



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119032105 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 26

(21) 申请号 202380032234.1

(22) 申请日 2023.05.05

(66) 本国优先权数据

202210491720.7 2022.05.07 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/092214 2023.05.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/216981 ZH 2023.11.16

(71) 申请人 北京拓界生物医药科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园医
科路9号院4号楼7层

(72) 发明人 杜延平 王雷 刘潇 高红

申晨曦 张琳爽 姜鹏

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(54) 发明名称

松弛素或类似物的融合蛋白及其医药用途

(57) 摘要

本公开涉及松弛素或类似物的融合蛋白及其医药用途。具体而言,本公开涉及一种包含松弛素或其类似物与血清白蛋白结合结构域的融合蛋白,及其用于治疗疾病(例如,心衰)的医药用途。以及,本公开涉及一种血清白蛋白结合分子,所述结合分子包含能结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域(如VHH),具有良好的血浆稳定性,可用于延长药物的血浆半衰期。

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 11 月 16 日 (16.11.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/216981 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/092214

(22) 国际申请日: 2023 年 5 月 5 日 (05.05.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210491720.7 2022年5月7日 (07.05.2022) CN

(71) 申请人: 北京拓界生物医药科技有限公司(BEIJING TUO JIE BIOPHARMACEUTICAL CO. LTD.) [CN/CN]; 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。

(72) 发明人: 杜延平(DU, Yanping); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。王雷(WANG, Lei); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。刘潇(LIU, Xiao); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。高红(GAO, Hong); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。申晨曦(SHEN, Chenxi); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。张琳爽(ZHANG, Linshuang); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。姜鹏(JIANG, Peng); 中国北京市昌平区生命科学园医科路9号院4号楼7层, Beijing 102206 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: FUSION PROTEIN OF RELAXIN OR ANALOGUE AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: 松弛素或类似物的融合蛋白及其医药用途

(57) Abstract: The present disclosure relates to a fusion protein of relaxin or an analogue and the medical use thereof. Specifically, the present disclosure relates to a fusion protein comprising relaxin or an analogue thereof and a serum albumin binding domain, and the medical use thereof for treating diseases (for example, heart failure). Moreover, the present disclosure relates to a serum albumin binding molecule, which comprises an immunoglobulin single variable domain (for example, VHH) capable of binding to serum albumin, has good plasma stability, and can be used for prolonging the plasma half-life of a drug.

(57) 摘要: 本公开涉及松弛素或类似物的融合蛋白及其医药用途。具体而言, 本公开涉及一种包含松弛素或其类似物与血清白蛋白结合结构域的融合蛋白, 及其用于治疗疾病(例如, 心衰)的医药用途。以及, 本公开涉及一种血清白蛋白结合分子, 所述结合分子包含能结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域(如VHH), 具有良好的血浆稳定性, 可用于延长药物的血浆半衰期。

WO 2023/216981 A1

松弛素或类似物的融合蛋白及其医药用途

本公开要求 2022 年 5 月 7 日提交的中国专利申请(申请号 CN202210491720.7) 的优先权。

5

技术领域

本公开属于生物医药领域，具体的，涉及一种包含松弛素或其类似物与血清白蛋白结合结构域的融合蛋白，及其用于治疗疾病（例如，心衰）的医药用途。以及，涉及一种血清白蛋白结合分子，所述结合分子包含能结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域（如 VHH），具有良好的血浆稳定性，可用于延长药物的血浆半衰期。

10

背景技术

松弛素 (relaxin) 作为孕期重要的激素于 1926 年由 Frederick Hisaw 首次发现，它是一种多肽类激素，属于胰岛素超家族。松弛素在人类中包含 7 个多肽成员，包括松弛素 1 (RLN-1 或 H1)，松弛素 2 (RLN-2 或 H2)，松弛素 3 (RLN-3 或 H3)。这些松弛素在一级序列上同源性低，却具有相似的三级结构。其中松弛素 2 是人体循环中主要的松弛素，由 RLN2 基因编码。松弛素以前体激素（A、B 链之间通过 C 肽进行线性连接）形式表达，在体内经过内切酶水解去除 C 肽，释放成熟的松弛素。天然成熟的松弛素 2 含有 A、B 两条多肽链，他们通过两个链间二硫键进行共价链接形成异二聚体，A 链内部还有一对二硫键 (Schwabe, et al. Science. 1977,197, 914-915)。

15

20

25

30

松弛素 2 是一种多效性激素，其信号传导主要通过受体 RXFP1（又称 LGR7）实现，RXFP1 是一种 G 蛋白偶联受体 (GPCR)，它富含亮氨酸重复单元，RXFP2（又称 LGR8）与松弛素 2 也有结合。松弛素 2 和受体结合可激活多种级联信号，包括激活 cAMP 和磷酸肌醇 3-激酶通路，激活一氧化氮信号通路等。松弛素 2 与受体结合还可以抑制 Smad2/3 的磷酸化，从而抑制细胞外基质，胶原蛋白的生成。研究表明松弛素 2 具有促进血管舒张，抗炎，降低血管阻力和增加动脉顺应性，促进血管生成和重塑，调节细胞外基质，抗纤维化等生理作用，对心力衰竭和心肌纤维化发挥有益的作用 (Chiara Sassoli, et al. Current Molecular Medicine 2022, 22, 196-208)。

35

松弛素 2 的半衰期 ($t_{1/2}$) 很短，天然松弛素 2 在体内的半衰期 ($t_{1/2}$) 只有几分钟，这为松弛素作为治疗药物带来挑战。已经上市的天然重组松弛素 2 (serelaxin) 在临床上需要通过连续静脉输注治疗，这造成患者不便，也表现出效力短暂。研究者对松弛素 2 进行改造以提高其半衰期 ($t_{1/2}$)，例如通过化学偶联的方式引入 PEG、脂肪酸链等，或者通过重组的方法融合半衰期延长的蛋白，多肽或者 Fc 等。

白蛋白是血浆中含量最为丰富的一种蛋白，占血浆蛋白的 40-60%。白蛋白可以结合许多内源和外源性配体，是体内天然的“多功能载体”。白蛋白和免疫球蛋白 G (IgG) 相似，在体内的保留时间比较长，有报道白蛋白在人体内的半衰期大约有 19-21 天 (Berson, S.A. et al, J. Clin. Invest. 1953, 32, 746-768)，这主要是因为：
5 白蛋白分子量为 66.5KD，而且其分子流体力学半径超过了肾小球过滤的阈值 3.5-6 nm (Lin, J.H. Curr. Drug Metab. 2009, 10, 661-691)；白蛋白可以和 FcRn 结合，并且这种结合具有 pH 依赖性的特点，内吞进入内涵体后，在内涵体酸性 pH 下 (pH5.5 或者 6.0) 两者结合比较强，从而保护了白蛋白免于溶酶体的降解，而随着 FcRn 转运到细胞表面，在中性的生理 pH 条件下，白蛋白从 FcRn 上解离，从而实现再
10 循环，这一原理类似于 IgG 的再循环，而且白蛋白和 IgG 分别跟 FcRn 上两个独立的位点结合，互不影响。

本公开提供了新结构的结合血清白蛋白的单域抗体，其能够显著提高药物活性成分的体内半衰期。例如，当本公开的结合血清白蛋白的单域抗体与作为活性成分的松弛素或其类似物融合为融合蛋白后，能够显著提高松弛素或其类似物的
15 体内半衰期。本公开提供的融合蛋白活性高，稳定性高，便于生产，具有优异的临床应用潜力。

发明内容

本公开提供了一种血清白蛋白结合分子，其包含特异性结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域，具有良好的血浆稳定性，可用于延长药物的血浆半衰期。
20

血清白蛋白结合分子

本公开提供血清白蛋白结合分子。

一些实施方案中，血清白蛋白结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如下 1) -5) 任一项所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3：
25

- 1) 如 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；
- 2) 如 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；
- 3) 分别如 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；
- 30 4) 分别如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；
- 5) CDR1 为 X_1SCX_2G (SEQ ID NO: 64)，其中， X_1 为 T 或 N， X_2 为 M 或 L；

CDR2 为 $X_3IYX_4VGGSTFYX_5X_6SVKG$ (SEQ ID NO: 58)，其中， X_3 为 S 或 T， X_4 为 T 或 M， X_5 为 T 或 A， X_6 为 N 或 D；

35 CDR3 为 $GSPARCX_7X_8RDPTTFX_9Y$ (SEQ ID NO: 59)，其中， X_7 为 R 或 L， X_8 为 L 或 R， X_9 为 D 或 N；

其中，上述 X₁ 至 X₉ 中的一个或多个可以为可选氨基酸的保守氨基酸突变。

上述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，例如，所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，血清白蛋白结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含上述 1) -5) 中 CDR1、CDR2、CDR3 中的任意一个或任意几个（例如，2 或 3）的组合。

一些实施方案中，血清白蛋白结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，其包含的 CDR1 与前述任一 CDR1 相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变；和/或，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的 CDR2 与前述任一 CDR2 相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变；和/或，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含的 CDR3 与前述任一 CDR3 相比，具有 0、1、2、3、4 或 5 个氨基酸突变。一些具体的实施方案中，CDR1、CDR2 和/或 CDR3 中的氨基酸突变为保守性取代。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域为骆驼源的。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域为经过以下任一项改造的：人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺、降低抗体聚集、降低抗体异构化、或其组合。

一些实施方案中，前述人源化的免疫球蛋白单一可变结构域中的框架区源自人重链可变区种系基因 IGHV3-23 或 IGVH3-66。

一些具体实施方案中，前述人源化的免疫球蛋白单一可变结构域在以下位置中的至少一处包含氨基酸突变：第 20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 和 84 位（基于 EU 编号系统的位置）；

例如，包含选自以下的至少一种氨基酸突变：20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 或 84P；

例如，包含选自如下任一的氨基酸突变组合：

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G；
L20V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G；
A23V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G；
F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S74A；
F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、L78V；
F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S49A；
F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、R83Q、A84P；
F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P；
S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P；或
S30L、V37F、G44E、L45R、W47G。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含或为 SEQ ID NO: 6 或 7 任一或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。一些实施方案中，所述免

疫球蛋白单一可变结构域是骆驼源的。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含或为 SEQ ID NO: 18-27 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域是人源化的。

本公开中，“至少 90%（序列）同一性”涵盖至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100%（序列）同一性；“至少 80%（序列）同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100%（序列）同一性、以及前述任意两个数值之间的范围，包括整数和小数。

一些实施方案中，前述本公开提供的血清白蛋白结合分子中的免疫球蛋白单一可变结构域包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3 和四个 FR，按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

一些实施方案中，前述本公开提供的血清白蛋白结合分子是结合血清白蛋白的抗体或其抗原结合片段，或包含所述抗体或其抗原结合片段的缀合物、融合蛋白。

一些实施方案中，前述抗体为骆驼抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体。

一些实施方案中，前述抗原结合片段为 sdAb 或双特异性抗体、多特异性抗体。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域是 VHH。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域是人源化的 VHH。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域是经亲和力成熟的 VHH。

一些实施方案中，提供血清白蛋白结合分子，其包含一个或多个（例如 2、3、4、5、6、7、8 个）前述免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以是相同或不同的，任意两个免疫球蛋白单一可变结构域之间可以直接连接或通过连接子连接。

在一些实施方案中，提供血清白蛋白结合分子，其与前述本公开的免疫球蛋白单一可变结构域结合或竞争结合相同的表位。

在一些实施方案中，提供血清白蛋白结合分子，其阻断前述本公开的免疫球蛋白单一可变结构域与血清白蛋白的结合。

在一些实施方案中，提供血清白蛋白结合分子，其与血清白蛋白的结合被前述本公开的免疫球蛋白单一可变结构域阻断。

一些实施方案中，前述本公开提供的血清白蛋白结合分子还包含免疫球蛋白的 Fc 区，例如选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 区；或者组氨酸标签，例如 (His)₆ 标签或 (His)₈ 标签。

可用于本公开的 Fc 区可以来自不同亚型的免疫球蛋白，例如，IgG（例如，IgG1、

IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM。在一些实施方案中，Fc 区包括恒定区的铰链区或部分铰链区、CH2 区和 CH3 区。

一些实施方案中，前述免疫球蛋白单一可变结构域与 Fc 区或组氨酸标签之间可以由连接子连接。所述连接子可以是长度为 1-20 个或更多个氨基酸、无二级以上结构的非功能性氨基酸序列。例如，所述连接子是柔性连接子，例如 G₄S (SEQ ID NO: 67)、GS、GAP、(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 68)、(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 69)、(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 70)、(G₄S)₅ (SEQ ID NO: 71)、ASGS、G₃S 或其组合。在一些实施方案中，连接子是 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 72)。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子包含或为 SEQ ID NO: 15 或 16 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述血清白蛋白结合分子中的免疫球蛋白单一可变结构域是特异性结合血清白蛋白的，所述血清白蛋白可以是啮齿类动物血清白蛋白（例如小鼠血清白蛋白 (mSA)），或灵长类动物血清白蛋白（例如猕猴血清白蛋白 (cySA)、人血清白蛋白 (HSA)）。一些具体实施方案中，所述血清白蛋白是 HSA。

一些替代方案中，本公开的血清白蛋白结合分子可以包含前述任一的完整的免疫球蛋白单一可变结构域；也可以包含前述任一的免疫球蛋白单一可变结构域的功能部分或其变体，例如 CDR3、CDR3-FR4、CDR2-FR3-CDR3、CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3。

在一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域的功能部分的变体可以是保留了 CDR3、CDR3-FR4、CDR2-FR3-CDR3、CDR2-FR3-CDR3-FR4、FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、或 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 的血清白蛋白结合功能且与之具有至少 80%、至少 90% 序列同源性的多肽，例如可以是保留了 CDR3 的血清白蛋白结合功能并与之具有一定序列同源性的多肽，例如与上述任一 CDR3 具有至少 80%、至少 90% 序列同源性的多肽。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子中，所述免疫球蛋白单一可变结构域可以作为用于延长半衰期的载体与任意其他大分子或小分子化合物共价或非共价连接。

一些实施方案中，本公开的血清白蛋白结合分子包含一种或更多种治疗剂或诊断剂，其中所述治疗剂或诊断剂与所述免疫球蛋白单一可变结构域共价或非共价连接。

一些实施方案中，所述治疗剂或诊断剂选自治疗性或诊断性蛋白质、核酸和小分子化合物。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子或其中的免疫球蛋白单

一可变结构域以 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，例如 $\leq 2 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $\leq 1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $\leq 9 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 7 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9} \text{M}$ 、或 $\leq 1 \times 10^{-9} \text{M}$ ，或 $\leq 9 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 8 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 7 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $\leq 1 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 K_D 值结合血清白蛋白，例如人血清白蛋白。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子对人血清白蛋白的亲合力 K_D 值为 10nM-100nM，例如 10nM-50nM。所述 K_D 值的检测方法是本领域常用的，例如为本公开实施例 4 中所提供的。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子具有选自以下的至少一项的活性：

(a) 以 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，例如， $\leq 1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 K_D 值结合 HSA；

(b) 体内和/或体外未检测到阻断血清白蛋白与 FcRn 的结合，所述血清白蛋白例如为 HSA，所述 FcRn 例如为人 FcRn；

(c) 当包含治疗剂或诊断剂时，延长所述治疗剂或诊断剂的血浆半衰期。

一些实施方案中，本公开提供的血清白蛋白结合分子保留了单域抗体（例如 VHH）的有利特性，并在个体循环中具有延长的寿命。因此，这样的分子能够在受试者的血清中循环数天，从而减少了治疗的频率、给受试者带来的不便并降低了治疗成本。

一些实施方案中，本公开的血清白蛋白结合分子的半衰期可以由分子中存在的特异性结合血清蛋白的单一可变结构域的数目来控制。

一些实施方案中，本公开的血清白蛋白结合分子在体内和/或体外促进血清白蛋白与 FcRn 的结合。

融合蛋白

本公开提供融合蛋白，其包含血清白蛋白结合结构域和松弛素或其类似物，所述血清白蛋白结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域为前述本公开的任一免疫球蛋白单一可变结构域。

一些实施方案中，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如下 1) -5) 任一项所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

1) 如 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

2) 如 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

3) 如 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

4) 如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

5) CDR1 为 $X_1\text{SCX}_2\text{G}$ (SEQ ID NO: 64)，其中， X_1 为 T 或 N， X_2 为 M 或 L；

CDR2 为 $X_3\text{IYX}_4\text{VGGSTFYX}_5\text{X}_6\text{SVKG}$ (SEQ ID NO: 58)，其中， X_3 为 S 或 T， X_4 为 T 或 M， X_5 为 T 或 A， X_6 为 N 或 D；

CDR3 为 GSPARCX₇X₈RDPTTFX₉Y (SEQ ID NO: 59), 其中, X₇ 为 R 或 L, X₈ 为 L 或 R, X₉ 为 D 或 N;

其中, 上述 X₁ 至 X₉ 中的一个或多个可以为其可选氨基酸的保守氨基酸突变。

上述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的,

5 例如, 所述 CDR 是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中, 前述免疫球蛋白单一可变结构域经过以下任一项改造的: 骆驼源, 或人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺、降低抗体聚集和/或降低抗体异构化、或其组合。

10 一些实施方案中, 所述人源化的免疫球蛋白单一可变结构域中的框架区源自人重链可变区种系基因 IGHV3-23 或 IGVH3-66。

一些具体实施方案中, 所述人源化的免疫球蛋白单一可变结构域在以下位置中的至少一处包含氨基酸突变: 第 20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 和 84 位 (基于 EU 编号系统的位置);

15 例如, 包含选自以下的至少一种氨基酸突变: 20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 或 84P;

例如, 包含选自如下任一的氨基酸突变组合:

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G;

L20V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G;

A23V、F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G;

20 F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S74A;

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、L78V;

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、S49A;

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、R83Q、A84P;

F27N、F29Y、S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P;

25 S30L、V37F、G44E、L45R、W47G、A84P; 或

S30L、V37F、G44E、L45R、W47G。

一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含或为 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

30 一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含或为 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, 所述免疫球蛋白单一可变结构域是 VHH, 例如骆驼源、人源化的 VHH。

