

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780050956.0

[43] 公开日 2009 年 12 月 23 日

[11] 公开号 CN 101611056A

[22] 申请日 2007.12.5

[21] 申请号 200780050956.0

[30] 优先权

[32] 2006.12.5 [33] US [31] 60/872,923

[86] 国际申请 PCT/EP2007/063348 2007.12.5

[87] 国际公布 WO2008/068280 英 2008.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.8.5

[71] 申请人 埃博灵克斯股份有限公司

地址 比利时茨维纳德

[72] 发明人 希尔德·阿迪·皮埃雷特·勒韦兹
约斯特·亚历山大·科尔克曼
亨德里克斯·雷内瑞斯·雅各布斯·
马托伊斯·霍根博姆
彼得·维尔希森
斯特凡妮·斯塔埃朗

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 王 旭

权利要求书 21 页 说明书 68 页 序列表 7 页
附图 12 页

[54] 发明名称

能够结合于血清蛋白的肽

[57] 摘要

本发明涉及能够结合于血清蛋白的氨基酸序列；涉及包括或基本由所述氨基酸序列组成的化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体；涉及编码所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的核酸；涉及包括所述氨基酸、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的组合物，且具体地药物组合物；和涉及所述氨基酸、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的用途。

1. 能够结合于血清蛋白和基本由 CDR 序列组成的氨基酸序列。
2. 能够结合于血清蛋白和包括 CDR 序列(且特别地,单一 CDR 序列)的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列不包括免疫球蛋白折叠和/或不能形成免疫球蛋白折叠。
3. 按照权利要求 1-2 的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列能够结合于血清蛋白。
4. 按照权利要求 1-3 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列源自能够结合于血清蛋白的免疫球蛋白可变结构域;和/或其中所述氨基酸序列基本由包括 CDR 序列的免疫球蛋白可变结构域片段组成。
5. 按照权利要求 1-4 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列源自免疫球蛋白可变结构域,所述免疫球蛋白可变结构域选自由 V_H-结构域、V_L-结构域、V_{HH}-结构域或免疫球蛋白可变结构域的抗原-结合片段组成的组;和/或是 V_H-结构域、V_L-结构域、V_{HH}-结构域的片段或包括 CDR 序列的免疫球蛋白可变结构域的抗原-结合片段。
6. 按照权利要求 1-5 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列源自免疫球蛋白可变结构域,所述免疫球蛋白可变结构域选自由人可变结构域、(单)结构域抗体、dAb、或纳米抗体®组成的组;和/或是人可变结构域、(单)结构域抗体、dAb、或纳米抗体®的片段。
7. 按照权利要求 1-6 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列是 CDR2 序列。
8. 按照权利要求 1-6 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列是 CDR3 序列。
9. 按照权利要求 1-8 中任一项的氨基酸序列,其中所述 CDR 序列具有 3-40 个氨基酸残基,优选 5-30 个氨基酸残基的长度。
10. 按照权利要求 1-9 中任一项的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列以这样的方式结合于血清蛋白,以致不(显著)缩短血清蛋白分子的半衰

期。

11. 按照权利要求 1-10 中任一项的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原组成的组的血清蛋白；或结合于前述任一项的至少一个部分、片段、表位或结构域。

12. 按照权利要求 1-11 中任一项的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域。

13. 按照权利要求 1-12 中任一项的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域。

14. 按照权利要求 12 或 13 的氨基酸序列，其能够结合于血清清蛋白上不涉及（人）血清清蛋白和 FcRn 的结合的氨基酸残基。

15. 按照权利要求 12-14 中任一项的氨基酸序列，其能够结合于血清清蛋白上不形成（人）血清清蛋白的结构域 III 部分的氨基酸残基。

16. 按照权利要求 1-15 中任一项的氨基酸序列，其中所述 CDR 序列在 CDR 序列的每一侧侧邻 2 个旁侧氨基酸序列。

17. 按照权利要求 16 的氨基酸序列，其中所述 2 个旁侧氨基酸序列各具有 1-30 个氨基酸残基，优选 2-20 个氨基酸残基，诸如约 5, 10 或 15 个氨基酸残基的长度。

18. 按照权利要求 16 或 17 的氨基酸序列，其中所述 2 个旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列；和/或是免疫球蛋白构架序列的片段。

19. 按照权利要求 18 的氨基酸序列，其中所述 CDR 序列源自来自免疫球蛋白可变结构域的 CDR 序列，且其中所述 2 个旁侧氨基酸序列是免疫球蛋白构架序列，所述免疫球蛋白构架序列源自这样的构架序列，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列；和/或是所述构架序列的片段，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列。

20. 按照权利要求 19 的氨基酸序列，其中所述 CDR 序列是 CDR2 序列，且其中所述旁侧序列是分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的免疫球蛋白构架序列；和/或分别地，是构架 2 序列和构架 3 序列的片段。

21. 按照权利要求 19 的氨基酸序列，其中所述 CDR 序列是 CDR3 序

列，且其中所述旁侧序列是分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的免疫球蛋白构架序列；和/或分别地，是构架 3 序列和构架 3 序列的片段。

22. 按照权利要求 1-21 中任一项的氨基酸序列，其包含至少 2 个能够形成二硫键的半胱氨酸残基。

23. 按照权利要求 22 的氨基酸序列，其中所述 CDR 序列在 CDR 序列的每一侧侧邻 2 个旁侧氨基酸序列，且其中每个旁侧氨基酸序列包含至少一个能够形成二硫键的半胱氨酸残基。

24. 按照权利要求 22 或 23 的氨基酸序列，其中所述 2 个旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列，且其中所述至少 2 个能够形成二硫键的半胱氨酸残基是所述免疫球蛋白构架序列中天然存在的半胱氨酸残基和/或已被引入到所述免疫球蛋白构架序列中的半胱氨酸残基。

25. 按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列，其包括至少一个二硫键。

26. 包含至少一种按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分的化合物或构建体。

27. 包含至少一种按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分的化合物或构建体。

28. 包含至少一种按照权利要求 25 的氨基酸序列和至少一种治疗部分的化合物或构建体。

29. 按照权利要求 27 或 28 的化合物或构建体，其中所述至少一种按照权利要求 1-24 中任一项或权利要求 25 的氨基酸序列分别直接连接于所述至少一种治疗部分或通过一种或多种适当的接头或间隔区连接于所述至少一种治疗部分。

30. 按照权利要求 26-29 中任一项的化合物或构建体，其中所述至少一种治疗部分包括氨基酸序列或基本由氨基酸序列组成。

31. 按照权利要求 26-30 中任一项的化合物或构建体，其中所述至少一种治疗部分包括免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段，诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段；包含免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段，诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段的蛋白质或多肽或基本由免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段，诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原

-结合片段；包含免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段，诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段的蛋白质或多肽组成。

32. 按照权利要求 31 的化合物或构建体，其中所述治疗部分包括（单）结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体®或基本由（单）结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体®组成。

33. 按照权利要求 29-32 中任一项的化合物或构建体，其中所述至少一种按照权利要求 1-24 中任一项或权利要求 25 的氨基酸序列分别直接连接于所述至少一种治疗部分或通过一种或多种适当的接头或间隔区连接于所述至少一种治疗部分，其中所述至少接头或间隔区包括氨基酸序列或基本由氨基酸序列组成。

34. 按照权利要求 29-33 中任一项的化合物或构建体，其包括（融合）蛋白或（融合）多肽或基本由（融合）蛋白或（融合）多肽组成，所述（融合）蛋白或（融合）多肽包括至少一种按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分。

35. 按照权利要求 35 的化合物或构建体，其包括（融合）蛋白或（融合）多肽或基本由（融合）蛋白或（融合）多肽组成，所述（融合）蛋白或（融合）多肽包括至少一种按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分。

36. 按照权利要求 29-33 中任一项的化合物或构建体，其包括（融合）蛋白或（融合）多肽或基本由（融合）蛋白或（融合）多肽组成，所述（融合）蛋白或（融合）多肽包括至少一种按照权利要求 25 的氨基酸序列和至少一种治疗部分。

37. 编码按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体的核苷酸序列或核酸。

38. 编码按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体的核苷酸序列或核酸。

39. 包含按照权利要求 37 或 38 的核苷酸序列或核酸，和/或表达（或能够表达）按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体的宿主或宿主细胞。

40. 包含按照权利要求 38 的核苷酸序列或核酸，和/或表达（或能够

表达)按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体的宿主或宿主细胞。

41. 制备按照权利要求 25 的氨基酸序列的方法,所述方法至少包括在按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列中形成二硫键的步骤。

42. 制备按照权利要求 28 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括在按照权利要求 27 的化合物或构建体中,在所述化合物或构建体与按照权利要求 22-24 的氨基酸序列相对应的部分中形成二硫键的步骤。

43. 制备按照权利要求 36 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括在按照权利要求 35 的化合物或构建体中,在所述化合物或构建体与按照权利要求 22-24 的氨基酸序列相对应的部分中形成二硫键的步骤。

44. 制备按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括下列步骤:

a) 表达按照权利要求 37 或 38 的核苷酸序列或核酸;

和任选地还包括:

b) 分别分离如此表达的按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体。

45. 制备按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括:

a) 在这样的条件下培养或维持按照权利要求 39 或 40 的宿主或宿主细胞,以使得所述宿主或宿主细胞产生按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 27 的化合物或构建体;

和任选地,还包括:

b) 分别分离在步骤 a) 中获得的按照权利要求 1-24 的氨基酸序列或按照权利要求 34 或 35 的化合物或构建体。

46. 制备按照权利要求 25 的氨基酸序列或按照权利要求 36 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括下列步骤:

a) 表达按照权利要求 38 的核苷酸序列,和

b) 任选地还包括分别分离如此表达的按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体;和

c) 在按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35

的化合物或构建体中在所述化合物或构建体对应于根据权利要求 22-24 的氨基酸序列的部分中形成二硫键。

47. 制备按照权利要求 25 的氨基酸序列或按照权利要求 36 的化合物或构建体的方法，所述方法至少包括下列步骤：

a) 在这样的条件下培养或维持按照权利要求 40 的宿主或宿主细胞，以使得所述宿主或宿主细胞分别产生按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体，和

b) 任选地还包括分别分离如此生成的按照权利要求 22-24 的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体；和

c) 在按照权利要求 22-24 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 35 的化合物或构建体中，在所述化合物或构建体与按照权利要求 22-24 的氨基酸序列相对应的部分中形成二硫键。

48. 通过权利要求 41-47 中任一项的方法获得的氨基酸序列、化合物或构建体。

49. 药物组合物，其包括至少一种按照权利要求 1-25 中任一项或权利要求 48 的氨基酸序列，至少一种按照权利要求 26-36 中任一项或 48 的化合物或构建体，和/或按照权利要求 37 或 38 的核苷酸序列；和任选地，至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。

50. 生成按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列的方法，所述方法至少包括下列步骤：

a) 提供氨基酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；

b) 筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列；和

c) 分离能够结合于所述血清蛋白或所述其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

51. 按照权利要求 50 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述氨基

酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力的氨基酸序列；和/或以获得能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

52. 按照权利要求 51 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

53. 按照权利要求 52 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

54. 按照权利要求 53 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于（人）血清清蛋白中不涉及（人）血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的一种或多种氨基酸序列。

55. 按照权利要求 53 或 54 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于（人）血清清蛋白中不形成（人）血清清蛋白的结构域 III 部分的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

56. 按照权利要求 50-55 中任一项的方法，其中，在步骤 b) 过程中，所述氨基酸序列组、集合或文库展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。

57. 按照权利要求 50-56 中任一项的方法，其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库包括这样的氨基酸序列组、集合或文库，所述这样的氨基酸序列组、集合或文库基本由侧邻 2 个源自免疫球蛋白构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成；和/或由包括两侧侧邻构架序列或构架序列片段的 CDR 序列的免疫球蛋白序列片段组成。

58. 按照权利要求 57 的方法，其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库包括这样的氨基酸序列组、集合或文库，所述这样的氨基酸序

列组、集合或文库包括侧邻 2 个源自构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列或基本由侧邻 2 个源自构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列。

59. 按照权利要求 58 的方法，其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库包括这样的氨基酸序列组、集合或文库，所述这样的氨基酸序列组、集合或文库包括侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR2 序列或基本由侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR2 序列组成。

60. 按照权利要求 58 的方法，其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库包括这样的氨基酸序列组、集合或文库，所述这样的氨基酸序列组、集合或文库包括侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR3 序列或基本由侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR3 序列组成。

61. 按照权利要求 57-60 中任一项的方法，其任选地还包括引入（即通过添加、插入或置换）1 个或 2 个半胱氨酸残基，以使得由此生成的氨基酸序列中的每个构架序列包含至少 1 个半胱氨酸残基。

62. 按照权利要求 50-61 中任一项的方法，其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库是通过至少包括下列步骤的方法获得的：

a) 提供编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库；

b) 利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列，以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；

c) 表达在步骤 b) 中获得的扩增片段，从而提供这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

63. 按照权利要求 62 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白

序列的核苷酸序列组、集合或文库是免疫组、集合或文库。

64. 按照权利要求 63 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库是免疫组、集合或文库，所述免疫组、集合或文库是从受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的哺乳动物中获得的。

65. 按照权利要求 64 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库是这样的核苷酸序列的免疫组、集合或文库，所述核苷酸序列编码获自受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的骆驼科动物的重链抗体或 V_{HH} 序列。

66. 按照权利要求 62-65 中任一项的方法，其中所述位点-特异性引物特异于编码侧邻所述 CDR 序列的构架序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即在用于扩增的条件下)。

67. 按照权利要求 62-66 中任一项的方法，其中，在步骤 b) 中，利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列，以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR2 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR2 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR2 序列但所述 CDR2 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

68. 按照权利要求 66 或 67 的方法，其中所述位点-特异性引物特异于分别编码构架 2 序列和构架 3 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即在用于扩增的条件下)。

69. 按照权利要求 62-68 中任一项的方法，其中，在步骤 b) 中，利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列，以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR3 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR3 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR3 序列但所述 CDR3 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

70. 按照权利要求 68 或 69 的方法，其中所述位点-特异性引物特异于分别编码构架 3 序列和构架 4 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即在用于扩增的条件下)。

71. 按照权利要求 50-61 中任一项的方法, 其中步骤 a) 中使用的氨基酸序列组、集合或文库是通过至少包括亲和力成熟步骤的方法获得的。

72. 生成按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列的方法, 所述方法至少包括下列步骤:

a) 提供免疫球蛋白序列组、集合或文库;

b) 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库, 以获得能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列;

c) 确定至少一种如步骤 b) 中鉴别的免疫球蛋白序列的核苷酸序列和/或氨基酸序列, 所述免疫球蛋白序列能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力; 和/或确定其 CDR 序列和/或其包括 CDR 序列的片段的核苷酸序列和/或氨基酸序列;

d) 利用本身已知的任何合适技术制备按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列, 所述氨基酸序列(i)基本由具有步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列组成; 和/或(ii)包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的免疫球蛋白片段; 和/或(iii)包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列, 但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

73. 按照权利要求 62 的方法, 其中, 在步骤 b) 中, 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库, 以获得能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列; 和/或以获得能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。

74. 按照权利要求 63 的方法, 其中, 在步骤 b) 中, 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库, 以获得能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。

75. 按照权利要求 74 的方法, 其中, 在步骤 b) 中, 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库, 以获得能够结合于人血清清蛋白或其至少一

个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。

76. 按照权利要求 75 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库，以获得能够结合于（人）血清清蛋白的不涉及（人）血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的一种或多种免疫球蛋白序列。

77. 按照权利要求 75 或 76 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库；以获得能够结合于（人）血清清蛋白的不形成（人）血清清蛋白的结构域 III 部分的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。

78. 按照权利要求 72-77 中任一项的方法，其中，在步骤 b) 过程中，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。

79. 按照权利要求 72-78 中任一项的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是天然免疫球蛋白序列组、集合或文库。

80. 按照权利要求 72-78 中任一项的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是合成或半-合成的免疫球蛋白序列组、集合或文库。

81. 按照权利要求 72-78 中任一项的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是进行了亲和力成熟的免疫球蛋白序列组、集合或文库。

82. 按照权利要求 72-78 中任一项的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库。

83. 按照权利要求 82 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库是免疫组、集合或文库，所述免疫组、集合或文库是获自受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的哺乳动物的。

84. 按照权利要求 83 的方法，其中步骤 a) 中使用的免疫球蛋白序列组、集合或文库是重链抗体或 V_{HH} 序列的免疫组、集合或文库，所述免疫组、集合或文库获自受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的骆驼科动物。

85. 按照权利要求 72-83 中任一项的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是源自重链可变结构域或轻链可变结构域的 CDR 序列的

组、集合或文库。

86. 按照权利要求 85 的方法，其中所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是结构域抗体、单结构域抗体或能够起结构域抗体或单结构域抗体作用的免疫球蛋白序列的组、集合或文库。

87. 按照权利要求 72-86 中任一项的方法，其中所述 CDR 序列是 CDR2 序列。

88. 按照权利要求 72-86 中任一项的方法，其中所述 CDR 序列是 CDR3 序列。

89. 生成按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列的方法，所述方法至少包括下列步骤：

a) 提供源自骆驼科动物的表达免疫球蛋白序列的细胞的组、集合或文库；

b) 筛选所述细胞的组、集合或文库，以获得 (i) 表达能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列的细胞；和 (ii) 表达重链抗体的细胞；其中步骤 (i) 和 (ii) 可以基本作为单一筛选步骤或作为两个分开的筛选步骤以任何合适的顺序执行，从而提供至少一种表达重链抗体的细胞，所述重链抗体能够结合于血清蛋白的至少一个结构域或表位和/或对其具有亲和力；

c) 确定由步骤 b) 中提供的细胞表达的至少一种重链抗体的核苷酸序列和/或氨基酸序列，所述重链抗体能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力；和/或确定其 CDR 序列和/或其包括 CDR 序列的片段的核苷酸序列和/或氨基酸序列；

d) 利用本身已知的任何合适技术制备按照权利要求 1-24 任一项的氨基酸序列，所述氨基酸序列(i)基本由具有步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

90. 按照权利要求 89 的方法，其中所述细胞的集合或样品是 B-细胞的集合或样品。

91. 按照权利要求 89 或 90 的方法，其中所述细胞集合或样品获自受抗原适当免疫的骆驼科动物，所述抗原包括血清蛋白需要的结构域或表位，从而产生针对需要的结构域或表位的免疫应答。

92. 按照权利要求 89-91 中任一项的方法，其中步骤 b) 的筛选是利用流式细胞术技术诸如 FACS 执行的。

93. 生成编码按照权利要求 1-24 中任一项的氨基酸序列的核苷酸序列的方法，所述方法至少包括下列步骤：

a) 提供编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；

b) 筛选所述编码氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列可以结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力；和

c) 分离编码氨基酸序列的核苷酸序列，所述氨基酸序列可以结合于所述血清蛋白或所述其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对所述血清蛋白或所述其至少一个部分、片段、表位或结构域具有亲和力。

94. 按照权利要求 93 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述核苷酸序列组、集合或文库，以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列，所述氨基酸序列能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力；和/或以获得能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

95. 按照权利要求 94 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述核苷酸序列组、集合或文库，以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列，所述氨基酸序列能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

96. 按照权利要求 95 的方法，其中，在步骤 b) 中，筛选所述核苷酸序列组、集合或文库，以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列，所述氨

基酸序列能够结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

97. 按照权利要求 96 的方法, 其中, 在步骤 b) 中, 筛选所述核苷酸序列组、集合或文库, 以获得一种或多种编码氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列可以结合于 (人) 血清清蛋白中不涉及 (人) 血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

98. 按照权利要求 96 或 97 的方法, 其中, 在步骤 b) 中, 筛选所述核苷酸序列组、集合或文库, 以获得编码氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列可以结合于 (人) 血清清蛋白中不形成 (人) 血清清蛋白的结构域 III 部分的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

99. 按照权利要求 93-98 中任一项的方法, 其中, 在步骤 b) 过程中, 所述核苷酸序列组、集合或文库作为氨基酸序列展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。

100. 按照权利要求 93-99 中任一项的方法, 其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列组、集合或文库包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库, 所述氨基酸序列基本由侧邻 2 个源自免疫球蛋白构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成; 和/或由包括两侧侧邻构架序列或构架序列片段的 CDR 序列的免疫球蛋白序列片段组成。

101. 按照权利要求 100 的方法, 其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列的组、集合或文库包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库, 所述氨基酸序列包括侧邻 2 个源自构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列或基本由侧邻 2 个源自构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成, 所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列。

102. 按照权利要求 101 的方法, 其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列组、集合或文库包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库, 所述氨基酸序列包括侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR2 序列或基本由侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR2 序列组成。

103. 按照权利要求 102 的方法, 其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列组、

集合或文库包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列的组、集合或文库，所述这样的氨基酸序列包括侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR3 序列或基本由侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR3 序列组成。

104. 按照权利要求 100-103 中任一项的方法，其任选地还包括引入（即通过添加、插入或置换 1 个或多个核苷酸）编码 1 个或 2 个半胱氨酸残基的密码子，以使得由此获得的核苷酸序列编码的氨基酸序列中的每个构架序列包含至少 1 个半胱氨酸残基。

105. 按照权利要求 93-104 中任一项的方法，其中步骤 a) 使用的核苷酸序列组、集合或文库通过至少包括以下步骤的方法获得：

- a) 提供编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库；
- b) 利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列，以使扩增的片段编码这样的氨基酸序列组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

106. 按照权利要求 105 的方法，其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列组、集合或文库是免疫组、集合或文库。

107. 按照权利要求 105 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库是免疫组、集合或文库，所述免疫组、集合或文库是获自受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的哺乳动物的。

108. 按照权利要求 107 的方法，其中步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库是核苷酸序列的免疫组、集合或文库，所述核苷酸序列编码获自受血清蛋白适当免疫（即由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的骆驼科动物的重链抗体或 V_{HH} 序列。

109. 按照权利要求 105-108 中任一项的方法，其中所述位点-特异性引物特异于编码侧邻所述 CDR 序列的构架序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交（即在用于扩增的条件下）。

110. 按照权利要求 105-108 中任一项的方法，其中，在步骤 b) 中，

利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列,以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合,所述氨基酸序列(i)基本由 CDR2 序列组成;和/或(ii)包括包含 CDR2 序列的免疫球蛋白的片段;和/或(iii)包括 CDR2 序列但所述 CDR2 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

111. 按照权利要求 109 或 110 的方法,其中所述位点-特异性引物特异地于分别编码构架 2 序列和构架 3 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即在用于扩增的条件下)。

112. 按照权利要求 105-108 中任一项的方法,其中,在步骤 b) 中,利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列,以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合,所述氨基酸序列(i)基本由 CDR3 序列组成;和/或(ii)包括包含 CDR3 序列的免疫球蛋白的片段;和/或(iii)包括 CDR3 序列但所述 CDR3 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

113. 按照权利要求 111 或 112 的方法,其中所述位点-特异性引物特异地于分别编码构架 3 序列和构架 4 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即在用于扩增的条件下)。

114. 按照权利要求 50-61 中任一项的方法,其中步骤 a) 中使用的核苷酸序列的组、集合或文库编码通过至少包括亲和力成熟步骤的方法获得的氨基酸序列。

115. 按照权利要求 93-114 中任一项的方法,其还包括表达由此获得的核苷酸序列的步骤。

116. 按照权利要求 93-114 中任一项的方法,其还包括下列步骤:任选通过一种或多种编码一种或多种接头的核苷酸序列,使一种或多种由此获得的核苷酸序列彼此连接和/或使其连接于一种或多种编码包括氨基酸序列或基本由氨基酸序列组成的治疗部分的核苷酸序列连接,从而提供按照权利要求 38 或 39 的核苷酸序列。

117. 能够结合于血清蛋白和包括至少一个二硫键的氨基酸序列。

118. 按照权利要求 117 的氨基酸序列,其具有少于 90 个氨基酸残基,优选少于 50 个氨基酸残基,诸如约 40, 30 或 20 个氨基酸残基的长度。

119. 按照权利要求 117 或 118 的氨基酸序列, 其包括肽序列或基本由肽序列组成, 所述肽序列能够结合于侧邻 2 个旁侧氨基酸序列的血清蛋白, 其中每个旁侧氨基酸序列包含形成二硫键部分的半胱氨酸残基。

120. 按照权利要求 119 的氨基酸序列, 其中所述肽序列具有 3-30 个氨基酸残基, 优选 5-25 个氨基酸残基的长度。

121. 按照权利要求 119 或 120 的氨基酸序列, 其中所述 2 个旁侧氨基酸序列各具有 1-30 个氨基酸残基, 优选 2-20 个氨基酸残基, 诸如约 5, 10 或 15 个氨基酸残基的长度。

122. 按照权利要求 119-121 中任一项的氨基酸序列, 其中所述 2 个旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列和/或免疫球蛋白构架序列的片段。

123. 按照权利要求 122 的氨基酸序列, 其中所述 2 个旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列, 且其中形成二硫键部分的各个旁侧氨基酸序列中的半胱氨酸残基是所述免疫球蛋白构架序列(或所述其片段中)中天然存在的半胱氨酸残基和/或已被引入到所述免疫球蛋白构架序列中(或所述其片段中)的半胱氨酸残基。

124. 按照权利要求 119-123 中任一项的氨基酸序列, 其中所述肽序列是合成肽序列。

125. 按照权利要求 119-124 中任一项的氨基酸序列, 其中所述肽序列是利用亲和力成熟技术生成的序列。

126. 按照权利要求 119-123 中任一项的氨基酸序列, 其中所述肽序列基本由 CDR 序列组成。

127. 按照权利要求 126 的氨基酸序列, 其中所述肽序列基本由源自 V_H -, V_L -或 V_{HH} -序列的 CDR 序列组成, 所述 V_H -, V_L -或 V_{HH} -序列能够结合于血清蛋白。

