



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117327188 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 02

(21) 申请号 202311281139.3

(22) 申请日 2018.07.11

(30) 优先权数据

62/531,215 2017.07.11 US

(62) 分案原申请数据

201880046102.3 2018.07.11

(71) 申请人 亚力兄制药公司

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 布里奇特·帕菲 朱利安·钱德

尼米斯·基拉

道格拉斯·L·谢里登

赛达斯·金达尔

保罗·P·腾博尼

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658

专利代理师 王怡瑾 黄幸兒

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书1页 说明书58页
序列表(电子公布) 附图26页

(54) 发明名称

结合补体成分C5或血清白蛋白的多肽及其融合蛋白

(57) 摘要

本公开内容提供了与人补体成分C5和/或血清白蛋白特异性结合的工程化多肽。本公开还提供了包含此类工程化多肽的融合蛋白,其中所述融合蛋白可以是多价和多特异性融合蛋白。本公开进一步提供了编码这样的工程化的多肽或融合蛋白的核酸分子,以及制备这样的工程化的多肽或融合蛋白的方法。本公开进一步提供了包含这样的工程化多肽或融合蛋白的药物组合物,以及使用这样的工程化多肽或融合蛋白的治疗方法。

1. 一种融合蛋白,其包含与人补体成分C5特异性结合的工程化多肽和与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽,其中将特异性结合人补体成分C5的工程化多肽直接或通过肽接头与特异性结合人血清白蛋白的多肽融合。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中特异性结合人血清白蛋白的多肽的C末端残基直接或通过接头与特异性结合人补体成分C5的多肽的N末端残基融合。

3. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中特异性结合人补体成分C5的多肽的C末端残基直接或通过接头与特异性结合人血清白蛋白的多肽的N末端残基融合。

4. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中与人补体成分C5特异性结合的多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:1-12及其片段组成的组;特异性结合人血清白蛋白的多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:22-34及其片段组成的组。

5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中与人补体成分C5特异性结合的多肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,而与人血清白蛋白特异性结合的多肽包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

6. 根据权利要求5所述的融合蛋白,其进一步包含具有氨基酸序列为SEQ ID NO:102或103的肽接头。

7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中所述肽接头包含氨基酸序列SEQ ID NO:102。

8. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含序列,所述序列是选自由SEQ ID NO:96-101组成的组中至少95%相同的序列。

9. 根据权利要求8所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白由选自由SEQ ID NO:96-101组成的组中的序列组成。

10. 根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白由SEQ ID NO:96的多肽序列组成。

结合补体成分C5或血清白蛋白的多肽及其融合蛋白

[0001] 相关信息段落

[0002] 本申请要求于2017年7月11日提交的美国临时申请号62/531,215的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2018年7月24日,名为AXJ-251PC_SL.txt,大小为376,575字节。

背景技术

[0005] 补体成分5(C5)是补体的第五个成分,在炎症和细胞杀伤过程中起重要作用。活化肽C5a是具有有效的痉挛和趋化活性的过敏毒素,它是通过C5转化酶裂解而衍生自 α 多肽的。C5b大分子裂解产物可以与C6补体成分形成复合物,而该复合物是形成膜攻击复合物(MAC)的基础,其中包括额外的补体成分。

[0006] C5调节不当会导致免疫功能受损的患者或以细胞过度降解为特征性疾病(例如,由C5介导的溶血引起的溶血性疾病)。

[0007] 由于C5调节失调会导致严重的破坏性表型,因此需要具有良好药物特性(例如半衰期)的C5活性调节剂。

发明内容

[0008] 本公开提供了特异性结合补体成分C5或血清白蛋白的工程化多肽,其中此类工程化多肽可以是sdAb或Ig可变结构域。在一些实施方案中,工程化多肽不显著降低或抑制血清白蛋白与FcRn的结合或不显著降低血清白蛋白的半衰期。本公开还提供了包含此类工程化多肽的融合蛋白,其中所述融合蛋白可以是多价和多特异性融合蛋白。本公开进一步提供了编码这样的工程化的多肽或融合蛋白的核酸分子,以及制备这样的工程化的多肽或融合蛋白的方法。本公开进一步提供了包含这样的工程化多肽或融合蛋白的药物组合物,以及使用这样的工程化多肽或融合蛋白的治疗方法。

[0009] 在一个实施方案中,本公开涉及一种融合蛋白,其包含特异性结合人补体成分C5的工程化多肽和特异性结合人血清白蛋白的工程化多肽,其中特异性结合人补体成分C5的工程化多肽直接或通过肽接头与人血清白蛋白特异性结合的多肽融合。在一个特定的实施方案中,将特异性结合人血清白蛋白的多肽的C末端残基直接融合或通过接头与特异性结合人补体成分C5的多肽的N末端残基融合。在一个具体的实施方案中,将特异性结合人补体成分C5的多肽的C末端残基直接融合或通过接头与特异性结合人血清白蛋白的多肽的N末端残基融合。在一个特定的实施方案中,与人补体成分C5特异性结合的多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:1-12及其片段组成的组;并且特异性结合人血清白蛋白的多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:22-34及其片段组成的组。在一个特定的实施方案中,特异性结合人补体成分C5的多肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,并且特异性结合人血清白蛋白的多肽包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一个特定的

实施方案中,本文所述的融合蛋白还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:102或103的肽接头。在一个特定的实施方案中,融合蛋白包含序列,所述序列是选自由SEQ ID NO:96-101组成的组中至少95%相同的序列。在一个特定的实施方案中,融合蛋白由选自由SEQ ID NO:96-101组成的组中的序列组成。在一个特定的实施方案中,融合蛋白由SEQ ID NO:96的多肽序列组成。在一个具体的实施方案中,特异性结合人补体成分C5的所述多肽包括三个互补决定区,CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含SEQ ID NO:13-17中的任何一个氨基酸序列,CDR2包含SEQ ID NO:18或19的氨基酸序列,并且CDR3包含SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列。在一个特定的实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的多肽包含三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含SEQ ID NO:35-43中的任何一个氨基酸序列,CDR2包含SEQ ID NO:44-51中的任何一个氨基酸序列,并且CDR3包含SEQ ID NO:52-63中的任何一个氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的抗原结合结构域可以被工程化或进一步工程化以pH依赖性方式结合抗原,例如在高pH下对抗原的高亲和力和在较低pH下对抗原结合的低亲和力,反之亦然。

[0010] 在一个实施方案中,本公开涉及一种药物组合物,其包含治疗有效量的本文所述的融合蛋白和药学上可接受的载体。在一个具体的实施方案中,药物组合物可以包含降解或灭活透明质酸的试剂,例如透明质酸酶或重组透明质酸酶。

[0011] 在一个实施方案中,本公开涉及一种分离的核酸分子,其包含编码本文所述的融合蛋白的核苷酸序列。核酸分子可以是例如表达载体。本公开涉及包含或利用本文所述的编码融合蛋白的核酸的宿主细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK293细胞、巴斯德毕赤酵母细胞(*Pichia pastoris* cells)、哺乳动物细胞、酵母细胞、植物细胞)和表达系统。

[0012] 在一个实施方案中,本发明涉及结合人补体成分C5的工程化多肽,其中该工程化多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:1-12及其片段组成的组。在一个具体的实施方案中,所述工程化多肽包含序列,所述序列是选自由SEQ ID NO:1-12组成的组中至少90%(例如与90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同)相同的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。

[0013] 在另一个实施方案中,提供了结合人补体成分C5的工程化多肽,其中该工程化多

肽由选自SEQ ID NO:1-12及其片段组成的组中的氨基酸序列组成。例如,在一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

[0014] 在一个实施方案中,本发明涉及一种特异性结合人血清白蛋白的工程化多肽,其中所述多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:22-34及其片段组成的组。在一个特定的实施方案中,该工程化多肽包含与SEQ ID NO:22-34中的任一氨基酸序列至少90%相同(例如90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同)的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。

[0015] 在另一个实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽由选自SEQ ID NO:22-34及其片段组成的组中的氨基酸序列组成。例如,在一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所

述工程化多肽由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成。

[0016] 在一个具体的实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽包含三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:35-43组成的组,CDR2包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:44-51组成的组,并且CDR3包含氨基酸序列,所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:52-63组成的组。在一个特定的实施方案中,该多肽特异性结合到人血清白蛋白上与A1b1相同的表位。

[0017] 在一个实施方案中,本公开内容涉及一种用于制备本文所述的融合蛋白的方法,其包含在宿主细胞中表达至少一个核酸分子,所述核酸分子包含编码所述融合蛋白的核苷酸序列。

[0018] 在一个实施方案中,本公开涉及一种治疗试剂盒,其包含:(a)包含标签的容器;(b)包含本文所述融合蛋白的组合物;其中所述标签指示所述组合物将被施用于患有补体介导的疾病或怀疑患有补体介导的疾病的患者。试剂盒可以任选地包含降解或灭活透明质酸的试剂,例如透明质酸酶或重组透明质酸酶。

[0019] 在一个实施方案中,本公开内容涉及一种用于治疗患有补体介导的疾病的患者的方法,该方法包括向该患者施用治疗有效量的本文所述的融合蛋白。在一个具体的实施方案中,补体介导的疾病选自:类风湿性关节炎;狼疮性肾炎;哮喘;缺血再灌注损伤;非典型溶血性尿毒症综合征;致密物沉积病(dense deposit disease);阵发性夜间血红蛋白尿;黄斑变性;溶血、肝酶升高和血小板减少(HELLP)综合征;格林巴雷综合征(Guillain-Barré Syndrome);CHAPLE综合征;重症肌无力;视神经脊髓炎;造血干细胞移植后血栓性微血管病(post-HSCT-TMA);骨髓移植后血栓性微血管病(post-BMT TMA);德戈斯病(Degosdisease);高雪氏病(Gaucher's disease);肾小球肾炎(glomerulonephritis);血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自然流产;包西免疫性血管炎(Pauci-immune vasculitis);大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa);反复胎儿流产(recurrent fetal loss);多发性硬化症(MS);创伤性脑损伤;以及因心肌梗塞、体外循环和血液透析引起的伤害。

[0020] 附图的简要说明

[0021] 图1A和1B显示了针对抗C5 VHH结构域的补体经典途径(CCP)红细胞溶解测定的结果。

[0022] 图2显示了针对抗C5 VHH结构域的C5a释放测定的结果。

[0023] 图3A至3D显示了针对双特异性融合蛋白的CCP红细胞溶解测定的结果。

[0024] 图4显示了针对双特异性融合蛋白的Wieslab CCP测定的结果。

[0025] 图5显示了针对双特异性融合蛋白的C5a释放测定的结果。

[0026] 图6A和6B显示了基于LC-MS的定量测定的结果,其证实了双特异性融合蛋白的药代动力学。

[0027] 图7A至7D显示了Biacore传感图,其示出了HBS EP缓冲液中在pH 6.0的FcRn与没有VHH结构域(对照,图7A),MSA21(图7B),HAS040(图7C)或HAS041(图7D)饱和的HSA的结合。

[0028] 图8A至8D显示了Biacore传感图,其示出了与Alb1 VHH竞争的VHH结构域HAS020、HAS040、HAS041和HAS044与白蛋白的结合。

[0029] 图9A和9B显示了各种双特异性融合蛋白抑制红细胞溶解的能力。

[0030] 图10显示CRL0952 (SEQ ID NO:96) 在预防红细胞溶解方面在功能上与CRL0500高度相似。CRL0500是具有 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:106) 接头的双特异性C5和白蛋白结合融合蛋白。

[0031] 图11A至11D显示了组氨酸取代的融合蛋白的pH依赖性结合。

[0032] 图12A和12B显示了组氨酸取代的融合蛋白的pH依赖性结合。

[0033] 发明详述

[0034] 本公开内容提供了特异性结合血清白蛋白或补体成分C5的工程化多肽,其中工程化多肽可以是例如单结构域抗体(sdAb)或免疫球蛋白(IgG)可变结构域。在一些实施方案中,工程化多肽不显著降低或抑制血清白蛋白与FcRn的结合或不显著降低血清白蛋白的半衰期。本公开还提供了包含工程化多肽的融合蛋白,其中所述融合蛋白可以是例如多价和多特异性融合蛋白。本公开进一步提供了编码工程化多肽或融合蛋白的核酸分子,以及制备这种工程化多肽或融合蛋白的方法。本公开进一步提供了包含工程化多肽或融合蛋白的药物组合物,以及使用这种工程化多肽或融合蛋白的治疗方法。

[0035] 使用标准重组DNA方法来构建编码本公开内容的工程化多肽或融合蛋白的多核苷酸,将此类多核苷酸掺入重组表达载体中,并将此类载体引入宿主细胞以产生本公开内容的工程化多肽或融合蛋白。参见,例如,Sambrook等,2001,《分子克隆:实验室手册》(冷泉港实验室出版社,第三版)。除非提供具体的定义,否则本文描述的与分析化学,合成有机化学以及药物和药物化学结合使用的术语以及实验室程序和技术是本领域已知的和常用的。类似地,常规技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、配制、递送和治疗患者。

[0036] 定义

[0037] 如根据本公开所利用的,除非另外指出,否则以下术语应被理解为具有以下含义。除非上下文另有要求,否则单数形式应包括复数,复数形式应包括单数。

[0038] 如本文所用,术语“结合结构域”是指蛋白质或抗体的包含与抗原有相互作用的氨基酸残基的部分。结合结构域包括但不限于抗体(例如,全长抗体)及其抗原结合部分。结合结构域赋予结合剂其对抗原的特异性和亲和力。该术语还涵盖具有与免疫球蛋白结合结构域同源或很大程度上同源的结合结构域的任何蛋白质。

[0039] 本文所指的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或其单链形式。在一个优选的实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原有相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。

[0040] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”(或简称为“抗体片段”)是指抗体的一个

或多个片段或部分,其保留特异性结合抗原的能力。这样的“片段”的长度例如为约8至约1500个氨基酸,合适的长度为约8至约745个氨基酸,合适地为约8至约300,例如约8至约200个氨基酸,或长度为10至约50或100个氨基酸。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。抗体的术语“抗原结合片段”中涵盖的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,是包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) *Nature* 341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,其可以任选地通过合成接头连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,但是它们可以使用重组方法通过合成的接头连接起来,从而使它们成为一条蛋白链,其中VL区和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(sFv);参见例如Bird等人(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意图包含在抗体的术语“抗原结合片段”内。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或完整的免疫球蛋白的酶促或化学裂解来产生。

[0041] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、创造或分离的所有人抗体,例如(a) 从具有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b) 从转化为表达抗体的宿主细胞中分离的抗体,例如从转染瘤中表达的抗体,(c) 从重组的组合人抗体库中分离的抗体,和(d) 抗体通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、创造或分离。此类重组人抗体包含利用特定人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区,这些序列由种系基因编码,但包括随后的重排和突变,例如在抗体成熟期间发生的重排和突变。如本领域中已知的(参见,例如,Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9):1117-1125),可变区包含抗原结合结构域,其由各种基因编码,所述各种基因重排以形成对外来抗原特异的抗体。除重排外,还可以通过多个单个氨基酸变化(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰可变区,以增加抗体对外来抗原的亲和力。恒定区将在对抗原的进一步应答中改变(即同种型转换)。因此,响应抗原而编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排和体细胞突变的核酸分子可能与原始核酸分子不具有序列同一性,而是基本上相同或相似(即具有至少80%的同一性)。

[0042] 如本文所用,术语“人抗体”是指免疫球蛋白(Ig),其例如被免疫系统用来结合和中和病原体。该术语包括具有基本上对应于人种系Ig序列的可变区和恒定区的抗体。在一些实施方案中,人抗体是在非人哺乳动物中产生的,包括但不限于啮齿动物,例如小鼠和大鼠,以及兔形动物,例如兔子。在其他实施方案中,人抗体在杂交瘤细胞中产生。在其他实施方案中,人抗体是重组产生的。如本文所用,人抗体包括抗体的全部或一部分,包括例如重链和轻链、可变区、恒定区、蛋白水解片段、互补决定区(CDR)和其他功能片段。

[0043] 如本文所用,“生物活性片段”是指具有所需长度或生物学功能的分子的一部分,例如基因、编码序列、mRNA、多肽或蛋白质。蛋白质的生物学活性片段,例如,可以是保留蛋白质的一种或多种生物学活性的全长蛋白质的片段。例如,mRNA的生物学活性片段可以是在翻译时表达生物学活性蛋白片段的片段。此外,具有生物活性的mRNA片段可包含非编码序列(例如,调节序列,UTR等)的缩短形式。通常,酶或信号分子的片段可以是,例如,保留其

信号或酶活性的分子的那部分。例如,基因或编码序列的片段可以是基因或编码序列中产生表达产物片段的那部分。片段不一定必须在功能上进行定义,因为它也可以指分子的一部分,而不是整个分子,但是具有某些所需的特征或长度(例如,限制性片段、蛋白质的蛋白水解片段、扩增片段等)。

[0044] 普通或常规哺乳动物抗体包含四聚体,该四聚体通常由两对相同的多肽链组成,每对具有一条全长的“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一条全长的“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。本文所用的术语“重链”和“轻链”是指具有足够的可变结构域序列以赋予对靶标抗原特异性的任何Ig多肽。每个轻链和重链的N末端部分通常包括约100至110个或更多个氨基酸的可变结构域,其通常负责抗原识别。每条链的C末端部分通常定义为负责效应子功能的恒定结构域。因此,在天然存在的抗体中,全长重链Ig多肽包括可变结构域(V_H 或 VH)和三个恒定结构域(C_{H1} 或 $CH1$ 、 C_{H2} 或 $CH2$ 以及 C_{H3} 或 $CH3$),其中 V_H 结构域位于多肽的N末端和 C_{H3} 结构域在C末端,并且全长轻链Ig多肽包括可变结构域(V_L 或 VL)和恒定结构域(C_L 或 CL),其中 V_L 结构域在多肽的N末端,而 C_L 结构域在C末端。

[0045] 在全长的轻链和重链中,可变结构域和恒定结构域通常由约12个或更多氨基酸的“J”区域连接,而重链还包括约10个以上氨基酸的“D”区域。每个轻/重链对的可变区通常形成抗原结合位点。天然存在的抗体的可变结构域通常表现出由三个称为CDR的高变区相连的相对保守的框架区(FR)的相同一般结构。来自每对两条链的CDR通常通过框架区对齐,这使得能够结合至特异的表位。从N末端到C末端,轻链和重链可变结构域通常都包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0046] 如本文所用,术语“基本上纯的”或“基本上纯化的”是指作为组合物中存在的主要物质的化合物或物质(即以摩尔计,它比组合物中的任何其他单个物质都丰富)。例如,基本上纯化的部分可以是这样的组合物,其中主要物质占存在的所有大分子物质的至少约50%(以摩尔为基准)。例如,基本上纯的组合物可以包含占组合物中存在的所有大分子物质的大于约80%、85%、90%、95%或99%的主要物质。在其他实施方案中,可以将主要物质纯化至基本均质(通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染物),其中所述组合物基本上由单个大分子物质组成。

[0047] 本文所用的术语“抗原”或“抗原靶标”是指能够被抗体,一个或多个Ig结合结构域或其他免疫结合部分结合的分子或分子的一部分,包括例如本文公开的工程化多肽或融合蛋白。抗原能够用于动物中,以产生能够结合该抗原表位的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。

[0048] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由连续氨基酸或蛋白质的三级折叠并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常以独特的空间构象包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定给定抗体结合哪些表位的方法(即表位作图)是本领域众所周知的,并且包括例如免疫印迹和免疫沉淀测定法,其中测试来自抗原的重叠或连续肽与给定抗体的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域和本文所述的技术,例如,x射线晶体学和二维核磁共振(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, G.E.Morris, Ed. (1996))。

[0049] 参照本公开内容的工程化多肽或融合蛋白使用的术语“活性”、“生物活性”或“生物学特性”包括但不限于表位亲和力和特异性,拮抗抗原靶标活性的能力,本发明的工程化多肽或融合蛋白的体内稳定性,以及本发明的工程化多肽或融合蛋白的免疫原性。其他可识别的生物学特性包括,例如,交叉反应性(例如,通常地,与抗原靶标的非人类同源物,或与其他抗原靶标或组织的交叉反应),以及在哺乳动物细胞中保持高蛋白表达水平的能力。

[0050] 当分子在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其抗原靶标时,本文所公开的抗体,免疫球蛋白或具有免疫功能的免疫球蛋白片段或工程化多肽或融合蛋白被称为“特异性”结合抗原。如本文所用,术语“特异性结合”是指抗体、免疫球蛋白或免疫功能性免疫球蛋白片段,或本发明的工程化多肽或融合蛋白结合抗原的能力,所述抗原具有至少约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 或更高的 K_D 的表位,和/或以比其对非特异性抗原的亲和力大至少两倍的亲和力结合表位。

[0051] 如本文所用,术语“ K_D ”是指抗体、免疫球蛋白或免疫功能性免疫球蛋白片段、或本文公开的工程化多肽或融合蛋白与抗原靶标之间的相互作用的解离常数。当本发明的工程化多肽或融合蛋白包含单价Ig序列时,单价Ig序列优选与所需抗原结合,抗原例如具有 10^{-5} 至 10^{-12}M 或更低,或 10^{-7} 至 10^{-12}M 或更低,或 10^{-3} 至 10^{-12}M 的 K_D ,和/或具有至少 10^7M^{-1} ,至少 10^8M^{-1} ,至少 10^9M^{-1} ,或至少 10^{12}M^{-1} 的结合亲和力。通常认为大于 10^{-4}M 的 K_D 值表示非特异性结合。在一些实施方案中,本发明的工程化多肽或融合蛋白的单价Ig序列以小于500mM,小于200nM,小于10nM或小于500pM的亲和力结合至所需抗原。

[0052] 可以通过本领域已知的方法来确定 K_D ,包括例如表面等离子体共振 (SPR)。通常,SPR分析使用例如BIAcore系统 (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ) 测量配体 (生物传感器基质上的靶标抗原) 与分析物之间的实时结合相互作用。还可以通过固定分析物并呈递配体来进行SPR分析。本公开内容的工程化多肽或融合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合也可以本领域已知的任何合适方式来确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定法,例如放射免疫测定法 (RIA)、酶免疫分析 (EIA) 和夹心竞争分析。

[0053] 术语“双特异性”是指能够结合两种抗原的本发明的融合蛋白。术语“多价融合蛋白”是指包含两个或更多个抗原结合位点的融合蛋白。

[0054] 术语“多特异性融合蛋白”是指本发明的融合蛋白,其能够结合两个或更多个相关或不相关的靶标。

[0055] 如本文所用,术语“融合至”是指通过组合一个以上序列而制成的多肽,通常通过将一个序列例如编码序列克隆到具有一个或多个第二编码序列的表达载体中,使得两个(或多个)编码序列被转录并翻译成单个连续多肽。除了通过重组技术制备之外,还可以通过化学反应或本领域已知的用于制备定制多肽的其他手段将多肽的部分彼此“融合”。

[0056] 本文使用的术语“载体”是指用于将编码信息转移至表达系统 (例如宿主细胞或体外表达系统) 的任何分子 (例如核酸、质粒或病毒)。载体的一种类型是“质粒”,其是指环状双链DNA (dsDNA) 分子,可以在其中插入其他DNA片段。载体的另一种类型是病毒载体,其中可以将其他DNA区段插入病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制 (例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体 (例如非游离型哺乳动物载体) 可以在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。另外,某些载体能够指导与其可操作连接的编码序列的表达。这样的载体在本文中称

为“表达载体”。

[0057] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指侧翼序列的布置,其中侧翼序列被配置或组装以执行期望的功能。因此,可操作地连接至编码序列的侧翼序列可能能够影响编码序列的复制,转录和/或翻译。编码序列可操作地连接至启动子,例如,其中该启动子能够指导该编码序列的转录。侧翼序列不必与编码序列邻接,只要它能正确运行就可以被认为是可操作地连接。

[0058] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指已将表达载体引入其中的细胞。宿主细胞不仅旨在指特定的对象细胞,而且还指该细胞的后代。因为由于突变或环境影响而在后代中可能发生某些修饰,所以这种后代实际上可能与亲本细胞不同,但是这种细胞仍然包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。多种宿主细胞表达系统可用于表达本发明的工程化多肽或融合蛋白,包括细菌、酵母、杆状病毒和哺乳动物表达系统(以及噬菌体展示表达系统)。

[0059] 如本文所用并应用于特定分子的术语“天然存在”是指在自然界中发现并且未被操纵的分子。类似地,如本文所用,术语“非天然存在的”是指在自然界中未发现或已被修饰或人工合成的分子。

[0060] 本文所用的术语“工程化的”,应用于特定分子诸如例如通过突变、截短、缺失、取代、添加、缀合或通过其他改变分子的主要序列、化学或三维结构、化学特征、折叠行为、糖基化状态或任何其他属性而被修饰或操纵的例如多肽分子,以使该分子与其天然存在的对应物不同。

[0061] 本文所用的术语“患者”包括人和动物主体。

[0062] “病症”是将从使用本公开的工程化多肽或融合蛋白的治疗中受益的任何病症。“病症”和“状况”在本文中可互换使用。

[0063] 如本文所用,“补体介导的病症”是指由补体途径的错误调节例如补体途径的激活或抑制直接或间接引起的病症,或由补体途径的一个或更多成分,或补体途径产生的产物,直接或间接介导的病症。。该术语还指由补体途径的一种或多种成分或由补体途径产生的产物加剧的疾病。

[0064] 本文所用的术语“治疗”(“treatment”或“treat”)是指治疗性治疗和疾病预防性或预防性措施。需要治疗的对象包括患有该疾病的那些对象以及具有患该疾病的风险的那些对象或将要预防该疾病的那些对象。

[0065] 如本文所用,例如本文所述的融合蛋白或工程化多肽的“治疗有效”量是当施用时导致疾病症状严重性降低的量(例如,与补体介导的疾病有关的疾病症状的减轻,疾病症状无症状期的频率和持续时间的增加,或由于疾病困扰的侵害或残疾的预防)。在某些实施方案中,本文描述的治疗剂的治疗有效量可以包括减少红细胞溶解或改善补体介导的病症症状的量(或在多次施用的情况下为各种量)。

[0066] 本文所用的术语“药物组合物”或“治疗组合物”是指当施用于患者时能够诱导所需治疗效果的化合物或组合物。

[0067] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”或“生理上可接受的载体”是指适合于完成或增强本发明的工程化多肽或融合蛋白的递送的一种或多种制剂材料。

[0068] 如涉及包含本公开的一种或多种工程化多肽或融合蛋白的药物组合物所使用的

术语“治疗有效量”是指足以产生所需治疗结果的量或剂量。更具体而言,治疗有效量是本公开内容的一种或多种工程化多肽或融合蛋白的量,其足以在一段时间内抑制与所治疗的状况例如补体介导的疾病相关的一种或多种临床定义的病理过程。治疗有效量可以根据所使用的特定工程化多肽或融合蛋白而变化,并且取决于与所治疗的患者以及疾病的严重程度有关的多种因素和状况。

[0069] 补体系统

[0070] 补体系统与机体的其他免疫系统共同发挥作用,以防御细胞和病毒病原体的入侵。至少有25种补体蛋白,它们是血浆蛋白和膜辅因子的复杂集合。血浆蛋白约占脊椎动物血清中球蛋白的10%。补体成分通过在一系列复杂但精确的酶促裂解和膜结合过程中相互作用来实现其免疫防御功能。产生的补体级联反应导致产生具有调理素的、免疫调节的和裂解功能的产物。

[0071] 补体级联反应可通过经典途径(CP)、凝集素途径或替代途径(AP)进行。凝集素途径通常起始于甘露糖结合凝集素(MBL)与高甘露糖底物的结合。AP可以是不依赖抗体的,并由病原体表面上的某些分子引发。CP通常通过抗体识别并结合目标细胞上的抗原位点而起始。这些途径在C3转化酶处汇合,其中补体成分C3被活性蛋白酶裂解,产生C3a和C3b。

[0072] 补体成分C3(在血液的血浆部分中丰富)的自发水解也可以导致AP C3转化酶的起始。这一过程被称为“敲除(tickover)”,是通过自发裂解C3中的硫酯键形成C3i或C3(H₂O)来进行的。表面的存在促进了敲除,所述表面支持活化的C3的结合和/或具有中性或正电荷特性(例如细菌细胞表面)。C3(H₂O)的形成允许血浆蛋白因子B的结合,从而使因子D将因子B裂解为Ba和Bb。Bb片段仍与C3结合形成含有C3(H₂O)Bb的复合物-“流体相”或“起始”C3转化酶。尽管仅少量产生,但是液相C3转化酶可以将多种C3蛋白裂解为C3a和C3b,并导致C3b的产生,并且其随后的共价结合至表面(例如细菌表面)。结合至表面结合C3b的因子B被因子D裂解形成结合AP C3转化酶复合物的表面,所述复合物包含C3b、Bb。

[0073] AP C5转化酶((C3b)₂,Bb)是在将第二个C3b单体添加到AP C3转化酶后形成的。第二个C3b分子的作用是结合C5并将其呈递给Bb裂解。通过添加三聚体蛋白备解素使AP C3和C5转化酶稳定。然而,不需要备解素结合就可以形成功能性的替代途径C3或C5转化酶。

[0074] CP C3转化酶是在补体成分C1(其为C1q、C1r和C1s的复合物)与结合至靶标抗原(例如微生物抗原)的抗体相互作用后形成的。C1的C1q部分与抗体抗原复合物的结合会导致C1的构象变化,从而激活C1r。然后,活性C1r裂解与C1相关的C1s,以产生活性丝氨酸蛋白酶。活性C1s将补体成分C4裂解成C4b和C4a。与C3b一样,新生成的C4b片段包含高反应性的硫醇,该硫醇易于与目标表面(例如微生物细胞表面)上的合适分子形成酰胺或酯键。C1s还将补体成分C2裂解成C2b和C2a。由C4b和C2a形成的复合物是CP C3转化酶,其能够将C3加工成C3a和C3b。CP C5转化酶(C4b,C2a,C3b)是在将C3b单体添加到CP C3转化酶后形成的。