一些实施方案中, 融合蛋白中的松弛素或其类似物包含 A 链和 B 链。

35 一些实施方案中, A 链具有 SEQ ID NO: 31、50、52、54、56 任一所示的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 31、50、52、54、56 任一具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列, 或较之 SEQ ID NO: 31、50、52、54、56 任一具有一个或多个氨

氨基酸添加、缺失、插入或置换的氨基酸序列，例如 A 链可以是 SEQ ID NO: 31 或 50 在 N 端缺失 1、2、3 或 4 个氨基酸，或添加 1、2、3、4 个氨基酸。

一些实施方案中，B 链具有 SEQ ID NO: 32、51、53、55、57 任一所示的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 32、51、53、55、57 任一具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，或较之 SEQ ID NO: 32、51、53、55、57 任一具有一个或多个氨基酸添加、缺失、插入或置换的氨基酸序列，例如 B 链可以是 SEQ ID NO: 51 在 N 端缺失 1 个氨基酸。

一些实施方案中，所述松弛素或其类似物的 A 链和 B 链是上述的任意组合。

一些实施方案中，所述松弛素或其类似物包含如下 1) -7) 中任一项的 A 链和 B 链组合：

- 1) SEQ ID NO: 31 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 32 所示的 B 链；
- 2) SEQ ID NO: 50 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 51 所示的 B 链；
- 3) SEQ ID NO: 52 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 53 所示的 B 链；
- 4) SEQ ID NO: 54 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 55 所示的 B 链；
- 5) SEQ ID NO: 31 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 53 所示的 B 链；
- 6) SEQ ID NO: 52 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 32 所示的 B 链；
- 7) SEQ ID NO: 56 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 57 所示的 B 链。

>人 RLN2 A 链

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO: 31)

>人 RLN2 B 链 (delB1)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO: 32)

>人 RLN1 A 链

PYVALFEKCCLIGCTKRSLAKYC (SEQ ID NO: 50)

>人 RLN1 B 链

VAAKWKDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO: 51)

>人 RLN2 A 链 (delA1-4)

ALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO: 52)

>人 RLN2 B 链

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO: 53)

>人 RLN3 A 链

DVLAGLSSSCCKWGCSKSEISLC (SEQ ID NO: 54)

>人 RLN3 B 链

RAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRW (SEQ ID NO: 55)

>人 RLN2 A 链 (Z₁₀LYS)

X₁₀LYSALANKCCHVGCTKRSLARFC, 其中, X₁₀ 为 Q 或 D (SEQ ID NO: 56)

>人 RLN2 B 链 (E 突变为 D)

DSWMEEVIKLCGRDLVRAQIAICGMSTWS

(SEQ ID NO: 57)。

一些实施方案中, 所述融合蛋白包含 1 个前述免疫球蛋白单一可变域和 1 个前述松弛素或其类似物。一些实施方案中, 所述融合蛋白包含 1 个前述免疫球蛋白单一可变域和 2 个前述松弛素或其类似物。一些实施方案中, 所述融合蛋白包含 2 个前述免疫球蛋白单一可变域和 1 个前述松弛素或其类似物。一些实施方案中, 所述融合蛋白包含 2 个前述免疫球蛋白单一可变域和 2 个前述松弛素或其类似物。

一些实施方案中, 所述融合蛋白包含如式 (I) 至式 (IV) 任一所示或任意组合的多肽:

B-L₁-A-L₂-VHH 式 (I)

A-L₁-B-L₂-VHH 式 (II)

VHH-L₂-B-L₁-A 式 (III)

VHH-L₁-A-L₁-B 式 (III)

其中, A 是前述任一的松弛素 A 链, B 是前述任一的松弛素 B 链, L₁ 和 L₂ 是连接子, 可以各自独立地存在或不存在。

一些实施方案中, L₁ 包含选自 (GGGGQ)_n (SEQ ID NO: 73)、(GGGQ)_n、(GGGGS)_n、(PGPQ)_n 和 (PGPA)_n 的氨基酸序列, 所述 n 选自 1-10 的整数, 例如 3、4、5、6、7、8。

一些实施方案中, L₁ 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, L₂ 包含 (G_xS_y)_z 的氨基酸序列, 所述 X、Y、Z 独立的选自 1-10 的整数, 例如 L₂ 是 (GGGGS)_z, 所述 Z 选自 1-10 的整数, 例如 3、4、5、6、7、8。

一些实施方案中, L₂ 包含 SEQ ID NO: 49 所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, L₂ 包含选自 KR、KRKPTGYGSRKKR (SEQ ID NO: 65)、KRKPTGYGSRKR (SEQ ID NO: 66)、KRGGGPRR (SEQ ID NO: 60)、KRGGGPKR (SEQ ID NO: 61)、KRKPTGYGSKR (SEQ ID NO: 62)、KRSLKR (SEQ ID NO:

63) 任一或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, 所述融合蛋白是单链蛋白。

一些实施方案中, 所述融合蛋白是多聚体, 例如二聚体蛋白。

以下给出示例性的实施方案:

融合蛋白, 包含血清白蛋白结合结构域和松弛素或其类似物, 所述血清白蛋白结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或如 SEQ ID NO:

11、12 和 13 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；所述松弛素或其类似物包含如 SEQ ID NO: 31、32 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 50、51 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 52、53 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 54、55 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 31、53 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 52、32 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 56、57 所示的 A 链和 B 链。

融合蛋白，包含血清白蛋白结合结构域和松弛素或其类似物，所述血清白蛋白结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含如 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

所述松弛素或其类似物包含如 SEQ ID NO: 31、32 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 50、51 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 52、53 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 54、55 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 31、53 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 52、32 所示的 A 链和 B 链，或如 SEQ ID NO: 56、57 所示的 A 链和 B 链。

一些实施方案中，提供融合蛋白，包含如 SEQ ID NO: 36-43 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白对 RXFP1 受体的结合亲和力与天然人松弛素 2 (SEQ ID NO: 31 和 53) 的结合亲和力相当。另一些实施方案中，本公开的融合蛋白对 RXFP1 受体的结合亲和力小于与天然人松弛素 2 (SEQ ID NO: 31 和 53) 的结合亲和力。另一些实施方案中，本公开的融合蛋白对 RXFP1 受体的结合亲和力大于与天然人松弛素 2 (SEQ ID NO: 31 和 53) 的结合亲和力。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白较之天然人松弛素 2 (SEQ ID NO: 31 和 53) 显著增长，例如具有体内血清白蛋白相当的体内半衰期 ($t_{1/2}$)，不同种属中从十几个小时到十几天。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白以 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，例如， $\leq 1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 K_D 值结合 HSA。

一些实施方案中，本公开的融合蛋白在体内和/或体外不阻断血清白蛋白与 FcRn 的结合。

本公开的融合蛋白涵盖其药学上可接受的盐。

多核苷酸和载体

一些实施方案中，提供多核苷酸，其编码本公开的血清白蛋白结合分子。

一些实施方案中，提供多核苷酸，其编码本公开的融合蛋白。

所述多核苷酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案，本公开的多核苷酸是分离的多核苷酸。

本公开的多核苷酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提

供血清白蛋白结合分子体外和/或体内（即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中）表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的多核苷酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件（例如启动子、增强子、终止子等）。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的血清白蛋白结合分子的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的多核苷酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式（例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术）制备或获得，和/或可从适合的自然来源加以分离。

10 宿主细胞

一些实施方案中，提供宿主细胞，其表达或能够表达一种或多种本公开的血清白蛋白结合分子、和/或含有本公开的多核苷酸或载体的重组宿主细胞。

一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株（例如大肠杆菌（*Escherichia coli*）菌株、变形杆菌属（*Proteus*）菌株及假单胞菌属（*Pseudomonas*）菌株）及革兰氏阳性细菌菌株（例如芽孢杆菌属（*Bacillus*）菌株、链霉菌属（*Streptomyces*）菌株、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）菌株及乳球菌属（*Lactococcus*）菌株）的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属（*Trichoderma*）、脉孢菌属（*Neurospora*）及曲菌属（*Aspergillus*）的物种的细胞；或者包括酵母属（*Saccharomyces*）（例如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*））、裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）（例如粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*））、毕赤酵母属（*Pichia*）（例如巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）及嗜甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*））及汉森酵母属（*Hansenula*）的物种的细胞。

示例性地，哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

生产或制备方法

30 本公开提供制备本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白的方法，其包括：

- 在允许表达本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白的条件下培养本公开的宿主细胞；及

- 从培养物回收由所述宿主细胞表达的血清白蛋白结合分子或融合蛋白；及

- 任选地，包括进一步纯化和/或修饰本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白。

35 本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白可在如上所述细胞中以细胞内方式（例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中）产生，接着从宿主细胞分离且任选

进一步纯化；或其可以细胞外方式（例如在培养宿主细胞的培养基中）产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生多肽或蛋白的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。

5 类似地，适用于制造本公开的结合分子或抗体等目的蛋白的分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南（5-8 章和 15 章）。本公开工程化的抗体也可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

15 然而，本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

组合物

一些实施方案中，所述组合物为药物组合物，其含有预防或治疗有效量的如上所述的本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白，和/或编码所述血清白蛋白结合分子或融合蛋白的多核苷酸，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的血清白蛋白结合分子或融合蛋白。另一些具体实施方案中，药物组合物单位剂量中含血清白蛋白结合分子或融合蛋白的量为 0.1-2000mg；一些具体实施方案中为 1-1000mg。

试剂盒和检测

本公开提供试剂盒或产品，其包含前述本公开任意的血清白蛋白结合分子和/或编码本公开血清白蛋白结合分子的核酸分子。

30 本公开提供检测血清白蛋白的组合物，所述组合物包含本公开的血清白蛋白结合分子。本公开还提供用于体内或体外检测血清白蛋白的方法、系统或装置，其包括使用本公开的血清白蛋白结合分子。

一些实施方案中，体外检测方法、系统或装置可能例如包括（1）使样品与本公开的血清白蛋白结合分子接触；（2）检测在本公开的血清白蛋白结合分子和样品之间形成的复合物；和/或（3）使参比样品（例如，对照样品）与抗体接触；和
35 （4）通过与参比样品比较，确定抗体和样品之间复合物形成的程度。如与对照样品或受试者中相比，样品或受试者中复合物形成的变化（例如，统计学上的显著变化）表示样品中存在血清白蛋白。

另一些实施方案中，体内检测方法、系统或装置可以包括：（1）向受试者施用本公开的血清白蛋白结合分子；和（2）检测在本公开的血清白蛋白结合分子和受试者之间复合物的形成。检测可以包括确定形成复合物的位置或时间。结合血清白蛋白结合分子的抗体可以直接或间接地用可检测物质标记以促进所结合的或未结合的抗体的检测。合适的可检测物质包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。可以通过测量与血清白蛋白结合分子结合或不结合的抗体或使其可视化，检测在本公开的血清白蛋白结合分子和血清白蛋白之间的复合物形成。可以使用常规检测测定法，例如，酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）或组织免疫组织化学。一些实施方案中，通过竞争免疫测定法分析样品中血清白蛋白的存在，所述竞争免疫测定法使用以可检测物质标记的标准物和未标记的本公开的血清白蛋白结合分子。检测或测定的活体样品可以是组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

一些实施方案中，出于检测目的，本公开的血清白蛋白结合分子可以用荧光团或发色团标记。

治疗、预防疾病的方法和制药用途

本公开提供了一种延长治疗剂或诊断剂血浆半衰期的方法，其包括将本公开的血清白蛋白结合分子或其免疫球蛋白单一可变结构域与所述治疗剂或诊断剂共价或非共价连接。用于连接的方法是本领域已知的，或者可以是任何将来的方法，例如，可以通过化学偶联将其融合、在 DNA 水平上融合、在 mRNA 水平上融合或在蛋白质水平上融合等。

一些实施方案中，所述治疗或诊断性分子可以是治疗靶标、诊断靶标。靶标可以是治疗或诊断用途的任意蛋白质、肽、核酸、寡核酸、糖、多糖、糖蛋白。实例包括但不限于受体、受体配体、病毒外壳蛋白、免疫系统蛋白、激素、酶、抗原、细胞信号蛋白或其片段。

一些实施方案中，与本公开的血清白蛋白结合分子或其免疫球蛋白单一可变结构域连接的治疗剂或诊断剂的血浆半衰期与连接前相比提高了至少 1.5 倍，优选至少 2 倍，例如至少 5 倍，例如至少 10 倍或大于 20 倍；例如，与连接前相比，增加的血浆半衰期可以大于 1 小时，优选大于 2 小时，更优选大于 6 小时，例如大于 12 小时，或甚至大于 24、48 或 72 小时。

本公开提供治疗和/或预防疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白。

本公开还提供了血清白蛋白结合分子或融合蛋白用于治疗 and/或预防疾病的方法中，方法包括向有需要的受试者施用治疗和/或预防有效量的本公开的血清白蛋白结合分子或融合蛋白。

本公开还提供了血清白蛋白结合分子在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途。

一些实施方案中，所述疾病为纤维化疾病或心血管疾病。

一些具体实施方案中，所述心血管疾病为心力衰竭（心衰）、心肌肥厚。

附图说明

图 1A 至图 1C：为血清白蛋白结合分子的 ELISA 结合实验结果。

5 图 1A 为抗 HSA 抗体与人血清白蛋白（HSA）的 ELISA 结合实验结果。

图 1B 为抗 HSA 抗体与猴血清白蛋白（CySA）结合的 ELISA 结合实验结果。

图 1C 为抗 HSA 抗体与小鼠血清白蛋白（mSA）结合的 ELISA 结合实验结果。

图 2A 和图 2B 为抗 HSA 抗体对 FcRn 和 HSA 结合影响的实验结果。

图 3 为抗 HSA 抗体小鼠药代动力学研究中静脉给药后血浆中的药时曲线。

10 图 4A 至图 4B 为抗 HSA 抗体小鼠药代动力学研究结果。

图 4A 为采用非房室模型计算抗 HSA 抗体在血浆中的 $T_{1/2}$ 参数比较结果。

图 4B 为 Cl_{obs} (mL/(min*kg)) 参数比较结果。

图 5 为本公开融合蛋白（式（III））的结构示意图。

图 6A 为 THP1 细胞在无 HSA 条件下检测融合蛋白体外活性结果。

15 图 6B 为 THP1 细胞在体系含有 1% HSA 条件下检测融合蛋白体外活性结果。

图 7A 为融合蛋白在小鼠模型中的血浆药时曲线。

图 7B 为融合蛋白在大鼠模型中的血浆药时曲线。

图 8 为融合蛋白对小鼠心肌肥厚的作用实验中，小鼠 ISO 心肌肥厚模型的心重/胫骨长比。

20

具体实施方式

定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本公开中的它处另有明确定义，否则本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

25

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

“抗体”或“免疫球蛋白”无论是指重链抗体，还是指常规的由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链抗体，均用作一般术语以包括全长抗体、其单个的链以及其所有部分、结构域或片段（包括但不限于抗原结合结构域或片段，例如 VHH 结构域或 VH/VL 结构域）。

30

“序列”（例如在“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“单一可变结构域序列”、“VHH 序列”或“蛋白序列”等的术语中）一般应理解为既包括相关氨基酸序列，又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列，除非本公开需要进一步限定的解释。

35

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分

维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，并在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球形区域。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由“框架区 1”(FR1)、“框架区 2”(FR2)、
5 “框架区 3”(FR3)、及“框架区 4”(FR4)，以及“互补决定区 1”(CDR1)、“互补决定区 2”(CDR2)、及“互补决定区 3”(CDR3)组成的结构域。因此，可变结构域的一般结构（或序列）可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

10 “抗体框架（FR）”，是指可变结构域的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环（CDR）的支架。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下（例如在没有如常规四链单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域之间所需要的 VH/VL 相互作用的情况下），形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域（其可以是重链或轻链结构域，包括 VH、VHH 或 VL 结构域）。
15 “免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体（包括 VHH、人源化 VHH 和/或骆驼化 VH，例如骆驼化人 VH）、IgNAR、结构域、作为 VH 结构域或衍生自 VH 结构域的（单结构域）抗体（诸如 dAbsTM）和作为 VL 结构域或衍生自 VL 结构域的（单结构域）抗体（诸如 dAbsTM）。基于和/或衍生自重链可变结构域（诸如 VH 或 VHH 结构域）的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选的。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH 结构域”（或简称为“VHH”）。

“VHH 结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、V_HH 结构域、VHH 抗体片段、VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”（即“缺乏轻链的抗体”）的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域（Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S,
25 Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.:“Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature363, 446-448 (1993)）。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的 VH 以及 VL 进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域（对于常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域，表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别）。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语
30 “重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“V_HH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及“Nanobody®结构域”（“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司，Ghent, Belgium 的商标）可互换使用。“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体，也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的，
35 也可以是经噬菌体展示技术筛选获得的。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内，常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法，先前已公开于以下文献中：R.van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240(2000)

185-195; Li et al., J Biol Chem., 287(2012)13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol.8 (12), pp.2645-2652, 17June, 2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的, 各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同, 且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数 (即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据, 或实际序列可能含有 5 多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言, 根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体 (humanized antibody)”, 也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted 10 antibody), 是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分, 从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降, 可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变, 以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而 “人源化” 15 人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列, 且在一些具体实施方案中, 可含 IGHV3 的人框架区序列。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化 (resurfacing) 及抗体人源化通用框架移植法 (CDR grafting to a universal framework), 即将 CDR “移植” 于其它 “支架” (包括但不限于人支架或非免疫球蛋白蛋白支架) 上。适于所述 CDR 移植的支架及技术在本领域中是已知的。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 VBase 人种系序列数据库, 以及在 Kabat, E.A.等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。此外, 为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述 25 的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变, 以保持活性。

本领域技术人员可以使用许多已知的编号方案中的任一种方案来确定抗体 CDR 的氨基酸序列边界, 已知的编号方案包括以下文献中所述的编号方案: Kabat 等人, 见上文 (“Kabat” 编号方案); Al-Lazikani 等人, 1997, J.Mol.Biol., 273:927-948 (“Chothia” 编号方案); MacCallum 等人, 1996, J.Mol.Biol. 262:732-745 (“Contact” 30 编号方案); Lefran 等人, Dev.Comp.Immunol., 2003, 27:55-77 (“IMGT” 编号方案) 和 Honegge 和 Plückthun, J.Mol.Biol., 2001, 309:657-70 (“AHo” 编号方案); 其各自均通过引用整体并入。

