSGTSASLTITELQAEDEADYYCSSWDDSLSGLVFGGGTRLTVL	158
405 VH	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYWMYWVRQAPGKGLEWVSAIDTRGGSTYYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCATGGLVRVGGLGSWGQGTQVTVSS	159
405 VL	SYELTQSPSVSVALRQTAKITCGGDNIGSKNAHWYQQKPGQAPVLVIYKDSNRPSGIPERFSGSNS GNTATLTVSGAQAEDEADYYCQVWDSSANAAVFGGGTHLTVL	160
408 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWMYWVRQAPGKGLEWVSAIDTRGGSTYYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCARGGLVRVGGLGSWGQGTQVTVSS	161
408 VL	QAVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGMAPKLLIYDVSKRASGITDRFS ASKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRSGTTVFGGGTHLTVL	162
415 VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSHYYMNWVRQAPGKGLEWVSGINTGGGTTYYADS VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAKGGIVAVGGFGSWGQGTQVTVSS	163
415 VL	SYELTQSPSVSVALRQTAKITCGGDNIGSKNAHWYQQKPGQAPVLVIYKDSNRPSGIPERFSGSNS GNTATLTVSGAQAEDEADYYCQVWDSSANAAVFGGGTHLTVL	164
438 VH	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGRYWIHWVRQAPGKGLEWVSGISIGDGTTYYADSV RGRFTISRDKAKNTLALTMNSLKSEDTAVYYCAKGGIVYFGAYDSWGQGTQVTVSS	165

[0205]

438 VL	DIVMTQSPRSVTASVGEKVTINCKSSQSVVSGSNQKSLLNWYQQRPGQSPRLLIYLASTRESGVPD RFSGSGSGTTDFTLTISSFQPEDVAVYYCQQGYGTPFSFGSGTRLEIK	166
442 VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSDDFVMHWVRQAPGKGLEWVSAIRWDDGSTYYAES MKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKSVSASSNYWGQGTQVTVSS	167
442 VL	DIVMTQSPSSLSVSLGDRVTITCQASQNIISYLAWYQQKPGQTPKLLIYGASRLQTGVPSRFSGSGS GTSFTLTISGVEAEDVATYYCLQHLTYPLTFGQGTKVELK	168
462 VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSRYWMHWVRQAPGKGLEWVSGINTGTGSTAYADS VKGRFTISRDNGKNTLYLQMNSLKSDDTAVYYCAKGGLVVGGGYSDWGQGTQVTVSS	169
462 VL	DIVMTQSPSSVTASAGEKVTINCKSSRSVLYSSNQKNYLAWYQQRPGQSPRLLIYLASTRESGVPD RFSGSGSGTTDFTLTISSFQPEDVAVYYCQQGYDVPVTFGQGTKVELK	170
476 VH	QVQVQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGRYWIHWVRQAPGKGLEWVSGISIGIGDGTTYYADSV RGRFTISRDKAKNTLALTMNSLKSEDTAVYYCAKGGIVYFGAYDSWGQGTQVTVSS	171
476 VL	DIVMTQSPSSLSASLGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLQTGVPSRFSGGGS GTSFTLTISGVEAEDVATYYCLQQKLPVTFGQGTKVELK	172

[0206] 实例2:pH依赖性抗白蛋白VHH延长Albumus小鼠™中Fab片段的半衰期,而不依赖于IgG-FcRn介导的再循环的评估。

[0207] 使用Mota-Fab-VHH融合体评估了具有不同程度的pH依赖性(在pH 5.5时结合较强,在pH 7.4时结合较弱)的抗白蛋白VHH延长半衰期的亲和力要求。可模拟人体内的生理抗体清除率的Albumus小鼠™(HSA/hFcRn)经腹膜内注射(IP单剂量)七种不同的测试项目,以评估其在该小鼠模型中的清除率。所施用的测试项目详细描述如下:

[0208] 1.莫维珠单抗-Fab片段用作对照处理条件。该特定分子与感兴趣的测试项目具有相同的基本结构;然而,其大小较小(约50kDa)。

[0209] 2.使用20GS接头将不相关的VHH 3Rab在C末端融合至轻链的莫维珠单抗-Fab用作第二对照处理条件。该特定分子与感兴趣的测试项目具有相似的大小(约65

