



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119060177 A

(43) 申请公布日 2024.12.03

(21) 申请号 202410731815.0

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.05.19

C07K 16/18 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006.01)

62/339,682 2016.05.20 US

C07K 16/46 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 39/395 (2006.01)

201780045208.7 2017.05.19

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 哈普恩治疗公司

A61P 29/00 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 37/02 (2006.01)

(72) 发明人 罗伯特·B·杜布里奇

A61P 31/00 (2006.01)

布莱恩·D·莱蒙

A61P 31/12 (2006.01)

理查德·J·奥斯汀

A61P 37/08 (2006.01)

卢克·伊弗宁 吉恩玛丽·盖诺

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

权利要求书3页 说明书31页

有限公司 11262

序列表（电子公布） 附图4页

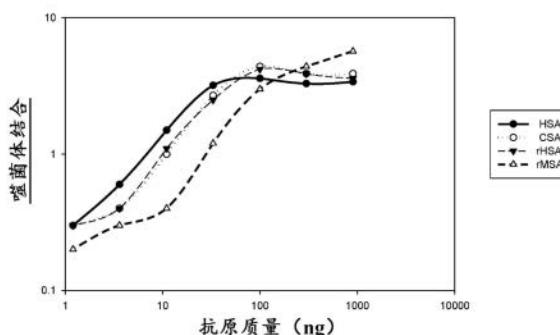
专利代理人 王玮玮 郑霞

(54) 发明名称

单结构域血清白蛋白结合蛋白质

(57) 摘要

本文公开了具有改善的热稳定性、结合亲和力和稳健的聚集特性的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。本文还描述了包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。提供了包含本文公开的结合蛋白质的药物组合物和使用这样的制剂的方法。

HSA噬菌体的交叉反应性

1. 单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其包含SEQ ID NO.9的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与小鼠血清白蛋白的结合亲和力(Kd)比所述蛋白质与人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(Kd)弱约1.5倍至约20倍。
3. 根据权利要求2所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人血清白蛋白结合,以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴血清白蛋白结合,其中hKd与cKd(hKd:cKd)之间的比例范围为约20:1至约1:2。
4. 根据权利要求1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质的消除半衰期为至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时。
5. 单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其包含SEQ ID NO.10的氨基酸序列。
6. 根据权利要求5所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与小鼠血清白蛋白的结合亲和力(Kd)比所述蛋白质对人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(Kd)弱约1.5倍至约20倍。
7. 根据权利要求6所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以人Kd(hKd)与人血清白蛋白结合,一与食蟹猴Kd(cKd)食蟹猴血清白蛋白结合,与食蟹猴血清白蛋白结合,其中hKd与cKd(hKd:cKd)之间的比例范围为约20:1至约1:2。
8. 根据权利要求5所述的血清白蛋白结合蛋白结构域,其中所述蛋白质的消除半衰期为至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时。
9. 编码根据权利要求1-8中任一项的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸。
10. 编码根据权利要求1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸。
11. 包含根据权利要求9所述的多核苷酸的载体。
12. 包含根据权利要求10所述的多核苷酸的载体。
13. 包含根据权利要求9所述的多核苷酸的宿主细胞。
14. 包含根据权利要求10所述的多核苷酸的宿主细胞。
15. 包含根据权利要求11所述的载体的宿主细胞。
16. 包含根据权利要求12所述的载体的宿主细胞。
17. 根据权利要求1-8中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质在制备用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的药物中的用途。
18. 根据权利要求1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质在制备用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的药物中的用途。
19. 包含根据权利要求1-8中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。
20. 包含根据权利要求1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。
21. 单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中

(a) CDR1的氨基酸序列如GFX₁X₂X₃X₄FGMS (SEQ ID NO.1) 所示,X₁为苏氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸,X₂为苯丙氨酸或酪氨酸,X₃为丝氨酸、精氨酸或赖氨酸,X₄为丝氨酸、赖氨酸、精氨酸或丙氨酸;

(b) CDR2的氨基酸序列如SISGSGX₅X₆TLYAX₇SX₈K (SEQ ID NO.2) 所示,X₅为丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或丙氨酸,X₆为天冬氨酸、组氨酸、缬氨酸或苏氨酸,X₇为天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或丝氨酸,X₈为缬氨酸或亮氨酸;和

(c) CDR3的氨基酸序列如GGSLX₉X₁₀ (SEQ ID NO.3) 所示,X₉为丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或赖氨酸,X₁₀为精氨酸、赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺,其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉和X₁₀不同时分别是苏氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸和精氨酸。

22. 包含CDR1、CDR2和CDR3的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其包含SEQ ID NO.10所示的序列,其中选自CDR1的氨基酸位置28、29、30或31,CDR2的位置56、57、62或64,以及CDR3的位置103和104的一个或多个氨基酸残基被置换,其中

氨基酸位置28被精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸置换,

氨基酸位置29被酪氨酸置换,

氨基酸位置30被精氨酸或赖氨酸置换,

氨基酸位置31被赖氨酸、精氨酸或丙氨酸置换,

氨基酸位置56被精氨酸、苏氨酸或丙氨酸置换,

氨基酸位置57被组氨酸、缬氨酸或苏氨酸置换,

氨基酸位置62被组氨酸、精氨酸、谷氨酸或丝氨酸置换,

氨基酸位置64被亮氨酸置换,

氨基酸位置103被精氨酸、苏氨酸或赖氨酸置换,

氨基酸位置104被赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺置换。

23. 包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的组合物,其包括互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中

a. CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.15所示;

b. CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.22所示;并且

c. CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.24中所示。

24. 包含血清白蛋白结合域、靶抗原结合域和与T细胞受体复合物(TCR)内的蛋白质结合的结构域的多特异性蛋白质,其中所述血清白蛋白结合域包括互补性决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中

(a) CDR1的氨基酸序列如GFX₁X₂X₃X₄FGMS (SEQ ID NO.1) 所示,X₁为苏氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸,X₂为苯丙氨酸或酪氨酸,X₃为丝氨酸、精氨酸或赖氨酸,X₄为丝氨酸、赖氨酸、精氨酸或丙氨酸;

(b) CDR2的氨基酸序列如SISGSGX₅X₆TLYAX₇SX₈K (SEQ ID NO.2) 所示,X₅为丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或丙氨酸,X₆为天冬氨酸、组氨酸、缬氨酸或苏氨酸,X₇为天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或丝氨酸,X₈为缬氨酸或亮氨酸;和

(c) CDR3的氨基酸序列如GGSLX₉X₁₀ (SEQ ID NO.3) 所示,X₉为丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或赖氨酸,X₁₀为精氨酸、赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺,其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉和X₁₀不同时分别是苏氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸和精氨酸。

和X₁₀不同时分别是苏氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸和精氨酸。

25. 包含血清白蛋白结合域、靶抗原结合域和与T细胞受体复合物 (TCR) 内的蛋白质结合的结构域的多特异性蛋白质, 其中所述血清白蛋白结合域包括如SEQ ID NO.10所示的序列内的互补性决定区CDR1、CDR2和CDR3, 其中选自CDR1的氨基酸位置28、29、30或31; CDR2位置56、57、62或64位, CDR3的位置103和104的一个或多个氨基酸残基被置换, 其中

氨基酸位置28被精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸置换,

氨基酸位置29被酪氨酸置换,

氨基酸位置30被精氨酸或赖氨酸置换,

氨基酸位置31被赖氨酸、精氨酸或丙氨酸置换,

氨基酸位置56被精氨酸、苏氨酸或丙氨酸置换,

氨基酸位置57被组氨酸、缬氨酸或苏氨酸置换,

氨基酸位置62被组氨酸、精氨酸、谷氨酸或丝氨酸置换,

氨基酸位置64被亮氨酸置换,

氨基酸位置103被精氨酸、苏氨酸或赖氨酸置换,

氨基酸位置104被赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺置换。

26. 包含血清白蛋白结合域、靶抗原结合域和与T细胞受体复合物 (TCR) 内的蛋白质结合的结构域的多特异性蛋白质, 其中所述血清白蛋白包含CDR1、CDR2或CDR3中的至少一个突变, 其中CDR1具有如SEQ ID NO.11所示的序列, CDR2具有如SEQ ID NO.12所示的序列, CDR3具有如SEQ ID NO.13所示的序列, 其中至少一个突变不在SEQ ID NO.11的氨基酸位置1、2、7、8、9或10, SEQ ID NO.12的位置1、3、6、10或11位, 或SEQ ID NO.13的位置1或2上。

单结构域血清白蛋白结合蛋白质

[0001] 申请是申请日为2017年5月19日、申请号为201780045208.7、发明名称为“单结构域血清白蛋白结合蛋白质”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2017年5月19日、申请号为(PCT/US2017/033665)的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2016年5月20日提交的美国临时申请号62/339,682的权益,该临时申请通过引用以其全文并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式以电子方式提交,并且通过引用以其全文并入本文。所述ASCII副本于2017年5月18日创建,命名为47517-703_601_SEQ.txt,并且大小为22,218字节。

[0006] 援引并入

[0007] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入,并且如同以其全文进行说明。

背景技术

[0008] 白蛋白是最丰富的血浆蛋白质,其高度可溶,非常稳定,并且具有极长的循环半衰期。白蛋白可以以多种方式使用以延长治疗分子的循环半衰期。本公开内容提供了单结构域白蛋白结合蛋白质,其可用于延长治疗分子的半衰期。

发明内容

[0009] 在一个实施方案中,本文提供了单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中(a)CDR1的氨基酸序列如GFX₁X₂X₃X₄FGMS(SEQ ID NO.1)所示,X₁是苏氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸,X₂是苯丙氨酸或酪氨酸,X₃是丝氨酸、精氨酸或赖氨酸,X₄是丝氨酸、赖氨酸、精氨酸或丙氨酸;(b)CDR2的氨基酸序列如SISGSGX₅X₆TLYAX₇SX₈K(SEQ ID NO.2)所示,X₅是丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或丙氨酸,X₆是天冬氨酸、组氨酸、缬氨酸或苏氨酸,X₇是天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或丝氨酸,X₈是缬氨酸或亮氨酸;并且(c)CDR3的氨基酸序列如GGSLX₉X₁₀(SEQ ID NO.3)所示,X₉是丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或赖氨酸,并且X₁₀是精氨酸、赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺,其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉和X₁₀不同时分别是苏氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸和精氨酸。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含下式:f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4,其中r1是SEQ ID NO.1;r2是SEQ ID NO.2,并且r3是SEQ ID NO.3;并且其中f₁、f₂、f₃和f₄是选定的框架残基,使得所述蛋白质与SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列至少80%相同。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.16。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r2包含SEQ

ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21或SEQ ID NO.22。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r3包含SEQ ID NO.23或SEQ ID NO.24。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.14。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.15,r2包含SEQ ID NO.17,并且r3包含SEQ ID NO.23。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.16,并且r3包含SEQ ID NO.23。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.15,并且r2包含SEQ ID NO.18。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.14,并且r3包含SEQ ID NO.23。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.15,r2包含SEQ ID NO.19,并且r3包含SEQ ID NO.24。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.14,并且r2包含SEQ ID NO.20。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中r1包含SEQ ID NO.15,并且r2包含SEQ ID NO.21。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有选自SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26和SEQ ID NO.27的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质与选自人血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白和小鼠血清白蛋白的血清白蛋白结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质以相当的结合亲和力(K_d)与人血清白蛋白和食蟹猴血清白蛋白结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质与小鼠血清白蛋白结合的结合亲和力(K_d)比所述蛋白质对人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(K_d)弱约1.5倍至约20倍。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质以约1nM至约100nM的人 K_d (h K_d)与人血清白蛋白结合,并且以1nM至100nM的食蟹猴 K_d (c K_d)与食蟹猴血清白蛋白结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的h K_d 和c K_d 为1nM至约5nM或约5nM至约10nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的h K_d 和c K_d 为约1nM至约2nM、约2nM至约3nM、约3nM至约4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、

约7nM至约8nM、约8nM至约9nM或约9nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd与cKd之比(hKd:cKd)在约20:1至约1:2的范围内。

[0011] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约5nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.22所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.23所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含如SEQ ID NO.24所示的氨基酸序列，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0012] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时的消除半衰期。

[0013] 在另一个实施方案中，提供了包含CDR1、CDR2和CDR3的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其包含如SEQ ID NO.10所示的序列，其中选自CDR1的氨基酸位置28、29、30或31，CDR2的位置56、57、62或64，以及CDR3的位置103和104的一个或多个氨基酸残基被置换，其中氨基酸位置28被精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸置换，氨基酸位置29被酪氨酸置换，氨基酸位置30被精氨酸或赖氨酸置换，氨基酸位置31被赖氨酸、精氨酸或丙氨酸置换，氨基酸位置56被精氨酸、苏氨酸或丙氨酸置换，氨基酸位置57被组氨酸、缬氨酸或苏氨酸置换，氨基酸位置62被组氨酸、精氨酸、谷氨酸或丝氨酸置换，氨基酸位置64被亮氨酸置换，氨基酸位置103被精氨酸、苏氨酸或赖氨酸置换，氨基酸位置104被赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在除位置28、29、30、31、56、57、62、64、103和104之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置29处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置31处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置56处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置62处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置64处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在位置104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31和62处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中位置31被精氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中位置31被精氨酸置换，并且氨基酸位置62被谷氨酸

置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31、56、64和104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被丙氨酸置换，氨基酸位置64被亮氨酸置换，并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置29和104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置29被酪氨酸置换，并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31和56处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，并且氨基酸位置56被苏氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31、56和62处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被苏氨酸置换，并且氨基酸位置62被谷氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31和104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被精氨酸置换，并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31、56和104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被精氨酸置换，并且氨基酸位置104被缬氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在氨基酸位置31、56、62和104处包含置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被精氨酸置换，氨基酸位置62被谷氨酸置换，并且氨基酸位置104被缬氨酸置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被精氨酸置换，并且所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被精氨酸置换，氨基酸位置62被谷氨酸置换，并且所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被丙氨酸置换，氨基酸位置64被亮氨酸置换，氨基酸位置104被赖氨酸置换，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置29被酪氨酸置换，氨基酸位置104被赖氨酸置换，并且其中hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被苏氨酸置换，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被苏氨酸置换，并且氨基酸位置62被谷氨酸置换，并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被精氨酸置换，氨基酸位置104被赖氨酸置换，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约5nM至约10nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合

蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被精氨酸置换，氨基酸位置104被缬氨酸置换，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中氨基酸位置31被赖氨酸置换，氨基酸位置56被精氨酸置换，氨基酸位置62被谷氨酸置换，并且氨基酸位置104被缬氨酸置换，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。

[0014] 在另一个实施方案中，本文提供了单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其在CDR1、CDR2或CDR3处包含至少一个突变，其中CDR1包含如SEQ ID NO:11所示的序列，CDR2包含如SEQ ID NO:12所示的序列，CDR3包含如SEQ ID NO:13所示的序列，并且其中所述至少一个突变不在SEQ ID NO:11的氨基酸位置1、2、7、8、9或10，SEQ ID NO:12的位置1、3、6、10或11，或者SEQ ID NO:13的位置1或2处。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在选自CDR1 (SEQ ID NO:11) 的位置3、4、5和6，CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7、8、13和15，以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置5和6的氨基酸位置处包含至少一个突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在除CDR1 (SEQ ID NO:11) 的3、4、5和6，CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7、8、13和15，以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置5和6之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6和CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置13处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和15以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置4和CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6和CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置13处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和15以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6和CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置13处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质在CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和13以及CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6处包含突变。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为精氨酸，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为精氨酸，并且CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置13被突变为谷氨酸，并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列，其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸，CDR2 (SEQ ID NO:12)

的氨基酸位置7和15分别被突变为丙氨酸和亮氨酸,CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置4被突变为酪氨酸,并且CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7被突变为苏氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和13分别被突变为苏氨酸和谷氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为精氨酸,CDR3 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约5nM至约10nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7被突变为精氨酸,CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为缬氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含这样的氨基酸序列,其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和13分别被突变为精氨酸和谷氨酸,并且CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为缬氨酸,并且其中所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的hKd和cKd为约1nM至约5nM。

[0015] 在另一个实施方案中,本文提供了编码根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸。进一步的实施方案描述了包含如本文所公开的多核苷酸的载体。另一个实施方案描述了用根据本公开内容的载体转化的宿主细胞。在一个实施方案中提供了药物组合物,其包含 (i) 根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质、根据本公开内容的多核苷酸、根据本公开内容的载体或根据本公开内容的宿主细胞,和 (ii) 药学上可接受的载体。

[0016] 在另一个实施方案中,本文描述了用于产生根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的方法,所述方法包括在允许所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码如本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白的核酸序列的载体转化或转染的宿主,以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0017] 进一步描述了用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述方法进一步包括与根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质联合施用药剂。

[0018] 在另一个实施方案中,描述了包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。在另一个实施方案中,描述了包含根据本公开内容的单结构

域血清白蛋白结合蛋白质的抗体。

[0019] 进一步的实施方案描述了包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性抗体、双特异性抗体、sdAb、重链可变域、肽或配体。在一个实施方案中，提供了包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的抗体，其中所述抗体是单结构域抗体。在一些实施方案中，所述单结构域抗体衍生自IgG的重链可变区。

[0020] 一个实施方案描述了多特异性结合蛋白质或抗体，其包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质以及CD3结合域。在一个实施方案中，描述了用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法，其包括向有需要的受试者施用根据本公开内容的多特异性抗体。

附图说明

[0021] 本发明的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下对利用了本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述及其附图，将会获得对本发明特征和优点的更好的理解，在这些附图中：

[0022] 图1图示了通过ELISA滴定测定的亲本抗HSA噬菌体与HSA抗原和CD3抗原的特异性结合。

[0023] 图2图示了通过ELISA滴定测定的抗HSA噬菌体与人、食蟹猴和小鼠血清白蛋白的交叉反应性。

[0024] 图3提供了使用纯化的sdAb，为了更精确的Kd测定而选择的9个克隆的结合亲和力概况。

[0025] 图4图示了几种抗HSA sdAb变体的疏水暴露温度(T_h °C)。

[0026] 图5图示了几种抗HSA sdAb变体在低pH下形成二聚体与单体的倾向。

具体实施方式

[0027] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案，但是对于本领域技术人员显而易见的是，这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员现将想到许多变化、改变和替换。应当理解，本文所述的本发明实施方案的各种替代方案均可用于实施本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围，并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

[0028] 某些定义

[0029] 本文使用的术语仅用于描述特定情况的目的，而非限制性的。如本文所用，除非上下文另有明确说明，否则单数形式“一个”、“一种”和“该”也旨在包括复数形式。此外，就具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”或其变化形式而言，这些术语旨在以与术语“包含”类似的方式为包含性的。

[0030] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员测定的特定值的可接受误差范围内，所述可接受误差范围将部分取决于该值如何测量或测定，例如，测量系统的局限性。例如，根据给定值的实践，“约”可以表示在1个或大于1个标准差内。在本申请和权利要求书中描述特定值的情况下，除非另有说明，否则术语“约”应被认为意指该特定值的可接受误差

范围。

[0031] 术语“个体”、“患者”或“受试者”可互换使用。这些术语均不要求或不限于以医疗保健工作者(例如,医生、注册护士、护士执业者、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如,持续或间歇的)为特征的情况。

[0032] 术语“框架”或“FR”残基(或区)是指除如本文定义的CDR或高变区残基之外的可变域残基。“人共有框架”是代表在选择人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。

[0033] 如本文所用,“可变区”或“可变域”是指以下情况:可变域的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同,并且在每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中使用。然而,变异性并非均匀地分布在抗体的整个可变域中。其集中在轻链和重链可变域中称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变域更高度保守的部分被称为框架(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR区,其主要采取 β -折叠构型,且通过三个CDR连接,所述三个CDR形成连接 β 折叠结构的环,并且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区紧密靠近保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定域虽然不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应物功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。“按照Kabat的可变域残基编号”或“按照Kabat的氨基酸位置编号”及其变化形式是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中用于抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有减少或添加的氨基酸,其对应于可变域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变域可包含在H2的残基52之后的单氨基酸插入(根据Kabat为残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat为残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列在同源性区域与“标准”Kabat编号的序列进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。这并不意味着本公开内容的CDR必然对应于Kabat编号约定。

[0034] 如本文所用,相对于序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在将序列进行比对并引入缺口(如果需要)以达到最大序列同一性百分比之后,候选序列中的氨基酸残基与特定序列中的氨基酸残基相同的百分比,并且不认为任何保守置换是序列同一性的一部分。为了确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对可通过本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megaalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0035] 如本文所用,“消除半衰期”以其普通意义使用,如在Goodman和Gillman的The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25(Alfred Goodman Gilman,Louis S.Goodman和Alfred Gilman编著,第六版1980)中所述。简言之,该术语意在包括药物消除的时间过程的定量量度。大多数药物的消除是指数性的(即,遵循一级动力学),因为药物浓度通常并未接近消除过程的饱和所需的浓度。指数过程的速率可由其速率常数k或由其半衰期 $t_{1/2}$ 表示,速率常数k表示每单位时间的分数变化,半衰期 $t_{1/2}$ 表示该过程完成50%所需

的时间。这两个常数的单位分别是时间⁻¹和时间。反应的一级速率常数和半衰期简单相关($k \times t_{1/2} = 0.693$)并且可以相应地互换。由于一级消除动力学指示每单位时间损失恒定分数的药物,因此药物浓度的对数相对于时间的图形在初始分布阶段之后(即在药物吸收和分布完成之后)一直是线性的。可从这样的图形准确地确定药物消除的半衰期。