128. 按照权利要求 126 或 127 的氨基酸序列, 其中所述肽序列基本由源自(单)结构域抗体、dAb、或纳米抗体®或其片段的 CDR 序列组成。

129. 按照权利要求 126-128 中任一项的氨基酸序列, 其中所述肽序列基本由 CDR2 序列组成。

130. 按照权利要求 129 的氨基酸序列, 其中分别地, 所述 2 个旁侧氨基酸序列之一源自构架 2 序列和/或构架 2 序列的片段, 且其中另一个旁侧

氨基酸序列源自构架 3 序列和/或是构架 3 序列的片段。

131. 按照权利要求 126-128 中任一项的氨基酸序列, 其中所述肽序列基本由 CDR3 序列组成。

132. 按照权利要求 130 的氨基酸序列, 其中分别地, 所述 2 个旁侧氨基酸序列之一源自构架 3 序列和/或构架 3 序列的片段, 且其中另一个旁侧氨基酸序列源自构架 4 序列和/或是构架 4 序列的片段。

133. 按照权利要求 117-132 中任一项的氨基酸序列, 其能够以这样的方式结合于血清蛋白, 以致不(显著)缩短血清蛋白分子的半衰期。

134. 按照权利要求 117-133 中任一项的氨基酸序列, 其能够结合于选自血清清蛋白、血清免疫球蛋白、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原或其片段组成的组的血清蛋白。

135. 按照权利要求 117-134 中任一项的氨基酸序列, 其能够结合于血清清蛋白或其片段。

136. 按照权利要求 135 的氨基酸序列, 其能够结合于人血清清蛋白或其片段。

137. 按照权利要求 136 的氨基酸序列, 其能够结合于(人)血清清蛋白上不涉及血清清蛋白和 FcRn 的结合的氨基酸残基。

138. 按照权利要求 134-137 中任一项的氨基酸序列, 其能够结合于(人)血清清蛋白上不形成血清清蛋白的结构域 III 部分的氨基酸残基。

139. 包含至少一种按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分的化合物或构建体。

140. 按照权利要求 139 的化合物或构建体, 其中所述至少一种按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列分别直接连接于所述至少一种治疗部分或通过一种或多种合适的接头或间隔区连接于所述至少一种治疗部分。

141. 按照权利要求 139 或 140 的化合物或构建体, 其中所述至少一种治疗部分包括氨基酸序列或基本由氨基酸序列组成。

142. 按照权利要求 139-141 中任一项的化合物或构建体, 其中所述至少一种治疗部分包括免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段, 诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段; 包括所述免疫球蛋白序列或其抗原-结合

片段,诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段的蛋白质或多肽或基本由免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段,诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段;包括免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段,诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段的蛋白质或多肽组成。

143. 按照权利要求 142 的化合物或构建体,其中所述治疗部分包括或基本由(单)结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体®组成。

144. 按照权利要求 141-143 中任一项的化合物或构建体,其中所述至少一种按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列直接连接于所述至少一种治疗部分或通过一种或多种合适的接头或间隔区连接于所述至少一种治疗部分,其中所述至少接头或间隔区包括氨基酸序列或基本由氨基酸序列组成。

145. 按照权利要求 139-145 中任一项的化合物或构建体,其包括(融合)蛋白或(融合)多肽或基本由(融合)蛋白或(融合)多肽组成,所述(融合)蛋白或(融合)多肽包括至少一种按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分。

146. 按照权利要求 145 的化合物或构建体,其包括(融合)蛋白或(融合)多肽或基本由(融合)蛋白或(融合)多肽组成,所述(融合)蛋白或(融合)多肽包括至少一种按照权利要求 119-138 中任一项的氨基酸序列和至少一种治疗部分。

147. 核苷酸序列或核酸,所述核苷酸序列或核酸编码具有与按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列或编码具有与按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列。

148. 宿主或宿主细胞,所述宿主或宿主细胞包含按照权利要求 147 的核苷酸序列或核酸和/或表达(或能够表达)这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有与按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列相同的一级氨基酸序列,或具有与按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体相同的一级氨基酸序列。

149. 制备按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体的方法,所述方法至少包括下列步骤:

a) 分别提供具有与按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列或与按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列;

b) 在所述氨基酸序列中形成二硫键, 从而分别提供按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体。

150. 制备按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体的方法, 所述方法至少包括下列步骤:

a) 表达按照权利要求 147 的核苷酸序列或核酸, 从而分别提供具有与按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列或具有与按照权利要求 145 或 146 的氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列;

和任选还包括:

b) 分离步骤 b) 中获得的氨基酸序列;

和:

c) 在步骤 a) 中获得的氨基酸序列中或, 当执行步骤 b) 时, 在步骤 b) 中获得的氨基酸序列中分别形成二硫键, 从而分别提供按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列或按照权利要求 145 或 146 的化合物或构建体。

151. 通过权利要求 41-47 中任一项的方法获得的氨基酸序列、化合物或构建体。

152. 药物组合物, 其包括至少一种按照权利要求 117-138 或 151 中任一项的氨基酸序列, 至少一种按照权利要求 139-146 或 151 中任一项的化合物或构建体, 和/或至少一种按照权利要求 147 的核苷酸序列; 和任选地, 至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。

153. 制备按照权利要求 26-36 中任一项的化合物或构建体的方法, 所述方法至少包括使至少一种按照权利要求 1-25 或 48 中任一项的氨基酸序列, 任选地通过一种或多种合适的接头或间隔区, 连接于至少一种治疗部分的步骤。

154. 制备按照权利要求 26-36 中任一项的化合物或构建体的方法, 所

述方法至少包括使按照权利要求 25 的氨基酸序列，任选地通过一种或多种合适的接头或间隔区，连接于至少一种治疗部分的步骤。

155. 制备按照权利要求 139-146 或 151 中任一项的化合物或构建体的方法，所述方法至少包括使至少一种按照权利要求 117-138 中任一项的氨基酸序列，任选地通过一种或多种合适的接头或间隔区，连接于至少一种治疗部分的步骤。

156. 通过权利要求 153-155 中任一项的方法获得的化合物或构建体。

157. 药物组合物，其包括至少一种按照权利要求 156 的氨基酸序列；和任选地至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。

能够结合于血清蛋白的肽

相关申请

本申请根据 35 U.S.C. § 119(e) 要求 2006 年 12 月 5 日提交的美国临时申请系列号 60/872,923 的利益，将其全部内容引入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及能够结合于血清蛋白的氨基酸序列；包括或基本由所述氨基酸序列组成的化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体；编码所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的核酸；包括所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的组合物和特别是药物组合物；和所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体的用途。

由本文中进一步的描述，本发明的其他方面、实施方案、优势和应用将变得清晰。

发明背景

能够结合于血清蛋白的氨基酸序列及其在化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或构建体中为了增长治疗相关蛋白质、多肽和其他化合物半衰期的用途是本领域中已知的。

例如，WO 91/01743、WO 01/45746 和 WO 02/076489 描述了与血清清蛋白结合的肽部分，其能够与治疗蛋白质和其他治疗化合物和实体相融合，从而增加其半衰期。然而，这些肽部分是细菌或合成来源的，其对于用在治疗中是较不优选的。

新生儿 Fc 受体 (FcRn)，也称为 “Brambell 受体”，与延长清蛋白在循环中的寿命有关（见 Chaudhury 等，实验医学杂志 (The Journal of Experimental Medicine)，第 3 卷，第 197 号，315-322 (2003)）。FcRn 受体

是由可溶性轻链、跨膜区和约 50 个氨基酸的胞质尾区组成的完整膜糖蛋白, 所述可溶性轻链由 β 2-微球蛋白组成, 与具有三个细胞外结构域的 43 kD α 链非共价结合。所述胞质尾区包含涉及受体内在化的、以二核苷酸基序为基础的胞吞作用信号。所述 α 链是蛋白质非经典 MHC I 家族的成员。 β 2m 与 α 链的缔合对 FcRn 的正确折叠和离开内质网定向到内体和细胞表面非常关键。

FcRn 的总体结构类似于 I 类分子的总体结构。 α -1 和 α -2 区类似由 8 个反向平行 β 链组成的平台, 所述反向平行 β 链形成加帽 (topped) 了 2 个反向平行 α -螺旋的单 β -折叠, 所述 α -螺旋非常类似于 MHC I 分子中的肽裂(peptide cleft)。由于 α -1 螺旋的全面重新定位和 α -2 螺旋由于存在 Pro162 而引起该螺旋中断裂的 C-末端部分弯曲, FcRn 螺旋彼此相当靠近, 从而封闭肽结合。FcRn 的 Arg164 侧链也封闭肽 N-末端与 MHC 袋的潜在相互作用。另外, α -1 和 α -2 螺旋间的盐桥和疏水性相互作用也对沟关闭作出贡献。

因此, FcRn 与抗原呈递无关, 且所述肽裂是空的。

FcRn 结合并运输 IgG 由母体循环穿过胎盘合胞体滋养层到达胎儿循环, 并保护成年人中的 IgG 免于被降解。除体内稳态外, FcRn 控制组织中 IgG 的胞转作用。FcRn 位于上皮细胞、内皮细胞和肝细胞中。

按照 Chaudhury 等 (见上), 清蛋白结合 FcRn 从而形成具有 IgG 的三-分子复合物。清蛋白和 IgG 非协作地结合于 FcRn 上的不同位点。人 FcRn 与琼脂糖-HSA 和琼脂糖-hIgG 的结合是 pH 依赖性的, 其在 pH 5.0 时达到最大, 并在 pH 7.0-pH 8 时为零。关于 FcRn 以与结合 IgG 相同的 pH 依赖方式结合清蛋白的观察提示清蛋白与 FcRn 相互作用并由此受到保护免于被降解的机制与 IgG 的相同, 并通过与 FcRn 类似的 pH-敏感性相互作用受到介导。利用 SPR 测量各个 HSA 结构域结合固定的可溶性 hFcRn 的能力, Chaudhury 显示 FcRn 和清蛋白通过清蛋白的 D-III 结构域, 以 pH-依赖性方式, 在与 IgG 结合位点不同的位点上相互作用(Chaudhury, PhD 论文, 见 <http://www.andersonlab.com/biosketchCC.htm>; Chaudhury 等 生物化学 (Biochemistry), ASAP 文章 10.1021/bi052628y S0006-2960(05)02628-0 (网页公开日期: 2006 年 3 月 22 日))。

埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 的 WO 04/041865 描述了能够结合于血清蛋白(和特别是针对人血清清蛋白)的纳米抗体(Nanobodies)[®], 其能够与其他蛋白质(诸如一种或多种能够结合于需要的靶标的其它纳米抗体[®])连接, 从而增加所述蛋白质的半衰期。已知这些纳米抗体[®]比常规四链血清清蛋白结合抗体更有效和更稳定, 这导致(1)更低的剂量形式, 更低的频率剂量, 从而引起较少副作用;(2)改进的稳定性, 从而导致更广泛施用途径选择, 除静脉内途径外包括口服或皮下途径;(3)由于较低的材料成本引起的较低治疗成本。

尽管如此, 仍然存在对能够用于增长治疗相关蛋白质、多肽和(其他)化合物半衰期的备选技术和部分的需要。例如, 本领域中描述的一些肽部分来自合成或半-合成来源, 且可能因此包含不合乎需要的可能被人免疫系统识别的表位, 这可以引起免疫原性特性。而且, 比本领域中所述的血清蛋白结合结构域抗体和纳米抗体[®](其有时可以具有比它们待融合或连接的化合物更高的分子量)小的血清蛋白结合肽可能更容易处理, 从而与治疗蛋白、多肽或化合物融合或连接, 和/或作为重组(融合)多肽(的一部分)表达; 可具有优越的生物物理性质(诸如溶解性、稳定性); 且在它们连接治疗蛋白、多肽或化合物的融合体或构建体中, 其可以引起减小的位阻现象或与融合配偶体的其他不需要的相互作用或其需要的药理学特性。

WO 03/050531 (埃博灵克斯股份有限公司(Ablynx N.V.)和 Algonomics N.V.)描述用于识别和选择肽, 具体地结合于给定靶标或目的靶标的免疫球蛋白重链可变结构域 CDR 序列的方法。显示出尤其是 CDR3 在抗原结合中起关键作用(Kabat 和 Wu, 1991), 且报告了许多情形, 其中 CDR3 肽显示出模拟母体抗体的抗原结合(参考例如 Taub 等, 1991)。对于纳米抗体, CDR3 在抗原结合相互作用中的优势作用甚至更明显(De Genst 等, 2006)。

发明概述

本发明的一个目的是为以上引用的现有技术中所述的血清蛋白-结合氨基酸序列提供备选的, 且特别是改善备选的氨基酸序列。

通常, 本发明通过提供这样的氨基酸序列实现该目的, 所述氨基酸序

列能够结合于血清蛋白和能够作为小肽或作为肽部分使用以与治疗化合物（诸如蛋白质或多肽）连接或融合，从而增长其半衰期。这些氨基酸序列（其在本文中也称为“本发明的氨基酸序列”）在本文中进一步定义。

因此，按照第一方面，本发明涉及能够结合于血清蛋白和基本由 CDR 序列（且特别地，单一 CDR 序列）组成的氨基酸序列。

所述氨基酸序列优选具有少于 90 个氨基酸残基，优选少于 50 个氨基酸残基，诸如约 40、30 或 20 个氨基酸残基的长度；和/或优选是这样的，以致其不包含免疫球蛋白形式并且也不能够形成免疫球蛋白折叠。

本发明的氨基酸序列优选包含 CDR 序列（和特别地，单一 CDR 序列），且特别地，这样的 CDR 序列，其是这样的以致能够结合血清蛋白，从而允许该氨基酸序列结合于血清蛋白。

CDR 序列可以具体地是源自免疫球蛋白可变结构域能够结合于血清蛋白的 CDR 序列。CDR 序列可以基本由包括 CDR 序列的免疫球蛋白可变结构域的片段组成。

更特别地，CDR 序列还可以源自选自下列各项组成的组中的免疫球蛋白可变结构域： V_H -结构域、 V_L -结构域、 V_{HH} -结构域或免疫球蛋白可变结构域的抗原-结合片段；和/或可以是 V_H -结构域、 V_L -结构域、 V_{HH} -结构域的片段或包括 CDR 序列的免疫球蛋白可变结构域的抗原-结合片段。

优选地，CDR 序列源自免疫球蛋白可变结构域，其选自由人可变结构域、（单）结构域抗体、dAb、或纳米抗体®组成的组；和/或是人可变结构域、（单）结构域抗体、dAb、或纳米抗体的片段。源自纳米抗体的 CDR 序列是特别优选的。

CDR 序列优选具有 3-40 个氨基酸残基，优选 5-30 个氨基酸残基的长度。具体地，CDR 序列可以是 CDR2 序列或 CDR3 序列。

本发明的氨基酸序列优选地是这样的，以致它以这样的方式结合于血清蛋白，以致所述方式不（显著）缩短血清蛋白分子的半衰期。

本发明的氨基酸序列结合的血清蛋白可以具体地是选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原组成的组的血清蛋白。本发明的氨基酸序列还可以结合于前述任一种的

至少一个部分、片段、表位或结构域。

优选地，本发明的氨基酸序列结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域；和具体地，结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域。当本发明的氨基酸序列结合于（人）血清清蛋白时，其优选地能够结合于血清清蛋白上不涉及（人）血清清蛋白和 FcRn 的结合的氨基酸残基；和/或结合于血清清蛋白上不形成（人）血清清蛋白的结构域 III 部分的氨基酸残基。参考 WO 06/0122787。

本发明的氨基酸序列优选包括 CDR 序列，在所述 CDR 序列任一侧侧邻 2 个旁侧氨基酸序列。所述 2 个旁侧氨基酸序列优选分别具有 1-30 个氨基酸残基、优选 2-20 个氨基酸残基，诸如约 5、10 或 15 个氨基酸残基的长度，且可以具体地源自免疫球蛋白构架序列和/或可以是免疫球蛋白构架序列的片段。更具体地，所述 2 个旁侧氨基酸序列可以是免疫球蛋白构架序列，所述免疫球蛋白构架序列源自这样的构架序列，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列；和/或可以是这样的构架序列的片段，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列。

例如，当 CDR 序列是 CDR2 序列时，旁侧序列优选是分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的免疫球蛋白构架序列；和/或分别地，构架 2 序列和构架 3 序列的片段。当 CDR 序列是 CDR3 序列时，旁侧序列优选是分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的免疫球蛋白构架序列；和/或分别地，构架 3 序列和构架 4 序列的片段。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的氨基酸序列包含至少 2 个能够形成二硫键和/或形成分子内二硫键部分的半胱氨酸残基。优选地，所述半胱氨酸残基位于旁侧氨基酸序列中。例如，当旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列和/或是免疫球蛋白构架序列的片段时，所述半胱氨酸残基可以是所述免疫球蛋白构架序列中天然存在的半胱氨酸残基和/或已被引入到所述免疫球蛋白构架序列中的半胱氨酸残基。

在本发明的一个具体但非-限制性方面，本发明的氨基酸序列处于“限制”形式（即，包括至少一个连接旁侧序列的二硫键）或是当处于限制形式时，能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白的氨基酸序列。具

体地，所述氨基酸序列包括这样的 CDR 序列，其是这样的，以致当该氨基酸序列处于限制形式时，所述 CDR 序列能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白。

在本发明的另一个具体但非-限制性方面，本发明的氨基酸序列处于“非-限制”形式（即，不包括任何连接旁侧序列的二硫键）或是在当处于非-限制形式时，能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白的氨基酸序列。具体地，所述氨基酸序列包括这样的 CDR 序列，其是这样的，以致当该氨基酸序列处于非-限制形式时，所述 CDR 序列能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白。

在本发明的另一个具体但非-限制性方面，本发明的氨基酸序列是在处于限制形式以及非-限制形式时都能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白的氨基酸序列。所述氨基酸序列可以处于限制形式以及非-限制形式。具体地，所述氨基酸序列包括这样的 CDR 序列，其是这样的，以致当该氨基酸序列处于限制形式或非-限制形式时，所述 CDR 序列均能够结合（如本文中所述）于人血清清蛋白。

本发明氨基酸序列的非-限制性实例在 SEQ ID NO:1 中给出，其相应的核苷酸序列在 SEQ ID NO:2 中给出。该氨基酸序列 *DTAVYYCNAAASYSDYDVFGGGTDFGPWGQGTQV* (SEQ ID NO:1) 包括侧邻 2 个构架序列(斜体字表示)的 CDR 序列 *AASYSDYDVFGGGTDFGP* (SEQ ID NO:3)，所述 2 个构架序列分别源自构架 3 和 4。该 CDR 序列在其处于 SEQ ID NO:1 的肽形式时能够以氨基酸序列形式结合于血清清蛋白，但也如此（即，不存在旁侧 FR 序列）。参考以下的实施例 4，其显示该 CDR 序列可以以限制形式（即包含二硫键，见例如肽 17D12-CDR3-C, SEQ ID NO: 27）以及以非-限制形式（即，没有二硫键，见例如肽 17D12-CDR3-NC, SEQ ID NO: 26）结合于人血清清蛋白。

因此，在一个优选但非-限制性方面，本发明的氨基酸序列是至少包括氨基酸序列 *AASYSDYDVFGGGTDFGP* (SEQ ID NO:3) 或包括与氨基酸序列 *AASYSDYDVFGGGTDFGP* (SEQ ID NO:3) 相差不多于 9 个氨基酸差别(如本文中定义)，优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别的氨基酸序列的氨基酸序列。所述氨基酸序列可以在本文中进

一步描述。

例如，所述本发明的氨基酸序列可以包括氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) (或与该序列相差不多于 9 个氨基酸差别，优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别的氨基酸序列)，和可以进一步包括 1 或 2 个旁侧氨基酸序列 (即，分别在该序列的任一侧或两侧)。而且，所述本发明的氨基酸序列可以处于限制或非-限制形式。

优选地，所述本发明的氨基酸序列 (或包括至少一种所述氨基酸序列的本发明的化合物，如本文中进一步所述) 是这样的，以致它可以结合于血清清蛋白，和具体地人血清清蛋白：

- 具有解离常数(K_D)为 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更小，和优选 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更小和更优选 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升 (即，具有结合常数(K_A)为 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大，和优选 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大和更优选 10^8 - 10^{12} 升/摩尔)；
- 具有缔合率 (k_{on} -rate) 为 10^2 M⁻¹s⁻¹-约 10^7 M⁻¹s⁻¹，优选 10^3 M⁻¹s⁻¹- 10^7 M⁻¹s⁻¹，更优选 10^4 M⁻¹s⁻¹- 10^7 M⁻¹s⁻¹，诸如 10^5 M⁻¹s⁻¹- 10^7 M⁻¹s⁻¹；

和/或

- 具有解离率(k_{off} 率)为 1 s⁻¹ ($t_{1/2}$ =0.69 s)- 10^{-6} s⁻¹ (提供具有多日的 $t_{1/2}$ 的接近不可逆的复合物)，优选 10^{-2} s⁻¹- 10^{-6} s⁻¹，更优选 10^{-3} s⁻¹- 10^{-4} s⁻¹，诸如 10^{-4} s⁻¹- 10^{-6} s⁻¹；

且所述氨基酸序列 (和编码所述氨基酸序列的核苷酸序列，以及包括所述氨基酸序列的本发明的化合物) 形成本发明另外的方面。

优选地，所述本发明的氨基酸序列 (或包括一种所述氨基酸序列的本发明的化合物，如本文中进一步所述) 是这样的，以致它将以小于 500 nM，优选小于 200 nM，更优选小于 10 nM，诸如小于 500 pM 的亲和力结合于血清蛋白。

当所述氨基酸序列是与氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 相差不多于 9 个氨基酸差别 (和优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别) 的氨基酸序列时，其优选是这样的，

以致它（或包括至少一种所述氨基酸序列的本发明化合物，如本文中进一步所述）可以以前段中提到的 K_D , K_A , K_{on} 和/或 K_{off} 结合于血清清蛋白，且特别地人血清清蛋白。所述氨基酸序列（和编码所述氨基酸序列的核苷酸序列、以及包括所述氨基酸序列的本发明化合物，如本文中进一步所述）形成本发明另外的方面。例如，所述氨基酸序列可以是从小氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 开始，通过亲和力成熟获得的氨基酸序列。

当所述氨基酸序列是与氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 相差不多于 9 个氨基酸差别（和优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别）的氨基酸序列时，它可以包括总共 9-27 个氨基酸残基，诸如 12-24 个氨基酸残基，例如 15-21 个氨基酸残基，诸如 16, 17, 18, 19 或 20 个氨基酸残基。此外，所述氨基酸序列优选是这样的，以致它可以以前段中提到的 K_D , K_A , K_{on} 和/或 K_{off} 结合于血清清蛋白，和具体地人血清清蛋白；且所述氨基酸序列（和编码所述氨基酸序列的核苷酸序列、以及包括所述氨基酸序列的本发明化合物，如本文中进一步所述）形成本发明另外的方面。例如，所述氨基酸序列可以是从小氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 开始，通过亲和力成熟获得的氨基酸序列。

而且，优选地，当所述氨基酸序列是与氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 相差不多于 9 个氨基酸差别（和优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别）的氨基酸序列时，它优选是这样的，以致它包括一或多（诸如 1、2、3、4 或 5）段氨基酸残基序列，其包括至少 3 个（诸如至少 4, 5, 6, 7, 8, 9 或更多）来自序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 的连续氨基酸残基（此外，是这样的以致氨基酸残基总数是 9-27 个氨基酸残基，诸如 12-24 个氨基酸残基，例如 15-21 个氨基酸残基，诸如 16, 17, 18, 19 或 20 氨基酸残基）。此外，所述氨基酸序列优选是这样的，以致它可以以前段中提到的 K_D , K_A , K_{on} 和/或 K_{off} 结合于血清清蛋白，和具体地人血清清蛋白；且所述氨基酸序列（和编码所述氨基酸序列的核苷酸序列、以及包括所述氨基酸序列的本发明化合物，如本文中进一步所述）形成本发明另外的方面。

例如，所述氨基酸序列可以是氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3)开始，通过亲和力成熟获得的氨基酸序列。

在一个特殊但非-限制性方面，所述氨基酸序列是这样的氨基酸序列，即 (i) 与氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3) 相差不多于 9 个氨基酸差别（和优选不多于 6 个氨基酸差别，诸如 5, 4, 3, 2 或仅 1 个氨基酸差别）；(ii) 从氨基酸序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3)开始，通过亲和力成熟获得的；(iii) 包括总共 9- 27 个氨基酸残基，诸如 12-24 个氨基酸残基，例如 15- 21 个氨基酸残基，诸如 16, 17, 18, 19 或 20 个氨基酸残基），和优选包括一或多（诸如 1、2、3、4 或 5）段氨基酸残基序列，其包括至少 3 个（诸如至少 4, 5, 6, 7, 8, 9 或更多）来自序列 AASYSDYDVFGGGTDFGP (SEQ ID NO:3)的连续氨基酸残基；和 (iv) 其可以以前段中提到的 K_D , K_A , K_{on} 和/或 K_{off} 结合于血清清蛋白，和具体地人血清清蛋白。

此外，所有上述氨基酸序列可以在本文中进一步描述，且可以例如包括 1 个或 2 个旁侧氨基酸序列（即分别在该序列的任一端或两端），且可以处于限制或非-限制形式。例如，所述氨基酸序列还可以是这样的，以致它们能够以限制形式、以非-限制形式、和优选地以限制和非-限制两种形式结合（如本文中所述）于血清清蛋白，和具体地人血清清蛋白。

此外，包括一种或多种上述氨基酸序列的本发明化合物形成本发明另外的特殊方面，且所述本发明的化合物可以在本文中进一步描述（且优选地，根据本文中关于本发明化合物所述的优选方面）。

本发明还涉及包括至少一种本发明氨基酸序列和至少一种治疗部分（本文中也称为“本发明的化合物”）的化合物或构建体。此外，所述化合物或构建体中存在的本发明氨基酸序列优选地包含至少 2 个能够形成二硫键或/或形成分子内二硫键部分（例如，且特别地，在 CDR 序列旁侧的两个旁侧序列中）的半胱氨酸残基。

例如，且不限，本发明的化合物可以包括至少一种治疗部分，其与 1、2、3、4 或更多本发明的氨基酸序列连接。例如，当所述治疗部分是蛋白质或多肽时，一种或多种本发明的氨基酸序列可以连接于该蛋白质或多肽的 C-端（直接地或通过合适的间隔区或接头）；连接于该蛋白质或

多肽的 N-端（也直接地或通过合适的间隔区或接头）；或连接于 C-端和 N-端二者。当本发明的化合物包括 2 个或更多本发明的氨基酸序列时，这些可以是相同或不同的。

