



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115043940 A

(43) 申请公布日 2022.09.13

(21) 申请号 202210227069.2

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.08

A61K 47/68 (2017.01)

(66) 本国优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

202110254786.X 2021.03.09 CN

(71) 申请人 天辰生物医药(苏州)有限公司

地址 200000 上海市浦东新区碧波路518号
317室

(72) 发明人 张大挺 马海立 刘恒

(74) 专利代理机构 上海巛石知识产权代理事务
所(普通合伙) 31309

专利代理师 张琤 蒋舫玮

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书1页 说明书19页
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

抗人血清白蛋白抗体及其应用

(57) 摘要

本申请涉及一种抗人血清白蛋白抗体及其应用,所述抗人血清白蛋白抗体以约 $9E-09M$ 或以下的 K_D 值与人血清白蛋白特异性结合。所述抗人血清白蛋白抗体与人血清白蛋白结合后,不会降低或者抑制人血清白蛋白与新生儿受体的结合。

1. 分离的抗原结合蛋白,其具有下述性质中的一种或多种:
 - a) 在Octet测定中,以约 $9E-09M$ 或以下的 K_D 值与人血清白蛋白特异性结合;
 - b) 在Octet测定中,以约 $3.5E-08M$ 或以下的 K_D 值与食蟹猴血清白蛋白特异性结合;
 - c) 与人血清白蛋白结合后,不会降低或者抑制人血清白蛋白与新生儿受体的结合。
2. 根据权利要求1所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3包含选自下述任一组的氨基酸序列:
 - a) HCDR1:SEQ ID NO:1,HCDR2:SEQ ID NO:3,和HCDR3:SEQ ID NO:5;以及
 - b) HCDR1:SEQ ID NO:2,HCDR2:SEQ ID NO:4,和HCDR3:SEQ ID NO:6。
3. 多肽,其包含权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。
4. 免疫缀合物,其包含权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求3所述的多肽。
5. 分离的核酸分子,其编码权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,或者权利要求3所述的多肽。
6. 载体,其包含权利要求5所述的分离的核酸分子。
7. 细胞,其包含权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,权利要求3所述的多肽,权利要求4所述的免疫缀合物,权利要求5所述的分离的核酸分子和/或权利要求6所述的载体。
8. 药物组合物,其包含权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,权利要求3所述的多肽,权利要求4所述的免疫缀合物,权利要求5所述的分离的核酸分子,权利要求6所述的载体,权利要求7所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。
9. 一种人血清白蛋白的检测试剂盒,其包含权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求3所述的多肽。
10. 权利要求1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和/或权利要求3所述的多肽在制备预防和/或治疗疾病或病症的药物中的用途。

抗人血清白蛋白抗体及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医药领域,具体的涉及一种抗人血清白蛋白抗体及其应用。

背景技术

[0002] 人血清白蛋白(Human Serum Albumin,HSA)是主要的血浆蛋白,其由约591个氨基酸组成,分子量约67Kd。在抗体制备过程中,其作为载体蛋白用于半抗原的偶联,也常作为分子量标准蛋白用于电泳或色谱层析。Holt等人已经通过使用抗血清白蛋白结构域抗体延长短期药物的半衰期(Holt等人,Protein Engineering,Design and Selection 21(2008) 283S28288)。

[0003] 目前,已知的抗人血清白蛋白抗体还存在选择性不强、亲和力弱等缺陷。因此,有必要开发对人血清白蛋白亲和力高、特异性强的新型抗人血清白蛋白抗体。

发明内容

[0004] 本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白,其具有下述性质中的一种或多种:1)在Octet测定中,以约 $9E-09M$ 或以下的 K_D 值与人血清白蛋白特异性结合;2)在Octet测定中,以约 $3.5E-08M$ 或以下的 K_D 值与食蟹猴血清白蛋白特异性结合;以及3)与人血清白蛋白结合后,不会降低或者抑制人血清白蛋白与新生儿受体的结合。

[0005] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR3,所述HCDR3包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0006] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR2,所述HCDR2包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0007] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR1,所述HCDR1包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0008] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区VH,所述VH包含所述HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,且所述HCDR3包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0009] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3包含选自下述任意一组的氨基酸序列:

[0010] a) HCDR1:SEQ ID NO:1,HCDR2:SEQ ID NO:3,和HCDR3:SEQ ID NO:5;以及

[0011] b) HCDR1:SEQ ID NO:2,HCDR2:SEQ ID NO:4,和HCDR3:SEQ ID NO:6。

[0012] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR1,所述H-FR1的C末端与所述HCDR1的N末端直接或间接地相连,且所述H-FR1包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0013] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR2,所述H-FR2位于所述HCDR1与所述HCDR2之间,且所述H-FR2包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序

列。

[0014] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR3,所述H-FR3位于所述HCDR2与所述HCDR3之间,且所述H-FR3包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0015] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR4,所述H-FR4的N末端与所述HCDR3的C末端直接或间接地相连,且所述H-FR4包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR1,H-FR2,H-FR3和H-FR4,所述H-FR1包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;所述H-FR2包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;所述H-FR3包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;且所述H-FR4包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白中所述H-FR1、H-FR2、H-FR3和H-FR4包含选自下述任意一组的氨基酸序列:

[0018] a) H-FR1:SEQ ID NO:7,H-FR2:SEQ ID NO:9,H-FR3:SEQ ID NO:11和H-FR4:SEQ ID NO:13;以及

[0019] b) H-FR1:SEQ ID NO:8,H-FR2:SEQ ID NO:10,H-FR3:SEQ ID NO:12和H-FR4:SEQ ID NO:14。

[0020] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含重链可变区VH,所述VH包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包括抗体或其抗原结合片段。

[0022] 在某些实施方式中,所述抗原结合片段选自下组:Fab,Fab',F(ab)2,Fv片段,F(ab')2,scFv,di-scFv,VHH和/或dAb。

[0023] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包括VHH或其抗原结合片段。

[0024] 在某些实施方式中,所述抗体选自下组:单克隆抗体、嵌合抗体和全人源抗体。

[0025] 在某些实施方式中,所述分离的抗原结合蛋白包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0026] 另一方面,本申请提供了一种或多种多肽,其包含所述分离的抗原结合蛋白。

[0027] 另一方面,本申请提供了一种或多种免疫缀合物,其包含所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

[0028] 在某些实施方式中,所述的免疫缀合物还包括药学上可接受的治疗剂。

[0029] 在某些实施方式中,所述治疗剂选自下组:细胞毒性剂和细胞抑制剂。

[0030] 另一方面,本申请提供了一种或多种分离的核酸分子,其编码所述分离的抗原结合蛋白,或者所述的多肽。

[0031] 另一方面,本申请提供了一种或多种载体,其包含所述分离的核酸分子。

[0032] 另一方面,本申请提供了一种或多种细胞,其包含所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述分离的核酸分子和/或所述的载体。

[0033] 另一方面,本申请提供了制备所述分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽的方法,所述方法包括在使得所述的分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽表达的条件下,培养所述的细胞。

[0034] 另一方面,本申请提供了一种或多种药物组合物,其包含所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述分离的核酸分子,所述的载体,所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。

[0035] 另一方面,本申请提供了一种用于检测人血清白蛋白的方法,其包括:施用所述分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

[0036] 另一方面,本申请提供了一种人血清白蛋白的检测试剂盒,其包含所述分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

[0037] 另一方面,本申请提供了一种所述分离的抗原结合蛋白或所述的多肽在制备试剂盒中的用途。

[0038] 另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽在制备预防和/或治疗疾病或病症的药物中的用途。

[0039] 另一方面,本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述的分离的核酸分子,所述的载体,所述的细胞和/或所述的药物组合物,其用于预防、缓解和/或治疗疾病或病症。

[0040] 另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述分离的核酸分子,所述的载体,和/或所述的细胞。

[0041] 本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的,本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地,本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的,而非为限制性的。

附图说明

[0042] 本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述 of 的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明如下:

[0043] 图1显示的是本申请所述抗原结合蛋白与HSA的结合活性。

[0044] 图2显示的是本申请所述抗原结合蛋白能够结合与FcRn结合后的HSA。

[0045] 图3显示的是本申请所述抗原结合蛋白能够结合与FcRn结合后的HSA。

[0046] 图4显示的是阴性对照不能够结合与FcRn结合后的HAS。

具体实施方式

[0047] 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

[0048] 术语定义

[0049] 在本申请中,术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境发生了改变,或从天然环境下分离出该物质,或二者情况均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在某种未被分

离的多聚核苷酸或多肽,而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质,也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0050] 在本申请中,术语“抗原结合蛋白”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如,在本申请中,术语“抗原结合蛋白”可包括“抗体”或“抗原结合片段”。例如,所述抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白,并且可包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”可包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物,包括但不限于鼠源抗体、人抗体(全人源抗体)、嵌合抗体、单链抗体(例如,scFv),以及与抗原结合的抗体片段(例如,Fab、Fab',VHH和(Fab)2片段)。术语“抗体”还可包括抗体的所有重组体形式,例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及本文所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。在本申请中,所述“抗体”可以包括单域抗体。

[0051] 在本申请中,术语“抗原结合片段”通常是指抗体中发挥特异性结合抗原功能的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可通过抗体的全长片段来实现。抗体的抗原结合功能也可通过以下来实现:包括Fv、ScFv、dsFv、Fab、Fab'或F(ab')₂的片段的重链,或者,包括Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'或F(ab')₂的片段的轻链。(1) Fab片段,通常为由VL、VH、CL和CH结构域组成的一价片段;(2) F(ab')₂片段,包含通过铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(3) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(4) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(5) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等,(1989) Nature341:544-546);(6) 分离的互补决定区(CDR)和(7)可任选地通过接头连接的两个或以上分离的CDR的组合。例如,还可包括由VL和VH配对形成的一价单链分子Fv(scFv)(参见Bird等(1988) Science 242:423-426;以及Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。例如,还可包括缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体VHH(例如,可参见康晓圳等,生物工程学报,2018,34(12):1974-1984)。所述“抗原结合部分”还可包括融合蛋白,所述融合蛋白包含选自以下的结合结构域:(1)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽;(2)与铰链区融合的免疫球蛋白重链CH₂恒定区;和(3)与CH₂恒定区融合的免疫球蛋白重链CH₃恒定区。

[0052] 在本申请中,术语“单域抗体”通常是指缺失抗体轻链而只有重链可变区的一类抗体。研究发现,双峰驼、单峰驼、羊驼和美洲驼中存在一种仅由重链组成、但具有完整功能的单域抗体(heavy chain antibody,hcAb),其可变区(variable domains of the hcAb,简称为VHH)分子量仅为常规抗体的1/10,是目前可以得到的具有完整抗体功能的最小分子片段,称为单域抗体(single domain antibody,sdAb)。单域抗体与其它抗体相比,具有免疫原性低、分子小、穿透力强等优点,因此其在基础研究、药物开发、疾病治疗等领域有广阔的应用前景。例如,单域抗体可以来自羊驼。单域抗体可由重链可变区(VH)构成。术语“重链可变区”通常是指抗原结合片段的重链的氨基末端结构域。重链可变区可进一步被区分为称为互补决定区(CDR)的高变区,它们散布在成为框架区(FR)的更保守的区域中。每个重链可变区可由三个CDR和四个FR区构成,它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列:H-FR1、HCDR1、H-FR2、HCDR2、H-FR3、HCDR3和H-FR4。重链可变区含有与抗原(例如,HSA)相互作用的结合结构域。所述CDRs的确切边界已根据不同系统不同地限定。由Kabat(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of

Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 描述的系统, 不仅提供了可应用于抗原结合蛋白的任何可变区的明确残基编号系统, 还提供了限定CDRs的精确残基边界。这些CDRs可以被称为Kabat CDRs。Chothia和同事(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) 以及 Chothia等人, *Nature* 342:877-883 (1989)) 发现尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性, 但是Kabat CDRs内的某些亚部分采取几乎相同的肽主链构象。这些亚部分命名为L1、L2和L3或H1、H2和H3, 其中“L”和“H”分别指轻链和重链区域。这些区域可以被称为Chothia CDRs, 所述Chothia CDRs具有与Kabat CDRs重叠的边界。与Kabat CDRs重叠的限定CDRs的其他边界已由Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) 和MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)) 描述。另外, 其他的CDR边界定义可能不严格地遵循上述系统之一, 但仍将与Kabat CDRs重叠, 尽管按照特定残基或残基组或甚至整个CDRs并不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或加长。在本申请中, CDRs可用Kabat编号系统定义。在本申请中, 术语“单域抗体”可与“纳米抗体”、“VHH”互换使用。

[0053] 在本申请中, 术语“单克隆抗体”通常是指一群基本同源的抗体, 即包含该群的各个抗体除了可能的以微量存在的天然发生的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 直接针对单个抗原性位点。例如, 所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备或者通过使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中产生。单克隆抗体也可以得自噬菌体抗体文库, 使用例如Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 和Marks et al., *Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 所述的技术进行。

[0054] 在本申请中, 术语“嵌合抗体”通常是指这样的抗体, 其中每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源, 或者属于特定的类别, 而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。例如, 轻链和重链的可变区均来自一个动物物种(如小鼠、大鼠等)的抗体的可变区, 而恒定部分则与来自另一物种(如人)的抗体序列同源。例如, 为获得嵌合抗体, 可利用非人源的B细胞或杂交瘤细胞产生可变区, 而与其组合的恒定区则来自人。所述可变区具有易于制备的优点, 并且其特异性不受与其组合的恒定区的来源的影响。同时, 由于嵌合抗体的恒定区可来源于人类, 因此嵌合在注射时抗体引发免疫应答的可能性会低于使用恒定区为非人来源的抗体。

[0055] 在本申请中, 术语“鼠源抗体”通常是指可变区框架和CDR区得自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外, 如果抗体包含恒定区, 其也得自小鼠种系免疫球蛋白序列。本申请的鼠源抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基, 例如通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变而导入的突变。然而, 术语“鼠源抗体”不包括在小鼠框架序列中插入得自其他哺乳动物物种的CDR序列的抗体。

[0056] 在本申请中, 术语“HSA蛋白”或“HSA抗原”可以互换使用, 并且包括HSA的任何功能活性片段、变体和同源物, 其由细胞天然表达或在用HSA基因转染的细胞上表达。在本申请中, HSA在NCBI中的登录号可以为NP_000468.1。例如, 所述“功能活性片段”可以包括保留至少一种天然存在的蛋白质的内源功能(例如, 与本申请所述的抗原结合蛋白结合)的片段。例如, 所述“功能活性片段”可以包括与本申请的抗原结合蛋白结合的结构域。

[0057] 除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸之外, 本申请还可包括其功能活性片段、衍生物、类似物、同源物及其片段。

[0058] 术语“功能活性片段”指与天然存在序列具有基本上同一的氨基酸序列或由基本

上同一的核苷酸序列编码并能够具有天然存在序列的一种或多种活性的多肽。在本申请的上下文中,任何给定序列的功能活性片段是指其中残基的特定序列(无论是氨基酸或核苷酸残基)已经经过修饰而使得所述多肽或多核苷酸基本上保留至少一种内源功能的序列。可以通过天然存在的蛋白质和/或多核苷酸中存在的至少一个氨基酸残基和/或核苷酸残基的添加、缺失、取代、修饰、替换和/或变异来获得编码功能活性片段的序列,只要保持原来的功能活性即可。

[0059] 在本申请中,术语“衍生物”通常是指本申请的多肽或多核苷酸而言包括自/对序列的一个(或多个)氨基酸残基的任何取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加,只要所得的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源功能。

[0060] 在本申请中,术语“类似物”通常对多肽或多核苷酸而言,包括多肽或多核苷酸的任何模拟物,即拥有该模拟物模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