[0075] 除了在C3和C5转化酶中的作用外,C3b还通过与抗原呈递细胞(例如巨噬细胞和树突状细胞)表面上存在的补体受体相互作用而起调理素的作用。C3b的调理素的功能通常被认为是补体系统最重要的抗感染功能之一。具有阻断C3b功能的遗传性病变的患者容易被多种病原体感染,而发现补体级联反应序列中后面具有病变的患者,即具有阻断C5功能的病变的患者,仅更容易患奈瑟氏球菌感染,然后更容易发生。

[0076] AP和CP C5转化酶将C5裂解成C5a和C5b。裂解C5会释放出C5a(一种有效的过敏毒

素和趋化因子)和C5b,从而形成裂解性末端补体复合物C5b9。C5b与C6、C7和C8结合形成在目标细胞表面的C5b 8复合物。当几个C9分子结合时,形成膜攻击复合物(MAC,C5b 9,末端补体复合物(“TCC”)。当足够数量的MAC插入目标细胞膜中时,它们产生的开口(MAC孔)介导目标细胞的快速渗透裂解。

[0077] 尽管功能正常的补体系统提供了抵抗感染微生物的强大防御能力,但补体途径的不适当调节或激活已牵涉到多种疾病的发病机理,包括类风湿性关节炎(RA);狼疮性肾炎;哮喘;缺血再灌注损伤;非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS);致密物沉积病(DDD);阵发性夜间血红蛋白尿(PNH);黄斑变性(例如,年龄相关性黄斑变性(AMD));溶血、肝酶升高和血小板减少(HELLP)综合征;格林巴雷综合征(GBS);蛋白质丢失性肠病(例如CHAPLE综合征);重症肌无力(MG);视神经脊髓炎(NMO);造血干细胞移植后血栓性微血管病(post-HSCT-TMA);骨髓移植后血栓性微血管病(post-BMT TMA);德戈斯病(Degos disease);高雪氏病(Gaucher's disease);肾小球肾炎(glomerulonephritis);血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自然流产;包西免疫性血管炎(Pauci-immune vasculitis);大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa);反复胎儿流产(recurrent fetal loss);多发性硬化症(MS);创伤性脑损伤;以及心肌梗塞、体外循环和血液透析引起的伤害(Holers, V., Immunol.Rev., 223:300-16, 2008)。在多种动物模型中,补体激活的下调已被证明可有效治疗多种疾病(Rother, R. et al., Nat.Biotechnol., 25:1256-64, 2007; Wang, Y. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 93:8563-8, 1996; Wang, Y. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 92:8955-9, 1995; Rinder, C. et al., J.Clin.Invest., 96:1564-72, 1995; Kroshus, T. et al., Transplantation, 60:1194-202, 1995; Homeister, J. et al., J.Immunol., 150:1055-64, 1993; Weisman, H. et al., Science, 249:146-51, 1990; Amsterdam, E. et al., Am.J.Physiol., 268:H448-57, 1995; 和Rabinovici, R. et al., J.Immunol., 149:1744-50, 1992)。

[0078] 人血清白蛋白和新生儿Fc受体

[0079] 已经描述了可以结合人血清白蛋白(HSA)以增加治疗相关蛋白的半衰期的多肽(W091/01743、W001/45746和W002/076489)。然而,所描述的肽部分是细菌或合成来源的,对于在人类的治疗中使用不是优选的。W004/041865描述了针对血清白蛋白(特别是针对HSA)的单结构域抗体(sdAb或Nanobodies®),其可以与其他蛋白质(例如针对所需靶标的一种或多种其他sdAb)连接以增加该蛋白质的半衰期。

[0080] 新生儿Fc受体(FcRn),也称为“Brambell受体”,与延长白蛋白的循环寿命有关(Chaudhury, C. et al., J.Exp.Med., 3:315-22, 2003)。FcRn是一种完整的膜糖蛋白,由可溶性轻链组成,该可溶性轻链由 β 2-微球蛋白(β 2m)组成,与3个胞外结构域,一个跨膜区和一个约50个氨基酸的胞质尾部非共价结合到一条43kDa的链上。胞质尾部包含与受体的内在化有关的二核苷酸基序胞吞信号。 α 链是非经典MHC I蛋白质家族的成员。所述 β 2m与 α 链的结合对于FcRn正确折叠并离开内质网以路由至内体和细胞表面至关重要。

[0081] FcRn的整体结构类似于I类分子的整体结构。 α -1和 α -2区类似于一个平台,其由八根反平行链组成,形成一个单一的 β 折叠,上面是两个反平行的 α 螺旋,其非常类似于MHC I分子中的肽裂隙(peptide cleft)。由于Pro162的存在导致螺旋的断裂, α -1螺旋的整体重新定位和 α -2螺旋的C末端部分发生了弯曲,因此FcRn螺旋彼此非常接近,从而阻止了肽结

合。FcRn的Arg164的侧链也挡住了肽N末端与MHC口袋的潜在相互作用。此外, α -1和 α -2螺旋之间的盐桥和疏水相互作用也可能有助于凹槽闭合。因此,FcRn不参与抗原呈递并且肽裂隙为空。

[0082] FcRn从母体循环到胎儿循环跨胎盘合体滋养细胞结合并转运IgG,并保护IgG不受成人降解。除体内平衡外,FcRn还控制组织中IgG的胞吞作用。FcRn位于上皮细胞、内皮细胞和肝细胞中。

[0083] HSA结合FcRn与IgG形成三分子复合物。白蛋白和IgG都非合作地结合到FcRn上的不同位点。人FcRn与Sepharose HSA和SepharosehIgG的结合是pH依赖性的,在pH5时最大,在pH7到pH8时不可检测。FcRn以如同其结合IgG相同的pH依赖性方式结合白蛋白的观察结果表明,白蛋白与FcRn相互作用并因此被保护免于降解的机制与IgG的机制相同,并通过与FcRn类似的pH敏感性相互作用介导。使用表面等离子体共振测量单个HSA结构域结合固定的可溶性hFcRn、FcRn和白蛋白的能力已显示通过pH依赖性方式的白蛋白D III结构域在与IgG结合位点不同的位点相互作用(Chaudhury,C.等,Biochemistry,45:4983-90,2006)。

[0084] 特异结合补体C5或血清白蛋白的工程化多肽

[0085] 本文描述了工程化多肽,其包含可以结合或以其他方式与补体成分C5或血清白蛋白结合的Ig序列,例如Ig可变结构域序列。本文所述的工程化多肽可以以这样的方式特异性结合血清白蛋白,使得当工程化多肽与血清白蛋白分子结合或以其他方式与血清白蛋白分子结合时,与当多肽未与其结合时血清白蛋白分子与FcRn的结合相比,血清白蛋白分子与FcRn的结合没有显著降低或被抑制。。在该实施方案中,“未显著降低或抑制”是指对血清白蛋白与FcRn的结合亲和力(使用合适的测定法,例如,SPR测量)不降低超过50%,或降低超过30%,或降低超过10%,或降低超过5%,或完全不减少。在该实施方案中,“未显著降低或抑制”还意味着血清白蛋白分子的半衰期没有显著降低。特别地,工程化多肽可以结合血清白蛋白上不参与血清白蛋白与FcRn结合的氨基酸残基。更特别地,工程化多肽可以结合不构成血清白蛋白的结构域III的一部分的血清白蛋白的氨基酸残基或序列,例如能够结合构成结构域I和/或结构域II的一部分的血清白蛋白的氨基酸残基或序列的工程化多肽。

[0086] 在一些实施方案中,工程化多肽是sdAb或适合用作sdAb,因此可以是重链可变结构域序列或轻链可变结构域序列,并且在某些实施方案中,是重链抗体的重链可变结构域序列。在工程化多肽是单结构域,重链可变结构域序列来自重链抗体的情况下,此类序列可以被称为VHH或V_HH抗体,VHH或V_HH抗体片段,或VHH或V_HH结构域。

[0087] 重链抗体”是指由两条重链组成并且缺少常规抗体中发现的两条轻链的抗体。骆驼科动物(骆驼科的成员,骆驼科是骆驼科亚目中目前唯一活着的科;现存的骆驼科动物包括单峰骆驼(dromedary camel)、双峰骆驼(Bactrian camel)、野生骆驼(wild or feral camel)、美洲驼(llama)、羊驼(alpaca)、小羊驼(vicuña)和大羊驼(guanaco))是唯一具有单链VHH抗体的哺乳动物。骆驼科动物中约有50%的抗体为重链抗体,其余50%为普通或常规的哺乳动物重/轻链抗体类型。

[0088] “VHH结构域”是指天然存在的重链抗体中存在的可变结构域,以使其与常规四链抗体中存在的重链可变结构域(在本文中称为“VH结构域”)和存在于常规四链抗体中的轻链可变结构域(本文称为“VL结构域”)区分开来。

[0089] VHH结构域具有许多独特的结构特征和功能特性,这些结构特征和功能特性使分

离的VHH结构域(以及基于VHH结构域并与天然存在的VHH结构域共享这些结构特征和功能特性的sdAb)和包含VHH结构域的蛋白质用作功能性抗原结合结构域或蛋白质非常有利。例如,在不存在VL的情况下与抗原结合的VHH结构域和sdAb可以充当单个相对较小的功能性抗原结合结构单元、结构域或蛋白质。这些分子的小尺寸将VHH结构域与常规四链抗体的VH和VL结构域区分开。使用VHH结构域和sdAb作为单一抗原结合蛋白或作为抗原结合结构域(例如,作为较大蛋白质或多肽的一部分),与使用常规VH和VL结构域以及scFv或常规抗体片段(例如Fab或F(ab')₂片段)相比,具有许多明显的优势。例如,仅需要一个单结构域就可以高亲和力和高选择性地结合抗原,这样就不必存在两个单独的结构域,也不必确保这两个结构域以特定的空间构象和构型存在(例如,与scFv一样,通过使用特定的接头)。VHH结构域和sdAb也可以从单个基因表达,不需要翻译后折叠或修饰。VHH结构域和sdAb可以轻松设计成多价和多特定格式。VHH结构域和sdAb也是高度可溶的并且没有聚集的趋势(Ward, E.等, *Nature*, 341:544-6, 1989),并且它们对热、pH、蛋白酶和其他变性剂或条件高度稳定(Ewert, S.等, *Biochemistry*, 41:3628-36, 2002)。VHH结构域和sdAb相对容易制备且便宜,即使达到生产所需的规模。例如,可以使用本领域已知的方法使用微生物发酵来生产VHH结构域, sdAb和含有VHH结构域或sdAb的多肽,并且不需要使用哺乳动物表达系统,以及例如常规抗体片段。与常规的四链抗体及其抗原结合片段相比, VHH结构域和sdAb相对较小(约15kDa, 或比常规IgG小10倍), 因此显示出比常规的四链抗体及其抗原结合片段更高的组织渗透性(包括但不限于实体瘤和其他致密组织)。VHH结构域和sdAb可以显示出所谓的“腔体结合”特性(例如由于其扩展的CDR3环), 并且可以接近常规四链抗体及其抗原结合片段无法接近的靶标和表位。例如, 已显示VHH结构域和sdAb可抑制酶(WO 97/49805; Transue, T.等, *Proteins*, 32:515-22, 1998; Lauwereys, M.等, *EMBO J.*, 17:3512-20, 1998)。

[0090] 本文所用的术语“单结构域抗体”或“sdAb”是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体或其片段。它不限于特定的生物来源或特定的制备方法。sdAb可通过例如(1)分离天然存在的重链抗体的VHH结构域而获得;(2)表达编码天然存在的VHH结构域的核苷酸序列;(3)天然存在的VHH结构域的“人源化”或通过表达编码这种人源化VHH结构域的核酸;(4)使从任何动物物种,特别是哺乳动物物种,例如人类的天然存在的VH结构域“骆驼化”,或通过表达编码这种骆驼化的VH结构域的核酸;;(5)“结构域抗体”(“Dab”)的“骆驼化”或通过表达编码这样的骆驼化的VH结构域的核酸;(6)采用合成或半合成技术制备工程化多肽或融合蛋白;(7)使用核酸合成技术制备编码sdAb的核酸,然后表达得到的核酸;和/或(8)以上的任意组合。

[0091] 本文所述的工程化多肽或融合蛋白可包含例如已经“人源化”的天然存在的VHH结构域的氨基酸序列,例如,通过用存在于人的VH结构域中相应位置的一个或多个氨基酸残基替换天然存在的VHH序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基。

[0092] 本文所述的工程化多肽或融合蛋白可包含例如已经“骆驼化”的天然存在的VH结构域的氨基酸序列,即,通过用存在于例如骆驼科动物抗体的VHH结构域的相应位置的一个或多个氨基酸残基替换天然存在的VH结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基。这可以以本领域中已知的方式执行。这样的骆驼化可优先发生在存在于VH VL界面和所谓的“骆驼科标志残基”上的氨基酸位置(WO 94/04678)。用作亲本序列或用于产生或设计骆驼化序列的起始材料的VH结构域或序列可以是例如来自哺乳动物的VH序列,并且在某些实施

方案中,可以是人的VH序列。然而,应该指出的是,这样的骆驼化序列可以以本领域已知的任何合适方式获得,因此并不严格限于使用包含天然存在的亲本VH结构域的多肽获得的多肽。

[0093] 通过提供分别编码天然存在的VHH结构域或VH结构域的核苷酸序列,然后以本领域技术人员已知的方式改变该核苷酸序列中的一个或多个密码子,使得新的核苷酸序列分别编码人源化或骆驼化序列,可以进行“人源化”和“骆驼化”。核苷酸序列。而且,基于天然存在的VHH结构域或VH结构域的氨基酸序列或核苷酸序列,可以使用本领域已知的核酸合成技术从头设计并合成编码期望的人源化或骆驼化序列的核苷酸序列。这样获得的核苷酸序列可以以本领域已知的方式表达。

[0094] 在一些实施方案中,本公开内容提供了工程化多肽,其与依库丽单抗(Eculizumab)一样特异性结合人C5上的相同表位,或结合防止C5裂解成C5a和C5b的C5上的表位。在一些实施方案中,本公开内容提供了与人补体成分C5特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:1-12中的任一氨基酸序列或其片段。在其他实施方案中,本公开内容提供了与人补体成分C5特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:1-12中的任一氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,本公开内容提供了与人补体成分C5特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:1-12中的任一氨基酸序列具有至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,所述工程化多肽包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。

[0095] 在另一个实施方案中,提供了与人补体成分C5结合的工程化多肽,其中所述工程化多肽由选自SEQ ID NO:1-12及其片段的氨基酸序列组成。例如,在一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方

案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,工程化多肽由SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

[0096] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了与人补体成分C5特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含SEQ ID NO:13-17中的任一个的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:13-17至少90%相同的序列;CDR2包含SEQ ID NO:18或19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:18或19至少90%相同的序列;CDR3包含SEQ ID NO:20或21的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20或21至少90%相同的序列。

[0097] 在其他实施方案中,本公开内容提供了与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:22-34的氨基酸序列中的任一个或其片段。在其他实施方案中,本公开内容提供了与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:22-34的氨基酸序列中的任一个至少90%相同的氨基酸序列。在其他实施方案中,本公开内容提供了与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:22-34的氨基酸序列中的任一个至少95%相同,至少96%相同,至少97%相同,至少98%相同,或至少99%相同的氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,所述工程化多肽包含SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。在另一个实施方案中,工程化多肽包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或与其至少90%相同的序列。

[0098] 在另一个实施方案中,与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽由选自SEQ ID NO:22-34的氨基酸序列及其片段组成。例如,在一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案

中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,所述工程化多肽由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成。

[0099] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了与人血清白蛋白特异性结合的工程化多肽,其中所述多肽包含三个互补决定区CDR1、CDR2和CDR3,其中CDR1包含SEQ ID NO:35-43的氨基酸序列中的任一个,或与SEQ ID NO:35-43至少90%相同的序列;CDR2包含SEQ ID NO:44-51的氨基酸序列中的任一个或与SEQ ID NO:44-51至少90%相同的序列;或CDR3包含SEQ ID NO:52-63的氨基酸序列中的任一个或与SEQ ID NO:52-63至少90%相同的序列。

[0100] 本文公开的工程化多肽可以特异性结合例如人血清白蛋白上与A1b1相同的表位(AVQLVESGGG LVQPGNSLRL SCAASGFTFR SFGMSWVRQA PGKEPEWVSS ISGSGSDTLY ADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLKPED TAVYYCTIGG SLSRSSQGTQ VTVSS;SEQ ID NO:149)。在其他实施方案中,工程化多肽竞争性地抑制A1b1与人血清白蛋白的结合。

[0101] 当工程化多肽包含Ig时,也可以使用Ig的合适片段,例如Ig可变结构域,来代替完整的Ig。

[0102] 从给定的免疫球蛋白可变结构域内鉴定CDR的方法是本领域已知的(Wu, T. & Kabat, E., J. Exp. Med., 132:211-50, 1970; Clothia, C. 等, Nature, 342:877-83, 1989; Al-Lazikani, B. 等, J. Mol. Biol., 273:927-48, 1997; 以及 Ofra, Y. 等, J. Immunol., 181:6230-35, 2008)。

[0103] 特异性结合补体成分C5和血清白蛋白的融合蛋白

[0104] 本文描述了包含特异性结合白蛋白和补体成分C5的工程化多肽的融合蛋白,其中工程化多肽直接融合或通过一个或多个合适的接头或间隔子连接。本文所用的术语“肽接头”是指插入或包括在融合蛋白的工程化多肽之间的一个或多个氨基酸残基。肽接头可以例如在序列水平上插入或包括在融合蛋白的工程化多肽之间的过渡处。接头中氨基酸残基的同一性和序列可以根据所需的二级结构而变化。例如,甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸可用于具有最大柔韧性的接头。可以将任何氨基酸残基与一个或多个其他氨基酸残基(可以与第一氨基酸残基相同或不同)组合作为接头,以根据所需性质根据需要构建更大的肽接头。在其他实施方案中,接头是GGGGAGGGGAGGGGS (SEQ ID NO:102)。在其他实施方案中,接头是GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:103)。适用于产生本文所述融合蛋白的其他肽接头包括,例如, G_4S (SEQ ID NO:104)、 $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:105)、 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:106)、 $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:107)、 $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO:108)、 $(G_4S)_6$ (SEQ ID NO:109)、 $(EAAAK)_3$ (SEQ ID NO:110)、PAPAP (SEQ ID NO:111)、 $G_4SPAPAP$ (SEQ ID NO:112)、 $PAPAPG_4S$ (SEQ ID NO:113)、GSTSGKSSEGKG (SEQ ID NO:114)、 $(GGGDS)_2$ (SEQ ID NO:115)、 $(GGGES)_2$ (SEQ ID NO:116)、GGGDSGGGGGS (SEQ ID NO:117)、GGGASGGGGGS (SEQ ID NO:118)、GGGESGGGGGS (SEQ ID NO:119)、ASTKGP (SEQ ID NO:120)、ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:121)、 G_3P (SEQ ID NO:122)、 G_7P (SEQ ID NO:123)、PAPNLLGGP (SEQ ID NO:124)、 G_6 (SEQ ID NO:125)、 G_{12} (SEQ ID NO:126)、APELPGGP (SEQ ID NO:127)、SEPQPQPG (SEQ ID NO:128)、 $(G_3S_2)_3$ (SEQ ID NO:129)、

GGGGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:130)、GGGSGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO:131)、(GGSSS)₃ (SEQ ID NO:132)、(GS₄)₃ (SEQ ID NO:133)、G₄A(G₄S)₂ (SEQ ID NO:134)、G₄SG₄AG₄S (SEQ ID NO:135)、G₃AS(G₄S)₂ (SEQ ID NO:136)、G₄SG₃ASG₄S (SEQ ID NO:137)、G₄SAG₃SG₄S (SEQ ID NO:138)、(G₄S)₂AG₃S (SEQ ID NO:139)、G₄SAG₃SAG₃S (SEQ ID NO:140)、G₄D(G₄S)₂ (SEQ ID NO:141)、G₄SG₄DG₄S (SEQ ID NO:142)、(G₄D)₂G₄S (SEQ ID NO:143)、G₄E(G₄S)₂ (SEQ ID NO:144)、G₄SG₄EG₄S (SEQ ID NO:145)和(G₄E)₂G₄S (SEQ ID NO:146)。本领域技术人员可以选择一种接头,例如以减少或消除翻译后修饰,例如糖基化,例如木糖基化。在某些实施方案中,所述融合蛋白包含至少两个sdAb、Dab、VHH抗体、VHH抗体片段或其组合,其中所述sdAb、Dab、VHH抗体或VHH抗体片段中的至少一个针对白蛋白以及sdAb、Dab、VHH抗体或针对补体成分C5的VHH抗体片段中的一个,因此所得融合蛋白具有多价或多特异性。结合结构域或部分可以针对例如HAS、食蟹猴血清白蛋白、人C5和/或食蟹猴C5。

[0105] 在一些实施方案中,融合蛋白的白蛋白结合结构域的C末端残基可以直接或经由肽与补体成分C5结合结构域的N末端残基融合。在其他实施方案中,融合蛋白的补体成分C5结合结构域的C末端残基可以直接融合或通过肽与白蛋白结合结构域的N末端残基融合。

[0106] 在一些实施方案中,融合蛋白包含补体成分C5结合,所述补体成分C5结合包含SEQ ID NO:1-12中的氨基酸序列或其片段;和特异性结合人血清白蛋白的多肽可以包含SEQ ID NO:22-34中的氨基酸序列或其片段。在一些实施方案中,第一多肽衍生自SEQ ID NO:1-12中任一个的氨基酸序列,第二多肽衍生自SEQ ID NO:22-34中任一个的氨基酸序列。人补体成分C5结合结构域可包含例如SEQ ID NO:5或11的氨基酸序列,而白蛋白结合结构域可包含例如SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本公开提供了具有SEQ ID NO:64-95中的任一个的氨基酸序列的融合蛋白。在另一个实施方案中,本公开提供了具有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的融合蛋白。在另一个实施方案中,本公开提供了具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的融合蛋白。在另一个实施方案中,本公开提供了具有SEQ ID NO:96-101中的任一个的氨基酸序列的融合蛋白。

[0107] 本文公开的融合蛋白可以通过在宿主细胞中表达至少一种包含编码融合蛋白的核苷酸序列的核酸分子来制备。宿主细胞的来源可以是哺乳动物、植物或微生物。除已知的哺乳动物宿主细胞外,还可以使用酵母宿主细胞,例如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母和/或植物宿主细胞。

[0108] 包含与补体C5或血清白蛋白或其结合蛋白特异性结合的多肽的治疗性组合物及其施用

[0109] 在另一个实施方案中,本公开提供了工程化多肽,其包含或由本文公开的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,本公开内容提供融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白,其包含或由任选地经由一个或多个合适的接头或间隔子连接至至少一个治疗或靶标部分的本公开内容的至少一种工程化多肽组成。

[0110] 本公开进一步涉及本公开的工程化多肽或包含此类工程化多肽或由其组成的融合蛋白和多价和多特异性融合蛋白的治疗用途,或涉及包含此类工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白的药物组合物的治疗用途。

[0111] 在一些实施方案中,治疗或靶标部分可包含例如至少一个sdAb、Dab、VHH或其片段。在某些实施方案中,本发明的工程化多肽是多价和/或多特异性融合蛋白,其包含至少

两个sdAb、Dab、VHH抗体、VHH抗体片段或其组合。

[0112] 在一些实施方案中,工程化多肽,融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对HSA的亲合力高于对小鼠血清白蛋白的亲合力。在某些实施方案中,工程化多肽,融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对食蟹猴血清白蛋白的亲合力高于对小鼠血清白蛋白的亲合力。在其他实施方案中,工程化多肽,融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对HSA的亲合力高于对食蟹猴血清白蛋白的亲合力。

[0113] 在一些实施方案中,工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对人C5的亲合力高于对小鼠C5的亲合力。在某些实施方案中,工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对食蟹猴C5的亲合力高于对小鼠C5的亲合力。在其他实施方案中,工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白显示出对人C5的亲合力高于对食蟹猴C5的亲合力。

[0114] 当与抗体疗法或其他疗法相比时,本文所述的工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白可以表现出例如改善的疗法特性,包括例如提高的功效、生物利用度、半衰期或其他疗法期望的特性。在一个实施方案中,本公开内容的融合蛋白包含至少一种本文公开的工程化多肽和至少一种治疗或靶标部分。在此类融合蛋白中,与单独的治疗性结合结构域相比,融合蛋白可表现出例如延长的半衰期。通常,此类融合蛋白的半衰期是单独的相应治疗或靶标部分的半衰期的至少1.5倍,或至少2倍,或至少5倍,或至少10倍,或大于20倍。在一些实施方案中,与相应的治疗或靶标部分的半衰期相比,本发明的融合蛋白的半衰期增加了超过1小时,超过2小时,超过6小时或超过12小时。在其他实施方案中,融合蛋白具有大于1小时,大于2小时,大于6小时,大于12小时,约一天,约两天,约一周,约两周,约三周,或不超过2个月的半衰期。

[0115] 如本文所用,术语“半衰期”是指在体内通过例如生理机制降解分子和/或清除或螯合分子将工程化多肽,融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白的血清浓度降低50%所花费的时间。药代动力学分析和确定半衰期的方法是本领域技术人员已知的。

[0116] 包含一种或多种VHH抗体的多价和多特异性融合蛋白的一般描述及其制备方法是已知的(ElsConrath,K.等,J.Biol.Chem.,276:7346-50,2001;Muyldermans,S.,J.Biotechnol.,74:277-302 2001;International Publication No.WO 96/34103,WO 99/23221和WO 04/041865)。

[0117] 本文公开的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白可以从包含例如一种或多种元件例如表达载体的构建体表达或与其相关联(W004/041862)。

[0118] 本文公开的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白可以在例如分离的宿主细胞中表达,所述宿主细胞包含编码本文公开的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白的核酸分子。合适的宿主细胞包括但不限于哺乳动物和酵母细胞。

[0119] 本文公开的治疗或药物组合物可以包含治疗有效量的本文公开的一种或多种工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白,所述工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白与经选择以适合于给药方式的药学或生理上可接受的制剂混合。可接受的制剂材料优选在使用的剂量和浓度下对接受者无毒。

[0120] 可接受的制剂材料可用于修饰、维持或保持例如组合物的pH、摩尔渗透压浓度、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透。可接受的制

剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸),抗菌剂,抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠),缓冲液(例如如硼酸盐、碳酸氢盐、TrisHCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸),填充剂(如甘露醇或甘氨酸),螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA)),络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精),填充剂,单糖、双糖和其他碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖或糊精),蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白),着色剂、调味剂和稀释剂,乳化剂,亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮),低分子量多肽,成盐的抗衡离子(如钠),防腐剂(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、洗必太、山梨酸或过氧化氢),溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇),糖醇(如甘露醇或山梨醇),助悬剂,表面活性剂或湿润剂(例如普鲁尼克斯(pluronic);PEG;山梨糖醇酯;聚山梨酯,例如聚山梨酯20或聚山梨酯80;triton;三甲胺;卵磷脂;胆固醇或替洛沙普),稳定性增强剂(例如蔗糖或山梨糖醇),张力增强剂(例如碱金属卤化物-优选氯化钠或氯化钾-或甘露醇山梨糖醇),递送载体,稀释剂,赋形剂和/或药物佐剂(请参见例如,《雷明顿药物科学》(第18版,AR Gennaro编辑,Mack Publishing Company 1990)及其后续版本,通过引用并入本文)。

[0121] 熟练的技术人员可以根据例如预期的施用途径,递送形式和所需剂量来开发包含本文公开的工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白的药物组合物。

[0122] 由于本文公开的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白可以表现出例如增加的半衰期,因此在一些实施方案中,它们可以循环给药。这样,它们可以以任何合适的方式施用,例如静脉内,皮下,通过注射或输注,或以允许工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白进入循环的任何其他合适的方式施用。这种药物组合物的制备在本领域技术人员知识范围内。

[0123] 本文公开的任何工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白可以与另外的疗法联合施用,即与其他药剂联合施用。本文所用的术语“共同施用”包括本文所述的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白与佐剂和其他试剂的同时、分开或依次施用中的任何或全部,包括作为给药方案一部分的给药。

[0124] 本文所述的药物组合物可包含一种或多种试剂以改善例如治疗剂的递送。可以例如以可共同注射的方式共同施用其他药剂。例如,降解透明质酸的试剂可包含在本文所述的药物组合物中,或可将此类试剂与本文所述的药物组合物共同施用,以例如在施用时促进本文所述的治疗剂的分散和吸收。这种试剂的例子是重组透明质酸酶。

[0125] 还可以选择药物组合物用于肠胃外递送。或者,可以选择组合物用于吸入或通过消化道例如口服递送。这种药物组合物的制备在本领域技术人员知识范围内。

[0126] 其他药物组合物对本领域技术人员将是显而易见的,包括涉及持续递送的制剂或受控递送的制剂。使用例如脂质体载体,可生物降解的微粒或多孔珠和储库注射剂来配制持续递送或受控递送制剂的技术是本领域技术人员已知的。

[0127] 本公开内容还涵盖包含本文公开的工程化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白的治疗试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒既包括具有干燥蛋白质的第一容器,也包括具有水性制剂的第二容器。在其他实施方案中,试剂盒包含单腔和多腔预填充注射器(例如,液体注射器和溶血针)。

