



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101842387 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200880113719. 9

(22) 申请日 2008. 09. 26

(30) 优先权数据

0718832. 9 2007. 09. 26 GB

0718834. 5 2007. 09. 26 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2008/003331 2008. 09. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/040562 EN 2009. 04. 02

(73) 专利权人 UCB 医药有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 D·P·胡姆皮雷斯 E·达弗

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 16/24 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2004003019 A, 2004. 01. 08, 全文.

Juqun Shen et al. Single variable domain antibody as a versatile building block for the construction of IgG-like bispecific antibodies. 《Journal of Immunological Methods》. 2006,

审查员 岳礼溪

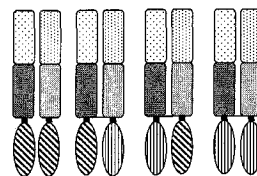
权利要求书2页 说明书27页
序列表37页 附图7页

(54) 发明名称

双特异性抗体融合物

(57) 摘要

本发明提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少一个具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合。



dAbL 和 dAbH 与每条链的恒定区的 C-末端相连接, 从而 LC-dAbL 或 LC-dAbH 融合物与 HC-dAbL 或 HC-dAbH 相配对
轻链可变区 或 重链可变区 。恒定区 CH1 和 CHI 。结构域抗体片段, dAbL 和 dAbH

1. 双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少两个具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合,所述第二目的抗原选自血清载体蛋白,其中一个单结构域抗体为与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相融合的 VL 结构域,而另一个单结构域抗体为与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相融合的 VH 结构域,并且其中所述血清载体蛋白是人血清白蛋白。

2. 根据权利要求 1 的融合蛋白,其中一个单结构域抗体是 VH 结构域,而另一个单结构域抗体是 VL 结构域,并且所述 VH 和 VL 结构域是协作地结合所选择的抗原的互补 VH / VL 对。

3. 根据权利要求 1-2 中任一项的融合蛋白,其中每个单结构域抗体是完全人的或人源化的。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的融合蛋白,其中所述 Fab 或 Fab' 是完全人的或人源化的。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的融合蛋白,其中与所述抗体 Fab 或 Fab' 片段相融合每个单结构域抗体是经由独立地选自下列的接头进行融合的:氨基酸序列 GS、PPP、SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50 和 SEQ ID NO :51。

6. 根据权利要求 5 的融合蛋白,其中所述接头序列选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :45。

7. 根据权利要求 1 的融合蛋白,其中所述单结构域抗体经由具有 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :45 中给出的序列的接头与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相连接。

8. 根据权利要求 1 的融合蛋白,其中所述单结构域抗体经由具有 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :45 中给出的序列的接头与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相连接。

9. 根据权利要求 2 的融合蛋白,其中所述 VH 结构域经由具有 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :45 中给出的序列的接头与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相连接,并且所述 VL 结构域经由具有 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :45 中给出的序列的接头与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C- 末端相连接。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项的融合蛋白,其中每个单结构域抗体具有对于血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35 / CR1 的特异性,所述单结构域抗体通过与所述血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35 / CR1 结合而为具有对于所述目的抗原的特异性的所述抗体 Fab 或 Fab' 片段提供了延长的半衰期。

11. 表达载体,其包含权利要求 1 至 10 中任一项之中所定义的双特异性抗体融合蛋白的密码。

-
12. 宿主细胞,其包含权利要求 11 中所定义的载体。
 13. 权利要求 1 至 10 中任一项之中所定义的双特异性抗体融合蛋白在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。

双特异性抗体融合物

[0001] 本发明涉及新的双特异性抗体融合蛋白。此类抗体包含针对目的抗原的第一特异性,和对于第二目的抗原的第二特异性,所述第二目的抗原例如为血清载体蛋白,其用于在延长抗体的体内血清半衰期中使用。还提供了用于产生此类分子的方法和包含它们的药物组合物。

[0002] 抗体的高特异性和亲和力使得它们成为理想的诊断和治疗剂,特别是用于调节蛋白质:蛋白质相互作用。在重组抗体技术领域中的进展已导致产生出抗体片段例如 Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段及其他抗体片段。这些更小的分子保留了完整抗体的抗原结合活性,并且还可以展示出相比于完整免疫球蛋白分子而言经改善的组织渗透和药物代谢动力学特性。事实上,抗体片段被证明是多用途的治疗剂,如通过产品例如 **ReoPro®** 和 **Lucentis®** 的近期成功而可见的。尽管此类片段看起来展示出超过完整免疫球蛋白的许多优点,但它们还遭受了增加的从血清中的清除率,因为它们缺乏赋予长的体内寿命的 Fc 结构域 (Medasan 等人,1997, J. Immunol. 158 :2211-2217)。

[0003] 先前已描述了具有双特异性即与两种不同的抗原相结合的抗体(关于综述,参见 Segal 等人,1999, Curr. Opin. Immunol. 11 :558-562; Plütkthun & Pack,1997, Immunotechnology, 3 :83-105; Fischer 和 Leger,2007, Pathobiology, 74, 3-14)。在 W002/02773、US2007065440、US2006257406、US2006106203 和 US2006280734 中也描述了双特异性抗体。用于制备基于异双特异性抗体的分子的先前方法一般采用化学交联或者蛋白质改造技术。化学交联遭受了异和同二聚体形成的产率差以及要求进行其后续的色谱法分离。蛋白质改造方法已高度地进行了详细阐述(例如,杵-臼(knobs-into-holes)改造; Ridgway 等人,1996, Protein Eng. 9(7) :617-621) 或已使用了具有不合适的稳定性特征的分子(例如,双抗体, scFv)。在某些情况下,双特异性抗体还可以遭受位阻问题,从而使得两种抗原无法同时与每条抗体臂相结合。

[0004] 单可变结构域抗体也称为单结构域抗体或 dAbs,其相应于抗体的重链可变区(VH) 或轻链可变区(VL)。Ward 等人,1989, Nature, 341, 544-546 描述了鼠类单结构域抗体。人单结构域抗体和‘骆驼化的(camelised)’人单结构域抗体也已得到描述(Holt 等人,2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490)。还已从骆驼科动物(骆驼和美洲驼)和软骨鱼(须鲨和铰口鲨)中获得了单结构域抗体。这些生物已进化出了安装在 Fc- 等价恒定结构域构架上的高亲和力单 V- 样结构域(在骆驼科动物中称为 VhH,和在鲨鱼中称为 V-NAR),以作为其免疫系统的完整且至关重要的组分(关于综述,参见 Holliger & Hudson; 2005, Nature Biotechnology, 23(9) :1126-1136)。

[0005] 在 EP0368684 中描述了单结构域抗体-酶融合物。在 W02004/058820 中还描述了单结构域-效应子基团融合物,其包含单个可变结构域。在 W02007/024715 中描述了双重可变结构域免疫球蛋白。在 EP1517921 中描述了包含两个具有不同特异性的单结构域抗体的双特异性配体。

[0006] 用于改善抗体片段例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 和其他抗体片段的半衰期的手段是已知的。一种方法使所述片段与聚合物分子相缀合。因此,已通过缀合至聚乙二醇

(PEG) 而改善了 Fab'、F(ab')₂ 片段在动物中的短的循环半衰期 (参见例如, W098/25791、W099/64460 和 W098/37200)。另一种方法通过缀合至与 FcRn 受体相互作用的试剂来修饰所述抗体片段 (参见例如, W097/34631)。延长半衰期的另外一种方法使用结合血清白蛋白的多肽 (参见例如, Smith 等人, 2001, Bioconjugate Chem. 12 :750-756 ;EP0486525 ;US6267964 ;W004/001064 ;W002/076489 ;和 W001/45746)。然而, 仍然需要产生具有长的体内半衰期的抗原结合性免疫球蛋白蛋白质, 以作为因为与 FcRn 受体相互作用而具有长的半衰期的那些的备选方案, 其中没有通过缀合至 PEG 来进行化学修饰或者缀合至人血清白蛋白。