[0036] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指本公开内容中描述的蛋白质与其结合靶标的亲和力,并且使用“Kd”值以数字表示。如果表明两种或更多种蛋白质对其结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质对其结合靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。如果表明两种或更多种蛋白质对单一结合靶标具有相当的结合亲和力,那么各蛋白质与所述单一结合靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。如果表明蛋白质以相当的结合亲和力结合两种或更多种靶标,那么所述蛋白质与该两种或更多种靶标结合的Kd值在彼此的±2倍之内。通常,较高的Kd值对应于较弱的结合。在一些实施方案中,使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)或表面等离子体共振测定来测量“Kd”。在某些实施方案中,还使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)通过表面等离子体共振技术来测定“缔合率”或“缔合的速率”或“缔合速率”或“kon”以及“解离率”或“解离的速率”或“解离速率”或“koff”。在其他实施方案中,使用Octet[®]Systems(Pall Life Sciences)来测定“Kd”、“kon”和“koff”。

[0037] 本文描述了单结构域血清白蛋白结合蛋白质、药物组合物以及用于制备这样的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的核酸、重组表达载体和宿主细胞。还提供了使用所公开的单结构域血清白蛋白结合蛋白质预防和/或治疗疾病、病况和病症的方法。该单结构域血清白蛋白结合蛋白质能够特异性结合血清白蛋白。在一些实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质包含其他结构域,诸如CD3结合域以及针对其他靶抗原的结合域。

[0038] 单结构域血清白蛋白结合蛋白质

[0039] 本文考虑了单结构域血清白蛋白结合蛋白质。血清白蛋白由肝脏产生,以溶于血浆中的形式存在,并且是哺乳动物中最丰富的血液蛋白质。白蛋白对于维持体液在血管与身体组织之间的适当分布所需的膨胀压至关重要;在没有白蛋白的情况下,血管中的高压会迫使更多流体流出并进入组织。其还通过与几种疏水性类固醇激素非特异性结合而充当血浆载体,以及充当氯高铁血红素和脂肪酸的转运蛋白。人血清白蛋白(HSA)(分子量~67kDa)是血浆中最丰富的蛋白质,以约50mg/ml(600μM)存在,并且在人体内具有约20天的半衰期。HSA用于维持血浆pH,对胶体血压有贡献,起到许多代谢物和脂肪酸的载体的作用,并且充当血浆中的主要药物转运蛋白。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质与HSA结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质与来自食蟹猴的血清白蛋白结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质与HSA和来自食蟹猴的血清白蛋白结合。在一些实施方案中,所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质还与小鼠血清白蛋白结合。在一些实施方案中,对小鼠血清白蛋白的结合亲和力比对人或食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力弱约1.5倍至约20倍。

[0040] 与白蛋白的非共价结合延长了短寿命蛋白质的消除半衰期。例如,与单独施用Fab片段相比,分别向小鼠和兔静脉内施用白蛋白结合域与Fab片段的重组融合物导致体内清除率降低了25倍和58倍,并且半衰期延长26倍和37倍。在另一个实例中,在用脂肪酸对胰岛素进行酰化以促进与白蛋白结合的情况下,当在兔或猪中皮下注射时观察到持久的效果。

总之,这些研究证明白蛋白结合与延长的作用/血清半衰期之间存在联系。

[0041] 在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质是单结构域抗体,诸如对血清白蛋白具有特异性的重链可变域(VH)、骆驼科来源的sdAb的可变域(VHH)、肽、配体或小分子实体。在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质是单结构域抗体,诸如对HSA具有特异性的重链可变域(VH)、骆驼科来源的sdAb的可变域(VHH)、肽、配体或小分子实体。在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白的血清白蛋白结合域是与血清白蛋白结合的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在某些实施方案中,该血清白蛋白结合域是单结构域抗体。在其他实施方案中,该血清白蛋白结合域是肽。在进一步的实施方案中,该血清白蛋白结合域是小分子。考虑到该单结构域血清白蛋白结合蛋白质相当小,并且在一些实施方案中不大于25kD、不大于20kD、不大于15kD或不大于10kD。在某些情况下中,如果该单结构域血清白蛋白结合蛋白质是肽或小分子实体,则其为5kD或更小。

[0042] 在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质是半衰期延长结构域,其对单结构域血清白蛋白结合蛋白质自身提供改变的药效学和药代动力学。如上所述,半衰期延长结构域延长了消除半衰期。半衰期延长结构域还改变药效学性质,包括改变单结构域血清白蛋白结合蛋白的组织分布、渗透和扩散。在一些实施方案中,与没有半衰期延长结构域的蛋白质相比,半衰期延长结构域提供改善的组织(包括肿瘤)靶向、组织分布、组织穿透、在组织内的扩散和增强的疗效。在一个实施方案中,治疗方法有效且高效地利用较少量的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,导致副作用降低,如非肿瘤细胞的细胞毒性降低。

[0043] 此外,可选择单结构域血清白蛋白结合蛋白质对其结合靶标的结合亲和力,以便在特定的单结构域血清白蛋白结合蛋白质中指向特定的消除半衰期。因此,在一些实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质对其结合靶标具有高结合亲和力。在其他实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质对其结合靶标具有中等结合亲和力。在其他实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质对其结合靶标具有低的或微小的结合亲和力。示例性的结合亲和力包括10nM或更小(高)、10nM至100nM(中等)和大于100nM(低)的 K_D 。如上所述,通过诸如表面等离子体共振(SPR)等已知方法来测定单结构域血清白蛋白结合蛋白对结合靶标的结合亲和力。

[0044] 在某些实施方案中,本文公开的单结构域血清白蛋白结合蛋白质以人Kd(hKd)与HSA结合。在某些实施方案中,本文公开的单结构域血清白蛋白结合蛋白质以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴血清白蛋白结合。在某些实施方案中,本文公开的单结构域血清白蛋白结合蛋白质以食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴血清白蛋白结合并以人Kd(hKd)与HSA结合。在一些实施方案中,hKd的范围在1nM至100nM之间。在一些实施方案中,hKd的范围在1nM至10nM之间。在一些实施方案中,cKd的范围在1nM至100nM之间。在一些实施方案中,cKd的范围在1nM至10nM之间。在一些实施方案中,hKd和cKd的范围在约1nM至约5nM或约5nM至10nM之间。在一些实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质与选自人血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白和小鼠血清白蛋白的血清白蛋白结合。在一些实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白和小鼠血清白蛋白结合。在一些实施方案中,该单结构域血清白蛋白结合蛋白质以约1nM至约10nM的人Kd(hKd)

与人血清白蛋白结合，并且以1nM至10nM的食蟹猴Kd (cKd) 与食蟹猴血清白蛋白结合。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质以约10nM至约50nM的小鼠Kd (mKd) 与小鼠血清白蛋白结合。

[0045] 在一些实施方案中，hKd为约1.5nM、约1.6nM、约1.7nM、约1.8nM、约1.9nM、约2nM、约2.1nM、约2.2nM、约2.3nM、约2.4nM、约2.5nM、约2.6nM、约2.7nM、约2.8nM、约2.9nM、约3nM、3.1nM、约3.2nM、约3.3nM、约3.4nM、约3.5nM、约3.6nM、约3.7nM、约3.8nM、约3.9nM、约4nM、约4.5nM、约5nM、约6、约6.5nM、约7nM、约7.5nM、约8nM、约8.5nM、约9.0nM、约9.5nM或约10nM。

[0046] 在一些实施方案中，cKd为约1.5nM、约1.6nM、约1.7nM、约1.8nM、约1.9nM、约2nM、约2.1nM、约2.2nM、约2.3nM、约2.4nM、约2.5nM、约2.6nM、约2.7nM、约2.8nM、约2.9nM、约3nM、3.1nM、约3.2nM、约3.3nM、约3.4nM、约3.5nM、约3.6nM、约3.7nM、约3.8nM、约3.9nM、约4nM、约4.5nM、约5nM、约6、约6.5nM、约7nM、约7.5nM、约8nM、约8.5nM、约9.0nM、约9.5nM或约10nM。

[0047] 在一些实施方案中，mKd为约10nM、约11nM、约12nM、约13nM、约14nM、约15nM、约16nM、约17nM、约18nM、约19nM、约20nM、约21nM、约22nM、约23nM、约24nM、约25nM、约26nM、约27nM、约28nM、约29nM、约30nM、约31nM、约32nM、约33nM、约34nM、约35nM、约36nM、约37、约38nM、约39nM、约40nM、约41nM、约42nM、约43nM、约44nM、约45nM、约46nM、约47nM、约48nM或约50nM。

[0048] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有选自SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ IN NO.25、SEQ ID NO.26和SEQ ID NO.27的氨基酸序列。

[0049] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，并且hKd为约2.3nM且cKd为约2.4nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列，并且hKd为约2.1nM且cKd为约2.2nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，并且hKd为约1.9nM且cKd为约1.7nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，并且hKd为约1.9nM且cKd为约1.7nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，并且hKd为约2.1nM且cKd为约2.2nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，并且hKd为约3.2nM且cKd为约3.6nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列，并且hKd为约2.7nM且cKd为约2.6nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列，并且hKd为约2.1nM且cKd为约2nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白

质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，并且hKd和cKd为约5nM至约10nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，并且hKd为约6nM且cKd为约7.5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，并且其中hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，并且其中hKd为约2.2nM且cKd为约2.3nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列，并且其中hKd和cKd为约1nM至约5nM。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列，并且其中hKd为约1.6nM且cKd为约1.6nM。

[0050] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，并且具有约17nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，并且具有约12nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，并且具有约33nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列，并且具有约14nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，并且具有约16nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列，并且具有约17nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列，并且具有约17nM的mKd。在一些实施方案中，该单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列，并且具有约16nM的mKd。

[0051] 在一些实施方案中，hKd与cKd之比(hKd:cKd)在约20:1至约1:2的范围内。

[0052] 在一些实施方案中，所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质具有至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少6小时、至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时的消除半衰期。

[0053] CD3结合域

[0054] 通过T细胞受体复合物对抗原(在主要组织相容性复合物MHC的背景下展示)的识别来介导T细胞应答的特异性。作为T细胞受体复合物的一部分，CD3是包含CD3 γ (gamma)链、CD3 δ (delta)链和存在于细胞表面上的两条CD3 ϵ (epsilon)链的蛋白质复合物。CD3与细胞受体(TCR)的 α (alpha)和 β (beta)链缔合并与CD3 ζ (zeta)一起构成T细胞受体复合物。CD3在T细胞上的群集(如通过固定的抗CD3抗体)导致T细胞活化，这类似于T细胞受体的接合，但不依赖于其克隆特有的特异性。