[0210] kDa);然而,它对白蛋白没有任何亲和力。

[0211] 3.使用20GS接头将具有Alb23的莫维珠单抗-Fab片段在C末端融合至轻链。Alb23是一种抗白蛋白VHH。包括该处理条件是因为该分子似乎对白蛋白具有高亲和力,但这种亲和力不依赖于pH。

[0212] 4.使用20GS接头将莫维珠单抗-Fab片段与2H11在C末端融合至轻链。先前的体外研究表明,该变体在pH 5.5下似乎对白蛋白具有高亲和力,然而这种亲和力在pH 7.4下略有降低,进一步表明pH依赖性亲和力。

[0213] 5.使用20GS接头将莫维珠单抗-Fab片段与2H11突变体v3、v8、v9或v15在c末端融合至轻链。经过丙氨酸扫描和体外表征后,这些2H11突变体在CDR3中携带丙氨酸突变(分别为位置3、8、9和15),并且与亲代分子2H11相比,在pH 5.5和pH 7.4两者下似乎具有降低的亲和力,但具有更强的pH依赖性亲和力。

[0214] 根据在先前研究中使用的30mg/kg Fc-ABDEG-Alb23等摩尔剂量作为参考,测试项目的剂量为19mg/kg(wt Fab)和25mg/kg(C末端融合Fab片段)。

[0215] 出于实际原因,实验分为连续进行的两部分:

[0216] • 实验1:处理组1、2、3、4

[0217] • 实验2:处理组4、5、6、7、8

[0218] 总共,四十五(45)只雄性和雌性Albumus小鼠™用于两项实验(两项研究中均包括处理组4)。大约14至15周龄的Albumus小鼠™对于人FcRn转基因和人白蛋白转基因是纯合的。对小鼠进行尾部标记以供识别,并单独饲养在通风良好的聚砜笼中,笼中空气经HEPA过滤,最大密度为每笼至多4只小鼠。动物室的正常温度和相对湿度范围分别为22℃±4℃和50%±15%。随意提供酸化至pH为2.5至3.0的经过滤的自来水和标准实验室食物。

[0219] 1.将Albumus小鼠™随机分为8组,每组5只小鼠。

[0220] 2.在第-3天(-3d),给小鼠预载IVIg。

[0221] 3.在第0天,0小时,按如下方式向小鼠IP施用供试品:

[0222] • 以19mg/kg的Mota-Fab,n=5,第1组

[0223] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-3Rab(Mota-Fab-3Rab),n=5,第2组

[0224] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-Alb23(Mota-Fab-Alb23),n=5,第3组

[0225] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-2H11(Mota-Fab-2H11),n=5,第4组

[0226] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-2H11v3(Mota-Fab-2H11v3),n=5,第5组

[0227] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-2H11v8(Mota-Fab-2H11v8),n=5,第6组

[0228] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-2H11v9(Mota-Fab-2H11v9),n=5,第7组

[0229] • 以25mg/kg的Mota-Fab-LC-2H11v15(Mota-Fab-2H11v15),n=5,第8组

[0230] 4.根据下表S9所示的出血时间表,在2h、1d、2d、3d、4d、7d、8d经由尾静脉从每只小鼠收集20μL血液样品。

[0231] 5.在接下来的基于ELISA的测定中评定血清样品(按优先顺序):

[0232] a.测试项目PK ELISA

[0233] b.人血清白蛋白ELISA

[0234] 该方案也总结在图2和表S9中。使用PK和HSA测定对收集的小鼠血清进行读数。

[0235] 表S9.体内方案

[0236]

组	n	剂量	浓度测试项目	频率	途径	体积测试项目注射	采血点
Mota-Fab	5	19 mg/kg	6.9 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-3Rab（不相关的 VHH）	5	25 mg/kg	7.81 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-Alb23（高亲和力，无 pH 依赖性）	5	25 mg/kg	9.9 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-2H11(高亲和力，pH 依赖性）	5	25 mg/kg	9.53 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-2H11v3	5	25	8.97	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、

[0237]