所述治疗部分也可以连接（在其 C-端、其 N-端、或两端，且也直接地或通过合适的间隔区或接头）于包括至少 2（诸如 2、3 或 4）个本发明氨基酸序列（其可以相同或不同）的多联体（concatamer），其可以是彼此直接，或通过合适的间隔区或接头连接的。所述（二价、三价或多价）多联体（和编码所述多联体的核苷酸序列、以及包括所述多联体的本发明化合物）形成本发明另外的方面，且可以以高于本发明单体氨基酸序列的亲合力结合于血清清蛋白。

此外，当本发明的化合物包括两个或更多治疗部分时，这些治疗部分中的每一个（或两个）可以连接于一个或多个本发明的氨基酸序列，如本文中进一步所述。此外，所述两个或更多治疗部分可以彼此通过接头连接，所述接头包括或基本由一个或多个本发明的氨基酸序列（和任选地另外的连接氨基酸序列）组成，且所述接头（以及包括所述接头的本发明化合物）形成本发明另外的方面。

所述至少一种治疗部分优选包括或基本由氨基酸序列组成，且特别地可以包括或基本由免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段（例如，抗体或其抗原-结合片段），诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段（例如，V_H-结构域、V_L-结构域、V_{HH}-结构域或其抗原-结合片段）组成；或包括或由包括其的蛋白质或多肽（例如，scFv 构建体）组成。关于所述构建体，参考例如 Holliger 和 Hudson 的综述，自然生物技术（Nat Biotechnol.）2005 年 9 月；23(9):1126-36 和其中引用的其他现有技术。

按照一个具体但非-限制性方面，所述治疗部分包括或基本由(单)结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体®组成。

在本发明的化合物中，本发明的一个或多个氨基酸序列可以直接连接于所述至少一个治疗部分或通过一个或多个合适的接头或间隔区连接于所述至少一个治疗部分。合适的接头对技术人员应该是清楚的，例如基于本文中进一步的公开。当所述一个或多个治疗部分是氨基酸序列时，所述接头或间隔区优选包括或基本由氨基酸序列组成，这样由此生成的化合物

或构建体基本由（融合）蛋白或（融合）多肽（本文中也称为“本发明的多肽”）组成。此外，所述本发明的多肽中存在的本发明氨基酸序列优选包含至少 2 个能够形成二硫键和/或形成分子内二硫键部分（例如，且特别地，在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列中）的半胱氨酸残基。

本发明还涉及编码本发明氨基酸序列或本发明多肽的核苷酸序列或核酸（本文中也称为“本发明的核苷酸序列”或“本发明的核酸”）。此外，所述本发明的核酸优选地编码包含至少 2 个能够形成二硫键（例如，且特别地，在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列中）的半胱氨酸残基的本发明氨基酸序列或本发明多肽。

本发明还涉及宿主或宿主细胞，其包含本发明核苷酸序列或核酸和/或表达（或能够表达）本发明氨基酸序列或本发明多肽，和具体地包含至少 2 个能够形成二硫键（例如，且特别地，在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列中）的半胱氨酸残基的本发明氨基酸序列或本发明多肽。

如基于本文中的内容技术人员应该清楚地，本发明的一个优选但非-限制性方面涉及本发明的氨基酸序列，其包含二硫键，具体地在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列（的每一个中存在的半胱氨酸残基）之间。因此，本发明还涉及用于制备所述本发明氨基酸序列的方法，所述方法通常至少包括在包括至少 2 个能够形成二硫键的半胱氨酸残基的本发明氨基酸序列中形成二硫键的步骤，且特别地，至少包括在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列（的每一个中存在的半胱氨酸残基）之间形成二硫键的步骤。

本发明还涉及本发明的多肽，其包含二硫键，具体地在由本发明的氨基酸序列组成的多肽的部分中。因此，本发明还涉及用于制备所述本发明多肽的方法，所述方法通常至少包括在本发明的多肽中，具体地在由本发明的氨基酸序列形成的部分中形成二硫键的步骤。此外，为了该目的，所述多肽中存在的本发明氨基酸序列优选包括至少 2 个半胱氨酸残基，其能够形成二硫键，具体地在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列的每一个中。

另一种用于制备本发明的氨基酸序列或多肽的方法通常包括至少下列步骤：

- a) 表达本发明的核苷酸序列或核酸；
- 和任选地还包括：

b) 分别分离如此表达的本发明的氨基酸序列或本发明的多肽。

在由此获得的本发明氨基酸序列或本发明多肽包含至少 2 个能够形成二硫键(例如, 且特别地, 在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列中)的半胱氨酸残基的情况下, 所述方法还可以包括另一个形成所述二硫键的步骤, 如本文中进一步所述。

再一种用于制备本发明的氨基酸序列或多肽的方法通常包括至少下列步骤:

a) 在这样的条件下培养或维持本文中所述的宿主或宿主细胞, 以使得所述宿主或宿主细胞产生本发明的氨基酸序列或多肽;

和任选地, 还包括:

b) 分别分离由此获得的本发明的氨基酸序列或本发明的多肽。

此外, 当由此获得的本发明的氨基酸序列或本发明的多肽包含至少 2 个能够形成二硫键(例如, 且特别地, 在 CDR 序列旁侧的 2 个旁侧序列中)的半胱氨酸残基的情况下, 所述方法还可以包括另一个形成所述二硫键的步骤, 如本文中进一步所述。

本发明还涉及通过以上方法获得的氨基酸序列、化合物、构建体或多肽。

本发明还涉及药物组合物, 其包括至少一种如本文中所述的氨基酸序列、化合物、构建体或多肽; 和任选地至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。

本发明还涉及一些用于提供能够结合于血清蛋白和能够在本发明中使用(即作为本发明的氨基酸序列或作为用于提供本发明氨基酸序列的起始点)的氨基酸序列(如 CDR 序列)的具体方法。一种所述具体方法至少包括下列步骤:

a) 提供氨基酸序列组、集合或文库, 所述氨基酸序列(i)基本由 CDR 序列组成; 和/或(ii)包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段; 和/或(iii)包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠;

b) 筛选所述组、集合或文库, 以获得能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列; 和

c) 分离能够结合于所述血清蛋白或所述其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

在该方法的步骤 b) 中, 优选筛选所述氨基酸序列组、集合或文库, 以获得能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白(transferring)、纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力的氨基酸序列; 和/或以获得能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

具体地, 在该方法的步骤 b) 中, 可以筛选所述氨基酸序列组、集合或文库, 以获得能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列; 和更具体地, 以获得能够结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。按照一个具体但非-限制性方面, 在该方法的步骤 b) 中, 可以筛选所述氨基酸序列组、集合或文库, 以获得能够结合于(人)血清清蛋白的不涉及(人)血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的一种或多种氨基酸序列; 和/或以获得能够结合于(人)血清清蛋白的至少一个不形成(人)血清清蛋白的结构域 III 部分的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

所述筛选可以以任何本身已知的蛋白质筛选方式进行。例如, 所述氨基酸序列组、集合或文库可以使用技术人员已知的技术展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。参考例如 Hoogenboom 等的综述, 自然生物技术(Nat Biotechnol) 23:1105, 2005 和其中引用的其他现有技术。

以上方法中使用的氨基酸序列组、集合或文库优选地包括基本由侧邻 2 个源自免疫球蛋白构架序列的旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成的氨基酸序列组、集合或文库; 和/或包括在两侧侧邻构架序列或构架序列片段的 CDR 序列的免疫球蛋白序列的片段组、集合或文库。具体地, 所述氨基酸序列组、集合或文库可以包括包括或基本由侧邻 2 个旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成的氨基酸序列的组合, 集合或文库, 所述旁侧氨基酸序列源自构架序列, 所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构

域中邻近所述 CDR 序列。例如，氨基酸序列组、集合或文库可以包括或基本由侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR2 序列组成；或包括或基本由侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列的 CDR3 序列组成。

为了提供包含 2 个用于形成二硫键的半胱氨酸残基的氨基酸序列（如本文中进一步所述），以上方法还可以包括引入（即通过添加、插入或置换）1 或 2 个半胱氨酸残基，以使得由此生成的氨基酸序列中的每个构架序列包含至少一个半胱氨酸残基。

备选地，在由此获得氨基酸序列不包括旁侧氨基酸序列的情况下，可以添加所述旁侧序列（优选地还具有半胱氨酸残基）。

以上方法的步骤 a) 中使用的（且随后在步骤 b) 中筛选的）氨基酸组、集合或文库可以是任何合适的氨基酸序列组、集合或文库，其 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。例如，它可以是通过包括使用一种或多种本身已知的亲和力成熟技术的方法获得氨基酸序列的组、集合或文库。

然而，按照一个优选的方面，所述组、集合或文库可以通过至少包括下列步骤的方法获得：

a) 提供编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库；

b) 利用位点-特异性引物组合扩增所述核苷酸序列，以使得扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；

c) 表达在步骤 b) 中获得的扩增片段，从而提供这样的氨基酸序列的组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白的片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

以上方法的步骤 a) 中使用的编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库可以是任何合适的编码免疫球蛋白序列（如本领域中技术人员

通常理解地,例如抗体、抗体的可变结构域、或包括可变结构域的抗体片段)的核苷酸序列组、集合或文库,但是可以具体地是免疫组、集合或文库,和更具体地,获自用血清蛋白适当免疫(即,以致生成针对所述血清蛋白的免疫应答)的哺乳动物的免疫组、集合或文库。该组、集合或文库可以以任何本身已知的方式,诸如通过所有组成部分克隆生成(见例如 WO 90/05144 或本文中引用的 Hoogenboom 的综述)。

在一个具体但非-限制性方面,所述编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库可以是编码重链抗体或 V_{HH} 序列的核苷酸序列免疫组、集合或文库,免疫组、集合或文库获自用血清蛋白适当免疫的骆驼科动物(Camelid)(即,以致生成针对所述血清蛋白的免疫应答)。为此,参考例如本文中引用的现有技术。

扩增步骤 b) 优选使用位点-特异性引物(的组合)执行,所述位点-特异性引物特异于编码侧邻所述 CDR 序列的构架序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即,在用于扩增的条件下)。例如,所述位点-特异性引物(的组合)可以是这样的,以致扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合,所述氨基酸序列(i)基本由 CDR2 序列组成;和/或(ii)包括包含 CDR2 序列的免疫球蛋白的片段;和/或(iii)包括 CDR2 序列但所述 CDR2 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠;在该情形中,所述位点-特异性引物可以特异于分别编码构架 2 序列和构架 3 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即,在用于扩增的条件下)。

备选地,所述位点-特异性引物(的组合)可以是这样的,以致扩增的片段编码这样的氨基酸序列的组、文库或集合,所述氨基酸序列(i)基本由 CDR3 序列组成;和/或(ii)包括包含 CDR3 序列的免疫球蛋白的片段;和/或(iii)包括 CDR3 序列但所述 CDR3 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠;在该情形中,所述位点-特异性引物可以特异于分别编码构架 3 序列和构架 4 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交(即,在用于扩增的条件下)。

另一种用于提供能够结合于血清蛋白和能够在本发明中使用(即作为本发明的氨基酸序列或作为用于提供本发明氨基酸序列的起始点)的氨基酸序列(诸如 CDR 序列)的具体方法可以包括下列步骤:

a) 提供免疫球蛋白序列的组、集合或文库；

b) 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列；

c) 确定至少一种如步骤 b) 中鉴别的免疫球蛋白序列的核苷酸序列和/或氨基酸序列，所述免疫球蛋白序列能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力；和/或确定其 CDR 序列和/或其包括 CDR 序列的片段的核苷酸序列和/或氨基酸序列；

d) 利用本身已知的任何合适技术制备按照本发明的氨基酸序列，所述氨基酸序列(i)基本由具有步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

此外，在该方法的步骤 b) 中，可以筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库，以获得能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白(transferring)或纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列；和/或以获得能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。

具体地，可以筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列，和更具体地，以获得能够结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域，和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列。按照一个具体但非-限制性方面，在该方法的步骤 b) 中，可以筛选所述氨基酸序列组、集合或文库，以获得能够结合于(人)血清清蛋白的不涉及(人)血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的一种或多种氨基酸序列；以获得能够结合于(人)血清清蛋白的至少一个不形成(人)血清清蛋白的结构域 III 部分的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的氨基酸序列。

此外，所述筛选可以以任何本身已知的蛋白质筛选方式进行。例如，所述氨基酸序列组、集合或文库可以使用技术人员已知的技术展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。参考例如 Hoogenboom 等的综述，自然生物技术 (Nat Biotechnol) 23:1105, 2005 和其中引用的其他现有技术。

以上方法的步骤 a) 中使用的免疫球蛋白序列的组、集合或文库可以是任何合适的免疫球蛋白序列组、集合或文库，诸如天然免疫球蛋白序列组、集合或文库，合成或半-合成免疫球蛋白序列组、集合或文库，或进行了亲和力成熟的免疫球蛋白序列组、集合或文库。按照一个具体但非-限制性方面，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库，和具体地，是获自血清蛋白适当免疫（即，以致生成针对所述血清蛋白的免疫应答）的哺乳动物的免疫组、集合或文库。例如，步骤 a) 中使用的免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是重链抗体或 V_{HH} 序列的免疫组、集合或文库，所述免疫组、集合或文库获自血清蛋白适当免疫的骆驼科动物（即，以致生成针对所述血清蛋白的免疫应答）。关于提供所述组、集合或文库的方法，也参考本文中引用的现有技术。

所述免疫球蛋白序列组、集合或文库优选地是源自重链可变结构域或轻链可变结构域的 CDR 序列的组、集合或文库，和可以具体地是结构域抗体、单结构域抗体或能够起结构域抗体或单结构域抗体作用的免疫球蛋白序列的组、集合或文库。

此外，在步骤 c) 中，优选地，确定 CDR2 序列或 CDR3 序列的序列。

另一种用于提供能够结合于血清蛋白和能够在本发明中使用（即作为本发明的氨基酸序列或作为用于提供本发明氨基酸序列的起始点）的氨基酸序列（诸如 CDR 序列）具体方法可以包括下列步骤：

a) 提供源自骆驼类动物表达免疫球蛋白序列的细胞的组、集合或文库；

b) 筛选所述细胞的组、集合或文库，以获得 (i) 表达能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列的细胞；和 (ii) 表达重链抗体的细胞；其中步骤 (i) 和 (ii) 可以基本作为单一筛选步骤或作为两个分开的筛选步骤以任何合适

的顺序执行，从而提供至少一种表达重链抗体的细胞，所述重链抗体能够结合于血清蛋白的至少一个结构域或表位和/或对其具有亲和力；

c) 确定由步骤 b) 中提供的细胞表达的至少一种重链抗体的核苷酸序列和/或氨基酸序列，所述重链抗体能够结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力；和/或确定其 CDR 序列和/或其包括 CDR 序列的片段的核苷酸序列和/或氨基酸序列；

d) 利用本身已知的任何合适技术制备按照本发明的氨基酸序列，所述氨基酸序列(i)基本由具有步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括具有在步骤 c) 中确定的氨基酸序列的 CDR 序列，但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

在该方法中，细胞的集合或样品优选是 B-细胞集合或样品，且特别地，(B-) 细胞集合或样品获自受抗原适当免疫的骆驼科动物，所述抗原包括需要的血清蛋白结构域或表位，从而产生针对需要的结构域或表位的免疫应答。

筛选步骤 b) 可以例如使用流式细胞术技术诸如 FACS 执行。

在另一种具体的方法中，提供编码可以结合于血清蛋白和可以用在本发明中（即，作为本发明的氨基酸序列或作为用于提供本发明氨基酸序列的起始点）的氨基酸序列（如 CDR 序列）的核苷酸序列。所述方法可以包括下列步骤：

a) 提供编码氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；

b) 筛选所述编码氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列可以结合于血清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力；和

c) 分离编码氨基酸序列的核苷酸序列，所述氨基酸序列可以结合于所述血清蛋白或所述其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

在该方法的步骤 b) 中, 优选筛选所述核苷酸序列组、集合或文库, 以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列能够结合于选自由血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原组成的组中的血清蛋白和/或对其具有亲和力; 和/或以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列能够结合于血清清蛋白、血清免疫球蛋白诸如 IgG、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白或纤维蛋白原的至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

具体地, 在该方法的步骤 b) 中, 可以筛选所述核苷酸序列组、集合或文库, 以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列能够结合于血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力; 和更具体地, 以获得编码这样氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列能够结合于人血清清蛋白或其至少一个部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。按照一个具体但非-限制性方面, 在该方法的步骤 b) 中, 可以筛选所述核苷酸序列组、集合或文库, 以获得一种或多种编码氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列可以结合于(人)血清清蛋白中不涉及(人)血清清蛋白和 FcRn 的结合的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力; 和/或以获得编码氨基酸序列的核苷酸序列, 所述氨基酸序列可以结合于(人)血清清蛋白中至少一个不形成(人)血清清蛋白的结构域 III 部分的部分、片段、表位或结构域和/或对其具有亲和力。

所述筛选可以任何本身已知的蛋白质筛选方式执行。例如, 由所述核苷酸序列组、集合或文库编码的氨基酸序列可以使用技术人员已知的技术展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体上。参考例如 Hoogenboom 等的综述, 自然生物技术 (Nat Biotechnol) 23:1105, 2005 和其中引用的其他现有技术。

以上方法中使用的核苷酸序列组、集合或文库优选包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库, 所述氨基酸序列基本由侧邻 2 个旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成, 所述旁侧氨基酸序列源自免疫球蛋白构架序列; 和/或编码包含 CDR 序列的免疫球蛋白序列片段的核苷酸序列组、集合或文库, 所述 CDR 序列两侧侧邻构架序列或构架序列片段。具

体地，所述核苷酸序列组、集合或文库可以包括编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列包括或基本由侧邻 2 个旁侧氨基酸序列的 CDR 序列组成，所述旁侧氨基酸序列源自构架序列，所述构架序列在所述 CDR 序列来源的免疫球蛋白可变结构域中邻近所述 CDR 序列。例如，所述核苷酸序列组、集合或文库可以包括或基本由编码 CDR2 序列的核苷酸序列组成，所述 CDR2 序列侧邻 2 个分别源自构架 2 序列和构架 3 序列的旁侧氨基酸序列，或可以包括或基本由编码 CDR3 序列的核苷酸序列组成，所述 CDR2 序列侧邻 2 个分别源自构架 3 序列和构架 4 序列的旁侧氨基酸序列。

为了提供编码包含 2 个用于形成二硫键（如本文中进一步所述）的半胱氨酸残基的氨基酸序列的核苷酸序列，以上方法可以进一步包括引入（即，通过添加、插入或置换一个或多个核苷酸）编码 1 个或 2 个半胱氨酸残基的密码子，以使通过由此获得的核苷酸序列编码的氨基酸序列中的每个构架序列包含至少一个半胱氨酸残基。

备选地，在由核苷酸序列编码的氨基酸序列不包括旁侧氨基酸序列的情况下，所述核苷酸序列可以适当地连接于编码所述可以添加的旁侧序列（也优选具有半胱氨酸残基）核苷酸序列。

而且，一种或多种由此获得的核苷酸序列可以彼此连接和/或连接于一种或多种（且至少一种）编码包括或基本由氨基酸序列组成的治疗部分的核苷酸序列（任选地通过一种或多种编码一种或多种接头的核苷酸序列）。

以上方法还可以包括适当表达由此获得的核苷酸序列的步骤，从而提供本发明的氨基酸序列或本发明的多肽。

以上方法的步骤 a) 中使用的（和步骤 b) 中随后筛选的）核苷酸序列组、集合或文库可以是编码氨基酸序列的任何合适核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。例如，其可以是编码这样的氨基酸序列的核苷酸序列组、集合或文库，所述氨基酸序列通过包括使用一种或多种本身已知的亲和力成熟技术的方法获得。

然而，按照一个优选的方面，所述组、集合或文库可以通过至少包括下列步骤的方法获得：

a) 提供编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库；

b) 利用位点-特异性引物的组合扩增所述核苷酸序列，以使扩增的片段编码这样的氨基酸序列组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR 序列但所述 CDR 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠。

编码以上方法步骤 a) 中使用的免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库可以是编码免疫球蛋白序列的任何合适核苷酸序列组、集合或文库，但是可以具体地是免疫组、集合或文库，和更具体地，获自由血清蛋白适当免疫（即，由此提高针对所述血清蛋白的免疫应答）的哺乳动物的免疫组、集合或文库。这样的组、集合或文库可以以任何本身已知的方式，诸如通过所有组成部分克隆产生（见例如 WO 90/05144 或本文中引用的 Hoogenboom 的综述）。

在一个具体但非-限制性方面，所述编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列组、集合或文库可以是编码获自由血清蛋白适当免疫（即，由此产生针对所述血清蛋白的免疫应答）的骆驼科动物的重链抗体或 V_{HH} 序列的核苷酸序列免疫组、集合或文库。为此，参考例如本文中引用的现有技术。

扩增步骤 b) 优选利用位点-特异性引物（的组合）执行，所述引物特异地编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交（即，在用于扩增的条件下），所述免疫球蛋白序列侧面是所述 CDR 序列。例如，所述位点-特异性引物（的组合）可以是这样的，以致扩增的片段编码这样的氨基酸序列组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由 CDR2 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR2 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR2 序列但所述 CDR2 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；在该情形中，所述位点-特异性引物可以特异地编码免疫球蛋白序列 2 序列和免疫球蛋白序列 3 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交（即，在用于扩增的条件下）。

备选地，所述位点-特异性引物（的组合）可以是这样的，以致扩增的片段编码这样的氨基酸序列组、文库或集合，所述氨基酸序列 (i) 基本由

CDR3 序列组成；和/或 (ii) 包括包含 CDR3 序列的免疫球蛋白片段；和/或 (iii) 包括 CDR3 序列但所述 CDR3 序列不包括免疫球蛋白折叠且也不能形成免疫球蛋白折叠；在该情形中，所述位点-特异性引物可以特异于分别编码构架 3 序列和构架 4 序列的核苷酸序列和/或能够与其杂交（即，在用于扩增的条件下）。

可以用在本文所述方法中的一些优选但非-限制性引物在图 1 中和在 SEQ ID NO's: 7-25 中给出。这些引物（以及与 SEQ ID NO's: 7-25 中至少一种引物具有至少 80%，诸如至少 90%，例如至少 95% 序列同一性的类似引物）形成本发明的另一方面。

本发明的另一方面包括选自 SEQ ID NO's: 7-25（或选自与 SEQ ID NO's: 7-25 中至少一种引物具有至少 80%，诸如至少 90%，例如至少 95% 序列同一性的引物）的引物中的至少 2 种引物（即至少一种正向引物和至少一种反向引物）的合适组合在生成（即，通过扩增和任选一种或多种本文中提及的另外的步骤，诸如亲和力成熟）至少一种本发明的氨基酸中的用途。

可以利用所述引物（即通过扩增，任选随后进行一种或多种本文中提及的其他步骤，诸如亲和力成熟）生成的本发明氨基酸序列形成本发明的另外方面。当 SEQ ID NO's: 7-25 的引物（及其变体）适合于扩增 CDR3 序列时，所述氨基酸序列优选是 CDR3 序列。而且，当使用 SEQ ID NO's: 7-25 的引物（或其变体）时，扩增后获得的氨基酸序列通常在 CDR3 序列的两端包含旁侧序列（见以下实施例）。然而，本发明的这个方面还包括用 SEQ ID NO's: 7-25 的引物（或其变体）获得的不具有所述旁侧序列，或具有一种或多种其他旁侧序列（如本文中进一步所述）的 CDR3 序列。

所述氨基酸序列（即，包括具有或不具有旁侧序列的 CDR3）可以进一步在如本文中所述，且优选与按照本文中所述的优选方面相一致。例如，所述氨基酸序列可以处于限制或非-限制形式；和/或可以是这样的以致它们能够以限制形式、以非-限制形式，和优选以限制和非-限制两种形式结合（如本文中所述）于血清清蛋白，且具体地人血清清蛋白。

具体地，所述氨基酸序列（或包括至少一种所述氨基酸序列的本发明化合物，如本文中进一步所述）优选是这样的，以致它们可以结合于血清

清蛋白，且具体地，人血清清蛋白：

- 具有解离常数(K_D)为 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更小，和优选 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更小和更优选 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升（即，具有缔合常数(K_A)为 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大，和优选 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大和更优选 10^8 - 10^{12} 升/摩尔)；
- 具有缔合率为 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -约 $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，优选 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，更优选 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，诸如 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；

和/或

- 具有解离率为 1s^{-1} ($t_{1/2}=0.69 \text{ s}$)- 10^{-6} s^{-1} (提供具有多日的 $t_{1/2}$ 的接近不可逆的复合物)，优选 10^{-2} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} ，更优选 10^{-3} s^{-1} - 10^{-4} s^{-1} ，诸如 10^{-4} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} ；

包括一种或多种以上氨基酸序列的本发明化合物形成本发明另外的具体方面，且所述本发明的化合物可以如本文中进一步所述（且优选与本文中所述的关于本发明化合物的优选方面相一致）。

本发明的其他方面包括本发明的方法（其可以如本文中进一步所述），其中使用选自 SEQ ID NO's: 7-25 的引物（或选自与 SEQ ID NO's: 7-25 的至少一个引物具有至少 80%，诸如至少 90%，例如至少 95% 序列同一性的引物）的至少 2 种引物的合适组合（即至少一个正向引物和至少一个反向引物）。

在另一方面，本发明涉及能够通过包括本发明中所述方法之一的步骤（且特别地，本文中所述的优选方法之一）以及随后的亲和力成熟（的至少一个步骤）（即，用于改善关于血清蛋白，具体地血清清蛋白，和更具体地人血清清蛋白亲和力）的方法获得的(或已经获得的)氨基酸序列。所述亲和力成熟可以以任何本身已知的蛋白质或多肽亲和力成熟方式执行，且合适的方法和技术是技术人员基于本文中的内容应该清楚的。优选地，所述本发明的亲和力-成熟的氨基酸序列对相关血清蛋白（诸如血清清蛋白，和更具体地人血清清蛋白）具有亲和力，所述亲和力是作为亲和力成熟步骤起始序列使用的序列的亲和力（即，如通过本发明中所述的方法之一获得的）的至少 10 倍或更高，诸如 100 倍或更高，或甚至 1000 倍或 10000