[0055] 在一方面，本文描述了包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与CD3特异性结合的结构域。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与人CD3特异性结合的结构域。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与CD3 γ 特异性结合的结构域。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与CD3 δ 特异性结合的结构域。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与CD3 ϵ 特异性结合的结构域。

[0056] 在另外的实施方案中，所述多特异性蛋白质进一步包含与T细胞受体(TCR)特异性结合的结构域。在一些实施方案中，该多特异性蛋白质进一步包含与TCR的 α 链特异性结合

的结构域。在一些实施方案中,该多特异性蛋白质进一步包含与TCR的β链特异性结合的结构域。

[0057] 在某些实施方案中,包含本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质的CD3结合域不仅表现出强力的与人CD3的CD3结合亲和力,而且还显示出与相应的食蟹猴CD3蛋白质极好的交叉反应性。在一些情况下,该多特异性蛋白质的CD3结合域与来自食蟹猴的CD3是交叉反应性的。在某些情况下,关于CD3结合的人:食蟹猴 K_p (hKd:cKd)之比为20:1至1:2。

[0058] 在一些实施方案中,包含本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质的CD3结合域可以是与CD3结合的任何结构域,包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域,或者CD3结合抗体的抗原结合片段,诸如单结构域抗体(sdAb)、Fab、Fab'、F(ab)2和Fv片段、由一个或多个CDR组成的片段、单链抗体(例如,单链Fv片段(scFv))、二硫键稳定的(dsFv)Fv片段、异缀合抗体(例如,双特异性抗体)、pFv片段、重链单体或二聚体、轻链单体或二聚体以及由一条重链和一条轻链组成的二聚体。在一些情况下,CD3结合域来源于包含本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质最终将在其中使用的相同物种是有益的。例如,对于在人类中使用,包含本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质的CD3结合域包含来自抗体或抗体片段的抗原结合域的人或人源化残基可能是有益的。

[0059] 因此,在一方面,所述抗原结合域包含人源化或人抗体或抗体片段或者鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源化或人抗CD3结合域包含本文所述的人源化或人抗CD3结合域的轻链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)中的一个或多个(例如,全部三个),和/或本文所述的人源化或人抗CD3结合域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)中的一个或多个(例如,全部三个),例如,人源化或人抗CD3结合域包含一个或多个,例如全部三个LC CDR,以及一个或多个,例如全部三个HC CDR。

[0060] 在一些实施方案中,人源化或人抗CD3结合域包含对CD3具有特异性的人源化或人轻链可变区,其中对CD3具有特异性的轻链可变区包含人轻链框架区中的人或非人轻链CDR。在某些情况下,该轻链框架区为 λ (lambda)轻链框架。在其他情况下,该轻链框架区为 κ (kappa)轻链框架。

[0061] 在一些实施方案中,人源化或人抗CD3结合域包含对CD3具有特异性的人源化或人重链可变区,其中对CD3具有特异性的重链可变区包含人重链框架区中的人或非人重链CDR。

[0062] 在某些情况下,重链和/或轻链的互补决定区衍生自已知的抗CD3抗体,例如,莫罗单抗-CD3(OKT3)、奥昔珠单抗(TRX₄)、替利珠单抗(MGA031)、维西珠单抗(Nuvion)、SP34、TR-66或X₃5-3、VIT3、BMA030(BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1和WT-31。

[0063] 与CD3结合的亲和力可通过例如包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性蛋白质自身或其CD3结合域与测定板上涂覆的CD3、微生物细胞表面上展示的CD3、溶液中的CD3等结合的能力来测定。根据本公开内容的包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特

异性蛋白质自身或其CD3结构域与CD3的结合活性可如下测定：将配体（例如，CD3）或所述多特异性蛋白质自身或其CD3结合域固定至珠子、基底、细胞等。可将试剂添加至合适的缓冲液中并将结合配偶体在给定的温度下温育一段时间。洗涤以去除未结合的物质后，可采用例如SDS、高pH缓冲液等释放结合的蛋白质，并通过例如表面等离子体共振（SPR）进行分析。

[0064] 靶抗原结合域

[0065] 在某些实施方案中，除了所述血清白蛋白结合域和CD3结构域之外，本文所述的包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质还包含与靶抗原结合的结构域。靶抗原参与疾病、病症或病况和/或与疾病、病症或病况有关。特别地，靶抗原与增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病有关。在一些实施方案中，靶抗原是肿瘤细胞上表达的肿瘤抗原。或者，在一些实施方案中，靶抗原与病原体如病毒或细菌有关。

[0066] 在一些实施方案中，靶抗原是细胞表面分子，如蛋白质、脂质或多糖。在一些实施方案中，靶抗原在肿瘤细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、受损红细胞、动脉斑块细胞或纤维化组织细胞上。

[0067] 包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的设计允许靶抗原的结合域为柔性的，因为靶抗原的结合域可以是任何类型的结合域，包括但不限于来自单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体的结构域。在一些实施方案中，靶抗原的结合域为单链可变片段（scFv）、单结构域抗体如重链可变域（VH）、轻链可变域（VL）和骆驼科来源的sdAb的可变域（VHH）。在其他实施方案中，靶抗原的结合域为非Ig结合域，即，抗体模拟物，如anticalin、affilin、affibody分子、affimer、affitin、alphabody、avimer、DARPin、fynomer、kunitz结构域肽和单抗体（monobody）。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为与靶抗原结合或缔合的配体或肽。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为knottin。在进一步的实施方案中，靶抗原的结合域为小分子实体。

[0068] 单结构域血清白蛋白结合蛋白质修饰

[0069] 本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质包括衍生物或类似物，其中(i)氨基酸被不是由遗传密码编码的氨基酸残基置换，(ii)成熟多肽与另一化合物如聚乙二醇融合，或(iii)附加的氨基酸与该蛋白质融合，如前导序列或分泌序列或阻断免疫原性结构域的序列和/或用于纯化蛋白质的序列。

[0070] 典型的修饰包括但不限于乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附接、血红素部分的共价附接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附接、脂质或脂质衍生物的共价附接、磷脂酰肌醇的共价附接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联形成、胱氨酸形成、焦谷氨酸形成、甲酰化、 γ 羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、十四烷基化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转移RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加，如精氨酰化，和泛素化。

[0071] 在本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质中的任何位置进行修饰，该位置包括肽骨架、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。可用于修饰单结构域血清白蛋白结合蛋白质的某些常见肽修饰包括糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟基化、多肽中的氨基或羧基基团或两者被共价修饰的阻断，以及ADP-核糖基化。

[0072] 编码单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸

[0073] 在一些实施方案中,还提供了编码本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸分子。在一些实施方案中,该多核苷酸分子以DNA构建体的形式提供。在其他实施方案中,该多核苷酸分子以信使RNA转录物的形式提供。

[0074] 通过已知方法构建多核苷酸分子,例如通过将编码由肽接头隔开,或在其他实施方案中通过肽键直接连接的三个结合域的基因合并为单个基因构建体,该单个基因构建体与合适的启动子以及可选的合适的转录终止子可操作地连接,并且将其在细菌或其他合适的表达系统例如CHO细胞中表达。

[0075] 在一些实施方案中,还提供了编码包含根据本公开内容的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白的多核苷酸分子。在一些实施方案中,编码所述多特异性结合蛋白质的多核苷酸还包括CD3结合域的编码序列。在一些实施方案中,编码所述多特异性结合蛋白质的多核苷酸还包括靶抗原结合域的编码序列。在一些实施方案中,编码所述多特异性结合蛋白质的多核苷酸还包括CD3结合域和靶抗原结合域的编码序列。在一些实施方案中,该多核苷酸分子以DNA构建体的形式提供。在其他实施方案中,该多核苷酸分子以信使RNA转录物的形式提供。在靶抗原结合域为小分子的实施方案中,该多核苷酸含有编码血清白蛋白结合域和CD3结合域的基因。在半衰期延长结构域为小分子的实施方案中,该多核苷酸含有编码与CD3和靶抗原结合的结构域的基因。根据所采用的载体系统和宿主,可使用任何数目的合适的转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。选择启动子使得其驱动多核苷酸在相应宿主细胞中的表达。

[0076] 在一些实施方案中,将多核苷酸插入载体中,优选表达载体中,这代表进一步的实施方案。该重组载体可根据已知方法来构建。特别感兴趣的载体包括质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、病毒(virii)(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、慢病毒等)和粘粒。

[0077] 可利用多种表达载体/宿主系统,以包含并表达编码所述单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多肽的多核苷酸。用于在大肠杆菌(E.coli)中表达的表达载体的实例为pSKK(Le Gall等人,J Immunol Methods.(2004)285(1):111-27),用于在哺乳动物细胞中表达的pcDNA5(Invitrogen),PICHIAPINKTM酵母表达系统(Invitrogen),BACUVANCETM杆状病毒表达系统(GenScript)。

[0078] 因此,在一些实施方案中,如本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质通过以下步骤产生:将编码如上所述的蛋白质的载体引入宿主细胞中,并在蛋白质结构域借以表达的条件下培养所述宿主细胞,该宿主细胞可进行分离并任选地进一步纯化。

[0079] 单结构域血清白蛋白结合蛋白质的产生

[0080] 在一些实施方案中,本文公开了用于产生单结构域血清白蛋白结合蛋白质的方法。在一些实施方案中,该方法包括在允许单结构域血清白蛋白结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码单结构域血清白蛋白结合蛋白质的核酸序列的载体转化或转染的宿主,并从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0081] 在另外的实施方案中,提供了针对与参考结合化合物相比改善本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质和/或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质的一种或多种性质的方法,所述性质例如是亲和力、稳定性、耐热性、交叉反应性等。在一些实施方案中,提供了多个单置换文库,每个文库对应于单结构域血清白蛋白结合蛋白质

或参考结合化合物的不同结构域或氨基酸区段,使得单置换文库的每个成员仅编码在其相应的结构域或氨基酸区段中的单氨基酸变化(这允许用少量小文库探测大的蛋白质或蛋白结合位点中的所有潜在置换)。在一些实施方案中,多个结构域形成或覆盖单结构域血清白蛋白结合蛋白质或参考结合化合物的氨基酸连续序列。不同单置换文库的核苷酸序列与至少一个其他单置换文库的核苷酸序列重叠。在一些实施方案中,设计多个单置换文库,使得每个成员与编码相邻结构域的每个单置换文库的每个成员重叠。

[0082] 单独选择由这样的单置换文库表达的结合化合物以获得每个文库的变体子集,所述变体子集具有与参考结合化合物的性质至少一样好的性质,并且其得到的文库大小减小(即,编码结合化合物的选定组的核酸数目小于编码原始单置换文库的成员的核酸数目)。这样的性质包括但不限于对靶标化合物的亲和力,在诸如加热、高pH或低pH、酶促降解等各种条件下的稳定性,与其他蛋白质的交叉反应性,等等。来自每个单置换文库的选定化合物在本文可互换地称为“预候选化合物”或“预候选蛋白质”。然后使用基于PCR的基因改组技术,将编码来自单独的单置换文库的预候选化合物的核酸序列在PCR中改组以产生改组文库。