“表位” 或可互换使用的术语 “抗原决定簇” 指抗体所结合的抗原上的任何抗原决定簇。抗原决定簇通常包含分子的化学活性表面基团, 例如氨基酸或糖侧链, 并且通常具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。例如, 表位通常以 35 独特的空间构象包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连续的氨基酸, 其可以是 “线性” 表位或 “构象” 表位。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed.(1996)。

在线性表位中，抗原与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着抗原的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的氨基酸残基而存在。可使用本领域中熟知的许多表位定位技术鉴别给定抗原的表位。参见例如 *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed. (1996)。举例而言，线性表位可通过例如以下方法来确定：在固体支持物上同时合成大量肽，其中这些肽对应于蛋白质分子的各部分，且使这些肽在仍然与支持物连接的情况下与抗体反应。这些技术在本领域中为已知的且描述于例如美国专利第 4,708,871 号；Geysen 等人 (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81: 3998-4002；Geysen 等人 (1986) *Molec.Immunol.*23: 709-715 中。构象表位也可通过诸如通过例如 x 射线结晶学及二维核磁共振确定氨基酸的空间构形加以鉴别。可使用本领域技术人员已知的常规技术，就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如，可进行竞争和交叉竞争研究，以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利申请 WO03/48731 中。因此，可使用本领域技术人员已知的常规技术，获得与本公开的抗体分子竞争结合血清白蛋白上的相同表位的抗体及其抗原结合片段。

一般而言，术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白（例如本公开的血清白蛋白结合分子）可结合的不同类型抗原或表位的数目。可基于抗原结合蛋白的亲和力（affinity）和/或亲合力（avidity）确定其特异性。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数（ K_D ）所表示的亲和力，是表位与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度： K_D 值越小，表位与抗原结合蛋白之间的结合强度越强（或者，亲和力也可表示为结合常数（ K_a ），其为 $1/K_D$ ）。如本领域技术人员将了解，取决于具体感兴趣的抗原，可以以已知方式测定亲和力。亲合力为抗原结合蛋白（例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域或含有其的多肽）与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与以下两者有关：与其抗原结合蛋白上的抗原结合位点之间的亲和力，以及存在于抗原结合蛋白上的相关结合位点的数目。

“血清白蛋白结合结构域”意指任何能够特异性结合血清白蛋白或其表位的多肽。“血清白蛋白结合分子”意指任何能够特异性结合血清白蛋白或其表位的分子，包括但不限于蛋白、多肽。血清白蛋白结合分子可以包括针对血清白蛋白或其表位的如本公开定义的抗体或其抗原结合片段，或包含所述抗体、其抗原结合片段的缀合物、融合蛋白。抗原结合片段例如为 sdAb 或双特异性抗体、多特异性抗体。本公开的血清白蛋白结合分子可以包含至少一个（例如，2、3、4 或更多个）结合血清白蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域（如 VHH）。本公开的血清白蛋白结合分子除免疫球蛋白单一可变结构域外也可包含连接子和/或具有效应分子功能的部分，所述效应分子包括但不限于诊断剂或治疗剂，例如，抗肿瘤剂、免疫调节剂、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子以及其任何组合。

“亲和力成熟”的血清白蛋白抗体（如 VHH），在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化，所述变化导致对血清白蛋白的亲和力相比于其亲本抗血清白蛋白抗体有所增加。亲和力成熟的抗血清白蛋白抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备：Marks 等人，1992，*Biotechnology* 10: 779-783 或 Barbas 等人，1994，*Proc.Nat.Acad.Sci, USA* 91: 3809-3813.; Shier 等人，1995，*Gene* 169: 147-155; Yelton 等人，1995，*Immunol.*155: 1994-2004; Jackson 等人，1995，*J.Immunol.*154 (7): 3310-9; 及 Hawkins 等人，1992，*J.Mol.Biol.*226 (3): 889896; KS Johnson 及 RE Hawkins, “Affinity maturation of antibodies using phage display”, Oxford University Press 1996。

“回复突变”是指将人抗体来源的 FR 区氨基酸残基突变成原始来源抗体对应位置的氨基酸残基，通常是为了避人源化抗体引起的免疫原性下降的同时，引起的活性下降，对所述的人源化抗体可变区可进行最少反向突变，以保持抗体的活性。

通常，本公开的血清白蛋白结合分子将以如于 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升 (M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-10} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-10} 或更低的解离常数 (K_D)，和/或以至少 10^{-7} M、优选至少 10^{-8} M、更优选至少 10^{-9} M，更优选至少 10^{-10} M 的结合常数 (K_a) 结合所要结合的抗原（即血清白蛋白）。任何大于 10^{-4} M 的 K_D 值一般都视为指示非特异性结合。抗原结合蛋白对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定，包括例如本公开所述的表面等离子体共振术 (SPR) 测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定（例如放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (ELISA) 及夹心式竞争性测定。

术语“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。

本公开中“同源性”、“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“保守氨基酸突变”或“保守（氨基酸）取代”是指将蛋白或多肽的某个或多个氨基酸残基进行保守氨基酸替换，替换前的氨基酸残基与替换后的氨基酸残基的化学结构类似，且提换对蛋白或多肽的功能、活性或其他生物性质影响较小或基本上无影响。所述保守氨基酸替换在本领域中是公知的，例如保守氨基酸替换优选是以下组 (i) - (v) 内的一个氨基酸被同一组内的另一氨基酸残基所取代：

(i) 较小脂族非极性或弱极性残基：Ala、Ser、Thr、Pro 及 Gly；

(ii) 极性带负电残基及其（不带电）酰胺：Asp、Asn、Glu 及 Gln；

(iii) 极性带正电残基：His、Arg 及 Lys；(iv) 较大脂族非极性残基：Met、Leu、Ile、Val 及 Cys；及

(v) 芳族残基：Phe、Tyr 及 Trp。

5 特别优选地保守氨基酸取代如下：Ala 被 Gly 或 Ser 取代；Arg 被 Lys 取代；Asn 被 Gln 或 His 取代；Asp 被 Glu 取代；Cys 被 Ser 取代；Gln 被 Asn 取代；Glu 被 Asp 取代；Gly 被 Ala 或 Pro 取代；His 被 Asn 或 Gln 取代；Ile 被 Leu 或 Val 取代；Leu 被 Ile 或 Val 取代；Lys 被 Arg、Gln 或 Glu 取代；Met 被 Leu、Tyr 或 Ile 取代；Phe 被 Met、Leu 或 Tyr 取代；Ser 被 Thr 取代；Thr 被 Ser 取代；Trp 被 Tyr
10 取代；Tyr 被 Trp 或 Phe 取代；Val 被 Ile 或 Leu 取代。

“核酸”、“核酸分子”或“多核苷酸”在本公开可互换使用，指的是单链或双链的任何 DNA 分子或 RNA 分子以及在单链的情况下，它的互补序列的分子，优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子
15 有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”是指能够运输与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本公开中的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制（例如，
20 具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制（例如，非附加型哺乳动物载体）。

本公开使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑传代数。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由
25 上下文清楚可见。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入核酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同（在形态学或基因组 DNA 互补体中）。宿主细胞包括用本公开的核酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确
30 相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“药物组合物”表示含有一种或多种本公开所述融合蛋白、血清白蛋白结合

分子、多核苷酸与其他组分的混合物，所述其他组分例如生理学/药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”、“施用”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂（如本公开的融合蛋白），所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床有测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的词组中所用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”（单独）及“B”（单独）。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

本公开的序数词“第一”、“第二”、“L1”、“L2”等，不意图对数量、水平、等级、顺序构成限制，目的仅在于区别不同的元素、步骤、技术特征。

实施例

以下结合实施例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。

本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

5 实施例 1. 血清白蛋白抗原及检测用蛋白的制备

1. 人血清白蛋白的设计与表达：

以人血清白蛋白（HSA）为模板，设计缺失部分 C-末端氨基酸的检测用蛋白的氨基酸序列。

人血清白蛋白全长氨基酸序列：

10 MKWVTFISLLFLFSSAYS**RGV**FRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL
QQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETY
GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK
KYL YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG
KASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KV
15 HTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN
DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LL
RLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEY
KFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVESRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFT
20 FHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKA
DDKETCFAEEGKKLV AASQAALGL (SEQ ID NO: 1)

（注：斜体下划线部分为信号肽；斜体加粗部分为前肽）。

白蛋白与 FcRn 结合区分布在白蛋白分子的第三结构域，根据分子模拟结构设计了缺失 C-末端第三结构域部分氨基酸的白蛋白分子（同时在 C-末端融合了

25 Avi-his 标签）：
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTC
VADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQH
KDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK KYL YEIARRHPYFYAPELLFFAK
RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEG KASSAKQRLK CASLQKFGERAFA
30 KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKY
ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN
YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY
AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV
EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KC
35 CTESLVNRRPCFSALEVDETGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHH

(SEQ ID NO: 2)

（注：斜体为 Avi-his 标签）。

2. 猴血清白蛋白全长氨基酸序列：

MKWVTFISLLFLFSSAYS**RGV**FRRDTHKSEVAHRFKDLGEEHFKGLVLVA

FSQYLQQCPFEEHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPPLVRPEVDVMCTA
FHDNEATFLKKYLYEVARRHPYFYAPELLFFAARYKAAFAECCQAADKAA
CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGDRAFKAWAVARLSQKFPKA
5 EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYMCENQDSISSKLK
ECCDKPLLEKSHCLA EVENDEMPADLPSLAADYVESKDVCKNYAEAKDVF
LGMFLYEYARRHPDYSVMLLLRLAKAYEATLEKCCAAADPHECYAKVFDE
FQPLVEEPQNLVKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGAKCCKLPEAKRMPCAEDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKVTKC
10 CTESLVNRRPCFSALELDEAYVPKAFNAETFTFHADMCTLSEKEKQVKKQ
TALVELVKHKPKATKEQLKGVMDNFAAFVEKCKADDKEACFAEEGPKFV
AASQAALA (SEQ ID NO: 3)

(注：斜体下划线部分为信号肽；斜体加粗部分为前肽)。

3. 小鼠 (mouse) 血清白蛋白全长氨基酸序列：

15 MKWVTFLLLLFVSGSAF**SRGVFRRE**AHKSEIAHRYNDLGEQHF KGLVLI
AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIP
NLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPT
TFMGHYLHEVARRRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGV
KEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL
20 TKVNKECCHGDLLECADDR AELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLS
EVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVS
LLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEK
LGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE
DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKA
25 ETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQFLDTC
CKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA (SEQ ID NO: 4)

(注：斜体下划线部分为信号肽；斜体加粗部分为前肽)。

4. 大鼠 (Rat) 血清白蛋白全长氨基酸序列：

MKWVTFLLLLFISGSAF**SRGVFRRE**AHKSEIAHRFKDLGEQHF KGLVLIAFSQYL
30 QKCPYEEHIKLVQEVTDFAKTCVADENAENCDKSIHTLFGDKLCAIPKLRDNYG
ELADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPPFQRPEAEAMCTSFQENPTSFLGHYL
HEVARRRHPYFYAPELLYYAEKYNEVLTQCCTESDKAACLTPKLDAVKEKALV
AAVRQRMKCSSMQRFGERAFKAWAVARMSQRFPNAEFAEITKLATDVTKINK
ECCHGDLLECADDR AELAKYMCENQATISSKLQACCDKPV LQKSQCLAEIEHD
35 NIPADLPSIAADFVEDKEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLA
KKYEATLEKCCAEGDPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCELYEKLGEYGF
QNAV LVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEAQR LPCVEDYLSAI
LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFH
SDICTLPDKEKQIKKQTALAELVKHKPKATEDQLKTVMGDFAQFVDKCCKAA
40 DKDNCFATEGPNLVARSKEALA (SEQ ID NO: 5)

(注：斜体下划线部分为信号肽；斜体加粗部分为前肽)。

实施例 2. 特异性结合人血清白蛋白 (HSA) 的抗体筛选

1. 骆驼免疫

5 使用商品化的人血里提取的血清白蛋白 (Sigma, Cat No. 126658) 免疫内蒙古天然双峰驼。取免疫前的骆驼血清 5 mL 并分离血清。将弗氏完全或不完全佐剂与抗原按体积 1: 1 混合后, 对骆驼进行皮下多点免疫 (免疫剂量为 100 μ g 蛋白/只/每次)。每两周进行一次加强免疫, 免疫四次后测定效价。用 5 μ g/mL 人血清白蛋白 (HSA) 包被平板 (Costar, Cat.No, 9018), 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。第二天使用 PBST (0.05% Tween20) 洗涤三次, 300 μ L/孔, 之后加入 4% 的脱脂奶粉进行封闭, 37 $^{\circ}$ C, 2h。洗涤后加入梯度稀释的免疫骆驼的血清, 37 $^{\circ}$ C, 1h 进行孵育。阴性对照为同样梯度稀释的免疫前血清和空白 PBS 溶液。孵育结束后用 PBST 洗涤三遍, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗骆驼 Fc 的多抗 (Thermo, Cat No. A16060, 1:5000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。再次洗涤后加入 TMB 显色液进行显色, 10 用 1M 硫酸进行终止, 使用 SpectraMax M5 酶标仪在 OD450nm 波长下读取吸收值。1: 51200 倍稀释后检测到效价。效价合格, 采集骆驼外周血进行建库。

2. 噬菌体文库建立

取 100-200mL 骆驼外周血, 使用 Ficoll 方法分离外周血淋巴细胞 (PBMC), 细胞计数为 1.2×10^8 个, 加入 Trizol 试剂重悬 (1×10^7 个细胞/mL Trizol), 以裂解细胞, 冰上放置 5min; 13000rpm 离心 3min, 取上清, 丢弃沉淀; 加入 1/5 体积的氯仿, 剧烈震荡 30-60s, 冰浴静置 2min; 13000rpm 离心 10min, 吸取上层水相层至新的 1.5mL 管中; 加入等体积的异丙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 静置 30min; 13000rpm 离心 10min, 去掉上清, 保留沉淀; 加入预冷的 75%乙醇洗涤沉淀, 室温放置 5-10min; 加入 RNA 酶去除的去离子水 600 μ L, 复溶, 得到 RNA, 逆转录得到 cDNA, 进行噬菌体文库的构建。20 25

3. 噬菌体文库的筛选

缺失 C-末端第三结构域部分氨基酸的 HSA 蛋白 (又称截短的 HSA, 序列如 SEQ ID NO: 2 所示) 在 HEK293 细胞进行表达并纯化, 使用此蛋白进行噬菌体文库的筛选。通过筛选来获得与 HSA 具有亲和力的抗体。

30 用 10 μ g 上述截短的 HSA-*avi*-生物素蛋白结合 1mg Dynabeads M-280 链霉亲和素 (Invitrogen, Cat No. 11206D), 室温放置一小时后, 使用 1 $\times$ PBS 洗涤 3 次, 用 2%脱脂奶室温封闭 2 小时, 加入骆驼重链单域抗体噬菌展示文库, 在室温下作用 1 小时。用 PBST(0.05% Tween-20)溶液洗 9 遍, 去除不结合的噬菌体。用 1mg/mL 的胰蛋白酶将与截短的 HSA 特异性结合的噬菌体洗脱, 并侵染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1, 产生并纯化噬菌体用于下一轮筛选。相同筛选过程重复 1-2 轮后, 35 阳性的克隆序列被富集。

4. 噬菌体 ELISA 鉴定

从最后一轮筛选得到的克隆中挑取单克隆菌落包装成噬菌体单链抗体，用于噬菌体 ELISA 测试。ELISA 板上分别过夜包被 2μg/mL 的人、猴、小鼠血清白蛋白（HSA、CySA、mSA），4%的脱脂牛奶 37℃封闭 1 小时以后，加入使用 2%脱脂牛奶进行封闭的噬菌体上清，常温下作用 1 小时，PBST（0.05% Tween 20）洗涤 3 次，加入抗 M13 HRP 检测。将 ELISA 结合测试中与三种白蛋白 OD450 值都大于 0.5 的克隆进行测序，得到 50 个特异性序列。将仅同时与人和猴血清白蛋白呈现高 OD450 值的部分抗体进行测序，得到另外 7 个新的特异性序列。噬菌体筛选获得 57 个新的特异性序列。

10

实施例 3. 抗体哺乳动物细胞表达载体的构建

将实施例 2 通过噬菌体库筛选得到的 57 个特异性序列进行归类整理，对其中的 19 个序列进行了克隆，对这 19 个抗 HSA 抗体的噬菌体上清 ELISA 结合进行测试，其中#7 和#9 克隆的 OD450 值如表 1 所示。

15

表 1. 抗 HSA 抗体噬菌体上清 ELISA 检测结果

编号	人 HSA OD450	小鼠 SA OD450	猴 SA OD450
#7aHSA	1.6929	1.1185	1.7477
#9aHSA	1.5231	1.0871	1.8161

>#7aHSA
HVQLVESGGGSVQAGGSLRVSCVASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVASIYTVGG
STFYTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLQPEDTAMY^{CAAG}SPARCRLRDPTTFE
DYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 6)

20

>#9aHSA
DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAA^{AEY}TYLNSCLGWFRQAPGKEREGVATIY^{MVG}
GSTFYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMMNSLKPEDTAMY^{CAAG}SPARCLRRDPTTF
FNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 7)。

以上序列 SEQ ID NO: 6、7 中，顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线分别为 CDR1、CDR2、CDR3 序列。本公开提供的抗 HSA 抗体按照 Kabat 编码的 CDR 序列总结如表 2。

25

表 2. 抗 HSA 抗体的 CDR 序列（Kabat 编码规则）

抗体编号	CDR 序列及其序列编号		
#7aHSA	CDR1	TSCMG	SEQ ID NO: 8
	CDR2	SIYTVGGSTFYTNSVKG	SEQ ID NO: 9
	CDR3	GSPARCRLRDPTTFDY	SEQ ID NO: 10
#9aHSA	CDR1	NSCLG	SEQ ID NO: 11
	CDR2	TIYMVGGSTFYADSVKG	SEQ ID NO: 12
	CDR3	GSPARCLRRDPTTFNY	SEQ ID NO: 13