[0007] 各种蛋白质存在于血浆中, 并且包括甲状腺素结合蛋白、运甲状腺素蛋白、 α 1- 酸性糖蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原和白蛋白, 或者它们中的任何的片段。血清载体蛋白在机体内循环, 具有以天测量的半衰期, 例如对于甲状腺素结合蛋白来说为 5 天或者对于运甲状腺素蛋白来说为 2 天 (Bartalena & Robbins, 1993, Clinics in Lab. Med. 13 :583-598), 或者在碘化的 α 1- 酸性糖蛋白的周转的第二个阶段中为 65 小时 (Bree 等人, 1986, Clin. Pharmacokin. 11 :336-342)。来自 Gitlin 等人 (1964, J. Clin. Invest. 10 :1938-1951) 的数据暗示, 在孕妇中, α 1- 酸性糖蛋白的半衰期为 3.8 天, 对于转铁蛋白为 12 天, 和对于纤维蛋白原为 2.5 天。血清白蛋白是在血管和血管外区室中都丰富的蛋白质, 其在人中的半衰期为大约 19 天 (Peters, 1985, Adv Protein Chem. 37 :161-245)。这与为大约 21 天的 IgG1 的半衰期相似 (Waldeman & Strober, 1969, Progr. Allergy, 13 :1-110)。

[0008] 本发明提供了经改善的双特异性抗体融合蛋白, 其可以重组地产生并且能够同时结合两种抗原。

[0009] 因此, 本发明提供了双特异性抗体融合蛋白, 其包含具有对于目的抗原的第一特异性的免疫球蛋白部分, 并且进一步包含具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体 (dAb)。

[0010] 本发明还提供了双特异性抗体融合蛋白, 其包含具有对于目的抗原的第一特异性的免疫球蛋白部分, 并且进一步包含至少一个具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体。

[0011] 本发明的双特异性抗体融合物将能够与两种目的抗原选择性地相结合。

[0012] 在一个实施方案中, 由所述 Fab 或 Fab' 片段所结合的目的抗原可以是细胞关联蛋白, 例如在细胞例如细菌细胞、酵母细胞、T- 细胞、内皮细胞或肿瘤细胞上的细胞表面蛋白, 或者它可以是可溶性蛋白。目的抗原还可以是任何在医学上相关的蛋白质, 例如在疾病或感染期间上调的那些蛋白质, 例如受体和 / 或其相应的配体。细胞表面蛋白的具体例子包括粘附分子, 例如整联蛋白例如 β 1 整联蛋白例如 VLA-4, E- 选择蛋白, P 选择蛋白或 L- 选择蛋白, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, 柄蛋白 - 样 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, 癌胚抗原 (CEA), 人乳脂球蛋白 (HMFG1 和 2), I 类 MHC 和 II 类 MHC 抗原, 和 VEGF, 以及适当时, 它们的受体。

[0013] 可溶性抗原包括白介素例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、

IL-16 或 IL-17, 病毒抗原例如呼吸道合胞病毒或巨细胞病毒抗原, 免疫球蛋白例如 IgE, 干扰素例如干扰素 α 、干扰素 β 或干扰素 γ , 肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β , 集落刺激因子例如 G-CSF 或 GM-CSF, 和血小板衍生生长因子例如 PDGF- α 和 PDGF- β , 以及适当时, 它们的受体。其他抗原包括细菌细胞表面抗原, 细菌毒素, 病毒例如流感、EBV、HepA、B 和 C, 生物恐怖主义试剂, 放射性核素和重金属, 以及蛇和蜘蛛毒液和毒素。

[0014] 在一个实施方案中, 本发明的抗体融合蛋白可以用于在功能上改变目的抗原的活性。例如, 所述抗体融合蛋白可以直接地或间接地中和、拮抗或激动所述抗原的活性。

[0015] 在一个实施方案中, 由本发明的双特异性抗体融合蛋白中的所述单结构域抗体所结合的第二目的抗原可以是细胞关联蛋白, 例如在细胞例如细菌细胞、酵母细胞、T-细胞、内皮细胞或肿瘤细胞上的细胞表面蛋白, 或者它可以是可溶性蛋白。目的抗原还可以是任何在医学上相关的蛋白质, 例如在疾病或感染期间上调的那些蛋白质, 例如受体和 / 或其相应的配体。细胞表面蛋白的具体例子包括粘附分子, 例如整联蛋白例如 $\beta 1$ 整联蛋白例如 VLA-4, E-选择蛋白, P 选择蛋白或 L-选择蛋白, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, 柄蛋白-样 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, 癌胚抗原 (CEA), 人乳脂球蛋白 (HMGF1 和 2), I 类 MHC 和 II 类 MHC 抗原, 和 VEGF, 以及适当时, 它们的受体。

[0016] 可溶性抗原包括白介素例如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-16 或 IL-17, 病毒抗原例如呼吸道合胞病毒或巨细胞病毒抗原, 免疫球蛋白例如 IgE, 干扰素例如干扰素 α 、干扰素 β 或干扰素 γ , 肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β , 集落刺激因子例如 G-CSF 或 GM-CSF, 和血小板衍生生长因子例如 PDGF- α 和 PDGF- β , 以及适当时, 它们的受体。其他抗原包括细菌细胞表面抗原, 细菌毒素, 病毒例如流感、EBV、HepA、B 和 C, 生物恐怖主义试剂, 放射性核素和重金属, 以及蛇和蜘蛛毒液和毒素。

[0017] 可以由所述单结构域抗体所结合的其他抗原包括血清载体蛋白、使得能够进行细胞介导的效应子功能募集的多肽以及核素整合剂蛋白质。

[0018] 因此, 在一个实例中, 本发明提供了双特异性抗体融合蛋白, 其包含具有对于目的抗原的第一特异性的免疫球蛋白部分, 并且进一步包含具有对于第二种蛋白质的特异性的单结构域抗体, 后者提供了募集效应子功能 (例如补体途径激活和 / 或效应细胞募集) 的能力。此外, 由于与核素整合剂蛋白质相结合的单结构域抗体, 本发明的融合蛋白可以用于整合放射性核素。此类融合蛋白可在成像或放射性核素靶向方法 (以进行治疗) 中使用。

[0019] 因此, 在一个实例中, 提供了分离的双特异性抗体融合蛋白, 其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段, 所述片段与至少一个具有对于募集多肽的特异性的 dAb 相融合, 所述 dAb 通过与所述募集多肽相结合而提供了直接地或间接地募集细胞介导的效应子功能的能力。

[0020] 效应子功能的募集可以是直接的, 因为效应子功能与细胞相关联, 所述细胞在其表面上携带有募集分子。当 dAb 与募集分子的结合引起例如下述因子的释放时, 可以发生间接募集: 所述因子可以直接地或间接地募集效应子功能, 或者可以经由信号传导途径的激活。例子包括 TNF α 、IL2、IL6、IL8、IL17、IFN γ 、组胺、C1q、调理素以及经典和旁路补体

激活级联的其他成员,例如 C2、C4、C3- 转变酶和 C5 至 C9。

[0021] 如本文所使用的,“募集多肽”包括 Fc γ R 例如 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII,补体途径蛋白例如但不限于 C1q 和 C3, CD 标志蛋白(分化群(Cluster of Differentiation)标志物)例如但不限于 CD68、CD115、CD16、CD80、CD83、CD86、CD56、CD64、CD3、CD4、CD8、CD28、CD45、CD19、CD20 和 CD22。为 CD 标志蛋白的进一步的募集多肽包括 CD1、CD1d、CD2、CD5、CD8、CD9、CD10、CD11、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD40、CD43、CD44、CD45、CD46、CD49、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD58、CD59、CD61、CD62、D62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD66e、CD68、CD70、CD71、CD72、CD79、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD88、CD89、CD90、CD94、CD95、CD98、CD106、CD114、CD116、CD117、CD118、CD120、CD122、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD137、CD138、CD141、CD142、CD143、CD146、CD147、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD162、CD164、CD169、CD184、CD206、CD209、CD257、CD278、CD281、CD282、CD283 和 CD304,或它们中的任何的片段,所述片段保留了直接地或间接地募集细胞介导的效应子功能的能力。募集多肽还包括具有效应子功能的免疫球蛋白分子,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE 和 IgA。

[0022] 在一个实施方案中,dAb 对于其具有特异性的第二种蛋白质是补体途径蛋白,其中 C1q 是特别优选的。

[0023] 在优选的实施方案中,dAb 对于其具有特异性的第二种蛋白质是 CD 标志蛋白,其中 CD68、CD80、CD86、CD64、CD3、CD4、CD8、CD45、CD16 和 CD35 是特别优选的。

[0024] 因此,还提供了分离的双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体片段,所述片段与至少一个 dAb 相融合,所述 dAb 具有对于选自下列的 CD 分子的特异性:CD68、CD80、CD86、CD64、CD3、CD4、CD8、CD45、CD16 和 CD35。

[0025] 在一个实施方案中,所述单结构域抗体为具有第一特异性的免疫球蛋白部分提供了延长的半衰期。

[0026] 因此,在一个实施方案中,提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少一个具有对于血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 的特异性的单结构域抗体相融合,所述单结构域抗体通过与所述血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 相结合而为具有对于所述目的抗原的特异性的所述抗体片段提供了延长的半衰期。