倍或更高。

所述本发明的亲和力-成熟氨基酸序列可以进一步如本文中所述,且优选与本文中所述的优选方面相一致。例如,所述氨基酸序列可以处于限制或非-限制形式;和/或可以是这样的,以致它们能够以限制形式、以非-限制形式,和优选以限制和非-限制两种形式结合(如本文中所述)于血清清蛋白,且具体地,人血清清蛋白。

具体地,所述氨基酸序列(或包括至少一种所述氨基酸序列的本发明化合物,如本文中进一步所述)优选是这样的,以致它们可以结合于血清清蛋白,且具体地,人血清清蛋白:

- 具有解离常数(K_D)为 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更小,和优选 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更小和更优选 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升(即,具有缔合常数(K_A)为 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大,和优选 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大和更优选 10^8 - 10^{12} 升/摩尔);
- 具有缔合率为 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -约 $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 优选 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 更优选 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 诸如 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;

和/或

- 具有解离率为 1 s^{-1} ($t_{1/2}=0.69 \text{ s}$)- 10^{-6} s^{-1} (提供具有多日的 $t_{1/2}$ 的接近不可逆的复合物), 优选 10^{-2} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} , 更优选 10^{-3} s^{-1} - 10^{-4} s^{-1} , 诸如 10^{-4} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} ;

包括一种或多种以上氨基酸序列的本发明化合物形成本发明另外的具体方面,且所述本发明的化合物可以如本文中进一步所述(且优选与本文中所述的关于本发明化合物的优选方面相一致)。

在另一方面,本发明涉及能够结合于血清蛋白和包括至少一个(且优选仅一个)二硫键的氨基酸序列。

所述氨基酸序列优选具有少于 90 个氨基酸残基,优选少于 50 个氨基酸残基,诸如约 40、30 或 20 个氨基酸残基的长度。

例如,按照优选但非-限制性的方面,所述氨基酸序列包括或基本由能够结合于侧邻 2 个旁侧氨基酸序列的血清蛋白的肽序列组成,其中每个旁侧氨基酸序列包含形成二硫键部分的半胱氨酸残基。在所述氨基酸序列

中,所述肽序列可以具有 3-30 个氨基酸残基,优选 5-25 个氨基酸残基的长度,且所述 2 个旁侧氨基酸序列可以各具有 1-30 个氨基酸残基,优选 2-20 个氨基酸残基,诸如约 5、10 或 15 个氨基酸残基的长度。

而且,在所述氨基酸序列中,所述 2 个旁侧氨基酸序列优选源自免疫球蛋白构架序列和/或优选地免疫球蛋白构架序列的片段,其中形成二硫键部分的各个旁侧氨基酸序列中的半胱氨酸残基是所述免疫球蛋白构架序列中(或在所述其片段中)天然存在的半胱氨酸残基和/或是引入到所述免疫球蛋白构架序列中(或在所述其片段中)的半胱氨酸残基。

这些氨基酸序列中存在的肽序列可以是合成的肽序列,利用亲和力成熟技术产生的肽序列,或可以基本由 CDR 序列组成(即,如本文中进一步所述)。而且,所述 CDR 序列可以源自能够结合于血清蛋白的 V_H -, V_L -或 V_{HH} -序列,且具体地,源自(单)结构域抗体、dAb、或纳米抗体®或其片段。

而且,CDR2 序列(在该情形中,2 个旁侧氨基酸序列之一优选源自构架 2 序列和/或构架 2 序列的片段,且另一个旁侧氨基酸序列优选源自构架 3 序列和/或构架 3 序列的片段)和 CDR3 序列(在该情形中,2 个旁侧氨基酸序列之一优选源自构架 3 序列和/或构架 3 序列的片段,且另一个旁侧氨基酸序列优选源自构架 4 序列和/或构架 4 序列的片段)是特别优选的。

此外,所述氨基酸序列优选可以以不(显著)缩短血清蛋白分子半衰期的方式结合于血清蛋白。而且,此外,所述氨基酸序列优选可以结合于来自血清蛋白、血清免疫球蛋白、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原或其片段组成的组的血清蛋白;且具体地,结合于血清蛋白或其片段;和更具体地结合于人血清蛋白或其片段。当氨基酸序列可以结合于(人)血清蛋白时,其优选能够结合于不涉及血清蛋白和 FcRn 的结合的(人)血清蛋白上的氨基酸残基;和/或结合于(人)血清蛋白上不形成血清蛋白结构域 III 的部分的氨基酸残基。

而且,所述至少一种治疗部分优选包括或基本由氨基酸序列,且具体地免疫球蛋白序列或其抗原-结合片段(例如,抗体或其抗原-结合片段),诸如免疫球蛋白可变结构域或其抗原-结合片段(例如, V_H -结构域、 V_L -结构域、 V_{HH} -结构域或其抗原-结合片段);或包括所述氨基酸序列的蛋白

质或多肽（例如，scFv 构建体）；和更具体地（单）结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体®组成。

本发明还涉及包括至少一种所述氨基酸序列和至少一种治疗部分的化合物或构建体。此外，所述至少一种氨基酸序列可以直接连接于所述至少一种治疗部分或可以通过一种或多种合适的接头或间隔区连接于所述至少一种治疗部分。当所述至少一种治疗部分优选包括或基本由氨基酸序列组成时，接头或间隔区也优选包括或基本由氨基酸序列组成，这样由此生成的化合物或构建体包括或基本由（融合）蛋白或（融合）多肽组成（即，在本发明的各个氨基酸序列中具有一个二硫键）。

本发明还涉及核苷酸序列或核酸，所述核苷酸序列或核酸编码具有与本发明氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）或编码具有与本发明多肽相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）。

本发明还涉及宿主或宿主细胞，所述宿主或宿主细胞包含所述核苷酸序列或核酸和/或表达（或能够表达）具有与本发明氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）或具有与本发明多肽相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）。

本发明还涉及用于制备本发明所需氨基酸序列化合物或构建体（即，包括至少一个如本文中所述的二硫键）的方法，其包括至少下列步骤：

a) 提供具有与本发明所需氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）或具有与本发明所需多肽相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列（即，具有能够形成二硫键的2个半胱氨酸残基，但不具有二硫键本身）；和

b) 在所述氨基酸序列中形成二硫键，从而分别提供本发明所需氨基酸序列或本发明所需化合物或构建体。

具体地，当所述所需的化合物或构建体是本发明的多肽时，所述方法可以至少包括下列步骤：

a) 表达核苷酸序列或核酸, 所述核苷酸序列或核酸编码具有与本发明所需氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列(即, 具有能够形成二硫键的 2 个半胱氨酸残基, 但不具有二硫键本身), 或编码具有与本发明所需多肽相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列(即, 具有能够形成二硫键的 2 个半胱氨酸残基, 但不具有二硫键本身), 从而分别提供具有与到 138(to 138)的本发明所需氨基酸序列相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列或具有与本发明所需多肽相同的一级氨基酸序列的氨基酸序列;

和任选地, 还包括:

b) 分离步骤 b) 中获得的氨基酸序列;

和:

c) 在步骤 a) 中获得的氨基酸序列中或, 当执行步骤 b) 时, 在步骤 b) 中获得的氨基酸序列中分别形成二硫键, 从而分别提供本发明的所需氨基酸序列或本发明的所需化合物或构建体。

本发明还涉及通过任意以上方法获得的氨基酸序列、化合物或构建体。

本发明还涉及药物组合物, 其包括至少一种如本文中所述的氨基酸序列, 至少一种如本文中所述的化合物或构建体, 或至少一种如本文中所述的核苷酸序列; 和任选地, 至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。

本发明还包括一些其他用于制备本文中所述的构建体和化合物的方法, 其通常包括使至少一种本发明的氨基酸序列, 任选地通过一种或多种合适接头或间隔区, 连接于至少一种治疗部分的步骤。这可以以任何本身已知的合适方式, 例如根据使用的接头(如果有)执行, 且可以例如包括本领域中本身已知的化学连接技术, 例如通过形成一个或多个共价键。一种或多种本发明的氨基酸序列和一种或多种治疗部分可以如本文中进一步所述。此外, 一种或多种本发明的氨基酸序列优选包括如本文中所述的二硫键。

本发明还涉及通过任意以上方法获得的化合物或构建体; 且还涉及包括至少一种所述化合物或构建体且任选至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

发明详述

在本说明书中，实施例和权利要求中：

a) 除非另外指示或定义，所有使用的术语具有它们在本领域中的普通含义，技术人员应该对此很清楚。参考例如标准手册，诸如 Sambrook 等，“分子克隆：实验室手册”（"Molecular Cloning: A Laboratory Manual"）（第 2 版），卷 1-3，冷泉港实验室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（1989）；F. Ausubel 等，编辑，“当前分子生物学方案”（"Current protocols in molecular biology"），Green Publishing 和 Wiley Interscience，纽约（1987）；Lewin，“基因 II”（"Genes II"），John Wiley & Sons，纽约，N.Y.，（1985）；Old 等.，“基因操作原理：遗传工程入门”（"Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering"），第 2 版，加利福尼亚大学出版社（University of California Press），伯克利，CA（1981）；Roitt 等.，“免疫学”（"Immunology"）（第 6 版），Mosby/Elsevier，爱丁堡（2001）；Roitt 等.，Roitt 基本免疫学（Roitt's Essential Immunology），第 10 版，Blackwell Publishing，UK（2001）；和 Janeway 等.，“免疫生物学”（"Immunobiology"）（第 6 版），Garland Science Publishing/Churchill Livingstone，纽约（2005），以及本文中引用的一般背景技术；

b) 除非另外指示，术语“免疫球蛋白序列”-无论其在本文中用于指重链抗体还是指常规 4-链抗体-均作为包括全长抗体、其各条链、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，诸如分别地， V_{HH} 结构域或 V_H/V_L 结构域）的一般术语使用。另外，术语“序列”用于本文中（例如，在如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“ V_{HH} 序列”或“蛋白质序列”中）时，应该通常理解为包括相应的氨基酸序列以及编码所述氨基酸序列的核酸序列或核苷酸序列，除非上下文需要更有限的解释；

c) 如技术人员应该清楚地，除非另外指示，可以且已经以本身已知的方式执行没有特别详细描述的所有方法、步骤、技术和操作。还参考例如标准手册和本文中提到的一般背景技术，和其中引用的其它参考；以及例如以下综述 Presta，现代药物递送综述（Adv. Drug Deliv. Rev.）2006，58（5-6）：640-56；Levin 和 Weiss，分子生物系统（Mol. Biosyst.）2006，2(1)：

49-57; Irving 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods), 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz 等, 胎盘 (Placenta), 2000, 21 附录 A, S106-12, Gonzales 等, 肿瘤生物学 (Tumour Biol.), 2005, 26(1), 31-43, 其描述蛋白质工程技术, 诸如亲和力成熟和其他用于改进蛋白质诸如免疫球蛋白特异性和其他需要的性质的技术。

d) 氨基酸残基按照标准三字母或单字母氨基酸密码显示, 如表 A-2 中所提及;

表 A-2: 单字母和三字母氨基酸密码

非极性, 不带电 (pH 6.0 – 7.0) ⁽³⁾	丙氨酸	Ala	A
	缬氨酸	Val	V
	亮氨酸	Leu	L
	异亮氨酸	Ile	I
	苯丙氨酸	Phe	F
	甲硫氨酸 ⁽¹⁾	Met	M
	色氨酸	Trp	W
	脯氨酸	Pro	P
极性, 不带 电 (pH 6.0-7.0)	甘氨酸 ⁽²⁾	Gly	G
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	半胱氨酸	Cys	C
	天冬酰胺	Asn	N
	谷酰胺	Gln	Q
	酪氨酸	Tyr	Y
极性, 带电 (pH 6.0-7.0)	赖氨酸	Lys	K
	精氨酸	Arg	R
	组氨酸 ⁽⁴⁾	His	H
	天冬氨酸	Asp	D
	谷氨酸	Glu	E

注意:

- (1) 有时也认为是极性不带电的氨基酸。
- (2) 有时也认为是非极性不带电的氨基酸。
- (3) 如对技术人员清楚地, 该表中指出的氨基酸残基在 pH 6.0-7.0 时带电或不带电的事实不以任何方式反映所述氨基酸残基在低于 6.0 的 pH 和/或在高于 7.0 的 pH 可能具有的电荷; 如对技术人员清楚地, 该表中提及的氨基酸残基在所述更高或更低的 pH 时, 可以是带电的和/或不带电。
- (4) 如在本领域中已知, His 残基的电荷很大程度上依赖于 pH 甚至微小的变化, 但是 His 残基可以通常被认为在 pH 约 6.5 时是基本不带电的。

e) 为了比较两个或更多核苷酸序列的目的, 第一核苷酸序列和第二核苷酸序列间“序列同一性”的百分比可以通过[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中相应位置处的核苷酸相同的核苷酸的数量]除以[第一核苷酸序列中核苷酸总数]并乘以[100%]来计算, 其中第二核苷酸序列中的每个核苷酸缺失, 插入, 置换或添加-与第一核苷酸序列相比-被认为是在单核苷酸(位置)的差别。

备选地, 两个或更多核苷酸序列间序列同一性程度可以利用已知的用于序列匹配的计算机运算法则诸如 NCBI Blast v2.0, 以及利用标准设置而计算。

一些其他的用于确定序列同一性程度的技术, 计算机运算法则和设置例如记述在 WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 和 GB 2 357 768-A 中。

通常, 为了依照上文中所略述的计算方法确定两个核苷酸序列间的“序列同一性”百分比的目的, 将具有最大核苷酸数量的核苷酸序列取作“第一”核苷酸序列, 且将另一条核苷酸序列取作“第二”核苷酸序列;

f) 为了比较两个或更多氨基酸序列的目的, 第一氨基酸序列和第二氨基酸序列间“序列同一性”(也称为“氨基酸同一性”)的百分比可以通过[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数量]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基总数]并乘以

[100%]来计算, 其中第二氨基酸序列中的每个氨基酸残基缺失, 插入, 置换或添加-与第一氨基酸序列相比-被认为是在单氨基酸残基(位置)的差别, 即作为本文所定义的“氨基酸区别”。

备选地, 两个氨基酸序列间序列同一性的程度可以利用已知的计算机运算法则, 诸如以上提及的用于为核苷酸序列确定序列同一性程度的那些, 以及也利用标准设置而计算。

通常, 为了确定依照上文中所略述的计算方法的两个氨基酸序列间的“序列同一性”百分比的目的, 将具有最大氨基酸残基数量的氨基酸序列取作“第一”氨基酸序列, 且将另一条氨基酸序列取作“第二”氨基酸序列。

而且, 在确定两个氨基酸序列间序列同一性程度中, 技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸置换, 所述“保守”氨基酸置换可以通常被描述为这样的氨基酸置换, 其中氨基酸残基被另一个具有相似化学结构且其对多肽的功能, 活性, 或其他生物特性具有很小或基本无影响的氨基酸残基替换。所述保守氨基酸置换在本领域中众所周知, 例如来自 WO 04/037999, GB-A-2 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 和 WO 01/09300; 并且可以基于来自 WO 04/037999 和 WO 98/49185 以及来自其中所引用的其他参考文献的相关教导选择所述置换(优选)的类型和/或组合。

所述保守的置换优选地是这样的置换, 其中下列组(a) – (e)中的一个氨基酸被相同组中的另一个氨基酸残基置换: (a)小脂肪族, 非极性或稍微极性的残基: Ala, Ser, Thr, Pro 和 Gly; (b)极性, 带负电的残基和它们(不带电的)酰胺: Asp, Asn, Glu 和 Gln; (c)极性, 带正电的残基: His, Arg 和 Lys; (d)大脂肪族, 非极性残基: Met, Leu, Ile, Val 和 Cys; 和(e)芳香族残基: Phe, Tyr 和 Trp。

特别优选的保守置换如下: Ala 变为 Gly 或变为 Ser; Arg 变为 Lys; Asn 变为 Gln 或变为 His; Asp 变为 Glu; Cys 变为 Ser; Gln 变为 Asn; Glu 变为 Asp; Gly 变为 Ala 或变为 Pro; His 变为 Asn 或变为 Gln; Ile 变为 Leu 或变为 Val; Leu 变为 Ile 或变为 Val; Lys 变为 Arg, 变为 Gln 或变为 Glu; Met 变为 Leu, 变为 Tyr 或变为 Ile; Phe 变为 Met, 变为 Leu 或变为 Tyr; Ser 变为 Thr; Thr 变为 Ser; Trp 变为 Tyr; Tyr 变为 Trp; 和/或 Phe 变为 Val, 变为 Ile 或变为

Leu。

应用于本文所述多肽的任何氨基酸替换还可以基于由 Schulz 等, 蛋白质结构的原则 (Principles of Protein Structure), Springer-Verlag, 1978 揭示的不同物种同源蛋白质间氨基酸变异频率的分析, 基于由 Chou 和 Fasman, 生物化学 (Biochemistry) 13: 211, 1974 和酶学进展 (Adv. Enzymol.), 47: 45-149, 1978 揭示的结构形成潜力分析, 和基于由 Eisenberg 等, 美国国家科学院学刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 81: 140-144, 1984; Kyte & Doolittle; 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 157: 105-132, 1981, 和 Goldman 等, 生物物理学和化学年度综述 (Ann. Rev. Biophys. Chem.) 15: 321-353, 1986 揭示的蛋白质中疏水性模式的分析进行, 将其全部内容引入本文作为参考。在本文的叙述和以上引用的一般背景技术中给出了纳米抗体一级结构, 次级结构和三级结构的信息。而且, 为了这个目的, 例如由 Desmyter 等, 自然结构生物学 (Nature Structural Biology), 卷 3, 9, 803 (1996); Spinelli 等, 自然结构生物学 (Natural Structural Biology) (1996); 3, 752-757; 和 Decanniere 等, 结构 (Structure), 卷 7, 4, 361 (1999) 给出了来自美洲驼 (llama) 的 V_{HH} 结构域的晶体结构。进一步关于一些在常规 V_H 结构域中形成 V_H/V_L 界面的氨基酸残基和关于骆驼化 (camelize) 这些位置置换的潜力的信息可以见于以上引用的现有技术中。

g) 如果氨基酸序列和核酸序列在其全长范围内具有 100% 序列同一性 (如本文定义), 则将它们称为“完全地相同”;

h) 当比较两个氨基酸序列时, 术语“氨基酸区别”指与第二序列相比, 第一序列位置上单个氨基酸残基的插入, 缺失或置换; 可以理解两个氨基酸序列可以含有一个, 两个或多个所述的氨基酸区别;

i) 当将核苷酸序列或氨基酸序列分别记述为“包括”另一种核苷酸序列或氨基酸序列, 或“基本由”另一种核苷酸序列或氨基酸序列“组成”时, 其可以意味着将后者核苷酸序列或氨基酸序列分别引入了第一-提及的核苷酸序列或氨基酸序列中, 但是更通常地, 其通常意指第一-提及的核苷酸序列或氨基酸序列在其序列中分别具有一段分别与后者序列相同的核苷酸序列或氨基酸序列的核苷酸或氨基酸残基序列, 这与所述第一-提及的序列实际上是如何生成或获得的 (其可以例如通过本文中所述的任何合适

方法)无关。通过非-限制性实例,当将本发明的纳米抗体记述为包括 CDR 序列时,这意味着将所述 CDR 序列引入到本发明的纳米抗体中,但更通常地,其通常意指本发明的纳米抗体在其序列中包含一段与所述 CDR 序列相同的氨基酸序列的氨基酸残基序列,这与所述本发明的纳米抗体是如何生成或获得的无关。还应该注意到当所述后者氨基酸序列具有特定生物学或结构功能时,其优选具有所述第一-提及的氨基酸序列中的基本相同、相似或等价的生物学或结构功能(换言之,所述第一-提及的氨基酸序列优选是这样的,即所述后者序列能够执行基本相同、相似或等价生物学或结构功能)。例如,当将本发明的纳米抗体记述为分别包括 CDR 序列或构架序列时,所述 CDR 序列和构架优选地能够在所述纳米抗体中分别起 CDR 序列或构架序列的作用。而且,当将核苷酸序列记述为包括另一种核苷酸序列时,第一-提及的核苷酸序列优选是这样的,即当将其表达为表达产物(例如多肽)中时,由后者核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换言之,即后者核苷酸序列与第一-提及的,较大的核苷酸序列符合相同的阅读框)。

j) 认为核酸序列或氨基酸序列是“(处于)基本分离的(形式)”-例如,与它的天然生物来源和/或获得它的反应培养基或培养基相比较-当将它与至少一种通常在该来源或培养基中与它缔合的其他成分,如另一种核酸,另一种蛋白质/多肽,另一种生物成分或高分子或至少一种污染物,杂质或次要成分分离时。特别地,当将核酸序列或氨基酸序列纯化至少 2 倍,特别地至少 10 倍,更特别地至少 100 倍,和高达 1000 倍或更高时,认为它们是“基本分离的”。如利用合适的技术,如合适的层析技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳确定地,“处于基本分离形式的”核酸序列或氨基酸序列优选地是基本同源的;

k) 术语“结构域”用于本文时,通常指氨基酸序列(诸如抗体链,且具体地指重链抗体的球状区域)的球状区域,或指基本由所述球状区域组成的多肽。通常,所述结构域包括稳定的肽环(例如,3 或 4 个肽环),例如,作为片层或通过二硫键稳定的。术语“结合结构域”指直接针对抗原决定子(如本文中定义)的这样的结构域。

l) 术语“抗原决定子”指由抗原结合分子(诸如本发明的纳米抗体或

多肽), 且更具体地由所述分子的抗原结合位点识别的抗原上的表位。术语“抗原决定子”和“表位”还可以在本文中交替使用。

m) 可以(特异性)结合于特定抗原决定子, 表位, 抗原或蛋白质(或其至少一个部分、片段或表位), 对其具有亲和力和/或对其具有特异性的氨基酸序列(如本发明的纳米抗体, 抗体, 多肽, 或通常地抗原结合蛋白或多肽或其片段)称为“针对(against)”或“针对(directed against)”所述抗原决定子, 表位, 抗原或蛋白质。

n) 术语“特异性”指特定的抗原结合分子或抗原结合蛋白(如本发明的纳米抗体或多肽)分子可以结合的不同类型抗原或抗原决定子的数量。可以基于亲和力(affinity)和/或抗体亲抗原性(avidity)确定抗原结合蛋白的特异性。由抗原与抗原结合蛋白解离的平衡常数(K_D)表示的亲和力是抗原决定子和抗原结合蛋白上的抗原结合位点间结合强度的测量: K_D 值越小, 抗原决定子和抗原结合分子间的结合强度越强(备选地, 亲和力还可以表达为亲和力常数(K_A), 即 $1/K_D$)。如对技术人员清楚地(例如基于本文进一步的公开内容), 依赖于目的的特异性抗原, 可以以本身已知的方式确定亲和力。抗体亲抗原性是抗原结合分子(如本发明的纳米抗体或多肽)和相关抗原间结合强度的测量。抗体亲抗原性涉及抗原决定子和其在抗原结合分子上的抗原结合位点间的亲和力, 以及抗原结合分子上存在的相关结合位点的数量。典型地, 抗原结合蛋白(如本发明的氨基酸序列、纳米抗体和/或多肽)以 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更低, 和优选地 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更低, 和更优选地 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升的解离常数(K_D)(即, 以 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大, 和优选 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大和更优选 10^8 - 10^{12} 升/摩尔的缔合常数(K_A))结合于其抗原。通常认为任何高于 10^4 摩尔/升的 K_D 值(或任何低于 $10^4 M^{-1}$ 升/摩尔的 K_A 值)表示非特异性结合。优选地, 本发明的单价免疫球蛋白序列以低于 500nM, 优选地低于 200nM, 更优选地低于 10nM, 诸如低于 500pM 的亲和力结合于所需血清蛋白。抗原结合蛋白对抗原或抗原决定子的特异性结合可以以任何合适的本身已知方式和其在本领域中本身已知的不同变体确定, 所述方式包括例如, 斯卡查德分析(Scatchard analysis)和/或竞争结合测定诸如放射性免疫测定(RIA), 酶免疫测定(EIA)和夹心式竞争测定(sandwich competition assays), 以及

本文中提及的其他技术。

如技术人员应该清楚地，解离常数可以是实际或表观解离常数。用于确定解离常数的方法应该是技术人员清楚的，并且例如，包括本文中提到的技术。在这个方面，还应该清楚的是，可能不能测量大于 10^{-4} 摩尔/升或 10^{-3} 摩尔/升 (例如, 10^{-2} 摩尔/升) 的解离常数。任选地, 如技术人员也应该清楚地, 可以基于(实际或表观) 缔合常数 (K_A) , 根据关系 [$K_D = 1/K_A$], 计算(实际或表观) 解离常数。亲和力表示分子相互作用的强度或稳定性。通常通过 K_D , 或解离常数表示亲和力, 其具有单位摩尔/升 (或 M)。还可以将亲和力表示为缔合常数, K_A , 其等于 $1/K_D$, 且具有单位 (摩尔/升) $^{-1}$ (或 M^{-1})。在本说明书中, 两分子 (诸如本发明的氨基酸序列、纳米抗体或多肽或其预期的靶标) 之间相互作用的稳定性应该主要以术语它们相互作用的 K_D 值表示; 这对技术人员应该是清楚的由于通过其 K_D 值指定分子相互作用强度的关系 $K_A = 1/K_D$ 也可以用于计算相应的 K_A 值。 K_D -值也在热力学意义上表征分子相互作用强度, 因为它通过公知的关系 $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (等价地 $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$) 与结合自由能 (DG) 相关, 其中 R 等于气体常数, T 等于绝对温度, 且 $\ln$ 表示自然对数。

被认为是具有意义 (例如特异性的) 生物学相互作用的 K_D 典型地在 $10^{-10}M$ (0.1 nM)- $10^{-5}M$ (10000 nM) 范围内。相互作用越强, 其 K_D 越低。