（低亲和力，pH 依赖性）		mg/kg	mg/ml				D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-2H11v3（低亲和力，pH 依赖性）	5	25 mg/kg	9.27 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-2H11v9（低亲和力，pH 依赖性）	5	25 mg/kg	9.15 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8
Mota-Fab-LC-2H11v15（低亲和力，pH 依赖性）	5	25 mg/kg	9.48 mg/ml	SD	IP	250 μl	D0+2h、D1、D2、D3、D4、D7、D8

[0238] 将Mota-Fab-VHH的血清浓度以研究过程中每组随时间的平均值作图,并显示在图3中。数据点显示每组5只动物的平均值±SD。

[0239] 不结合白蛋白的Mota-Fab-VHH,例如Mota-Fab(约50kDa)和Mota-Fab-3Rab(约65kDa),显示出相对较短的半衰期,1天后无法检测到血清浓度。该数据表明分子量并不是血清持久性的主要驱动因素。含有反向pH依赖性抗白蛋白VHH的Mota-Fab-2H11显示出与Mota-Fab-Alb23相当的半衰期。Mota-Fab与2H11丙氨酸变体偶联,在pH 7.4下与白蛋白的亲和力降低(参见表S10,使用Biacore 8K+,在单循环动力学(SCK)方案中。人血清白蛋白固定在CM5芯片上,并且Fab-VHH变体在1XHBS-EP+pH 7.4或柠檬酸盐缓冲液pH 5.5中以30μl/min.的速度在2分钟内以八步1.5倍稀释系列注入溶液中)显示出与其白蛋白结合亲和力相

对应的血清半衰期。与对HSA具有更高亲和力的Mota融合体相比,Mota-Fab-2H11-v9和Mota-Fab-2H11-v15显示出较短的半衰期,但是它们仍然显示出延长的PK曲线。相比之下,Mota-Fab-2H11-v8在SPR中在pH 5.5和pH 7.4两者下均未显示出与白蛋白的可检测结合(数据未显示),并且显示出与Mota-Fab和Mota-Fab-3Rab相似的半衰期。

[0240] 表S10.结合动力学特性和理论上的抗白蛋白:白蛋白复合物形成

[0241]

	KD (nM)			第 1 天复合 Mota-FabVHH 的浓度 (100 μg/ml)		VHH 结合/未结合(%)			
克隆	pH 5.5	pH 7.4	比率	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5		pH 7.4	
Mota-Fab-Alb23	12.3	65	5.28	1538	1538	100.0	0.0	100.0	0.0
Mota-Fab-2H11wt	2.85	264	92.63	1538	1537	100.0	0.0	100.0	0.0
Mota-Fab-2H11v3	94.9	2580	27.19	1538	1531	100.0	0.0	100.0	0.0
Mota-Fab-2H11v9	21200	$2.67x10^6$	126	1486	283	96.6	3.4	18.4	81.6

[0242]

Mota-Fab-2H11v15	130000	$5.10x10^7$	392	1264	18	82.2	17.8	1.2	98.8

[0243] 这表明Mota-Fab-2H11v9和-2H11v15对血清中的HSA具有非常低的结合,并且因此仅通过与内体中的白蛋白结合而再循环。如图4所示,抗HSA-VHH在血清中与HSA的结合减少,但在内体中结合增加,趋向于导致HSA和抗HSA-VHH的再循环,而不影响抗HSA-VHH的大小。我们已经展示了以pH依赖性方式结合HSA的克隆,其具有理想的半衰期,并且预期在施用后在组织和肿瘤中具有更好的生物分布。

[0244] ***

[0245] 本发明的范围不受本文所描述的特定实施例限制。实际上,根据前述描述和附图,除所描述的修改之外,本发明的各种修改对本领域技术人员而言将会变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求书的范围内。