[0027] 在一个实施方案中,提供了分离的双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少一个具有对于血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 的特异性的单结构域抗体相融合,所述单结构域抗体通过与所述血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 相结合而为具有对于所述目的抗原的特异性的所述抗体片段提供了延长的半衰期。

[0028] 如本文所使用的,“血清载体蛋白”包括甲状腺素结合蛋白、运甲状腺素蛋白、 α 1- 酸性糖蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原和白蛋白,或它们中的任何的片段。

[0029] 如本文所使用的,“循环免疫球蛋白分子”包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM 和 IgD、或它们中的任何的片段。

[0030] CD35/CR1 是存在于红细胞上的蛋白质,其具有 36 天的半衰期(正常范围为 28 至 47 天;Lanaro 等人,1971, *Cancer*, 28(3):658-661)。

[0031] 在优选的实施方案中,dAb 对于其具有特异性的第二种蛋白质是血清载体蛋白,其中人血清载体蛋白是特别优选的。在最优选的实施方案中,所述血清载体蛋白是人血清白蛋白。

[0032] 因此,提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少一个具有对于人血清白蛋白的特异性的单结构域抗体相融合。

[0033] 在一个实施方案中,本发明提供了分离的双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,所述片段与至少一个具有对于人血清白蛋白的特异性的单结构域抗体相融合。

[0034] 在一个实施方案中,具有对于目的抗原的特异性的所述抗体片段是 Fab 片段。在另一个实施方案中,具有对于目的抗原的特异性的所述抗体片段是 Fab' 片段。

[0035] 因此,在一个最优选的实施方案中,本发明的抗体融合蛋白是翻译融合蛋白,即基因融合物,其各自的序列由表达载体编码。备选地,所述抗体融合蛋白组分通过使用化学手段,即通过化学缀合或化学交联进行融合。此类化学手段是本领域已知的。

[0036] 在一个实例中,所述抗体片段是 Fab' 片段,其具有天然的或经修饰的铰链区。当用于在制备本发明的双特异性抗体融合蛋白中使用的抗体片段是 Fab' 片段时,所述片段一般在重链的 C-末端处延长一个或多个氨基酸。因此,本发明的抗体融合物可以包含直接地或经由接头与 dAb 相翻译融合(或化学融合)的 Fab' 片段。此外,合适的抗体 Fab' 片段的例子包括在 W02005003170 和 W02005003171 中描述的那些。

[0037] 在另一个实例中,所述抗体片段是 Fab 片段。因此,本发明的抗体融合物可以包含与接头序列相翻译融合(或化学融合)的 Fab 片段,而所述接头序列与 dAb 相翻译融合(或化学融合)。优选地,所述 Fab 片段是在链间半胱氨酸处终止的 Fab 片段,如 W02005/003169 中所描述的。

[0038] 在本发明中有用的抗体 Fab 或 Fab' 片段可以来自任何物种,但优选地源自单克隆抗体、人抗体,或者是人源化的片段。用于在本发明中使用的抗体片段可以源自免疫球蛋白分子的任何类别(例如 IgG、IgE、IgM、IgD 或 IgA)或亚类,并且可以获自任何物种,包括例如小鼠、大鼠、鲨鱼、兔、猪、仓鼠、骆驼、美洲驼、山羊或人。

[0039] 在一个实施方案中,所述抗体 Fab 或 Fab' 片段是单克隆的、完全人的、人源化的或嵌合的抗体片段。在一个实施方案中,所述抗体 Fab 或 Fab' 片段是完全人的或人源化的。

[0040] 单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法来制备,例如杂交瘤技术(Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497)、三源杂交瘤技术、人 B-细胞杂交瘤技术(Kozbor 等人, *Immunology Today*, 1983, 4, 72) 和 EBV-杂交瘤技术(Cole 等人, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", 第 77-96 页, Alan R. Liss, Inc., 1985)。

[0041] 用于在本发明中使用的抗体还可以使用单淋巴细胞抗体方法来产生,所述单淋巴细胞抗体方法通过克隆且表达从被选择用于产生特异性抗体的单个淋巴细胞中产生的免疫球蛋白可变区 cDNAs,其中通过例如由 Babcook, J. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15), 7843-7848; WO 92/02551; WO2004/051268; 和 WO2004/106377 所描述的方法

来进行。

[0042] 人源化抗体是来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补性决定区(CDRs)和来自人免疫球蛋白分子的构架区(参见例如US 5,585,089)。

[0043] 用于在本发明中使用的抗体还可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来产生,并且包括由下列文献所公开的那些:Brinkman等人,J. Immunol. Methods,1995,182,41-50;Ames等人,J. Immunol. Methods,1995,184,177-186;Kettleborough等人,Eur. J. Immunol.,1994,24,952-958;Persic等人,Gene,1997,187,9-18;和Burton等人,Advances in Immunology,1994,57,191-280;WO90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;和WO 95/20401;和US 5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743;和5,969,108。此外,转基因小鼠或其他生物(包括其他哺乳动物)可以用于产生人源化抗体。

[0044] 完全人的抗体是这样的那些抗体,在所述抗体中重链和轻链的可变区和恒定区(当存在时)都是人起源的,或者基本上等同于人起源的序列,不必来自相同的抗体。完全人的抗体的例子可以包括例如通过上文所描述的噬菌体展示方法而产生的抗体,和由其中鼠类免疫球蛋白可变区和恒定区基因已被其人对对应物替代的小鼠所产生的抗体,例如如在EP0546073B1、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US 5,770,429、EP 0438474B1和EP0463151B1中所概括性地描述的。

[0045] 用于在本发明中使用的抗体Fab或Fab'片段起始材料可以获自任何完整的抗体,尤其是完整的单克隆抗体,其中使用任何合适的酶促切割和/或消化技术,例如通过用胃蛋白酶进行处理。备选地或者另外地,抗体起始材料可以通过使用重组DNA技术来制备,其中牵涉编码抗体可变区和/或恒定区的DNA的操作和再表达。标准分子生物学技术可以用于修饰、添加或删除氨基酸或结构域,如所希望的。对于可变区或恒定区的任何改变仍然包括在本文所使用的术语“可变区”和“恒定区”的范围内。

[0046] 所述抗体片段起始材料可以获自任何物种,包括例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠、骆驼、美洲驼、山羊或人。所述抗体片段的部分可以获自超过一个物种,例如所述抗体片段可以是嵌合的。在一个实例中,恒定区来自一个物种,而可变区来自另一个物种。所述抗体片段起始材料也可以是经修饰的。在另一个实例中,所述抗体片段的可变区通过使用重组DNA改造技术来形成。此类经改造的变化形式包括例如通过对于天然抗体的氨基酸序列进行插入、缺失或改变而从天然抗体可变区形成的那些。这种类型的具体例子包括这样的那些经改造的可变区结构域,其包含来自一种抗体的至少一个CDR和任选地一个或多个构架氨基酸,以及来自第二种抗体的该可变区结构域的其余部分。用于形成和制备这些抗体片段的方法是本领域众所周知的(参见例如,Boss等人,US 4,816,397;Cabilly等人,US 6,331,415;Shrader等人,WO 92/02551;Ward等人,1989,Nature,341,544;Orlandi等人,1989,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,86,3833;Riechmann等人,1988,Nature,322,323;Bird等人,1988,Science,242,423;Queen等人,US 5,585,089;Adair,WO91/09967;Mountain和Adair,1992,Biotechnol. Genet. Eng. Rev,10,1-142;Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。

[0047] 在本发明中,与Fab或Fab'片段相融合的每个单结构域抗体可以直接地或经由接

头进行连接。

[0048] 用于使 dAb 与 Fab 或 Fab' 相连接的合适的接头区的例子包括但不限于,柔性接头序列和刚性接头序列。柔性接头序列包括在下列文献中所描述的那些:Huston 等人,1988,PNAS 85:5879-5883;Wright &Deonarain, Mol. Immunol.,2007,44(11):2860-2869; Alfthan 等人, Prot. Eng.,1995,8(7):725-731;Luo 等人, J. Biochem.,1995,118(4):825-831;Tang 等人,1996, J. Biol. Chem. 271(26):15682-15686;和 Turner 等人,1997, JIMM 205,42-54(关于代表性的例子参见表 1)。

[0049] 表 1. 柔性接头序列

[0050]