[0083] 本文描述了筛选过程的示例性工作流程。从单置换文库产生预候选化合物的文库并针对与靶蛋白质的结合进行选择,之后将预候选文库改组以产生编码候选化合物的核酸文库,继而将该核酸文库依次克隆到适宜的表达载体如噬菌粒表达系统中。然后使表达候选化合物的噬菌体经历一轮或多轮选择以改善所需性质,如对靶分子的结合亲和力。靶分子可被吸附或以其他方式附着到孔或其他反应容器的表面,或者靶分子可用结合部分如生物素进行衍生化,该结合部分在与候选结合化合物一起温育后可用与珠子如磁珠结合的互补部分如链霉素捕获,以供洗涤。在示例性选择方案中,候选结合化合物经受延长的洗涤步骤,使得仅与靶分子具有非常低的解离速率的候选化合物得以选择。这样的实施方案的示例性洗涤时间为至少8小时;或者在其他实施方案中为至少24小时;或者在其他实施方案中为至少48小时;或者在其他实施方案中为至少72小时。在选择后,将分离的克隆扩增并使其进行另外的选择循环或分析,例如通过测序和通过对结合亲和力的比较测量,例如通过ELISA、表面等离子体共振结合、生物膜干涉法(例如,Octet system,ForteBio, Menlo Park, CA)等。在一些实施方案中,实施该过程以鉴别与参考血清白蛋白结合蛋白质(如具有SEQ ID NO.10的氨基酸序列的蛋白质)相比具有改善的热稳定性、改善的与选定组的结合靶标的交叉反应性的一种或多种单结构域血清白蛋白结合蛋白质和/或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。通过改变参考血清白蛋白结合蛋白质的VH区中的密码子来制备单置换文库,该密码子包括框架区和CDR中的密码子;在另一个实施方案中,密码子发生改变的位置包括参考血清白蛋白结合蛋白质的重链的CDR,或者此类CDR的子集,如仅CDR1、仅CDR2、仅CDR3或CDR对。在另一个实施方案中,密码子发生改变的位置仅在框架区中出现。在一些实施方案中,文库仅包含相对于参考血清白蛋白结合蛋白质的单密码子变化,该变化仅在编号范围为10至250的VH的框架区中。在另一个实施方案中,密码子发生改变的位置包括参考血清白蛋白结合蛋白质的重链的CDR3或此类CDR3的子集。在另一个实施方案中,VH编码区密码子发生改变的位置的数目在10至250的范围内,使得至多100个位置在框架区中。在如上所述制备单置换文库后进行以下步骤:(a)单独表达每个单置换文库的每个成员作为预候选蛋白质;(b)选择编码与结合配偶体结合的预候选蛋白质

的每个单置换文库的成员,该结合配偶体可与原始结合靶标[例如,所需的交叉反应靶标]不同或相同;(c)在PCR中改组选定文库的成员以产生组合的改组文库;(d)表达该改组文库的成员作为候选血清白蛋白结合蛋白质;以及(e)对该改组文库的成员进行一次或多次选择以获得与原始结合配偶体结合的候选血清白蛋白结合蛋白质,并且可能(f)针对与所需交叉反应性靶标的结合进一步选择候选蛋白质,从而提供核酸编码的血清白蛋白结合蛋白质,其相对于参考血清白蛋白结合蛋白质对一种或多种物质具有增加的交叉反应性,而不丧失对原始配体的亲和力。在另外的实施方案中,可通过用以下步骤代替步骤(f)来实现该方法,以获得对选定的交叉反应性物质或化合物或表位具有降低的反应性的血清白蛋白结合蛋白质:从候选血清白蛋白结合蛋白质的子集中一次或多次排除与不需要的交叉反应性化合物结合的候选结合化合物。

[0084] 最近的研究已经报道,在制备、储存和体内使用的过程中,治疗性抗体有通过许多途径降解的风险。蛋白质中最常发生的化学降解反应包括天冬酰胺(N)的脱酰胺作用和天冬氨酸(D)残基的异构化。特别地,假设如果N和D残基参与抗原识别,则它们的化学改变可能导致严重的效力损失。已知天冬酰胺和天冬氨酸残基共享通过形成环状琥珀酰亚胺中间体而进行的降解途径。在抗体的天冬氨酸位点形成琥珀酰亚胺中间体及其水解产物(天冬氨酸盐和异天冬氨酸盐)代表着稳定性问题。当发生异构化时,抗体的化学结构改变,这可能导致较差的稳定性,例如通过聚集、较短的保质期所表现出来的。因此,在本公开内容的一些实施方案中,提供了单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中一个或多个天冬氨酸残基发生突变,从而降低了单结构域血清白蛋白结合蛋白质的异构化可能。在一些实施方案中,天冬氨酸残基在单结构域血清白蛋白结合蛋白质的CDR2中,并且天冬氨酸残基被突变为谷氨酸。在某些实施方案中,由SEQ ID NO.10定义的蛋白质的位置62处的天冬氨酸残基被突变为谷氨酸(D62E)。在一些实施方案中,含有D62E突变的单结构域血清白蛋白蛋白的血清白蛋白结合亲和力不受突变影响。在一些实施方案中,具有和不具有D62E突变的单结构域血清白蛋白结合蛋白质对血清白蛋白具有相当的结合亲和力。

[0085] 药物组合物

[0086] 在一些实施方案中,还提供了药物组合物,其包含本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质、包含编码单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多肽的多核苷酸的载体或被该载体转化的宿主细胞,以及至少一种药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”包括但不限于不干扰成分的生物活性的有效性且对所施用的患者无毒的任何载体。合适的药物载体的实例是本领域公知的,且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如水包油乳液、各种类型的润湿剂、无菌溶液等。这样的载体可通过常规方法配制,并且可以以合适的剂量施用于受试者。优选地,该组合物是无菌的。这些组合物还可含有佐剂如防腐剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗生素和抗真菌剂来确保阻止微生物的作用。

[0087] 在药物组合物的一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质被包封在纳米颗粒中。在一些实施方案中,该纳米颗粒是富勒烯、液晶、脂质体、量子点、超顺磁纳米颗粒、树状聚体或纳米棒。在药物组合物的其他实施方案中,将单结构域血清白蛋白结合蛋白质附着至脂质体。在一些情况下,单结构域血清白蛋白结合蛋白质与脂质体表面缀合。在一些情况下,单结构域血清白蛋白结合蛋白质被包封在脂质体的壳内。在一些情况下,该脂质体为阳离子脂质体。

[0088] 本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质被考虑用作药物。施用通过不同方式实现,例如,通过静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在一些实施方案中,施用途径取决于疗法的种类和药物组合物中包含的化合物的种类。给药方案将由主治医师根据其他临床因素来确定。对于任何一名患者的剂量依赖于许多因素,包括患者体型、体表面积、年龄、性别、待施用的具体化合物、施用的时间和途径、疗法的种类、总体健康和其他同时施用的药物。“有效剂量”是指活性成分的量,该量足以影响疾病的过程和严重程度,从而导致这种病理学的减轻或缓解,并且可使用已知方法来确定。

[0089] 治疗方法

[0090] 在一些实施方案中,本文还提供了用于刺激有需要的个体的免疫系统的方法和用途,其包括施用本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。在一些情况下,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的施用诱导和/或保持对表达靶抗原的细胞的细胞毒性。在一些情况下,表达靶抗原的细胞是癌细胞或肿瘤细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、自身反应性T细胞或B细胞、受损的红细胞、动脉斑块或纤维化组织。

[0091] 本文还提供了用于治疗与靶抗原有关的疾病、病症或病况的方法和用途,其包括向有需要的个体施用本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质。与靶抗原有关的疾病、病症或病况包括但不限于病毒感染、细菌感染、自身免疫病、移植排斥、动脉粥样硬化或纤维化。在其他实施方案中,与靶抗原有关的疾病、病症或病况为增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病。在一个实施方案中,与靶抗原有关的疾病、病症或病况为癌症。在一种情况下,该癌症为血液系统癌症。在另一种情况下,该癌症为实体瘤癌症。

[0092] 在一些实施方案中,如本文所用,“治疗”或“处理”是指治疗性处理,其中目的是减缓(减轻)不期望的生理病况、病症或疾病,或是获得有益或期望的临床结果。对于本文所述的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻;病况、病症或疾病程度的减小;病况、病症或疾病状态的稳定(即不恶化);病况、病症或疾病的延迟发作或进展减缓;病况、病症或疾病状态的改善;以及可检测的或不可检测的缓解(部分或全部的),或者病况、病症或疾病的增强或改善。治疗包括引发临幊上显著的反应,而没有过多的副作用。治疗还包括与不接受治疗的情况下预期的生存期相比延长生存期。在其他实施方案中,“治疗”或“处理”是指预防性措施,其中目的是例如在易患疾病的人(例如,携带疾病如乳腺癌的遗传标志物的个体)中,延迟不期望的生理病况、病症或疾病的发作或者减小其严重程度。

[0093] 在本文所述的方法的一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质与用于治疗特定疾病、病症或病况的药剂联合施用。药剂包括但不限于涉及抗体、小分子(例如,化疗药物)、激素(甾体、肽等)的疗法、放疗(γ 射线、X射线和/或放射性同位素的定向递送、微波、UV辐射等)、基因疗法(例如,反义疗法(antisense)、逆转录病毒疗法等)和其他免疫疗法。在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质或包含单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质与止泻剂、止吐剂、镇痛药、阿片类药物和/或非甾体抗炎剂联合施用。在一些实施方案中,本文所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质或包含单结构域血清

白蛋白结合蛋白质的多特异性结合蛋白质在手术之前、期间或之后施用。

[0094] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式：

[0095] 1. 一种单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其包含互补决定区CDR1、CDR2和CDR3，其中

[0096] (a) CDR1的氨基酸序列如GFX₁X₂X₃X₄FGMS (SEQ ID NO.1) 所示，X₁是苏氨酸、精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸，X₂是苯丙氨酸或酪氨酸，X₃是丝氨酸、精氨酸或赖氨酸，X₄是丝氨酸、赖氨酸、精氨酸或丙氨酸；

[0097] (b) CDR2的氨基酸序列如SISGSGX₅X₆TLYAX₇SX₈K (SEQ ID NO.2) 所示，X₅是丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或丙氨酸，X₆是天冬氨酸、组氨酸、缬氨酸或苏氨酸，X₇是天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或丝氨酸，X₈是缬氨酸或亮氨酸；并且