[0061] 通常,可以进行氨基酸取代,例如至少1个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或20个以上)氨基酸取代,只要经修饰的序列基本上保持需要的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。

[0062] 在本申请中,术语“同源物”通常是指与天然存在序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%相同的氨基酸序列。通常,同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑,也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中,提及的氨基酸序列或核苷酸序列的SEQ ID NO中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的SEQ ID NO的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。为了确定序列同一性,可进行序列比对,其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行,例如,使用BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE或MegaAlign(DNASTAR)软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数,包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

[0063] 用于本申请的蛋白质或多肽也可以具有氨基酸残基的缺失、插入或取代,所述氨基酸残基产生沉默的变化并导致功能上等同的蛋白质。可以根据残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行有意的氨基酸取代,只要保留内源性功能即可。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且含具有相似亲水性值的不带电极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0064] 在本申请中,术语“免疫缀合物”通常是指所述其他治疗剂与所述分离的抗原结合蛋白缀合(例如,通过连接分子共价相连)而形成的缀合物,该缀合物可以通过所述分离的抗原结合蛋白与靶细胞上的抗原的特异性结合,将所述其他治疗剂递送至靶细胞(例如,肿瘤细胞)。然后所述免疫缀合物经所述内化,最终进入靶细胞内部(例如,进入溶酶体等泡囊体),此时所述免疫缀合物中的连接分子可以裂解,释放所述其他试剂从而发挥其细胞毒性效应。此外,所述抗原也可以由所述靶细胞分泌,并位于所述靶细胞外的间隙。

[0065] 在本申请中,术语“受试者”通常指人类或非人类动物,包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

[0066] 在本申请中,术语“核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

[0067] 在本申请中,术语“载体”通常是指一种核酸分子,该种核酸分子能够转运与其连接的另一核酸。所述载体可将插入的核酸分子转移到细胞中和/或细胞之间。所述载体可包括主要用于将DNA或RNA插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体,以及主要用于DNA或RNA的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体可以是当引入合适的细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常,通过培养包含所述载体的合适的细胞,所述载体可以产生期望的表达产物。

[0068] 在本申请中,术语“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体,或者能够表达本申请所述的多肽或本申请所述的抗原结合蛋白的个体细胞,细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个细胞的子代。由于天然的,意外的或故意的突变,子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同,但能够表达本申请所述的多肽或抗原结合蛋白即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞(例如大肠杆菌),也可以是真核细胞(例如酵母细胞,例如COS细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HeLa细胞,HEK293细胞,COS-1细胞,NS0细胞或骨髓瘤细胞)。在一些实施方式中,所述细胞可以是免疫细胞。例如,所述免疫细胞可以选自下组:T细胞、B细胞、天然杀伤细胞(NK细胞)、巨噬细胞、NKT细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

[0069] 在本申请中,术语“治疗”通常是指:(i) 预防可能易患疾病、病症和/或病状、但尚未诊断出患病的患者出现该疾病、病症或病状;(ii) 抑制该疾病、病症或病状,亦即遏制其发展;以及(iii) 缓解该疾病、病症或病状,亦即使得该疾病、病症和/或病状和/或与该疾病、病症和/或病状相关联的症状消退。

[0070] 在本申请中,术语“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白质”可互换地使用,通常是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的,它可以包含修饰的氨基酸,并且可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已经被修饰的氨基酸聚合物。这些修饰可以包含:二硫键形成、糖基化、脂化(lipidation)、乙酰化、磷酸化、或任何其他操纵(如与标记组分结合)。术语“氨基酸”包括天然的和/或非天然的或者合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L旋光异构体、以及氨基酸类似物和肽模拟物。

[0071] 在本申请中,术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换地使用,通常是指具有任何长度的核苷酸的聚合形式,如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码区或非编码区、根据连接分析定义的多个座位(一个座位)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、micro-RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针、和引物。多核苷酸可以包含一个或多个经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后,如通过与标记的组分缀合来进一步修饰。

[0072] 在本申请中,术语“ K_D ”(同样地,“ K_D ”或“KD”)通常指“亲和常数”或“平衡解离常

数”，并指在滴定测量中在平衡时、或者通过将解离速率常数(k_d)除以结合速率常数(k_a)所获得的值。使用结合速率常数(k_a)、解离速率常数(k_d)和平衡解离常数(K_D)表示结合蛋白(例如本申请所述的分离的抗原结合蛋白)对抗原(例如，HSA蛋白)的结合亲和力。确定结合和解离速率常数的方法为本领域熟知。使用基于荧光的技术提供了高灵敏度以及在生理缓冲液中在平衡时检查样品的能力。例如，可以通过Octet测定所述 K_D 值，也可以使用其他实验途径和仪器例如BIAcore(生物分子相互作用分析)测定(例如，可以从BIAcoreInternationalAB, aGEHealthcarecompany, Uppsala, 瑞典获得的仪器)。另外，也可以使用可以从Sapidyne Instruments (Boise, Idaho)获得的KinExA(动态排阻测定(Kinetic Exclusion Assay))测定所述 K_D 值，或者使用表面等离子共振仪(SPR)测定所述 K_D 值。在本申请中，可以通过胺偶联试剂盒测定所述 K_D 值。

[0073] 在本申请中，术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

[0074] 在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。在某些情形中，“包含”也涵盖仅包括指定的组分的情况。例如，包含也表示为也表示“由……组成”的含义。

[0075] 在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%的范围内变动。

[0076] 在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

[0077] 发明详述

[0078] 一方面，本申请提供一种分离的抗原结合蛋白，其在Octet测定中，可以以约 $9E-09M$ 或以下的 K_D 值(例如，所述 K_D 值不高于约 $9E-09M$ 、不高于约 $8.5E-09M$ 、不高于约 $8E-09M$ 、不高于约 $7.5E-09M$ 、不高于约 $7E-09M$ 、不高于约 $6.5E-09M$ 、不高于约 $6E-09M$ 、不高于约 $5E-09M$ 、不高于约 $4E-09M$ 、不高于约 $3E-09M$ 、不高于约 $2E-09M$ 、不高于约 $1E-09M$ 、不高于约 $9E-10M$ 、不高于约 $8E-10M$ 、不高于约 $7E-10M$ 、不高于约 $6E-10M$ 、不高于约 $5E-10M$ 、不高于约 $4E-10M$ 、不高于约 $3E-10M$ 、不高于约 $2E-10M$ 或不高于约 $1E-10M$ 或以下)与人血清白蛋白特异性结合。

[0079] 在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以以约 $3.5E-08M$ 或以下的 K_D 值(例如，所述 K_D 值不高于约 $3E-08M$ 、不高于约 $2.5E-08M$ 、不高于约 $2E-08M$ 、不高于约 $1.5E-08M$ 、不高于约 $1E-08M$ 、不高于约 $9E-09M$ 、不高于约 $8E-09M$ 、不高于约 $7E-09M$ 、不高于约 $6E-09M$ 、不高于约 $5E-09M$ 、不高于约 $4E-09M$ 、不高于约 $3E-09M$ 、不高于约 $2E-09M$ 或不高于约 $1E-09M$ 或以下)与食蟹猴血清白蛋白特异性结合。

[0080] 在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白与人血清白蛋白结合后，通常不会降低或者抑制人血清白蛋白与新生儿受体的结合。

[0081] 例如，先用本申请的抗原结合蛋白与HSA结合，待饱和后，可通过Octet系统检测HSA与FcRn的结合(例如，可通过 K_D 值判断HSA是否与FcRn结合)。

[0082] 一方面，本申请提供一种分离的抗原结合蛋白，其可以包含抗体重链可变区VH中的至少一个CDR，所述VH可以包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0083] 在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白的HCDR可以通过任何形式划分，只要VH与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列相同，以任何形式划分得到的HCDR都可落