SEQ ID NO:	序列
1	SGGGGSE
2	DKHTS
3	GGGS
45	GGGSGGGS
46	GGGSGGGSGGGS
47	GGGSGGGSGGGSGGGS
48	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
4	AAAGSG-GASAS
5	AAAGSG-XGGGS-GASAS
49	AAAGSG-XGGGSXGGGS-GASAS
50	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
51	AAAGSG-XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
6	AAAGSG-XS-GASAS
7	PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
8	ATTTGSSPGPT
9	ATTTGS
-	GS

10	EPSGPISTINSPPSKESHKSP
11	GTVAAPSVFIFPPSD
12	GGGGIAPSMVGGGGS
13	GGGGKVEGAGGGGGS
14	GGGSMKSHDGGGGS
15	GGGGLITIVGGGGS
16	GGGVVPSLPGGGGS
17	GGEKSIPGGGGS
18	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
19	YPRSIYIRRRHPSPLTT
20	TPSHLSHILPSFGLPTFN
21	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
22	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
23	APGPSAPSHRSLPSRAFG
24	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
25	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
26	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
27	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
28	LPWRTSLLPSLPLRRRP
29	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
30	VPPAPVVSLRSAHARPPY
31	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
32	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
33	CNPLPLCARSPAVRFTP

[0051] 刚性接头的例子包括肽序列 GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO :34)、PPPP (SEQ ID NO :35) 和 PPP。

[0052] 在一个实施方案中,将抗体铰链序列或其部分用作接头,例如上部铰链序列。通常,用于在本发明中使用的抗体 Fab' 片段具有天然的或经修饰的铰链区。将此类铰链区用作关于所述 dAb 部分的天然接头。所述天然铰链区是通常与抗体分子的 C_H1 结构域相关联的铰链区。经修饰的铰链区是在长度和 / 或组成方面与天然铰链区不同的任何铰链。此类铰链可以包括来自任何其他物种的铰链区,例如人、小鼠、大鼠、兔、仓鼠、骆驼、美洲驼或山羊铰链区。其他经修饰的铰链区可以包括源自具有与所述 C_H1 结构域不同的类别或亚类的抗体的完整的铰链区。因此,例如, γ 1 类别的 C_H1 结构域可以附着至 γ 4 类别的铰链区。备选地,经修饰的铰链区可以包括天然铰链的部分或重复单元 (其中在所述重复中的每个单元源自天然铰链区)。在进一步的备选方案中,通过将一个或多个半胱氨酸或其他残基转变成中性残基例如丙氨酸,或者通过将处于合适位置的残基转变成半胱氨酸残基,可以改变天然铰链区。通过此类手段,可以增加或减少铰链区中的半胱氨酸残基的数目。此外,可以控制铰链的其他特征,例如铰链半胱氨酸与轻链链间半胱氨酸的距离、铰链半胱氨酸之间的距离、以及铰链中可能影响铰链的特性 (例如柔韧性) 的其他氨基酸的组成,例如可以将甘氨酸掺入到铰链中以增加旋转柔韧性,或者可以掺入脯氨酸以减少柔韧性。备选地,可以将带电荷的或疏水性的残基的组合掺入到铰链中以赋予多聚化 (multimerisation) 特性,关于带电荷的或离子性的尾 (例如酸性尾) 作为接头的使用,参见例如 Richter 等人, 2001, Prot. Eng. 14(10) :775-783 ;和关于亮氨酸拉链序列,参见例如 Kostelny 等人, 1992, J. Immunol. 5(1) :1547-1553。其他经修饰的铰链区可以是完全合成的,并且可以被设计为具有所希望的特性例如长度、组成和柔韧性。

[0053] 许多经修饰的铰链区已例如描述在 US5, 677, 425、US6642356、W09915549、W02005003170、W02005003169、W02005003170、W09825971 和 W02005003171 中,并且这些专利文献通过提及而合并入本文。此类铰链一般紧跟在所述 CH1 区之后,但也可以掺入至轻链 κ 或 λ 片段的恒定区的末端处;关于例子参见表 2。

[0054] 表 2. 铰链接头序列

[0055]

SEQ ID NO :	序列
36	DKTHTCAA
37	DKTHTCPPCPA
38	DKTHTCPPCPATCPPCPA
39	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
40	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
41	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

42	DKTHTCCVECPCPA
43	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
44	DKTHTCP SCPA

[0056] 用于在本发明中使用的单可变结构域（也称为单结构域抗体或 dAbs）可以使用本领域已知的方法来产生，并且包括在 W02005118642 ;Ward 等人, 1989, Nature, 341, 544-546 ;和 Holt 等人, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490 中所公开的那些。在一个实施方案中，用于在本发明中使用的单结构域抗体是重链可变结构域 (VH) 或轻链结构域 (VL)。每个轻链结构域可以是 κ 或 λ 亚组的。用于分离 VH 和 VL 结构域的方法已在本领域中进行了描述，参见例如 EP0368684 和 Ward 等人（同上）。此类结构域可以源自任何合适的物种或抗体起始材料。在一个实施方案中，所述单结构域抗体可以源自啮齿动物、人或其他物种。在一个实施方案中，所述单结构域抗体是人源化的。

[0057] 在一个实施方案中，所述单结构域抗体源自噬菌体展示文库，其中使用在例如 W02005/118642 ;Jespers 等人, 2004, Nature Biotechnology, 22, 1161-1165 ;和 Holt 等人, 2003, Trends in Biotechnology, 21, 484-490 中所描述的方法。优选地，此类单结构域抗体是完全人的，但也可以源自其他物种。将会意识到，所述单结构域抗体的序列在分离后可以进行修饰，以改善单结构域抗体的特征例如可溶性，如 Holt 等人（同上）中所描述的。

[0058] 在一个实施方案中，所述 dAb 是获自 scFv 噬菌体展示或者获自转基因的 Humouse™ 或 Velocimouse™ 或者人源化的啮齿动物的人序列。

[0059] 在一个实施方案中，所述 dAb 获自人或人源化的啮齿动物、骆驼科动物或鲨鱼。此类 dAb 将优选地是人源化的。在一个实例中，所述单结构域抗体是基于骆驼科动物免疫球蛋白的 VHH 结构域，如 EP0656946 中所描述的。在一个实例中，用目的抗原对骆驼或美洲驼进行免疫接种，并且在滴度合适时收集血液。可以通过单细胞 PCR 来克隆编码所述 dAb 的基因，或者可以通过 EBV 转化或通过无限增殖细胞系相融合来使编码所述 dAb 的 B 细胞永生。

[0060] 如本文上面所描述的，本发明提供了双特异性抗体融合蛋白，其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段，所述片段直接地或经由接头与至少一个具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合。

[0061] 因此，在一个实施方案中，所述抗体片段例如 Fab 或 Fab' 片段直接地或经由接头在重链或轻链可变区的 N- 末端处与 dAb 相融合。备选地，所述抗体 Fab 或 Fab' 片段直接地或经由接头在重链或轻链的 C- 末端处与 dAb 相融合。在另一个实施方案中，所述抗体 Fab 或 Fab' 片段的重链和轻链各自直接地或经由接头在 C- 末端处与 dAb 相融合。所述连接可以是化学缀合，但最优选地是翻译融合，即其中各自的序列顺次由表达载体进行编码的基因融合。

[0062] 通常，所述单结构域抗体的 N- 末端将直接地或经由接头与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链或重链的 C- 末端相融合，并且当所述单结构域抗体与所述 Fab 或 Fab' 的 N- 末端相融合时，它将经其 C- 末端（任选地经由接头）进行融合。

[0063] 在一个实施方案中，本发明提供了双特异性抗体融合蛋白，其包含具有对于目的

抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,或者由具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段组成,所述片段在重链或轻链的 N-末端处与具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合。

[0064] 在一个实施方案中,本发明提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,或者由具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段组成,所述片段在重链或轻链的 C-末端处与具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合。

[0065] 在一个实施方案中,本发明提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,或者由具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段组成,所述片段在重链或轻链的 C-末端处与至少一个具有对于第二目的抗原的特异性的单结构域抗体相融合。

[0066] 在一个实施方案中,本发明提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,或者由具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段组成,所述片段与两个单结构域抗体相融合,其中每个单结构域抗体以线性顺序彼此融合(任选地经由接头),并且所得到的单结构域抗体融合物与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链或重链的 C-末端相融合。

[0067] 在一个实施方案中,本发明提供了双特异性抗体融合蛋白,其包含具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段,或者由具有对于目的抗原的特异性的抗体 Fab 或 Fab' 片段组成,所述片段与两个单结构域抗体相融合,其中一个单结构域抗体与所述 Fab 或 Fab' 片段的轻链的 C-末端相融合,而另一个单结构域抗体与所述 Fab 或 Fab' 片段的重链的 C-末端相融合,所述单结构域抗体具有对于第二目的抗原的特异性。