[0128] 本公开内容还包括一种制品,该制品包括包含标签的容器和包含本文公开的工程

化多肽、融合蛋白以及多价和多特异性融合蛋白的组合物,其中标签指示该组合物将被施用于患有或怀疑患有补体介导的疾病的患者。

[0129] 在一个实施方案中,本公开提供了一种预防和/或治疗至少一种疾病、状况或病症的方法,所述疾病、状况或病症可以使用本文公开的工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白来预防或治疗,所述方法包括向有需要的患者施用治疗或药理学有效量的本文公开的工程化多肽、融合蛋白或多价和多特异性融合蛋白。在特定的实施方案中,所述病症是补体介导的疾病,例如类风湿关节炎(RA);狼疮性肾炎;哮喘;缺血再灌注损伤;非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS);致密物沉积病(DDD);阵发性夜间血红蛋白尿(PNH);黄斑变性(例如,年龄相关性黄斑变性(AMD));溶血、肝酶升高和血小板减少(HELLP)综合征;格林巴雷综合征(GBS);CHAPLE综合征;重症肌无力(MG);视神经脊髓炎(NMO);造血干细胞移植后血栓性微血管病(post-HSCT-TMA);骨髓移植后血栓性微血管病(post-BMT TMA);德戈斯病(Degos disease);高雪氏病(Gaucher's disease);肾小球肾炎(glomerulonephritis);血栓性血小板减少性紫癜(TTP);自然流产;包西免疫性血管炎(Pauciimmune vasculitis);大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa);反复胎儿流产(recurrent fetal loss);多发性硬化症(MS);创伤性脑损伤;以及因心肌梗塞、体外循环和血液透析引起的伤害。

[0130] 用于治疗的本公开的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域技术人员将理解,用于治疗的合适剂量水平将部分地取决于所递送的分子,使用该组合物的适应症,给药途径和患者大小(体重、体表或器官大小)和状况(年龄和总体健康状况)。

实施例

[0131] 以下实施例说明了本公开的具体实施方案及其各种用途。阐述它们仅出于解释目的,并且不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

[0132] 实施例1.美洲驼(Llama)免疫和抗C5 VHH噬菌体文库的构建从初次注射开始进行美洲驼免疫,然后进行二次增强免疫。简而言之,用500 μ g人补体蛋白C5进行初次免疫,随后在第2周(第1次增强)、第4周(第2次增强)、第8周(第3次增强)和第12周(第4次增强)进行500 μ g人补体蛋白C5抗原增强。通过ELISA测量血清滴度,并且在1:1,000,000稀释度下,第3次增强后的滴度被发现是最高,比预取血液信号高10倍。第3次增强后,从血液样本中分离出外周血单个核细胞(PBMC)。通过台盼蓝(trypan blue)染色发现细胞活力为98%。PBMC分离后,立即在RNA溶解缓冲液中溶解细胞。从PBMC中分离总RNA,并使用美洲驼重链特异性引物合成cDNA。VHH(仅重链)片段通过凝胶电泳与VH(常规重链)片段分离。将VHH片段克隆到pADL 10b(抗体设计实验室,圣地亚哥,加利福尼亚)中,并将DNA文库转化入TG1细胞。随机测序了114个菌落,获得了101个(89%)正确序列。刮擦文库并悬浮在25%甘油中,然后在-80 $^{\circ}$ C下保存。

[0133] 实施例2.噬菌体展示淘选和筛选抗C5 VHH结构域

[0134] 含有抗人补体蛋白C5 VHH结构域文库的TG1细胞在含有100 μ g/mL羧苄青霉素和2%葡萄糖的2x YT培养基中于37 $^{\circ}$ C生长至对数期($OD_{600}=0.4-0.8$)。将细胞用M13K07辅助噬菌体感染,在37 $^{\circ}$ C摇动30分钟或不摇动30分钟。将感染的细胞以4000 $\times$ g的速度沉淀10分钟,然后重悬于含有100 μ g/mL羧苄青霉素,50 μ g/mL卡那霉素和1mM IPTG的2x YT培养基中,并通过在30 $^{\circ}$ C和250rpm条件下过夜生长繁殖噬菌体。将过夜培养物在4 $^{\circ}$ C以9000 $\times$ g离心10

分钟,并通过在冰上孵育1小时,用五分之一体积的PEG NaCl溶液[20%聚乙二醇6000,1.5M NaCl]沉淀噬菌体。通过在4℃下以9000×g离心15分钟来沉淀噬菌体颗粒,并弃去上清液。将噬菌体颗粒重悬于超级封闭缓冲液中,并在微量离心管中以7500×g离心10分钟以沉淀细胞碎片。将含有噬菌体颗粒的上清液转移到新的试管中,并如上所述再次沉淀噬菌体。将浓缩的噬菌体颗粒在70℃下热刺激1小时,并通过感染对数期TG1细胞,然后在具有100μg/mL羧苄青霉素、50μg/mL毫升卡那霉素和2%葡萄糖的2x YT琼脂平板上平板接种,测定加热前后的噬菌体滴度。

[0135] 文库选择策略包括用生物素化的食蟹猴(cyno)补体蛋白C5进行选择,并与摩尔当量的非生物素化的人补体蛋白C5竞争以获得对人和食蟹猴种类都具有反应性的亲和力匹配的抗C5VHH结构域。在室温下,将噬菌体展示VHH文库针对Dynabeads®M-280链霉亲和素进行去选择步骤1小时。通过在室温下将生物素化的食蟹猴C5和非生物素化的人C5的等摩尔溶液与Dynabeads®M-280链霉亲和素孵育30分钟,以选择与人和食蟹猴C5匹配的亲和力的去选择噬菌体颗粒。用PBST和PBS洗涤5轮后,使用含1mg/mL BSA的0.1M甘氨酸(pH 2.2)从珠上洗脱噬菌体。用1M Tris pH 8.0中和洗脱的上清液。用中和的噬菌体感染对数期TG1细胞,并铺在2YTCG培养基上以测量输出滴度。比较输出滴度和输入滴度以计算富集率。较高的比率表明成功分离了C5特异性克隆。

[0136] 挑选单个克隆,将其接种在96孔深孔板上的2x YT培养基中,其中加入100μg/mL羧苄青霉素和2%葡萄糖,并生长至对数期。用M13K07感染细胞,并在30℃下培养过夜,以产生在培养上清液中显示单个VHH结构域的噬菌体颗粒。用链霉亲和素涂层的平板捕获的四个带有人C5的96孔平板的噬菌体ELISA筛选表明有约60%阳性克隆。基于CDR H3的序列分析,从总共76个中选择72个特异克隆作为代表。这些代表性的VHH克隆的序列在表1中提供。出于克隆的目的,修饰了N-和C-末端氨基酸以匹配人VH 3种系的N-和C-末端氨基酸。

[0137] 适用于本发明的工程化多肽的氨基酸序列包括表1中公开的氨基酸序列或其片段。

[0138] 表1. 代表性的美洲驼的抗C5 VHH结构域,以及每个克隆是否与人补体蛋白C5(hC5)和/或食蟹猴补体蛋白C5(cC5)结合。

[0139]

VHH 结构域	序列	结合 hC5	结合 cC5
LCP0081	EVQLVESGGGLVQTTGGSLRLSCAASTSGSDFSGKKMAWYRQ APGNNGREFVAIIIFSNNKVTDYADSVKGRFTISRDNAAKKTIVYL QMSSLTPDPTAVYYCHDQEISWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:150)	+	-
LCP0082	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTSVIVNSMGWYRQAP GKQRELVAITDLSGTTNYADSAQGRFTISRDNAAENLNLVYL QMNNLNPDDTAVYYCNALLSRAVSGSYVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:151)	+	+
LCP0083	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRIGTISNIDLMNWYRQA PGKQREFVASLQSNATNYADSVKGRFTISRDNAAKNTLFLQ MNSLNPEDTAVYFCHALLPRSPYNSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:152)	+	+
LCP0085	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSIIPNIYAMGWYRQAP GKQRELVASIENGLPANYADSVKGRFTISRDNAAKNTVFLQM HSLKSEDTAVYYCYAFRPGVPTTWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:153)	+	+
LCP0086	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSCAASGSISAINAMGWYRQAP GKQREFVADITRAGVSDYADAVKGRFTISRDNAAKNTFYLMQ NDLKPEDTAVYYCDALLIAGGVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:154)	+	-
LCP0088	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTVMGWFRQAP GKEREFVAAVHWGDGNTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVYLLQ LNYLKPEDTSVYYCAARPPTYVGTSRNSRSYDYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:155)	+	+
LCP0089	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSRAIDRNAMGWFRQAP GKERESVAAISASSGNTYYSDSVTGRFTISRDNKNTVYLLQ MNSLKPEDTAVYYCAAGSRGSWYLFDRREYDYWGQGTQVTV SS (SEQ ID NO:156)	+	-
LCP0090	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCTASETSFDINVMGWYRQAP GKQRELVAIITASGNTHEYADSAKGRFTISRDNKNTVAMQM NNLKPDDTAVYYCYVLLSGAVSGVYAHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:157)	+	+
LCP0091	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGRDTSRYAMGWFRQAP	+	+

[0140]

	GKERELMAAISWSGRPTYADSVKGRFTISRDNANTVSLQ MNSLKPEDTAVYYCAYKRLPAWYTGSAYYSQESEYDWGQG TQVTVSS (SEQ ID NO:158)		
LCP0092	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRIGTISNIDLMNWYRQA PGKQREFVASLQSTGTTDYADSVKGRFTISRDNANTLFLQ MNSLNPEDTAVYYCHALIPRSPYNVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:159)	+	+
LCP0095	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTTVMAWFRQAP GKEREFVAADHWGDAGTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNYLKPEDTSVYYCAARPPTYVGTSRDSRAYDWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:160)	+	+
LCP0097	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASESISDSDPMWYRQAP GKQREMVARIPIGPPDYADAVKDRFSISRENAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCNLLHLPGLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:161)	+	+
LCP0098	EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCVASRSISSAMNWYRQPPGK QRELVALITRGFTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMN LKPEDTGYYCNSLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:162)	+	-
LCP0100	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRDMSMWSMGWFRQAP GQREFVAAISWSVGTYEDSVKGRFTLSRDDDKDTAYLEM SDLKLEDADYYCAASTRHGTNLVLPDYDWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:163)	+	-
LCP0101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRIGTISNIDLMNWYRQA PGKQREFVASLQSTGTTDYADSVKGRFTISRDNANTLFLQ MNSLNPEDTAVYYCHALLPRSPYNWGWQGTQVTVSS (SEQ ID NO:164)	+	+
LCP0102	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIPNIYAMGWYRQAP GKQRELVASIENGSTNYADSVKGRFTISRDNANTVFLQM HSLKSEDTAVYYCYAFRPGVPTDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:165)	+	+
LCP0103	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCVASGRFTSNYRMGWFRQAP GAEREFVGTIYWSTGRSYYGDSVKGRFIISGDNAKNTIHLQ MNSLKPEDTGYYCASPENSADFSDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:166)	+	+
LCP0104	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRPFSSYTMGWFRQAP GKERDFVATISWGGIKYYADSVGRFISRDNANTMNYLQ MNSLKPEDTAVYYCAATELRTWSRQTFEYDWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:167)	+	-
LCP0105	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTTVMAWFRQAP GKEREFVAHVHGWDESTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNYLKPEDTSVYYCAARPPTYVGSSRSRAYDWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:168)	+	+
LCP0106	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVSGSILDINVMWYRQAP GKQREFVARITSGGDIDYADPVKGRFTISTNGAKNTVYLQM NSLKPEDTAAYYCNVLLSRSSAGRYTHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:169)	+	+
LCP0111	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPSLYDMGWYRQAP EKQRESVAIITQSGSTDYADSVKGRFTISRDNANTLYLQM NSLKPEDTAVYYCRLVGVTWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:170)	+	-
LCP0112	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGRFTSSYGIGWFRQAP GKEREFVAISRTGQTTHYADSIRFTISRDNANTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARTGGPIYGSEYHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:171)	+	-
LCP0113	EVQLVESGGGLVQAGDSLTLSCAASGRPFSSLTMGWFRQAP GKGREFVATTWSGDIKYYADSVKGRFTISRDNANTMNYLQ MNSLKPEDTAVYYCAATLLRTWSRQTNEYEYWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:172)	+	-
LCP0114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRIGTISNIDLMNWYRQA	+	+

[0141]

	PGKQREFVASLQSTGTTDYADSVRGRFTISRDNANTLFLQ MNSLNPEDTAVYYCHALLPRSPYNVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:173)		
LCP0115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSGILSPYAVGWF RQAPGKQREFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTLSRDNAKDTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPPQENEYGYWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:174)	+	+
LCP0122	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPETGATINVMAWYRQAP GKQRELVARVAIDNNTDYADHAKGRFTISRDNKNTVYLQM NNLKPDDTAVYYCNVLLSRQISGSYGHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:175)	+	+
LCP0123	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAMSGGTRPFEDYVMAWFRQ ATGKEREVATITWMGETTYKDSVNGRFAISRDNANTVA LQMNSLEPEDTAVYFCAHSRSSFSTSGGRYNPRPTEYDYW GQGTQVTVSS (SEQ ID NO:176)	+	+
LCP0125	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTTVMGWFRQAP GKEREVAAVHWGDEGTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNAKLPEDTSVYYCAAKPPTYVGTSSRAYVYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:177)	+	+
LCP0126	EVQLVESGGGLVQAGDSLTLSCAASGSGFSINVMAWYRQAP GKQRDVASMSTIGGRTNYKDSLKGRFTISRDNKNTAYLQM NSLKPEDTAVYYCYALLDRGIGGNYVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:178)	+	+
LCP0127	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSDYYMGWFRQAP GKERDFLARIGKSGIGKSYADSVRGRFTISRDNANTVYLQ MNNLKLEDTAVYYCAARDIAYDARLTAEDYDWGQGTQVTV SS (SEQ ID NO:179)	+	+
LCP0128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTTVMGWFRQAP GKEREVAAVHWGDESTVYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNYLKPEDTAVYYCAARPPTYVGTSSRAYDYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:180)	+	-
LCP0129	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASVASETIVSINDMAWYR QAPGKQRELVASITIHNNRDYADSAKGRFTISRDDTKNTVY LQMTHLKPDDTAVYYCTVLLSRALSGSYRFGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:181)	+	+
LCP0130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTGSETSGTIFNINVMGWYR QAPGKQRELVAIMDIGTTDYADSVKGRFTISRDNANTVY VQMNNLKSEDVAVYYCYCALDRAVAGRYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:182)	ND	ND
LCP0132	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGISLNDYNGWFRQAP GKDREIIVALSRRSHGIYQSDSVKYRFSISRDNKTNMVSQ MDSLRLPEDTAVYYCAADGDPYFTGRDMNPEYWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:183)	+	-
LCP0133	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAFSGGRFSDYGMWFRQGP GKEREVSRISGNGRGTQYTDVSGRFIISRDNKNTVYLQ MNDLKVEDTAIYYCARGSGPSSFNEGSVYDYWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:184)	+	+
LCP0134	EVQLVESGGGLVQSGGSLTLSCVLSGSIFSSNTMGWHRQAP GKQREWVAITTSGGTTKYADSVKGRFTISRDNANTVYLRM NNLKPEDTGVYFCYASLAGIWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:185)	+	+
LCP0135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPETEATYNVMGWYRRAP GKQRELVAITIDYNTNYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQM NNLRPDDTAVYYCRVDLSRQISGSYNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:186)	+	+
LCP0136	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAISGFAFTDVGMSWVRQAP GKGLEWVSSISSGSSITTYSDSVKGRFTISRDNANTLFLQ MNSLKPEDTAVYYCGRYCYCTGLGCHPRRDSALWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:187)	+	+
LCP0137	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCRASGFTYSTAAMGWVRQAP	+	+

[0142]

	GKGLEWVSSISSLSGSDRKSADSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCARFISNRWSRDVHAPSDFGSRGQGTQV TVSS (SEQ ID NO:188)		
LCP0138	EVQLVESGGGSPAGGSLRLSAAFGFTFDNYAIAWFRQAP GKEREGVSCSTNDGETYYADSVKGRFTISSDHAKNTVYLQ MDSLRPEDTAVYYCAAEGSWCHKYEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:189)	+	-
LCP0139	EVQLVESGGGLVQAGESLRLSAAAGRTSDLYVVGWFRQTP GKEREFVAGIAWTGDASYADSVKGRFTIARDNAENRIDLQ MTSLKPEDTAVYYCAADSRARFERQRYNDMNYWGQGTQVTV SS (SEQ ID NO:190)	+	-
LCP0141	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCIASVTIADINVMGWYRQAP GKQREFVASIPTTGDKNYAESAKGRFTISRDNQNTVAMQM NNLKPDDTAVYYCYVLLSRAVSGSYGHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:191)	+	+
LCP0142	EVQLVESGGGLVQVGGSLRLSAAAGSIVDIKVMGWYRQAP GNERELVALINDADDSEYSPSMRGRFTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAAYYCAADRDSWFKSPYIPGSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:192)	+	+
LCP0143	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSAAPEMGATINVMAWYRQAP GKQRELVARLPLDNNIDYGFAGKGRFTISRDIRNTVYLQM NNLKPDDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:193)	+	+
LCP0144	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSAAAGIDGDINVMAWYRQAP GKQRELVASITIGGNTNYADSVKGRFTIARDNAKNRMSLEM NSLKSEDVAVYYCNTLLSRVHDGQYVFWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:194)	+	+
LCP0145	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASEDAFKTDTLGWFRQAP GEEREFVAAFVWAGGPFYADSVKGRFTISMDEDRNTVYLQM NSLKPEDTGYYCAASLSRLRVGEITPRHMNYWGQGTQVTV SS (SEQ ID NO:195)	+	-
LCP0146	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSAAAGRAFSYAMAWFRQAP GKEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSKDNKNRMSLQ MNSLKPEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:196)	+	+
LCP0147	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSAAAGRTFSSSNMGWFRQAP GEEREFVTAIDWGGRTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MDSLKPEDTAVYYCAAQGSGLDWGYPWTYDYWGQGTQVTVS S (SEQ ID NO:197)	+	+
LCP0149	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGSVLNIDSMWYRQAP GKQRELVAEMLWGGTKNYGDSVKGRFTISGDADWGTELQMS SLKPEDTAVYYCNAVGRGFRDAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:198)	+	-
LCP0150	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSGFGILDMGWYRQAP GSRRELVGIVTRDGTNYGNSVKGRSIISEDITKNTVILQM NSLKPEDTAVYFCTAGLTNQPRAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:199)	+	+
LCP0151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGSVSSINVMGWYRQTP GKQRELVAAINRGGSTNVADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSLKPEDTAVYYCNAEPYGLDWRYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:200)	+	+
LCP0152	EVQLVESGGGLEQAGGSLRLSCTASGGTDSIYQMGWFRQTP GKEREFVAAINWNYGGAYYPDSVKGRFTISRDKAKNIGFLQ MNSLKPEDTAVYYCATSQTSVDAFSPITARRYQYWGGGT QVTVSS (SEQ ID NO:201)	+	-
LCP0153	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLCVASGRTFSNYRMGWFRQAP GKEREFVGTIYWTGRSYYGDSVKGRFIISGDNAKNTIHLQ MNSLKPEDTGYYCASGPEMSAFDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:202)	+	+
LCP0154	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTLDDYAIGWFRQAP	+	+

[0143]

	GKEREVSCISSSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNANTMYLQ MNSLKPEDTAVYYCATGTPLSSYYGSCLDYDMAYWGQGTQV TVSS (SEQ ID NO:203)		
LCP0155	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTFSTNYGMAWFRQAP EKEREFVARISSNGRRTEYADGVSGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCARAAGPSGFHEQSIYDDWGQGTQVTVSS S (SEQ ID NO:204)	+	+
LCP0295	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRSISTYVAGWFRQGP GKEREFVALISRGGGDIQYSDSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPADTAVYYCSLDASFGSRLVSRWDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:205)	+	+
LCP0296	EVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWRQAP GKEREFVASISWGMWTDYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLNAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGTQ VTVSS (SEQ ID NO:206)	+	+
LCP0297	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTSDDYAIWFRQAP GKEREVSCIGSGDGTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTGIYYCAADLYPPADYALDHTWYDYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:207)	+	+
LCP0298	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVSGSRFSLDTVGWHHQAP GKLRELVARIRDDGDTMYVASVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTGVYYCYFSRNGAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:208)	+	+
LCP0299	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGASGRISDINVMGWYRQAP GKQREMVADIDIRGYTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYRCNALTSRDWGTGKYVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:209)	+	+
LCP0300	EVQLVESGGDLVQVGGSLRLSCAFPGSMSSRNSVNWYRQPP GKQREWVATISVSGFTQYADSAKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTGVYYCNYMDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:210)	+	+
LCP0301	EVQLVESGGGVVRAGGSLKLCTAAGTDINIVTVGWHHRQAP GKHRELVAIVGSGSRTNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCYATSIGWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:211)	+	+
LCP0302	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSGILSAYAVGWF RQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWG QGTQVTVSS (SEQ ID NO:212)	+	+
LCP0303	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCTASGNVRSIFTMAWYRQAP GKQRELVASAAKGGDTYYADSAKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCKTDGRPFSEYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:213)	+	+
LCP0304	EVQLVESGGGLVQVGDMSRLSCAVFGNIFTRDPVMWFRQPP GKQREWVATITPSGFANYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTGVYFCNFGTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:214)	+	+
LCP0306	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASKGAFNINVMWYRQAP GKQRELVARVALGGTTDYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCNVLLDRGVRGSYAYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:215)	+	+
LCP0309	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITYSSYVIGWFRQAP GKEREFVASIRWAGGDSHYQESVKGRSTISKDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAGAAPVPGQSYEWSSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:216)	+	+
LCP0310	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSFYVGPMAWYRQAP GKERESVASITKGGITNYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTDVYVCNARVKLQEDRLFRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:217)	+	+
LCP0311	EVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCVSGASGNIDFVTVGWHHRQ	+	+

	APGKHREMVAVITGDGTRNYRDSVKGRFSISRDNANTYIL QMNSLKPEDTAVYYCYMSNPISSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:218)		
[0144]	LCP0312 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAVSGRTLSSFGMGWFRQAP EKPREFVAAITWGQGGTFYADSVKGRFTISRDIVKNTVYLQ MNDLKPDDTGLYFCVSAPHFHEAFPSRPPAYAYWGQGTQVT VSS (SEQ ID NO:219)	+	+
	LCP0313 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAASGRITYGSYVIGWFRQAP GKEREFVASIRWAGGDSHYGDPKGRSTISKDNANTVYLQ MNSLKPEDAAVYYCAGAAPVPGSSYEWTNWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:220)	+	+
	LCP0314 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAASGSISSVNTMGWYRQAP GKQRELVAFITSGDDTNYADSMKGRFTISRDNANTLYLQM NSLKPEDTAVYYCVATLGRSSSGTYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:221)	+	+
	LCP0316 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAASLRLTDNYGVGWFRQTP GREREFVSAVSWNGDRYYQDSVKGRFTISRREYAKNTVYLQ MDSLKPEDTAVYYCAVNMYGSTFPGLSVESHYDYWGQGTQV TVSS (SEQ ID NO:222)	+	+
	LCP0317 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAASGSIFSINAMAWYRQAP GKQRELVAIDITKNDITDYADSVKGRFTIARDNAKNTVDLQM NSLKPEDTAVYYCTAALSRHPYRSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:223)	+	+
	LCP0319 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAAAGRSLSDYYIIWFRQPP GKEYEFVSSIRWNTGSTTYGDSVKGRFTISRDNASTVYLQ MNSLKPEDTALYWCAAGLHLTPTSRTYNYRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:224)	+	+
	LCP0320 EVQLVESGGGLVQAGGSRLSCAAPETIFTINSMGWYRQAP GKQRELVAFINLDGNTNYADSAKGRFTISRDNANTVYLQM DNLKPDDTAVYYCNVLLSRAISGSYVHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:225)	+	+

[0145] 实施例3.抗C5 VHH结构域的克隆和表达

[0146] 将代表性的抗C5 VHH结构域亚克隆到哺乳动物表达载体中,并在Expi293F细胞中表达为VHH His标签融合体。当细胞活力降至50-60%时,收获培养物上清液。在还原条件下通过SDS PAGE分析上清液,然后进行考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue)染色。使用Octet (ForteBio Inc.) 仪器上的生物层干涉术计算表达水平。通过固定化金属亲和色谱(IMAC)在AKTA(GE Healthcare)上从培养物上清液中纯化His标记的VHH结构域。

[0147] 实施例4.抗C5 VHH结构域的结合和功能分析

[0148] 与补体成分C5的结合的分析。在Octet (ForteBio Inc.) 仪器上使用生物层干涉术对代表性的抗C5 VHH结构域进行测序,表征和评估与人、食蟹猴(cyno)和小鼠C5蛋白的结合。将来自表达的VHH His结构域的细胞培养上清液在2x动力学缓冲液中标准化至20μg/mL的浓度,并在抗penta HIS (HIS1K) 生物传感器吸头(ForteBio Inc.)上加载300秒,以使传感器针尖完全饱和。然后在单独的实验中,将饱和的针尖暴露在2x动力学缓冲液中分别含有50nM可溶性C5(人、食蟹猴或小鼠)的溶液中600秒,然后解离到2x动力学缓冲液中600秒。显示与人(hC5)或食蟹猴C5(cC5)结合的VHH结构域在表1中标有'+'。

[0149] C5拮抗作用的红细胞溶解测定。红细胞溶解测定法测定暴露于补体经典途径(CCP)活化血清后致敏的鸡红细胞溶解而释放的血红蛋白。His标记的VHH结构域在Expi293细胞中表达。初步测定用于选择功能性抗C5 VHH结构域,该结构域已通过IMAC纯化。分析了十个纯化的VHH结构域在不同浓度下抑制CCP介导的致敏鸡红细胞溶解的能力。

[0150] 无抗体和20mM EDTA分别作为用于测定的完全溶解对照和未溶解对照。将十个VHH结构域和不同浓度(32μg/mL至0.5μg/mL)的对照抗C5 IgG(表示h5G1.1、BNJ441和Ec-CHO)

与20%正常人血清(NHS)在0.1mL明胶维拉纳缓冲盐水(GVB++,cat#B100,Comptech)中于室温下预孵育30分钟。用1mL GVB++洗涤400μL鸡红细胞(Lampire Biologicals,cat#7201403)四次,并通过将 5×10^7 细胞/mL与1:500(v/v)稀释的兔抗鸡IgG(cat#203-4139,罗克兰(Rockland))孵育来制备致敏的cRBC,并在4℃下孵育15分钟。将细胞用GVB++洗涤两次,并重悬于3.6mL GVB++的最终体积。将30μL致敏的cRBCs(2.5×10^6 细胞)添加到预孵育的人血清和抗体中,并在37℃孵育30分钟。通过在4℃下以 $1700 \times g$ 离心3分钟沉淀细胞,并将上清液(85μL)转移至新的平底96孔板中。在415nm处测量吸光度。计算每个VHH结构域和对照抗体的溶解百分比如下:

$$[0151] \quad ((A_{415\text{样品}} - A_{415\text{未溶解}}) / (A_{415\text{完全溶解}} - A_{415\text{未溶解}})) \times 100$$

[0152] 其中 $A_{415\text{样品}}$ 是样品抗体在415nm处的吸光度, $A_{415\text{未溶解}}$ 是未溶解对照(20mM EDTA)在415nm的吸光度,而 $A_{415\text{完全溶解}}$ 是完全溶解对照在415nm的吸光度。结果示于图1。

[0153] 抑制C5a释放的VHH结构域的识别。使用基于介观规模发现(MSD)的免疫测定法测量人C5蛋白质的裂解程度(例如,以CAP激活剂酵母聚糖沉积的补体替代途径C5转化酶释放C5a)。如前一节所述表达和纯化抗C5 VHH结构域,并通过测量释放的hC5a的量分析其阻断人C5蛋白质裂解的能力。在先导实验中确定了样品VHH结构域的最佳浓度。将样品VHH结构域和对照抗体(h5G1.1,N19/8,BNJ441和Ec-CHO)添加到含有1%明胶和2.5mM NiCl的GVB++缓冲液中的人C5蛋白(终浓度25nM)(CompTech Inc.)中,在37℃下放置30分钟,并保存在4℃下直至进一步使用。在BupH磷酸盐缓冲盐水(ThermoFisher)中以2μg/mL的抗C5a抗体涂层的MSD高结合力的96孔板,并孵育1小时。然后将酵母聚糖按等比例添加到NHS中以激活补体替代途径。然后将这种酵母聚糖NHS混合物加到预孵育的VHH hC5溶液中,并在37℃孵育。通过加入futhan-乙二胺四乙酸EDTA在不同的时间点(0、30、60和90分钟)终止反应。将该板以3600rpm离心2分钟,并将上清液转移至新的聚丙烯板上。在室温下添加阻滞剂A1小时,以阻止与涂层MSD板的非特异性结合。洗涤MSD板,并添加来自上方样品的上清液。将该板在室温下孵育15分钟。制备1μg/mL的检测抗体生物素Ab2942(Abcam)和0.5μg/mL的链霉亲和素偶联的磺基标签的混合物,然后添加到每个孔中,并在室温下孵育30分钟。将MSD 2x读缓冲液添加到每个孔中,并测量化学发光信号。使用MSD工作台软件分析原始数据。该实验的结果示于图2。

[0154] LCP0115、LCP0146、LCP0295、LCP0296、LCP0297和LCP0302抑制了C5a的释放,并用于进一步表征。

[0155] 实施例5.通过BIAcore对抗C5 VHH结构域的亲和力分析

[0156] 根据与食蟹猴C5的交叉反应性对抗C5 VHH结构域进行优先排序,并通过Biacore对8个纯化的抗C5 VHH结构域进行亲和力分析。表2显示了最初的8个候选物与人和食蟹猴C5结合的动力学参数。在8个亲和力分析的候选物中,选择了5个抗C5结构域(LCP0115, LCP0143, LCP0146, LCP0296和LCP0302)并确定了用于人源化的优先排序和基于与人和食蟹猴C5匹配的亲和力进行进一步分析。

[0157] 表2.VHH结构域的biacore表征结果。

[0158]