还可以将 K_D 表示为复合物解离率常数 (表示为 k_{off}), 与其缔合率 (表示为 k_{on}) 的比 (由此, $K_D = k_{off}/k_{on}$ 且 $K_A = k_{on}/k_{off}$)。解离率 k_{off} 具有单位 s^{-1} (其中 s 是秒的 SI 单位符号)。缔合率 k_{on} 具有单位 $M^{-1}s^{-1}$ 。缔合率可以在 $10^2 M^{-1}s^{-1}$ —约 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 之间变化, 接近双分子相互作用的扩散-限制性缔合率常数。解离率通过关系式 $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$, 与给定分子相互作用的半衰期相关。解离率可以在 $10^{-6}s^{-1}$ (具有多日 $t_{1/2}$ 的接近不可逆复合物) — $1s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0.69s$) 的范围内变化。

两分子之间分子相互作用的亲和力可以通过不同的本身已知的技术, 诸如众所周知的表面等离子体共振 (SPR) 生物传感器技术 (见例如, Ober 等, 国际免疫学 (Intern. Immunology), 13, 1551-1559, 2001) 测量, 其中将一个分子固定在生物传感器芯片上, 并在流动条件下使另一个分子经过该固定的分子, 从而产生缔合率 (K_{on})、解离率 (k_{off}) 测量值和由此的 K_D

(或 K_A) 值。这可以例如使用公知的 BIACORE 设备执行。

技术人员还应该清楚地, 如果测量过程以某种方式影响所示分子固有的结合亲和力, 例如通过与在一个分子的生物传感器上的涂层相关的人为产物, 则测量的 K_D 可以对应于表观 K_D 。而且, 如果一个分子包含多于一个关于另一个分子的识别位点, 则可以测量表观 K_D 。在所述情形中, 测量的亲和力可能受到两分子相互作用亲和力的影响。

可以用于评估亲和力的另一种方法是 Friguet 等的 2-步 ELISA (酶联免疫吸附测定) 程序(免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods), 77, 305-19, 1985)。该方法建立溶液相结合平衡测量法, 并避免将所述分子之一吸附到支持物诸如塑料上可能涉及的人为产物。

然而, 精确测量 K_D 可能需要大量劳动, 所以, 通常确定表观 K_D 值来评估两分子的结合强度。应该注意到只要以一致的方式进行所有测量 (例如, 保持测定条件不变), 则表观 K_D 测量值可以用作真实 K_D 的近似值, 且因此在本文件中, 应该认为 K_D 和表观 K_D 是同等重要或相关的。

最后, 应该注意到在许多情形中, 有经验的科学家可以判断相对于一些参考分子来确定结合亲和力是方便的。例如, 为了评估分子 A 和 B 之间的结合强度, 人们可以例如使用参考分子 C, 已知所述参考分子 C 结合于 B 并由荧光基团或发色基团或其它化学部分, 诸如用于在 ELISA 或 FACS 中容易检测 (荧光激活的细胞分类) 的生物素或其它形式 (用于荧光检测的荧光团、用于光吸收检测的发色团、用于链霉抗生物素蛋白-介导的 ELISA 检测的生物素) 适当标记。典型地, 将所述参考分子 C 保持为固定浓度, 且 A 的浓度由于给定的 B 浓度或量而变化。作为结果, 获得对应于 A 浓度的 IC_{50} 值, 在所述浓度时, 在缺乏 A 的条件下, 对 C 测量的信号减半。倘若 $K_{D\text{ 参考}}$, 参考分子的 K_D , 以及参考分子的总浓度 $c_{\text{参考}}$ 是已知的, 则可以由下列公式: $K_D = IC_{50} / (1 + c_{\text{参考}} / K_{D\text{ 参考}})$ 获得关于相互作用 A-B 的表观 K_D 。注意, 如果 $c_{\text{参考}} \ll K_{D\text{ 参考}}$, 则 $K_D \approx IC_{50}$ 。倘若以一致的方式对进行比较的结合物进行 IC_{50} 测量 (例如, 保持 $c_{\text{参考}}$ 固定), 则可以通过 IC_{50} 评估分子相互作用的强度或稳定性, 并且贯穿本文将该测量判定为等价于 K_D 或表观 K_D 。

o) 本发明氨基酸序列、化合物或多肽的半衰期通常定义为体内, 例如

由于由天然机制引起的序列或化合物降解和/或序列或化合物清除或螯合，降低氨基酸序列、化合物或多肽血清浓度 50%所用的时间。本发明氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以以任何本身已知的方式，诸如通过药物代谢动力学分析确定。合适的技术对本领域中的技术人员应该是清楚的，且可以例如通常包括下列步骤：向温血动物（即，向人或向其他合适的哺乳动物，诸如小鼠、兔、大鼠、猪、狗或灵长类动物，例如来自猕猴属（*Macaca*）的猴（诸如，和具体地，食蟹猴（*Macaca fascicularis*）和/或猕猴（*Macaca mulatta*）和狒狒（*Papio ursinus*））适当施用合适剂量的本发明氨基酸序列、化合物或多肽；从所述动物收集血液样品或其他样品；确定本发明氨基酸序列、化合物或多肽在所述血液样品中的水平或浓度；和从由此获得的（一组）数据计算直到本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的水平或浓度与给药后初始水平相比降低了 50%时的时间。参考例如以下试验部分，以及 Dennis 等，生物化学杂志（*J. Biol. Chem*）277:35035-42 (2002)，参考标准手册，诸如 Kenneth, A 等：药物的化学稳定性：药剂师手册（*Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*）和 Peters 等，药物动力学分析：实践方案（*Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach*）(1996)。还参考“药物代谢动力学”（“*Pharmacokinetics*”），M Gibaldi & D Perron, 由 Marcel Dekker 出版,第 2 修订版(1982)。

如技术人员也应该清楚地（见例如 WO 04/003019 的第 6 和 7 页和在其中引用的其它参考文献），可以利用参数诸如 $t_{1/2-\alpha}$ ， $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积（AUC）表示半衰期。在本说明书中，“半衰期的增加”指这些参数中任一项，诸如这些参数中任两项，或基本全部三项参数的增加。用于本文中时，“半衰期的增加”或“增加的半衰期”具体指在 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或 AUC 或二者增加或不增加的情况下， $t_{1/2-\beta}$ 的增加。

p) 提供任何附图、序列表和试验部分/实施例仅为了举例说明本发明而不要接受或诠释为以任何方式限制本发明和/或所附权利要求的范围，除非在本文中明确另外指出。

为了一般性描述重链抗体及其可变结构域，特别参考本文中引用的现有技术，参考 Muyldermans 在分子生物技术综述中的文章 74(2001), 277-302；以及参考下列专利申请，将其作为一般背景技术提及：Vrije

Universiteit Brussel 的 WO 94/04678, WO 95/04079 和 WO 96/34103; Unilever 的 WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 和 WO 02/48193; Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB) 的 WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 和 WO 03/055527; Algonomics N.V. 和埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 的 WO 03/050531; 加拿大国家研究委员会 (National Research Council of Canada) 的 WO 01/90190; 抗体学会 (Institute of Antibodies) 的 WO 03/025020 (= EP 1 433 793); 以及埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 的 WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 和 WO 06/122825 和埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 的其它公开的专利申请。还参考这些申请中提及的其他现有技术, 且具体地是国际申请 WO 06/040153 的第 41-43 页提及的参考文献列表, 将该列表和参考文献引入本文作为参考。

按照本领域中使用的技术 (参见以上参考文献), 在天然存在的重链抗体中存在的可变结构域还应该指“ V_{HH} 结构域”, 从而将它们与常规 4-链抗体中存在的重链可变结构域 (在下文中称为“ V_H 结构域”), 和与常规 4-链抗体中存在的轻链可变结构域 (在下文中称为“ V_L 结构域”) 区别开。如以上提到的现有技术中所提及地, V_{HH} 结构域具有大量独特的结构特征和功能特性, 其使得分离的 V_{HH} 结构域 (以及基于此的纳米抗体, 其与天然存在的 V_{HH} 结构域共享这些结构特征和功能特性) 和包含所述 V_{HH} 结构域的蛋白质高度有利地用作功能抗原-结合结构域或蛋白。

本发明的氨基酸序列优选是哺乳动物来源的, 或源自 (如本文中定义) 哺乳动物来源的氨基酸序列。例如, 所述氨基酸序列可以源自产生重链抗体的哺乳动物物种, 诸如可以使用携带所述重链抗体基因座的骆驼科动物或转基因动物 (见例如 WO 02/085945, WO 04/049794, WO 06/008548 和 Janssens 等, 美国国家科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 2006 年 10 月 10 日; 103(41):15130-5)。备选地, 本发明的氨基酸序列可以源自如可在鲨鱼的某些物种中存在的单可变结构域 (例如, 所谓的“IgNAR 结构域”, 见例如 WO 05/18629)。

本发明的氨基酸序列优选包括或基本由 CDR (“互补决定区”) 序列 (本文中也称为 “CDR 序列”) 组成; 所述 CDR 序列优选地可以结合于血清蛋白和可以源自免疫球蛋白可变结构域序列, 所述免疫球蛋白可变结构域序列是已经产生的和/或针对血清蛋白, 具体地, 针对血清清蛋白, 和更具体地针对人血清清蛋白 (或针对其一部分、结构域或片段)。按照优选但非-限制性方面, 所述 CDR 序列源自来自免疫球蛋白可变结构域的 CDR2 序列或 CDR3 序列。所述免疫球蛋白可变结构域可以是, 例如人可变结构域、(单结构域抗体)、dAb 的、纳米抗体®或其功能性片段。

本发明还提供用于识别和生成所述肽和用于制备包括至少一种所述肽的化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白和构建体的方法。

按照优选但非-限制性方面, 本发明的氨基酸序列源自免疫球蛋白重链可变结构域。所述重链可变结构域的优选实例是来自骆驼科动物 (*Camelidae*) 的 V_{HH} 结构域。

按照另一个具体但非-限制性方面, 本发明的氨基酸序列包括或基本由 CDR 序列组成, 所述 CDR 序列具有 3-40 个氨基酸范围内, 优选 5-30 个氨基酸范围内, 更优选 6-25 个氨基酸范围内的长度; 本发明氨基酸序列的长度可以是 (但不仅限于) 例如 8 个氨基酸、10 个氨基酸、12 个氨基酸、14 个氨基酸、16 个氨基酸、18 个氨基酸、20 个氨基酸、22 个氨基酸或 24 个氨基酸。

本发明的氨基酸序列 (以及包含所述氨基酸序列的化合物, 如本文中定义) 优选是这样的, 以致它们以这样的方式与人血清清蛋白结合或否则 (otherwise) 缔合, 所述方式是当所述氨基酸序列 (或化合物) 与人中的人血清清蛋白结合或否则缔合时, 其表现出血清半衰期为人中人血清清蛋白天然半衰期的至少约 50% (诸如约 50%-70%), 优选至少 60% (诸如约 60%-80%), 或优选至少 70% (诸如约 70%-90%), 更优选至少 80% (诸如约 80%-90%), 或优选至少约 90%。

在一个非-限制性方面, 本发明的氨基酸序列优选与来自至少一种其他哺乳动物物种, 例如来自小鼠、兔、大鼠、或灵长类动物的血清清蛋白交叉-反应。具体地, 本发明的氨基酸序列可以与来自选自下列各项组成的组灵长类动物的血清清蛋白交叉-反应: 来自猕猴 (*Macaca*) 属的猴 (诸如,

和具体地, 食蟹猴(*Macaca fascicularis*)和/或猕猴(*Macaca mulatta*)和狒狒(*Papio ursinus*)。而且, 当本发明的氨基酸序列与来自所述灵长类动物物种的血清清蛋白交叉-反应时, 其优选是这样的, 以致当其与所述灵长类动物中的血清清蛋白分子结合或否则缔合时, 其表现出的血清半衰期是所述灵长类动物中所述血清清蛋白天然半衰期的至少约 50% (诸如约 50%-70%), 优选至少约 60% (诸如约 60%-80%), 或优选至少约 70% (诸如约 70%-90%), 更优选至少约 80% (诸如约 80%-90%), 或优选至少约 90%。

通常, 包括至少一种本发明氨基酸序列和至少一种治疗部分的本发明化合物或多肽优选地具有的半衰期为所述治疗部分本身半衰期的至少 1.5 倍, 优选至少 2 倍, 诸如至少 5 倍, 例如至少 10 倍或多于 20 倍。例如, 本发明的化合物或多肽可以具有与治疗部分本身相比增长多于 1 小时, 优选多于 2 小时, 更优选多于 6 小时, 诸如多于 12 小时, 或甚至多于 24, 48 或 72 小时的半衰期。

在本发明的优选但非-限制性方面, 所述本发明的化合物或多肽具有与治疗部分本身相比增长多于 1 小时, 优选多于 2 小时, 更优选多于 6 小时, 诸如多于 12 小时, 或甚至多于 24, 48 或 72 小时的血清半衰期。

在另一个优选但非-限制性方面, 本发明的氨基酸序列优选是这样的, 以致它们以这样的方式与人血清清蛋白结合或否则缔合, 所述方式是当所述氨基酸序列与人血清清蛋白结合或否则缔合时, 所述氨基酸序列在人中表现出血清半衰期为至少约 9 天(诸如约 9-14 天), 优选至少约 10 天 (诸如约 10-15 天), 或至少约 11 天 (诸如约 11-16 天), 更优选至少约 12 天 (诸如约 12-18 天或更长), 或多于 14 天(诸如约 14-19 天)。

本发明的氨基酸序列还优选以本文中定义的解离常数(K_D) 和/或结合亲和力(K_A)与人血清清蛋白结合。

本发明还涉及化合物, 即包括至少一种本发明氨基酸序列和至少一种治疗部分, 诸如选自由小分子、多核苷酸、多肽或肽组成的组中至少一种部分的化合物、蛋白质、多肽或其它构建体, 所述化合物在人中具有半衰期是本发明氨基酸序列在人中的半衰期的至少 80%, 更优选至少 90%, 诸如 95%或更高, 或与其基本相同。

在该说明书中, 根据上下文需要, 术语“序列”具体指氨基酸序列和/

或核苷酸/核酸序列。当序列处于核酸序列形式时，相应的氨基酸序列可以通过适当表达由所述核酸序列编码的氨基酸序列制备。

“包括”或“基本由……组成”在本说明书中具体指本发明的氨基酸序列可以包含一种或多种另外的氨基酸序列，其在 CDR 序列的每一端或两端具有例如，但不仅限于 1-10 个氨基酸残基，诸如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10 个（其不源自 CDR 序列）的长度。这些另外的氨基酸序列可以源自构架序列，例如在全长免疫球蛋白序列中与 CDR 序列相邻的构架序列；例如，如果本发明的氨基酸序列包括或基本由源自 CDR3 序列的 CDR 序列组成，则所述另外的氨基酸序列可以源自构架 3 和或构架 4 区域。按照非-限制性优选实施方案，所述另外的氨基酸序列可以包括至少 2 个半胱氨酸残基（即在血清蛋白结合序列的每一侧），其可以或可以不通过二硫键相连接。例如，当所述另外的氨基酸序列源自构架序列时，可以合成地引入半胱氨酸残基；备选地，可以选择包含所述（天然存在的）半胱氨酸残基的其他另外氨基酸残基。

当在本说明书中，将序列（氨基酸或核酸）具体记述为“源自”另一种序列（氨基酸或核酸）时，所需的序列（氨基酸或核酸）可以通过产生和/或分离相关序列和随后分离其相关部分，或通过直接产生和/或分离所述其他序列的相关部分；或以本身已知方式通过这两种方法获得。

备选地，可以确定所述其他序列的序列（氨基酸或核酸），其后可以利用确定的序列作为起始点，以本身已知的方式制备所需的序列。例如，所需的氨基酸序列可以通过肽合成或通过适当表达编码所述氨基酸序列的核酸制备。所需核苷酸序列可以通过本身已知的核酸合成技术制备。

所需序列（氨基酸或核酸）的部分、片段、变体、类似物等可以利用本身已知的技术，诸如用限制性酶消化，适当连接一种或多种序列，位点-定向的诱变，利用一种或多种引入所述突变的引物的 PCR，从头合成（氨基酸或核酸），和/或通过所述技术的任意合适组合，或以任何其他本身已知的合适技术制备。

当在该说明书中，将序列（氨基酸或核酸）记述为“源自”哺乳动物（物种）时，所述序列“源自”（如本文中定义）所述哺乳动物中天然存在的序列（氨基酸或核酸）。

因此，例如，当在本说明书中，提到是“源自免疫球蛋白可变结构域序列的 CDR 序列”的序列（氨基酸或核酸）时，所述序列（氨基酸或核酸）可以具体通过分离免疫球蛋白可变结构域 CDR 序列的所述其他序列（氨基酸或核酸）或其合适部分、片段、类似物、变体获得。

备选地，其序列（氨基酸或核酸）可以通过确定免疫球蛋白可变结构域 CDR 序列的序列（氨基酸或核酸）或其部分、片段、类似物、变体的序列和随后利用该序列作为设计合成或半-合成的本发明氨基酸序列起始点获得，所述序列可以例如是天然存在的 CDR 序列的部分、片段、类似物、变体等。在 CDR 序列是氨基酸序列的情形中，其可以通过技术人员已知的任何合适肽合成技术获得；备选地，在 CDR 序列是核酸序列的情形中，其可以通过技术人员已知的任何合适核酸合成技术制备，并随后被表达。

当在本说明书中，提到“针对血清蛋白产生的免疫球蛋白序列”或“针对血清蛋白的免疫球蛋白序列”时，这些免疫球蛋白序列是通过将（优选异源）血清蛋白适当引入人或动物的血液循环中时，由人或动物体通过激活免疫系统天然生成的（即，以使得例如通过用血清蛋白适当免疫的方法，产生针对血清蛋白的免疫应答）。

当在本说明书中，提到“结合”时，所述结合优选是特异性结合，如技术人员通常理解地。具体地，当如本文中所述的氨基酸序列“结合于血清蛋白”时，其优选是这样的，以致它结合于所述血清蛋白：

- 具有解离常数(K_D)为 10^{-5} - 10^{-12} 摩尔/升或更小，和优选 10^{-7} - 10^{-12} 摩尔/升或更小和更优选 10^{-8} - 10^{-12} 摩尔/升（即，具有结合常数(K_A)为 10^5 - 10^{12} 升/摩尔或更大，和优选 10^7 - 10^{12} 升/摩尔或更大和更优选 10^8 - 10^{12} 升/摩尔)；
- 具有缔合率为 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -约 $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，优选 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，更优选 $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，诸如 $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；

和/或

- 具有解离率为 1s^{-1} ($t_{1/2}=0.69 \text{ s}$)- 10^{-6} s^{-1} (提供具有多日的 $t_{1/2}$ 的接近不可逆的复合物)，优选 10^{-2} s^{-1} - 10^{-6} s^{-1} ，更优选 10^{-3}

s^{-1} - $10^{-4} s^{-1}$, 诸如 $10^{-4} s^{-1}$ - $10^{-6} s^{-1}$;

优选地, 本发明的单价氨基酸序列 (或仅包含一种本发明氨基酸序列的多肽) 优选是这样的以致其以低于 500nM, 优选地低于 200nM, 更优选地低于 10nM, 诸如低于 500pM 的亲和力结合于所述血清蛋白。

在另一方面, 本发明提供可以作为用于连接或融合于治疗化合物从而增长其半衰期的小肽或肽部分使用的氨基酸序列, 和包括所述肽或肽部分的构建体和融合蛋白, 它们可以以这样的方式结合于血清蛋白, 以致当本发明的氨基酸序列、构建体、或融合蛋白结合于血清蛋白分子时, 所述血清蛋白分子的半衰期不被 (显著) 缩短 (即, 与当所述氨基酸序列、构建体、或融合蛋白不与之结合时血清蛋白分子的半衰期相比)。在本发明的这个方面, 所谓 “不显著缩短” 意指血清蛋白分子的半衰期 (如利用本身已知的合适技术测量的) 不缩短多于 50%, 优选不缩短多于 30%, 甚至更优选不缩短多于 10%, 诸如不缩短多于 5%, 或基本完全不缩短。

本发明的氨基酸序列优选包括或基本由源自免疫球蛋白可变结构域的 CDR 序列组成, 所述免疫球蛋白可变结构域是已经产生的和/或针对血清蛋白, 具体地针对血清清蛋白, 和更具体地针对人血清清蛋白 (或针对其部分、结构域或片段)。

所述氨基酸序列可以例如包括或基本由源自免疫球蛋白可变结构域的 CDR 序列, 诸如例如 CDR1、CDR2 或 CDR3 组成。

优选地, 本发明的氨基酸序列包括或基本由 CDR3 序列组成。按照另一个具体但非-限制性方面, 本发明的氨基酸序列可以基本记述在 WO 03/050531, 参考以上内容并引入本文中作为参考。

所述氨基酸序列可以来源的免疫球蛋白可变结构域可以例如是 (但不限于) 免疫球蛋白重链或轻链可变结构域、(单) 结构域抗体、“dAb”、或纳米抗体。

按照特别优选的实施方案, 本发明的氨基酸序列包括或基本由纳米抗体®的 CDR 序列组成, 所述纳米抗体®是已经产生的和/或针对血清蛋白, 具体地针对血清清蛋白, 和更具体地针对人血清清蛋白 (或针对其部分、结构域或片段) 产生; 更优选地, 本发明的氨基酸序列包括或基本由纳米抗体®的 CDR3 序列组成, 所述纳米抗体®是已经产生的和/或针对血清蛋

白，具体地针对血清清蛋白，和更具体地针对人血清清蛋白（或针对其部分、结构域或片段）。此外，按照本发明的该具体方面，本发明的氨基酸序列可以基本记述在 WO 03/050531 中。为了进一步描述和定义纳米抗体®，以及在本说明书中使用的一些其他术语，还参考本文中提及的埃博灵克斯股份有限公司（Ablynx N.V.）的申请以及本文中引用的其他现有技术。

在另一方面，本发明还涉及用于生成或产生本发明氨基酸序列（或包括所述氨基酸序列的化合物）的方法。

例如，当本发明的氨基酸序列是 CDR 氨基酸序列（或其合适部分、类似物、片段、变体）时，所述方法可以包括下列步骤：

- a) 提供 CDR 序列组、集合或文库；
- b) 筛选所述 CDR 序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的序列；
- c) 分离所述能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的 CDR 序列。

该方法可以利用本领域中技术人员已知的技术和/或如本文中进一步所述地，以任何本身已知的方式执行。例如，用于提供 CDR 序列文库，用于筛选所述文库以获得对需要的靶标具有亲和力的序列，和用于分离结合于需要的抗原的 CDR 序列的方法记述在 WO 03/050531 (埃博灵克斯股份有限公司（Ablynx N.V.）和 Algonomics N.V.)中。

在以上方法中，所述 CDR 序列组、集合或文库可以例如展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体（诸如酵母）上，诸如以促进筛选。用于展示和筛选 CDR 序列（组、集合或文库）的合适方法、技术和宿主生物体，例如基于下一步的公开内容和本文中引用的现有技术，对本领域中技术人员应该是清楚的。

基于 c) 中获得的序列，所述序列的部分、类似物、片段、变体可以，例如通过位点-特异性诱变（使用错配引物），通过从头核酸合成，或从头肽合成，以本身已知的方式制备。

备选地，能够结合于血清蛋白的 CDR 氨基酸序列或其合适的部分、类似物、片段、变体可以通过由本发明提供的方法生成，所述方法至少包括下列步骤：

- a) 提供免疫球蛋白序列组、集合或文库；
- b) 筛选所述免疫球蛋白序列组、集合或文库，以获得能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的序列；
- c) 任选地，分离所述能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列；
- d) 利用技术人员已知的技术制备源自 c) 中获得的免疫球蛋白序列的 CDR 序列。

该方法也可以利用本领域中技术人员已知的技术和/或如本文中进一步所述地，以任何本身已知的方式执行。步骤 d) 可以例如通过使用合适的位点特异性引物，诸如（但不仅限于）由 FW3（‘构架 3’）-特异性和 FW4（‘构架 4’）-特异性引物组成的引物组合和随后表达获得的（扩增的）核酸序列执行。

基于 c) 或 d) 中获得的序列，部分、类似物、片段、变体可以，例如通过位点-特异性诱变（使用错配引物），通过从头核酸合成，或从头肽合成，以本身已知的方式制备。

在该方法中，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是天然的免疫球蛋白序列组、集合或文库；合成的或半-合成的免疫球蛋白序列组、集合或文库；和/或进行了亲和力成熟的免疫球蛋白序列组、集合或文库。

此外，在该方法中，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是重链可变结构域或轻链可变结构域的组、集合或文库。例如，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是结构域抗体或单结构域抗体组、集合或文库，或是能够起结构域抗体或单结构域抗体作用的免疫球蛋白序列组、集合或文库。

在本方法的优选方面，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以是免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库，例如源自用抗原适当免疫的哺乳动物，所述抗原包括需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他细胞外表位，从而产生针对需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他细胞外表位的免疫应答。在一个具体但非-限制性方面，所述免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库可以源自骆驼科动物。

所述免疫球蛋白序列的免疫组、集合或文库可以例如是重链可变结构

域或轻链可变结构域的组、集合或文库。在一个具体方面，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库是 V_{HH} 序列的组、集合或文库。

在以上方法中，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体（诸如酵母）上，诸如以促进筛选。用于展示和筛选免疫球蛋白序列（组、集合或文库）的合适方法、技术和宿主生物体，例如基于下一步的公开内容，对本领域中技术人员应该是清楚的。还参考 Hoogenboom 在自然生物技术（Nature Biotechnology），23, 9, 1105-1116 (2005)的综述和本文中引用的其他现有技术。

在另一方面，用于生成结合于血清蛋白的 CDR 氨基酸序列或其合适部分、类似物、片段、变体的方法至少包括下列步骤：

- a) 提供表达免疫球蛋白序列的细胞的集合或样品；
- b) 筛选所述细胞的集合或样品，以获得表达能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列的细胞；
- c) (i) 从所述细胞中分离所需的 CDR 序列（任选地在首先从所述细胞中分离所述免疫球蛋白序列后）；或 (ii) 从所述细胞中分离编码来自所述免疫球蛋白序列的所需 CDR 序列的核酸序列；随后表达来自所述免疫球蛋白序列的所需 CDR 序列。

在按照该方面的方法中，所述细胞的集合或样品可以例如是 B-细胞集合或样品。此外，在该方法中，所述细胞样品可以源自用抗原适当免疫的哺乳动物，所述抗原包括需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他胞外表位，从而产生针对需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他细胞外表位的免疫应答。例如，所述细胞集合或样品可以源自适当免疫的骆驼科动物。