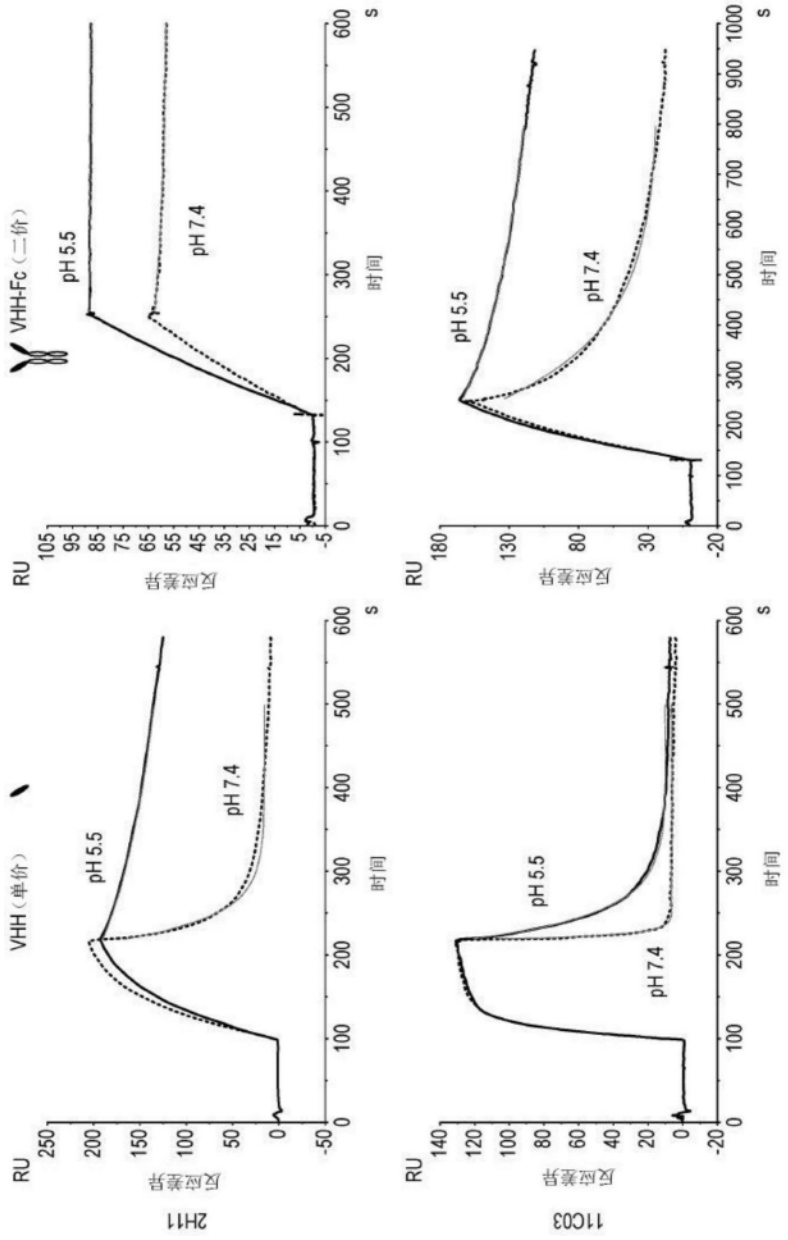

VHH-Fc（二价）
pH 5.5
pH 7.4
RU
反应差异
时间
s
VHH（单价）
2H11
11C03

图1

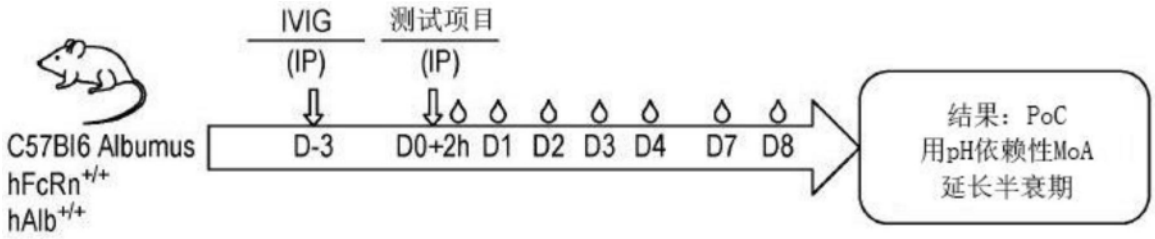

IVIG
(IP)
测试项目
(IP)
C57Bl6 Albumus
hFcRn+/+
hAlb+/+
D-3
D0+2h D1 D2 D3 D4 D7 D8
结果：PoC
用pH依赖性MoA
延长半衰期