因此，我们提供如下抗 HSA 抗体的 CDR：

CDR1 为 X_1SCX_2G ，其中， X_1 为 T 或 N， X_2 为 M 或 L；

CDR2 为 $X_3IYX_4VGGSTFYX_5X_6SVKG$ (SEQ ID NO: 58)，其中， X_3 为 S 或 T， X_4 为 T 或 M， X_5 为 T 或 A， X_6 为 N 或 D；

CDR3 为 $GSPARCX_7X_8RDPTTFX_9Y$ (SEQ ID NO: 59)，其中， X_7 为 R 或 L， X_8 为 L 或 R， X_9 为 D 或 N。

将 VHH 序列融合人 IgG1-Fc (CH2-CH3)，并构建到 PTT5 表达载体中，所连接的人 IgG1-Fc 的序列如下所示：

>人 IgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
10 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

以下是 VHH 序列融合人 Fc (CH2-CH3) 段的全序列，单下划线是人 IgG1-Fc
15 (CH2-CH3) 段序列 (SEQ ID NO: 14 所示)，双下划线为连接子序列。全序列如
下：

>#7aHSA-IgG1Fc:

HVQLVESGGGSVQAGGSLRVSCVASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVASIYT
VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLQPEDTAMYYCAAGSPARCRL
20 RDPTTFDYWGQGTQVTVSSASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 15)

25 >#9aHSA-IgG1Fc:

DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAAAEYTYLNSCLGWFRQAPGKEREGVATIYM
VGGSTFYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLMNSLKPEDTAMYYCAAGSPARCLR
RDPTTFNYWGQGTQVTVSSASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
30 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16)。

实施例 4. 抗 HSA 抗体的表达、筛选与检测

35 将融合了人 IgG1-Fc 的#7aHSA 和#9a 抗 HSA 抗体分别在 HEK293 细胞进行瞬
时表达和 ProteinA 亲和纯化。之后通过 ELISA 结合实验、Biacore 蛋白相互作用实
验进行检测。

通过 ELISA 结合实验检测#7aHSA 和#9a 抗 HSA 抗体对于人、猴和小鼠血清

白蛋白的体外结合能力，测试用抗原为人血清白蛋白（Sigma，Cat No. 126658），猴血清白蛋白（Abcam，Cat No. ab184894）和小鼠血清白蛋白（Abcam，Cat No. ab183228）。其中：阴性对照为 PBS，阳性对照使用融合了人 IgG1-Fc 的 ALB8（可变区序列来自 Ablynx 专利公开 WO 2008/028977 A2 中的 ALB8 的序列），序列如下：

>ALB8- IgG1-Fc
EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSFSGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS
GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT
LVTVSSASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

（注：单下划线为 IgG1 的 Fc 区，双下划线为连接子区）。

用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液将人、猴、小鼠白蛋白稀释至 1μg/mL，以 100μL/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning，Cat No. 9018），于 4℃放置过夜 16-20 小时。弃去液体后，用 PBST（pH7.4，0.05% Tween-20）缓冲液洗板三次后，加入用 PBS 缓冲液稀释的 2% 脱脂奶粉封闭液（300μL/孔），37℃孵育 1 小时进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液洗板 3 次后，加入初始浓度为 2μg/mL 的抗 HSA 抗体，用 PBS 缓冲液进行三倍比稀释 11 个梯度，置于 25℃孵育 1 小时。孵育结束后，弃去板中的反应液，用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100μLHRP 标记的山羊抗人 IgGFc 的二抗（Jackson immu，109-035-190）（1:5000 稀释），25℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，加入 100μL TMB 显色底物进行显色，使用 1M 硫酸终止反应，用 SpectraMax M5 酶标仪在 OD450nm 处读取吸收值，使用 GraphPad prism 对吸收值和抗体浓度用 4 参数拟合作图，结果如图 1A-图 1C 所示；计算抗体对抗原的结合 EC₅₀ 值，结果如表 3 所示。

表 3. 抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠白蛋白的 ELISA 结合 EC₅₀（μg/mL）

抗体编号	结合 HSA 的 EC ₅₀	结合猴 SA 的 EC ₅₀	结合小鼠 SA 的 EC ₅₀
#7aHSA-IgG1Fc	0.04552	0.04256	0.04502
#9aHSA-IgG1Fc	0.04601	0.03865	0.04116
阳性对照（ALB8-IgG1Fc）	0.009926	0.010134	0.01061
阴性对照（PBS）	/	/	/

（注：“/”表示未检测到结合）

此外，还通过 Biacore T200（GE Healthcare）仪器测定融合了人 IgG1Fc 的抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠白蛋白（HSA、CySA、mSA）的亲和力常数。首先将 protein A 使用氨基偶联试剂盒（GE，Cat. BR-1000-50）共价偶联到 CM5 S series 芯片（GE，Cat. 29-1049-88）上，抗 HSA 抗体通过亲和捕获至偶联了 protein A 的

芯片上，然后于芯片表面流过不同浓度的人、猴、小鼠白蛋白，利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合解离曲线，通过 BIAevaluation version 4.1，GE 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合，获得亲和力常数。实验使用缓冲液为 HBS-EP 溶液（10 mM HEPES，150 mM NaCl，3mM EDTA, 0.05% P20，pH 7.4，GE，Cat. # BR-1006-69）。每个循环结束后使用 PH1.5 甘氨酸-盐酸（GE，Cat. # BR-1003-54）对芯片进行再生。亲和力结果如表 4 所示。

表 4. 抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠白蛋白的亲和力结果

抗体编号	抗原	ka（1/Ms）	kd（1/s）	K _D （M）
#7aHSA-IgG1Fc	人 HSA	4.29E+04	7.55E-05	1.76E-09
	猴 SA	4.49E+04	5.70E-05	1.27E-09
	小鼠 SA	4.66E+04	3.47E-04	7.44E-09
#9aHSA-IgG1Fc	人 HSA	8.43E+04	2.64E-05	3.13E-10
	猴 SA	8.92E+04	4.40E-05	4.93E-10
	小鼠 SA	2.21E+09	3.10E+01	1.40E-08

实施例 5. 抗 HSA 抗体的人源化改造

通过对选定的特异性抗 HSA 抗体分子#7aHSA 进行三维结构同源建模，结合与 V-base 人种系序列数据库，IMGT 人类抗体重链可变区种系基因数据库进行比对的结果，挑选与筛选出来的抗体同源性高的重链可变区种系基因 IGHV3-23 作为模板，将骆驼来源单域抗体的 CDR 移植到相应的人源模板中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。对移植后的单域抗体再次进行三维结构模拟并分析。将 FR 区中影响 CDR 区结构形态的特定位点进行回复突变。改造后的抗体具有更高的稳定性。其中氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。其中#7_Hu-9 和#7_Hu-10 的 FR 中更多的保留了人种系序列，使其具有更低的免疫原性突变。

回复突变位点和突变方式设计如表 5。

表 5. 回复突变位点和突变方式

抗体编号	回复突变
#7_Hu_1	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G
#7_Hu_2	L20V; F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G
#7_Hu_3	A23V; F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G
#7_Hu_4	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; S74A
#7_Hu_5	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; L78V
#7_Hu_6	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; S49A
#7_Hu_7	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; R83Q; A84P
#7_Hu_8	F27N; F29Y; S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; A84P
#7_Hu_9	S30L; V37F; G44E; L45R; W47G; A84P
#7_Hu-10	S30L; V37F; G44E; L45R; W47G

获得的人源化具体序列如下，CDR 区用下划线表示，编码规则为 Kabat 编码：

- >#7_Hu_1
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYT~~
~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLR~~
~~DPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 18)
- 5 >#7_Hu_2
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRVSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYT~~
~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLR~~
~~DPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 19)
- 10 >#7_Hu_3
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCVASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYT~~
~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLR~~
~~DPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 20)
- >#7_Hu_4
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYT~~
15 ~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~AKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRL~~
~~RDPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 21)
- >#7_Hu_5
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYT~~
~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTVYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRL~~
20 ~~RDPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 22)
- >#7_Hu_6
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVASIYT~~
~~VGGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLR~~
~~DPTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 23)
- 25 >#7_Hu_7
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV~~
~~GGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLQPEDTAVYYCAAGSPARCRLRD~~
~~PTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 24)
- >#7_Hu_8
30 EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV~~
~~GGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRD~~
~~PTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 25)
- >#7_Hu_9
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV~~
35 ~~GGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRD~~
~~PTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 26)
- >#7_Hu_10
EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV~~
~~GGSTFYTNSVKGRFTISRDN~~SKNTLYLQMN~~SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRD~~
40 ~~PTTFDYWGQGT~~LVTVSS (SEQ ID NO: 27)。

使用实施例 5 中的方法构建人源化抗 HSA 抗体与 hIgG1 的 Fc (CH2-CH3) 段融合蛋白或者是融合了 6His 标签的蛋白, 单下划线是 hIgG1-Fc (CH2-CH3) 段序列 (SEQ ID NO: 14 所示), 斜体是 6His 标签序列, 双下划线为连接子序列。蛋白序列如下 (以 #7_hu_1-hIgG1Fc 和 #7_hu_10-6His 为例, 其他人源化抗 HSA 抗体也一样)。对于抗体编号规则, #7_hu_10-6His 即是 #7_Hu_10 (SEQ ID NO: 26) 的 C 末端融合 “GGGSGGGSHHHHHH”, 其他抗体也是一样。

>#7_hu_1-hIgG1Fc:

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV
GGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRD
10 PTTFDYWGQGT LVT VSS ASGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28)

15 >#7_Hu_10-6His

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAAS GFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTV
GGSTFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRD
PTTFDYWGQGT LVT VSS GGGSGGGSGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 29)

>ALB8-6his

20 EVQLVES GGGGLVQP GNS LRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS
GSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT
LVT VSS GGGSGGGSGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 30)。

将质粒瞬时转染 HEK293 细胞, 细胞培养 5 天后收集表达上清, 4000rpm 离心 15 分钟以去除细胞, 收获上清并使用 0.45 μ M 的滤器进行过滤, 再使用 Protein A 柱或则镍柱等本领域常规方法进行纯化, 分离获得。经检测, 获得本公开的抗 HSA 抗体。

实施例 6. 人源化抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠血清白蛋白的亲和力测定

通过 Biacore T200 (GE Healthcare) 仪器测定融合了 6His 标签的人源化抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠白蛋白的亲和力常数。首先使用氨基偶联试剂盒 (GE, Cat. BR-1000-50) 和 His 捕获试剂盒 (GE, Cat. 28-9950-56) 根据试剂盒说明书对 CM5 S series 芯片 (GE, Cat. 29-1049-88) 进行氨基偶联, 表面响应值达到约 10000RU, 乙醇胺封闭后待用; 融合了 6His 标签的人源化抗 HSA 抗体通过亲和捕获至抗 his 的芯片上, 然后于芯片表面流过不同浓度的人、猴、小鼠白蛋白, 利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合解离曲线, 通过 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合, 获得亲和力常数。实验使用缓冲液为 HBS-EP 溶液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% P20, pH 7.4, GE, Cat. # BR-1006-69)。每个循环结束后使用 PH1.5 甘氨酸-盐酸 (GE, Cat. #

BR-1003-54) 对芯片进行再生。部分人源化抗体的亲和力结果如表 6 所示。结果显示, 本公开筛选获得的抗体与 HSA 的亲和力与阳性对照相当或略好。

表 6. 人源化抗 HSA 抗体与人、猴、小鼠白蛋白的亲和力

抗体编号		ALB8-6his	#7_hu_1-6his	#7_hu_5-6his	#7_hu_6-6his	#7_hu_7-6his	#7_hu_10-6his
人 HSA	ka (1/Ms)	2.62E+04	3.60E+04	3.55E+04	3.71E+04	3.74E+04	3.01E+04
	kd (1/s)	1.72E-03	6.53E-04	5.34E-04	6.40E-04	6.68E-04	3.47E-04
	K _D (M)	6.57E-08	1.81E-08	1.51E-08	1.73E-08	1.79E-08	1.15E-08
猴 SA	ka (1/Ms)	2.30E+04	3.30E+04	3.31E+04	3.41E+04	3.49E+04	1.76E+04
	kd (1/s)	1.46E-03	5.54E-04	4.80E-04	5.45E-04	5.47E-04	5.45E-04
	K _D (M)	6.34E-08	1.68E-08	1.45E-08	1.60E-08	1.57E-08	3.10E-08
小鼠 SA	ka (1/Ms)	2.25E+04	4.55E+04	3.93E+04	4.83E+04	4.61E+04	5.97E+04
	kd (1/s)	1.95E-02	2.62E-02	2.60E-02	2.81E-02	2.29E-02	1.96E-02
	K _D (M)	8.67E-07	5.77E-07	6.62E-07	5.82E-07	4.97E-07	3.28E-07

5 使用 HEK293E 细胞瞬时表达抗 HSA 抗体 7_Hu_10-6his, 镍柱亲和纯化后通过 Biacore T200 (GE Healthcare) 仪器测定其与人、猴、小鼠、大鼠、狗, 兔白蛋白的亲和力常数。首先使用氨基偶联试剂盒 (GE, Cat. BR-1000-50) 和 His 捕获试剂盒 (GE, Cat. 28-9950-56) 根据试剂盒说明书对 CM5 S series 芯片 (GE, Cat. 29-1049-88) 进行氨基偶联, 表面响应值达到约 10000RU, 乙醇胺封闭后待用; 融合

10 了 6His 标签的人源化抗 HSA 抗体通过亲和捕获至抗 his 的芯片上, 然后于芯片表面流过不同浓度的人、猴、小鼠、大鼠、狗, 兔白蛋白, 利用 Biacore 仪器实时检测反应信号从而获得结合解离曲线, 通过 BIAevaluation version 4.1, GE 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合, 获得亲和力常数。实验使用缓冲液为 HBS-EP 溶液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% P20, pH 7.4, GE, Cat. #

15 BR-1006-69)。每个循环结束后使用 PH1.5 甘氨酸-盐酸 (GE, Cat. # BR-1003-54) 对芯片进行再生。亲和力结果如表 7 所示。

表 7. #7_Hu_10-6his 与不同种属的白蛋白亲和力

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
人 HSA	6.47E+04	6.83E-04	1.06E-08
猴 SA	4.79E+04	6.97E-04	1.45E-08
小鼠 SA	3.89E+04	2.54E-02	6.53E-07
大鼠 SA	2.92E+04	4.61E-03	1.58E-07
狗 SA	6.17E+04	2.11E-02	3.42E-07
兔 SA	未检测到结合		

20 **实施例 7. 抗 HSA 抗体在稳定表达 hFcRn 的细胞中对 FcRn 和生物素-HSA 结合的影响**

抗 HSA 抗体对 HSA 与 FcRn 结合的阻断效果通过抗体对稳定表达 hFcRn 突变体的 HEK293 细胞 (293-hFcRn-mut 细胞) 表面结合随机生物素化 HSA 的荧光量

变化的方式进行检测。本实验使用稳定表达 hFcRn 突变体 (L320A, L321A) 的 HEK293 细胞, 该 hFcRn 突变体可较好地定位并维持在细胞膜表面。将表达 hFcRn 突变体的细胞和不同浓度的抗 HSA 抗体以及 Biotin-HSA 共同孵育, 随后加入 SA-FITC 二抗孵育, 以二抗荧光信号 (MFI) 的减弱程度作为衡量抗 HSA 抗体对于生物素-HSA 与 FcRn 结合阻断作用的强弱。具体实验方法如下:

将 293-hFcRn-mut 细胞用 pH 5.5 PBS 清洗两次后, 在 U 型孔 96 孔板中每孔加入 5×10^5 个细胞。离心并去上清后, 每孔加入 90 μ L 以 PBS (pH5.5) 稀释的抗 HSA 抗体以及 10 μ L 生物素-HSA (终浓度为 250 μ g/mL), 在冰上共同孵育 40 分钟。以 200 μ L PBS (pH5.5) 清洗两次后, 每孔加入 100 μ L 以 PBS (pH5.5) 稀释的链霉亲和素-FITC 二抗 (eBioscience, Cat No. 11-4317-87), 稀释比例 1:200, 在冰上孵育 40 分钟。以 200 μ L PBS (pH5.5) 清洗两次后, 每孔加入 200 μ L PBS (pH5.5), 用流式细胞仪 (BD Biosciences, BD Accuri C6) 与 FL1 通道测量荧光值, 并使用 Flowjo 软件对数据进行分析, 用 Prism6 软件对分析结果进行绘制。部分抗体的抑制作用测试结果见图 2A 和图 2B。

结果分析: 根据荧光信号值 (MFI) 判断抗 HSA 抗体与 HSA 的结合是否阻断 HSA 与 FcRn 的结合, 如果荧光信号降低说明阻断结合。

如图 2A 所示, 我们以生物素-HSA+FcRn 稳转细胞+SA-FITC 组 (不阻断组) 作为基线; 生物素-HSA+HSA+FcRn 稳转细胞+SA-FITC 组 (HSA 自竞争组) 做阳性对照; Nc 为同种型对照抗体。结果显示, 本公开的抗 HSA 抗体 #7_Hu_6-6his 和 #7_Hu_7-6his 不会阻断 HSA 与 FcRn 的结合。

如图 2B 所示, #7_Hu_10-6his 和 #7_Hu_10 不会阻断 HSA 与 FcRn 的结合 (1mg/mL 浓度下检测)。

这说明, 本公开的抗 HSA 抗体不会影响 FcRn 与 HSA 的 PH 依赖性的结合, 可以很好的维持 FcRn 介导的血清白蛋白再循环机制。

实施例 8. 抗 HSA 抗体在小鼠中的药代动力学

对本公开抗 HSA 抗体 (#7_Hu_6-6his; #7_Hu_7-6his; #7_Hu_10-6his)、阳性对照抗体 (ALB8-6his) 和同种型对照抗体 (Isotype, 非 HSA 结合的 VHH 分子) 在 CD-1 雄性小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司) 中进行了药代动力学特征研究。每组三只小鼠, 在第 0 天按照 4mg/kg 的剂量通过尾静脉注射给药, 在给药前, 给药后 5 分钟、1 小时、7 小时、24 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时、144 小时采集血样, 使用 EDTA 抗凝并离心制备血浆, 用于并进行药代动力学测定。

PK 测定: 使用 5 μ g/mL 抗 his 的抗体 (Thermo, MAI-21315-1mg) 包被, 以 100 μ L/孔的体积加入 96 孔酶标板 (Corning, Cat No. 9018), 于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜 16-20 小时。弃去液体后, 用 PBST (pH7.4, 0.05% Tween-20) 缓冲液洗板三次后, 加入 Casin