[0068] 在一个实施方案中,当所述 Fab 或 Fab' 片段的重链和轻链各自在 C-末端处包含单结构域抗体时,这两个单结构域抗体是等同的,即具有相同的对于相同抗原的结合特异性。在一个实例中,它们结合在相同抗原上的相同表位。例如,所述单结构域抗体可以均为相同的 VHdAb、相同的 VHH dAb 或相同的 VL dAb。

[0069] 优选地,当所述 Fab 或 Fab' 片段的重链和轻链各自在 C-末端处包含单结构域抗体时,这两个单结构域抗体是协作地结合抗原的互补 VH/VL 对,即它们是具有相同的结合特异性的互补 VH/VL 对。通常,它们将是源自相同抗体的 VH/VL 对。

[0070] 在一个实施方案中,当本发明的双特异性抗体融合蛋白包含为互补 VH/VL 对的两个单结构域抗体时,VH 单结构域抗体与重链恒定区(CH1)的 C-末端相融合,并且 VL 单结构域抗体与轻链恒定区(C κ 或 C λ)的 C-末端相融合。

[0071] 在一个实施方案中,当本发明的双特异性抗体融合蛋白包含为互补 VH/VL 对的两个单结构域抗体时,VL 单结构域抗体与重链恒定区(CH1)的 C-末端相融合,并且 VH 单结构域抗体与轻链恒定区(C κ 或 C λ)的 C-末端相融合。

[0072] 在本发明的双特异性融合蛋白中,所述单结构域抗体与第二种抗原相结合,所述第二种抗原与由所述 Fab 或 Fab' 片段组分所结合的那种抗原不同。

[0073] 在一个实例中,用于在本发明中使用的 dAbs 展示出对于补体途径蛋白、CD 标志蛋白或 Fc γ R 的特异性。在这种情况下,所述 dAb 优选地对于 CD 分子是特异的。最优选地,所述 dAb 展示出对于选自下列的 CD 分子的特异性:CD68、CD80、CD86、CD64、CD3、CD4、CD8、

CD45、CD16 和 CD35。

[0074] 在优选的实例中,用于在本发明中使用的 dAbs 展示出对于血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 的特异性,所述血清载体蛋白优选地是人血清载体蛋白例如甲状腺素结合蛋白、运甲状腺素蛋白、 α 1- 酸性糖蛋白、转铁蛋白、纤维蛋白原或血清白蛋白。最优选地,所述 dAb 展示出对于人血清白蛋白的特异性。因此,在一个实例中,用血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1 (例如人血清白蛋白) 对兔、小鼠、大鼠、骆驼或美洲驼进行免疫接种,并且在滴度合适时收集血液。可以通过单细胞 PCR 来克隆编码所述 dAb 的基因,或者可以通过 EBV 转化或通过无限增殖细胞系相融合来使编码所述 dAb 的 B 细胞永生。备选地,所述单结构域抗体可以通过如本文上面所描述的噬菌体展示来获得。

[0075] 在一个实施方案中,所述单结构域抗体结合人血清白蛋白。在一个实施方案中,所述单结构域抗体结合人血清白蛋白、鼠类血清白蛋白和大鼠血清白蛋白。

[0076] 在一个实施方案中,所述结合血清白蛋白的单结构域抗体是在 W02005/118642 中提供的 dAb (参见例如图 1c 和 1d),或在 W02004/041862 中提供的 VHH,或在 W02006/122787 的例如表 III 中描述的人源化的纳米抗体 (nanobody)。

[0077] 在一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是重链 VH 单结构域抗体,其包含下列 CDR 中的至少一个:具有在图 5(e) SEQ ID NO :56 或图 5(k) SEQ ID NO :62 中给出的关于 CDR-H1 的序列的 CDR,具有在图 5(f) SEQ ID NO :57 或图 5(l) SEQ ID NO :63 中给出的关于 CDR-H2 的序列的 CDR,和具有在图 5(g) SEQ ID NO :58 或图 5(m) SEQ ID NO :64 中给出的关于 CDR-H3 的序列的 CDR。

[0078] 在另一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是重链 VH 抗体,其中 VH 结构域的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 中的至少两个选自下列:在 SEQ ID NO :56 或 SEQ ID NO :62 中给出的关于 CDR-H1 的序列,在 SEQ ID NO :57 或 SEQ ID NO :63 中给出的关于 CDR-H2 的序列,和在 SEQ ID NO :58 或 SEQ ID NO :64 中给出的关于 CDR-H3 的序列。例如,所述单结构域抗体可以包含 VH 结构域,其中 CDR-H1 具有在 SEQ ID NO :56 中给出的序列,并且 CDR-H2 具有在 SEQ ID NO :57 中给出的序列。备选地,所述单结构域抗体可以包含 VH 结构域,其中 CDR-H1 具有在 SEQ ID NO :56 中给出的序列,并且 CDR-H3 具有在 SEQ ID NO :58 中给出的序列。为了避免疑问,应当理解包括了所有排列。

[0079] 在另一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是重链 VH 单结构域抗体,其中所述 VH 结构域包含有在 SEQ ID NO :56 中给出的关于 CDR-H1 的序列,在 SEQ ID NO :57 中给出的关于 CDR-H2 的序列,和在 SEQ ID NO :58 中给出的关于 CDR-H3 的序列。

[0080] 在另一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是重链 VH 单结构域抗体,其中所述 VH 结构域包含有在 SEQ ID NO :62 中给出的关于 CDR-H1 的序列,在 SEQ ID NO :63 中给出的关于 CDR-H2 的序列,和在 SEQ ID NO :64 中给出的关于 CDR-H3 的序列。

[0081] 在一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是人源化的重链 VH 单结构域抗体, dAbH1,其具有在图 5(a) (SEQ ID NO :52) 中给出的序列。合适的 CH1-dAbH1 融合物 (包含 G₄S 接头) 的例子在图 6 (SEQ ID NO :68) 中给出。

[0082] 在一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是

人源化的重链 VH 单结构域抗体, dAbH2, 其具有在图 5(c) (SEQ ID NO :54) 中给出的序列。合适的 CH1-dAbH2 融合物 (包含 G4S 接头) 的例子在图 6 (SEQ ID NO :69) 中给出。

[0083] 根据由 Kabat 等人设计出的系统, 对抗体可变结构域中的残基常规地进行编号。这种系统在 Kabat 等人, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (下文中称为“Kabat 等人 (同上)”) 中进行了阐述。除非另有说明, 在本说明书中使用这种编号系统。

[0084] Kabat 残基名称并不总是与氨基酸残基的线性编号直接地相对应。实际的线性氨基酸序列可能包含比在严格 Kabat 编号中更少或额外的氨基酸, 这相应于结构组分的缩短或向结构组分中的插入, 无论是基本可变结构域结构的构架还是互补性决定区 (CDR)。通过使抗体序列中的同源性残基与“标准”Kabat 编号序列进行比对, 关于给定的抗体可以确定残基的正确的 Kabat 编号。

[0085] 根据 Kabat 编号系统, 重链可变结构域的 CDRs 位于残基 31-35 (CDR-H1)、残基 50-65 (CDR-H2) 和残基 95-102 (CDR-H3) 处。然而, 根据 Chothia (Chothia, C. 和 Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), 等价于 CDR-H1 的环从残基 26 延伸至残基 32。因此, 如本文所使用的, “CDR-H1” 包括残基 26 至 35, 如由 Kabat 编号系统和 Chothia 的拓扑环 (topological loop) 定义的组合所描述的。

[0086] 根据 Kabat 编号系统, 轻链可变结构域的 CDRs 位于残基 24-34 (CDR-L1)、残基 50-56 (CDR-L2) 和残基 89-97 (CDR-L3) 处。

[0087] 在一个实施方案中, 用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是轻链 VL 单结构域抗体, 其包含下列 CDR 中的至少一个: 具有在图 5(h) SEQ ID NO :59 或图 5(n) SEQ ID NO :65 中给出的关于 CDR-L1 的序列的 CDR, 具有在图 5(i) SEQ ID NO :60 或图 5(o) SEQ ID NO :66 中给出的关于 CDR-L2 的序列的 CDR, 和具有在图 5(j) SEQ ID NO :61 或图 5(p) SEQ ID NO :67 中给出的关于 CDR-L3 的序列的 CDR。