[0098] (c) CDR3的氨基酸序列如GGSLX₉X₁₀ (SEQ ID NO.3) 所示，X₉是丝氨酸、精氨酸、苏氨酸或赖氨酸，并且X₁₀是精氨酸、赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺，其中X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₉和X₁₀不同时分别是苏氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、丝氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸和精氨酸。

[0099] 2. 如实施方式1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中所述蛋白质包含下式：

[0100] f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4

[0101] 其中r1是SEQ ID NO.1；r2是SEQ ID NO.2；并且r3是SEQ ID NO.3；并且其中f₁、f₂、f₃和f₄是选定的框架残基，使得所述蛋白质与SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列至少80%相同。

[0102] 3. 如实施方式2所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15或SEQ ID NO.16。

[0103] 4. 如实施方式2所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r2包含SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21或SEQ ID NO.22。

[0104] 5. 如实施方式2所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r3包含SEQ ID NO.23或SEQ ID NO.24。

[0105] 6. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.14。

[0106] 7. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.15，r2为SEQ ID NO.17，并且r3为SEQ ID NO.23。

[0107] 8. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.16，r3包含SEQ ID NO.23。

[0108] 9. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.15，并且r2包含SEQ ID NO.18。

[0109] 10. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.14，并且r3包含SEQ ID NO.23。

[0110] 11. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含SEQ ID NO.15，r2包含SEQ ID NO.19，并且r3包含SEQ ID NO.24。

[0111] 12. 如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质，其中r1包含

SEQ ID NO.14,并且r2包含SEQ ID NO.20。

[0112] 13.如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中r1包含SEQ ID NO.15,并且r2包含SEQ ID NO.21。

[0113] 14.如实施方式2-5中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中r1包含SEQ ID NO.15,r2包含SEQ ID NO.22,并且r3包含SEQ ID NO.24。

[0114] 15.如实施方式1所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质具有选自SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ IN NO.25、SEQ ID NO.26和SEQ ID NO.27的氨基酸序列。

[0115] 16.如实施方式1-15中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与选自人血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白和小鼠血清白蛋白的血清白蛋白结合。

[0116] 17.如实施方式1-16中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(Kd)与人血清白蛋白和食蟹猴血清白蛋白结合。

[0117] 18.如实施方式1-17中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与小鼠血清白蛋白结合的结合亲和力(Kd)比所述蛋白质对人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(Kd)弱约1.5倍至约20倍。

[0118] 19.如实施方式1-18中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约100nM的人Kd(hKd)与人血清白蛋白结合,并且以1nM至100nM的食蟹猴Kd(cKd)与食蟹猴血清白蛋白结合。

[0119] 20.如实施方式19所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述hKd和所述cKd为1nM至约5nM或约5nM至约10nM。

[0120] 21.如实施方式20所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约2nM、约2nM至约3nM、约3nM至约4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、约7nM至约8nM、约8nM至约9nM或约9nM至约10nM。

[0121] 22.如实施方式16-21中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述hKd与所述cKd之比(hKd:cKd)在约20:1至约1:2的范围内。

[0122] 23.如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0123] 24.如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0124] 25.如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0125] 26.如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0126] 27.如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,并且其中所述hKd和所述cKd为约5nM至约

10nM。

[0127] 28. 如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0128] 29. 如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0129] 30. 如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0130] 31. 如实施方式1-22中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0131] 32. 如实施方式1-31中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质具有至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时的消除半衰期。

[0132] 33. 一种包含CDR1、CDR2和CDR3的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其包含如SEQ ID NO.10(野生型抗HSA)所示的序列, 其中选自CDR1的氨基酸位置28、29、30或31, CDR2的位置56、57、62或64, 以及CDR3的位置103和104的一个或多个氨基酸残基被置换, 其中

[0133] 氨基酸位置28被精氨酸、赖氨酸、丝氨酸或脯氨酸置换,

[0134] 氨基酸位置29被酪氨酸置换,

[0135] 氨基酸位置30被精氨酸或赖氨酸置换,

[0136] 氨基酸位置31被赖氨酸、精氨酸或丙氨酸置换,

[0137] 氨基酸位置56被精氨酸、苏氨酸或丙氨酸置换,

[0138] 氨基酸位置57被组氨酸、缬氨酸或苏氨酸置换,

[0139] 氨基酸位置62被组氨酸、精氨酸、谷氨酸或丝氨酸置换,

[0140] 氨基酸位置64被亮氨酸置换,

[0141] 氨基酸位置103被精氨酸、苏氨酸或赖氨酸置换,

[0142] 氨基酸位置104被赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸或天冬酰胺置换。

[0143] 34. 如实施方式33所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在除位置28、29、30、31、56、57、62、64、103和104之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。

[0144] 35. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在位置29处包含置换。

[0145] 36. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在位置31处包含置换。

[0146] 37. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在位置56处包含置换。

[0147] 38. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在位置62处包含置换。

- [0148] 39. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其在位置64处包含置换。
- [0149] 40. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其在位置104处包含置换。
- [0150] 41. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其在氨基酸位置31和62处包含置换。
- [0151] 42. 如实施方式36所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换。
- [0152] 43. 如实施方式41所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换,并且氨基酸位置62被谷氨酸置换。
- [0153] 44. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其在氨基酸位置31、56、64和104处包含置换。
- [0154] 45. 如实施方式44所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被丙氨酸置换,氨基酸位置64被亮氨酸置换,并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。
- [0155] 46. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置29和104被置换。
- [0156] 47. 如实施方式46所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置29被酪氨酸置换,并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。
- [0157] 48. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31和56被置换。
- [0158] 49. 如实施方式48所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,并且氨基酸位置56被苏氨酸置换。
- [0159] 50. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31、56和62被置换。
- [0160] 51. 如实施方式50所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被苏氨酸置换,并且氨基酸位置62被谷氨酸置换。
- [0161] 52. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31和104被置换。
- [0162] 53. 如实施方式52所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换,并且氨基酸位置104被赖氨酸置换。
- [0163] 54. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31、56和104被置换。
- [0164] 55. 如实施方式54所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被精氨酸置换,并且氨基酸位置104被缬氨酸置换。
- [0165] 56. 如实施方式33或34所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31、56、62和104被置换。
- [0166] 57. 如实施方式56所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被精氨酸置换,氨基酸位置62被谷氨酸置换,并且氨基酸位置

104被缬氨酸置换。

[0167] 58. 如实施方式33-57中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(K_d)与人血清白蛋白、食蟹猴血清白蛋白结合。

[0168] 59. 如实施方式33-58中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与小鼠血清白蛋白结合的结合亲和力(K_d)比所述蛋白质对人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(K_d)弱约1.5倍至约20倍。

[0169] 60. 如实施方式33-59中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约100nM的人 K_d (hK_d)与人血清白蛋白结合,并且以1nM至100nM的食蟹猴 K_d (cK_d)与食蟹猴血清白蛋白结合。

[0170] 61. 如实施方式33-60所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为1nM至约5nM或约5nM至约10nM。

[0171] 62. 如实施方式33-61中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约2nM、约2nM至约3nM、约3nM至约4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、约7nM至约8nM、约8nM至约9nM或约9nM至约10nM。

[0172] 63. 如实施方式33-62中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以人 K_d (hK_d)与人血清白蛋白结合,并且以食蟹猴 K_d (cK_d)与食蟹猴血清白蛋白结合,并且其中 hK_d 与 cK_d 之比($hK_d:cK_d$)为20:1至1:2。

[0173] 64. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0174] 65. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换,并且氨基酸位置62被谷氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0175] 66. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被丙氨酸置换,氨基酸位置64被亮氨酸置换,氨基酸位置104被赖氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0176] 67. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置29被酪氨酸置换,氨基酸位置104被赖氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0177] 68. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被苏氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0178] 69. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被苏氨酸置换,氨基酸位置62被谷氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0179] 70. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被精氨酸置换,氨基酸位置104被赖氨酸置换,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约5nM至约10nM。

[0180] 71. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中氨基酸位置31被赖氨酸置换,氨基酸位置56被精氨酸置换,氨基酸位置104被缬氨酸置换,并且

其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0181] 72. 如实施方式33-63中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中氨基酸位置31被赖氨酸置换, 氨基酸位置56被精氨酸置换, 氨基酸位置62被谷氨酸置换, 并且氨基酸位置104被缬氨酸置换, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0182] 73. 如实施方式33-72中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质具有至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时的消除半衰期。

[0183] 74. 一种单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1、CDR2或CDR3中包含至少一个突变, 其中CDR1具有如SEQ ID N0:11所示的序列, CDR2具有如SEQ ID N0:12所示的序列, CDR3具有如SEQ ID N0:13所示的序列, 并且其中所述至少一个突变不在SEQ ID N0:11的氨基酸位置1、2、7、8、9或10, SEQ ID N0:12的位置1、3、6、10或11, 或者SEQ ID N0:13的位置1或2处。

[0184] 75. 如实施方式74所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在选自CDR1 (SEQ ID N0:11) 的位置3、4、5和6, CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7、8、13和15, 以及CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置5和6的氨基酸位置处包含至少一个突变。

[0185] 76. 如实施方式75所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在除CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置3、4、5和6, CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7、8、13和15, 以及CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置5和6之外的氨基酸位置处包含一个或多个另外的置换。

[0186] 77. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0187] 78. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6和CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置13处包含突变。

[0188] 79. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7和15以及CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0189] 80. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置4和CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0190] 81. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6和CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7处包含突变。

[0191] 82. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6以及CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7和13处包含突变。

[0192] 83. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6和CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0193] 84. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7以及CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0194] 85. 如实施方式74-76中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其在CDR1 (SEQ ID N0:11) 的氨基酸位置6、CDR2 (SEQ ID N0:12) 的氨基酸位置7和13以及CDR3 (SEQ ID N0:13) 的氨基酸位置6处包含突变。

[0195] 86. 如实施方式74-85中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以相当的结合亲和力(K_d)与人血清白蛋白和食蟹猴血清白蛋白结合。

[0196] 87. 如实施方式74-86中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质与小鼠血清白蛋白结合的结合亲和力(K_d)比所述蛋白质对人和食蟹猴血清白蛋白的结合亲和力(K_d)弱约1.5倍至约20倍。

[0197] 88. 如实施方式74-87中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以约1nM至约100nM的人 K_d (hK_d)与人血清白蛋白结合,并且以1nM至100nM的食蟹猴 K_d (cK_d)与食蟹猴血清白蛋白结合。

[0198] 89. 如实施方式74-88中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为1nM至约5nM或约5nM至约10nM。

[0199] 90. 如实施方式74-89中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约2nM、约2nM至约3nM、约3nM至约4nM、约4nM至约5nM、约5nM至约6nM、约6nM至约7nM、约7nM至约8nM、约8nM至约9nM或约9nM至约10nM。