样品	C5	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
LCP0095	hC5	2.86e5	7.14e-4	2.50e-9	6.94
	cC5	4.56e5	1.68e-3	3.69e-9	12.9
LCP0115	hC5	1.13e5	3.48e-5	3.09e-10	0.08
	cC5	9.53e4	1.02e-5	1.07e-10	0.10
LCP0123	hC5	1.08e5	2.16e-4	1.99e-9	0.13

[0159]

样品	C5	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
	cC5	1e5	3.81e-4	3.8e-9	0.14
LCP0136	hC5	4.86e5	8.82e-4	1.81e-9	2.47
	cC5	7.89e5	2.51e-4	3.18e-10	1.01
LCP0143	hC5	6.91e5	5.66e-5	8.2e-11	0.90
	cC5	7.41e5	1.24e-4	1.67e-10	0.81
LCP0146	hC5	2.24e6	9.75e-5	4.35e-11	0.42
	cC5	2.64e6	2.44e-4	9.22e-11	0.47
LCP0296	hC5	9.34e4	3.9e-5	4.17e-10	0.06
	cC5	6.84e4	1.06e-4	1.55e-9	0.03
LCP0302	hC5	1.14e5	2.22e-5	1.95e-10	0.03
	cC5	1.03e5	2.38e-5	2.32e-10	0.03

[0160] 实施例6. 抗C5 VHH结构域的人源化

[0161] 通过将CDR嫁接到具有与美洲驼序列相似的序列的人种系上, 将五个优先化的抗C5 VHH结构域 (LCP0115, LCP0143, LCP0146, LCP0296和LCP0302) 人源化。CDR基于IMGT和Kabat定义中较高的氨基酸覆盖率。对美洲驼FR2标志残基进行了回复突变, 以维持VHH结构域的稳定性。人源化变体在Expi293细胞中表达, 并使用生物层干涉术测试与人C5的结合。

[0162] 在一些变体的选定框架中引入了对亲本美洲驼残基的进一步的回复突变, 以改善它们对人C5的亲合力。构建体在HEK293F细胞中表达, 并通过生物层干涉术评估结合。在某些变体中进行了其他突变以进一步优化其亲合力, 将N末端人源化为EVQLV (SEQ ID NO: 147; 必要时), 将C末端人源化为WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 148; 必要时)。所得的优先化抗C5 VHH候选物列于下表3。来自这些候选物的CDR在表4中显示。

[0163] 表3: 人源化抗C5 VHH结构域候选物

[0164]

VHH 抗 C5 候选物名称	候选物序列	SEQ ID NO:
LCP0177	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGQGLEAVATITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNskN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYg YWGQGTlLVTVSS	226
LCP0178	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEMGATINMAWFRQA PGQGLEAVARLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNskNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTlLVTVSS	227
LCP0179	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSdyAMAWFRQA PGQGLEAVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNskNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	228
LCP0180	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGQGREFVATITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNskN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYg YWGQGTlLVTVSS	229
LCP0181	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPMGATINMAWYRQA PGQQRELVARLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNskNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTlLVTVSS	230
LCP0182	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSdyAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNskNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	231
LCP0183	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGREFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNakN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYg YWGQGTlLVTVSS	232
LCP0184	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNakN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYg YWGQGTlLVTVSS	233
LCP0185	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASEMGATINMAWYRQA PGKQRELVSRLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNakNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTlLVTVSS	234
LCP0186	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASEMGATINMAWYRQA PGKGLELVSRLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNakNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTlLVTVSS	235
LCP0187	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGRAFSdyAMAWFRQA PGKREFVSGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNakNSLY LQMNSLRAEDTALYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	236
LCP0188	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGRAFSdyAMAWFRQA PGKGLEFVSGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNakNSLY LQMNSLRAEDTALYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	237

[0165]

LCP0195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	1
LCP0197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	2
LCP0199	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTMY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	3
LCP0203	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQA PGQGLEFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	4
LCP0207	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNKAKD SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGY WGQGT LTVSS	5
LCP0208	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNKAKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGY WGQGT LTVSS	6
LCP0209	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNKAKN SVY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGY WGQGT LTVSS	7
LCP0212	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGQGLEFVATITSGGSAIYTDsvKGRFTISRDNKSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGY WGQGT LTVSS	8
CRL0303	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	9
CRL0304	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	10
CRL0305	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	11
CRL0307	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHHSYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVSS	12
CRL0726	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFRQA PGQGLEAVASISWGGMWTDYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTLTVSS	238

[0166]

CRL0727	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGQGLEAVATITSGGSTLSADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEY G HWGQGTLVTVSS	239
CRL0728	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFRQA PGQEREFVASISWGGMWDYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTLVTVSS	240
CRL0729	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGQEREFVATITSGGSTLSADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEY G HWGQGTLVTVSS	241
CRL0730	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFRQA PGKREFVSSISWGGMWDYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTLVTVSS	242
CRL0731	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFRQA PGKGLEFVSSISWGGMWDYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTLVTVSS	243
CRL0732	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGKREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEY G HWGQGTLVTVSS	244
CRL0733	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEY G HWGQGTLVTVSS	245
CRL0960	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRAFS DYAMAWVRQA PGQGLEWMGGIGWSGGDTLYADSVRGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARQGQYIYSSMRSDSYD YWGQGTLVTVSS	246
CRL0961	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRAFS DYAMAWFRQA PGQEREFMGGIGWSGGDTLYADSVRGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARQGQYIYSSMRSDSYD YWGQGTLVTVSS	247
CRL0962	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRAFS DYAMAWFRQA PGQGLEFMGGIGWSGGDTLYADSVRGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARQGQYIYSSMRSDSYD YWGQGTLVTVSS	248
CRL0963	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASVGTISDYGMGWVRQA PGQGLEWMGSIWGGMWDYADSVKGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGRGRMYRGIGNSLAQ PKSYGYWGQGTLVTVSS	249
CRL0964	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASVGTISDYGMGWFRQA PGQEREFMGSISWGGMWDYADSVKGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGRGRMYRGIGNSLAQ PKSYGYWGQGTLVTVSS	250
CRL0965	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASVGTISDYGMGWFRQA PGQGLEFMGSISWGGMWDYADSVKGYTENFKDRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGRGRMYRGIGNSLAQ PKSYGYWGQGTLVTVSS	251

[0167]

CRL0966	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRTFSGILSAYAVGW VRQAPGQGLEWMGTITSGGSTLSADSVKGYTENFKDRVMT TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARAVRTWPGYSGNRG EVPTENEYGHWGQGT LVTVSS	252
CRL0967	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGQEREFGMTITSGGSTLSADSVKGYTENFKDRVMT TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARAVRTWPGYSGNRG EVPTENEYGHWGQGT LVTVSS	253
CRL0968	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGQGLEFMGTITSGGSTLSADSVKGYTENFKDRVMT TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARAVRTWPGYSGNRG EVPTENEYGHWGQGT LVTVSS	254
CRL0972	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSFAASGRAFSYAMAWFRQA PGKEREFVSGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTALYHCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	255
CRL0973	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQA PGKEREFVSGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	256
CRL0974	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSFAASGRAFSYAMAWFRQA PGKEREFVSGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTALYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	257
CRL0975	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASVGTISDYGMGWFRQA PGKEREFVSSISWGGMWDYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTQVTVSS	258
CRL0976	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASVGTISDYGMGWFRQA PGKEREFVSSISWGGMWDYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQTNLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GT LVTVSS	259
CRL0977	EVQLVESGGGVVVRPGSLRLSFAASVGTISDYGMGWFRQA PGKEREFVASISWGGMWDYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQ GTQVTVSS	260
CRL0978	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNT SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPGYSGNRGEVPTENEY HWGQGTQVTVSS	261
CRL0979	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNT TLYVQMSSLRAEDTAVYYCAVRTWPGYSGNRGEVPTENEY HWGQGTQVTVSS	262
CRL0980	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGW FRQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNT SLYLQMNSLRTEDTALYCAVRTWPGYSGNRGEVPTENEY HWGQGTQVTVSS	263

[0168] 表4:人源化抗C5 VHH结构域候选物的CDR

[0169]

VHH 结构域	CDR1 序列 [SEQ ID NO:]	CDR2 序列 [SEQ ID NO:]	CDR3 序列 [SEQ ID NO:]
---------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

[0170]

LCP0146 LCP0179 LCP0182 LCP0187 LCP0188 LCP0195 LCP0197 LCP0199 LCP0203 CRL0960 CRL0961 CRL0962 CRL0972 CRL0973 CRL0974	GRAFSDYAMA [13]	GIGWSGGDTLYADSV RG [18]	AARQGQYIYSSMRSDSYD Y [20]
LCP0115 LCP0177 LCP0180 LCP0183 LCP0184 LCP0207 LCP0208 LCP0209 LCP0212	GRTFSGILSPYA VG [14]	TITSGGSAIYTDSVK G [19]	AVRTRRYGSNLGEVPQEN EYGY [21]
LCP0143 LCP0178 LCP0181 LCP0185 LCP0186	EMGATINVMA [327]	RLPLDNNIDYGDFAK G [325]	NVLLSRQINGAYVH [326]
CRL0303	GRHFSDYAMA [15]	GIGWSGGDTLYADSV RG [18]	AARQGQYIYSSMRSDSYD Y [20]
CRL0304 CRL0305	GRAHSDYAMA [16]	GIGWSGGDTLYADSV RG [18]	AARQGQYIYSSMRSDSYD Y [20]
CRL0307	GRHSDYAMA [17]	GIGWSGGDTLYADSV RG [18]	AARQGQYIYSSMRSDSYD Y [20]
LCP0296 CRL0726 CRL0728 CRL0730 CRL0731 CRL0963 CRL0964 CRL0965 CRL0975 CRL0976 CRL0977	VGTISDYGMG [264]	SISWGGMWTDYADSV KG [266]	GRGRMYRGIGNSLAQPKS YGY [268]
LCP0302 CRL0727 CRL0729 CRL0732 CRL0733 CRL0966 CRL0967 CRL0968 CRL0978 CRL0979 CRL0980	GRTFSGILSAYA VG [265]	TITSGGSTLSADSVK G [267]	AVRTWPYGSNRGEVPTEN EYGH [269]

[0171] 通过人源化评估将亲本美洲驼残基的回复突变引入选定框架中,以提高所选变体的亲和力。表5显示了回复突变的变体的序列。构建体在HEK293F细胞中表达,并通过生物层

干涉术评估结合。

[0172] 表5.具有回复突变的抗C5 VHH人源化变体

[0173]

变体名称	回复突变的变体序列	SEQ ID NO
LCP0115 变体		
LCP0204	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	270
LCP0205	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGREFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	232
LCP0206	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTLSRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGY WGQGTLLTVSS	271
LCP0207	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNK DS LY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	5
LCP0208	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNK NT LY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	6
LCP0209	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSVY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	7
LCP0210	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY LQMNSL KA EDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	272
LCP0211	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY LQMNSL RP EDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	273
LCP0212	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWF RQAPGQGLEF VAT ITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDN SKNT LY LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYW GQGTLLTVSS	8
LCP0146 变体		

[0174]

LCP0193	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	274
LCP0194	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGKREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	275
LCP0195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQ GTLVTVSS	1
LCP0196	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISKDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	276
LCP0197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN AKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQ GTLVTVSS	2
LCP0198	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNRLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	277
LCP0199	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTM YLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQ GTLVTVSS	3
LCP0200	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLS LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	278
LCP0201	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLKAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	279
LCP0202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRPEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	280
LCP0203	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQ APGQGLEFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQG TLVTVSS	4

[0175] 实施例7. 结合人血清白蛋白的VHH结构域的分离

[0176] 白蛋白是血清中的丰富蛋白质,并具有足够的分子量,可避免通过肾小球滤过屏障过滤而被去除。FcRn与低pH下发生的白蛋白相互作用会抑制通过细胞内降解从血清中去除白蛋白。这种相互作用导致白蛋白FcRn复合物转运回质膜,当暴露于更中性pH的血液时,白蛋白释放回血液。

[0177] 生成抗HSA VHH的过程概述

[0178] 从针对抗C5 VHH结构域和抗HSA VHH结构域的免疫美洲驼的B细胞产生了免疫偏倚的VHH抗HSA噬菌体展示文库。获得对HSA的大于1,000,000的终点滴度后,收获PBMC,分离RNA,并通过遗传分离VHH区。如实施例2-4中针对抗C5VHH结构域的详细描述,将这些抗HSA VHH序列克隆到pIII融合噬菌粒中,产生 6×10^8 个独立克隆的文库。使用标准的噬菌体展示

淘选技术(Standard phage display panning technique)来选择对HSA和CSA(食蟹猴血清白蛋白)有反应性的VHH结构域。通过ELISA和Sanger测序分析了三轮淘选的输出。并行地,下一代测序(NGS)用于检查原始文库中的序列种群,或通过淘选富集的序列。使用这些方法分离并分析了总共约1000个克隆。

[0179] 美洲驼免疫和VHH噬菌体文库的构建。美洲驼被HSA免疫。初次增强免疫包括500 μ g抗原与完整的弗氏(Freunds)佐剂混合。在2周、4周、8周和12周时,在不完全的弗氏佐剂中进行500 μ g抗原的增强免疫。每次增强免疫后约2周,用测试血液监测血清滴度。通过ELISA分析测试血液,以确定免疫反应的滴度。在1:100,000稀释度下,检测到抗HSA血清滴度比预取血液量高出20倍的信号,因此处理了500mL的产血量,获得了约 7×10^8 个PBMC,用于RNA分离和文库生产。用苯酚/氯仿(phenol/chloroform)萃取,然后用硅胶旋转柱纯化来自PBMC的总RNA,并用无RNase的水洗脱总RNA。通过确定OD_{260/280}比例和琼脂糖凝胶电泳来评估RNA的质量。使用美洲驼重链特异性反向引物合成cDNA。VHH(仅重链)片段通过凝胶电泳与VH(常规重链)片段分离。

[0180] 用SfiI位点修饰VHH片段,并将其克隆到pADL-10b中,并将DNA文库转化入TG1细胞。该文库共获得 6×10^8 个独立克隆。收获所有克隆,并在-80℃下储存在25%甘油中直至使用。通过分析105个克隆中是否存在具有正确阅读框的插入片段、独特性和引物序列,来验证文库质量。

[0181] 噬菌体展示淘选和筛选。在包含2%葡萄糖和100 μ g/mL羧苄青霉素的2x YT培养基中培养包含 3.75×10^{10} 细胞的抗HSA VHH文库甘油库存的等分试样。使细胞在约250rpm摇动下在37℃下生长直至获得约0.6的OD₆₀₀。以20的感染复数(MOI)加入辅助噬菌体,将培养物在不摇动的情况下孵育30分钟,然后在37℃摇动的情况下孵育30分钟。收获细胞并将其重悬于补充有25 μ g/mL羧苄青霉素、50 μ g/mL卡那霉素和200 μ M IPTG的2xYT培养基中。将培养物在30℃和250rpm下摇动过夜。通过离心澄清培养基,通过加入1/4体积的10%PEG 8000/2.5M NaCl沉淀噬菌体,并在冰上孵育30分钟。通过在SLA3000转子中在4℃下以7500rpm离心15分钟来使噬菌体沉淀。将沉淀重悬于超级块(Superblock)(Thermo Scientific, 37515)中。

[0182] 在室温下,用M280链霉亲和素小珠(Life Technologies, 11205D)对噬菌体的等分试样进行30分钟的去选择,并用磁铁将所述小珠去除,然后将含有噬菌体的上清液转移至新的Eppendorf管中。在噬菌体中补充10 μ g生物素化的HSA,在室温下旋转孵育30分钟,然后补充M280链霉亲和素小珠以固定生物素化的HSA。将小珠用PBS/0.05%Tween洗涤缓冲液洗涤11次,用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱,然后用pH 9.0的1M Tris中和洗脱缓冲液。将洗脱的噬菌体营救到对数噬菌体TG1细胞中,并在250cm $\times$ 250cm LB羧苄青霉素,2%葡萄糖托盘上恢复生长产物。通过连续稀释噬菌体拯救液的等分试样来确定滴度。基本上如上所述进行第二轮淘选,使用等分试样的第一轮生长产物和5 μ g生物素化的HSA进行选择。

[0183] 为了筛选具有HSA反应性的克隆,将单个克隆挑入96孔板中,在250 μ L 2x YT体积中添加100 μ g/mL羧苄青霉素和2%葡萄糖在37℃下培养过夜。通过将5 μ L密集过夜培养物转移到250 μ L新鲜培养基中,将每个孔进行传代培养。提交等分试样以进行滚环扩增序列分析以确定编码的插入物。细胞生长至OD₆₀₀约为0.6,然后以20的感染复数(MOI)补充M13辅助噬菌体一小时。离心收集细胞,每孔替换250 μ L的培养基,该培养基为补充100 μ g/mL羧苄青

霉素和50 μ g/mL卡那霉素的2x YT培养基。然后将板在30℃下以250rpm摇动孵育过夜。通过离心澄清培养基以制备用于ELISA测定的噬菌体上清液。

[0184] 为了进行ELISA分析,将链霉亲和素涂层的,预封闭的96孔板(Pierce,15500)与具有2 μ g/mL生物素在室温下摇动孵育30分钟。洗涤板,然后在室温下重复封闭1小时。再次洗涤板并在室温下补充50 μ L澄清的上清液30分钟。将板洗涤3次,然后与抗M13 HRP抗体(GE Healthcare,Cat#27-9421-01)在封闭缓冲液中于室温孵育30分钟。将板洗涤四次,然后补充1-step Ultra TMB ELISA试剂(Thermo Scientific,Cat#34029),显色,并用2M硫酸终止溶液终止反应。使用BioRadiMark读板仪测定OD₄₅₀读数。

[0185] NGS用于检查原始文库中的序列种群,或通过淘选富集的序列。对于NGS,从初始文库的生长产物中分离噬菌粒DNA,进行第1轮淘选和第2轮淘选。通过限制性消化从噬菌粒释放VHH盒(cassette),通过琼脂糖凝胶电泳分离VHH编码条带,并使用DNA亲和柱纯化DNA。该DNA已提交用于MiSeq 2 $\times$ 300平台的文库生产和分析。

[0186] 实施例8.结合HSA的VHH结构域的表达和纯化

[0187] 使用以上方法选择的VHH序列与N末端信号肽和C末端6 $\times$ His标签(SEQ ID NO:324)合成,并克隆到哺乳动物表达构建体中。通过合成GeneBlocks(Integrated DNA Technologies)并注入克隆到标准哺乳动物表达载体中,制备了已公开的MSA21 VHH结构域(国际公开号W0 2004/062551 A2)和单个克隆的遗传修饰形式(去糖基化或人源化)。将这些构建体转染到293expi细胞中,并在转染后96小时收获上清液。上清液用PBS和VHH His蛋白透析,该VHH His蛋白采用标准色谱方法纯化。将纯化的蛋白质缓冲液交换到PBS中,并使用OD和消光系数进行定量。

[0188] 实施例9.与可溶性HSA、CSA和小鼠血清白蛋白结合的固定化VHH结构域的特征

[0189] 针对112个VHH序列创建了哺乳动物表达载体,并在293expi表达系统中产生了蛋白质。首先通过SDS PAGE和考马斯染色分析VHH序列,以相对于已知标准确定近似浓度。然后将上清液浓度标准化,并在Octet HTX(Pall/ForteBio)上进行生物层干涉术。Penta His传感器暴露在动力学缓冲液中60秒钟以建立基线测量。然后,在120秒内在动力学缓冲液中建立第二个基线之前,将含有VHH His的上清液装载到传感器300秒。然后将针尖与100nM HSA或CSA在动力学缓冲液中孵育600秒,并在另外600秒内测量解离。

[0190] 在分析的112个VHH结构域中,有12个结构域显示出与生物素化HSA结合,并且三个克隆(HAS040、HAS041和HAS042)与生物素化CSA和生物素化HSA相互作用。表6显示了这12个抗HSA VHH结构域的序列,包括其一个或多个个人源化版本,而这些抗HSA VHH结构域的CDR在表7中显示。

[0191] 表6.抗白蛋白VHH结构域的序列

[0192]

VHH 结构域	序列	SEQ ID NO:
HAS020	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFG SDAAGWFRQASGKEREFVASISWSGGYTTY ADSVKGRFTISSDNVKNVTYVLQMNSLTPED TAVYFCATGNRYSYRISLVTPSQYEYWGQ GTLVTVS	22
HAS038	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGHSFS TYTVGWFRQAPGEERKFVASISWSGEVTLY GDSVKGRFTISRDNRRKTVYLMHSLKPED SAIYYCAAKRGGRPDTSSDDYFYWGQGTQV TVSS	23
HAS040	QVQLNESGGGMVQAGGSLRLSCAASGRTVS NYAAGWFRQAPGKEREFVAAINWNKTTTYA DSVKGRFTISRREYAKNTVALQMNSLKPEDT AVYYCAAVFRIVAPKTQYEYDYWGQGTQVT VSS	24
HAS041	QVQLIESGGGLVQAGGSLGLSCAASGRPVS NYAAAWFRQAPGKEREFVAAINWNKTATYA DSVKGRFTISRDNASTVALQMNSLKPEDT AVYYCAAVFRVAPKTQYDYDYWGQGTQVT VSS	25
HAS042	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVS NYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAVFRVAPKTQYDYDYWGQGTQVT VSS	26
HAS044	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SYAIGWFRQAPGKAREFVARVSTIAGDTDY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAADSYNVRLVTGEADYWGEQTQVT VSS	27
HAS077	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS SYAIGWFRQAPGKAREFVARVSTIAGDTDY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAADSYNVRLGTGEADYWGEQTQVT VSS	28

[0193]

HAS079	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGFTFS NYAIGWFRQAPGKAREFVARVSTIAGD TDY ANAVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPDD TAVYYCAAESYNVRLVTGEADYWGEGTQVT VSS	29
HAS080	QVRLAESGGGRVQAGESLRLSCVASGR TFS NDAAGWFREASGKERE FVASISWSGNYTYY ADSVKGRFTISEDNVKNTVYLQMTSLKPED TAVYYCAAGNRYSDYRISLVTPRLYEYWGQ GTQVTVS	30
HAS081	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFS SDAAGWFRQASGKERE FVA AISWSGNYTYS ADSVKGRFTISSDNVKNTVYLQMNSLKPED TAVYLC AAGNRYSDYRISLVTPSQYEYWGQ GTQVTVS	31
HAS091	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFG SDAAGWFRQASGKERE FVASISWSGGYTYY ADSGTGRFTISSDNVKNTVYLQMNSLTPED TAVYFCATGNRDSYRISLVTPSQYEYWGQ GTQVTVS	32
HAS093	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFG SDAAGWFRQASGKERE FVASISWSGGYTYY ADSGKGRFTISSDNVKNTVYLQMNSLTPED TAVYFCATGNRYSDYRISLVTPSQYDYWGQ GTQVTVS	33
HAS096	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFG SDAAGWFRQASGKERE FVASISWSGGYTYY ADSVKGRFTSSSDNVKNTVYLQMNSLTPED TAVYFCATVNRYSDYRISLVTPSQYEYWGQ GTQVTVS	34

[0194] 表7. 抗白蛋白VHH结构域的CDR序列。

[0195]

VHH 结 构域	CDR1 序列 [SEQ ID NO:]	CDR2 序列 [SEQ ID NO:]	CDR3 序列 [SEQ ID NO:]
HAS020	GRTFGSDA [35]	ISWSGGYT [44]	ATGNRYSDYRISLVTPSQYEY [52]
HAS038	GHSFSTYT [36]	ISWSGEVT [45]	AAKRGGRP TDSSDDYFY [53]
HAS040	GRTVSNYA [37]	INWNKTTT [46]	AAVFRIVAPKTQYEYDY [54]
HAS041	GRPVSNYA [38]	INWNKTAT [47]	AAVFRVVAPKTQYDYDY [55]
HAS042	GRPVSNYA [38]	INWQKTAT [48]	AAVFRVVAPKTQYDYDY [55]
HAS044	GRTFSSYA [39]	VSTIAGDT [49]	AADSYNVRLVTGEADY [56]
HAS077	GRTFSSYA [39]	VSTIAGDT [49]	AADSYNVRLGTGEADY [57]
HAS079	GFTFSNYA [40]	VSTIAGDT [49]	AAESYNVRLVTGEADY [58]

[0196]	HAS080	GRTFSNDA [41]	ISWSGNYT [50]	AAGNRYSDYRISLVTPRLYEY [59]
	HAS081	GRTFSNDA [42]	ISWSGNYT [50]	AAGNRYSDYRISLVTPSQYEY [60]
	HAS091	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATGNRDSYRISLVTPSQYEY [61]
	HAS093	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATGNRYSDYRISLVTPSQYDY [62]
	HAS096	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATVNRYSYRISLVTPSQYEY [63]

[0197] 实施例10.BIACORE表征白蛋白结合动力学

[0198] 使用Biacore 3000仪器上的SPR测定了VHH结构域HAS040和HAS041与HSA或CSA的结合动力学。将生物素化的白蛋白捕获到用含脱氧核糖寡核苷酸的生物素CAPture试剂饱和的CAP芯片上(购自GE Healthcare)。将纯化的VHH结构域浓度以50 μ L/min的流速注入5分钟。每个VHH结构域评估了三个浓度。使结合的分析物解离600秒。每个浓度后,通过以10 μ L/min的速度注入6M盐酸胍/0.25M NaOH 2分钟,使芯片表面再生。使用1:1 Langmuir模型(局部Rmax和恒定RI)并进行双参比减法(从样品浓度循环中减去缓冲液浓度循环并减去平行参考流细胞)在HBS EP缓冲液中在pH 7.4和pH 6.0下测定动力学。MSA21 VHH结构域(国际公开号W02004/062551A2)(序列:

[0199] LEQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLG DSTLYADSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:322)

[0200] 被制备并在这些测定中用作比较物。

[0201] 该测定的结果显示在表8中。在0.3-5nM范围内观察到结合亲和力,表明HAS040和HAS041结构域在pH 6和pH 7.4下均具有足够的亲和力以促进半衰期延长。此外,这些VHH结构域显示出以非常相似的亲和力与CSA和HSA结合,从而增强了在灵长类动物中进行的半衰期延长研究的预测性质。

[0202] 表8. 抗白蛋白VHH结构域的Biacore表征结果。

[0203]

样品	白蛋白/pH	K _a	K _d	K _D	Chi ²
		(1/MS)	(1/s)	(M)	
HAS40	CSA/pH6.0	3.68E+05	2.81E-04	7.64E-10	0.05
	CSA/pH7.4	1.04E+06	5.62E-04	5.39E-10	0.1
	HSA/pH6.0	4.45E+05	2.08E-04	4.66E-10	0.09
	HSA/pH7.4	1.29E+06	4.40E-04	3.41E-10	0.03
HAS41	CSA/pH6.0	3.12E+05	7.39E-04	2.37E-09	0.41
	CSA/pH7.4	1.07E+06	1.23E-03	1.15E-09	0.18
	HSA/pH6.0	3.73E+05	3.87E-04	1.04E-09	0.12
	HSA/pH7.4	1.23E+06	5.66E-04	4.61E-10	0.03
MSA21	CSA/pH6.0	2.80E+05	1.53E-03	5.47E-09	0.05
	CSA/pH7.4	5.61E+05	2.16E-03	3.85E-09	0.05
	HSA/pH6.0	3.30E+05	1.81E-03	5.46E-09	0.06
	HSA/pH7.4	1.13E+06	3.93E-03	3.49E-09	0.07

[0204] 实施例11. 通过VHH和FcRn的非竞争性白蛋白结合的证明

[0205] 从内吞小泡中回收白蛋白是通过与FcRn相互作用介导的。因此,重要的是确定VHH是否会干扰HSA和FcRn的相互作用。为了确定HAS040和HAS041 VHH结构域是否与FcRn结合相同的表位,在HBS EP缓冲液中在pH 6.0于Biacore 3000仪器上分析了FcRn与已经被抗HSA VHH结构域饱和的HSA的结合。使用胺偶联将HSA直接固定在CM5芯片上,以达到250RU (共振单位)的目标密度。将VHH结构域稀释至大约1-10 μ g/mL,并注入以达到饱和(50 μ L/min的速度,3分钟)。将一浓度的FcRn注入HSA:VHH表面,以50 μ L/min的速度获得5分钟的动力学。再生前允许解离180秒。通过以100 μ L/min的速度注入20 μ L的25mM NaOH来再生芯片表面。使用1:1Langmuir模型(局部R_{max}和恒定RI)和双参比减法(从样品浓度循环中减去缓冲液浓度循环并减去平行参考流细胞)确定动力学。

[0206] 结果如图7所示。在图7A中,FcRn与HSA饱和表面的直接相互作用导致30RU的响应差异。当将400nM FcRn注射到表面饱和的HSA与MSA21 (ADL021) (图7B),HAS040 (图7C)或HAS041 (图7D)的复合物上时,获得了相似的RU。基于这些数据,HAS040和HAS041不会干扰FcRn的结合,并有望通过白蛋白与FcRn的相互作用从内体中回收。

[0207] 实施例12. 抗C5和抗白蛋白双特异性融合蛋白的产生

[0208] 将抗C5 VHH结构域与抗白蛋白结构域融合以产生双特异性分子。评估了四种不同的接头长度(G₄S)₃ (SEQ ID NO:106), (G₄S)₄ (SEQ ID NO:107), (G₄S)₅ (SEQ ID NO:108)和(G₄S)₆ (SEQ ID NO:109),并抗白蛋白结构域的两个不同方向(N末端或C末端)。构建体在HEK293F细胞中表达,并使用蛋白A亲和色谱法纯化。在Biacore实验中评估了纯化的融合分子。将人C5生物素化并固定在biacore芯片上,注入纯化的双特异性分子使芯片饱和,然后注入三种不同浓度的人血清白蛋白以获得动力学。测得的对人血清白蛋白的亲合力被用作比较不同接头长度的代理。选择(G₄S)₃ (SEQ ID NO:106)作为产生双特异性融合体的最佳接头长度。在同一实验中还评估了N末端或C末端抗白蛋白融合物。发现不同的方向对于不同的抗C5 VHH结构域是最佳的。在表9中的构建体名称下方指定了构建体的N-对C末端取向,