[0088] 在另一个实施方案中, 用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是轻链 VL 抗体, 其中 VL 结构域的 CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3 中的至少两个选自下列: 在 SEQ ID NO :59 或 SEQ ID NO :65 中给出的关于 CDR-L1 的序列, 在 SEQ ID NO :60 或 SEQ ID NO :66 中给出的关于 CDR-L2 的序列, 和在 SEQ ID NO :61 或 SEQ ID NO :67 中给出的关于 CDR-L3 的序列。例如, 所述结构域抗体可以包含 VL 结构域, 其中 CDR-L1 具有在 SEQ ID NO :59 中给出的序列, 并且 CDR-L2 具有在 SEQ ID NO :60 中给出的序列。备选地, 所述结构域抗体可以包含 VL 结构域, 其中 CDR-L1 具有在 SEQ ID NO :59 中给出的序列, 并且 CDR-L3 具有在 SEQ ID NO :61 中给出的序列。为了避免疑问, 应当理解包括了所有排列。

[0089] 在另一个实施方案中, 用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是轻链 VL 结构域抗体, 其中所述 VL 结构域包含有在 SEQ ID NO :59 中给出的关于 CDR-L1 的序列, 在 SEQ ID NO :60 中给出的关于 CDR-L2 的序列, 和在 SEQ ID NO :61 中给出的关于 CDR-L3 的序列。

[0090] 在另一个实施方案中, 用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是轻链 VL 结构域抗体, 其中所述 VL 结构域包含有在 SEQ ID NO :65 中给出的关于 CDR-L1 的序列, 在 SEQ ID NO :66 中给出的关于 CDR-L2 的序列, 和在 SEQ ID NO :67 中给出的关于 CDR-L3 的序列。

[0091] 在一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是人源化的轻链 VL 单结构域抗体, dAbL1, 其具有在图 5(b) (SEQ ID NO :53) 中给出的序列。合适的 CH1-dAbL1 融合物和 Ck1-dAbL1 融合物 (均包含 G₄S 接头) 的例子在图 6 (SEQ ID NO :70 和 SEQ ID NO :72) 中给出。

[0092] 在一个实施方案中,用于在本发明中使用的结合人血清白蛋白的单结构域抗体是人源化的轻链 VL 单结构域抗体, dAbL2, 其具有在图 5(d) (SEQ ID NO :55) 中给出的序列。合适的 CH1-dAbL2 融合物和 Ck1-dAbL2 融合物 (均包含 G₄S 接头) 的例子在图 6 (SEQ ID NO :71 和 SEQ ID NO :73) 中给出。

[0093] 在一个实施方案中,当所述 Fab 或 Fab' 片段的重链和轻链各自在 C- 末端处包含单结构域抗体,并且这两个单结构域抗体是协作地结合抗原的互补 VH/VL 对 (如本文上面所描述的) 时, VH dAb 是 dAbH1 (SEQ ID NO :52), 并且 VL dAb 是 dAbL1 (SEQ ID NO :53)。

[0094] 在一个实施方案中,当所述 Fab 或 Fab' 片段的重链和轻链各自在 C- 末端处包含单结构域抗体,并且这两个单结构域抗体是协作地结合抗原的互补 VH/VL 对 (如本文上面所描述的) 时, VH dAb 是 dAbH2 (SEQ ID NO :54), 并且 VL dAb 是 dAbL2 (SEQ ID NO :55)。

[0095] 在另一个方面,本发明提供了白蛋白结合抗体或其片段,其包含有在本文上面和图 5(e-p) 中所提供的 CDRs 中的一个或多个。所述 CDRs 可以掺入到任何合适的抗体构架和任何合适的抗体形式之中。此类抗体包括完整抗体以及其在功能上有活性的片段或衍生物,其可以是但不限于单克隆的、人源化的、完全人的或嵌合的抗体。因此,此类白蛋白结合抗体可以包括具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段,并且可以是但不限于 Fab, 经修饰的 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 单结构域抗体, scFv, 二、三或四价抗体, Bis-scFv, 双抗体, 三抗体, 四抗体和上述中的任何的表位结合片段 (参见例如, Holliger 和 Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9) :1126-1136 ; Adair 和 Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217)。用于形成和制备这些抗体片段的方法是本领域众所周知的 (参见例如, Verma 等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。多价抗体可以包含多重特异性或者可以是单特异性的 (参见例如 W092/22853 和 W005/113605)。将会意识到, 本发明的这个方面还延伸至这些白蛋白结合抗体的变体。

[0096] 将会意识到, 此类白蛋白结合抗体, 特别是单结构域抗体, 可以与任何其他抗体或蛋白质或其他分子相缀合, 如在任何其他合适的情形下所希望或使用的。在一个实例中, 在上文所描述的且在图 5(a-d) 中所显示的单结构域抗体 dAbH1、dAbL1、dAbH2、dAbL2 可以掺入到任何合适的抗体形式中, 或者在任何合适的情形 (例如融合物或缀合物) 下用作单结构域抗体。

[0097] 在一个实施方案中, 本发明的这个方面的抗体包含有在图 5(e) 中给出的关于 CDR-H1 的序列, 在图 5(f) 中给出的关于 CDR-H2 的序列, 和在图 5(g) 中给出的关于 CDR-H3 的序列。

[0098] 在一个实施方案中, 本发明的这个方面的抗体包含有在图 5(k) 中给出的关于 CDR-H1 的序列, 在图 5(l) 中给出的关于 CDR-H2 的序列, 和在图 5(m) 中给出的关于 CDR-H3 的序列。

[0099] 在一个实施方案中, 本发明的这个方面的抗体包含有在图 5(h) 中给出的关于 CDR-L1 的序列, 在图 5(i) 中给出的关于 CDR-L2 的序列, 和在图 5(j) 中给出的关于 CDR-L3

的序列。

[0100] 在一个实施方案中,本发明的这个方面的抗体包含有在图 5(n) 中给出的关于 CDR-L1 的序列,在图 5(o) 中给出的关于 CDR-L2 的序列,和在图 5(p) 中给出的关于 CDR-L3 的序列。

[0101] 当本发明的双特异性融合蛋白的单结构域抗体与白蛋白相结合时,所述单结构域抗体对于白蛋白的结合亲和力将足以延长所述 Fab 或 Fab' 在体内的半衰期。已报道了,小于或等于 $2.5 \mu\text{M}$ 亲和力的对于白蛋白的亲和力将会延长体内半衰期 (Nguyen, A. 等人 (2006) *Protein Engineering, Design & Selection*, 19(7), 291-297)。本发明的单结构域抗体分子优选地具有适合于其目的和它们所与之结合的抗原的结合亲和力。在一个实例中,所述单结构域抗体具有高的结合亲和力,例如 pM。在一个实例中,所述单结构域抗体具有为 nM 或 μM 的对于抗原的结合亲和力。亲和力可以使用本领域已知的任何合适方法来测量,包括如在本文实施例中所描述的 BIAcore,其中使用天然或重组抗原。

[0102] 优选地,结合白蛋白的本发明的单结构域抗体分子具有大约 $2 \mu\text{M}$ 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的单结构域抗体分子具有大约 $1 \mu\text{M}$ 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的单结构域抗体分子具有大约 500nM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的单结构域抗体分子具有大约 200nM 或更好的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的结构域抗体分子具有大约 1nM 或更好的结合亲和力。将会意识到,使用本领域已知的任何合适方法可以改变由本发明所提供的和本领域中已知的单结构域抗体的亲和力。因此,本发明还涉及本发明的结构域抗体分子的变体,其具有改善的对于白蛋白的亲和力。此类变体可以通过许多亲和力成熟方案来获得,包括使 CDRs 突变 (Yang 等人, *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995)、链改组 (Marks 等人, *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992)、大肠杆菌 (*E. coli*) 增变株的使用 (Low 等人, *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996)、DNA 改组 (Patten 等人, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示 (Thompson 等人, *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) 和有性 PCR (Cramer 等人, *Nature*, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等人 (同上) 讨论了这些亲和力成熟方法。

[0103] 本发明还提供了编码本发明的双特异性抗体融合蛋白的分离的 DNA 序列。本发明的 DNA 序列可以包括合成 DNA (例如通过化学加工而产生的)、cDNA、基因组 DNA 或其任何组合。

[0104] 编码本发明的双特异性抗体融合蛋白的 DNA 序列可以通过本领域技术人员众所周知的方法来获得。例如,如所希望的,可以从确定的 DNA 序列或者基于相应的氨基酸序列来合成编码所述抗体片段、接头和 / 或 dAbs 的部分或全部的 DNA 序列。