[0200] 91. 如实施方式74-90中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质以人 K_d (hK_d)与人血清白蛋白结合,并且以食蟹猴 K_d (cK_d)与食蟹猴血清白蛋白结合,并且其中 hK_d 与 cK_d 之比($hK_d:cK_d$)为20:1至1:2。

[0201] 92. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为精氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0202] 93. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为精氨酸,并且CDR2(SEQ ID NO:12)的氨基酸位置13被突变为谷氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0203] 94. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2(SEQ ID NO:12)的氨基酸位置7和15分别被突变为丙氨酸和亮氨酸,CDR3(SEQ ID NO:13)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0204] 95. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置4被突变为酪氨酸,并且CDR3(SEQ ID NO:13)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0205] 96. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2(SEQ ID NO:12)的氨基酸位置7被突变为苏氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0206] 97. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,CDR2(SEQ ID NO:12)的氨基酸位置7和13分别被突变为苏氨酸和谷氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约1nM至约5nM。

[0207] 98. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1(SEQ ID NO:11)的氨基酸位置6被突变为精氨酸,CDR3(SEQ ID NO:12)的氨基酸位置6被突变为赖氨酸,并且其中所述 hK_d 和所述 cK_d 为约5nM至约10nM。

[0208] 99. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中CDR1

1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸, CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7被突变为精氨酸, CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为缬氨酸, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0209] 100. 如实施方式74-91中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中CDR1 (SEQ ID NO:11) 的氨基酸位置6被突变为赖氨酸, CDR2 (SEQ ID NO:12) 的氨基酸位置7和13分别被突变为精氨酸和谷氨酸, 并且CDR3 (SEQ ID NO:13) 的氨基酸位置6被突变为缬氨酸, 并且其中所述hKd和所述cKd为约1nM至约5nM。

[0210] 101. 如实施方式74-100中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述蛋白质具有至少12小时、至少20小时、至少25小时、至少30小时、至少35小时、至少40小时、至少45小时、至少50小时或至少100小时的消除半衰期。

[0211] 102. 一种编码根据实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的多核苷酸。

[0212] 103. 一种包含如实施方式102所述的多核苷酸的载体。

[0213] 104. 一种用根据实施方式103所述的载体转化的宿主细胞。

[0214] 105. 一种药物组合物, 其包含(i)根据实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质、根据实施方式102所述的多核苷酸、根据实施方式103所述的载体或根据实施方式104所述的宿主细胞, 和(ii)药学上可接受的载体。

[0215] 106. 一种用于产生根据实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的方法, 所述方法包括在允许所述血清白蛋白结合蛋白质表达的条件下培养用包含编码根据实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质的核酸序列的载体转化或转染的宿主, 以及从培养物中回收并纯化所产生的蛋白质。

[0216] 107. 一种用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法, 其包括向有需要的受试者施用根据实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。

[0217] 108. 根据实施方式107所述的方法, 其中所述受试者是人。

[0218] 109. 如实施方式108所述的方法, 其中所述方法进一步包括与根据实施方式1-100中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质联合施用药剂。

[0219] 110. 一种多特异性结合蛋白质, 其包含根据实施方式1、实施方式33或实施方式74中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。

[0220] 111. 一种抗体, 其包含根据实施方式1、实施方式33或实施方式74所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。

[0221] 112. 一种多特异性抗体、双特异性抗体、sdAb、重链可变域、肽或配体, 其包含根据实施方式1、实施方式33或实施方式74所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质。

[0222] 113. 一种抗体, 其包含根据实施方式1、实施方式33或实施方式74所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质, 其中所述抗体为单结构域抗体。

[0223] 114. 如实施方式113所述的单结构域抗体, 其中所述抗体衍生自IgG的重链可变区。

[0224] 115. 一种多特异性结合蛋白质或抗体, 其包含根据实施方式1、实施方式33或实施

方式74中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质以及CD3结合域。

[0225] 116. 一种用于治疗或改善增生性疾病、肿瘤疾病、炎性疾病、免疫性病症、自身免疫病、感染性疾病、病毒性疾病、变态反应、寄生虫反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据实施方式111-115中任一项所述的多特异性抗体。

[0226] 117. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列。

[0227] 118. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列。

[0228] 119. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列。

[0229] 120. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列。

[0230] 121. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列。

[0231] 122. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列。

[0232] 123. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列。

[0233] 124. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。

[0234] 125. 如实施方式1-101中任一项所述的单结构域血清白蛋白结合蛋白质,其中所述蛋白质包含如SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列。

[0235] 实施例

[0236] 实施例1:与亲本抗HSA单结构域抗体具有等效的结合性质的抗HSA单结构域抗体变体的产生

[0237] 亲本抗HSA噬菌体的表征

[0238] 使用CD3作为阴性对照测定亲本抗HSA噬菌体与HSA抗原的特异性结合(图1),并测定抗HSA噬菌体与人、食蟹猴和小鼠血清白蛋白的交叉反应性(图2)。

[0239] 单置换HSA sdAb噬菌体文库

[0240] 对于三个CDR结构域中的每一个提供了单置换文库。单置换文库与HSA结合,然后在含有各种水平的HSA的缓冲液中洗涤。获得在第0小时和第24小时结合的噬菌体并计数。通过用缓冲液中的2.5mg/ml HSA洗涤24小时而选择的噬菌体用来产生两个独立的组合噬菌体文库。

[0241] 组合抗HSA文库

[0242] 在第一轮使用MSA作为选择靶标。在来自两个独立文库的组合噬菌体结合后,将孔洗涤24小时。在第二轮使用HSA作为选择靶标。在两个文库结合后,将孔在1mg/ml HSA中洗涤24小时。将通过PCR从第二轮选择获得的插入物亚克隆到ME10 His6表达载体中(6XHis序列被公开为SEQ ID NO:38)。挑选96个克隆,将DNA进行纯化、测序并转染到Expi293细胞中。

[0243] 结合亲和力测定

[0244] 使用上清液来使用Octet平台估计对HSA和CSA的Kd。基于相比于亲本sdAb的结合亲和力以及稳健的产生、聚集和稳定性特性,选择9个克隆用于进一步表征(图3)。

[0245] 实施例2:包含抗HSA单结构域抗体的三特异性抗体的药代动力学

[0246] 使用实施例1的抗HSA单结构域抗体制备三特异性抗体,在动物研究中评估该三特异性抗体的消除半衰期。

[0247] 将所述三特异性抗体以0.5mg/kg团注肌肉内施用于食蟹猴。另一个食蟹猴组接受具有CD3和CD20结合域但缺乏HSA结合域的在大小上相当的蛋白质。第三组和第四组分别接受具有CD3和HSA结合域的抗体和具有CD20和HSA结合域的蛋白质,并且两者的大小都与所述三特异性抗体相当。每个测试组由5只猴子组成。在指定的时间点采取血清样品,连续稀释,并且使用与CD3和/或CD20的结合ELISA来确定蛋白质的浓度。

[0248] 使用试验品血浆浓度进行药代动力学分析。当针对给药后时间绘图时,每个试验品的组平均血浆数据符合多指数曲线。利用团注输入以及分布和消除阶段的一级速率常数,按照标准的二室模型拟合这些数据。对于静脉内给药的数据的最佳拟合的一般方程是: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$,其中c(t)是在时间t时的血浆浓度,A和B是Y轴上的截距,而 α 和 β 分别是分布和消除阶段的表观一级速率常数。 α 阶段是清除的初始阶段,并且反映蛋白质向动物的所有细胞外液中的分布,而衰变曲线的第二或 β 阶段部分代表真实的血浆清除。拟合这样的方程的方法是本领域公知的。例如, $A = D/V(\alpha - k_{21}) / (\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21}) / (\alpha - \beta)$,并且 α 和 β (对于 $\alpha > \beta$)是二次方程 $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ 的根,使用以下估计参数:V=分布体积,k₁₀=消除速率,k₁₂=从隔室1到隔室2的转移速率,k₂₁=从隔室2到隔室1的转移速率,并且D=施用剂量。

[0249] 数据分析:使用KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V.3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.) 制作浓度相对于时间的曲线图。报告为小于可报告值(LTR)的值不包括在PK分析中,并且不以图形方式表示。使用WinNonlin软件(WinNonlin® Professional V.3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, Calif.)通过隔室分析确定药代动力学参数。如在Ritschel W A和Kearns G L, 1999, IN:Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 第5版, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D.C. 中所述计算药代动力学参数。

[0250] 与缺乏HSA结合域的蛋白质相比,预计实施例1的包含抗HSA单结构域抗体的三特异性抗体具有改善的药代动力学参数,如消除半衰期增加。

[0251] 实施例3:抗HSA单结构域抗体变体的热稳定性

[0252] 蛋白质的疏水暴露温度(T_h)对应于峰值染料荧光的拐点的导数,并且已知与熔解温度(T_m)—蛋白质稳定性的量度—相关。该研究的目的是评估几种抗HSA单结构域抗体变体的 T_h 。

[0253] 蛋白质产生

[0254] 将抗huALB单结构域抗体的序列克隆到pcDNA3.4 (Invitrogen) 中,前方是前导序列,后方是6x组氨酸标签 (SEQ ID NO:38)。将Expi293F细胞 (Life Technologies A14527) 悬浮保持在最佳生长瓶 (Optimum Growth Flasks) (Thomson) 中,密度为在Expi 293培养基

中0.2-8x 1e6个细胞/ml。根据Expi293表达系统试剂盒(Life Technologies,A14635)方案,将纯化的质粒DNA转染到Expi293F细胞中,并在转染后保持4-6天。通过亲和色谱法和脱盐色谱法部分纯化条件培养基。用Amicon Ultra离心过滤单元(EMD Millipore)浓缩抗huCD3e scFv蛋白质,将其施加到Superdex 200尺寸排阻培养基(GE Healthcare)中并溶解在含有赋形剂的中性缓冲液中。通过SDS-PAGE和分析尺寸排阻色谱法(SEC)评估级分合并和最终纯度。使用SpectraMax M2(Molecular Devices)和UV透明的96孔板(Corning3635)在280nm处测定纯化的蛋白质溶液的吸光度,并从摩尔消光系数计算它们的浓度。

[0255] 差示扫描荧光法

[0256] 将纯化的抗HSA单结构域抗体蛋白质稀释到0.2至0.25mg/ml,连同含有赋形剂的中性缓冲液中0.15% DMSO终浓度的5x SYPRO橙染料(Life Technologies S6651)一起放入MicroAmp EnduraPlate光学微板和胶膜(Applied Biosystems 4483485和4311971)中。将含有稀释的蛋白质和染料混合物的板装载到ABI 7500快速实时PCR仪(Applied Biosystems)中,并使其经受25°C至95°C的多步热梯度。热梯度包括在每一摄氏度保持两分钟,在500nm处激发并用ROX过滤器收集发射。图4中呈现了纯化的抗HSA单结构域抗体蛋白质的T_h(以摄氏度为单位)。