入本申请的保护范围内。

[0084] 抗体的CDR又称互补决定区,是可变区的一部分。该区域的氨基酸残基可以与抗原或抗原表位接触。抗体CDR可以通过多种编码系统来确定,如CCG、Kabat、Chothia、IMGT、AbM、综合考虑Kabat/Chothia等。这些编码系统为本领域内已知,具体可参见,例如,<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum>。本领域技术人员可以根据抗体的序列和结构,用不同的编码系统确定出CDR区。使用不同的编码系统,CDR区可能存在差别。在本申请中,所述CDR涵盖根据任何CDR划分方式划分得到的CDR序列;也涵盖其变体,所述变体包括所述CDR的氨基酸序列经过取代、缺失和/或添加一个或多个氨基酸。例如1-30个、1-20个或1-10个,又例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个氨基酸取代、缺失和/或插入;也涵盖其同源物,所述同源物可以为与所述CDR的氨基酸序列具有至少约85%(例如,具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的)序列同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,本申请所述分离的抗原结合蛋白通过Kabat编码系统定义。

[0085] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可包含重链可变区VH,所述VH可包含HCDR1、HCDR2和HCDR3中的至少一个、两个或三个。

[0086] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白的HCDR3的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0087] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白的HCDR2的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0088] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在本申请中,所述抗原结合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白的HCDR1的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0089] 例如,所述抗原结合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0090] 例如,所述抗原结合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB21或与其具有相同HCDR3(例如,与其具有相同HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。

[0091] 例如,所述抗原结合蛋白的HCDR1可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的HCDR2可包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的HCDR3可包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB22或与其具有相同HCDR3(例如,与其具有相同HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。

[0092] 例如,所述抗原结合蛋白的VH可包含框架区H-FR1,H-FR2,H-FR3和H-FR4。

[0093] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0094] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0095] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列。

- [0096] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。
- [0097] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。
- [0098] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。
- [0099] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。
- [0100] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0101] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0102] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB21或与其具有相同H-FR1-4的抗原结合蛋白。
- [0103] 在本申请中,所述抗原结合蛋白的H-FR1可包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR2可包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;所述抗原结合蛋白的H-FR3可包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;且所述抗原结合蛋白的H-FR4可包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB22或与其具有相同H-FR1-4的抗原结合蛋白。
- [0104] 在本申请中,所述抗原结合蛋白可包含重链可变区,所述重链可变区可包含HCDR1-3以及H-FR1-4。例如,所述HCDR1可包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;所述HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;所述HCDR3可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;所述H-FR1可包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;所述H-FR2可包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列;所述H-FR3可包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;所述H-FR4可包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB21或与其具有相同HCDR(例如,与其具有相同的HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。例如,所述抗原结合蛋白的重链可变区可包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。例如,编码所述抗原结合蛋白的核苷酸序列可以如SEQ ID NO:17所示。在某些情况下,所述抗原结合蛋白可包括与所述LB21具有相同VH的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。
- [0105] 在本申请中,所述抗原结合蛋白可包含重链可变区,所述重链可变区可包含HCDR1-3以及H-FR1-4。例如,所述HCDR1可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;所述HCDR2可包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;所述HCDR3可包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;所述H-FR1可包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;所述H-FR2可包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;所述H-FR3可包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;所述H-FR4可包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。例如,所述抗原结合蛋白可包括单域抗体LB21或与其具有相同HCDR(例如,与其具有相同的HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。例如,所述抗原结合蛋白的重链可变区可包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。例如,编码所述抗原结合蛋白的核苷酸序列可以如SEQ ID NO:18所示。在某些情况下,所述抗原结合蛋白可包括与所述LB22具有相同VH的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。

[0106] 在本申请中,所述分离的抗原结合蛋白可以与参比抗体竞争结合人血清白蛋白,所述参比抗体可包含重链可变区VH,所述VH可包含HCDR1、HCDR2和HCDR3中的至少一个、两个或三个。

[0107] 在本申请中,所述参比抗体的HCDR3可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。在本申请中,所述参比抗体的HCDR3可包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的HCDR3的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0108] 在本申请中,所述参比抗体的HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。在本申请中,所述参比抗体的HCDR2可包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的HCDR2的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0109] 在本申请中,所述参比抗体的HCDR1可包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在本申请中,所述参比抗体的HCDR1可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体的HCDR1的序列可通过Kabat编码系统定义。

[0110] 例如,所述参比抗体的HCDR1可包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;所述参比抗体的HCDR2可包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;且所述参比抗体的HCDR3可包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体可包括单域抗体LB21或与其具有相同HCDR3(例如,与其具有相同HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。

[0111] 例如,所述参比抗体的HCDR1可包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;所述参比抗体的HCDR2可包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;且所述参比抗体的HCDR3可包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。例如,所述参比抗体可包括单域抗体LB22或与其具有相同HCDR3(例如,与其具有相同HCDR1-3)的抗原结合蛋白(例如,单域抗体)。

[0112] 在本申请中,所述参比抗体的重链可变区可包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0113] 在本申请中,所述参比抗体的重链可变区可包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0114] 多肽和免疫缀合物

[0115] 另一方面,本申请提供了一种或多种多肽,其可包含本申请的分离的抗原结合蛋白。例如,所述多肽可包括融合蛋白。例如,所述多肽可包括多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0116] 另一方面,本申请提供了一种或多种免疫缀合物,所述免疫缀合物可包含本申请的分离的抗原结合蛋白。在某些实施方式中,所述免疫缀合物还可包含药学上可接受的治疗剂、标记物和/或检测剂。

[0117] 核酸、载体、细胞和药物组合物

[0118] 另一方面,本申请还提供了一种或多种核酸分子,所述一种或多种核酸分子可编码本申请所述分离的抗原结合蛋白。例如,所述一种或多种核酸分子中的每一个核酸分子可以编码完整的所述抗原结合蛋白,也可以编码其中的一部分(例如,HCDR1-3、重链可变区中的一种或多种)。

[0119] 例如,当核酸分子分别编码所述抗原结合蛋白的一部分时,核酸分子编码的产物合在一起可以形成有功能的(例如,可结合HSA)的本申请的分离的抗原结合蛋白。

[0120] 本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如,其可以通过以下方法产生或合成

的：(i) 在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增产生的，(ii) 通过克隆重组产生的，(iii) 纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者 (iv) 合成的，例如通过化学合成。例如，所述分离的核酸可以通过重组DNA技术制备的核酸分子。

[0121] 在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述分离的抗原结合蛋白的核酸，这些方法包括但不限于，采用逆转录PCR和PCR获得本申请所述分离的抗原结合蛋白的核酸分子。

[0122] 另一方面，本申请提供了一种或多种载体，其包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中，所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的5' 非转录序列和5' 及3' 非翻译序列，例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。例如，5' 非转录表达控制序列可包含启动子区，启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。所述表达控制序列还可包括增强子序列或上游活化子序列。在本申请中，适当的启动子可包括，例如用于SP6、T3和T7聚合酶的启动子、人U6RNA启动子、CMV启动子及其人工杂合启动子(如CMV)，其中启动子的某部分可与其他细胞蛋白(如人GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶)基因启动子的某部分融合，其可包含或不包含另外的内含子。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

[0123] 所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体可为表达载体。例如，所述载体可为病毒载体。可以将病毒载体直接给予至患者(体内)或可以通过间接的形式，例如，在体外使用病毒处理细胞，然后将处理过的细胞给予至患者(离体)。病毒载体技术在本领域中是公知的，并在例如Sambrook等(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。常规的基于病毒的系统可以包括用于基因转移的逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体以及单纯疱疹病毒载体。在某些情形中，可以用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒的方法将基因转移整合进宿主基因组中，使插入的基因长期表达。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并典型地产生较高病毒效价的逆转录病毒载体。慢病毒载体可包含长末端重复序列5' LTR和截短的3' LTR、RRE、rev应答元件(cPPT)、中央终止序列(CTS)和/或翻译后调控元件(WPRE)。本申请所述的载体可以被引入细胞。