[0105] 可以使用分子生物学的标准技术来制备编码本发明的双特异性抗体融合蛋白的 DNA 序列。可以使用寡核苷酸合成技术来完全或部分地合成所需的 DNA 序列。在合适时,可以使用位点定向诱变和聚合酶链反应 (PCR) 技术。

[0106] 本发明进一步涉及包含一个或多个本发明的 DNA 序列的克隆或表达载体。因此,提供了包含一个或多个 DNA 序列的克隆或表达载体,所述 DNA 序列编码本发明的双特异性抗体融合蛋白。在一个优选的实施方案中,所述克隆或表达载体包含编码整个双特异性抗体融合蛋白的单个 DNA 序列。因此,所述克隆或表达载体顺次包含 DNA 编码的转录单元,从而使得产生出翻译融合蛋白。

[0107] 事实上,本领域技术人员将会理解,本发明的融合蛋白可以在N-末端或C-末端处具有所述 dAb,并因此 dAb DNA 编码的转录单元将会在编码翻译融合物的 DNA 序列内分别处于开始或最后。因此,翻译融合物可以包含 N-末端 dAb 和 C-末端 Fab 或 Fab'。此外,翻译融合物可以包含 N-末端 Fab 或 Fab' 和 C-末端 dAb。

[0108] 将会意识到,所述 Fab 或 Fab' 的重链和轻链可以掺入到相同或不同的载体中。在一个实施方案中,一种载体可以包括包含 Fab 或 Fab' 重链和 C-末端 dAb 的翻译融合物,而另一种载体可以包括包含 Fab 或 Fab' 轻链和 C-末端 dAb 的翻译融合物。

[0109] 例如,当希望产生在抗体片段的 N-末端处具有 dAb 部分的双特异性抗体融合蛋白时,载体将以顺次顺序包含下列 DNA 转录单元:编码 dAb 部分的 DNA 转录单元;任选地,编码接头序列的 DNA 转录单元;和编码抗体片段的 DNA 转录单元。当希望产生在抗体片段的 C-末端处具有 dAb 部分的双特异性抗体融合蛋白时,载体将以顺次顺序包含下列 DNA 转录单元:编码抗体片段的 DNA 转录单元;任选地,编码接头序列的 DNA 转录单元;和编码 dAb 部分的 DNA 转录单元,所述 dAb 部分具有对于血清载体蛋白、循环免疫球蛋白分子或 CD35/CR1(例如人血清白蛋白)的特异性。因此,本发明的翻译融合物可以以不同的构造,包括例如但不限于,dAb-接头-Fab、Fab-接头-dAb、dAb-Fab、Fab-dAb、Fab'-dAb、dAb-Fab'、dAb-接头-Fab'、Fab'-接头-dAb。当例如使用两种载体时,第一种可以包含与 dAb 相融合的 Fab 或 Fab' 的重链,而第二种可以包含与 dAb 相融合的 Fab 或 Fab' 的轻链。

[0110] 关于包含在本发明的翻译融合物中的抗体片段的 DNA 密码可以作为转录单元掺入到载体中,其中以本领域技术人员已知的构造,例如转录单元可以包含关于轻链的密码,随后为重链密码,或者反之亦然;参见,特别是 Humphreys 等人,2002,Protein Expression and Purification, 26 :309-320。

[0111] 优选地,根据本发明的载体包含合适的前导序列,例如抗体前导序列。此类前导序列是本领域众所周知的。

[0112] 通过其可以构建出载体的一般方法、转染和转化方法以及培养方法是本领域技术人员众所周知的。在这方面,可参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999, F. M. Ausubel(编辑), Wiley Interscience, New York,和由 Cold Spring Harbor Publishing 出品的 Maniatis Manual。

[0113] 还提供了包含一种或多种克隆或表达载体的宿主细胞,所述克隆或表达载体包含一个或多个编码本发明的双特异性抗体融合蛋白的 DNA 序列。任何合适的宿主细胞/载体系统可以用于表达编码所述双特异性抗体融合蛋白的 DNA 序列。可以使用细菌例如大肠杆菌和其他微生物系统,或者还可以使用真核生物例如哺乳动物宿主细胞表达系统。合适的哺乳动物宿主细胞包括 NS0、CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。因此,在一个实施方案中,在大肠杆菌中表达本发明的融合蛋白。在另一个实施方案中,在哺乳动物细胞中表达本发明的融合蛋白。

[0114] 本发明还提供了用于产生双特异性抗体融合蛋白的方法,其包括在适合于从编码所述双特异性抗体融合蛋白的 DNA 序列中表达出蛋白质的条件下培养包含本发明的载体的宿主细胞。本发明进一步提供了用于分离所述双特异性抗体融合蛋白的方法。

[0115] 在产生之后,当需要时,通过使用本领域已知的任何合适方法,可以纯化出本发明的双特异性抗体融合蛋白。可以使用例如但不限于色谱法技术,例如离子交换、大小排阻、

G 蛋白或疏水相互作用色谱法。

[0116] 双特异性抗体融合蛋白的大小可以通过本领域已知的常规方法来证实,例如大小排阻色谱法和非还原性 SDS-PAGE。此类技术可以用于证实,所述蛋白质未二聚化和 / 或不具有部分缺失(例如 dAb 部分)。如果检测出二聚体,那么可以通过使用如上所描述的常规色谱法技术来从二聚体种类中纯化出单体的双特异性抗体融合蛋白。

[0117] 本发明的双特异性抗体融合蛋白在疾病或病症的治疗中 useful,所述疾病或病症包括炎性疾病和病症、免疫疾病和病症、纤维变性病症和癌症。

[0118] 术语“炎性疾病或病症”和“免疫疾病或病症”包括类风湿性关节炎、银屑病关节炎、斯蒂尔病、穆-韦病(Muckle Wells disease)、银屑病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、SLE(系统性红斑狼疮)、哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、多发性硬化、脉管炎、I 型糖尿病、移植和移植抗宿主病。

[0119] 术语“纤维变性病症”包括特发性肺纤维化(IPF)、系统性硬化病(或硬皮病)、肾纤维化、糖尿病性肾病、IgA 肾病、高血压、终末期肾脏病、腹膜纤维变性(不卧床持续腹膜透析)、肝硬化、年龄相关的黄斑变性(ARMD)、视网膜病变、心脏反应性纤维化(cardiac reactive fibrosis)、瘢痕形成、瘢痕瘤、烧伤、皮肤溃疡、血管成形术、冠状动脉搭桥手术、关节成形术和白内障手术。

[0120] 术语“癌症”包括起于上皮的、在皮肤中或更通常地在身体器官(例如:乳腺、卵巢、前列腺、肺、肾、胰腺、胃、膀胱或肠)的衬里(lining)中发现的恶性新生长。癌症趋于浸润到相邻组织中并且扩散(转移)至远离的器官,例如:至骨、肝、肺或脑。

[0121] 因此,根据本发明的进一步方面,提供了药物组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂相联合的本发明的抗体融合物。还提供了本发明的抗体融合蛋白在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。最优选地,所述疾病或病症是炎性疾病或病症。

[0122] 根据本发明的药物组合物可以采取适合于口服、颊、肠胃外、皮下、鼻、局部、眼或直肠施用的形式,或者适合于通过吸入或吹入进行施用的形式。

[0123] 当适当时,例如如果所述抗体融合蛋白的单结构域抗体与白蛋白相结合,那么可以值得做的是,通过使用本领域已知的任何合适方法,用人或重组血清白蛋白对所述双特异性融合蛋白进行预配制。

[0124] 对于口服施用,所述药物组合物可以采取例如片剂、锭剂或胶囊的形式,其通过常规方法用药学上可接受的赋形剂例如粘合剂(例如预胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或硅石);崩解剂(例如马铃薯淀粉或乙醇酸钠);或润湿剂(例如月桂基硫酸钠)来制备。片剂可以通过本领域众所周知的方法进行包衣。用于口服施用的液体制剂可以采取例如溶液、糖浆剂或悬浮液的形式,或者它们可以呈现为用于在使用前用水或其他合适的媒介物进行构建的干燥产物。此类液体制剂可以通过常规方法用药学上可接受的添加剂来进行制备,所述添加剂例如为悬浮剂、乳化剂、非水性媒介物或防腐剂。当适当时,所述制剂还可以包含缓冲盐类、矫味剂、着色剂或甜味剂。