Blocker (Thermo, 37528) 封闭液 (300 μ L/孔), 37°C 孵育箱孵育 2 小时进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用 PBST 缓冲液洗板 3 次后, 加入使用稀释液 (含有 1%CD1 小鼠血浆的 Casin Blocker) 进行适当稀释的不同时间点的小鼠血浆, 37°C 孵育 1.5 个小时。孵育结束后, 弃去板中的反应液, 用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μ L HRP 标记的兔抗骆驼 Cocktail VHH 的二抗 (Genescript, A02016, 无 BSA) (1:5000 稀释), 37°C 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 加入 100 μ L TMB 显色底物进行显色, 使用 1M 硫酸终止反应, 用 SpectraMax M5 酶标仪在 OD450nm 处读取吸收值。血浆样品中的 VHH 抗体浓度根据标准曲线进行计算, 结果如图 3 所示。将计算出的浓度使用 PK solver 进行半衰期的计算, 结果如图 4 和表 8 所示。

10

表 8. 抗 HSA 抗体的小鼠血浆半衰期

参数 (单位)	ALB8-6his	#7_Hu_6-6his	#7_Hu_7-6his	#7_Hu_10-6his	Isotype
	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg	5mg/kg
T _{1/2} (h)	7.16	9.0*	10.7**	9.83**	1.12****
AUC 0-inf_obs/剂量 (μ g/mL*h/mg/kg)	63	177	123	113	33.79
Cl_obs (mL/(min*kg))	0.285	0.095	0.114	0.148	0.493

(注: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001; ****, p<0.00001; 均是与阳性对照 ALB8-6his 相比)

结果显示, 本公开的各抗 HSA 抗体 #7_Hu_6-6his、#7_Hu_7-6his、#7_Hu_10-6his 具有类似的 pK 曲线, 半衰期在小鼠血清白蛋白的半衰期范围内, 且优于阳性对照 ALB8-6his 抗体, 清除率也低于 ALB8-6his 抗体。

15

实施例 9. 融合蛋白的设计和制备

松弛素 A 链与 B 链通过连接子连接形成单链松弛素分子, 同时为提高半衰期, 将单链松弛素分子与抗 HSA 的单域抗体进一步融合形成融合蛋白, 结构示意图如图 5。

20

>人 RLN2 A 链

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 31)

>人 RLN2 B 链 (delB1)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

(SEQ ID NO: 32)

25

>连接子 a

GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

(SEQ ID NO: 33)

>连接子 b

PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPA

(SEQ ID NO: 34)

>连接子 c

30

PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ

(SEQ ID NO: 35)

>连接子 d

GGGSGGSGGG

(SEQ ID NO: 49)

>0051

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
5 GQGT LVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
AQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 36)

>0052

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
10 TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
GQGT LVT VSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPASWMEEVIKLCGRE
LVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 37)

>0053

15 EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
GQGT LVT VSSPGPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQSWMEEVIKLCGR
ELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 38)

20 >0062

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
GQGT LVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
AQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

25 (SEQ ID NO: 39)

>0063

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVASIYTVGGS
TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
GQGT LVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
30 AQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCC

(SEQ ID NO: 40)

>0064

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLQPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
35 GQGT LVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
AQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 41)

>0065

EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
40 TFYTNSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
GQGT LVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
AQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO: 42)

>0066

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGNTYLTSCMGWFRQAPGKEREGVSSIYTVGGS
TFYTNVSKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAGSPARCRLRDPTTFDYW
QGGLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
 5 *AQIAICGMSTWSGGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC*

(SEQ ID NO: 43)

其中，斜体为抗 HSA 单域抗体；单下划线为连接子 1；双下划线为连接子 2；粗体为松弛素 2 的 B 链；粗斜体为松弛素 2 的 A 链。连接子 1 可选连接子 a、b、c，其中，a 为柔性连接子，b、c 为刚性连接子。

10 本实施例的阳性对照 0054 序列来自 WO2021022139A1 实施例 7。

>0054

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDI
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW
QGGLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVR
 15 *AQIAICGMSTWSGGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC*

(SEQ ID NO: 44)。

1. 融合蛋白的制备：

对编码融合蛋白 (SEQ ID NO: 36-44) 的 DNA 序列进行密码子优化，合成并克隆进 pTT5 表达载体，表达质粒瞬时转染 expiCHO (ThermoFisher, Cat No. A29127) 细胞，使用 ExpiFectamine CHO Transfection Kit (ThermoFisher, Cat No. A29133)，按试剂盒说明书进行转染。采用说明书中“High protocol”，转染后第二天将细胞放置于 32℃ 摇床悬浮震荡培养 (5% CO₂，110 rpm，75% 湿度)。转染后第 10-12 天，收取细胞培养液上清，4000rpm 离心 20 分钟，取上清并使用 0.45uM 的滤器过滤使用。

2. 融合蛋白的纯化：

(1) A3 亲和层析捕获融合蛋白：将表达融合蛋白的细胞培养上清进行高速离心收取上清，0.22um 滤膜过滤。A3 (JSR Life Sciences, Cat No. BP-AMS-A3-0100) 亲和柱利用 5 倍柱体积的 0.1M NaOH (Sigma, Cat No. 71687) 再生，然后用 5 倍柱体积的 1×PBS (pH7.4) (Sangon Biotech (Shanghai) co., Ltd.: Cat No. E607016-0500) 清洗平衡。将过滤后上清低流速进行上样，以便与亲和柱结合，控制流速使保留时间约 1min 或更长时间，结合完毕后分别利用 5 倍柱体积的 1×PBS (pH7.4)、5 倍柱体积的 1×PBS (pH 7.4) 0.8M NaCl (Vetec, Cat No. V900058) 和 5 倍柱体积的 1×PBS (pH7.4) 冲洗层析柱至紫外吸收回落至基线水平。利用 0.1M Glycine (pH3.0) (Sigma, Cat No. 410225) 缓冲液进行样品洗脱，根据紫外检测收集洗脱峰，洗脱产物利用 1M Tris-HCl (pH7.5) (Vetec, Cat No. V900483) 快速调节 pH 至 7-8，暂存。对于洗脱产物，可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换，如利用超滤管进行超滤浓缩，及溶液置换至所需的缓冲体系，或者利用分子排阻 (如 G-25 脱盐) 替换成所需的缓冲体系。

(2) 疏水层析精纯融合蛋白: 首先, 用缓冲液 20mM Tris pH 7.5 (Vetec, Cat No. V900483) 1M Na₂SO₄ (Sigma, Cat No. 239313) 按等体积稀释样品, Phenyl 650M (Toyopearl, Cat No. 0014478) 疏水层析柱用 5 倍柱体积的 0.5M NaOH (Sigma, Cat No. 71687) 再生, 然后用 10 倍柱体积的 20mM Tris pH 7.5 (Vetec, Cat No. V900483) 0.5M Na₂SO₄ (Sigma, Cat No. 239313) 清洗平衡。将稀释后的样品低流速进行上样, 以便与疏水柱结合, 控制流速使保留时间约 2min 或更长时间, 结合完毕后利用 5 倍柱体积的 20mM Tris pH 7.5 (Vetec, Cat No. V900483) 0.5M Na₂SO₄ (Sigma, Cat No. 239313) 冲洗层析柱至紫外吸收回落至基线水平。用洗脱缓冲液 20mM Tris pH 7.5 (Vetec, Cat No. V900483) 进行 0-100% 的梯度洗脱; 根据 SEC-HPLC (Column: TSKgel G3000SWXL, 5μm, Cat No. 008541) 纯度, 检测收集洗脱峰。经两步纯化后融合蛋白产量如表 9。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换, 如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系, 或者利用分子排阻 (如 G-25 脱盐) 替换成所需的缓冲体系。

表 9. 两步纯化后融合蛋白的质量参数

融合蛋白	表达产量 (mg/L)	纯度 (%) (SEC-HPLC)	理论分子量 (Da)	完整分子量 (Da) (LC/MS)
0051	150	99.7	21754.3	21755
0052	122	99.5	22551.6	22553
0053	156	99.	23008	23009
0054	70	99.7	21797.5	21798

两步纯化后, 获得了完整的高纯度融合蛋白, 并且本公开的 0051 和 0053 分子在 expiCHO 中瞬时转染的产量是相同条件下阳性对照分子 0054 的 2 倍。

实施例 10. 融合蛋白与不同种属血清白蛋白的亲和力测定

利用 Biacore T200 (GE Healthcare) 仪器测定 0051 与人、猴、大鼠、小鼠、犬、猪、兔和牛血清白蛋白的亲和力。阳性对照为 0054。使用人白蛋白 HSA (Sigma, Cat No. 126658), 猴白蛋白 (Abcam, Cat No. ab184894), 大鼠白蛋白 (Abcam, Cat No. ab198656), 小鼠白蛋白 (Abcam, Cat No. ab183228), 兔白蛋白 (Abcam, Cat No. ab188055) 和牛白蛋白 (Sigma, Cat No. B2064) 进行实验。

1. 使用抗 VHH 抗体偶联芯片进行亲和力测定

使用氨基偶联试剂盒 (GE, Cat No. BR-1000-50) 对 S 系列 CM5 传感芯片 (GE, Cat No. 29-1049-88) 进行抗 VHH 抗体 (MonoRab™ Rabbit Anti-Camelid VHH Cocktail, Genescript, Cat No. A02014) 的偶联。使用 10mM 醋酸钠 pH4.5 (GE, Cat No. BR-1003-50) 将抗体稀释到 10μg/mL。CM5 芯片经 EDC/NHS 活化后, 流经稀释好的抗 VHH 抗体, 使表面响应值达到约 5000RU, 再用乙醇胺封闭后待用。

各种属的白蛋白使用 1XHBS-EP (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20) 进行系列梯度稀释。使用偶联好的抗 VHH 抗体芯片

对待测融合蛋白分子进行捕获，响应值 30RU 左右，然后于芯片表面流经不同浓度的血清白蛋白 3 分钟，流速 50μL/min，解离时间 1-10 分钟（白蛋白种属不同解离时间不同），每个循环结束后使用 10mM 甘氨酸-盐酸 PH1.5（GE, Cat No. BR-1003-54）对芯片进行再生。利用 Biacore T200（GE）实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线，得到的数据选择合适的浓度点使用 BIAevaluation version 4.1 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合，得出亲和力数值，结果见表 10。

表 10. 融合蛋白与不同种属血清白蛋白的亲和力

白蛋白种类	融合蛋白	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
HSA	0051	5.45E+04	1.10E-03	2.02E-08
	0052	8.99E+04	8.67E-04	9.65E-09
	0053	9.23E+04	7.88E-04	8.54E-09
	0062	1.45E+05	7.90E-04	5.44E-09
	0063	1.47E+05	7.45E-04	5.07E-09
	0064	1.54E+05	8.60E-04	5.59E-09
	0065	8.23E+04	7.97E-04	9.68E-09
	0066	1.45E+05	7.78E-04	5.38E-09
	0054	3.57E+04	5.63E-04	1.58E-08
大鼠白蛋白	0051	3.72E+04	5.81E-03	1.56E-07
	0052	4.13E+04	5.99E-03	1.45E-07
	0053	4.08E+04	5.91E-03	1.45E-07
	0062	9.15E+04	7.23E-03	7.91E-08
	0063	9.41E+04	6.48E-03	6.88E-08
	0064	9.89E+04	5.79E-03	5.85E-08
	0065	3.57E+04	5.67E-03	1.59E-07
	0066	8.34E+04	6.95E-03	8.34E-08
	0054	6.15E+04	1.13E-02	1.83E-07

本公开设计的不同的融合蛋白与人、猴、大鼠和牛血清白蛋白的亲和力与阳性对照分子 0054 相当（数据未显示），表 10 示例性给出 HSA 和大鼠白蛋白结合结果。

2. 使用白蛋白偶联芯片进行亲和力测定

使用氨基偶联试剂盒（GE, Cat No. BR-1000-50）对 S 系列 CM5 传感芯片（GE, Cat. 29-1049-88）进行不同种属血清白蛋白的偶联。各种属白蛋白稀释到 2μg/mL。CM5 芯片经 EDC/NHS 活化后，流经稀释好的白蛋白，使表面响应值达到约 200（180 至 230）RU，之后再用乙醇胺封闭。空白对照通道同样需要进行 EDC/NHS 活化和乙醇胺封闭。

0051 和 0054 分子使用 1XHBS-EP（10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20）进行一系列梯度稀释：2000, 666.66, 222.22, 74.074, 24.69, 8.23, 2.74, 0.91, 0.305nM。0051 和 0054 不同浓度的样品分别流经白蛋白偶联通道和空白通道 3 分钟，流速 50μL/min，解离时间 4 分钟，每个循环结束后使用 10mM 甘氨酸-盐酸 PH1.5（GE, Cat. # BR-1003-54）对芯片进行再生。利用

Biacore T200 (GE) 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线, 得到的数据选择合适的浓度点使用 BIAevaluation version 4.1 软件以 Langmuir 1:1 结合模型进行拟合, 得出亲和力数值。

表 11. 与不同种属白蛋白的亲和力

白蛋白种类	分子	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
HSA	0051	4.91E+06	2.07E-04	4.22E-11
	0054	1.83E+06	1.81E-04	9.90E-11
大鼠白蛋白	0051	2.25E+06	4.39E-03	1.95E-09
	0054	2.31E+06	2.46E-03	1.06E-09
小鼠白蛋白	0051	1.24E+06	4.71E-02	3.79E-08
	0054	1.97E+06	2.70E-03	1.37E-09

5

0051 分子与人、猴、大鼠白蛋白的亲和力与阳性对照分子 0054 相当, 与小鼠和犬白蛋白的亲和力弱于阳性对照分子 0054 (数据未显示)。表 11 示例性给出 HSA、大鼠、小鼠结果。

10 实施例 11. 融合蛋白体外细胞生物活性

1、融合蛋白在 THP-1 细胞中的生物活性

THP-1 是人外周血单核细胞 (Procell, Cat No. CL-0233), 内源性表达的 RXFP1 受体, 松弛素与 THP-1 细胞上的受体结合, 诱导 THP-1 细胞产生 cAMP。因此, 本实例通过检测 cAMP 的产生量来测定融合蛋白的体外活性。本实施例使用均相
15 时间分辨荧光 (HTRF) cAMP-Gs Dynamic 试剂盒 (Cisbio, Cat No. 62AM4PEB) 并基于制造商的方案测定 cAMP 水平。0054、800814 (源自 WO2015067113A1) 和 0060 (WO2021255127A1, RELAX0023) 用于阳性对照。

>800814 的 A 链

DLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO: 45)

20 >800814 的 B 链

DSWMEEVIKLCGRDLVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO: 46)

>0060 的 A 链

DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
25 ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHN
HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
(SEQ ID NO: 47)

>0060 的 B 链

30 DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW

ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIA
ICGMSTWS (SEQ ID NO: 48)。

实验方法如下：细胞 THP-1 在 37℃、5%CO₂ 条件下培养，培养基为 RPMI1640
+ 0.05mM b-巯基乙醇+10%FBS+1%青霉素-链霉素双抗。实验当天，对数生长期的
THP-1 细胞经过离心收集后，重新悬浮在无血清培养基中，调整细胞密度为 4×10⁶
个细胞/mL，并以每孔 50μL 的体积（20,000 个细胞/孔）转移至 96 孔测定板（Cisbio,
Cat No. 66PL96025）。将待测融合蛋白样品和作为阳性对照的 0054、0060、800814
在单独的 U 底 96 孔板中使用试剂盒中的 Stimulation Buffer 1 进行 10 倍倍比系列
稀释，并以每孔 5μL 的体积转移至含有 THP-1 细胞的 96 孔测定板中，在 37℃、
5% CO₂ 条件下培养 30 分钟，未添加待测样品的细胞作为参考对照。使用试剂盒
中的 Lysis & Detection Buffer 1 稀释 cAMP-d2（受体荧光基团）和 anti-cAMP-cryptat
（供体荧光基团），将 cAMP-d2 以每孔 5μL 的体积添加到 96 孔测定板中除空白对
照孔外的所有孔中，之后将 anti-cAMP-cryptat 添加到所有孔中，避光室温孵育 1 小
时。然后在 Tecan（Infinite 200 PRO）上使用 620nm 和 665nm 波长进行读数，用
665nm 处荧光强度/620nm 处荧光强度 X10,000 的比率表示信号强度，使用 Graphpad
Prism 进行非线性拟合绘制 cAMP 浓度曲线，得到待测样品及对照诱导 THP-1 细胞
产生 cAMP 的 EC₅₀ 值（nM）。结果见表 12，图 6A 和图 6B。

表 12. 融合蛋白体外活性（THP1 细胞检测）

分子	无 HSA	1% HSA
	EC ₅₀ （nM）	EC ₅₀ （nM）
800814	0.2	0.32
0060	0.32	0.61
0054	10.3	15.82
0051	3.83	28.38
0052	5.22	21.52
0053	4.23	25.76
0062	4.02	23.06
0063	4.15	39.35
0064	8.5	19.75
0065	2.08	23.01
0066	3.49	23.47

结果显示，本公开的各融合蛋白体外活性与阳性对照分子 0054 相当。

2、融合蛋白在过表达 RXFP 受体的 CHO-K1 细胞中生物活性

（1）瞬时转染 RXFP1 和 RXFP2 受体的 CHO-K1 细胞的制备

使用 Lipofectamine 2000（Thermo Fisher, Cat No. 11668019）对 CHO-K1 细胞
（CCTCC, Cat No. GDC0018）进行瞬时转染，提前将 CHO-K1 细胞以 6×10⁵ 细胞
/孔的浓度重悬于 6 孔板中，在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 12 小时后移去原培养基，

加入 1.5mL 的无血清 Ham's F-12K (Kaighn's) 培养基 (Gibco, Cat No. 21127030)。对于每孔细胞：取两支试管，试管 1 将 3μg 相应质粒 DNA (人、狗、食蟹猴、大鼠、小鼠 RXFP1 受体或人 RXFP2 受体 DNA 质粒) 溶于 250μL Opti-MEM I 减血清培养基中 (Gibco, Cat No. 31985070)，试管 2 将 3μL 的 Lipofectamine 2000 试剂溶于 250μL Opti-MEM I 减血清培养基中，室温孵育 5 分钟后将试管 1 中试剂加入到试管 2 中，轻柔混匀，室温孵育 20 分钟，逐滴加入到 6 孔板中 (500 μL/孔)，转染 6 小时后换成完全培养基，继续培养 24 小时，进行后续实验。