其中 (C5/HSA) 表示抗C5结构域位于抗HSA结构域的N末端。同样, (HSA/C5) 表示抗HSA结构域位于抗C5结构域的N末端。

[0209] 选择最佳接头长度后,产生了一系列不同的双特异性融合分子,其入源化抗C5 VHH结构域与两个不同的抗白蛋白结构域融合(表8中所示)。这些构建体在Expi293细胞中表达,并使用蛋白A色谱法纯化。在红细胞溶解测定中测试了纯化的双特异性融合蛋白,结果显示在图3A和3B中。

[0210] 表9:抗C5/抗白蛋白融合蛋白

[0211]

名称	序列	SEQ ID NO:
CRL0400 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFS DYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN AKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	64
CRL0401 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN AKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	65
CRL0402 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN AKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	66
CRL0403 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFS DYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTMYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	67
CRL0404 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTMYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	68
CRL0405 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTMYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	69
CRL0406 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFS DYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	70

[0212]

名称	序列	SEQ ID NO:
CRL0407 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	71
CRL0408 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	72
CRL0409 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	73
CRL0410 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	74
CRL0411 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	75
CRL0483 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSGILSPYAVGWFRQ APGKGLFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKDSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGT LVT TVSS	76
CRL0484 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSGILSPYAVGWFRQ APGKGLFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKDSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYD YWGQGT LVT VSS	77
CRL0485 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSGILSPYAVGWFRQ APGKGLFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSI SGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGT LVT TVSS	78

[0213]

名称	序列	SEQ ID NO:
CRL0486 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQ APGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYD YWGQGTTLVTVSS	79
CRL0487 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQ APGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSVYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGPPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLV TVSS	80
CRL0488 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQ APGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSVYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYD YWGQGTTLVTVSS	81
CRL0489 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQ APGQGLEFVATITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFRSFGMSWVRQAPGKGPPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLV TVSS	82
CRL0490 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQ APGQGLEFVATITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYD YWGQGTTLVTVSS	83
CRL0491 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTTLVTVSS	84
CRL0492 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGTTLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVTVSS	85
CRL0493 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTTLVTVSS	86

[0214]

名称	序列	SEQ ID NO:
CRL0494 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	87
CRL0495 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	88
CRL0496 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	89
CRL0497 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPG QGLEFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	90
CRL0498 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAM AWFRQAPGQGLEFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	91
CRL0499 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSYAMAWFRQAPG QEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	92
CRL0500 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVT VSSGGGGSG GGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSYAM AWFRQAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	93
CRL0501 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGK GPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSYAMAWFRQAPG QGLEFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVT VSS	94

名称	序列	SEQ ID NO:
[0215] CRL0502 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGK EREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGTLTVTSSGGGGSG GGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAM AWFRQAPQGLEFVAGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNS TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	95

[0216] 基于结合和功能测定,确定了四个双特异性分子CRL0483、CRL0484、CRL0499和CRL0500的优先排序。表10显示了CRL0483、CRL0484、CRL0499和CRL0500与人C5结合的Biacore亲和力测量结果,图3、4和5显示了功能评估。在食蟹猴的体内药代动力学研究中评估了这四个双特异性分子。

[0217] 表10:在pH 7.4和pH 6.0下优先融合的Biacore测量

[0218]

样品	C5	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
CRL0483	hC5	7.4	2.25e5	2.42e-4	1.07e-9	0.03
	cC5	7.4	9.15e4	2.20e-5	2.40e-10	0.01
CRL0484	hC5	7.4	7.01e4	7.69e-5	1.10e-9	0.04
	cC5	7.4	9.15e4	2.2e-5	2.40e-10	0.01
CRL0499	hC5*	7.4	2.22e6	3.32e-4	1.5e-10	3.3
	cC5	7.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CRL0500	hC5	7.4	2.88e6	6.72e-4	2.33e-10	0.65
	cC5	7.4	2.00e6	8.48e-4	4.2e-10	0.04
CRL0483	hC5	6.0	4.00e4	2.11e-04	5.27e-09	0.02
	cC5	6.0	3.71e4	4.62e-5	1.25e-9	0.02
CRL0484	hC5	6.0	4.25e5	2.36e-4	5.56e-10	0.02
	cC5	6.0	4.82e4	6.17e-6	1.28e-10	0.03
CRL0499	hC5*	6.0	2.51e6	1.12e-3	4.48e-10	0.24
	cC5	6.0	1.92e6	3.88e-3	2.02e-9	0.31

[0219]

CRL0500	hC5*	6.0	8.02e6	1.519e-3	1.89e-10	1.06
	cC5*	6.0	3.91e6	2.5e-3	6.41e-10	3.16

[0220] 实施例13. 双特异性融合蛋白的药代动力学分析

[0221] 在食蟹猴中静脉内或皮下给予纯化的蛋白质,剂量为10mg/kg。每个测试物品的每

个剂量组使用三只猴子。双特异性分子的药代动力学性质通过基于LC MS的定量测定,使用每个构建体的特征肽进行。PK曲线显示在图6中,参数描述在表11中。

[0222] 表11:食蟹猴在10mg/kg的测试物品后的PK参数

测试物品	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (μg/mL)	AUC (h*μg/mL)	C _L (mL/h/kg)	V (mL/kg)	F (%)
CRL0483 IV	139	1.33	324	47900	0.211	42.0	
CRL0484 IV	125	1	382	43700	0.238	43.0	
CRL0483 SC	103	20	238	46412	0.218	32.5	97
CRL0484 SC	75.9	24	161	32610	0.315	34.9	75
CRL0499 IV	170	2.11	299	53773	0.184	46.9	
CRL0500 IV	239	0.167	351	51929	0.205	62.5	
CRL0499 SC	220	32	146	58666	0.173	54.2	109
CRL0500 SC	209	32	161	61475	0.163	49.0	118

[0224] 还产生了双特异性融合蛋白的变体接头序列。包含这些变体接头序列的序列在表12中示出。

[0225] 表12:具有不同接头的抗C5/抗白蛋白双特异性序列

名称	序列	SEQ ID NO
CRL0952	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKE REFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGLVTVSSGGGGAGGGG AGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFR QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGLVTVSS	96
CRL0953	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQA PGKGLFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKDSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLVTVSS GGGGAGGGGAGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPV SNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDN	97

[0227]

	AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVTVSS	
CRL0954	EVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWFQAPGKE REFVASISWGGMWTADSVKGRFTISRDNDAVYLRMNSLNA EDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGTQVTVSSGGGG AGGGGAGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYA AAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVTVSS	98
CRL0955	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAVGWFRQA PGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNADTVYLQMN LKPEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGTQVTVSS GGGGAGGGGAGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRP VSNYAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVTVSS	99
CRL0956	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAWFRQAPGKE REFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVTVSSGGGGAGGGG AGGGGSEVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWF RQAPGKEREFVASISWGGMWTADSVKGRFTISRDNDAVYLR MNSLNAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGTQVTV SS	100
CRL0957	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAWFRQAPGKE REFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGT LVTVSSGGGGAGGGG AGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSAYAV GWFRQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNADTV YLQMN SLKPEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGT QVTVSS	101

[0228] 实施例14.变化的肽接头序列

[0229] 使用HAS042 (SEQ ID NO:26) 白蛋白结合结构域和CRL0305 (SEQ ID NO:11) 人源化抗C5 VHH产生构建体。表13列出了评估的构建体。

[0230] 表13. 用于产生融合蛋白的接头。

[0231]

蛋白	接头	SEQ ID NO	八聚体结合-人C5和人白蛋白
TPP-3211	无抗白蛋白结构域 (只有抗C5)		否
TPP-3212	无抗C5结构域 (只有抗白蛋白)		否
TPP-3213	无接头		是
TPP-3214	GGGGS	104	是
TPP-3215	EAAAKEAAAKEAAK	110	是
TPP-3216	PAPAP	111	是
TPP-3217	GGGGSPAPAP	112	是
TPP-3218	PAPAPGGGGS	113	是
TPP-3219	GSTSGKSSEGKKG	114	是
TPP-3220	GGGDSGGGDS	115	是
TPP-3221	GGGESGGGES	116	是
TPP-3222	GGGSGGGGS	105	是
TPP-3223	GGGDSGGGGS	117	是
TPP-3224	GGGASGGGGS	118	是
TPP-3225	GGGESGGGGS	119	是
TPP-3226	ASTKGP	120	是
TPP-3227	ASTKGPSVFPLAP	121	是
TPP-3228	GGGGGGGP	123	是
TPP-3229	GGGGGGGGP	147	是
TPP-3230	PAPNLLGGP	124	是
TPP-3231	PNLLGGP	148	是
TPP-3232	GGGGGG	125	是
TPP-3233	GGGGGGGGGGGG	126	是
TPP-3234	APELPGGP	127	是
TPP-3235	SEPQPQPG	128	是
TPP-1252	GGGSGGGGSGGGGS	106	是

[0232] 表达了表13中列出的26种构建体,并评估了融合蛋白与人C5和白蛋白的结合(表13-八聚体结合),聚集体的产生,疏水性(HIC HPLC)和糖基化(电喷雾质谱)。对于八聚体分析,将生物素化的人C5捕获在CAP芯片上,然后注射测试双特异性分子。随后注射各种浓度的白蛋白。在pH 7.4下测定动力学(Biacore 3000)。所有双特异性分子均与C5和白蛋白结合,每个分子均对白蛋白具有相似的亲和力(5-6nM)。

[0233] 在体外红细胞溶解测定中测试了双特异性融合蛋白抑制红细胞溶解的能力。数据在图9A和9B中示出。

[0234] 表14显示了CRL0500和CRL0952与人C5(hC5)和食蟹猴C5(cC5)结合的结合动力学。

[0235] 表14. 与C5双特异性结合的动力学

[0236]

样品	抗原	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	χ^2
CRL0500	hC5	7.4	9.60e+06	4.91e-04	5.12e-11	0.24
CRL0500	cC5	7.4	3.74e+06	8.18e-04	2.19e-10	0.01
CRL0952	hC5	7.4	1.01e+07	5.39e-04	5.36e-11	0.27
CRL0952	cC5	7.4	3.53e+06	7.86e-04	2.23e-10	0.01

CRL0500	hC5	6.0	7.56e+06	1.04e-03	1.38e-10	0.54
CRL0500	cC5	6.0	5.51e+06	4.10e-03	7.44e-10	0.07
CRL0952	hC5	6.0	5.84e+06	9.07e-04	1.55e-10	0.58
CRL0952	cC5	6.0	5.55e+06	3.99e-03	7.20e-10	0.06

[0237] 表15显示了CRL0500和CRL0952与**Plasbumin**[®]和食蟹猴(cyno)白蛋白结合的结合动力学。

[0238] 表15. 白蛋白双特异性动力学

[0239]

样品	白蛋白	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi^2
CRL0500	血浆白蛋白	7.4	3.70e06	3.46e-03	9.36e-10	0.30
CRL0500	血浆白蛋白	6.0	3.55e06	2.0e-03	5.63e-10	0.17
CRL0952	血浆白蛋白	7.4	3.98e06	3.59e-03	9.01e-10	0.21
CRL0952	血浆白蛋白	6.0	3.23e06	2.10e-03	6.49e-10	0.10
CRL0500	cyno	7.4	3.32e06	1.26e-02	3.78e-09	0.42
CRL0500	cyno	6.0	3.27e06	6.93e-03	2.12e-09	0.43
CRL0952	cyno	7.4	2.93e06	1.52e-02	5.19e-09	0.17
CRL0952	cyno	6.0	3.03e06	7.55e-03	2.49e-09	0.22

[0240] 实施例15. 抗C5 VHH结构域的pH依赖性结合

[0241] 在所有CDR上针对抗C5 VHH结构域LCP0115、LCP0143、LCP0146和LCP0302进行组氨酸扫描。在CDR中的每个位置均产生单个组氨酸取代(以黑体划线显示)。将变体转染至Expi293细胞培养物中,并在pH7.4、6.0和5.5下评估pH依赖性结合。来自每种抗体的几种变体表现出pH依赖性结合。这些变体列于表16中,并且其pH依赖性结合反应示于图11A-D中。

[0242] 表16: 抗C5 VHH结构域的预人源化组氨酸扫描变体。

[0243]

变体名称	组氨酸变体序列	SEQ ID NO
LCP0115 变体		
CRL0085	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGREFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTLSRDNAKD TVYlQMNSLKPEDTAVYYC <u>H</u> VRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTQVTVSS	281
CRL0091	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGW FRQAPGKGREFVSTITSGGSAIYTDsvKGRFTLSRDNAKD TVYlQMNSLKPEDTAVYYCAVRTRR <u>H</u> GSNLGEVPQENEYGYWGQGTQVTVSS	282
LCP0143 变体		
CRL0120	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMawYRQA PGKQRELVARLP <u>H</u> DNNIDYGDFAKGRFTISRDI TRNTVYL QMNNLKPDDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTQVTVSS	283
CRL0121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMawYRQA PGKQRELVARLP <u>LH</u> NNIDYGDFAKGRFTISRDI TRNTVYL QMNNLKPDDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGTQVTVSS	284
CRL0133	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMawYRQA PGKQRELVARLPDNNIDYGDFAKGRFTISRDI TRNTVYL QMNNLKPDDTAVYYC <u>H</u> VLLSRQINGAYVHWGQGTQVTVSS	285
CRL0135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMawYRQA PGKQRELVARLPDNNIDYGDFAKGRFTISRDI TRNTVYL QMNNLKPDDTAVYYCNV <u>H</u> LSRQINGAYVHWGQGTQVTVSS	286
CRL0144	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMawYRQA PGKQRELVARLPDNNIDYGDFAKGRFTISRDI TRNTVYL QMNNLKPDDTAVYYCNVLLSRQINGA <u>H</u> VHWGQGTQVTVSS	287
LCP0146 变体		
CRL0149	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR <u>H</u> FSDYAMawFRQA PGKEREfVAGIGWsgGDTLYADSVRGRFTNSKDNakNRMS LQMNSLKPEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT QVTVSS	288

[0244]

CRL0150	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRA H SDYAMAWFRQA PGKEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMS LQMNSLKPEDTAVYYCAARQGGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT QVTVSS	289
CRL0166	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRA F SDYAMAWFRQA PGKEREFVAGIGWGGDT H YADSVRGRFTNSKDNAKNRMS LQMNSLKPEDTAVYYCAARQGGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT QVTVSS	290
CRL0180	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRA F SDYAMAWFRQA PGKEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMS LQMNSLKPEDTAVYYCAARQGGQ H IYSSMRSDSYDYWGQGT QVTVSS	291
LCP0302 变体		
CRL0623	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR T FSGILSHYAVGW FRQAPGKEREFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTLSRDNAKD TVYLMQNSLKPEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYG HWGQGTQVTVSS	292

[0245] 组合鉴定用于pH依赖性结合的单个组氨酸突变,以增强pH敏感性。这些变体的序列示于表17。这些变体在生物层干涉术中评估了pH依赖性结合,结果示于图12A和12B。

[0246] 表17:人源化抗C5 VHH结构域的组氨酸扫描组合变体

[0247]

变体名称	组氨酸变体序列	SEQ ID NO
LCP0115 组合变体		
CRL0282	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR T FSGILSPYAVGW FRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD S VKGRFTISRDN A KN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVR T RR H GSNLGEVPQENEY G YWGQGT L VTVSS	293
LCP0146 组合变体		
CRL0303	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR H F SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWGGDT L YADSVRGRFTISRDN S KNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ Y IYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	9
CRL0304	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR A H SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWGGDT L YADSVRGRFTISRDN S KNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ Y IYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	10
CRL0305	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR A F SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWGGDT H YADSVRGRFTISRDN S KNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ Y IYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	294

[0248]

CRL0306	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT LY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	295
CRL0307	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT LY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ YI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	12
CRL0308	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ YI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	296
CRL0309	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	297
CRL0310	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ YI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	298
CRL0311	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT LY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	299
CRL0312	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ YI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	296
CRL0313	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT LY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	300
CRL0314	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	297
CRL0315	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ YI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	301
CRL0316	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT LY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	302
CRL0317	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	303
CRL0318	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFRQA PGQEREFVAGIGWSGGDT HY ADSVRGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQ HI YSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	304

[0249] 实施例16. 抗C5和抗白蛋白双特异性融合物的产生

[0250] 将抗C5 VHH结构域与抗白蛋白结构域融合以产生双特异性分子。四种不同的接头

长度 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:106), $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:107), $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO:108) 和 $(G_4S)_6$ (SEQ ID NO:109) 和抗白蛋白结构域的两个不同方向 (N末端或C末端) 进行了评估。产生的分子的序列示于表18。在HEK293F细胞中表达构建体, 并使用蛋白A亲和色谱法纯化。在Biacore实验中评估了纯化的融合分子。将人C5生物素化并固定在biacore芯片上, 注入纯化的双特异性分子使芯片饱和, 然后注入三种不同浓度的人血清白蛋白以获得动力学。测得的对人血清白蛋白的亲和力被用作比较不同接头长度的代理。选择 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO:106) 作为产生双特异性融合体的最佳接头长度。在同一实验中还评估了N末端或C末端抗白蛋白融合蛋白。发现不同的方向对于不同的抗C5 VHH结构域是最佳的。

[0251] 表18: 抗C5/抗白蛋白双特异性的接头长度和方向变异的序列

名称	序列	SEQ ID NO
CRL0248	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVG WFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQEN EYGYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS	305
CRL0249	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVG WFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQEN EYGYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQL LES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPG KGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS	306

[0252]

[0253]

CRL0250	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVG WFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQEN EYGYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS	307
CRL0251	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVG WFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQEN EYGYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFG MSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT TVSS	308
CRL0254	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGG GGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASG RTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSS	309
CRL0255	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGG GGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTITSGGS AIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSS	310
CRL0256	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTI TSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT VSS	311
CRL0257	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVES GGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLE FVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVT TVSS	312
CRL0272	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFS DYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWG QGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS	313

[0254]

CRL0273	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	314
CRL0274	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKG PEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	315
CRL0275	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQ APGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	316
CRL0278	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RAFSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVR GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYI YSSMRSDSYDYWGQGTLVTVSS	317
CRL0279	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGGDTLY ADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAR QGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTLVTVSS	318
CRL0280	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSG GDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTLVTVSS	319
CRL0281	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQ APGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRAFSDYAMAWFRQAPGQEREFVAG IGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGTLVTVSS	320

[0255] 用具有或不具有pH依赖性结合的人源化抗C5 VHH结构域产生了一系列不同的双特异性融合分子。将抗C5 VHH结构域融合至两个不同的抗白蛋白结构域以生成双特异性分子(表9中所示)。这些构建体在HEK293F细胞中表达,并使用蛋白A色谱法纯化。在红细胞溶解测定中测试了纯化的双特异性,结果如图3A-D所示。

[0256] 基于结合和功能测定,对四个双特异性分子CRL0483、CRL0484、CRL0499和CRL0500进行了优先排序。表10中显示了对CRL0483、CRL0484、CRL0499和CRL0500与人C5结合的Biacore亲和力测量结果,在图5、6和7中显示了功能评估。这四个双特异性分子是在食蟹猴体内药代动力学研究中评估的。

[0257] 实施例17. 双特异性融合分子的药代动力学分析

[0258] 在食蟹猴中静脉内或皮下给予纯化的蛋白质,剂量为10mg/kg。每个测试物品的每个剂量组使用三只猴子。双特异性分子的药代动力学通过基于LC-MS的定量测定法,使用对每种构建体特异的特征肽进行测定。PK曲线显示在图6A和6B中,参数描述在表20中。

[0259] 表20. 10mg/kg测试物品进入食蟹猴后的PK参数

测试物品	$t_{1/2}$	t_{max}	C_{max}	AUC	C_L	V	F
	h	h	$\mu\text{g/mL}$	$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$	mL/h/kg	mL/kg	%
CRL0483 IV	139	1.33	324	47900	0.211	42.0	
CRL0484 IV	125	1	382	43700	0.238	43.0	
CRL0483 SC	103	20	238	46412	0.218	32.5	97
CRL0484 SC	75.9	24	161	32610	0.315	34.9	75
CRL0499 IV	170	2.11	299	53773	0.184	46.9	
CRL0500 IV	239	0.167	351	51929	0.205	62.5	
CRL0499 SC	220	32	146	58666	0.173	54.2	109
CRL0500 SC	209	32	161	61475	0.163	49.0	118

[0261] 尽管本公开描述了各种实施例,但是应当理解,本领域技术人员将想到变型和修改。因此,意图是所附权利要求覆盖所有这样的等同变化。另外,本文中使用的章节标题仅出于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0262] 除非明确相反地指出,否则本文描述的每个实施例可以与任何其他一个或多个实施例组合。特别地,除非明确相反地指出,否则指示为优选或有利的任何特征或实施方式可以与指示为优选或有利的任何其他一个或多个特征或实施方式组合。