图2

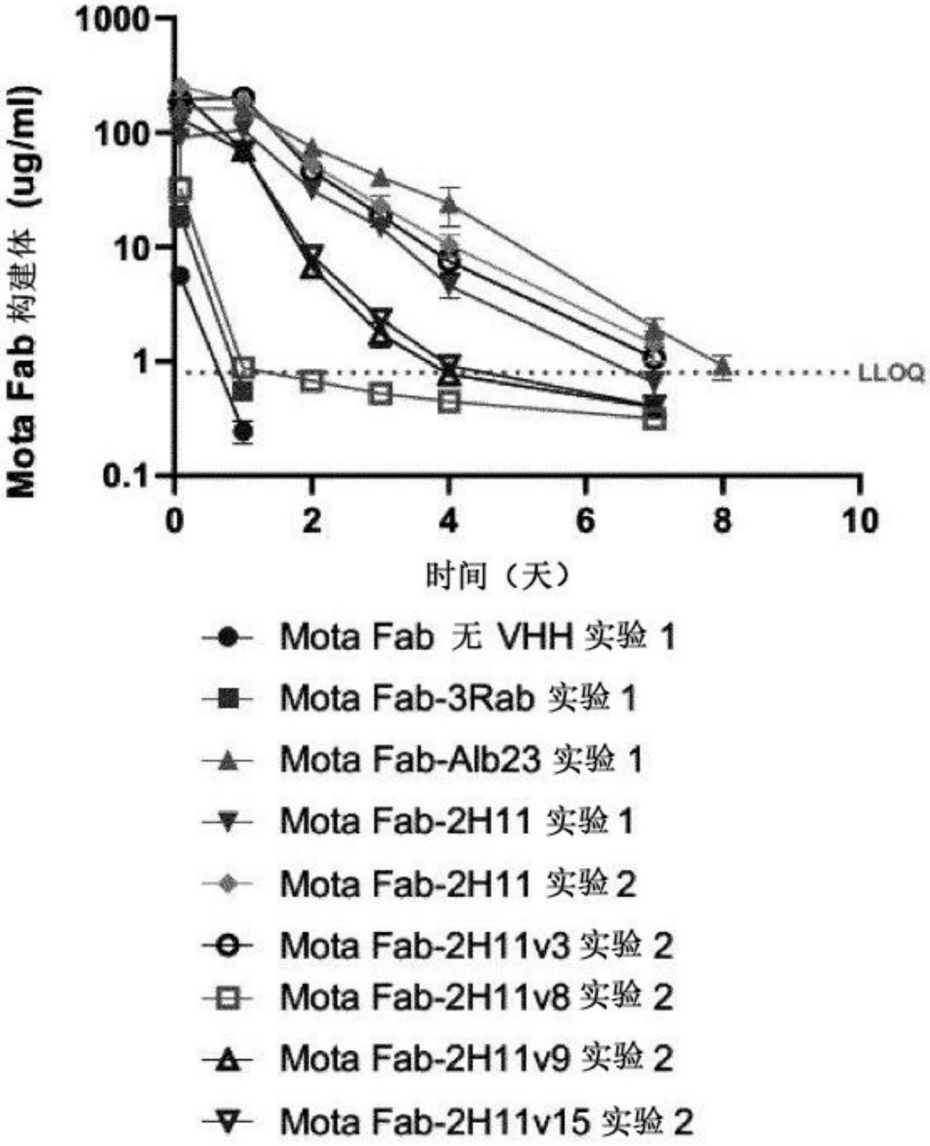

1000
100
10
1
0.1
Mota Fab 构建体 (ug/ml)
LLOQ
0
2
4
6
8
10
时间（天）
Mota Fab 无 VHH 实验 1
Mota Fab-3Rab 实验 1
Mota Fab-Alb23 实验 1
Mota Fab-2H11 实验 1
Mota Fab-2H11 实验 2
Mota Fab-2H11v3 实验 2
Mota Fab-2H11v8 实验 2
Mota Fab-2H11v9 实验 2
Mota Fab-2H11v15 实验 2