(2) 融合蛋白对其受体的体外激活作用

本实施例使用均相时间分辨荧光 (HTRF) cAMP-Gs Dynamic 试剂盒 (Cisbio, Cat No. 62AM4PEB) 并基于制造商的方案测定 cAMP 水平。具体方法如下：

实验当天，将转染了人、狗、食蟹猴、大鼠或小鼠 RXFP1 受体的 CHO-K1 细胞经过离心收集后，重新悬浮在无血清培养基中，调整细胞密度为 4×10^6 细胞/mL，并以每孔 50μL 的体积 (20,000 个细胞/孔) 转移至 96 孔测定板 (Cisbio, Cat No. 66PL96025)。将待测样品 0051 和作为阳性对照的 0054、0060、800814 在单独的 U 底 96 孔板中使用试剂盒中的 Stimulation Buffer 1 进行 10 倍倍比系列稀释，并以每孔 5μL 的体积转移至含有 THP1 细胞的 96 孔测定板中，在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 30 分钟，未添加待测样品的细胞作为参考对照。使用试剂盒中的 Lysis & Detection Buffer 1 稀释 cAMP-d2 (受体荧光基团) 和 anti-cAMP-cryptat (供体荧光基团)，将 cAMP-d2 以每孔 5μL 的体积添加到 96 孔测定板中除空白对照孔外的所有孔中，之后将 anti-cAMP-cryptat 添加到所有孔中，避光室温孵育 1 小时。然后在 Tecan (Infinite 200 PRO) 上使用 620nm 和 665nm 波长进行读数，用 665nm 处荧光强度/620nm 处荧光强度 $\times 10,000$ 的比率表示信号强度，使用 Graphpad Prism 进行非线性拟合绘制 cAMP 浓度曲线，得到融合蛋白及对照诱导 CHO-K1 受体过表达细胞产生 cAMP 的 EC₅₀ 值 (μM)。结果见表 13 和图 6B。

表 13. 融合蛋白体外活性 (CHO-K1 受体过表达细胞)

EC ₅₀ (nM)	人 Rxfp1	犬 Rxfp1	食蟹猴 Rxfp1	大鼠 Rxfp1	小鼠 Rxfp1	人 Rxfp2
800814	5.621	156.5	5.864	1.878	4.729	252.3
0054	25.65	3039	21.78	10.48	23.41	1347
0051	28.34	2207	25.12	21.11	21.67	1246
0060	39.46	1067	19.38	20.02	38.78	无活性

结果显示，0051 分子体外活性与对照分子 0054 和 0060 相当。

实施例 12. 融合蛋白在大鼠中的药代动力学

雄性 SD 大鼠，4-6 周龄，体重在 200-250g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养期间自由摄食饮水，12/12 小时光/暗周期调节，温度 16-26℃，相

对湿度 40-70 %。动物到达设施后，适应性喂养不小于 7 天。实验开始前一天，对实验动物进行编号，随机分组，一共四组，每组 3 只。实验当天，四组实验动物分别静脉注射或者皮下注射受试药物 0051 和 0054。给药剂量为 4mg/kg，注射体积均为 5mL/kg。

5 静脉注射给药方式于给药前及给药后 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192 和 240 小时各时间点采血。皮下注射给药方式于给药前及给药后 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192 和 240 小时各时间点采血。每只动物取全血 0.03mL，EDTA-K2 抗凝，取血后立即 4500rpm 离心 5min，取上清于 EP 管中，-20° C 保存，实验结束后转到-80° C 保存。

10 血浆中 0051 和 0054 药物浓度使用 ELISA 方法进行检测：使用 0.4 µg/mL Anti-Relaxin 2/RLN2 抗体（Abcam, Cat No. EPR21832-15）进行包被，以 100 µL/孔的体积加入 96 孔酶标板（Corning, Cat No. 9018），于 4°C放置过夜 16-20 小时。弃去液体后，用 PBST（pH7.4，0.05% Tween-20）缓冲液洗板三次后，加入 4%牛血清白蛋白溶液（300 µL/孔），室温下孵育 1 小时进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液洗板 3 次后，加入使用稀释液：含有 1%大鼠血浆的 Casin
15 Blocker（Thermo, Cat No. 37528）进行适当稀释的不同时间点的大鼠血浆，37°C孵育 1 个小时。孵育结束后，弃去板中的反应液，用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100µL HRP 标记的兔抗骆驼 Cocktail VHH 的二抗（Genescript, Cat No. A02016, 无 BSA）（1:5000 稀释），37°C孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，加入 100µL TMB（Sigma, Cat No. T0440）显色底物进行显色，使用 1M 硫酸终止反应，用 SpectraMax M5
20 酶标仪在 OD450nm 处读取吸收值。

 数据结果使用 Graphpad Prism 软件分析，血浆样品中的 0051 和 0054 分子浓度根据标准曲线进行计算，大鼠结果如图 7A 所示。将计算出的浓度使用 PK solver 进行半衰期的计算，结果如表 14 所示。此外，我们以类似方法检测了小鼠药代动力学，结果显示，如图 7B，0051 分子的 AUC 暴露量和 t_{1/2} 与阳性对照分子 0054
25 相当。

表 14. 大鼠中药代动力学参数

PK 参数	大鼠			
	IV		SC	
	0051	0054	0051	0054
AUC (0-t) _ (h*nmol/L)	153397	327981	78268	97492
AUC (inf) _ (h*nmol/L)	157174	331235	83492	100424
CLp_ (mL/min/kg)	0.02	0.01	/	/
T1/2_ (h)	44.3	40.4	54.4	45
AUClast/剂量	767	1640	/	/
MRT (inf) _ (h)	57.5	34.7	96	77

MRTlast	51.4	32	81	70
Vdss (L/kg)	0.07	0.02	/	/
Tmax	/	/	48	32
Cmax	/	/	948	1536
生物利用度%	/	/	53.1	30.3

大鼠的 PK 结果显示，IV 给药后，0054 的 AUC 大约为 0051 的 2 倍，2 个分子的 t1/2 差异不大，SC 给药后 0051 的生物利用度高于 0054。与 0054 分子相比，0051 的表观分布容积（Vdss）更大，表明分子有更好的组织细胞屏障透过性；此外，0051 有更长的表观滞留时间（MRT），预计分子体内发挥药效作用的时间更长；此外皮下注射 SC 给药后，0051 的生物利用度（Bioavailability%）明显高于 0054。因此 0051 有更优的药动力学性质。

实施例 13. 融合蛋白对小鼠心肌肥厚的作用

通过皮下植入微型渗透压泵（Alzet 1002）输注异丙肾上腺素（ISO, Sigma, Cat.# I5627）制备 C57BL/6J 小鼠（Charles River Laboratories）心肌肥厚模型，将 ISO 溶于含有 0.002%抗坏血酸钠（Sigma, Cat.# 11140）的 PBS 缓冲液（Servicebio, Cat.# G4202）中，使其浓度为 146mg/mL（根据小鼠平均体重 25.8g 计算），输注浓度为 15mg/kg/d，连续输注 14 天制备病理模型，第 14 天将渗透压泵取出，模型对照组 1 进行安乐死并取材，其余小鼠随机分组，开始皮下注射融合蛋白或对照分子，给药剂量和分组如表 15。

表 15. 给药剂量与分组信息

分组	数量	心肌肥厚模型制备	给药剂量
假手术	5	仅进行假手术	-
空白对照	5	空白对照（PBS 含 0.002%抗坏血酸）	PBS（S.C, Q3d）
模型对照 1	5	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	-
模型对照 2	16	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	PBS（S.C, Q3d）
0051 低剂量	17	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	2.5mg/kg（S.C, Q3d）
0051 高剂量	12	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	7.4mg/kg（S.C, Q3d）
0054 低剂量	5	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	2.5mg/kg（S.C, Q3d）
0054 高剂量	12	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	7.4mg/kg（S.C, Q3d）
0060 高剂量	12	15mg/kg/d ISO 于空白对照中	20mg/kg（S.C, Q7d）

在研究结束时，动物禁食 6 小时后测量小鼠体重，并对小鼠进行安乐死，测量心脏重量和胫骨长度。通过心脏重量和胫骨长度的比值判断心肌肥厚的情况。如图 8 和表 16。

表 16. 小鼠 ISO 心肌肥厚模型心脏重量和胫骨长度比

分组	平均值	P 值
假手术	7.38	/

空白对照	7.34	/
模型对照 1	8.98	0.0129
模型对照 2	7.34	/
0051 低剂量	6.83	0.0345
0051 高剂量	6.63	0.0078
0054 低剂量	7.36	0.9548
0054 高剂量	6.86	0.05
0060 高剂量	6.87	0.0563

以上计量数据以均数±标准差（mean±SD）表示，两组比较采用 Student t test 检验, *p<0.05、**p<0.01 vs 模型对照 2 组；#p<0.05 vs 空白对照组。

小鼠输注 ISO 可显著引起心肌肥厚，给予本公开的融合蛋白治疗可以逆转 ISO 引起的心肌肥厚至基线水平，所需剂量显著低于对照 0060。

权利要求书

1. 融合蛋白，其包含血清白蛋白结合结构域和松弛素或其类似物，
所述血清白蛋白结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白
5 白单一可变结构域包含选自 1) -3) 任一项的 CDR1、CDR2 和 CDR3：
1) 如 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
2) 如 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
3) 分别如 SEQ ID NO: 64、58、59 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定
10 义的；
优选地，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别如 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所示，
或如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示。
2. 如权利要求 1 所述的融合蛋白，其中所述免疫球蛋白单一可变结构域经选
15 自以下任一项改造的：骆驼源或人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗
体脱酰胺、降低抗体聚集、降低抗体异构化、或其组合；
优选地，所述人源化改造的人种系基因的框架区模板来源于 IGHV3-23。
3. 如权利要求 1-2 任一项所述的融合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域
20 在以下位置中的至少一处包含氨基酸突变：第 20、23、27、29、30、37、44、45、
47、49、74、78、83 和 84 位；
所述位置基于 EU 编号系统；
优选地，包含选自以下的至少一种氨基酸突变：20V、23V、27N、29Y、30L、
37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 或 84P；
25 更优选地，包含选自如下任一的氨基酸突变组合：
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G；
20V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G；
23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、74A；
30 27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、78V；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、83Q、84P；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、84P；
30L、37F、44E、45R、47G、84P；或
35 30L、37F、44E、45R、47G。

4. 如前权利要求任一项所述的融合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域：
包含 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，或

包含 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

5

5. 如前权利要求任一项所述的融合蛋白，所述免疫球蛋白单一可变结构域为 VHH。

6. 如前权利要求任一项所述的融合蛋白，所述松弛素或其类似物包含 A 链和 B 链，所述 A 链具有 SEQ ID NO: 31、50、52、54、56 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述 B 链具有 SEQ ID NO: 32、51、53、55、57 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

优选地，所述 A 链和 B 链选自如下 1) -7) 的任一组合：

- 1) SEQ ID NO: 31 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 32 所示的 B 链；
- 2) SEQ ID NO: 50 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 51 所示的 B 链；
- 3) SEQ ID NO: 52 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 53 所示的 B 链；
- 4) SEQ ID NO: 54 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 55 所示的 B 链；
- 5) SEQ ID NO: 31 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 53 所示的 B 链；
- 6) SEQ ID NO: 52 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 32 所示的 B 链；
- 7) SEQ ID NO: 56 所示的 A 链和 SEQ ID NO: 57 所示的 B 链。

7. 如权利要求 6 所述的融合蛋白，其包含如式 (I) 至式 (IV) 任一所示或任意组合的多肽：

B-L ₁ -A-L ₂ -VHH	式 (I)
A-L ₁ -B-L ₂ -VHH	式 (II)
VHH-L ₂ -B-L ₁ -A	式 (III)
VHH-L ₁ -A-L ₁ -B	式 (III)

其中，

A 是松弛素或其类似物的 A 链，

B 是松弛素或其类似物的 B 链，

L₁ 和 L₂ 是连接子，

L₁ 和 L₂ 各自独立地存在或不存在。

8. 如权利要求 7 所述的融合蛋白，其中，

L₁ 包含选自 (GGGGQ)_n、(GGGQ)_n、(PGPQ)_n、(PGPA)_n、(G_XS_Y)_Z 所示的氨基酸序列，所述 n 选自 1-10 的整数，所述 X、Y、Z 独立的选自 1-10 的整数；

L₂ 包含选自 (G_XS_Y)_Z、KR、SEQ ID NO: 60-63、65-66 任一所示的氨基酸序列, 所述 X、Y、Z 独立的选自 1-10 的整数;

优选地, L₁ 包含 SEQ ID NO: 33-35 任一所示的氨基酸序列;

优选地, L₂ 包含 SEQ ID NO: 49 所示的氨基酸序列。

5

9. 如前权利要求任一项所述的融合蛋白, 其包含 SEQ ID NO: 36-43 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

10. 如前权利要求任一项所述的融合蛋白, 其为单链蛋白、二聚体或多聚体蛋白。

11. 血清白蛋白结合分子, 其包含免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含选自 1) -3) 任一项的 CDR1、CDR2 和 CDR3:

- 1) 如 SEQ ID NO: 6、18-27 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3,
2) 如 SEQ ID NO: 7 所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3,
3) 分别如 SEQ ID NO: 64、58、59 所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3,
其中, 所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的;

优选地, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别如 SEQ ID NO: 8、9 和 10 所示, 或如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示。

12. 如权利要求 11 所述的血清白蛋白结合分子, 其中所述免疫球蛋白单一可变结构域经选自以下任一项改造的: 骆驼源或人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺、降低抗体聚集、降低抗体异构化、或其组合;

优选地, 所述人源化改造的人种系基因的框架区模板来源于 IGHV3-23。

13. 如权利要求 11-12 任一项所述的血清白蛋白结合分子, 所述免疫球蛋白单一可变结构域在以下位置中的至少一处包含氨基酸突变: 第 20、23、27、29、30、37、44、45、47、49、74、78、83 和 84 位;

所述位置基于 EU 编号系统;

优选地, 包含选自以下的至少一种氨基酸突变: 20V、23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A、74A、78V、83Q 或 84P;

更优选地, 包含选自如下任一氨基酸突变组合:

- 27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G;
20V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G;
23V、27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G;
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、74A;

27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、78V；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、49A；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、83Q、84P；
27N、29Y、30L、37F、44E、45R、47G、84P；
5 30L、37F、44E、45R、47G、84P；或
30L、37F、44E、45R、47G。

14. 如权利要求 11-13 任一项所述的血清白蛋白结合分子，所述免疫球蛋白单一可变结构域：

10 包含 SEQ ID NO：6、18-27 任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，或
包含 SEQ ID NO：7 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

15 15. 如权利要求 11-14 任一项所述的血清白蛋白结合分子，所述免疫球蛋白单一可变结构域为 VHH。

16. 如权利要求 11-15 任一项所述的血清白蛋白结合分子，其还包含人免疫球蛋白 Fc 区或组氨酸标签；

20 优选地，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。

17. 如权利要求 11-16 任一项所述的血清白蛋白结合分子，其还包含一种或多种治疗剂或诊断剂，

优选地，所述治疗剂或诊断剂与所述免疫球蛋白单一可变结构域共价连接或融合；

25 25 优选地，所述治疗剂或诊断剂选自以下任一项：治疗性或诊断性蛋白、多肽、核酸、小分子化合物。

18. 如权利要求 11-17 中任一项所述的血清白蛋白结合分子，其具有选自以下的至少一项的活性：

30 (a) 以 $\leq 1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，优选 $\leq 1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 K_D 值结合人血清白蛋白；
(b) 未检测到阻断血清白蛋白与 FcRn 的结合；
(c) 当包含治疗剂或诊断剂时，延长所述治疗剂或诊断剂的血浆半衰期。

35 19. 多核苷酸，其编码权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白，或权利要求 11-18 任一项所述的血清白蛋白结合分子。

20. 载体，其包含或表达权利要求 19 所述的多核苷酸。

21. 宿主细胞，其包含或表达权利要求 20 所述的载体。
22. 生产或制备权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白或权利要求 11-18 任一项
5 所述的血清白蛋白结合分子的方法，包括步骤：
培养权利要求 22 的宿主细胞；
回收所述融合蛋白或血清白蛋白结合分子，以及
任选地，纯化和/或修饰所述融合蛋白或血清白蛋白结合分子。
- 10 23. 延长治疗剂或诊断剂血浆半衰期的方法，其包括：
将权利要求 11-18 任一项中所定义的免疫球蛋白单一可变结构域与所述治疗
剂或诊断剂连接或融合。
24. 药物组合物，其包含：
15 权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白、权利要求 11-18 任一项所述的血清白
蛋白结合分子、权利要求 19 所述的多核苷酸或权利要求 20 所述的载体；
优选地，所述药物组合物进一步包含一种或多种药学上可接受的载体、稀释
剂、缓冲剂或赋形剂。
- 20 25. 权利要求 1-10 任一项所述的融合蛋白用于制备治疗、预防疾病的药物中的
用途；
优选地，所述疾病为纤维化疾病或心血管疾病；
更优选地，所述心血管疾病为心脏衰竭或心肌肥厚。
- 25 26. 权利要求 11-18 任一项所述血清白蛋白结合分子在制备用于诊断、治疗、
预防疾病的药物中的用途。