[0124] 另一方面，本申请提供了一种细胞。所述细胞可包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、一种或多种核酸分子和/或本申请所述的一种或多种载体。例如，每种或每个细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。例如，每种或每个细胞可包含多个(例如，2个或以上)或多种(例如，2种或以上)本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如原核细胞(例如，细菌细胞)、CHO细胞、NS/O细胞、HEK293T细胞、293F细胞或HEK293A细胞，或者其他真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引

入所述宿主细胞中,例如电穿孔、lipofectine转染、lipofectamin转染等。例如,所述细胞可以包括酵母细胞。例如,所述细胞可以包括大肠杆菌细胞。例如,所述细胞可以包括哺乳动物细胞。例如,所述细胞可以包括免疫细胞。

[0125] 所述细胞可以包括免疫细胞。在某些情形中,所述细胞可以包括免疫细胞。例如,所述细胞可包括T细胞、B细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、NKT细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、淋巴细胞、白细胞和/或外周血单个核细胞。

[0126] 另一方面,本申请提供了一种药物组合物。所述药物组合物可包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、所述的多肽、所述的免疫缀合物、所述分离的核酸分子、所述的载体、所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/或赋形剂。在本申请中,所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂。除非与本申请所述的细胞不相容,否则任何常规介质或试剂均可以考虑用于本申请的药物组合物中。在本申请中,所述药学上可接受的赋形剂可以包括在药物制剂中除主药以外的附加物,也可称为辅料。例如,所述赋形剂可以包括片剂中的粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂。例如,所述赋形剂可以包括中药丸剂中的酒、醋、药汁等。例如,所述赋形剂可以包括半固体制剂软膏剂、霜剂中的基质部分。例如,所述赋形剂可以包括液体制剂中的防腐剂、抗氧剂、矫味剂、芳香剂、助溶剂、乳化剂、增溶剂、渗透压调节剂、着色剂。

[0127] 检测方法、试剂盒、用途和方法

[0128] 另一方面,本申请提供了一种用于检测人血清白蛋白的存在和/或含量的方法,其可包括施用所述分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

[0129] 在本申请中,所述方法可包括体外方法,离体方法,非诊断或非治疗目的的方法。

[0130] 例如,所述方法可包括用于非诊断目的的检测人血清白蛋白的存在和/或含量的方法,其可包括下述步骤:

[0131] 1) 使样品与本申请的抗原结合蛋白接触;以及

[0132] 2) 检测样品结合的所述抗原结合蛋白的存在和/或含量来确定获自受试者的样品中人血清白蛋白的存在和/或表达水平。

[0133] 例如,所述样品可以包括血浆。

[0134] 另一方面,本申请提供了一种试剂盒,其可包含所述分离的抗原结合蛋白或所述的多肽。

[0135] 在本申请中,所述试剂盒还可包含使用说明,所述使用说明记载用于检测人血清白蛋白的存在和/或含量的方法。例如,所述方法可包括体外方法,离体方法,非诊断或非治疗目的的方法。

[0136] 另一方面,本申请提供了一种所述的分离的抗原结合蛋白或所述的多肽在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒可用于检测人血清白蛋白的存在和/或含量的方法。例如,所述方法可包括体外方法,离体方法,非诊断或非治疗目的的方法。

[0137] 另一方面,本申请提供了一种所述分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽在制备药物中的用途,所述药物可用于预防和/或治疗疾病或病症。

[0138] 另一方面,本申请提供了一种所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述的分离的核酸分子,所述的载体,所述的细胞和/或所述的药物组合物,其用于

预防、缓解和/或治疗疾病或病症。

[0139] 另一方面,本申请提供了一种预防和/或治疗疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的所述分离的抗原结合蛋白,所述的多肽,所述的免疫缀合物,所述分离的核酸分子,所述的载体,和/或所述的细胞。

[0140] 本申请还提供了以下具体实施方案:

[0141] 1.分离的抗原结合蛋白,其具有下述性质中的一种或多种:

[0142] a) 在Octet测定中,以约 $9E-09M$ 或以下的 K_D 值与人血清白蛋白特异性结合;

[0143] b) 在Octet测定中,以约 $3.5E-08M$ 或以下的 K_D 值与食蟹猴血清白蛋白特异性结合;以及

[0144] c) 与人血清白蛋白结合后,不会降低或者抑制人血清白蛋白与新生儿受体的结合。

[0145] 2.根据实施方案1所述的分离的抗原结合蛋白,其包含HCDR3,所述HCDR3包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0146] 3.根据实施方案1-2中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含HCDR2,所述HCDR2包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0147] 4.根据实施方案1-3中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含HCDR1,所述HCDR1包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0148] 5.根据实施方案1-4中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含重链可变区VH,所述VH包含所述HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述HCDR1包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,所述HCDR2包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,且所述HCDR3包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

[0149] 6.根据实施方案5所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述HCDR1、HCDR2和HCDR3包含选自下述任一组的氨基酸序列:

[0150] a) HCDR1:SEQ ID NO:1,HCDR2:SEQ ID NO:3,和HCDR3:SEQ ID NO:5;以及

[0151] b) HCDR1:SEQ ID NO:2,HCDR2:SEQ ID NO:4,和HCDR3:SEQ ID NO:6。

[0152] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含H-FR1,所述H-FR1的C末端与所述HCDR1的N末端直接或间接地相连,且所述H-FR1包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0153] 8.根据实施方案1-7中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含H-FR2,所述H-FR2位于所述HCDR1与所述HCDR2之间,且所述H-FR2包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0154] 9.根据实施方案1-8中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含H-FR3,所述H-FR3位于所述HCDR2与所述HCDR3之间,且所述H-FR3包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0155] 10.根据实施方案1-9中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含H-FR4,所述H-FR4的N末端与所述HCDR3的C末端直接或间接地相连,且所述H-FR4包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0156] 11.根据实施方案1-10中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含H-FR1,H-FR2,H-FR3和H-FR4,所述H-FR1包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;所述H-

FR2包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;所述H-FR3包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;且所述H-FR4包含SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

[0157] 12. 根据实施方案11所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述H-FR1、H-FR2、H-FR3和H-FR4包含选自下述任一组的氨基酸序列:

[0158] a) H-FR1:SEQ ID NO:7,H-FR2:SEQ ID NO:9,H-FR3:SEQ ID NO:11和H-FR4:SEQ ID NO:13;以及

[0159] b) H-FR1:SEQ ID NO:8,H-FR2:SEQ ID NO:10,H-FR3:SEQ ID NO:12和H-FR4:SEQ ID NO:14。

[0160] 13. 根据实施方案1-12中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含重链可变区VH,所述VH包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0161] 14. 根据实施方案1-13中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包括抗体或其抗原结合片段。

[0162] 15. 根据实施方案14所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述抗原结合片段选自下组:Fab, Fab', F(ab)2, Fv片段, F(ab')2, scFv, di-scFv, VHH和/或dAb。

[0163] 16. 根据实施方案1-15中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包括VHH或其抗原结合片段。

[0164] 17. 根据实施方案14-16中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其中所述抗体选自下组:单克隆抗体、嵌合抗体和全人源抗体。

[0165] 18. 根据实施方案1-17中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,其包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0166] 19. 多肽,其包含实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

[0167] 20. 免疫缀合物,其包含实施方案1-19中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或实施方案19所述的多肽。

[0168] 21. 根据实施方案20所述的免疫缀合物,其还包括药学上可接受的治疗剂。

[0169] 22. 根据实施方案21所述的免疫缀合物,其中所述治疗剂选自下组:细胞毒性剂和细胞抑制剂。

[0170] 23. 分离的核酸分子,其编码实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,或者实施方案19所述的多肽。

[0171] 24. 载体,其包含实施方案23所述的分离的核酸分子。

[0172] 25. 细胞,其包含实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,实施方案19所述的多肽,实施方案20-22中任一项所述的免疫缀合物,实施方案23所述的分离的核酸分子和/或实施方案24所述的载体。

[0173] 26. 制备实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和/或实施方案19所述的多肽的方法,所述方法包括在使得所述的分离的抗原结合蛋白和/或所述的多肽表达的条件下,培养实施方案25所述的细胞。