[0257] 实施例4:抗HSA单结构域抗体变体在暴露于低pH时的二聚化相对倾向

[0258] 如上所述,在Expi293-F细胞中表达抗HSA单结构域抗体蛋白。将每种变体的条件培养基施加到填充在柱中的蛋白A琼脂糖(GE Healthcare,17519901)中,用TRIS缓冲盐水充分洗涤,用pH 3的0.05%(体积/体积)乙酸洗脱,在室温下保持至多10分钟,然后部分中和至pH 5,随后使用Sephadex G25柱(GE Healthcare 17058401)脱盐至含有赋形剂的中性缓冲液中。

[0259] 如实施例3中所述,通过280nm处的吸光度确定纯化的抗HSA单结构域抗体变体的浓度。通过SDS-PAGE和分析SEC评价纯化的蛋白质,该分析SEC使用溶于含有溶剂的磷酸盐缓冲液中的Yarra2000SEC柱(Phenomenex 00H-4512-E0)在具有Chemstation软件(Agilent)的1200LC上进行。将对应于二聚体和单体的峰进行手动积分,并且将值呈现于图5中。

<u>SEQ</u> <u>ID</u> <u>NO:</u>	<u>描述</u>	<u>氨基酸序列</u>
1	具有变异位置的 CDR1	GFX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ FGMS
2	具有变异位置的 CDR2	SISGSGX ₅ X ₆ TLYAX ₇ SX ₈ K
3	具有变异位置的 CDR3	GGSLX ₉ X ₁₀
4	抗 HSA sdAb 克隆 6C	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSRFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPDETA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
5	抗 HSA sdAb 克隆 7A	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGADTLYADSLKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPDETA VYYCTIGGSLSKSSQGTLVTVSS

[0261]	6	抗 HSA sdAb 克隆 7G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTYSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLKSSQGTLTVSS
	7	抗 HSA sdAb 克隆 8H	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSS
	8	抗 HSA sdAb 克隆 9A	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSRFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLKSSQGTLTVSS
	9	抗 HSA sdAb 克隆 10G	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGTLTVSS
	10	野生型抗 HSA	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSS
	11	野生型抗 HSA CDR1	GFTFSSFGMS
	12	野生型抗 HSA CDR2	SISGSGSDTLYADSVK
	13	野生型抗 HSA CDR3	GGSLSR
	14	CDR1 变体 1	GFTFSRFGMS
	15	CDR1 变体 2	GFTFSKFGMS
	16	CDR1 变体 3	GFTYSSFGMS
	17	CDR2 变体 1	SISGSGADTLYADSLK
	18	CDR2 变体 2	SISGSGTDTLYADSVK
	19	CDR2 变体 3	SISGSGRDTLYADSVK
	20	CDR2 变体 4	SISGSGSDTLYAESVK
	21	CDR2 变体 5	SISGSGTDTLYAESVK
	22	CDR2 变体 6	SISGSGRDTLYAESVK
	23	CDR3 变体 1	GGSLSK
	24	CDR3 变体 2	GGSLSV
	25	抗 HSA sdAb 克隆 6CE	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSRFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAESVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSS

[0262]	26	抗 HSA sdAb 克隆 8HE	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGTDTLYAESVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLRSSQGTLVTVSS
	27	抗 HSA sdAb 克隆 10GE	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDITAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
	28	示例性接头序列	(GS)n
	29	示例性接头序列	(GGS)n
	30	示例性接头序列	(GGGS)n
	31	示例性接头序列	(GGSG)n
	32	示例性接头序列	(GGSGG)n
	33	示例性接头序列	(GGGGS)n
	34	示例性接头序列	(GGGGG)n
	35	示例性接头序列	(GGG)n
	36	示例性接头序列	(GGGGS)3
	37	示例性接头序列	(GGGGS)4
	38	6X 组氨酸	HHHHHH

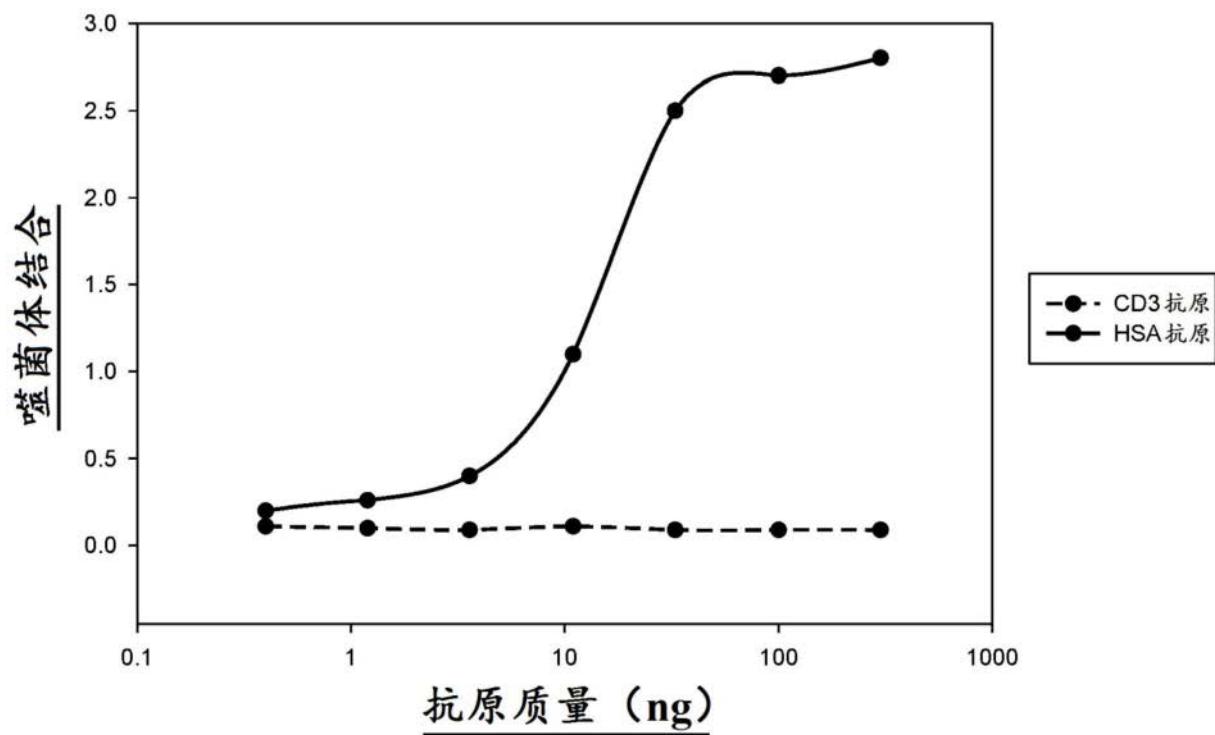


图1

HSA噬菌体的交叉反应性

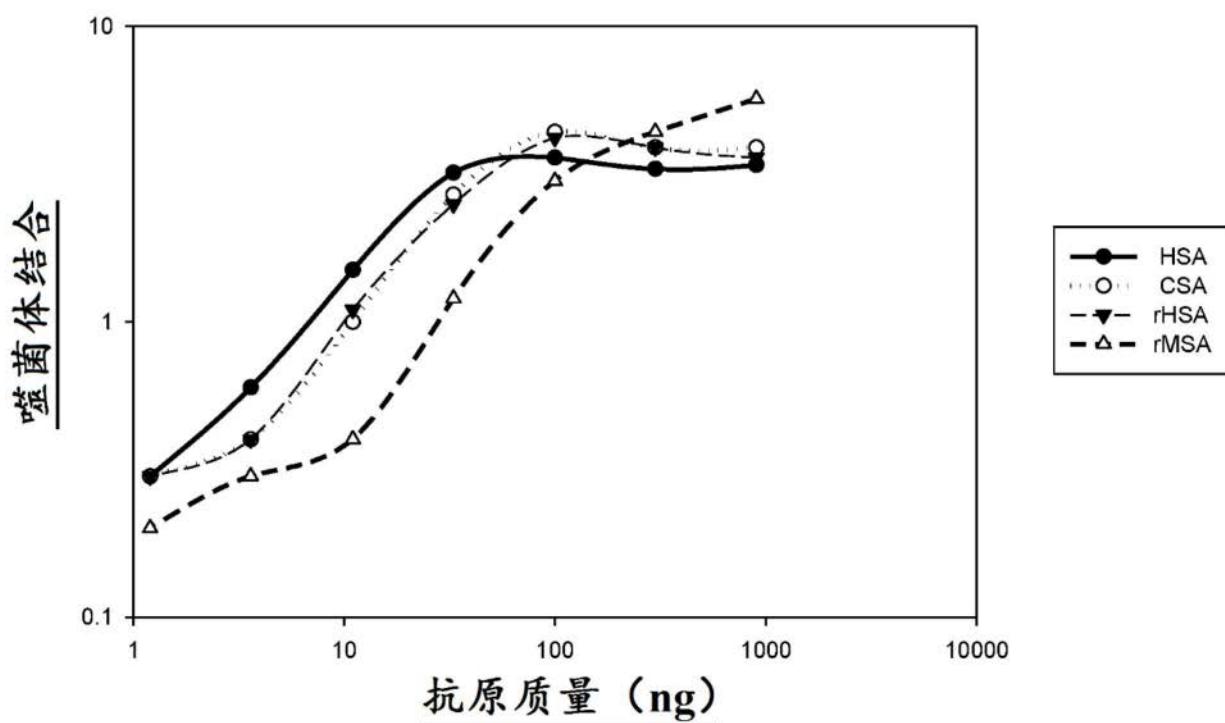


图2

<u>克隆</u>	<u>hK_d</u>	<u>cK_d</u>	<u>mK_d</u>
野生型	4 nM	4.1 nM	42.5 nM
6C	2.3 nM	2.4 nM	17.3 nM
7A	1.9 nM	1.7 nM	12.3 nM
7G	3.2 nM	3.6 nM	32.9 nM
8H	2.7 nM	2.6 nM	14.5 nM
9A	6.0nM	7.5nM	
10G	2.2 nM	2.3 nM	15.7 nM
6CE	2.1 nM	2.2 nM	16.8 nM
8HE	2.1 nM	2.0 nM	16.7 nM
10GE	1.6 nM	1.6 nM	16.1 nM

图3

<u>抗HSA单结构域 抗体变体</u>	<u>T_h(°C)</u>
野生型	63
6C	64.9
7A	59.1
7G	57.3
8H	66.2
10G	70.7
6CE	64
8HE	65.9
10GE	71.1

图4

<u>抗HSA单结构 域抗体变体</u>	<u>%二聚体</u>	<u>%单体</u>
野生型	3.9	96.1
6C	6.1	93.9
7A	35.1	64.9
7G	22	78
8H	5.5	94.5
10G	1.3	98.7

图5