[0263] 本申请中引用的所有参考文献均通过引用明确地并入本文。

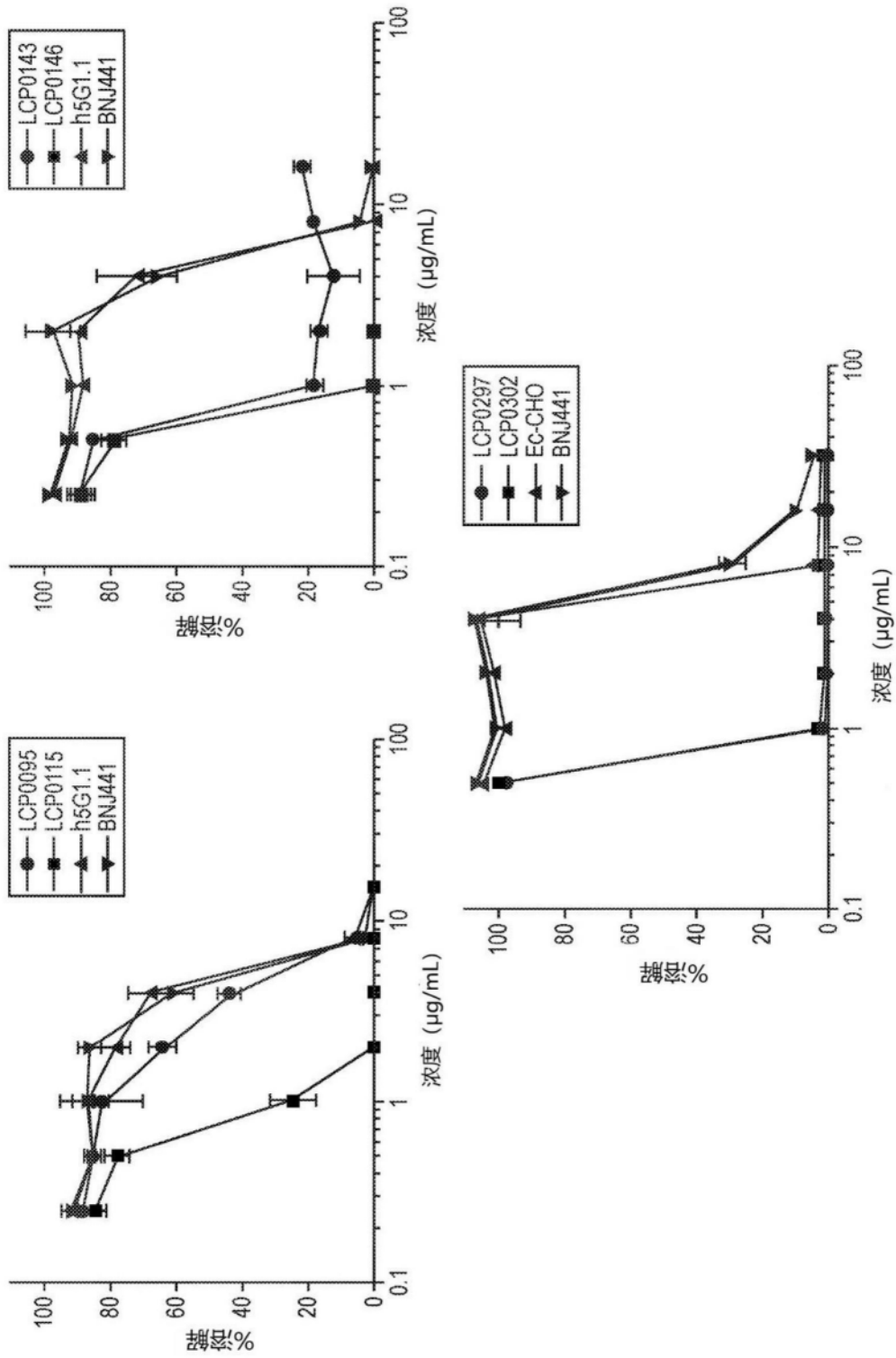


图1A

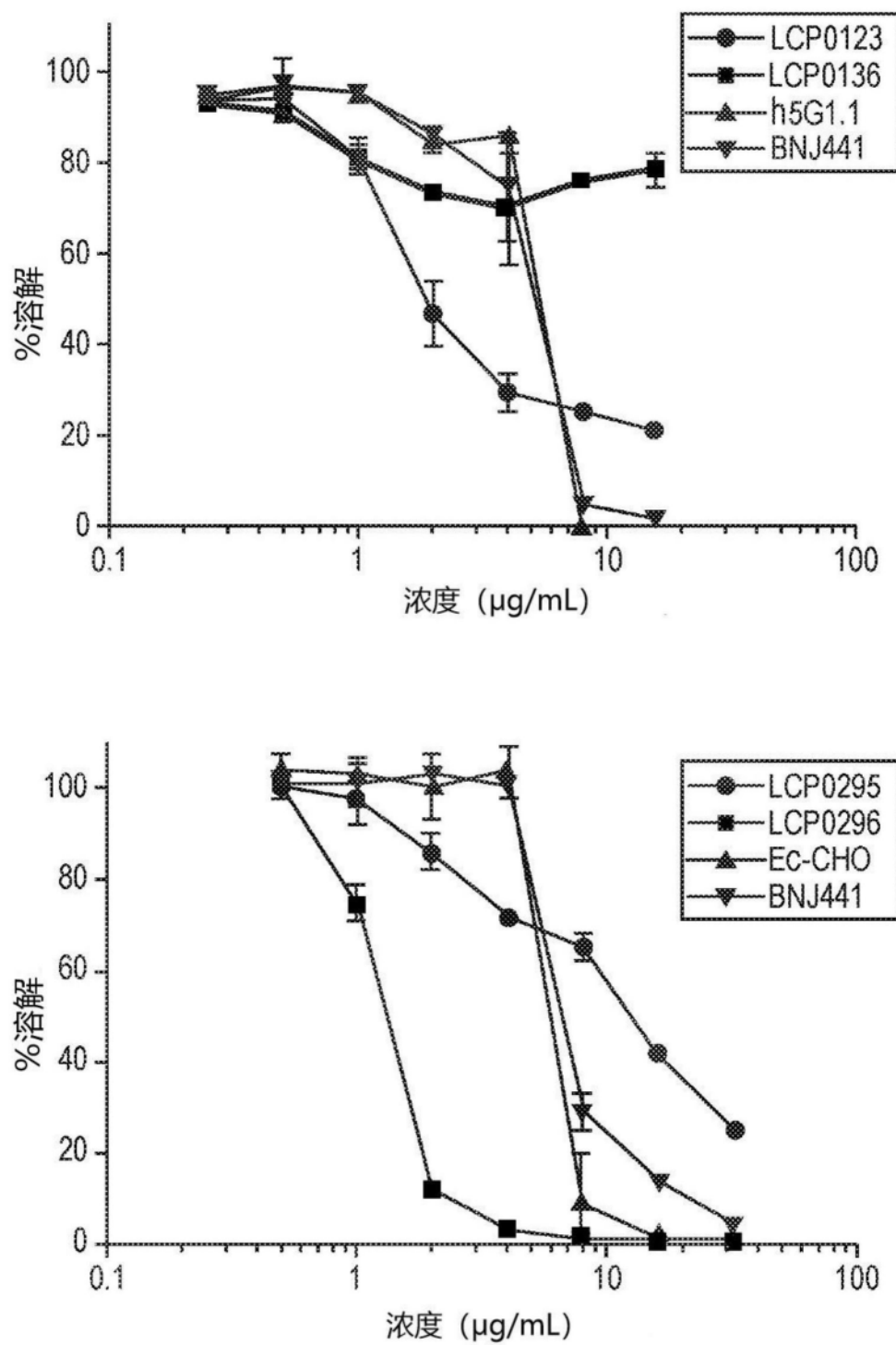


图1B

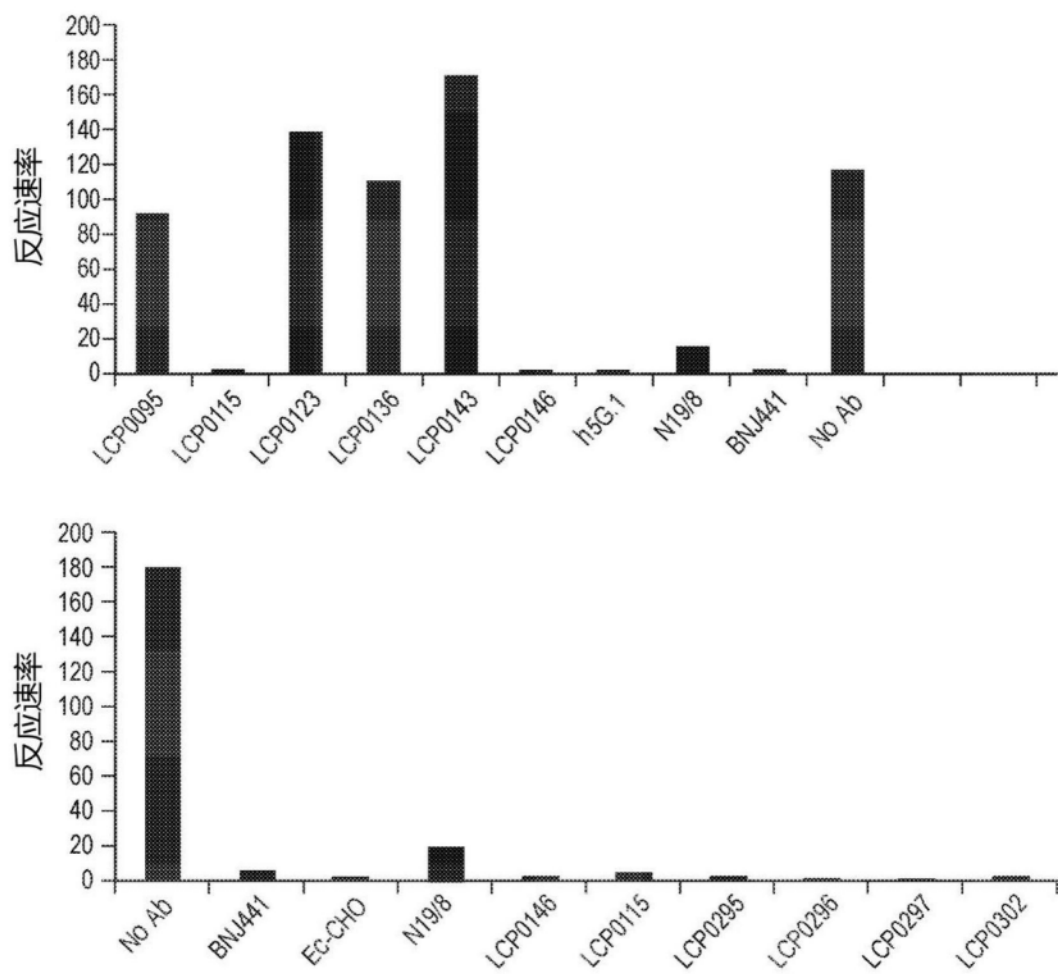


图2

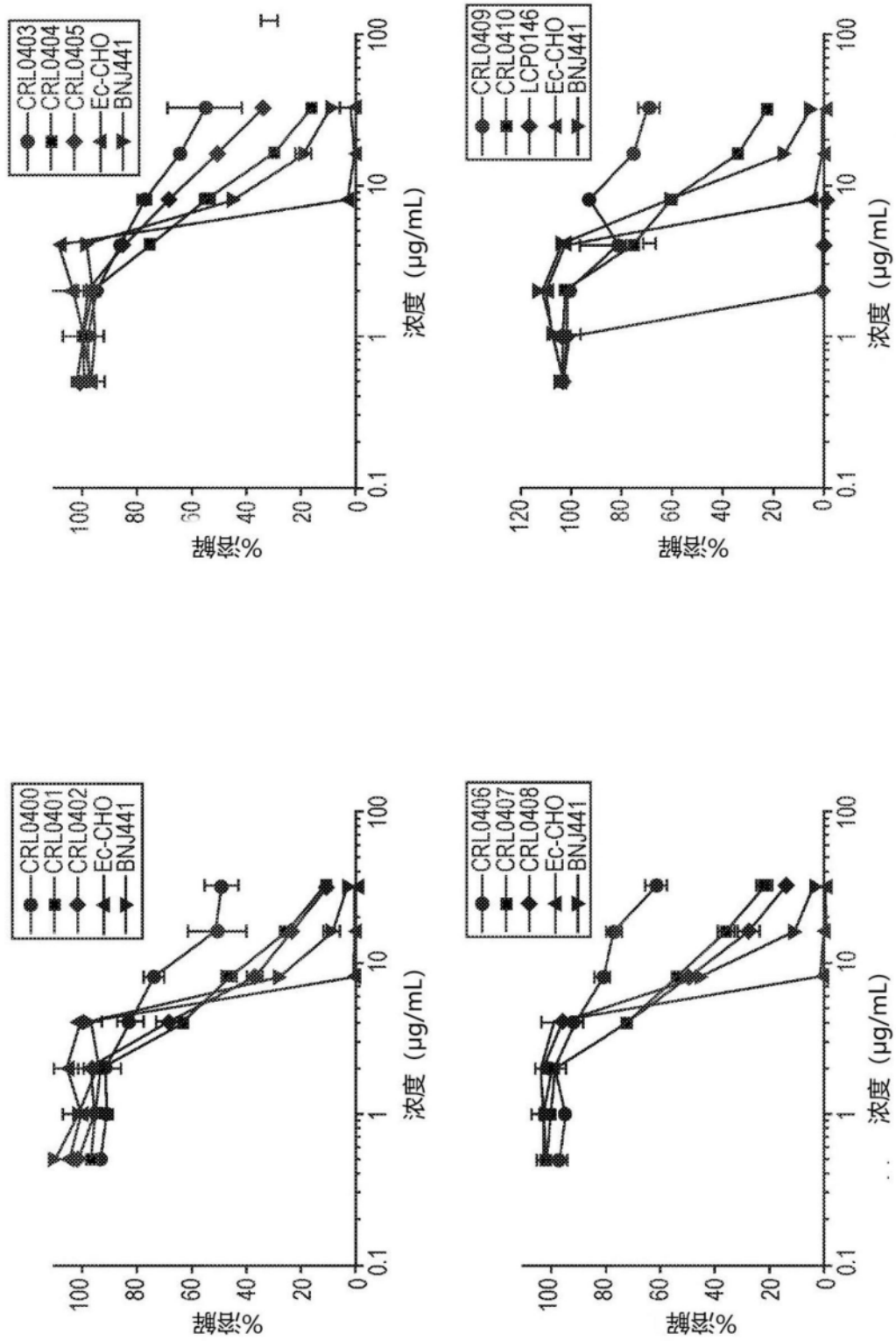


图3A

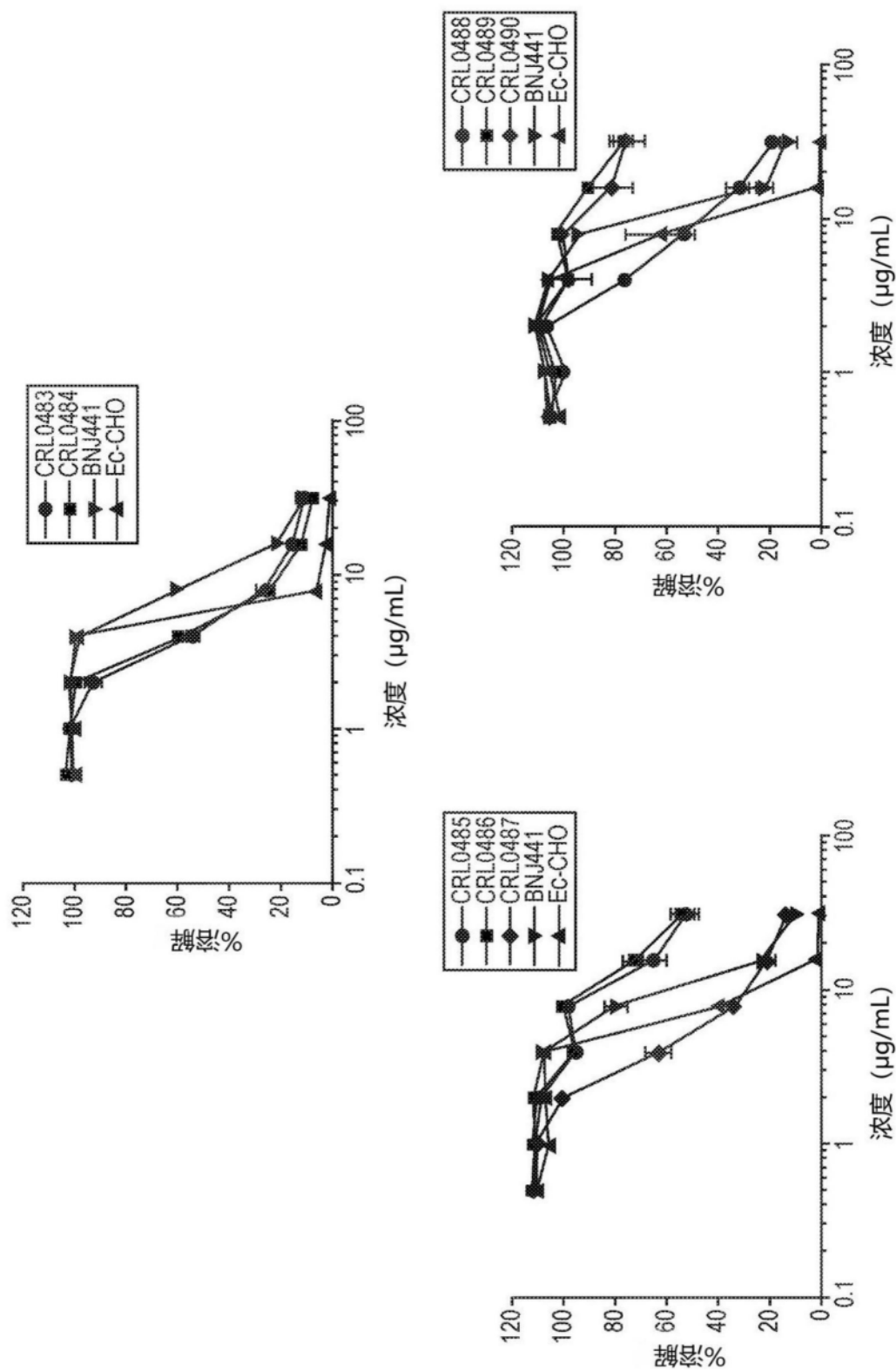


图3B

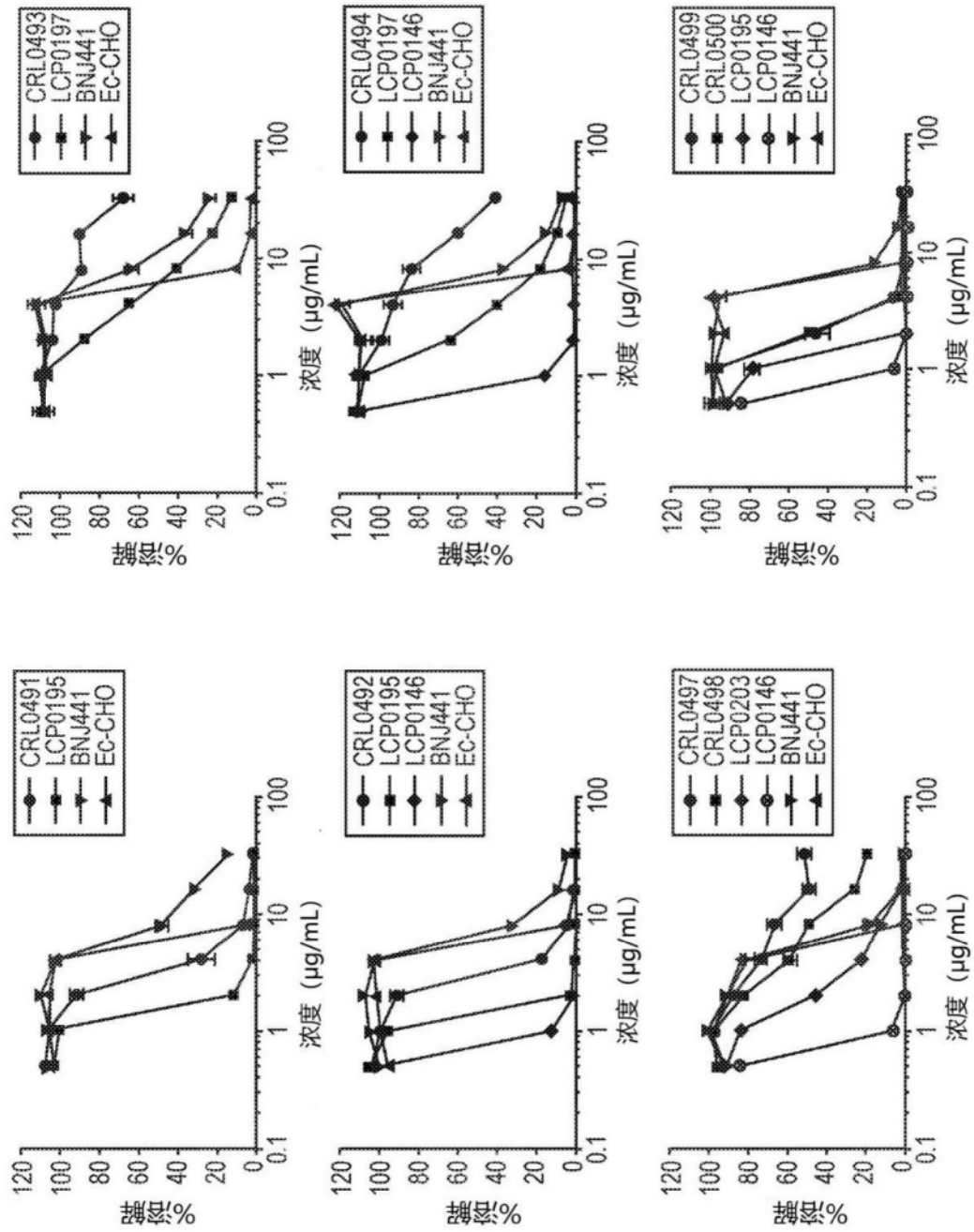


图3C

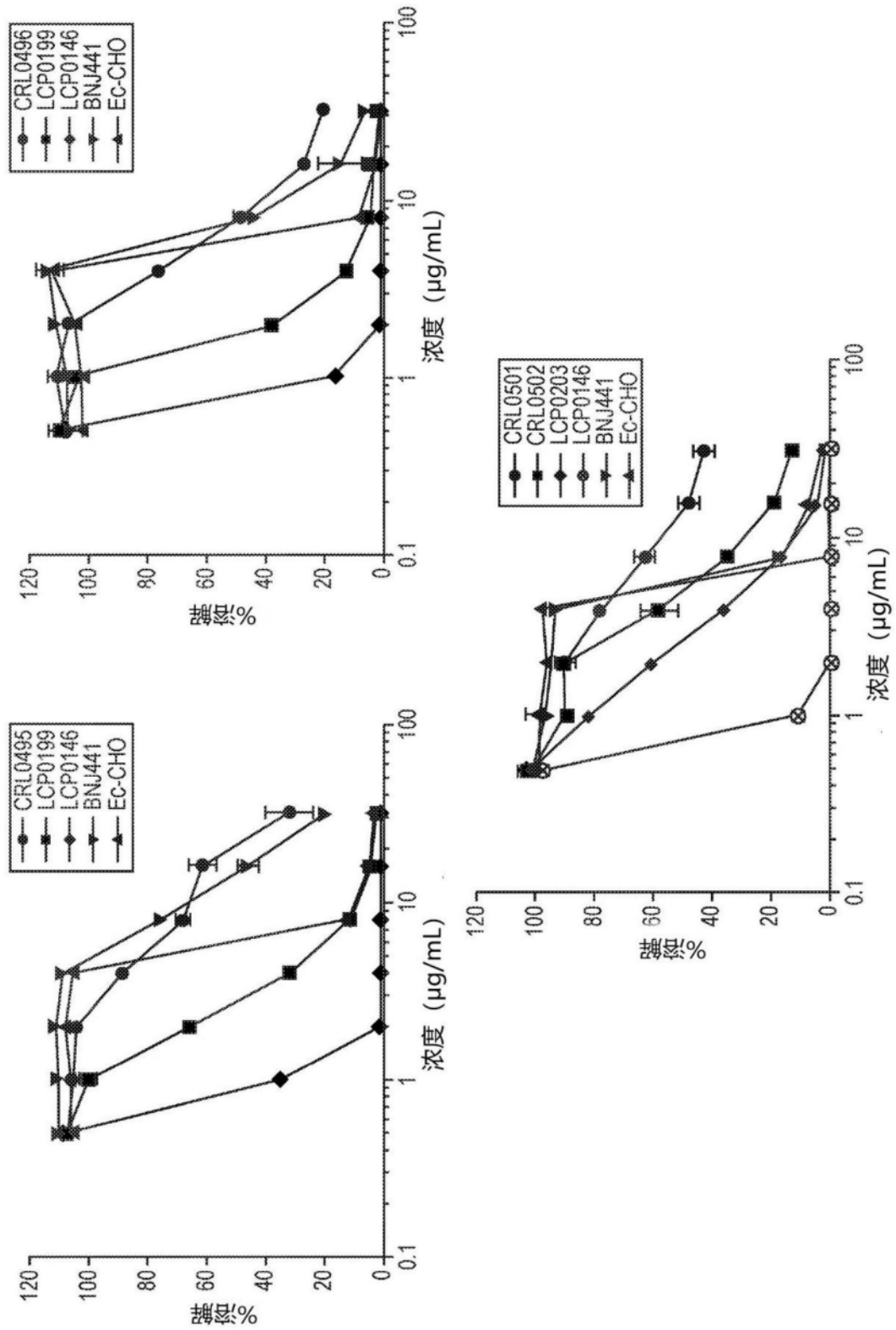


图3D

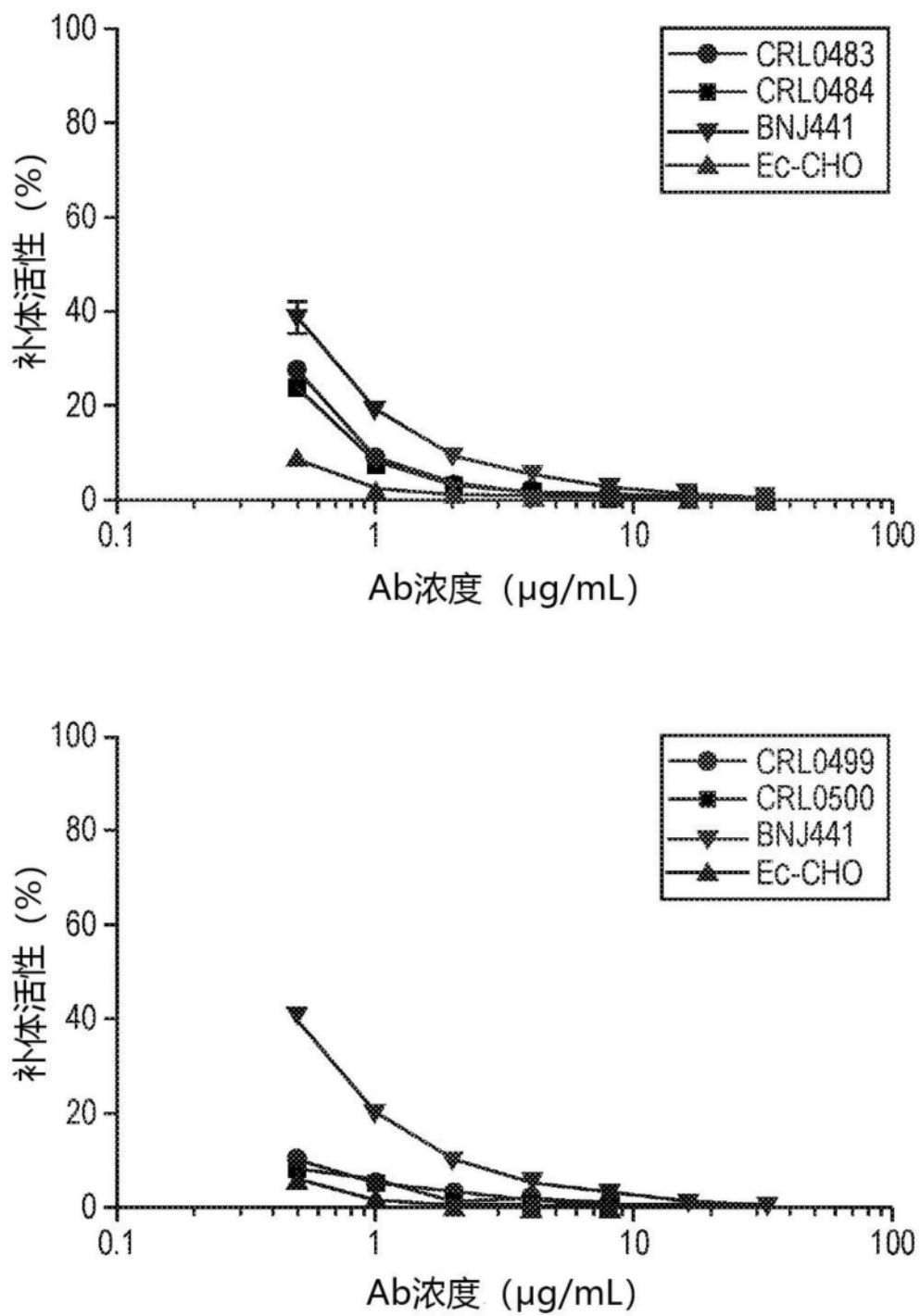


图4

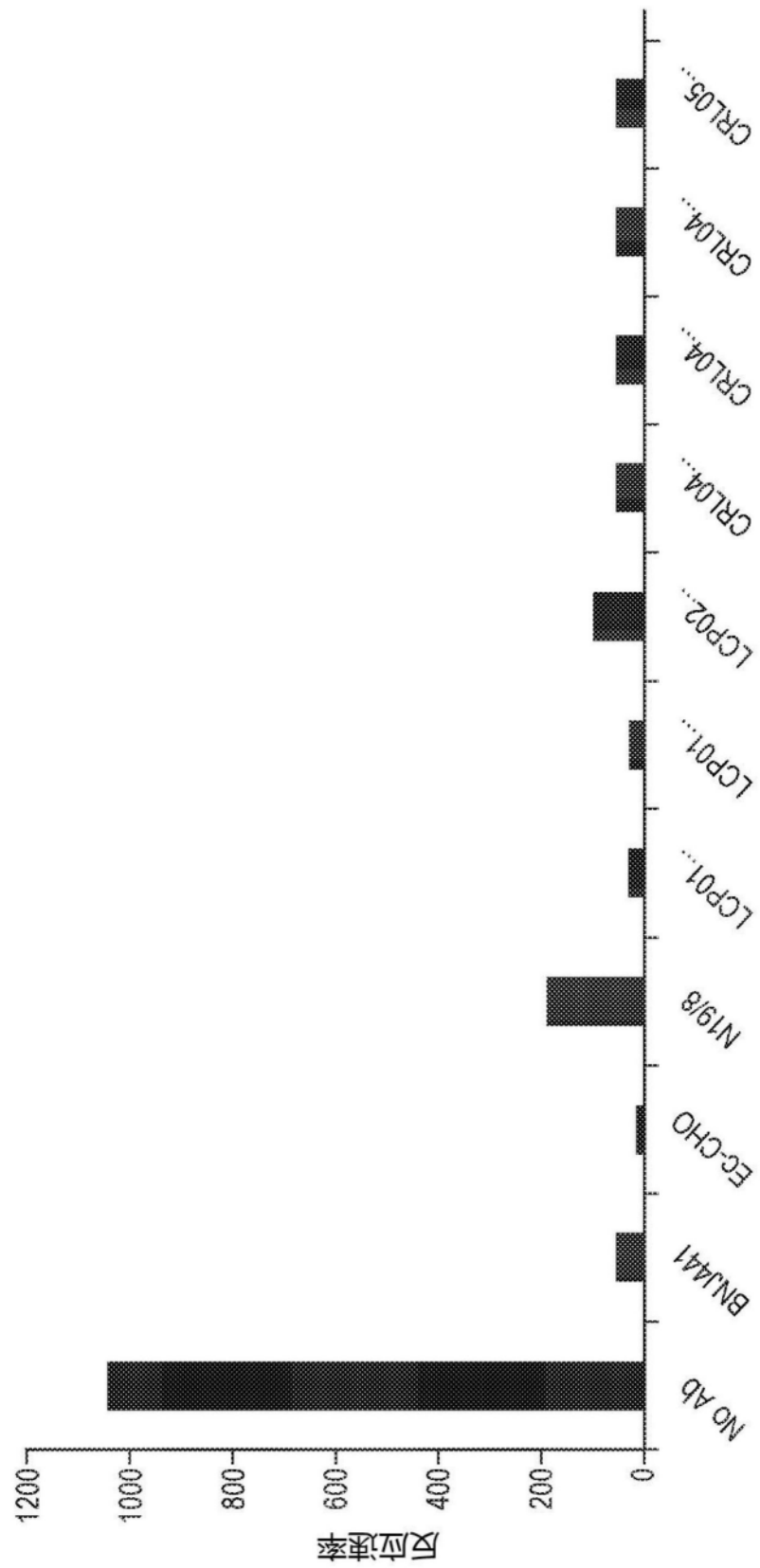


图5

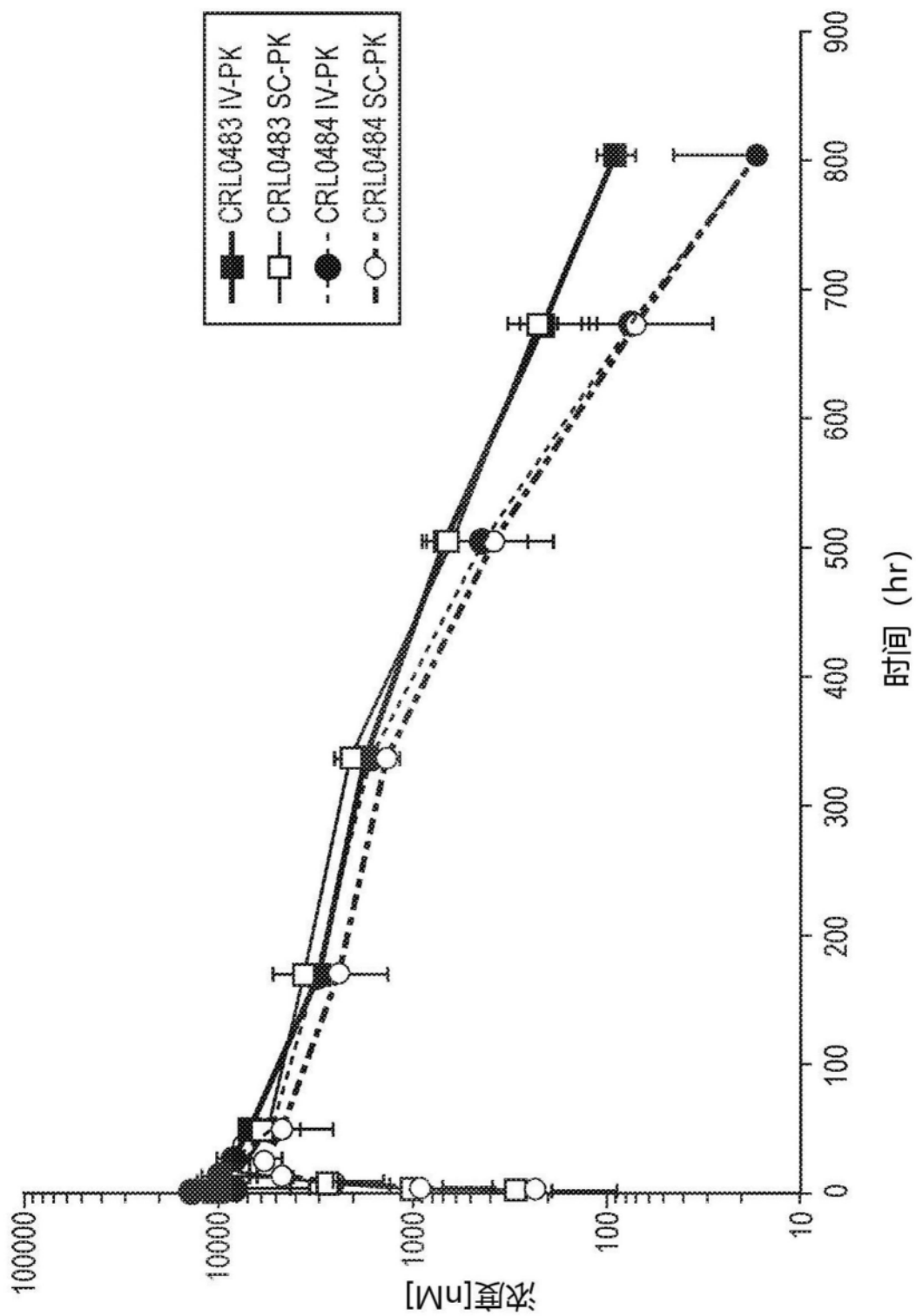


图6A