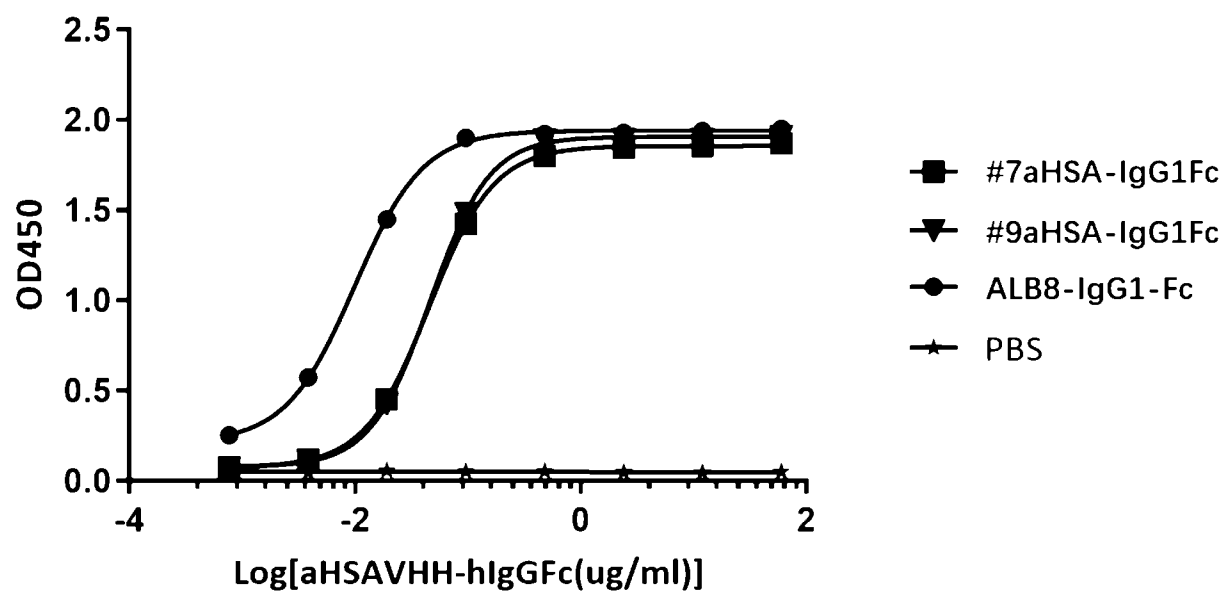


图 1A

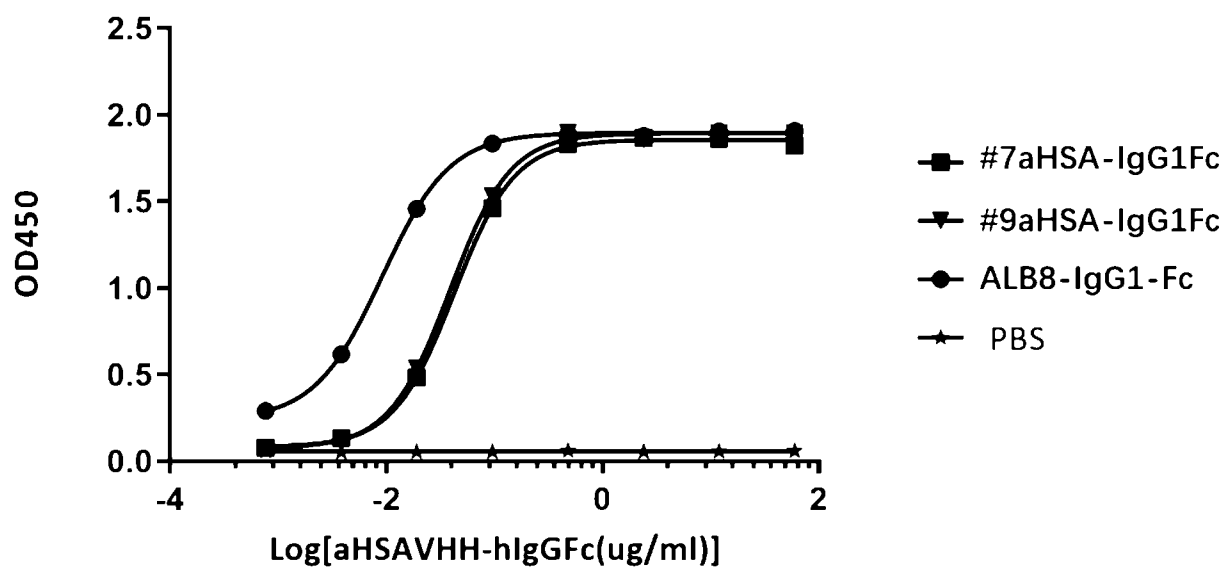


图 1B

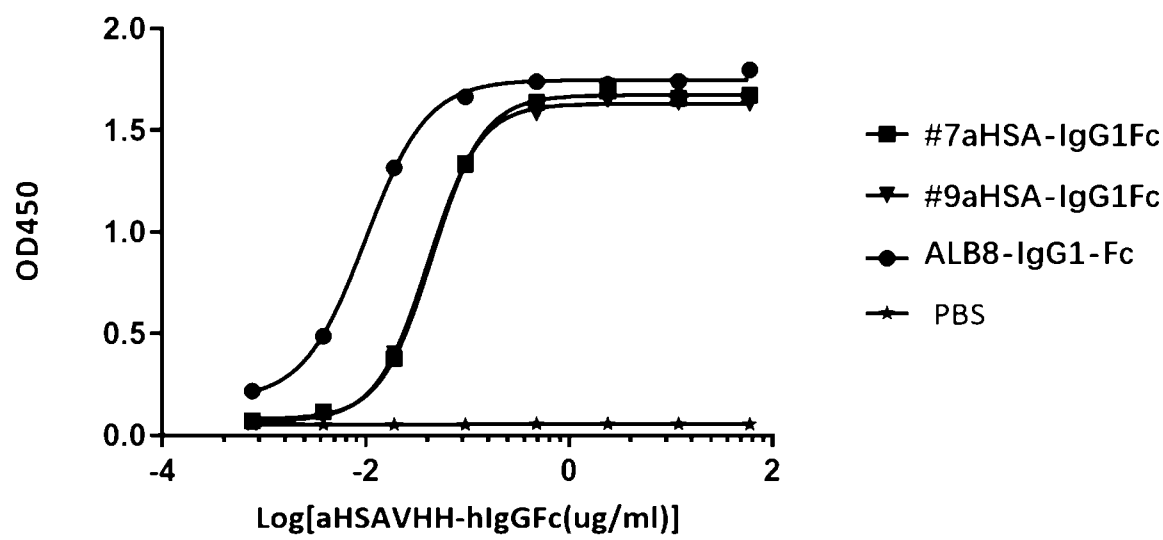


图 1C

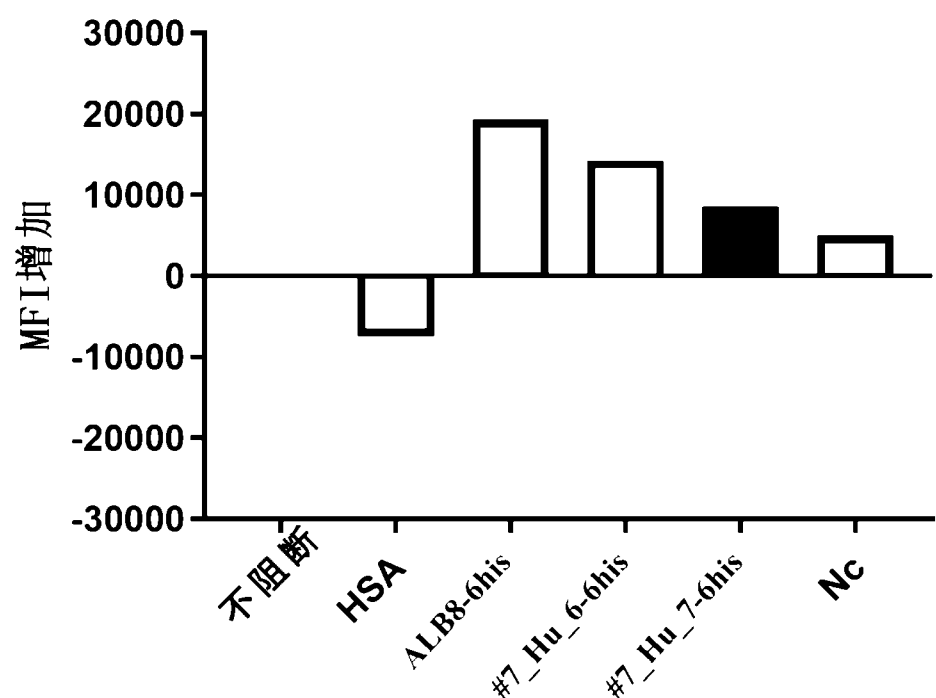


图 2A

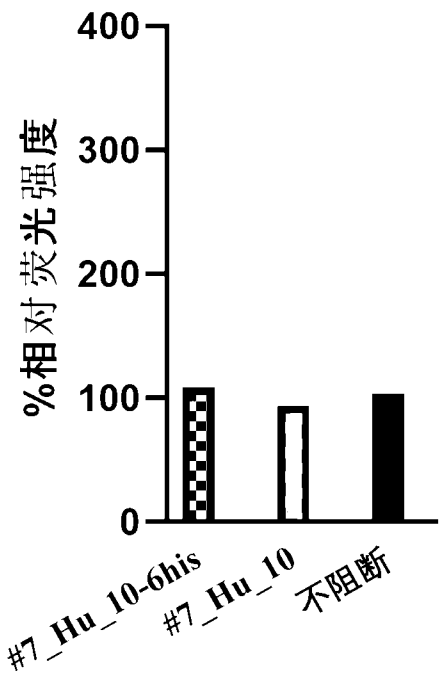


图 2B

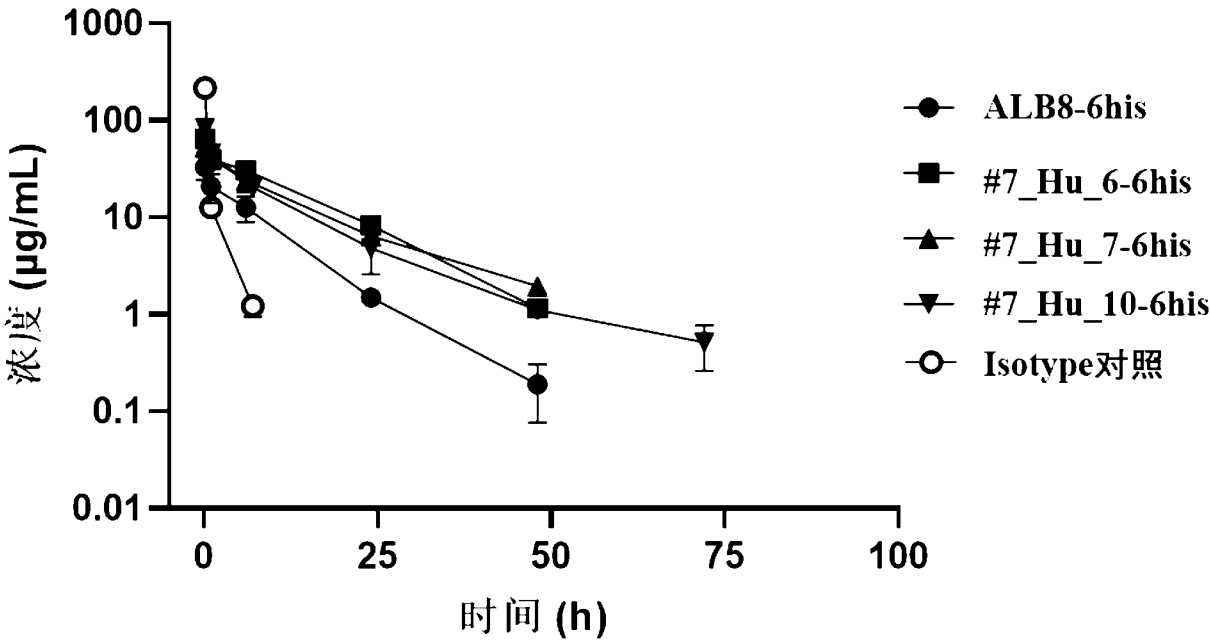


图 3

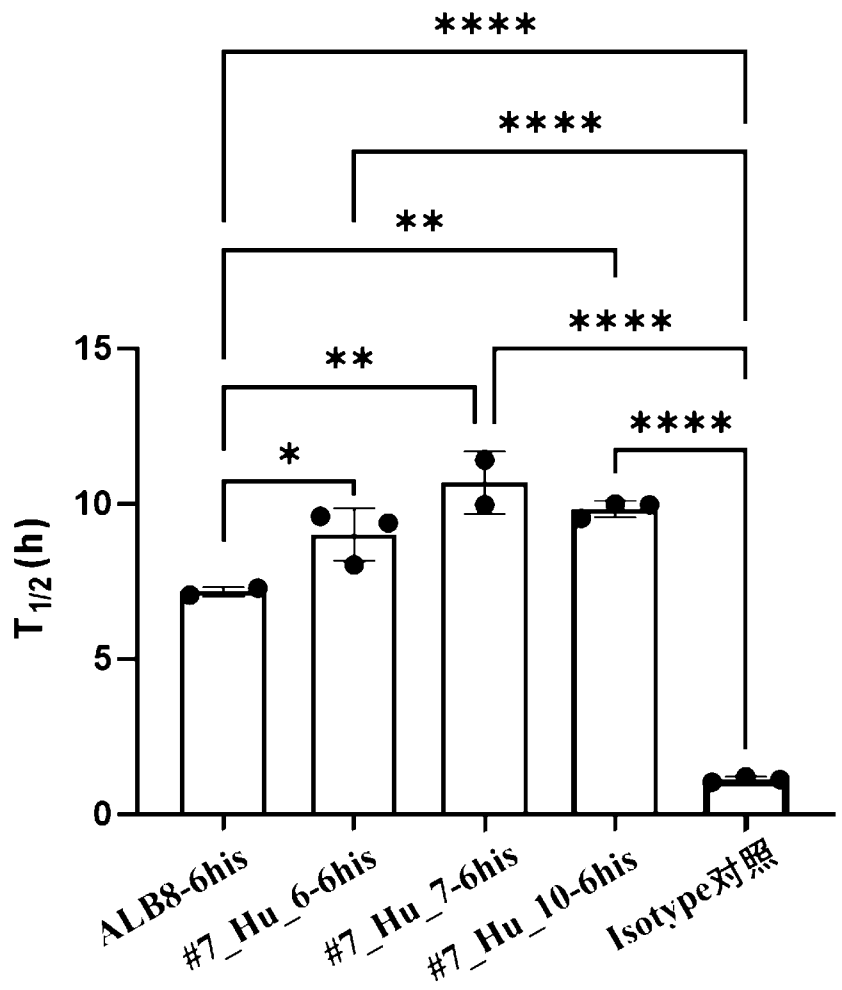


图 4A

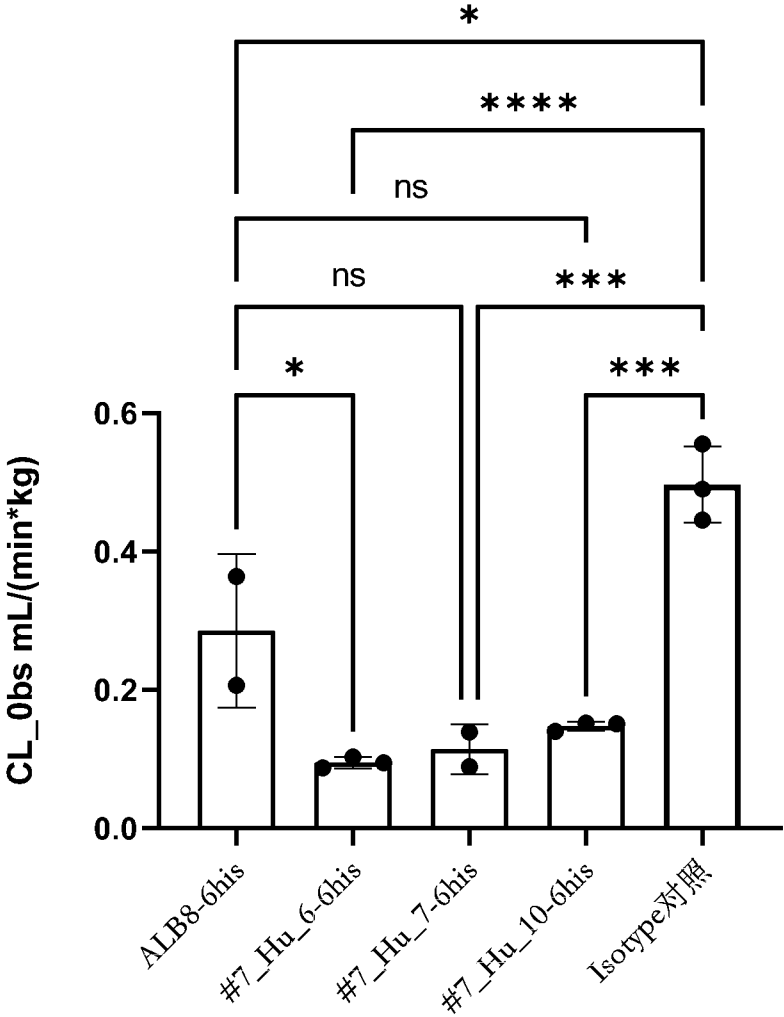


图 4B

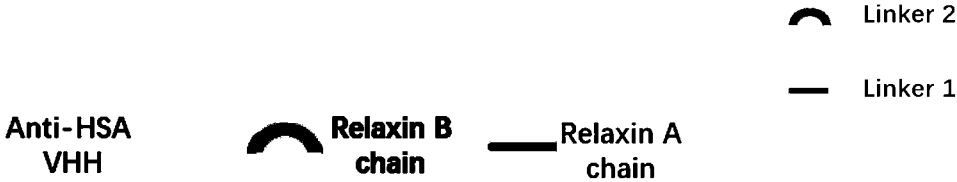


图 5

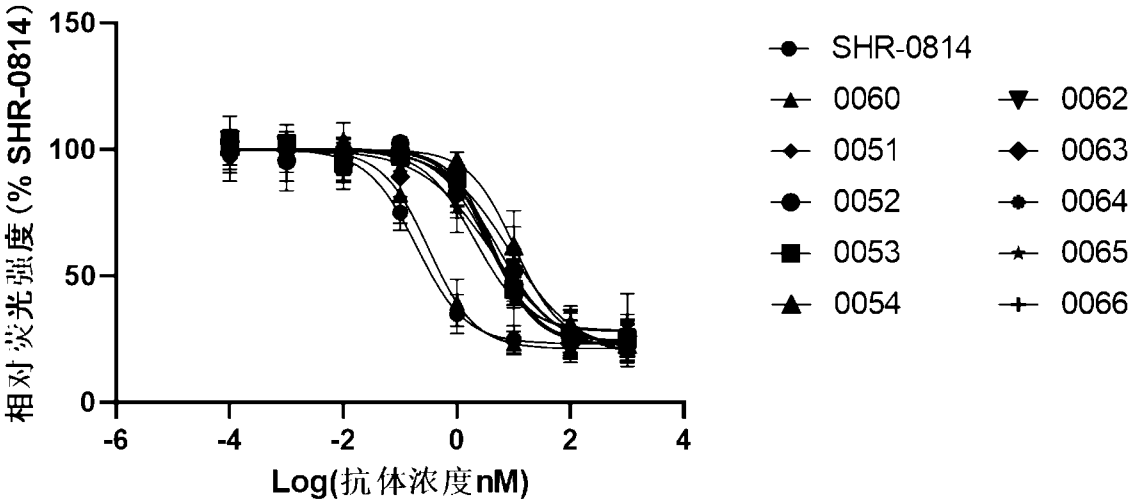


图 6A

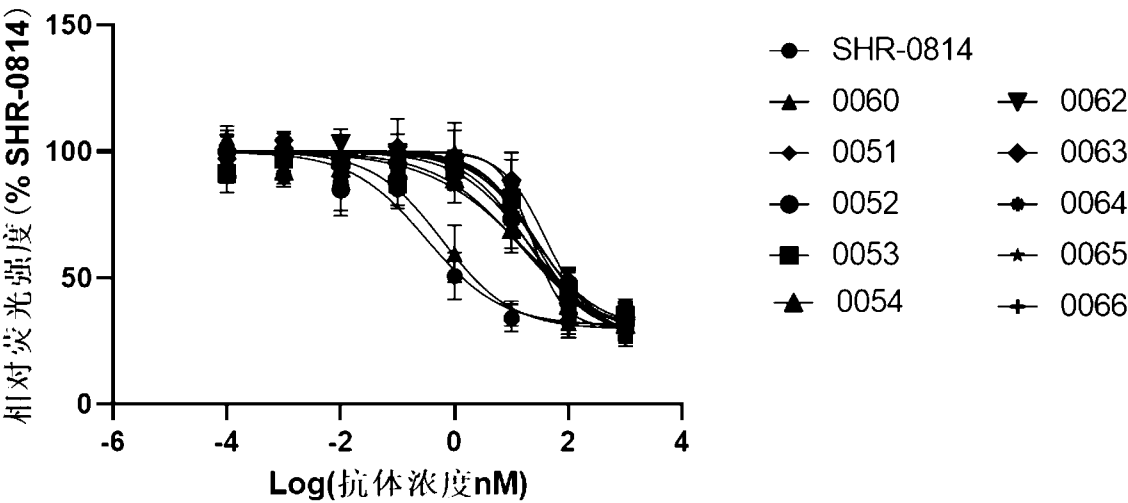


图 6B

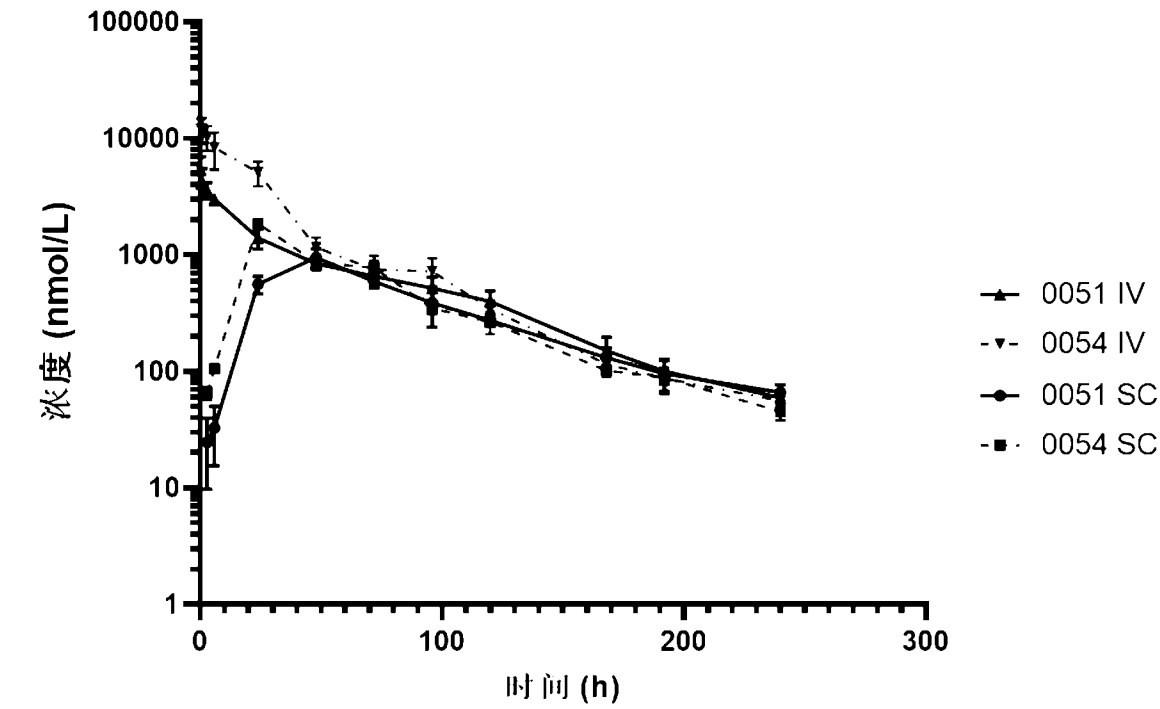


图 7A

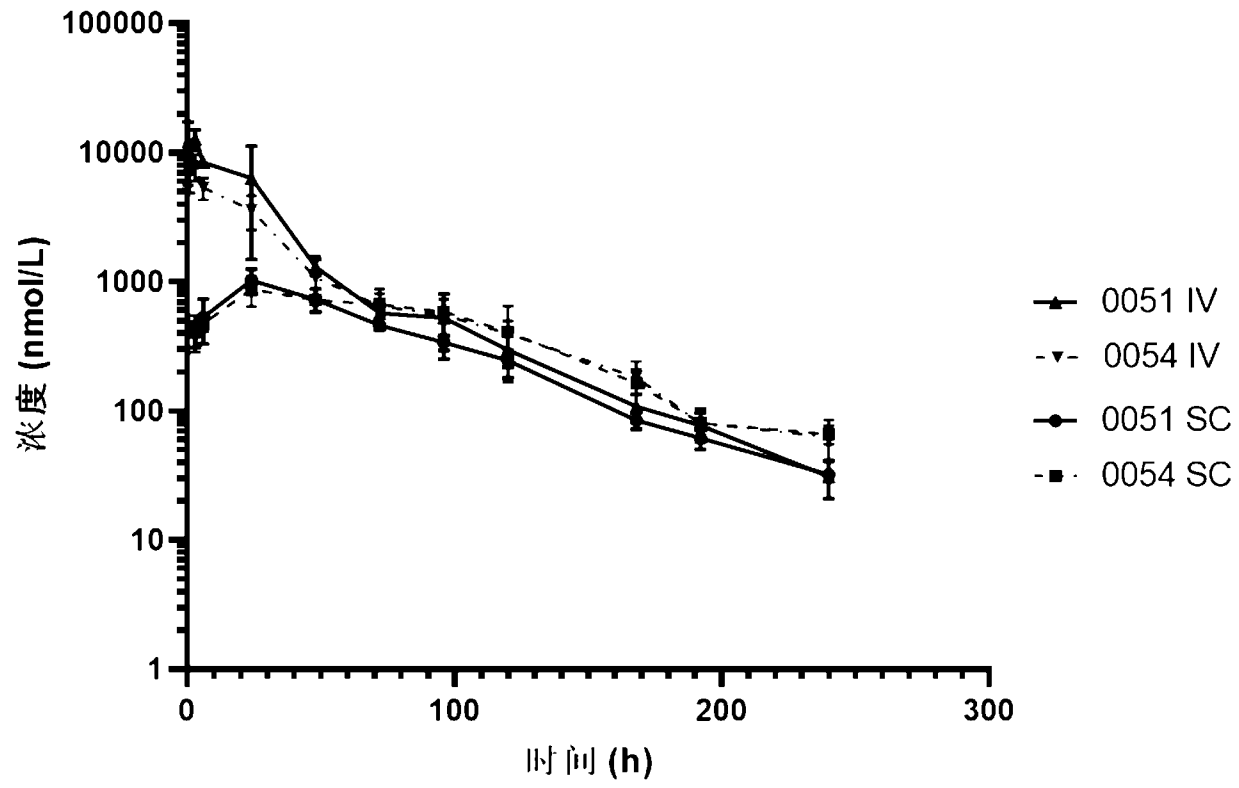


图 7B

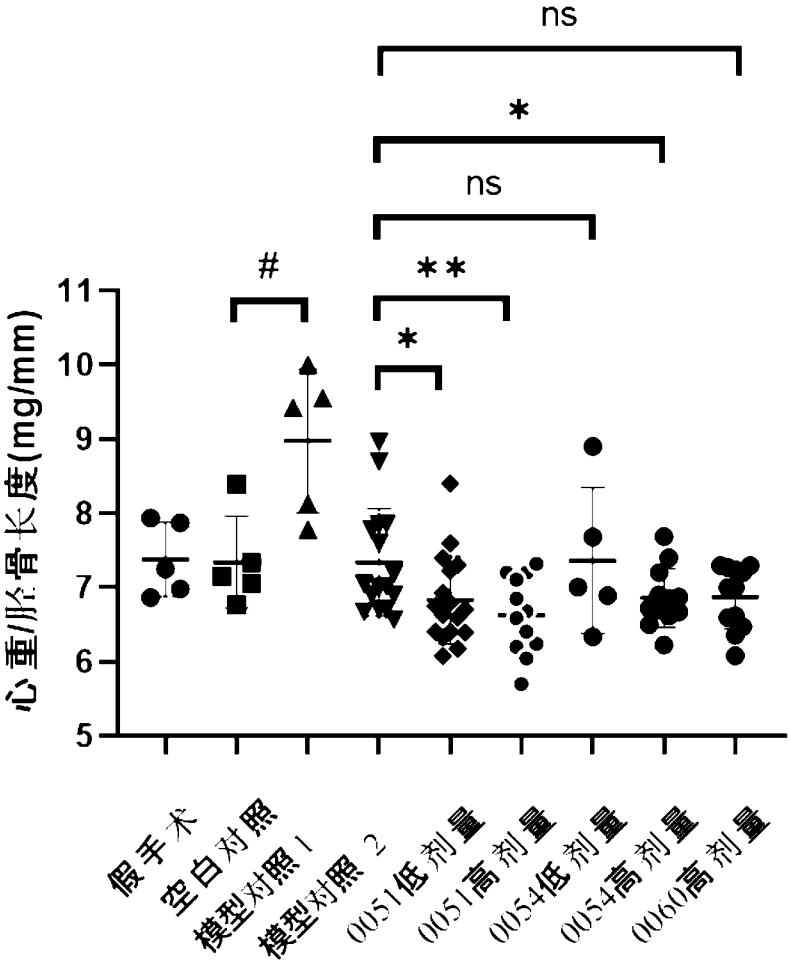


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i;
A61K39/395(2006.01)i; A61P9/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, OETXT, VEN, VCN, WPABS, WPABSC, CNKI, 万方资源数据库, WANFANG Resource Database, Web of Science, Pubmed: 血清白蛋白, 抗体, HSA, 松弛素, relaxin, 融合蛋白, 重组蛋白; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, STN, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 8-13, 58-59, 60, EMBL and searched sequences: SEQ ID NOs: 8-13, 58-59 and 60.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103649116 A (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 19 March 2014 (2014-03-19) claims 1-15	1-26
A	CN 112851805 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 28 May 2021 (2021-05-28) claims 1-40	1-26
A	CN 112409480 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26 February 2021 (2021-02-26) abstract, and claims 1-29	1-26
A	CA 2766160 A1 (MEDIMMUNE LLC AND BOARD OF REGENTS) 08 August 2002 (2002-08-08) claims 1-51	1-26
A	US 2008260757 A1 (DOMANTIS LTD.) 23 October 2008 (2008-10-23) claims 1-53	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 July 2023

Date of mailing of the international search report

13 August 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092214**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019352366 A1 (MEDIMMUNE, LLC; MEDIMMUNE LTD.) 21 November 2019 (2019-11-21) claims 1-14	1-26
A	JP 2014529293 A (BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH) 06 November 2014 (2014-11-06) abstract	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092214

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/092214

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103649116	A	19 March 2014	IL	229753	A0	30 January 2014
				CA	2840944	A1	17 January 2013
				BR	112014000474	A2	21 February 2017
				WO	2013007563	A1	17 January 2013
				KR	20140039257	A	01 April 2014
				AU	2012283235	A1	09 January 2014
				JP	2014529293	A	06 November 2014
				TW	201317259	A	01 May 2013
				MX	2014000316	A	19 February 2014
				RU	2014104302	A	20 August 2015
				AR	087070	A1	12 February 2014
				EP	2729494	A1	14 May 2014
				US	2014148390	A1	29 May 2014
CN	112851805	A	28 May 2021	None			
CN	112409480	A	26 February 2021	None			
CA	2766160	A1	08 August 2002	ES	2357756	T3	29 April 2011
US	2008260757	A1	23 October 2008	WO	2005118642	A2	15 December 2005
				WO	2005118642	A3	23 March 2006
				AU	2005250216	A1	15 December 2005
				AU	2005250216	B2	10 December 2009
				CA	2569240	A1	15 December 2005
				BRPI	0511755	A	02 January 2008
				IL	179633	A0	15 May 2007
				KR	20070039911	A	13 April 2007
				US	8921528	B2	30 December 2014
				KR	20120133403	A	10 December 2012
				EP	1784427	A2	16 May 2007
				JP	2012135311	A	19 July 2012