[0174] 27. 药物组合物,其包含实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,实施方案19所述的多肽,实施方案20-22中任一项所述的免疫缀合物,实施方案23所述的分离的核酸分子,实施方案24所述的载体,实施方案25所述的细胞,和/或药学上可接受的佐剂和/

或赋形剂。

[0175] 28.一种用于检测人血清白蛋白的方法,其包括:施用实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或实施方案19所述的多肽。

[0176] 29.一种人血清白蛋白的检测试剂盒,其包含实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或实施方案19所述的多肽。

[0177] 30.实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或实施方案19所述的多肽在制备试剂盒中的用途。

[0178] 31.实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白和/或实施方案19所述的多肽在制备预防和/或治疗疾病或病症的药物中的用途。

[0179] 32.实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,实施方案19所述的多肽,实施方案20-22中任一项所述的免疫缀合物,实施方案23所述的分离的核酸分子,实施方案24所述的载体,和/或实施方案25所述的细胞,其用于预防和/或治疗疾病或病症。

[0180] 33.一种预防和/或治疗疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的实施方案1-18中任一项所述的分离的抗原结合蛋白,实施方案19所述的多肽,实施方案20-22中任一项所述的免疫缀合物,实施方案23所述的分离的核酸分子,实施方案24所述的载体,和/或实施方案25所述的细胞。

[0181] 不欲被任何理论所限,下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的抗原结合蛋白、制备方法和用途等,而不用于限制本申请发明的范围。

[0182] 实施例

[0183] 实施例1抗人血清白蛋白(HSA)抗体的制备

[0184] 1.1羊驼免疫

[0185] 天然HSA(abcam货号:ab205808),每次皮下免疫500ug,免疫间隔为每7天免疫一次,总共免疫4次,并且在第三次、第四次免疫结束采羊驼外周血,离心后,取上清,10倍往下稀释,将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 稀释上清,用ELISA方法测羊驼血清中抗HSA的抗体效价(Titer)。

[0186] 1.2ELISA法测定羊驼血清与人血清白蛋白(HSA)效价

[0187] 包被HSA 1ug/ml的浓度到ELISA板上,4°C过夜。第二天取出包被HSA的ELISA板,用含2.5%脱脂牛奶的PBS(以下简称PBSM)封闭1小时;对采血取得羊驼血清,加入15ml离心管,4000g离心10分钟,取10u1上清用于检测羊驼血清抗HSA的抗体效价(titer),对羊驼血清用PBSM稀释到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} ,取血清稀释液100u1每孔加入包被HSA的ELISA板,每个稀释梯度做2个孔(复孔),37°C,结合1小时;血清稀释物结合完毕,用含0.1%Tween 20的PBS(PBST)洗每孔3遍;

[0188] 洗涤完毕,加入HRP标记的抗羊驼抗体(Goat PAb to Llama IgG(HRP),abcam货号:ab112786)1:10000稀释使用,每孔100u1,室温孵育30分钟;再次用PBST洗涤3遍,加入TMB底物显色5-10分钟,加入终止液终止反应后迅速OD450nm读板。

[0189] 实施例2抗人血清白蛋白(HSA)单克隆抗体VHH可变区基因的建库和筛选

[0190] 2.1羊驼PBMC分离和菌克隆库的制备

[0191] 体外采集4次免疫HSA后的羊驼外周血,使用淋巴细胞分离管(达科为,货号:7922021)分离得到羊驼外周单核淋巴细胞(PBMC),将PBMC裂解提取总RNA(RNeasy plus

Mini kit, 货号:74134, Qiagen), 再将总RNA反转录成cDNA (SuperscriptTM IV First-strand synthwsis system, Invitrogen, 货号:18091050), 以cDNA为模板, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 将羊驼B细胞中的VHH区域扩增出来, 纯化后连接到噬菌体展示载体 (pComb3XTT) 上, 通过电转化将插入了VHH的噬菌体展示载体转入TG1细胞中, 构建成VHH菌克隆库。

[0192] 将VHH菌克隆库接种到含氨苄抗生素和2%葡萄糖的2xYT培养基中37℃恒温摇床上培养, 待菌浓度OD₆₀₀达到0.4-0.8, 加入M13K07 (货号N0315S, NEB) 辅助噬菌体, 37℃静置孵育30分钟, 离心收集菌体, 将菌体用含卡那抗生素和1mM IPTG的2xYT培养基重悬菌体, 30℃250rpm过夜培养。

[0193] 过夜培养物在4℃下, 9000g离心15分钟, 收集上清, 过0.22um滤膜除菌后加入1/5体积的PEG-NaCl沉淀噬菌体颗粒, 冰上孵育1小时, 噬菌体悬液在4℃下, 9000g离心15分钟, 尽量弃干净上清, 用PBS缓冲液重悬噬菌体颗粒, 并转移到新的灭菌tube管中。得到的噬菌体展示文库可置于4℃短期存放或加入终浓度20%甘油, 冻存于-80℃冰箱长期保存。

[0194] 2.2噬菌体展示筛选本申请的抗原结合蛋白

[0195] 用生物素标记的人血清白蛋白 (HSA) 和食蟹猴血清白蛋白 (albumin-macaca, 简写 alb-ma) 来筛选既抗HSA, 也抗食蟹猴血清白蛋白的本申请的抗原结合蛋白。第一轮用50nM生物素标记的食蟹猴血清白蛋白与噬菌体展示文库在含2.5%牛奶的PBS中室温共孵育2小时, 然后加入M-270磁珠 (货号:65305, Invitrogen) 捕获生物素标记的食蟹猴血清白蛋白和能与食蟹猴血清白蛋白结合的噬菌体展示的本申请的抗原结合蛋白, 室温共孵育30分钟。用磁力架吸附M-270磁珠, 用PBST洗涤10遍, 再用PBS洗涤10遍, 之后加入0.25mg/ml Trypsin溶液 (Trypsin, 货号25200-072, Gibco), 室温震荡孵育30分钟洗脱噬菌体。随后以20:1的比例加入4mg/ml AEBSF (AEBSF蛋白酶抑制剂, Sigma, 78431) 溶液消除酶活性。洗脱下的噬菌体为第一轮噬菌体展示文库。用第一轮噬菌体库感染OD=0.4-0.5的新鲜TG1菌, 静置30分钟。接入50ml含氨苄抗生素和2%葡萄糖的2xYT培养基, 37℃225rpm摇菌1-2小时, 9000g离心15分钟。用含卡那抗生素和1mM IPTG的2xYT培养基重悬菌体, 并取10-100ul悬液用于稀释计数, 加入辅助噬菌体, 30℃250rpm过夜培养。

[0196] 第二轮使用20nM生物素标记的HSA与第一轮筛选得到的噬菌体。筛选方法同第一轮筛选, 获得第二轮噬菌体展示文库, 再依次筛选一轮获得第三轮噬菌体展示文库。

[0197] 第三轮噬菌体展示文库感染TG1混匀后, 稀释和涂布到含氨苄抗生素的琼脂平板上, 次日挑取菌单克隆接种到盛有含氨苄抗生素和的2xYT培养基的无菌96孔深孔板中, 37℃225rpm, 待菌生长到对数期, 取100ul加入到新的96孔板并加入M13K07辅助噬菌体, 30分钟孵育, 30℃摇菌过夜。

[0198] 次日, 将得到的含有噬菌体的培养上清, 利用噬菌体ELISA (Phage ELISA) 的方法进行验证, 检验是否能特异性的结合HSA和食蟹猴血清白蛋白。

[0199] 2.3噬菌体ELISA (Phage ELISA) 筛选阳性克隆

[0200] 包被HSA和食蟹猴血清白蛋白1ug/ml在StripwellTM Microplate (货号:42592, Costar), 4℃过夜包被。次日洗板后用含2.5% milk的PBS室温封闭1小时。洗板后每孔加入100ul 96孔板离心的上清, 室温孵育1小时。再次洗板加入抗M13 HRP检测抗体 (M13 Bacteriophage antibody (HRP) 货号:11973MM05T-HH013JA1501, Sino Bio), 室温孵育30分钟。洗5次板, 然后加入1-step Ultra TMB-ELISA reagent (Thermo Scientific, 货号:#