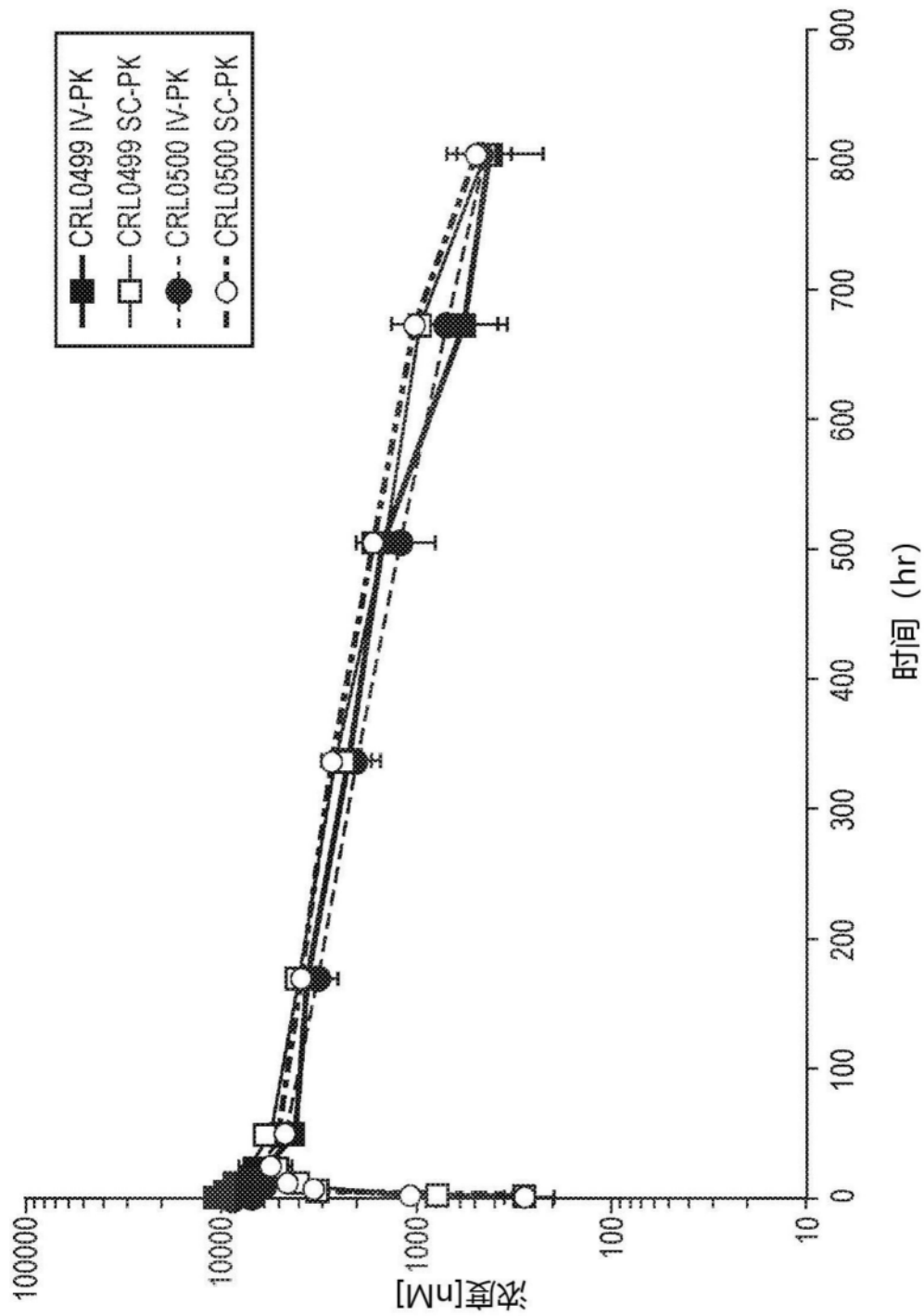


图6B

在pH6.0结合到HSA的FcRn

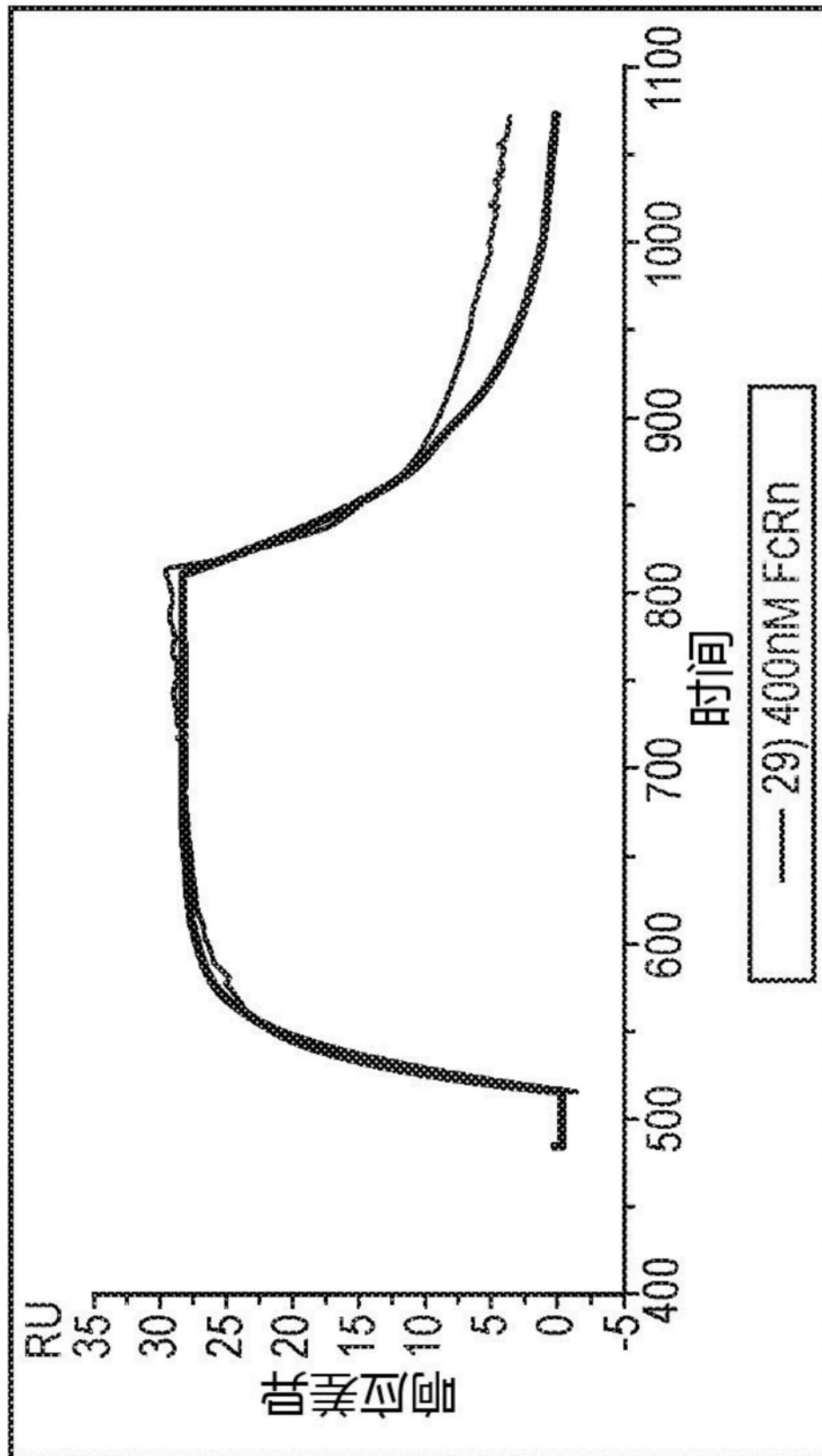


图7A

结合到HAS:MSA21复合物,pH6.0的FcRn

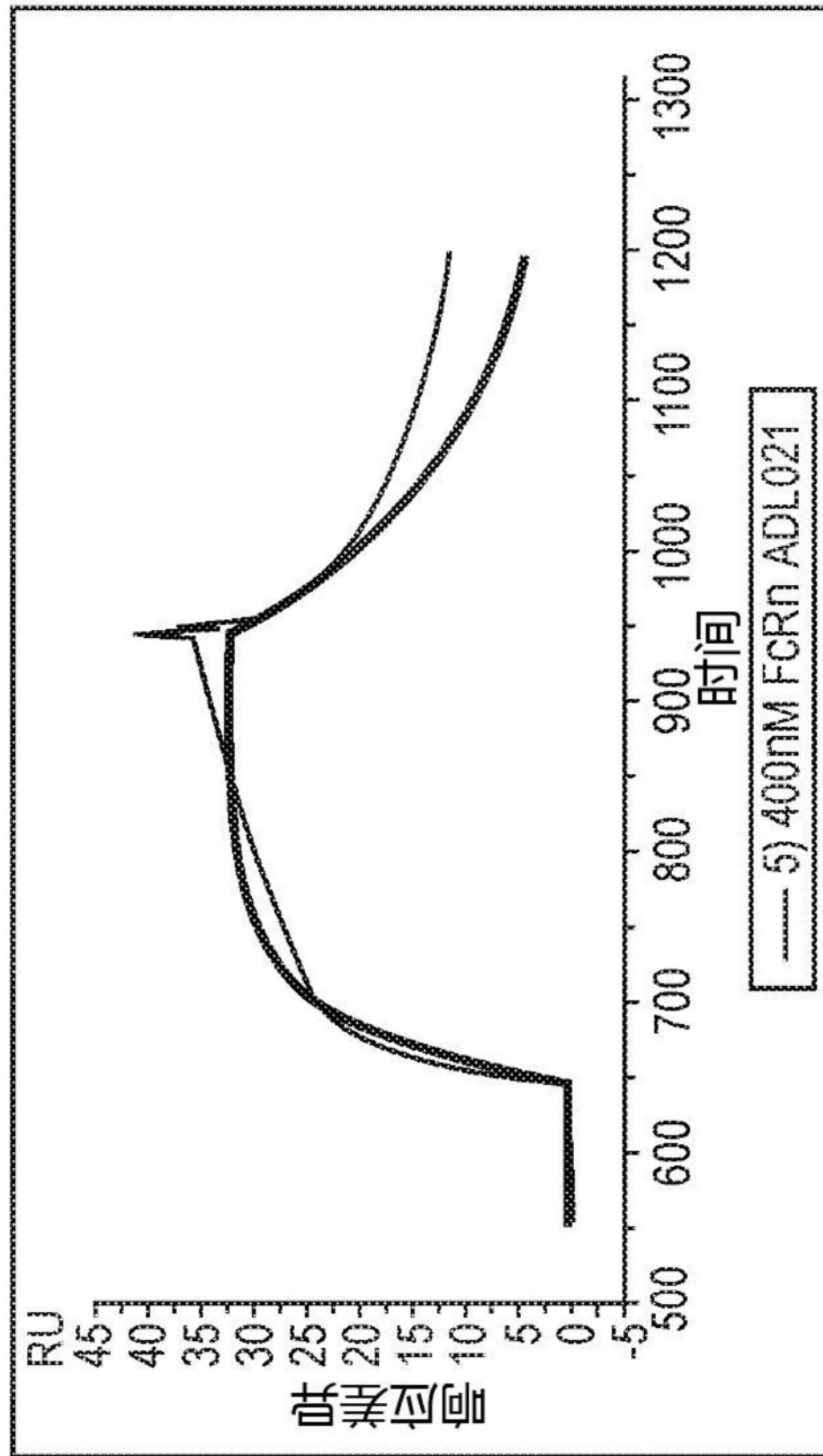


图7B

结合到HAS:HAS040复合物,pH6.0的FcRn

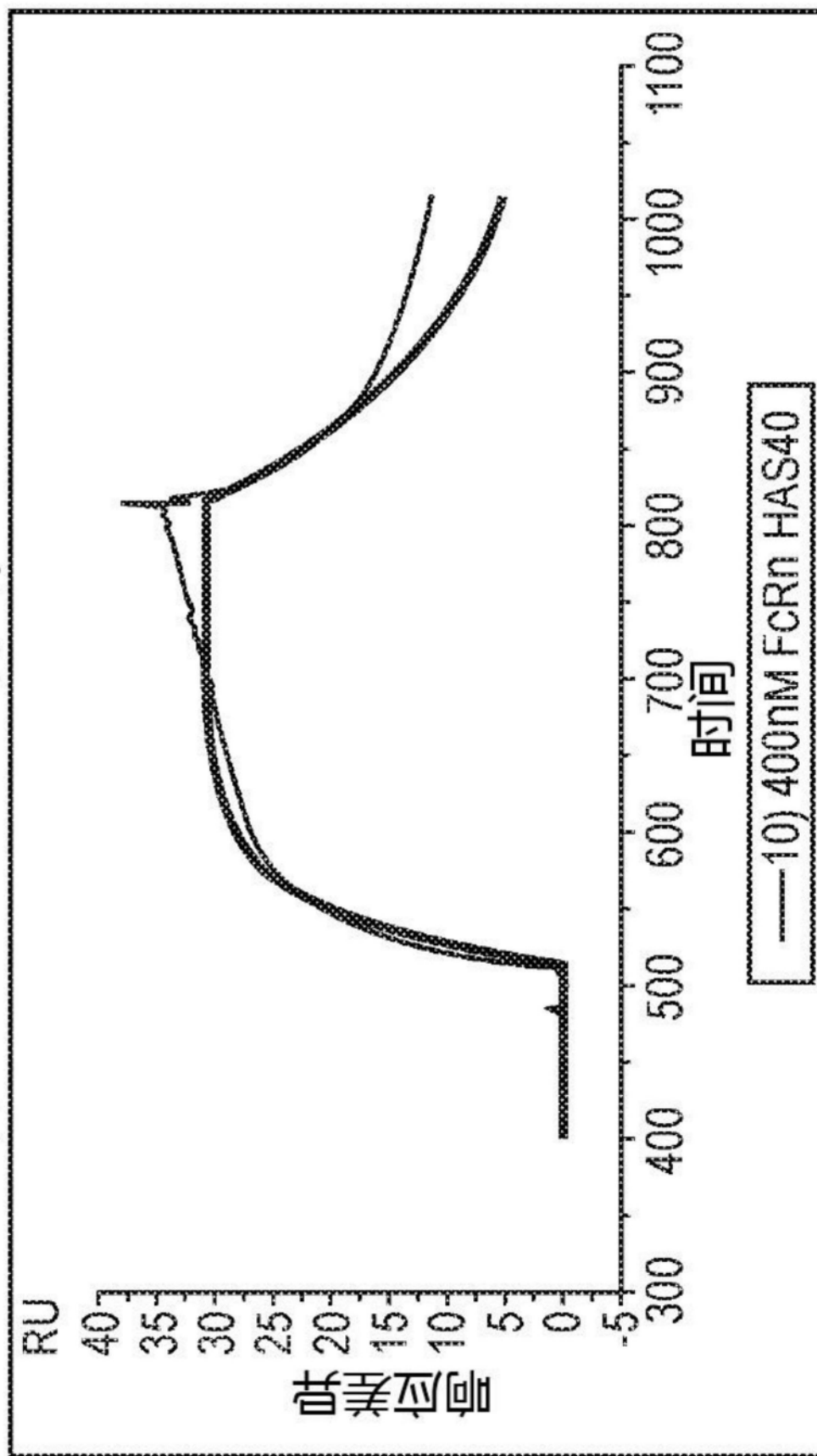


图7C

结合到HAS:HAS041复合物,pH6.0的FcRn

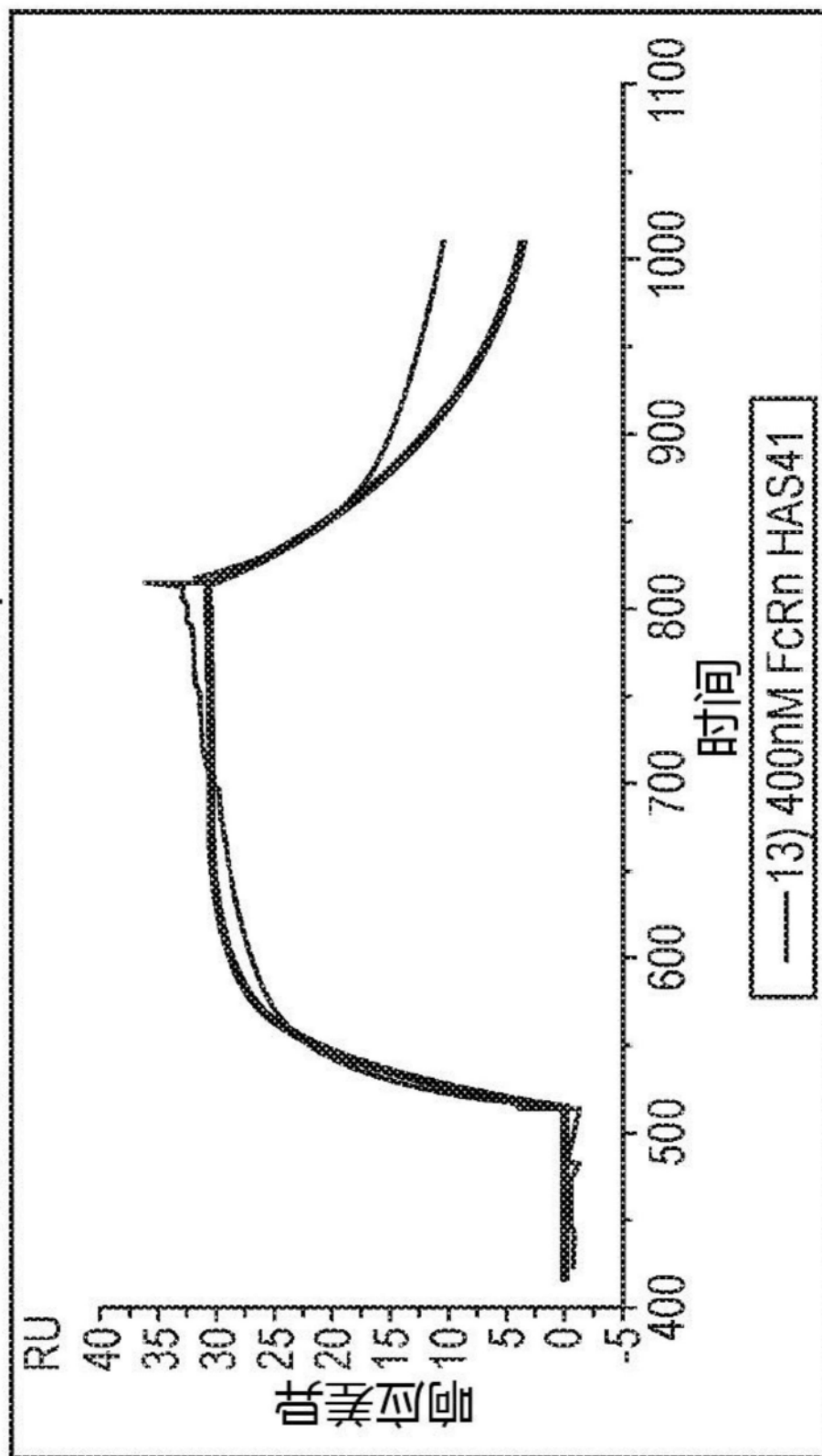


图7D

HAS040和Alb1 VHH结构域的竞争性白蛋白结合

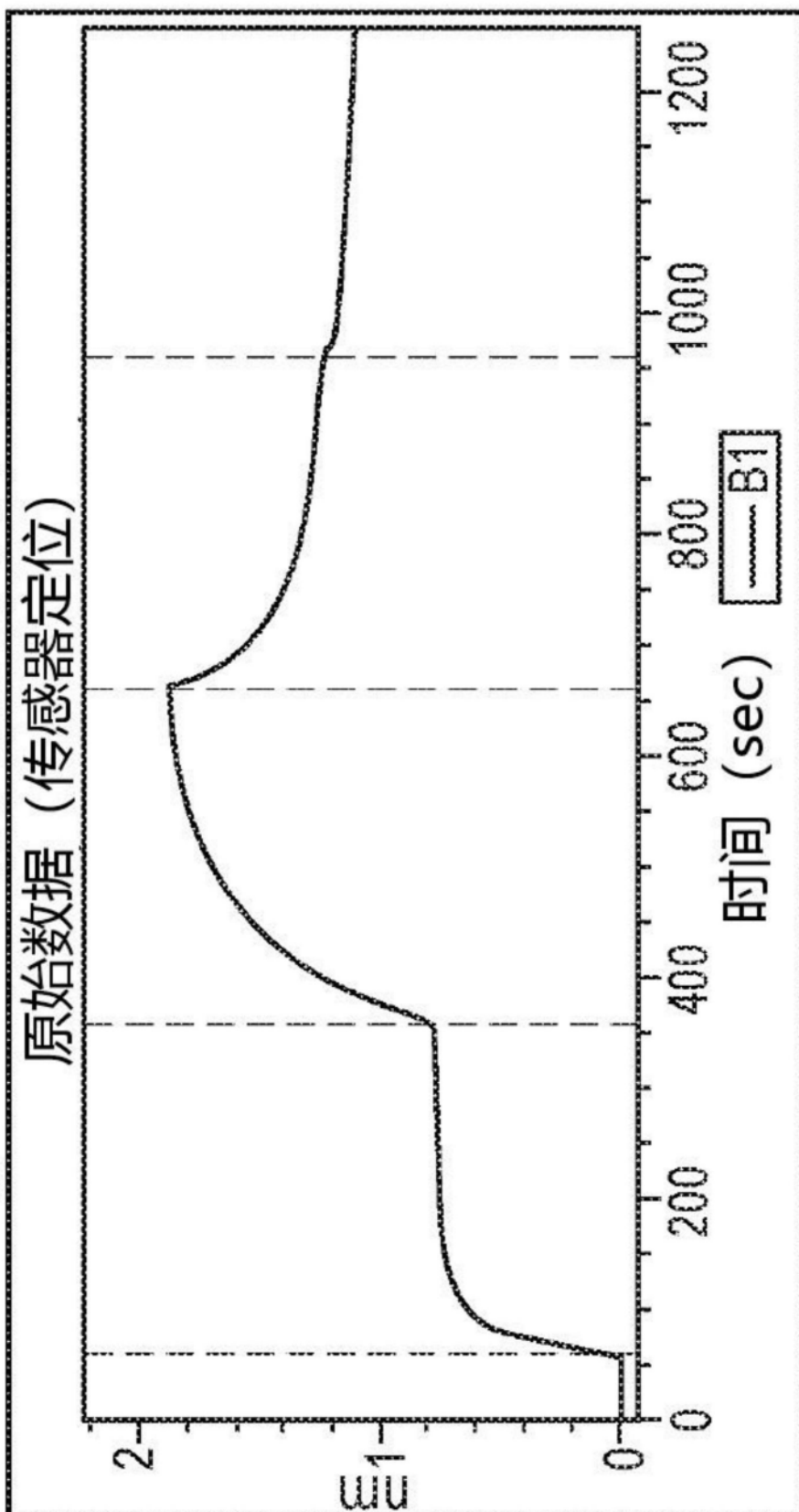


图8A

HAS041和Alb1 VHH结构域的竞争性白蛋白结合

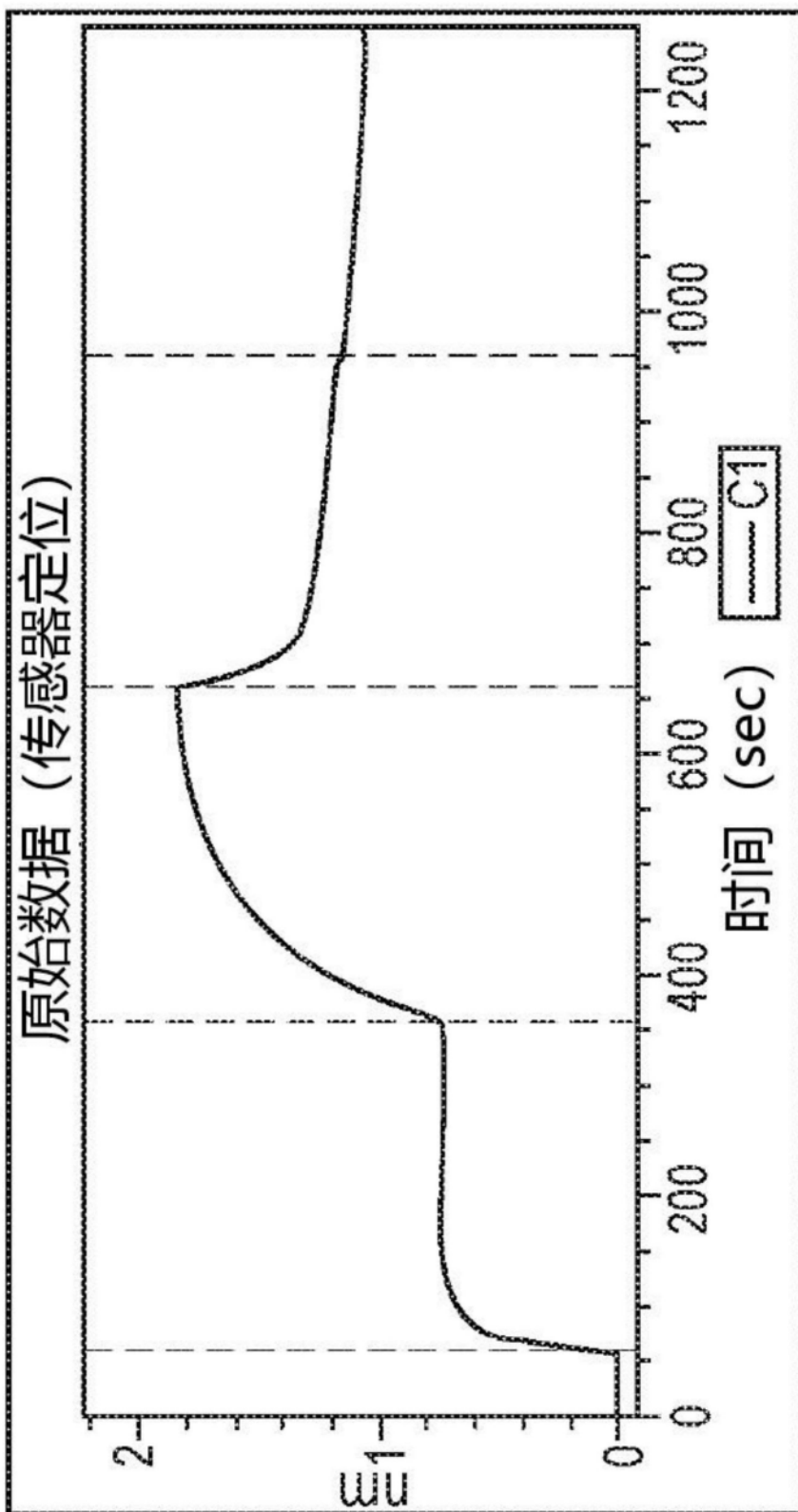


图8B