如对技术人员应该清楚地，以上方法可以以任何合适的方式执行。参考例如 EP 0 542 810, WO 05/19824, WO 04/051268 和 WO 04/106377。步骤 b) 的筛选优选利用流式细胞术技术诸如 FACS 执行。为此，参考例如 Lieby 等，血液（Blood），卷 97, No. 12, 3820。

如上提及地，在优选但非-限制性方面，本发明的氨基酸序列优选源自重链抗体，和更优选包括或基本由源自重链抗体（或其部分、片段、类似物或变体）的 CDR 序列（诸如 CDR3 序列）组成。在该方面，用于从重

链抗体中分离 CDR 序列的优选方法至少包括下列步骤：

- a) 提供表达免疫球蛋白序列的细胞的集合或样品；
- b) 筛选所述细胞的集合或样品，以获得 (i) 表达能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列的细胞；和 (ii) 表达重链抗体的细胞，其中步骤 (i) 和 (ii) 可以基本作为单一筛选步骤或作为两个分开的筛选步骤以任何合适的顺序执行，从而提供至少一种表达重链抗体的细胞，所述重链抗体能够结合于血清蛋白的至少一个结构域或表位和/或对其具有亲和力；
- c) (i) 从所述细胞中分离所需的 CDR 序列（任选地在首先从所述细胞中分离所述免疫球蛋白序列后）；或 (ii) 从所述细胞中分离编码所需 CDR 序列的核酸序列；随后表达所述 CDR 序列。

该方法也可以利用本领域中技术人员已知的技术和/或如本文中进一步所述地，以任何本身已知的方式执行。例如，选择、筛选和分离 B-细胞或免疫球蛋白序列可以利用所谓的“纳米克隆™”（“Nanoclone™”）技术执行，关于其参考埃博灵克斯股份有限公司（Ablynx N.V.）的国际申请 WO 06/079372。

在另一方面，用于生成结合于血清蛋白的 CDR 核酸序列的方法包括至少下列步骤：

- a) 提供编码 CDR 序列的核酸序列组、集合或文库；和
- b) 筛选所述核酸序列组、集合或文库，以获得编码能够结合于血清蛋白至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的 CDR 序列的核酸序列；和
- c) 分离所述核酸序列。

该方法也可以以任何本身已知的方式执行，关于其例如参考 WO 03/050531（埃博灵克斯股份有限公司（Ablynx N.V.）和 Algonomics N.V.）。

基于 c) 中获得的序列，部分、类似物、片段、变体可以，例如通过位点-特异性诱变（使用错配引物），通过从头核酸合成，或从头肽合成，以本身已知的方式制备。

备选地，编码本发明氨基酸序列的核酸序列（且具体地，CDR 或其合适的部分、类似物、片段、变体）可以通过由本发明提供的方法生成，所

述方法至少包括下列步骤：

- a) 提供编码免疫球蛋白序列的核酸序列组、集合或文库；和
- b) 筛选所述核酸序列组、集合或文库，以获得编码分别能够结合于血清蛋白的至少一种结构域或表位和/或对其具有亲和力的免疫球蛋白序列的核酸序列；和
- c) 分离所述核酸序列。

该方法也可以以任何本身已知的方式执行，关于其例如参考本文中提及的技术，以及参考 WO 03/050531。

也可以表达步骤 c) 中获得的核苷酸序列，从而提供本发明的氨基酸序列，或可以转化步骤 c) 中获得的核苷酸序列（例如，例如本文中引用的技术之一），从而提供编码本发明氨基酸序列的部分、片段、类似物或变体的核酸序列（然后可以对其进行表达，从而提供作为氨基酸序列的所述部分、片段、变体或类似物）。

备选地，所述核酸序列或转化的核酸序列可以（通过合适的间隔区或接头）连接于任何所需的核酸并随后表达（即作为蛋白质融合）；获得的核酸序列可以例如（但不仅限于）连接于编码治疗部分的核酸，如本文中所述，且随后作为多肽或蛋白构建体或融合蛋白表达。

在以上方法中，所述免疫球蛋白序列组、集合或文库可以例如展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体（诸如酵母）上，诸如以促进筛选。用于展示和筛选免疫球蛋白序列或 CDR 序列的（组、集合或文库）的合适方法、技术和宿主生物体，例如基于本文进一步的公开内容，对本领域中技术人员应该是清楚的。

在该方法中，编码免疫球蛋白序列或 CDR 序列的核酸序列组、集合或文库可以是编码天然免疫球蛋白序列或 CDR 序列组、集合或文库的核酸序列组、集合或文库；编码合成或半-合成的免疫球蛋白序列或 CDR 序列组、集合或文库的核酸序列组、集合或文库；和/或编码进行了亲和力成熟的免疫球蛋白序列或 CDR 序列组、集合或文库的核酸序列组、集合或文库。

而且，在该方法中，所述核酸序列组、集合或文库可以编码重链可变结构域（来源的 CDR 序列）或轻链可变结构域（来源的 CDR 序列）的组、

集合或文库。例如，核酸序列组、集合或文库可以编码结构域抗体或单结构域抗体（来源的 CDR 序列）的组、集合或文库，或能够起结构域抗体或单结构域抗体功能的免疫球蛋白序列（来源的 CDR 序列）的组、集合或文库。

在该方法的优选方面，核酸序列组、集合或文库可以编码例如源自用抗原适当免疫的哺乳动物的免疫球蛋白序列（来源的 CDR 序列）的免疫组、集合或文库，所述抗原包括需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他细胞外表位，从而产生针对需要的细胞外部分、区域、结构域、环或其他细胞外表位的免疫应答。在一个具体但非-限制性方面，所述核苷酸序列组、集合或文库可以源自骆驼科动物。

所述核酸序列组、集合或文库可以编码例如重链可变结构域（来源的 CDR 序列）或轻链可变结构域（来源的 CDR 序列）的免疫组、集合或文库。在一个具体方面，所述核苷酸序列组、集合或文库可以编码 V_{HH} 序列（来源的 CDR 序列）的组、集合或文库。

在以上方法中，所述核苷酸序列组、集合或文库可以展示在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微-生物体（诸如酵母）上，诸如以促进筛选。用于展示和筛选编码免疫球蛋白序列的核苷酸序列（组、集合或文库）的合适方法、技术和宿主生物体，例如基于进一步的公开内容，对本领域中技术人员应该是清楚的。还参考 Hoogenboom 在自然生物技术（Nature Biotechnology），23, 9, 1105-1116 (2005)的综述。

本发明还涉及由以上方法获得的本发明氨基酸序列或核酸序列。

本文中公开的氨基酸序列可以以作为融合配偶体的优势使用，从而增加治疗部分诸如蛋白质、化合物（包括，不限于，小分子）或其他治疗实体的半衰期。

因此，在另一方面，本发明提供包括或基本由本文中公开的氨基酸序列组成的多肽或蛋白构建体。具体地，本发明提供多肽或蛋白构建体，其包括或基本由与至少一种治疗部分，任选通过一种或多种合适接头或间隔区连接的至少一种本发明氨基酸序列组成。所述多肽或蛋白构建体可以例如（不限于）是融合蛋白，如本文中进一步所述。

本发明还涉及多肽或蛋白构建体或融合蛋白的治疗用途和包括所述多

肽或蛋白构建体或融合蛋白的药物组合物。

在一些实施方案中，所述至少一种治疗部分包括或基本由治疗蛋白、多肽、化合物、因子或其他实体组成。在优选的实施方案中，所述治疗部分针对需要的抗原或靶标，能够结合于需要的抗原（且具体地，能够特异性结合于需要的抗原），和/或能够与需要的靶标相互作用。在另一个实施方案中，所述至少一种治疗部分包括或基本由治疗蛋白或多肽组成。在再一个实施方案中，所述至少一种治疗部分包括或基本由免疫球蛋白或免疫球蛋白序列（包括但不限于免疫球蛋白片段），诸如抗体或抗体片段（包括但不限于 ScFv 片段）组成。在又一个实施方案中，所述至少一种治疗部分包括或基本由抗体可变结构域，诸如重链可变结构域或轻链可变结构域组成。

在优选的实施方案中，至少一种治疗部分包括或基本由至少一种结构域抗体或单结构域抗体、“dAb”或纳米抗体®组成。按照该实施方案的优选方面，本发明的氨基酸序列优选包括或基本由源自结构域抗体或单结构域抗体、“dAb”或纳米抗体®的 CDR（诸如 CDR3 环）组成，所以，由此产生的多肽或蛋白构建体或融合蛋白是包括或基本由至少一种结构域抗体、单结构域抗体、“dAb”或纳米抗体®（或其组合）组成的多价构建体和优选多特异性构建体，所述结构域抗体、单结构域抗体、“dAb”或纳米抗体®（或其组合）连接于（任选通过一种或多种合适接头）至少一种源自结构域抗体、单结构域抗体、“dAb”或纳米抗体®的 CDR（诸如 CDR3 环），所述多肽或蛋白构建体或融合蛋白结合于血清蛋白。

所谓“多价”化合物、蛋白质、多肽或构建体，在本说明书中具体意指包括至少 2 个结合单位（即结合于相同或不同表位）的化合物、蛋白质、多肽或构建体，这 2 个结合单位均可以结合于相同生物学分子。所谓“二价”化合物、蛋白质、多肽或构建体在本说明书中意指包括 2 个结合单位的化合物、蛋白质、多肽或构建体，所述结合单位可以结合于相同生物学分子。所谓“单价”化合物、蛋白质或多肽在本说明书中，意指基本由 1 个结合单位组成的化合物、蛋白质或多肽，所述结合单位可以结合于生物学分子。

所谓“结合单位”在本说明书中，具体意指如本文中所述能够结合生

物学分子的任何氨基酸序列、肽、蛋白质、多肽、构建体、融合蛋白、化合物、因子或其他实体，诸如本发明的氨基酸序列或治疗部分（均如本文中所述）。当化合物、蛋白质、多肽或构建体包括 2 或更多结合单位时，所述结合单位可以任选地通过一种或多种合适的接头彼此相连接。

所谓“多特异性”化合物、蛋白质、多肽或构建体在本说明书中，具体意指包括至少 2 个结合单位的化合物、蛋白质、多肽或构建体，其中至少第一结合单位可以结合于第一生物学功能分子和其中至少第二结合单位可以结合于第二生物学功能分子。所谓“双特异性”化合物、蛋白质、多肽或构建体在本说明书中，具体意指包括 2 个结合单位的化合物、蛋白质、多肽或构建体，其中第一结合单位可以结合于第一生物学功能分子和其中第二结合单位可以结合于第二生物学功能分子。

在具体的实施方案中，所述至少一种治疗部分包括或基本由至少一种单价纳米抗体®或二价、多价、双特异性或多特异性纳米抗体®构建体组成。按照该实施方案，与所述治疗部分相连接的本发明氨基酸序列优选包括或基本由源自结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”的至少一种 CDR（诸如 CDR3 环）组成，和更优选地包括或基本由源自纳米抗体®的 CDR（诸如 CDR3 环）组成，所以，由此产生的构建体或融合蛋白是多价构建体或融合蛋白（如本文中定义）和优选是多特异性构建体或融合蛋白（如本文中定义），其包括至少一种纳米抗体®和源自结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”的至少一种 CDR 和更优选地源自纳米抗体®的至少一种 CDR，所述构建体或融合蛋白结合于血清蛋白。

当本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或多价或多特异性构建体意欲用于制药或诊断用途时，它们优选结合于人血清蛋白。按照一个优选但非-限制性实施方案，本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或多价或多特异性构建体对人血清蛋白表现出比小鼠的血清蛋白亲和力更高的亲和力。

本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白或多价或多特异性构建体可以与之结合的血清蛋白的非限制性实例是血清清蛋白、血清免疫球蛋白、甲状腺素-结合蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原；优选地，本发明的氨基酸序列、肽、蛋白质、多肽、构建体、融合蛋白结合于血清清

蛋白，和更优选地人血清清蛋白。

通常，本发明的蛋白或多肽构建体或融合蛋白优选具有是相应治疗部分本身半衰期的至少 1.5 倍，优选至少 2 倍，诸如至少 5 倍，例如至少 10 倍或多于 20 倍的半衰期，所述本发明的蛋白或多肽构建体或融合蛋白包括或基本由与至少一种治疗部分（任选通过一种或多种合适的接头或间隔区）相连接的至少一种本发明氨基酸序列组成。

而且，优选地，任何所述蛋白或多肽构建体或融合蛋白具有与相应治疗部分本身半衰期相比增长多于 1 小时，优选多于 2 小时，更优选多于 6 小时，诸如多于 12 小时的半衰期。

而且，优选地，任何所述蛋白或多肽构建体或融合蛋白具有多于 1 小时，优选多于 2 小时，更优选多于 6 小时，诸如多于 12 小时，和例如约 1 天、2 天、1 周、2 周或 3 周，和优选地不多于 2 个月的半衰期，尽管后者可能不太关键。

而且，如上所提及地，当本发明的氨基酸序列包括或基本由源自结构域抗体、单结构域抗体、“dAbs”或优选源自纳米抗体®的 CDR3 序列组成时，可以使用它增加其它免疫球蛋白序列，诸如结构域抗体、单结构域抗体、“dAbs”或优选地纳米抗体®的半衰期。

因此，本发明的一个实施方案涉及这样的蛋白或多肽构建体或融合蛋白，其包括或基本由至少一种本发明的氨基酸序列和至少一种免疫球蛋白序列，诸如结构域抗体、单结构域抗体、“dAbs”或纳米抗体组成。所述免疫球蛋白序列优选地针对需要的靶标（其优选地是治疗靶标），和/或有效于或适合于治疗、预防和/或诊断目的其它免疫球蛋白序列。

因此，在另一方面，本发明涉及多特异性（和具体地，双特异性）构建体，其包括或基本由至少一种 CDR 序列（诸如 CDR3 序列）和至少一种纳米抗体®组成，其中所述至少一种纳米抗体®优选地针对需要的靶标（其优选地是治疗靶标），和/或有效于或适合于治疗、预防和/或诊断目的的其它纳米抗体®。

本发明还涉及编码本文中所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的核苷酸序列或核酸。本发明还包括遗传构建体，其包括上述核苷酸序列或核酸，和一种或多种关于遗传构建

体的本身已知的元件。所述遗传构建体可以处于质粒或载体的形式。所述和其他遗传构建体是本领域中那些技术人员已知的。

本发明还涉及包含所述核苷酸序列或核酸，和/或表达（或能够表达）本文中所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的宿主或宿主细胞。而且，所述宿主或宿主细胞是本领域中那些技术人员已知的。

本发明通常还涉及用于制备本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的方法，所述方法包括在这样的条件下培养或维持本文中所述的宿主细胞，在所述条件下，所述宿主细胞产生或表达如本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体，且任选地，还包括分离由此产生的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体。而且，通常可以如本文中所述的埃博灵克斯股份有限公司（Ablynx N.V.）的共同待审专利申请，诸如 WO 04/041862 或 WO 06/122825 中所述地执行所述方法。

本发明还包括包含该本发明氨基酸序列、化合物或多价和多特异性化合物的医学用途和治疗方法，其中所述医学用途或方法的特征在于所述药物适合于以人血清清蛋白天然半衰期的至少约 50% 的间隔施用。

本发明还涉及用于延长或增长治疗剂（即治疗部分、化合物、蛋白质或其他治疗实体）的血清半衰期的方法。所述方法包括使所述治疗剂与任意前述氨基酸序列相接触，以使所述治疗剂与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体结合或否则缔合。在一些实施方案中，所述治疗剂是生物学治疗剂，优选地是肽或多肽，在该情形中，接触所述治疗剂的步骤可以包括通过使所述肽或多肽与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体相连接，而制备融合蛋白。

这些方法可以进一步包括在治疗剂与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体结合或缔合后，向受试者施用所述治疗剂。在该方法中，所述治疗剂的血清半衰期是治疗剂本身半衰期的至少 1.5 倍，或与治疗剂本身的半衰期相比增加至少 1 小时。在一些优选的实施方案中，所述治疗剂的血清半衰期是相应治疗部分本身半衰期的至少 2 倍、至少 5 倍、至少

10 倍或超过 20 倍。在其它优选的实施方案中，所述治疗剂的血清半衰期与相应治疗部分本身的半衰期相比，增加超过 2 小时，超过 6 小时或超过 12 小时。

在另一方面，本发明涉及用于改进治疗剂的方法，所述方法使所述治疗剂的需要治疗水平，在适当施用所述治疗剂以获得所述需要的治疗水平后，维持一段延长的时期。

所述方法包括使所述治疗剂与任意前述的氨基酸序列相接触，从而使所述治疗剂与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体结合或以其他方式缔合。在一些实施方案中，所述治疗剂是生物学治疗剂，优选地是肽或多肽，在该情形中，接触所述治疗剂的步骤可以包括通过使所述肽或多肽与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体相连接，而制备融合蛋白。

这些方法可以进一步包括在治疗剂与本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体结合或以其他方式缔合后，向受试者施用该治疗剂，从而在所述施用后获得需要的治疗水平。在该方法中，所述治疗剂在所述施用后维持需要的治疗水平的时间是治疗剂本身半衰期的至少 1.5 倍，或与治疗剂本身的半衰期相比增加至少 1 小时。在一些优选的实施方案中，所述治疗剂在所述施用后维持需要的治疗水平的时间是相应治疗部分本身半衰期的至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或超过 20 倍。在其它优选的实施方案中，所述治疗剂在所述施用后维持需要的治疗水平的时间与相应治疗部分本身的半衰期相比，增加超过 2 小时，超过 6 小时或超过 12 小时。

优选地，增加所述治疗剂在所述施用后维持需要的治疗水平的时间，这样可以以本文中关于本发明化合物定义的频率施用所述治疗剂。

在另一方面中，本发明涉及本发明的化合物(如本文中定义)制备药物的用途，所述药物增加和/或扩大患者血清中所述化合物或构建体中治疗水平，以致能够以与单独治疗剂相比更低的剂量施用所述化合物或构建体中的所述治疗剂（即，以基本相同的施用频率）。

本发明还涉及药物组合物，其包括至少一种如本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体，和任选地，至少一种药用载体、稀释剂或赋形剂。所述制剂、载体、赋形剂和

稀释剂通常可以如埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 的共同待审专利申请, 诸如 WO 04/041862 或 WO 06/122825 中所述。

然而, 由于本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体具有增加的半衰期, 所以优选地将它们施用到循环中。同样地, 可以以任何容许所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体进入循环的合适方式, 诸如静脉内、通过注射或输注, 或以任何其它合适方式 (包括口服施用、经由皮肤施药、鼻内施用、通过肺的施用等) 施用它们。而且, 还例如由 WO 04/041862 或 WO 06/122825 的教导, 技术人员应该清楚合适的施用方法和途径。

因此, 在另一方面, 本发明涉及用于预防和/或治疗至少一种能够通过使用如本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体预防或治疗的疾病或病症的方法, 所述方法包括向有此需要的受试者施用药物有效量的本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体, 和/或药物有效量的包括所述本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的药物组合物。如技术人员应该清楚地, 能够通过使用如本文中所述的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体预防或治疗的疾病和病症通常与能够通过使用本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体中存在的治疗部分预防或治疗的疾病和病症相同。

在本发明的上下文中, 术语“预防和/或治疗”不仅包括预防和/或治疗疾病, 通常还包括预防疾病的发作, 减缓或逆转疾病进程, 预防或减缓一种或多种与疾病相关症状的发作, 减轻和/或缓解一种或多种与疾病相关的症状, 减少疾病和/或其任意相关症状的严重性和/或持续时间, 和/或预防疾病和/或其任意相关症状严重性的进一步增加, 预防、降低或逆转由疾病导致的任何生理学损伤, 和通常任何有益于待治疗患者的药理学作用。

待治疗的受试者可以是任何温血动物, 但是具体地是哺乳动物, 和更具体是人。如技术人员应该清楚地, 待治疗的受试者应该具体地是患有本文中提及的疾病和病症或处于本文中提及的疾病和病症危险的人。

更具体地，本发明涉及治疗方法，其中施用本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体的频率是所述哺乳动物(即在人、人血清清蛋白)中血清清蛋白天然半衰期的至少 50%，优选地至少 60%，优选地至少 70%，更优选地至少 80%和最优选地至少 90%。

属于本发明范围内的对哺乳动物具体施用频率是在如上定义的所述哺乳动物中血清清蛋白天然半衰期的至少 50%，55%，60%，65%，70%，75%，80%，85%，90%，95%或至少 100%。

换言之，属于本发明范围内的具体施用频率是每 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 或 19 天。

不限制地，上文提到的施用频率特别适合于维持利用所述氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体治疗的受试者血清中的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体的需要的水平，任选地，在施用意欲建立所述需要的血清水平的一次或多次（起始）剂量后。如技术人员应该清楚地，所述需要的血清水平可以特别依赖于使用的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体和/或待治疗的疾病。临床医生或医师应该能够选择需要的血清水平，和选择向待治疗受试者施用的剂量和/或量，从而在以本文中提到的频率施用本发明的氨基酸序列、化合物、融合蛋白或构建体时，在所述受试者中获得和/或维持需要的血清水平。

在另一个实施方案中，本发明涉及用于免疫治疗，和具体地用于被动免疫治疗的方法，所述方法包括向患有本文中提及疾病和病症或处于本文中提及疾病和病症危险的受试者施用药物有效量的本发明融合蛋白或构建体，和/或药物有效量的包括所述本发明融合蛋白或构建体的药物组合物。

按照适合于预防和/或治疗待预防或治疗的疾病或病症的治疗方案，施用所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体和/或包括所述氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的组合物。临床医生通常应该能够根据因素，诸如待预防或治疗的疾病或病症，待治疗疾病的严重性和/或其症状的严重性，待使用的具体本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体，具体施用途径和待使用的药物制剂或组合物，

患者的年龄、性别、体重、饮食、一般状态，和临床医生熟知的类似因素，确定合适的治疗方案。

通常，所述治疗方案应该包括以一种或多种药物有效量或剂量，施用一种或多种本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体，或一种或多种包括所述本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的组合物。临床医生也可以根据以上引用的因素确定具体的待施用量或剂量。

通常，为了预防和/或治疗预期的疾病和病症（即，通常通过使用所述治疗实体本身治疗或预防的那些疾病和病症），并根据待治疗的具体疾病或病症，待使用的特定氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体的功效和/或半衰期，使用的具体施用途径和具体药物剂型或组合物，通常应该以这样的量，在一天中连续地（例如通过输注）作为单次每日剂量或作为多次分开的剂量施用本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体，所述量是 1 克-0.01 微克/kg 体重/天，优选地 0.1 克-0.1 微克/kg 体重/天，诸如约 1, 10, 100, 1000 或 2000 微克/kg 体重/天。临床医生通常能够根据本文中提到的因素确定合适的每日剂量。还应该清楚地是，在具体情形中，临床医生可以选择偏离这些量，例如，基于以上引用的因素和他的专业判断。通常，可以由对类似常规抗体或抗体片段通常施用的量获得一些关于待施用量的指导，所述类似常规抗体或抗体片段针对基本通过相同途径施用的相同靶标，然而考虑亲和性/亲和力、功效、生物分布、半衰期和技术人员熟知的类似因素中的差别。

通常，在以上方法中，使用本发明的单一氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体。然而，组合使用两种或更多本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体属于本发明的范围。

本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体还可以与一种或多种其他药物活性化合物或成分组合使用，即作为组合的治疗方案，其可以引起或不引起协同功效。而且，临床医生能够基于以上引用的因素和他的专业判断，选择所述其他化合物

或成分，以及合适的组合治疗方案。

具体地，本发明的氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体可以与其他药物活性化合物或成分组合使用，所述药物活性化合物或成分用于或能够用于预防和/或治疗能够用本发明氨基酸序列、化合物、蛋白质、多肽、融合蛋白、或多价或多特异性构建体预防或治疗的疾病和病症，且作为其结果，可以获得或可以不获得协同功效。

临床医生应该清楚地，可以以关于有关疾病或病症本身已知的任何方式，确定和/或关注按照本发明使用的治疗方案的效力。临床医生还能够，在适当和或个案基础上，改变或更改具体的治疗方案，从而获得理想的治疗效果，以避免、限制或减少不希望的副作用，和/或在一方面获得理想治疗效果和另一方面避免、限制或减少不希望副作用之间获得适当的平衡。

通常，应该遵从所述治疗方案，直到获得理想的治疗效果和/或为了维持理想治疗效果。而且，这可以由临床医生确定。

待治疗的受试者可以是任何温血动物，但是具体地是哺乳动物，和更具体是人。如技术人员应该清楚地，待治疗的受试者应该具体地是患有本文中提及的疾病和病症或处于本文中提及的疾病和病症危险的人。

附图简述

通过下列非限制性实验部分和附图的方式，进一步描述本发明。所述非限制性附图显示：

— **图 1：**用于构建限制和非-限制 **CDR3** 文库的寡核苷酸序列。使用 IUPAC 密码子。显示的寡核苷酸引物是：For1*Sfi* (SEQ ID NO:7); For2*Sfi* (SEQ ID NO:8); For3*Sfi* (SEQ ID NO:9); For4*Sfi* (SEQ ID NO:10); For5*Sfi* (SEQ ID NO:11); For6*Sfi* (SEQ ID NO:12); For7*Sfi* (SEQ ID NO:13); Back1*Not* (SEQ ID NO:14); Back2*Not* (SEQ ID NO:15); Back3*Not* (SEQ ID NO:16); Back4*Not* (SEQ ID NO:17); Back5*Not* (SEQ ID NO:18); Back1cysR*Not* (SEQ ID NO:19); Back1cysW*Not* (SEQ ID NO:20); Back2cysW*Not* (SEQ ID NO:21); Back3cysW*Not* (SEQ ID NO:22); Back3cysR*Not* (SEQ ID NO:23); Back4cysW*Not* (SEQ ID NO:24);

Back5cysWNot (SEQ ID NO:25)。

— 图 2: 美洲驼 117 和美洲驼 118 针对下列各项的免疫应答: a) 人血清清蛋白 (图 2A), b) 小鼠血清清蛋白 (图 2B), c) 食蟹猴血清清蛋白 (图 2C) 和 d) 狒狒血清清蛋白 (图 2D)。