34029), 观察每孔颜色变化。待颜色合适时, 用2M硫酸终止反应, 在OD450nm下读值。根据ELISA反应的结果, 挑出表达阳性噬菌体的阳性克隆菌, 测序获得编码本申请的抗原结合蛋白的基因序列。

[0201] 实施例3抗体的表达、纯化和结合实验

[0202] 3.1抗体表达和纯化

[0203] 通过测序我们得到2个编码本申请的抗原结合蛋白的序列, 分别命名为LB21和LB22, 其氨基酸序列如表1所示, 本申请抗原结合蛋白的CDR、FR和重链可变区的序列信息如表2所示。

[0204] 表1抗原结合蛋白的序列

名称	氨基酸序列
LB21	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRIIFDVYNLAWFRQAPGKERELVASITSGLSTDYATT VKGRFIIIRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCTANSRTTWYYWGQGLTVSS (SEQ ID NO: 15)
LB22	QVQLQESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFVTSVYAMGWYRQAPGKDCELVGLITSTSDTR YADSVKGRFSISRDNAAKKTVYLQMNRLKPEDTAVYYCMAGNSWGATVQAMCKSDYD YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 16)

[0206] 表2本申请抗原结合蛋白的CDR、FR和重链可变区的序列信息

名称	HCDR1 (SEQ ID NO)	HCDR2 (SEQ ID NO)	HCDR3 (SEQ ID NO)	H-FR1 (SEQ ID NO)	H-FR2 (SEQ ID NO)	H-FR3 (SEQ ID NO)	H-FR4 (SEQ ID NO)	重链可变 区 (SEQ ID NO)
LB21	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15
LB22	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16

[0208] 克隆编码本申请的抗原结合蛋白的基因序列, 将其插入到哺乳动物细胞表达载体中, 并在本申请的抗原结合蛋白的N端加上信号肽(MGWSCIILFLVATATGVHS, SEQ ID NO: 19)和在本申请的抗原结合蛋白的C端加上6xHis-tags和HA-tags, 使用Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, 货号: 11668030) 转染试剂, 瞬转到293FT细胞中, 培养96小时。同时表达MSA21 VHH单域抗体(参见专利W0 2004/062551 A2) 做为对照。使用镍柱(His TrapTM excel 货号: 17-3712-05, GE Healthcare) 纯化VHH抗体, 用PBS缓冲液换液。

[0209] 3.2抗体结合HSA和食蟹猴血清白蛋白

[0210] 3.2.1ELISA实验验证本申请的抗原结合蛋白与HSA的结合

[0211] 4℃过夜包被1ug/ml HSA在StripwellTM Microplate (货号: 42592, Costar) 板上。次日洗板后用含2.5% milk的PBS室温封闭1小时。对LB21和LB22进行梯度稀释, 从1ug/ml开始3倍梯度往下稀释, 稀释得到7个浓度点和1个阴性对照点。将稀释后的LB21和LB22做为二抗, 以100u1/孔加入到封闭后的ELISA板中, 室温孵育一小时。洗板后加入二抗(抗His HRP), 观察每孔颜色变化。待颜色合适时, 用2M硫酸终止反应, 在OD450nm下读值。结果如图1所示, 本申请的抗原结合蛋白均能结合HSA。

[0212] 3.2.2Octet检测HSA和食蟹猴血清白蛋白与本申请的抗原结合蛋白之间的亲和力

[0213] 将生物素标记的HSA或食蟹猴血清白蛋白装载到SA探针上(SA Biosensors, 货号18-5019, Forte bio), 通过HSA与LB21和LB22间的动力学关系, 测定亲和力数值。SA探针先平衡基线60s, SA探针上载(捕获)生物素标记的HSA或者食蟹猴血清白蛋白90s, 平衡基线60s, 分别与LB21和LB22联合150s, 在反应体系缓冲液(NB buffer)里解离300s, 最后探针重生。本申请的抗原结合蛋白与HSA的亲和力如表3所示, 与食蟹猴血清白蛋白的亲和力如表4所示。

[0214] 表3本申请的抗原结合蛋白与HSA的亲和力

抗体名称	KD (M)	kon (1/Ms)	kd (1/s)
LB21	1.24E-09	5.54E+05	6.87E-04
LB22	1.09E-10	1.29E+06	1.40E-04

[0216] 表4本申请的抗原结合蛋白与食蟹猴血清白蛋白的亲和力

抗体名称	KD (M)	kon (1/Ms)	kd (1/s)
LB21	2.17E-10	1.24E+05	2.69E-05
LB22	7.08E-10	9.13E+04	6.47E-05

[0218] 实施例4抗体与FcRn的非竞争验证实验

[0219] 为了验证FcRn和本发明的抗原结合蛋白是否竞争性地结合人血清白蛋白(HSA), 通过Octet系统进行检测, 首先将生物素标记的人FcRn(FcRn-biotin, 百普赛斯生物, Cat: FCM-H82W4)蛋白装载到SA探针上(SA Biosensors, 货号18-5019, Forte bio), 然后在酸性条件下再装载上HSA, 最后再检测本发明的抗原结合蛋白是否能再结合HSA。具体地, 使用SA探针装载100nM FcRn-biotin 120s, 平衡60s, 装载1000nM HSA 150s, 再装载50nM本发明结合蛋白或对照200s。反应均在pH5.4柠檬酸缓冲液中进行。

[0220] 结果如图2-4所示, 结果显示, 结合了人FcRn的HSA仍能结合本发明的抗原结合蛋白, 证明本发明的抗原结合蛋白和人FcRn能够同时结合HSA, 二者不存在竞争关系。

序列表

<110> 天辰生物医药(苏州)有限公司

<120> 抗人血清白蛋白抗体及其应用

<130> 0125-PA-025

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 HCDR1

<400> 1

Val Tyr Asn Leu Ala

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 HCDR1

<400> 2

Val Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 HCDR2

<400> 3

Ser Ile Thr Ser Gly Leu Ser Thr Asp Tyr Ala Thr Thr Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 HCDR2

<400> 4

Leu Ile Thr Ser Thr Ser Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 HCDR3

<400> 5

Asn Ser Arg Thr Thr Trp Tyr Tyr

1 5

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 HCDR3

<400> 6

Gly Asn Ser Trp Gly Ala Thr Val Gln Ala Met Cys Lys Ser Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 H-FR1

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Ile Ile Phe Asp

20 25 30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 H-FR1

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

 20 25 30

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 H-FR2

<400> 9

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 H-FR2

<400> 10

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Cys Glu Leu Val Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 H-FR3

<400> 11

Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala

 20 25 30

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 H-FR3

<400> 12

Arg	Phe	Ser	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Lys	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Ala
			20					25					30		

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21 H-FR4

<400> 13

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22 H-FR4

<400> 14

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21氨基酸序列

<400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Arg	Ile	Ile	Phe	Asp	Val	Tyr
			20					25					30		
Asn	Leu	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Leu	Val
		35					40				45				
Ala	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Thr	Thr	Val	Lys

50	55	60
Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr		
	85	90
Ala Asn Ser Arg Thr Thr Trp Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
	100	105
Thr Val Ser Ser		110
	115	

<210> 16

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22氨基酸序列

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr		
	20	25
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Cys Glu Leu Val		
	35	40
Gly Leu Ile Thr Ser Thr Ser Asp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
50	55	60
Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Val Tyr Leu		
65	70	75
Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Met		
	85	90
Ala Gly Asn Ser Trp Gly Ala Thr Val Gln Ala Met Cys Lys Ser Asp		
	100	105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
	115	120
		125