				JP	2008500830	A	17 January 2008
				TW	200607523	A	01 March 2006
				EP	2740743	A2	11 June 2014
				EP	2740743	A3	19 August 2015
				EA	200602183	A1	29 June 2007
				EA	012622	B1	30 October 2009
				MXPA	06014031	A	08 October 2007
				US	2015064185	A1	05 March 2015
US	2019352366	A1	21 November 2019	WO	2018138170	A1	02 August 2018
				US	11192931	B2	07 December 2021
				EP	3574004	A1	04 December 2019
				US	2022073584	A1	10 March 2022
				JP	2020505029	A	20 February 2020
JP	2014529293	A	06 November 2014	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/092214

A. 主题的分类 C07K16/18(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P9/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, DWPI, ENTXT, ENTXTC, OETXT, VEN, VCN, WPABS, WPABSC, CNKI, 万方资源数据库, Web of Science, Pubmed和关键词: 血清白蛋白, 抗体, HSA, 松弛素, relaxin, 融合蛋白, 重组蛋白; 中国专利生物序列检索系统, STN, Genbank, EMBL和检索的序列: SEQ ID NO: 8-13, 58-59, 60。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103649116 A (拜耳知识产权有限责任公司) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 权利要求1-15	1-26
A	CN 112851805 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2021年5月28日 (2021 - 05 - 28) 权利要求1-40	1-26
A	CN 112409480 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 摘要, 权利要求1-29	1-26
A	CA 2766160 A1 (MEDIMMUNE LLC AND BOARD OF REGENTS) 2002年8月8日 (2002 - 08 - 08) 权利要求1-51	1-26
A	US 2008260757 A1 (DOMANTIS LTD) 2008年10月23日 (2008 - 10 - 23) 权利要求1-53	1-26
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年7月3日		国际检索报告邮寄日期 2023年8月13日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		授权官员 李颖 电话号码 (+86) 010-62412262

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2019352366 A1 (MEDIMMUNE LLC;MEDIMMUNE LTD;) 2019年11月21日 (2019 - 11 - 21) 权利要求1-14	1-26
A	JP 2014529293 A (B a y e r I n t e l l e c t u a l P r o p e r t y G m b H) 2014年11月6日 (2014 - 11 - 06) 摘要	1-26

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
- b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/092214

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103649116	A	2014年3月19日	IL	229753	A0	2014年1月30日
				CA	2840944	A1	2013年1月17日
				BR	112014000474	A2	2017年2月21日
				WO	2013007563	A1	2013年1月17日
				KR	20140039257	A	2014年4月1日
				AU	2012283235	A1	2014年1月9日
				JP	2014529293	A	2014年11月6日
				TW	201317259	A	2013年5月1日
				MX	2014000316	A	2014年2月19日
				RU	2014104302	A	2015年8月20日
				AR	087070	A1	2014年2月12日
				EP	2729494	A1	2014年5月14日
				US	2014148390	A1	2014年5月29日
CN	112851805	A	2021年5月28日	无			
CN	112409480	A	2021年2月26日	无			
CA	2766160	A1	2002年8月8日	ES	2357756	T3	2011年4月29日
US	2008260757	A1	2008年10月23日	WO	2005118642	A2	2005年12月15日
				WO	2005118642	A3	2006年3月23日
				AU	2005250216	A1	2005年12月15日
				AU	2005250216	B2	2009年12月10日
				CA	2569240	A1	2005年12月15日
				BR- PI	0511755	A	2008年1月2日
				IL	179633	A0	2007年5月15日
				KR	20070039911	A	2007年4月13日
				US	8921528	B2	2014年12月30日
				KR	20120133403	A	2012年12月10日
				EP	1784427	A2	2007年5月16日
				JP	2012135311	A	2012年7月19日
				JP	2008500830	A	2008年1月17日
				TW	200607523	A	2006年3月1日
				EP	2740743	A2	2014年6月11日
				EP	2740743	A3	2015年8月19日
				EA	200602183	A1	2007年6月29日
				EA	012622	B1	2009年10月30日
				MXPA	06014031	A	2007年10月8日
				US	2015064185	A1	2015年3月5日
US	2019352366	A1	2019年11月21日	WO	2018138170	A1	2018年8月2日
				US	11192931	B2	2021年12月7日
				EP	3574004	A1	2019年12月4日
				US	2022073584	A1	2022年3月10日
				JP	2020505029	A	2020年2月20日
JP	2014529293	A	2014年11月6日	无			