— 图 3: 对 HSA 两轮选择后筛选单克隆噬菌体的 **Odyssey** 示值读数。奇数和偶数栏分别由 HSA 和卵清蛋白包被。2 个框表示结合于 HSA 但不结合于卵清蛋白的 2 种不同的单克隆噬菌体, 尽管信号/背景比非常低。测序揭示这 2 个 CDR3 环相同: *dtavyycnaaasysdydvfggtdfgpwgqgtqv* (SEQ ID NO:1; 旁侧 FR 序列显示为斜体字)。该肽称为 17D12。

— 图 4: 具有或不具有在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的旁侧 FR 的 17D12 的 CDR3 环的氨基酸序列。侧面是 17D12 的 CDR3 (SEQ ID NO:1) 的 FR 残基, 如从对 HSA 两轮选择后的初级筛选中选择地, 显示为斜体字。为了构建非-限制(NC; SEQ ID NO:26)和限制(C; SEQ ID NO:27)截短的肽向 17D12 的 CDR3 添加的残基显示为粗体。

— 图 5: 具有或不具有在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的旁侧 FR 的 17D12 的 CDR3 环与 HSA 的结合。全长 17D12 (■), 以及处于非-限制和限制形式的不具有旁侧 FR 残基的 CDR3 环, 即分别地, 17D12-CDR3-NC (▲)或 17D12-CDR3-C (●), 剂量-依赖性地结合于 HSA (实线), 但不结合于阴性对照肽, 卵清蛋白 (虚线)。

— 图 6: 具有或不具有在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的旁侧 FR 的 17D12 的 CDR3 环的交叉-反应性和特异性。全长 17D12, 以及处于非-限制和限制形式的不具有旁侧 FR 残基的 CDR3 环, 即分别地, 17D12-CDR3-NC 或 17D12-CDR3-C, 剂量-依赖性地结合于 HSA 和 CSA。存在 17D12-CDR3-C 与不相关蛋白卵清蛋白和 TNF 的一些非-特异性结合。 -: 非-包被的。

— 图 7: 人血清清蛋白与合成肽 PEO-100 和 PEO-101.5 的结合的表面等离子体共振分析。版 a: PEO-105 (Ala-17D12-CDR3); 版 b: PEO-101.5 (Cys-Ala-17D12-CDR3)。

— 图 8: 在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的 VHH-17D12 融合体的氨基酸序列。17D12 的 FR 残基显示为斜体字。FR3 中的 Cys 残基替换为 Ser。

VHH-17D12(S), SEQ ID NO: 31; VHH-GlySer-17D12(S), SEQ ID NO: 32。

— 图 9: 在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的 VHH-17D12 融合体与 HSA 的结合。全长 17D12 (■), 以及与对 HER2 具有特异性的 VHH 2D3 的 C-端融合, 具有或不具有 Gly4Ser-Gly3Ser 接头的 17D12 肽, 即分别地, 2D3-GlySer-17D12(S) (●) 和 2D3-17D12(S) (▲), 剂量-依赖性地结合于 HSA (实线), 但不结合于阴性对照肽, 卵清蛋白 (虚线)。

— 图 10: 人血清清蛋白 (HSA) 上纳米抗体® (2D3) 和纳米抗体® 融合肽 (2D3-17D12) 的结合的表面等离子体共振分析。包被芯片 (CM5) 是通过利用用于活化的 NHS/EDC 和用于失活的乙醇胺的氨基偶联执行的 (Biacore 胺偶联试剂盒)。由 7000 RU 人血清清蛋白 (西格玛 (Sigma), 99% 纯) 和 2500 RU 不相关蛋白抗原包被芯片 (hip)。以增加的浓度 (1.25 μ M, 2.5 μ M 和 5 μ M), 将 2D3 和 2D3-17D12 连续注射到芯片上。HBS-EP 以 10 μ l min⁻¹ 的速度, 作为流动缓冲液使用。注射 20 μ l 样品 20s。

— 图 11: 2D3-17D12 融合蛋白与 HER2 抗原和人血清清蛋白 (HSA) 的同时结合的表面等离子体共振分析。用 1 和 5 μ M HSA 预-温育或不预-温育 2D3-17D12 融合蛋白, 随后流过固定的 2D3 靶抗原, rhErbB2-Fc。虚线表示在 25 μ M HSA 存在下 2D3 的结合特征。

实验部分

实施例 1- 免疫

1.1 免疫

在兽医系道德委员会 (Ethical Committee of the Faculty of Veterinary Medicine) (根特大学 (University Ghent), 比利时) 批准后, 按照标准方案, 以每周一次的时间间隔, 用 6 次肌肉内注射下列抗原的混合物, 免疫美洲驼:

- 美洲驼 006: 处于小鼠 TNF 和 IFN γ 的混合物中的人血清清蛋白 (HSA)
- 美洲驼 021: 处于由食蟹猴清蛋白、人血清清蛋白加强的 PDK-1, 抗-CD4, hTNF α , 胶原蛋白 III + 型的混合物中的小鼠血清清蛋白 (MSA)

- 美洲驼 022: 处于 PDK-1、hIFN γ 、hTNF α 胶原蛋白 III 型的混合物中的 MSA
- 美洲驼 039: HSA, MSA, MSA, 猴 SA, 猴 SA, HSA
- 美洲驼 117: 用 HSA 和狒狒 SA、食蟹猴 SA&MSA 的混合物交替免疫
- 美洲驼 118: 用 HSA 和狒狒 SA、食蟹猴 SA&MSA 的混合物交替免疫

1.2 评估在美洲驼中诱导的应答

在第 0、28 天和 PBL 收集时, 从美洲驼 117 和 118 收集血清, 从而通过 ELISA 评估在该动物中针对清蛋白诱导的免疫应答。简言之, 将 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 HSA, MSA, 食蟹猴 SA(cynoSA)或狒狒 SA 在 4°C 过夜固定在 96 孔 Maxisorp 板上 (Nunc)。用酪蛋白溶液 (PBS 中 1%) 封闭孔。添加血清稀释物后, 利用山羊抗-美洲驼辣根过氧化物酶缀合物检测特异性结合的免疫球蛋白(Bethyl 实验室公司(Bethyl Lab. Inc.)), 显示对于这两种动物, 诱导了针对人 (图 2A)、小鼠 (图 2B)、食蟹猴 (图 2C) 和狒狒 (图 2D) 清蛋白的显著抗体依赖性免疫应答。来自美洲驼 118 的预免疫血清显示出结合于至多 1:10,000 稀释的各种清蛋白, 但是明显优于用清蛋白 3 次免疫后获得的血清。没有检测到美洲驼 117 的预-免疫血清与不同物种来源的清蛋白的结合。

实施例 2- 文库构建

为了从起始 VHH 模板背景中识别出能够结合清蛋白的 CDR3 序列, 遵从 2 种方法。在第一种方法中, CDR3 环群锚定在限制该环基础(base)的微支架(microscaffold)上。在 VHH、和 VH 中, CDR3 环锚定在 FR3 和 FR4 上。由于这些区域是反向平行 β 折叠组构中包含的延长结构, 所以在该支架中包括 FR3 和 FR4 末端的最后部分, 以某种方式对于本领域中技术人员是显然的。为了进一步限制 CDR3 环的基础, 改造 FR3 中位置 93 (Kabat 编号), 保守的 Cys 残基和位置 104(Kabat 编号), 保守的 Gly 残基之间的非-天然二硫键。

将从免疫的美洲驼的淋巴结(LN)或外周血淋巴细胞(PBL)分离的VHH的互补决定区3(CDR3)作为与具有旁侧构架(FR)残基的基因III蛋白的N-端融合体,表达在M13噬菌体的表面上。更具体地,文库构建体包含pIII分泌信号肽、侧面是9个FR3和7个FR4残基的CDR3文库,随后分别是His₆和c-myc标记物,短Gly-Ala-Ala接头和M13 pIII基因。在该非-限制文库之后,由于FR3中的保守Cys,通过将FR4中的第一个残基(Trp或Arg)替换为Cys,设计限制文库构建体。

如下构建2种所述的CDR3文库。从免疫的美洲驼的淋巴结和/或外周血淋巴细胞中分离RNA,随后利用随机六聚体和Superscript III,按照制造商的指示进行cDNA合成(Invitrogen)。在第一次PCR中,利用正向引物混合物[分别地,4:1比例的ABL051(5'-ggctgagctgggtggtcctgg-3', SEQ ID NO:4)和ABL052(5'-ggctgagtttggtggtcctgg-3', SEQ ID NO:5)]和反向引物ABL003(5'-ggtacgtgctgttgaactgtcc-3', SEQ ID NO:6)扩增VHH和VH。分离VHH片段后,进行2个分别嵌套式的PCR,从而扩增处于非-限制或限制形式的具有旁侧FR序列的CDR3。在这2个嵌套式PCR中,使用7种简并的正向引物(即对FR3退火)的混合物(分别地,SEQ ID NO's: 7-13),将其与5种(SEQ ID NO's: 14-18)或7种(SEQ ID NO's: 19-25)反向引物(即对FR4退火)的混合物组合,以分别获得非-限制和限制形式(见图1,使用IUPAC密码子)。嵌套式PCR-片段通过在内部构建的、pUC19-来源的pAX50载体中的SfiI和NotI限制性位点,克隆在pIII基因的上游。由各种免疫的动物,获得2个~5x10⁷的文库。

实施例3- 选择和筛选

选择是针对人血清清蛋白(HSA: A5763, 西格玛(Sigma))执行的。利用10μg/mL HSA 包被和利用SuperBlock T20 PBS 封闭缓冲液(Pierce)封闭Maxisorp 微量滴定板(Nunc)的孔,以防止非-特异性结合。在将噬菌体加入到包被的孔中之前,将它们在1:1 (v:v) Superblock T20 PBS 封闭缓冲液:PBS+0.05% 吐温-20中预-温育。用100mM 三乙胺稀释噬菌体并用1M Tris pH 7.5 进行中和。

两轮选择后,针对对比阴性对照抗原,卵清蛋白(A5378, 西格玛(Sigma))

对 HSA 的结合筛选单克隆噬菌体。利用 10 μ g/mL HSA 或卵清蛋白包被和利用 SuperBlock T20 PBS 封闭缓冲液(Pierce)封闭 Maxisorp 微量滴定板(Nunc)的孔,以防止非-特异性结合。将在 96-孔板中生成的噬菌体以 1/10 稀释在 1:1 (v:v) Superblock T20 PBS 封闭缓冲液:PBS+0.05% 吐温-20 中,并在 HSA 和卵清蛋白上温育。利用抗-M13(GE 健康保健(GE Healthcare))和山羊抗-小鼠 IRDye700 (Rockland)检测结合的噬菌体,并在 Odyssey(LI-COR 生物科学(LI-COR Biosciences))上读出信号。图 3 显示筛选示值读数的实例,其中识别 2 个 HSA-结合 CDR3 环。2 个“击中”(hits)均选自相同文库,即源自处于非-限制形式的美洲驼 117。测序揭示这 2 个识别的 CDR3 环是相同的: *dtavyycnaaasysdydvfggtdfgpwgqgtqv* (旁侧 FR 序列,显示为斜体字)。该肽称为 17D12。其完整氨基酸序列在 SEQ ID NO: 1 中给出,且其编码核苷酸序列在 SEQ ID NO:2 中给出。CDR3 环的氨基酸序列在 SEQ ID NO:3 中给出。

实施例 4-具有或不具有在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的旁侧 FR 的 17D12 的 CDR3 环与 HSA 的结合。

利用不同的噬菌体浓度评估如选自初步筛选的 17D12 与 HSA 和阴性对照肽,卵清蛋白的结合。另外,分析了 17D12 的 2 种截短形式的结合。这 2 种截短的肽,即 17D12-CDR3-NC (SEQ ID NO: 26)和 17D12-CDR3-C (SEQ ID NO:27),缺乏旁侧 FR 残基,且前者是非-限制环,而后者是限制的(图 4)。

基本如实施例 3 中所述地执行噬菌体结合测定。将在 10mL 培养体积中生成的噬菌体,以由 7.5 $\times 10^{11}$ 个噬菌体/mL 开始的 $\frac{1}{2}$ 稀释系列,温育在 HSA 和卵清蛋白上。图 4 显示全长 17D12 肽以及缺乏 FR 残基的截短的肽对 HSA 的剂量-依赖性结合。与卵清蛋白的非-特异性结合比对限制的截短的肽略高。

实施例 5-具有或不具有在 M13 噬菌体的 pIII 上表达的旁侧 FR 的 17D12 的 CDR3 环的交叉-反应性和特异性

利用不同的噬菌体浓度评估如选自关于 HSA 的两轮选择后的初步筛

选的 17D12 与不同物种的血清清蛋白[小鼠血清清蛋白(MSA, A3559, 西格玛(Sigma)), 食蟹猴血清清蛋白 (CSA, 内部生成), 牛血清清蛋白 (BSA, A6003, 西格玛(Sigma)) 和 HSA] 和对阴性对照抗原[卵清蛋白、人肿瘤坏死因子 α (TNF, 内部生成)] 的结合。另外, 对 17D12 的 2 种截短的变体进行相似的结合研究。这 2 种肽, 即 17D12-CDR3-NC (SEQ ID NO: 26) 和 17D12-CDR3-C (SEQ ID NO: 27), 缺乏 17D12 的旁侧 FR 残基, 且前者是非-限制环, 而后者是限制的 (图 4)。

基本如实施例 4 中所述地执行噬菌体结合测定。全长 17D12 肽以及截短的肽, 17D12-CDR3-NC 和 17D12-CDR3-C, 剂量-依赖性结合于 HSA 和 CSA, 而对 MSA 和 BSA 的反应性在进行的测定中不明显 (图 6)。不存在 17D12 和 17D12-CDR3-NC 对测试的不相关蛋白 (卵清蛋白和 TNF) 的显著非-特异性结合。相反, 存在与限制的截短肽细微程度的非-特异性结合。

实施例 6- 合成肽与 HSA 的结合

通过 Pepscan Presto (Lelystad, 荷兰) 合成和纯化表 1 中所示的肽, 如下。利用多肽合成器, 通过基于树脂的 Fmoc (9-苄基甲氧基羰基) 化学原理来合成所述肽。使用生物素 NovaTag 树脂 (Novabiochem), 并按照固相肽合成 (SPPS) 的概念装配肽序列。通过电喷射质谱法驱动的制备 RP-HPLC 纯化所述肽, 并通过分析 RP-UPLC 和电喷射质谱法检查纯度和质量, 并确定为 94.07% (乙酰基-AAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头-生物素, SEQ ID NO: 28), 和 82.59% (乙酰基-CAAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头-生物素, SEQ ID NO: 29)。

Ala-17D12-CDR3	乙酰基-AAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头-生物素
Cys-Ala-17D12-CDR3	乙酰基-CAAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头-生物素

表 1 包含由 Ala 或 Cys-Ala 处理的 17D12 的 CDR3 序列的合成、生物素化肽。

由表面等离子体共振评估 2 种合成肽 Ala-17D12-CDR3 和 Cys-Ala-17D12-CDR3 对 HSA 的结合。分别在链霉抗生物素蛋白-包被的传感器芯片 SA T071122 上捕获生物素化肽。以多种浓度评估 HSA 结合。将样品以流速 10ul/min 注射到活化的和参考表面上 4 分钟,从而容许与芯片-结合的抗原结合。其次,将不具有 HSA 的结合缓冲液以相同的流速送到芯片上,从而容许结合的 HSA 的解离。10 分钟后,通过注射再生溶液 (50 mM NaOH)去除剩余的结合分析物。

如在图 7A 和 7B 中所述,关于这 2 种肽的结合动力学相当。虽然解离曲线是不均一的,但是可以计算 $2E-2$ 和 $2E-3$ 之间的解离速率 $1/s$ 。观察到针对高于 $15\ \mu M$ 的 HSA 浓度的结合反应的增加,但是结合反应显示在 $48\ \mu M$ HSA 时达到饱和水平。通过拟合 1:1 结合模式,缔合率常数是浓度依赖性的,且在 $1E2-E4$ 范围内。这些数据显示关于本文中所述合成肽的结合亲和力是至少为多于 $1\ \mu M$ 。

实施例 7- 构建纳米抗体-17D12 融合蛋白和在 M13 噬菌体的 pIII 上表达时分析与 HSA 的结合。

在存在或不存在 Gly₄Ser-Gly₃Ser 接头的情况下, HSA-结合肽 17D12 遗传融合于 VHH, 叫做 2D3 的 C-端, 并表达在 M13 噬菌体的 pIII 上 (图 8), 所述 VHH 特异性结合于 HER2 并记述在埃博灵克斯股份有限公司 (Ablynx N.V.) 在 2007 年 11 月 27 日提交的名称为“针对 HER2 的氨基酸序列和包括所述氨基酸序列的多肽用于治疗癌症和/或肿瘤 (Amino acid sequences directed against HER2 and polypeptides comprising the same for the treatment of cancers and/or tumors)”的美国临时申请中 (见 SEQ ID NO: 2060)。FR3 中的 Cys 残基替换为 Ser。

基本如实施例 4 中所述地执行对 HSA 和卵清蛋白的噬菌体结合测定。将在 10mL 培养体积中生成的噬菌体, 以由 10^{12} 个噬菌体/mL 开始的 $\frac{1}{2}$ 稀释系列, 温育在 HSA 和卵清蛋白上。当在存在或缺乏 GlySer 接头的条件下在非-清蛋白结合完整 VHH 的 C-端融合肽 17D12 时, 保持与 HSA 的剂量-依赖性结合 (图 9)。

实施例 8- 2D3-17D12 融合蛋白与 HSA 的结合

2D3-17D12 融合蛋白
EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKGLEW
VSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYY
CAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSSDTAVYYCNAAASYSDYD
VFGGGTDFGPWGQGTQVGGGS (SEQ ID NO: 30)表达在大肠杆菌 (*E. coli*)TG1 细胞中。该融合蛋白通过 IMAC/SEC 纯化,并且在 BIAcore™ 3000 中评估与 HSA 的结合。因此,将 2D3-17D12 融合蛋白和 2D3 纳米抗体的稀释系列注射到由高密度 HSA(7000RU)包被的 CM5 芯片上。图 10 显示 2D3-17D12 与 HSA 的剂量-依赖性结合,而如所预期地,2D3 在相同的测试浓度时不结合。计算的 2D3-17D12 关于 HSA 的亲合力是~10 μ M。作为对照,将 2.5 μ M 2D3-17D12 注射到由高密度不相关蛋白(2400RU)包被的 CM5 芯片上,但是没有检测到特异性结合。

实施例 9- 2D3-17D12 融合蛋白与 HER2 和 HSA 的同时结合。

为了检查 2D3 纳米抗体和 17D12 CDR3 是否能够同时结合它们各自的靶抗原(对于 2D3 纳米抗体是 Her-2 抗原,对于 17D12 CDR3 是清蛋白),执行下列实验。用增加浓度的 HSA 预-温育或不预-温育 2D3-17D12 融合蛋白,并然后将其注射到由 rhErbB2-Fc 抗原 (R&D 系统(R&D Systems))以密度~3000 RU 包被的 CM5 芯片上。如图 11 中所示,与 HSA 预混合的 2D3-17D12 的注射显示出与单独 2D3-17D12 相比相似的缔合率,其与对照注射相比略高但具有相当的解离率。向 2D3 添加 HSA 显示出与单独的 2D3-17D12 相比稍微不同的动力学,但是解离率在相似的范围。

实施例 10-通常融合于具有针对清蛋白结合特异性的 CDR3 环的纳米抗体的药物代谢动力学分析。

通过非限制性实例,本发明的化合物(诸如 SEQ ID NO:30 的 2D3-17D12 融合蛋白)的半衰期通过在啮齿类动物或非-人灵长类动物模型中进行的药物代谢动力学研究确定,如下。向动物组(n=2-10)给药静脉

内快速浓注(bolus injection) 1mg/kg 或 10 mg/kg 2D3-17D12 融合蛋白。血浆样品在给药后的不同时间点(例如, 给药后 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 144, 192, 240, 288 和 336 小时), 通过静脉获得, 并通过 ELISA 分析 2D3-17D12 融合蛋白的存在。将血浆浓度对比时间拟合为二-区室消除模型。清除、V₁、稳定状态体积(V_{ss})、T_{1/2}、AUC、和针对实际施用剂量校正的 AUC (AUC/剂量) 的药物代谢动力学参数针对各个治疗组进行平均。组之间的区别通过分析变量确定。还参考本说明书以及 Dennis 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem) 277:35035-42 (2002) 中引用的参考文献。

实施例中提及的序列列在下表 2 中:

表 2: 实验部分中使用的序列

17D12 ;SEQ ID NO:1	dtavyycnaaasysdydvfggtdfgpwgqgtqv
17D12 ;SEQ ID NO:2	
	gacacggccgtttatttgaatgcagccgcctctatagcgactatgacgtctttggggagggaactga
	ctttggtccttggggccaaggacccaggtc
17D2 CDR 序列	;SEQ ID NO:3: aasysdydvfggtdfgp
引物 ABL051	;SEQ ID NO:4: ggctgagctgggtggtcctgg
引物 ABL052	;SEQ ID NO:5: ggctgagtttgggtggtcctgg
引物 ABL003	;SEQ ID NO:6: ggtacgtgctgttgaactgttcc
引物 For1Sfi	;SEQ ID NO:7: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgcbctattactg
引物 For2Sfi	;SEQ ID NO:8: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgtttatwactg
引物 For3Sfi	;SEQ ID NO:9: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgtgtattatyg
引物 For4Sfi	;SEQ ID NO:10: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgtctattwttg
引物 For5Sfi	;SEQ ID NO:11: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgwtattatttg
引物 For6Sfi	;SEQ ID NO:12: Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccatytattwtctg

引物 For7Sfi ;SEQ ID NO:13
 Gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacgggactylattactg
 引物 Back1Not ;SEQ ID NO:14
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgrgtbccctggcccc
 引物 Back2Not ;SEQ ID NO:15
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctkggtccctlkgcccc
 引物 Back3Not ;SEQ ID NO:16
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtcccccggscyc
 引物 Back4Not ;SEQ ID NO:17
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccctghcccc
 引物 Back5Not ;SEQ ID NO:18
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccctggccgt
 引物 Back1cysRNot ;SEQ ID NO:19
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgrgtbccctggcacct
 引物 Back1cysWNot ;SEQ ID NO:20
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgrgtbccctggcacca
 引物 Back2cysWNot ;SEQ ID NO:21
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctkggtccctlkgcacca
 引物 Back3cysWNot ;SEQ ID NO:22
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgggtcccccggcacca
 引物 Back3cysRNot ;SEQ ID NO:23
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgggtcccccggcatct
 引物 Back4cysWNot ;SEQ ID NO:24
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgggtccctggcacca
 引物 Back5cysWNot ;SEQ ID NO:25
 gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccggctccgacctgggtccctggcagta
 17D12-CDR3-NC ;SEQ ID NO:26 aaasysdydvfggtdfgpa
 17D12-CDR3-C ;SEQ ID NO:27 caaasysdydvfggtdfgpac
 乙酰基 -AAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头 - 生物素;SEQ ID NO:28
 AAASYSDYDVFGGGTDFGP
 乙酰基 -CAAASYSDYDVFGGGTDFGP-c2 接头 - 生物素, SEQ ID NO:29;
 CAAASYSDYDVFGGGTDFGP
 2D3-17D12 融合蛋白;SEQ ID NO:30
 EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPGKG
 LEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTA
 VYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSSDTAVYYCNAAASYSD
 YDVFGGGTDFGPWGQGTQVGGGS

本领域中的那些技术人员利用不超过常规实验，应该承认或能够确定许多本文中所述发明的具体实施方案的等价物。确定所述等价物属于以下权利要求。

将本文中公开的所有参考文献的全部内容引入，作为参考。

序列表

<110> 希尔德·阿迪·皮埃雷特·勒韦兹
约斯特·亚历山大·科尔克曼
亨德里克斯·雷内瑞斯·雅各布斯·马托伊斯·霍根博姆

<120> 能够结合于血清蛋白的肽

<130> A0848.70038US01

<150> US 60/872,923
<151> 2006-12-05

<160> 32

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 34
<212> PRT
<213> 美洲驼 (Lama glama)

<400> 1

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Asp Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr
20 25 30

Gln Val

<210> 2
<211> 102
<212> DNA
<213> 美洲驼 (Lama glama)

<400> 2
gacacggccg tttattattg taatgcagcc gcctcctata gcgactatga cgtctttggg 60
ggaggaactg acttttgtcc ctggggccaa gggacccagg tc 102

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> 美洲驼 (Lama glama)

<400> 3

Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物ABL051

<400> 4
ggctgagctg ggtggtcctg g 21

<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物ABL0052	
<400> 5	
ggctgagttt ggtggtcctg g	21
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物ABL003	
<400> 6	
ggtacgtgct gtigaactgt tcc	23
<210> 7	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物For1Sfi	
<400> 7	
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccgbctatta ctg	53
<210> 8	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物For2Sfi	
<400> 8	
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccgtttatwa ctg	53
<210> 9	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物For3Sfi	
<400> 9	
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccgtgtatta ytg	53
<210> 10	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物For4Sfi	
<400> 10	
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccgtctattw ttg	53
<210> 11	
<211> 53	

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物For5Sfi	
<400>	11	
	gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccgwtattta ttg	53
<210>	12	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物For6Sfi	
<400>	12	
	gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg ccatytattw ctg	53
<210>	13	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物For7Sfi	
<400>	13	
	gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcggacacgg gactytattta ctg	53
<210>	14	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back1Not	
<400>	14	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc gcctccgacc tgrgtbccct ggcccc	56
<210>	15	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back2Not	
<400>	15	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc gcctccgacc tkggtccctt kgcccc	56
<210>	16	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back3Not	
<400>	16	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc gcctccgacc tgggtcccg gscctc	56
<210>	17	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

<220>		
<223>	引物Back4Not	
<400>	17	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc gcctccgacc tgggtcccct ghcccc	56
<210>	18	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back5Not	
<400>	18	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc gcctccgacc tgggtcccct ggccgt	56
<210>	19	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back1cysRNot	
<400>	19	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc ggctccgacc tgrgtbccct ggcacct	57
<210>	20	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back1cysWNot	
<400>	20	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc ggctccgacc tgrgtbccct ggcacca	57
<210>	21	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back2cysWNot	
<400>	21	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc ggctccgacc tkggtccctt kgcacca	57
<210>	22	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back3cysWNot	
<400>	22	
	gagtcattct cgacttgcgg ccgctgaacc ggctccgacc tgggtccccg ggcacca	57
<210>	23	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物Back3cysRNot	