图3

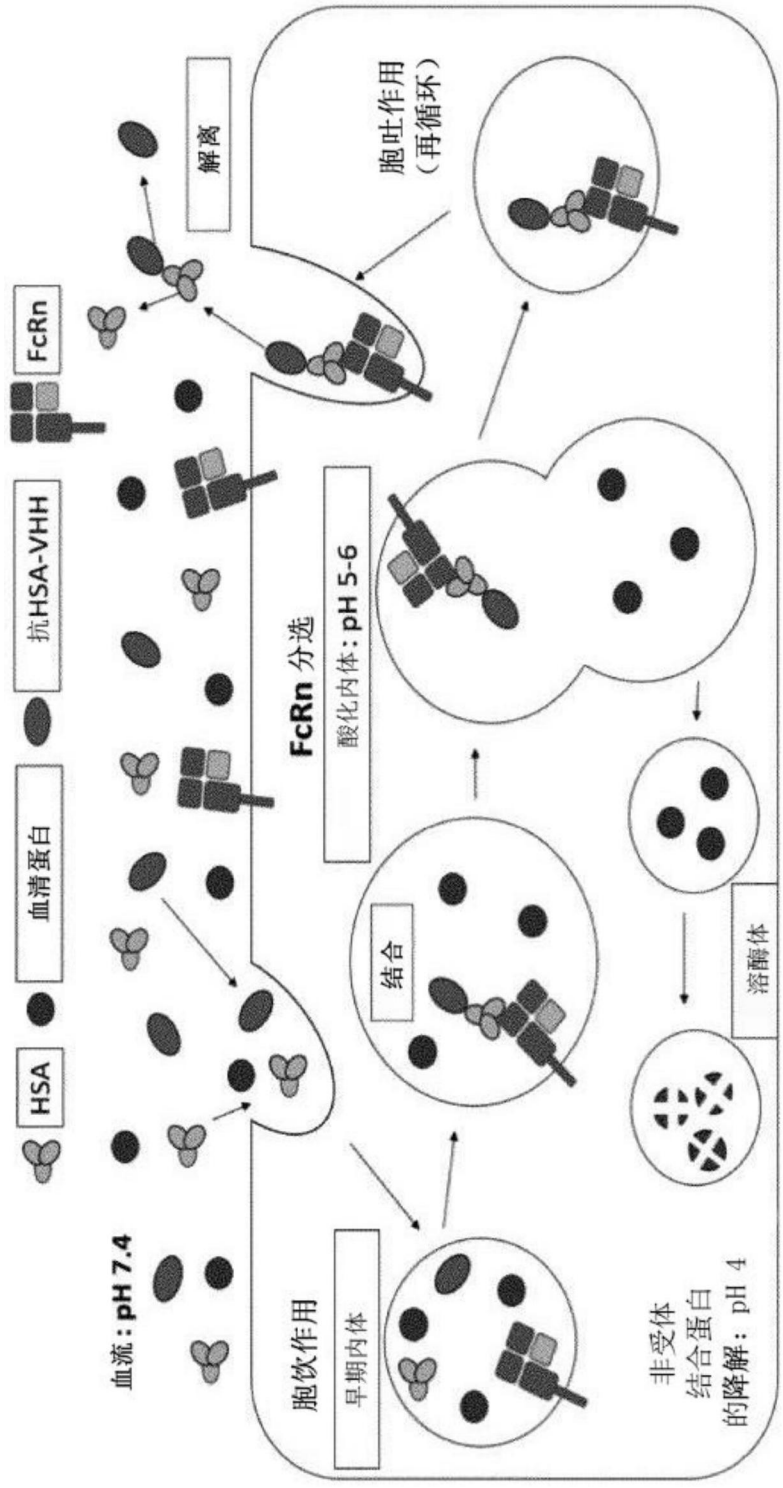

HSA
血清蛋白
抗HSA-VHH
FcRn
解离
胞吐作用
（再循环）
血流：pH 7.4
FcRn 分选
酸化内体：pH 5-6
结合
胞饮作用
早期内体
非受体
结合蛋白
的降解：pH 4
溶酶体

图4