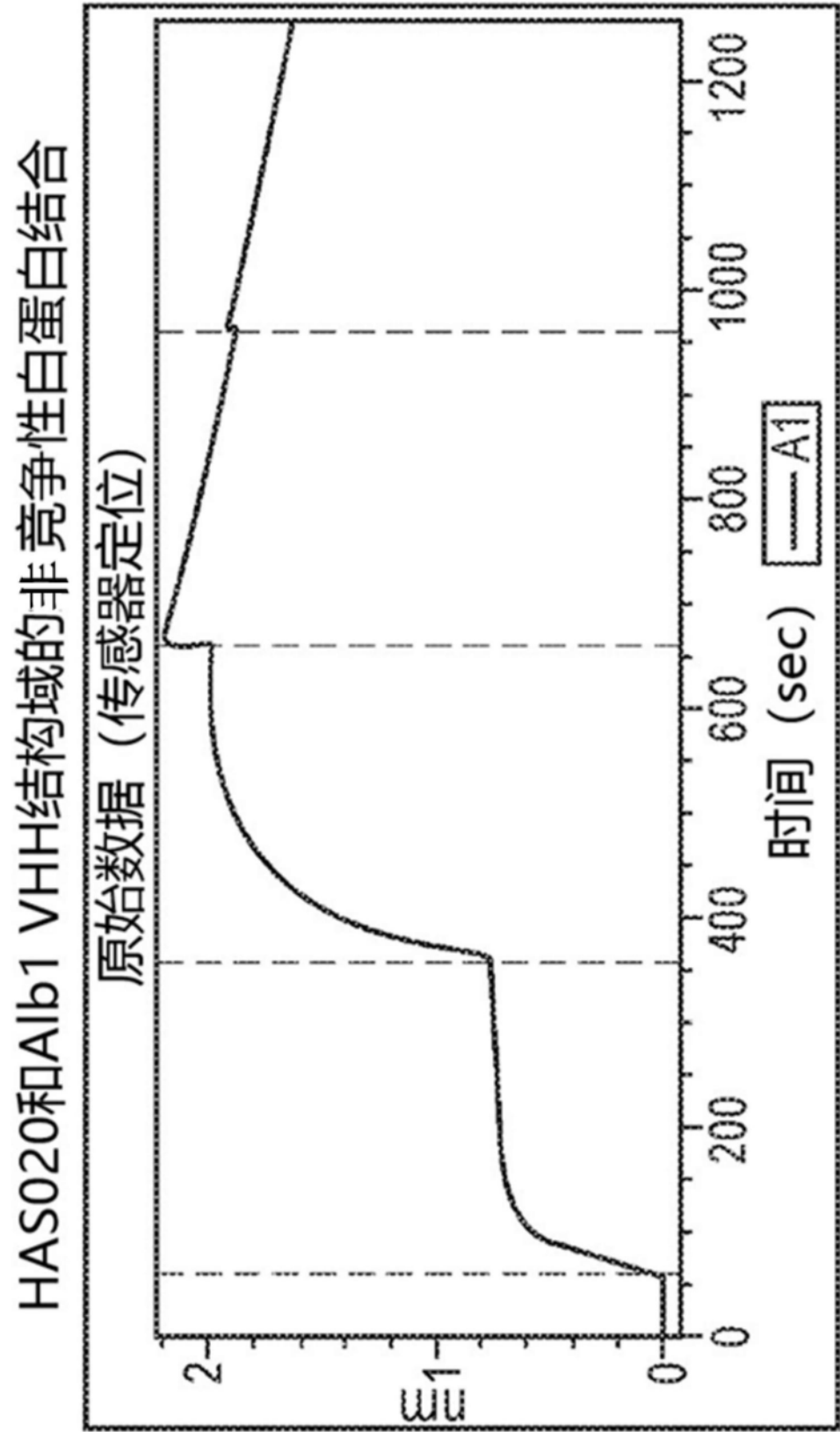


图8C

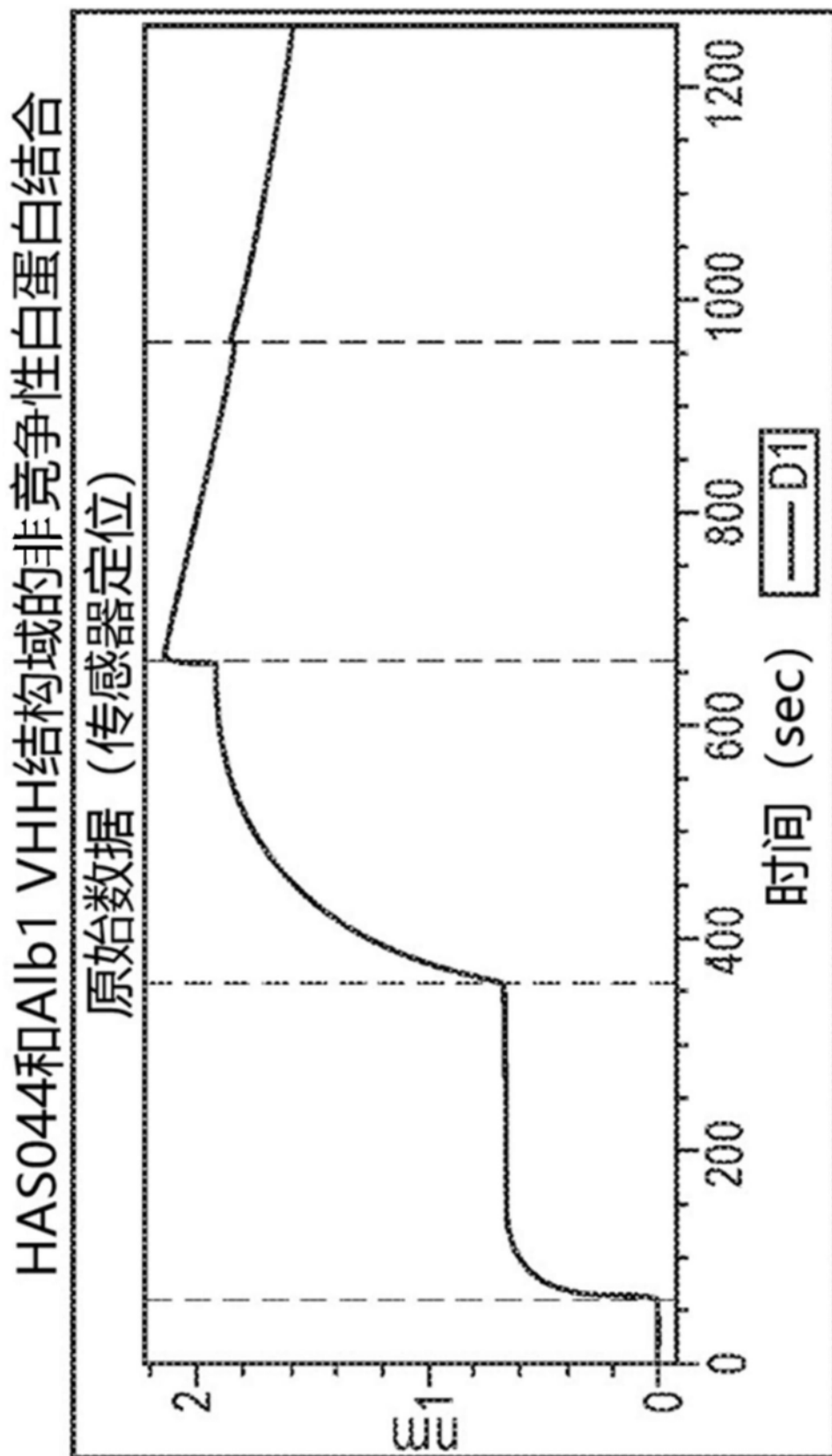


图8D

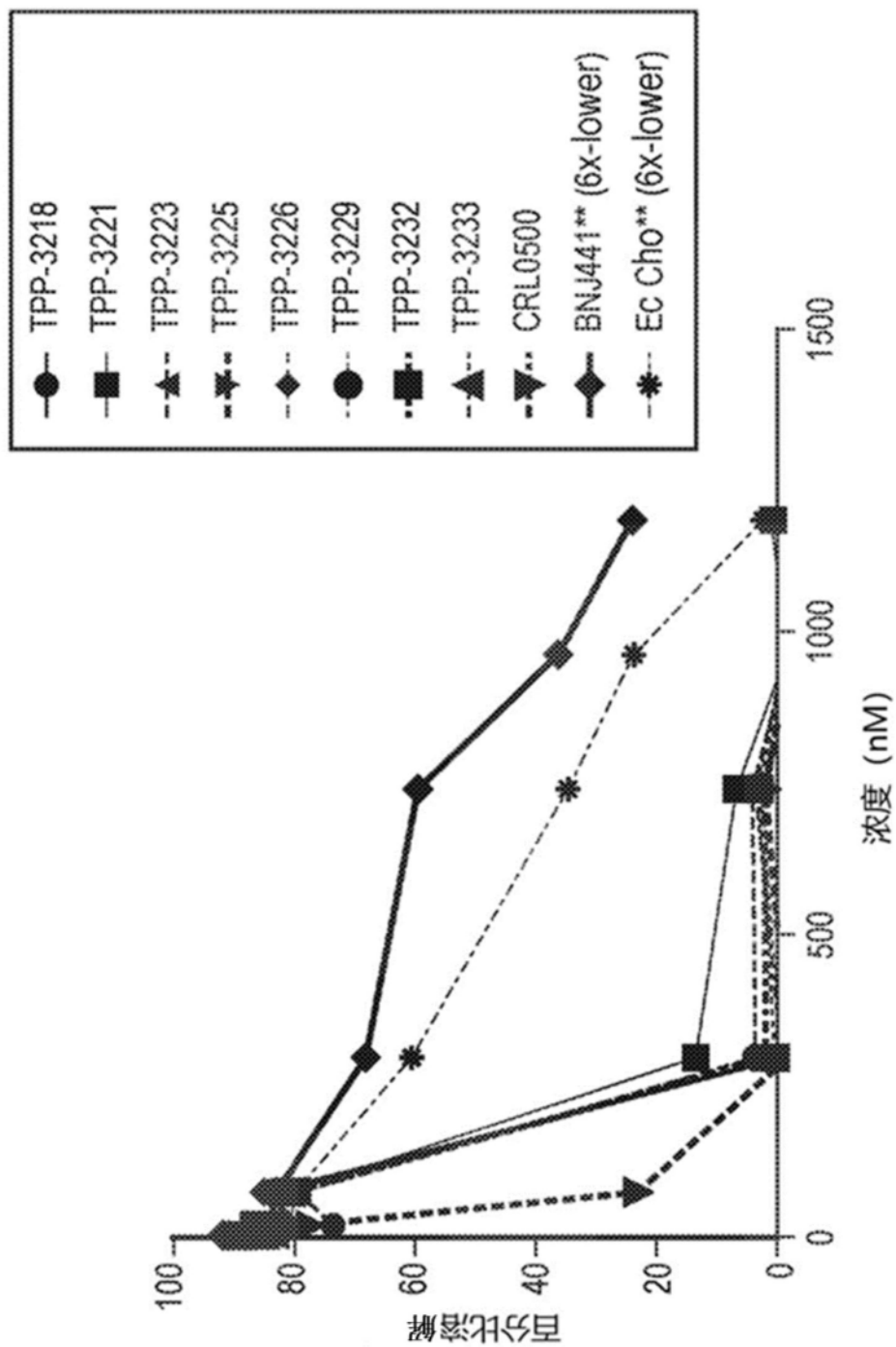


图9A

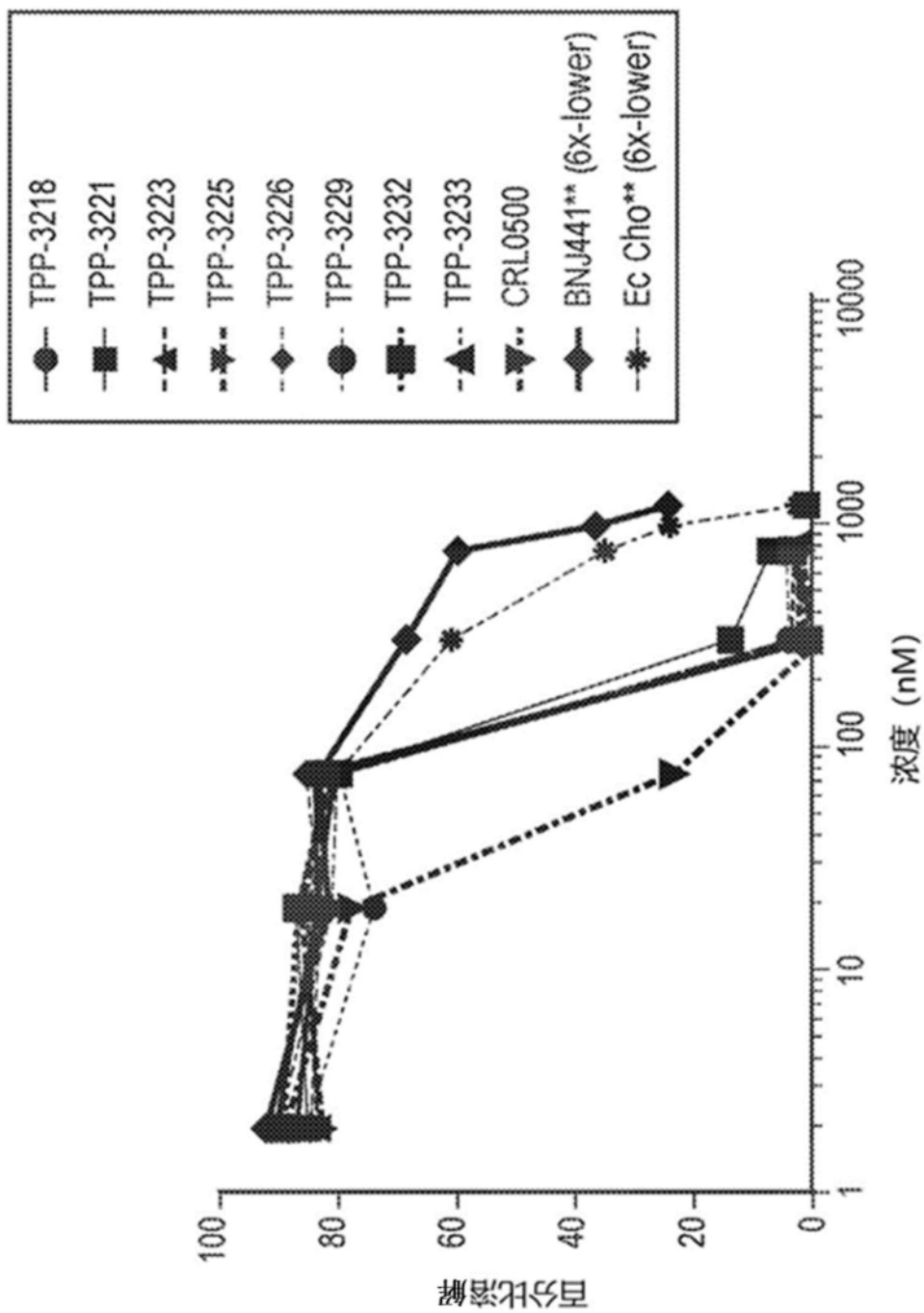


图9B

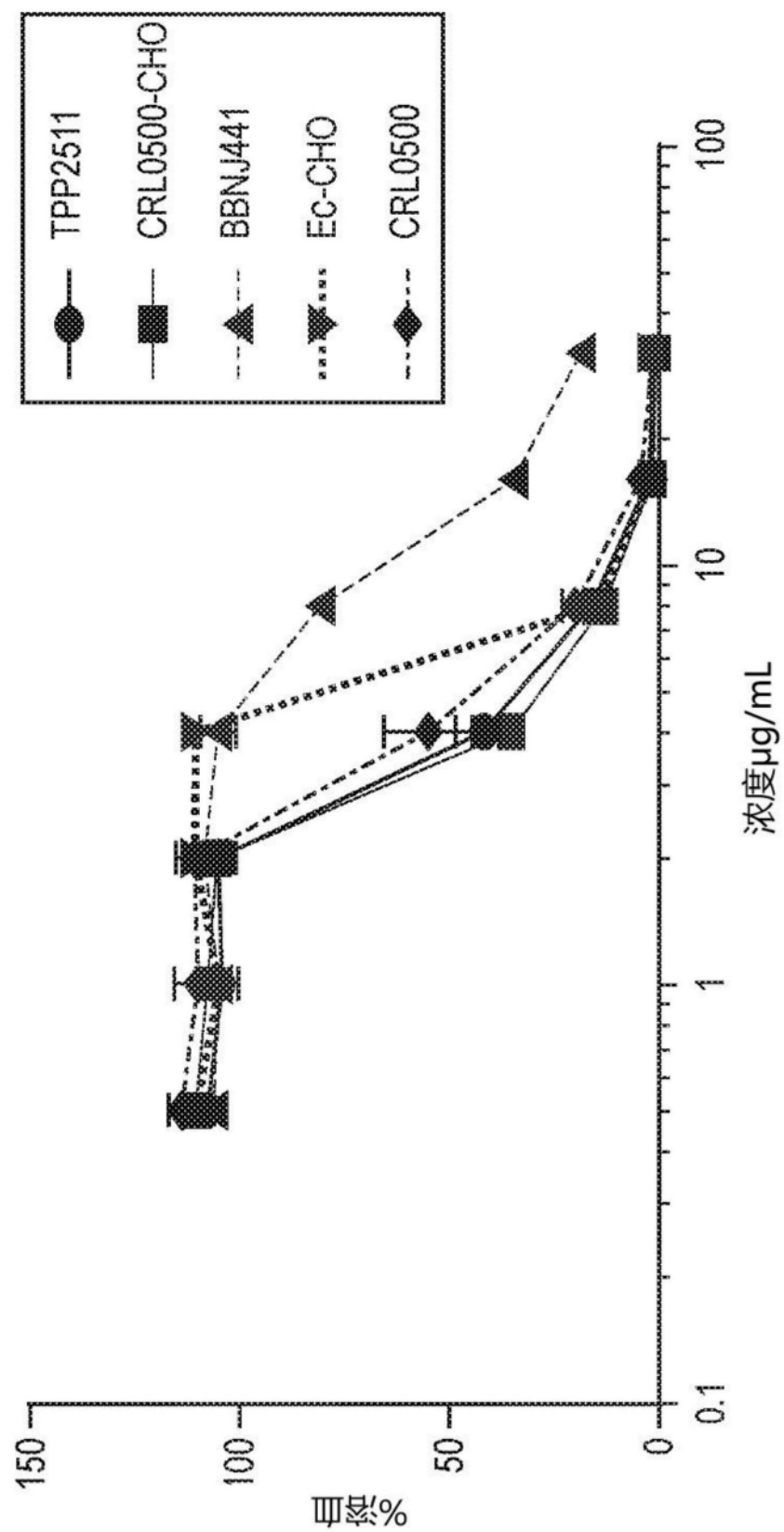


图10

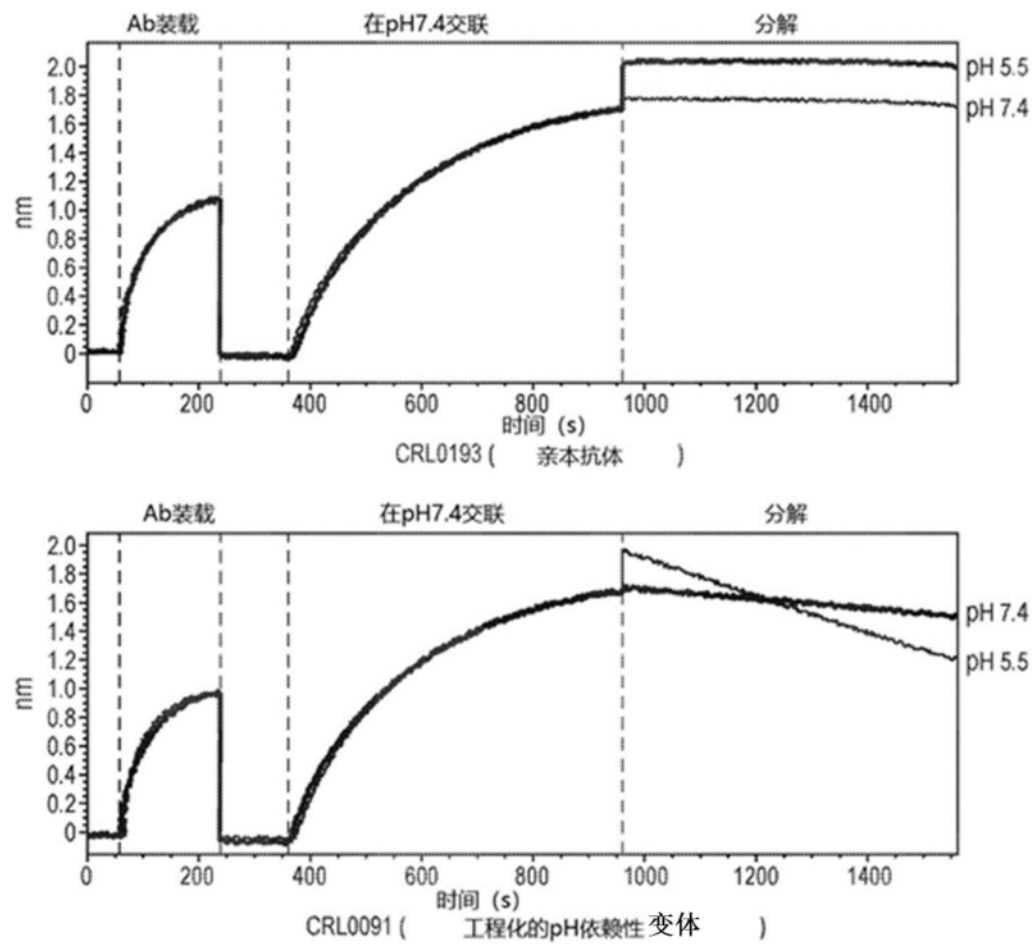


图11A

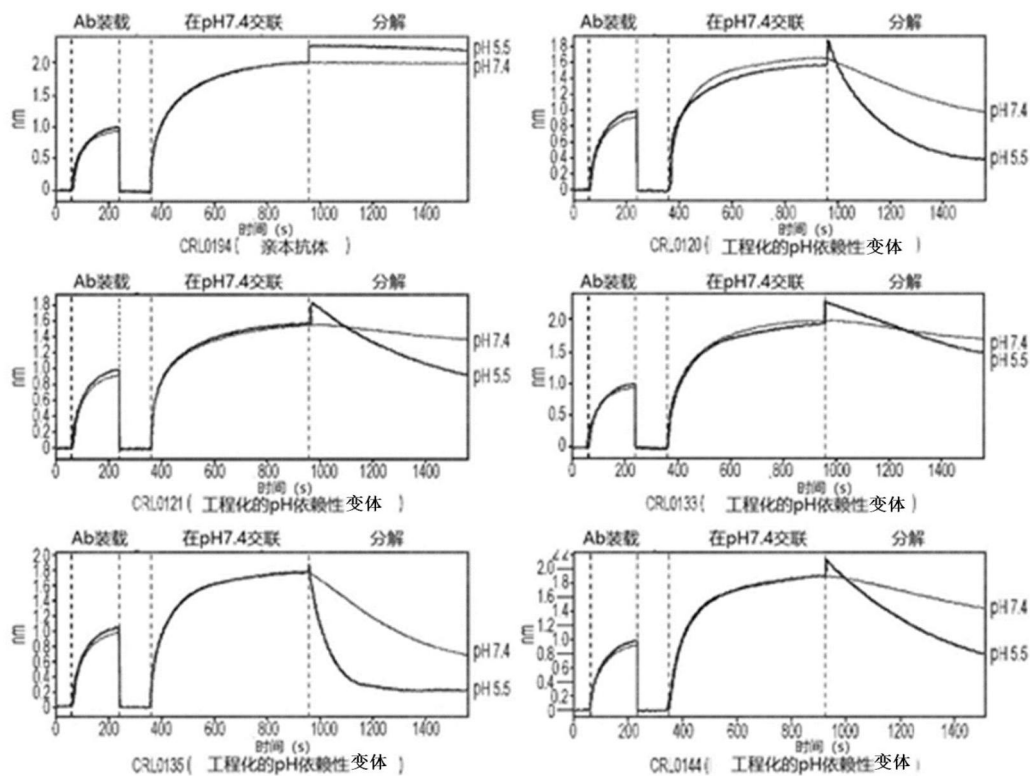


图11B

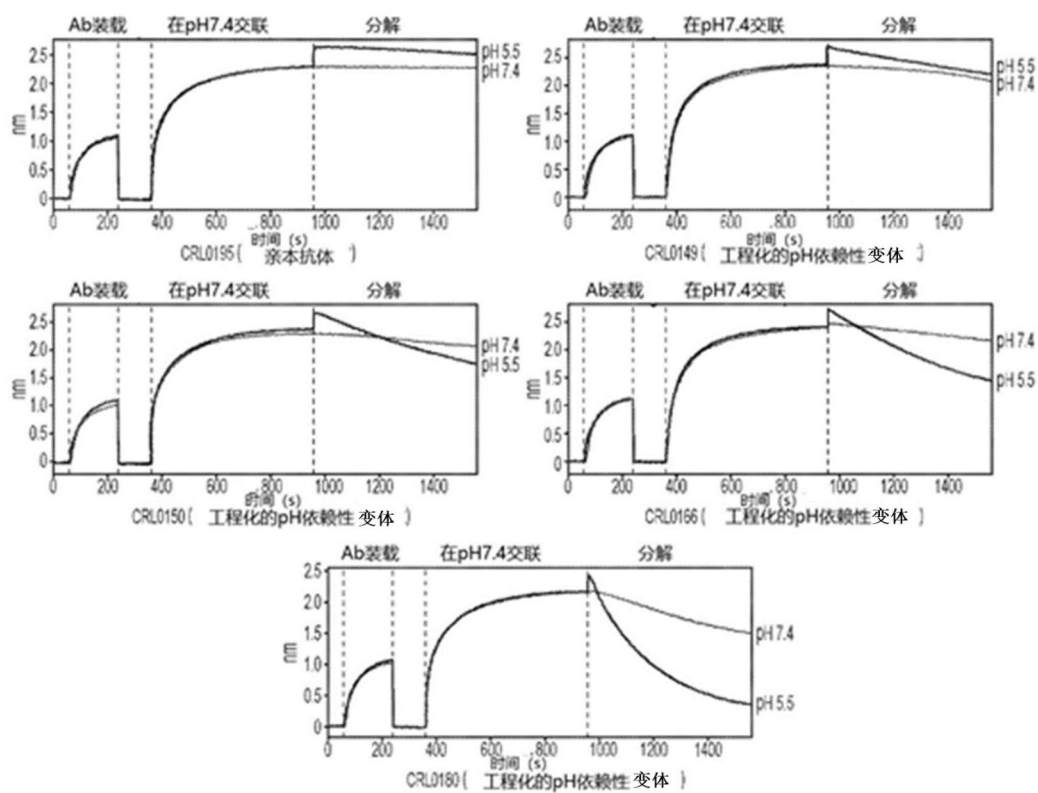


图11C

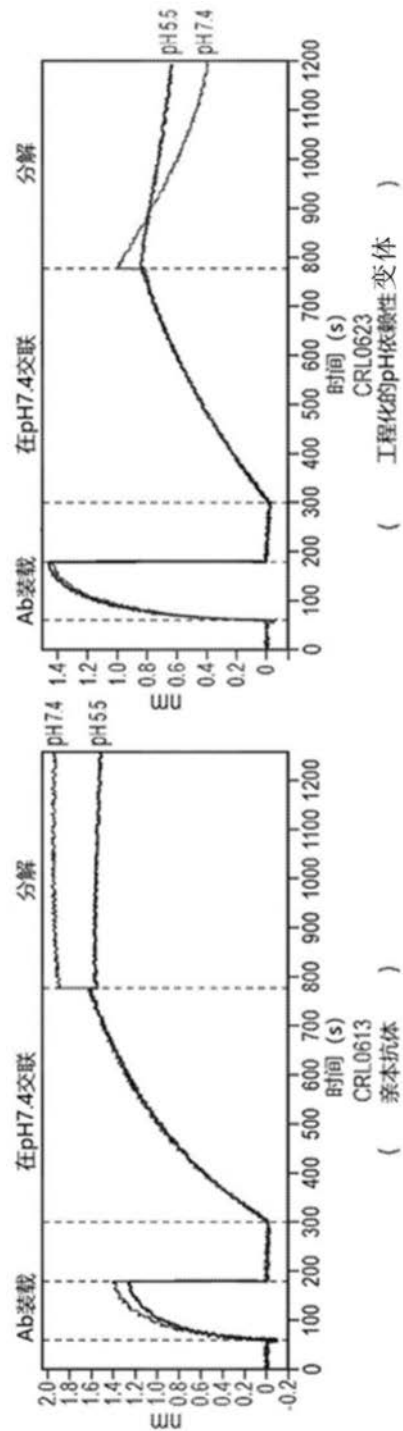


图11D

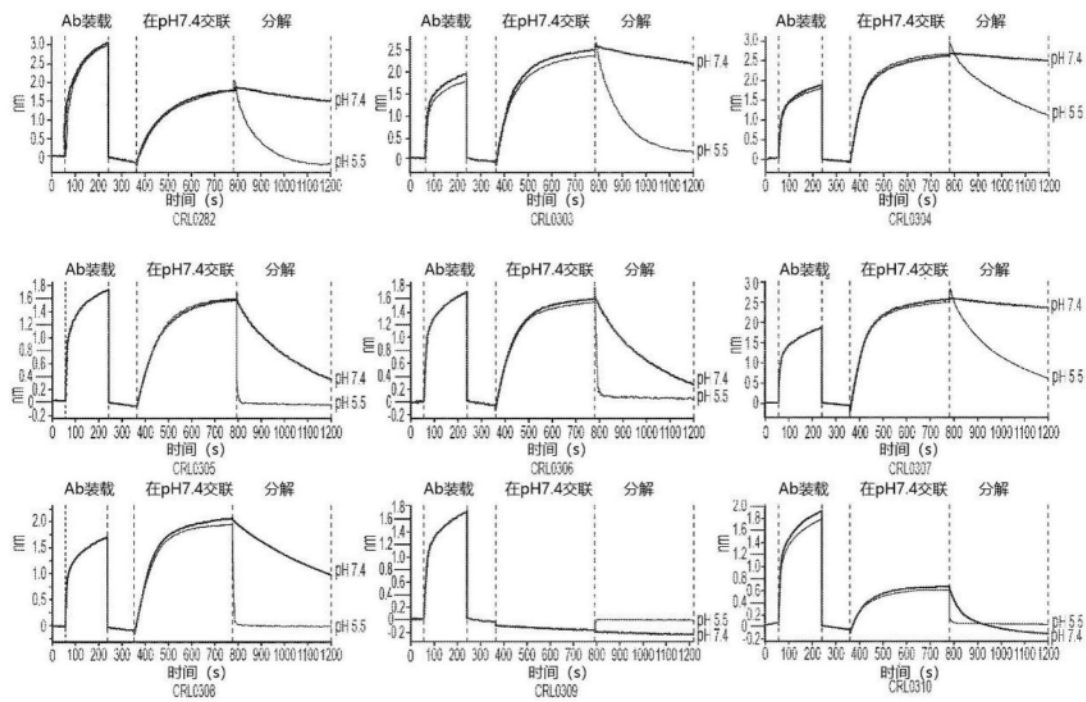


图12A

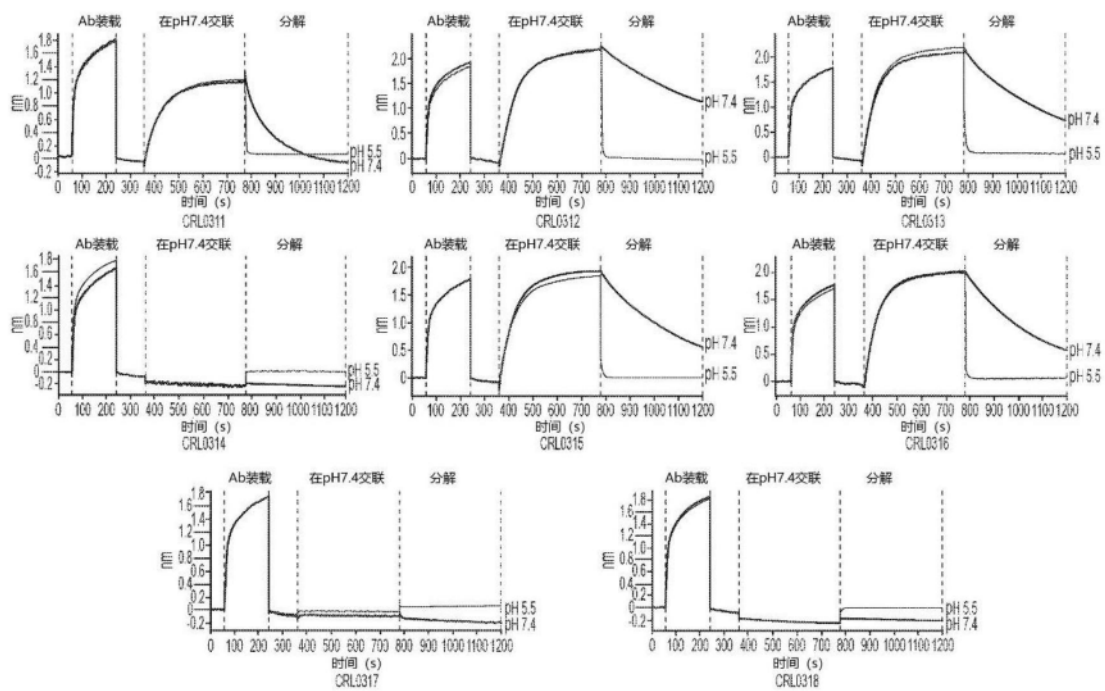


图12B