<400> 23
gagtcattct cgacttgagg ccgctgaacc ggctccgacc tgggtccccg ggcattct 57

<210> 24
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物Back4cysWNot

<400> 24
gagtcattct cgacttgagg ccgctgaacc ggctccgacc tgggtccccct ggcacca 57

<210> 25
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物Back5cysWNot

<400> 25
gagtcattct cgacttgagg ccgctgaacc ggctccgacc tgggtccccct ggcagta 57

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 非限制截短的17D12肽

<400> 26

Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Asp
1 5 10 15

Phe Gly Pro Ala
20

<210> 27
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 限制截短的17D12 肽

<400> 27

Cys Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr
1 5 10 15

Asp Phe Gly Pro Ala Cys
20

<210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 截短的17D12 肽
<400> 28

Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Asp
1 5 10 15

Phe Gly Pro

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 截短的17D12 肽

<400> 29

Cys Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Asp Phe Gly Pro
 20

<210> 30
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 2D3-17D12融合蛋白

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Asn Trp Ser Gly Thr His Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asn Trp Arg Asp Ala Gly Thr Thr Trp Phe Glu Lys Ser Gly
 100 105 110

Ser Ala Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Asp Thr Ala Val
 115 120 125

Tyr Tyr Cys Asn Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly
 130 135 140

Gly Gly Thr Asp Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Ser

<210> 31
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> Cys residue in FR3 of SEQ ID NO:1 replaced with a Ser

<400> 31

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser Asn Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr Asp Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr
20 25 30

Gln Val

<210> 32
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 在SEQ ID NO:1的FR3中的Cys残基用Ser取代;
在N末端添加Gly4Ser-Gly3Ser接头

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Asn Ala Ala Ala Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Val Phe Gly Gly Gly Thr
20 25 30

Asp Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
35 40

正向引物（即对 FR3 退火）

For1 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgbcctattactg-3'
For2 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgttatwactg-3'
For3 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgtgtattaytg-3'
For4 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgtctattwttg-3'
For5 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccgwtattatttg-3'
For6 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacggccatytattwctg-3'
For7 <i>Sfi</i>	5'-gtcctcgcaactgcggcccagccggccatggcggacacgggactytattactg-3'

反向引物（即对 FR4 退火），非限制形式

Back1 <i>Not</i>	5'-gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgrgtbccctggcccc-3'
Back2 <i>Not</i>	5'-gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctkggtcccttkgcccc-3'
Back3 <i>Not</i>	5'-gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccggscyc-3'
Back4 <i>Not</i>	5'-gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccghcccc-3'
Back5 <i>Not</i>	5'-gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccctggccgt-3'

反向引物（即对 FR4 退火），限制形式

Back1 <i>cysRNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgrgtbccctggcacct-3'
Back1 <i>cysWNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgrgtbccctggcacca-3'
Back2 <i>cysWNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctkggtcccttkgcacca-3'
Back3 <i>cysWNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccgggcacca-3'
Back3 <i>cysRNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccgggcatct-3'
Back4 <i>cysWNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccctggcacca-3'
Back5 <i>cysWNot</i>	5'- gagtcattctcgacttgcggccgctgaaccgcctccgacctgggtccccctggcagta-3'

图 1

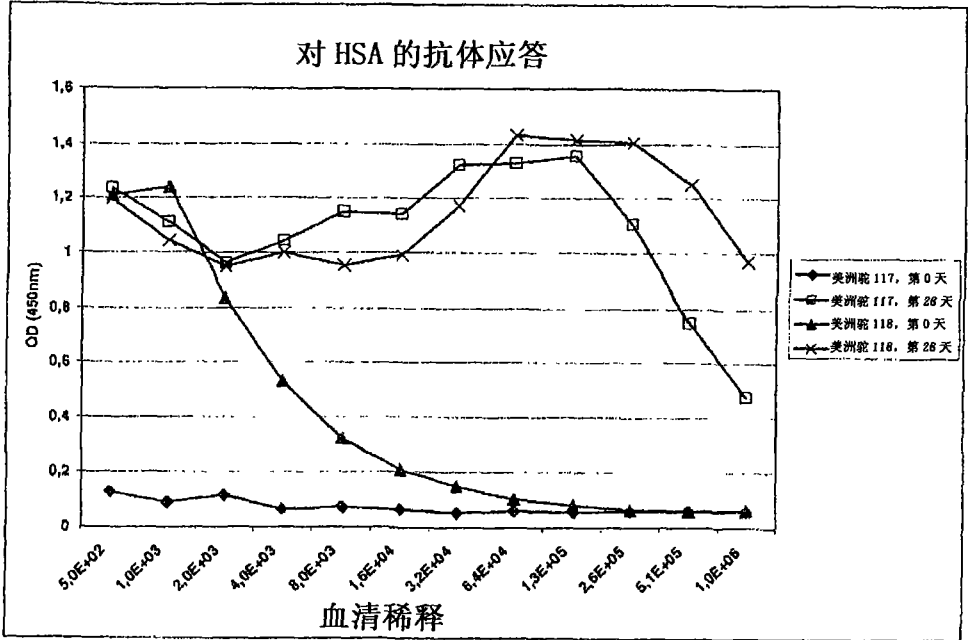


图 2A

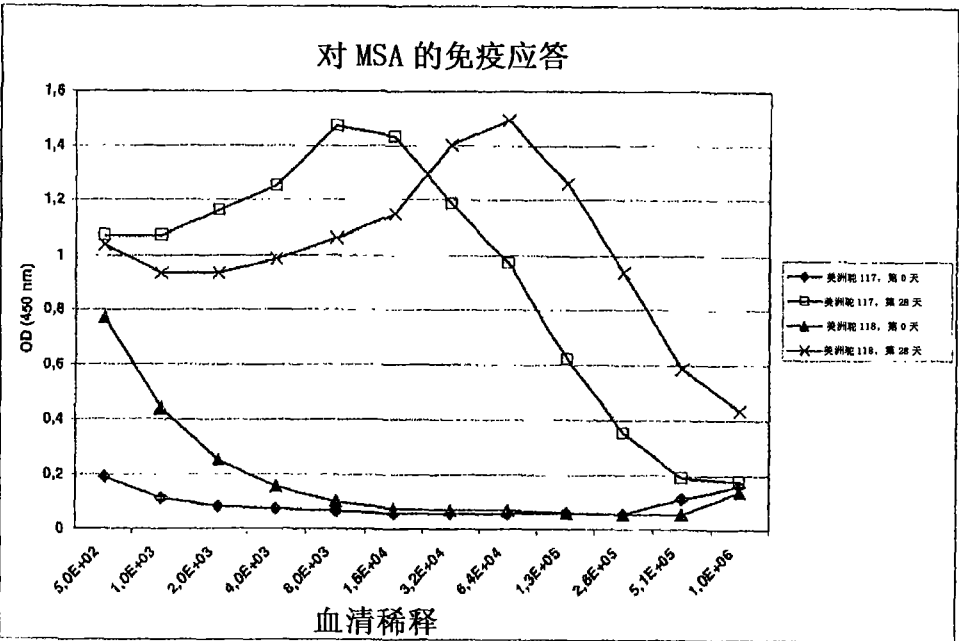


图 2B

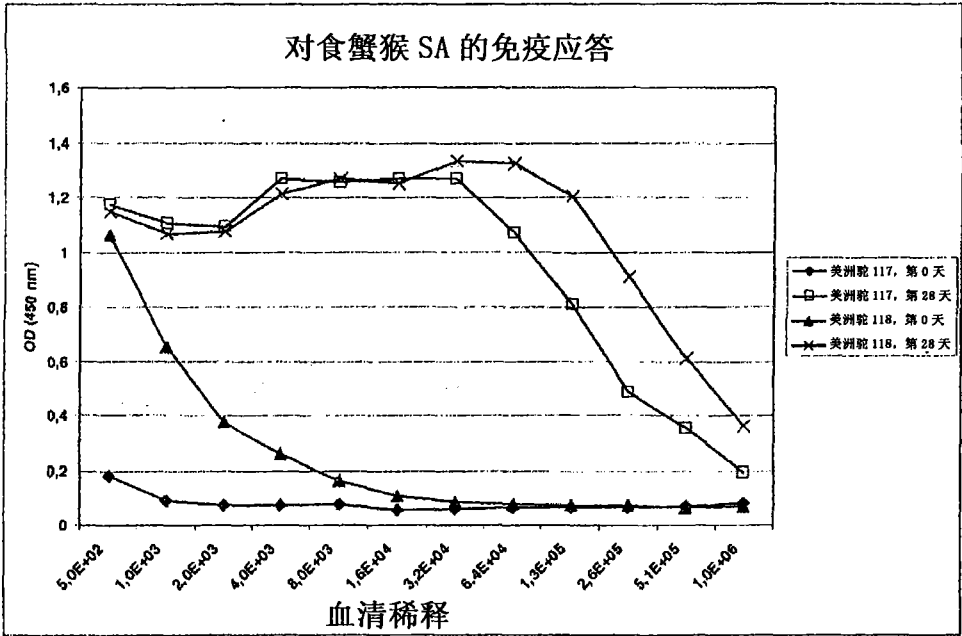


图 2C

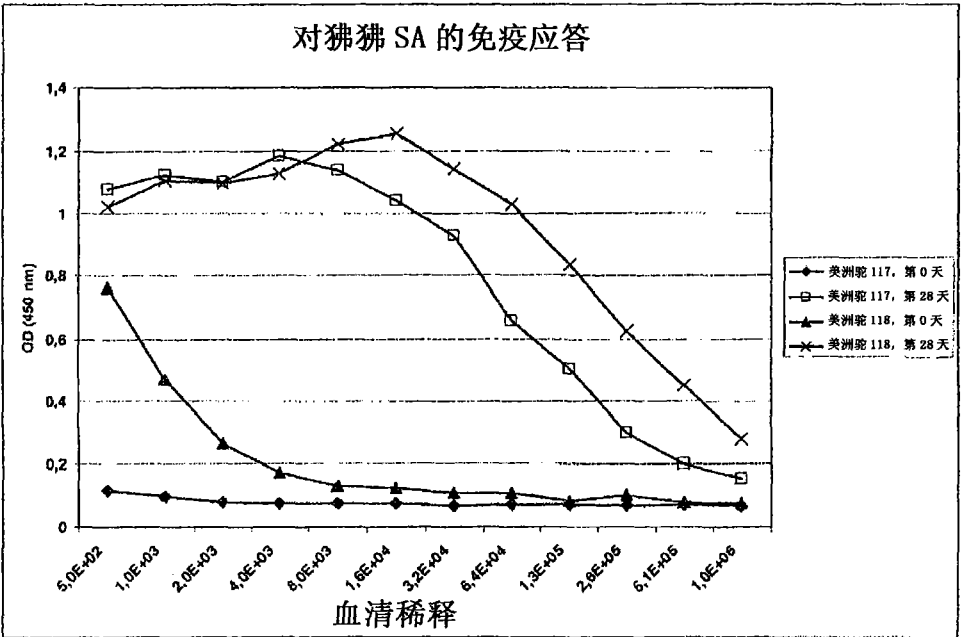


图 2D

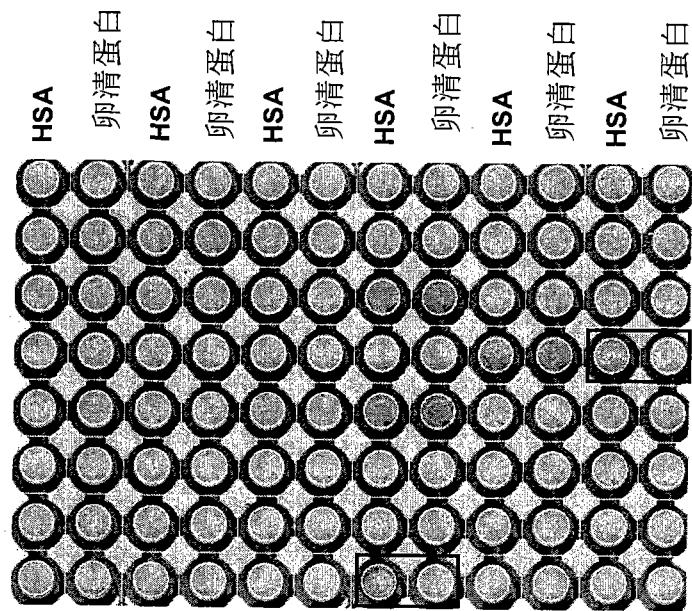


图 3

17D12	dtavyychnaasysdydvfgggtdfgpwwggtqv
17D12-CDR3-NC	aaasysdydvfgggtdfgpa
17D12-CDR3-C	caasysdydvfgggtdfgpac

图 4

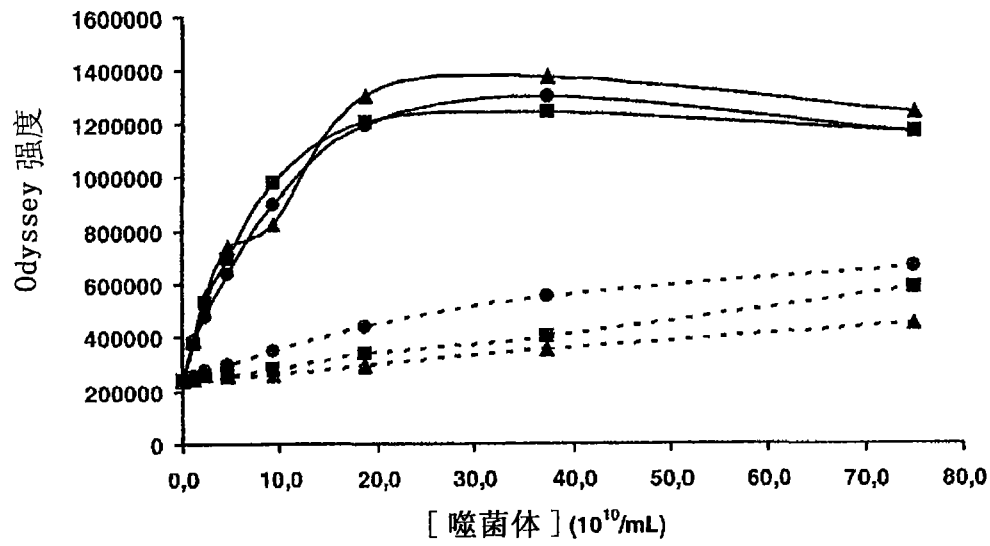


图 5

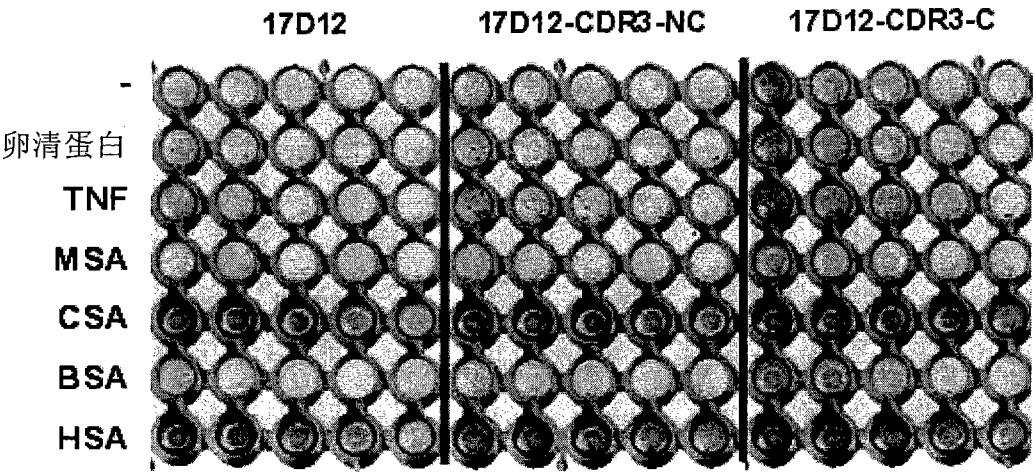


图 6

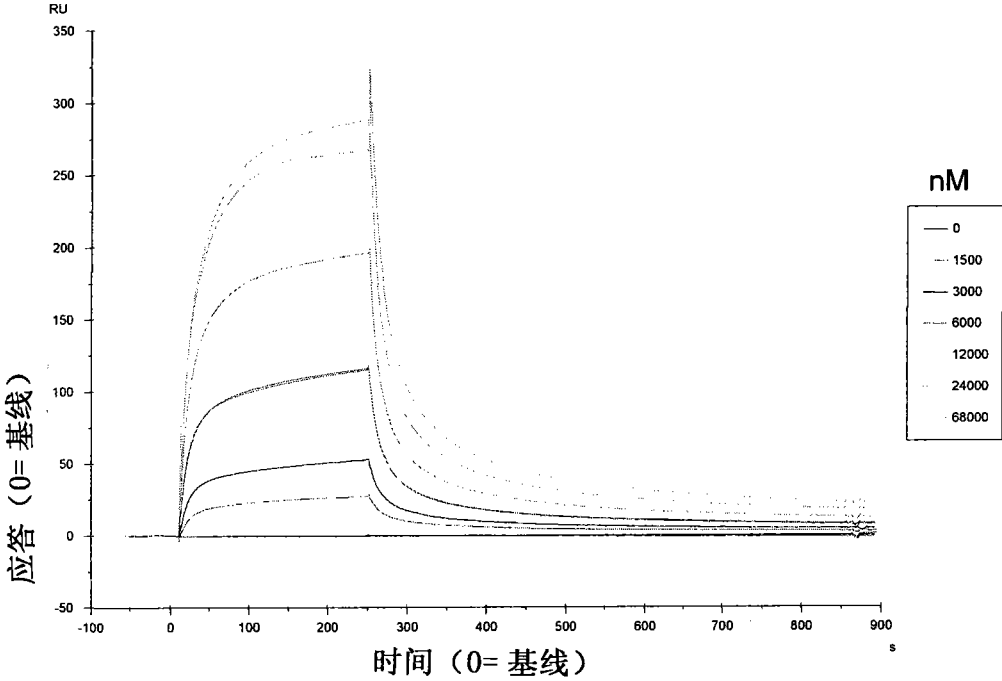


图 7A

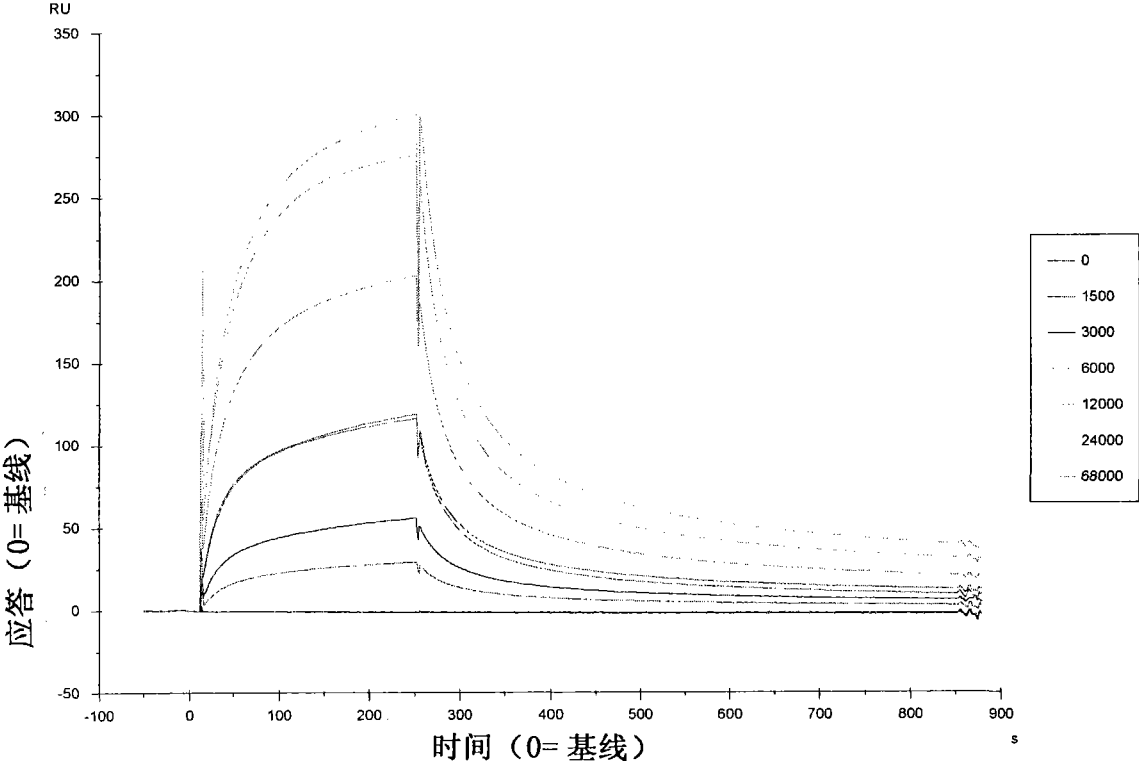


图 7B

VHH-17D12(S)	VHH- <i>dtavyysnaaasysdydvfggtdfgpwgqgtqv</i>
VHH-GlySer-17D12(S)	VHH-ggggsgggs- <i>dtavyysnaaasysdydvfggtdfgpwgqgtqv</i>

图 8

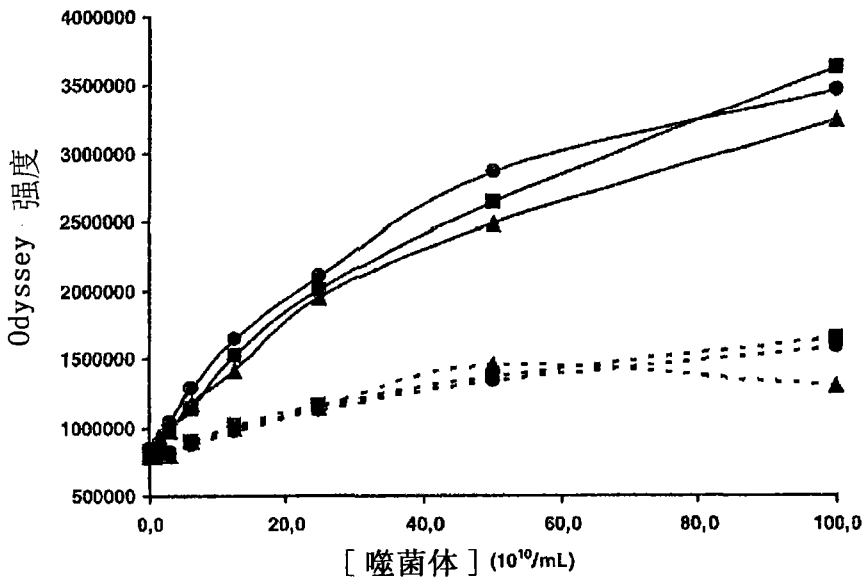


图 9

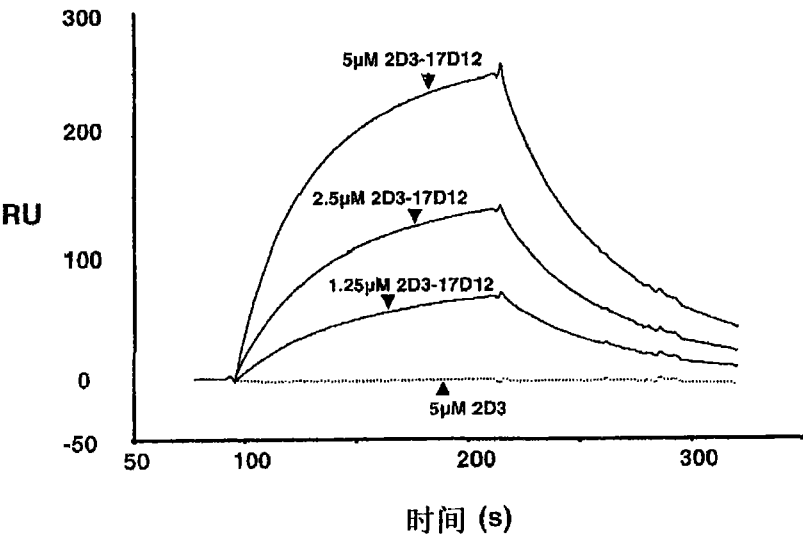


图 10

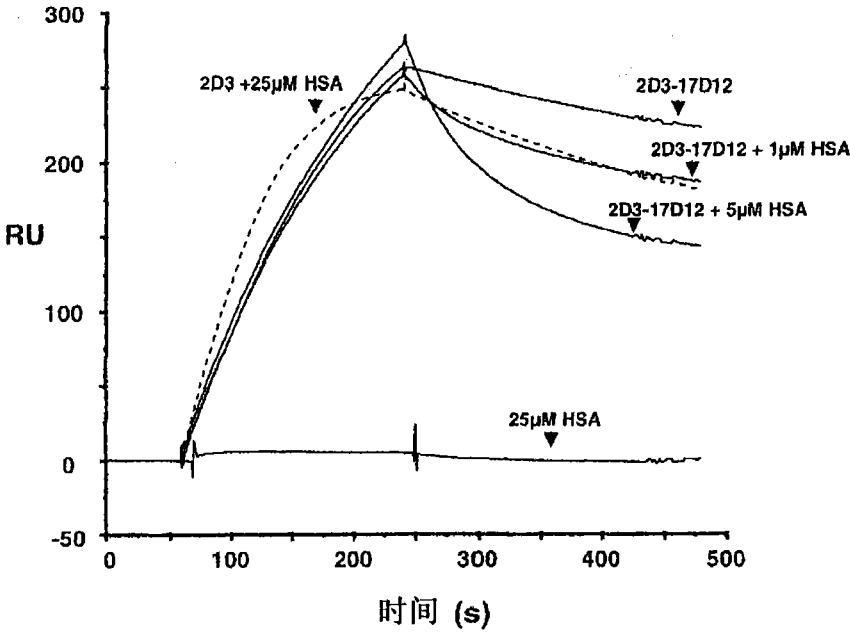


图 11