<210> 17

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB21核苷酸序列

<400> 17

caggtgcagc tctgtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctagaat aatcttcgat gtctataatt tggcctggtt ccgccaggct 120
 ccagggaaag agcgcgagtt ggtcgcaagt attactagtgt gtctgagcac agactatgcg 180
 acaaccgtga agggccgatt catcatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca acctgaaacc tgaggatacg gccgtctatt actgcactgc taatagcaga 300
 actacctggt actactgggg ccaggggacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 18

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> LB22核苷酸序列

<400> 18

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc gtggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt caccttcagt gtctatgcca tgggctggta ccgccaggct 120
 ccagggaaagg actgcgagtt ggtcggactt attactagta ctagtgcac acgctatgct 180
 gactccgtga agggccgatt ctccatctcc agagacaatg ccaagaaaac ggtgtatctg 240
 caaatgaaca ggctgaaacc tgaggacacg gccgtgtatt actgtatggc aggcaattcc 300
 tgggggggcta ctgttcaggc tatgtgtaag agtgactatg actactgggg ccaggggacc 360
 caggtcactg tctcctca 378

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 信号肽

<400> 19

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser

HSA结合ELISA

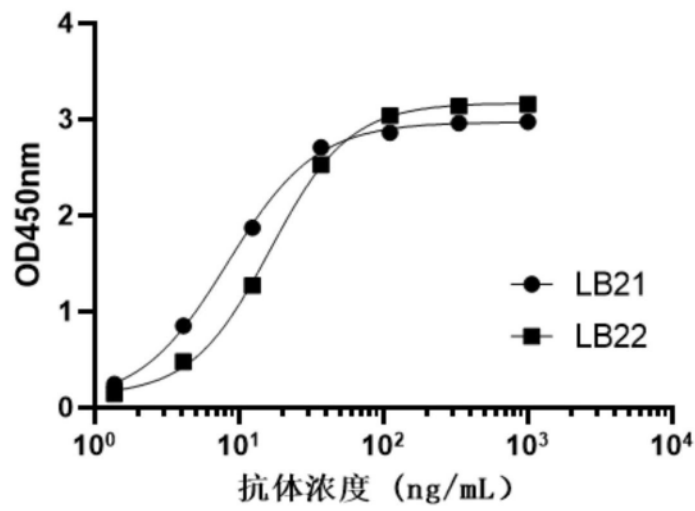


图1

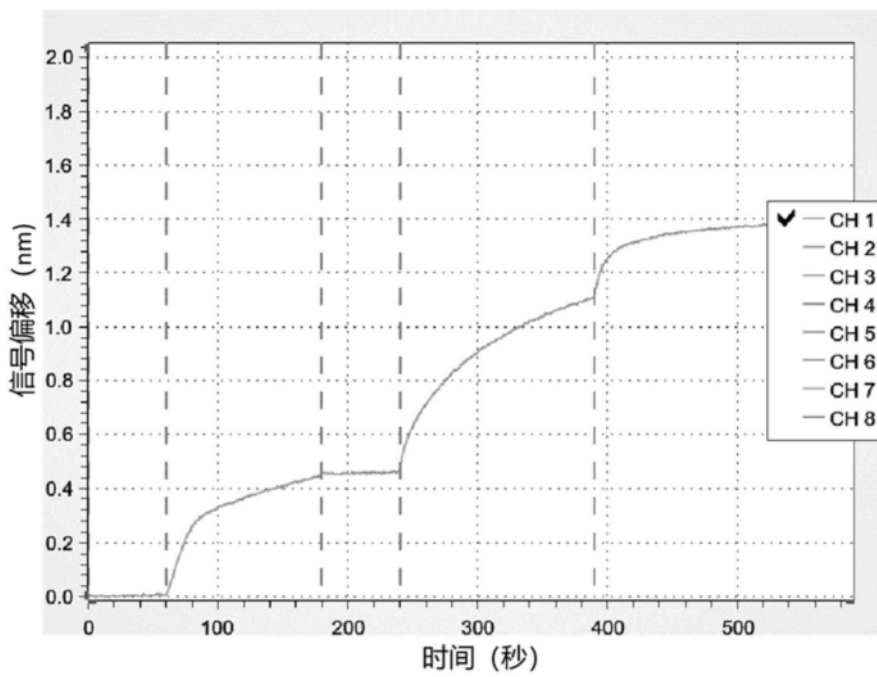


图2

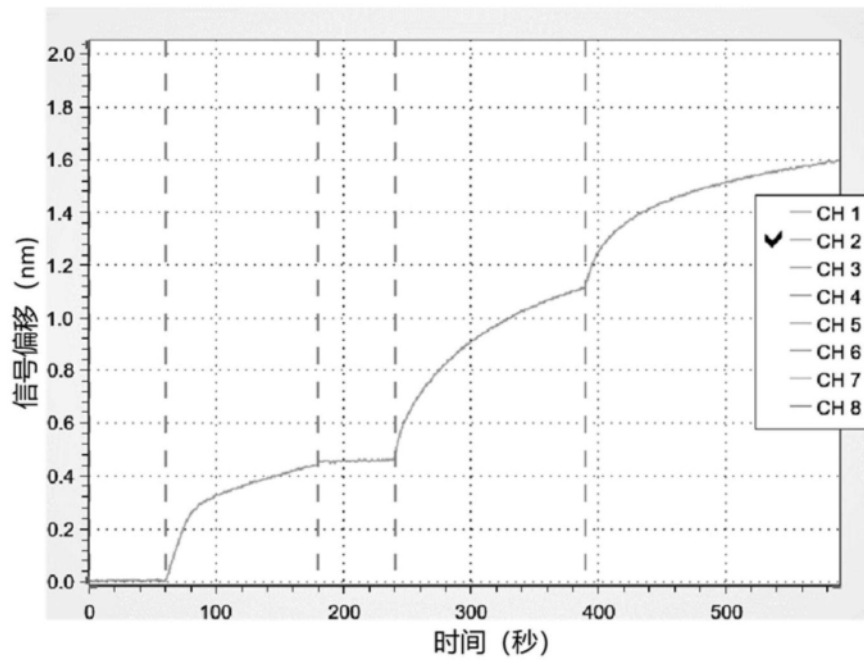


图3

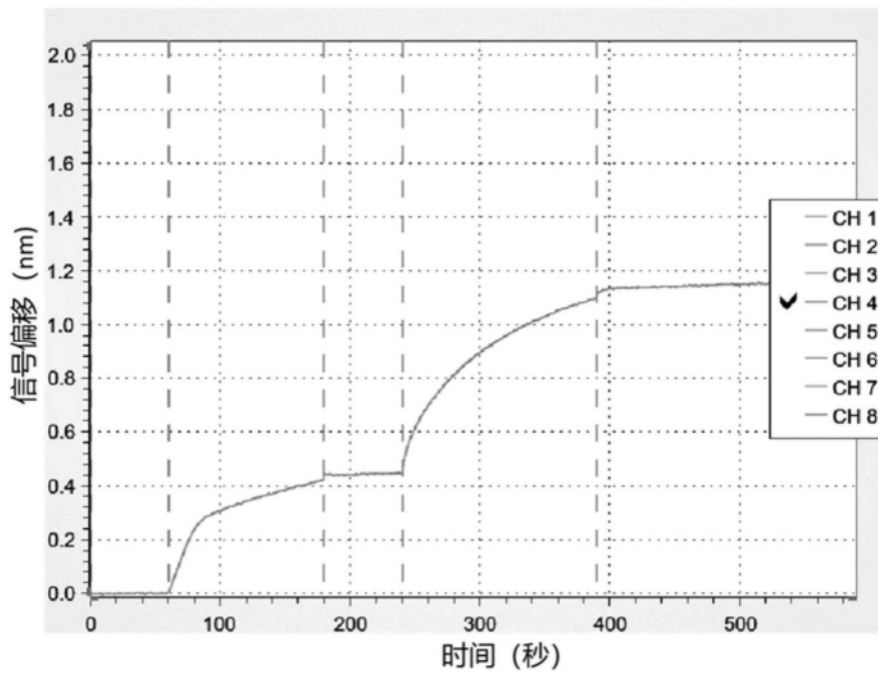


图4