[0125] 用于口服施用的制剂可以适当地进行配制,以产生活性化合物的受控释放。

[0126] 对于颊施用,所述组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0127] 本发明的双特异性抗体可以被配制成为用于肠胃外施用,所述肠胃外施用通过注射,例如通过推注或输注来进行。用于注射的制剂可以呈现为单位剂型,例如在玻璃安瓿或多剂量容器例如玻璃小瓶中。用于注射的组合物可以采取诸如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳状液的形式,并且可以包含配制试剂 (formulatory agent),例如悬浮剂、稳定剂、防腐剂 and / 或分散剂。备选地,活性成分可以为用于在使用前用合适的媒介物例如无热原的无菌水进行构建的粉末形式。

[0128] 除了上面所描述的制剂外,本发明的双特异性抗体也可以配制为贮库制剂。此类长效制剂可以通过植入或者通过肌内注射来进行施用。

[0129] 对于鼻施用或通过吸入施用,根据本发明的化合物可以方便地以用于加压包装或喷雾器的喷雾剂呈现形式进行递送,其中使用合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、一氟三氯甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体或气体混合物。

[0130] 如果需要,所述组合物可以呈现在包装或分配装置中,所述包装或分配装置可以包含一个或多个含有活性成分的单位剂型。所述包装或分配装置可以附有关于施用的说明书。

[0131] 对于局部施用,根据本发明的化合物可以方便地配制在包含活性组分的合适的软膏中,所述活性组分悬浮或溶解在一种或多种药学上可接受的载体中。具体的载体包括例如矿物油、液体石油、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯、乳化蜡和水。备选地,根据本发明的化合物可以配制在包含活性组分的合适的洗剂中,所述活性组分悬浮或溶解在一种或多种药学上可接受的载体中。具体的载体包括例如矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、鲸蜡基酯蜡、鲸蜡硬脂醇 (cetearyl alcohol)、苯甲醇、2-辛基十二烷醇和水。

[0132] 对于眼施用,根据本发明的化合物可以方便地配制为在等渗的、pH 经调整的无菌盐水中的微离子化 (microionized) 的悬浮液,其中具有或不具有防腐剂例如杀细菌剂或杀真菌剂,例如硝酸苯汞、苯扎氯铵或醋酸氯己定。备选地,对于眼施用,化合物可以配制在软膏例如凡士林中。

[0133] 对于直肠施用,根据本发明的化合物可以方便地配制为栓剂。这些可以通过将活性组分与合适的非刺激性赋形剂相混合来制备,所述非刺激性赋形剂在室温下是固体但在直肠温度下是液体,并因而将会在直肠中融化从而释放出活性组分。此类材料包括例如可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0134] 对于预防或治疗特定病状所需的本发明化合物的量将依赖于所选择的化合物和待治疗的患者的病状而改变。然而,一般而言,日剂量可以为大约 10ng/kg 至 1000mg/kg,通常 100ng/kg 至 100mg/kg,例如对于口服或颊施用为大约 0.01mg/kg 至 40mg/kg 体重,对于肠胃外施用为大约 10ng/kg 至 50mg/kg 体重,和对于鼻施用或者通过吸入或吹入施用为大约 0.05mg 至大约 1000mg,例如大约 0.5mg 至大约 1000mg。

[0135] 本发明的每个实施方案的优选特征比照适用于其他实施方案中的每一个。在本说明书中所引用的所有出版物 (包括但不限于专利和专利申请) 通过提及而合并入本文,就如同每一单个出版物被明确和单独地指明通过提及而合并 (好像完全阐述似的) 一样。

[0136] 现在,将就下列实施例而言来描述本发明,所述实施例仅是举例说明性的,而无论如何不应当解释为限制了本发明的范围。

[0137] 附图列表:

- [0138] 图 1 :Fab-dAbs 的图解表示,其中 dAb 在 C- 末端处。
- [0139] 图 2 :Fab-didAbs 的图解表示。
- [0140] 图 3 :FabA-dAbL3(CK-SG₄SE) (1) 和 FabA-dAbL3(CK-G[APAPA]₂) (2) 的 SDS PAGE 分析。
- [0141] 图 4 :FabA-dAbL3(CK-SG₄SE) (1) 和 FabA-dAbL3(CK-G[APAPA]₂) (2) 的 Western 印迹分析。
- [0142] 图 4a :FabB-didAbs 的 SDS PAGE :
- [0143] 泳道 M = SeeBlue 标准参照物
- [0144] 泳道 1 和 2 = IgG 对照
- [0145] 泳道 3 = FabB
- [0146] 泳道 4 = FabB-didAb, -dAbL1(CK-G₄Sx2) & dAbH1(CH1-G₄Sx2)
- [0147] 泳道 5 = FabB-didAb, -dAbL2(CK-G₄Sx2) & dAbH2(CH1-G₄Sx2)。
- [0148] 图 5 :结构域抗体 dAbH1、dAbH2、dAbL1 和 dAbL2 以及源自这些抗体中每一个的 CDRs 的序列。
- [0149] 图 6 :FabB-dAb 构建体,其包含与结构域抗体相融合的 FabB 重链或轻链可变结构域。
- [0150] 图 7 :Fab' A 重链和轻链序列以及 FabA 重链序列。
- [0151] 实验 :
- [0152] 实施例 1 :对于人血清白蛋白特异的 dAb 的产生
- [0153] 使用重组 DNA 技术来产生由符合读框的 DNA 编码的转录单元,其编码具有对于人血清白蛋白的特异性的 dAb。
- [0154] 当需要时,使用重组 DNA 技术可以产生由符合读框的 DNA 编码的转录单元,其编码具有对于募集蛋白的特异性的 dAb。
- [0155] 实施例 2 :抗体片段的产生
- [0156] 为了 dAb 与轻链 C- 末端的融合,合成了编码人 κ 轻链恒定区(具有 κ 恒定区的 Km3 同种异型)、肽接头和 dAb 的 DNA,并将其作为 SacI-PvuII 限制片段克隆到 UCB-Celltech 内部的(in-house)表达载体 pTTOD(Fab) (pTTO-1 的衍生物,其描述在 Popplewell 等人, Methods Mol. Biol. 2005 ;308 :17-30 中)中,所述表达载体包含编码人 γ -1CH1 恒定区的 DNA。这产生了由下列组成的双顺反子基因排列 :经由接头与 dAb 相融合的人源化轻链的基因,随后为人源化重链 Fab 片段的基因,两者都在 tac 启动子的控制下。还编码了在 Gly4Ser 接头上游的独特的 BspE1 位点,或在富含 Ala-Pro 的接头上游的 AscI 位点。
- [0157] 为了 dAb 与重链 C- 末端的融合,合成了编码人 CH1 片段(具有 γ 1 同种型)以及随后的接头编码序列和 dAb 的 DNA。将这作为 ApaI-EcoRI 限制片段亚克隆到 UCB-Celltech 内部的表达载体 pTTOD(Fab) (pTTO-1 的衍生物,其描述在 Popplewell 等人(上文)中)中,所述表达载体包含编码人 γ -1CH1 恒定区的 DNA。这产生由下列组成的双顺反子基因排列 :人源化轻链的基因,非编码性基因间序列,随后为经由接头与 dAb 相融合的重链的基因,这两个基因都在 tac 启动子的控制下。将该重组表达质粒转化到大肠杆菌菌株 W3110 中,在其中通过添加 IPTG 来诱导表达。最初通过在大约 0.5 的 OD(600nm) 时添加 200 μ M IPTG 来

以小规模进行表达实验 (5ml 培养体积), 在诱导后 2 小时收获细胞, 并且在 Tris/EDTA 中于 30°C 提取过夜。将经澄清的提取物用于通过 Biacore 的亲合力分析。选择给出有前途的表达产率和活性的构建体用于发酵。

[0158] 方法

[0159] 在下列实施例中, 将 dAb 所与之融合的抗体链命名为 CK 或 LC (对于 c κ 轻链), 和命名为 CH1 或 HC (对于重链恒定结构域 CH1)。

[0160] 用于在大肠杆菌中表达的 FabA-dAb 融合物质粒的构建

[0161] 通过使 dAbL3 或 dAbH4 与 FabA 的轻链或重链恒定区的 C- 末端相融合来构建 Fab-dAb 融合蛋白。使用柔性接头 (SGGGGSE (SEQ ID NO :1)) 或刚性接头 (G (APAPA)₂ (SEQ ID NO :34)) 来将 dAb 与 c κ 区 (SEQ ID NO :75) 相连接, 而使用接头 DKTHTS (SEQ ID NO :2) 来将 dAb 与 CH1 区 (SEQ ID NO :76) 相连接。作为片段合成地制备编码恒定区 -dAb 融合物的 DNA 序列, 以使得能够亚克隆到内部的 pTTOD 载体的 FabA 序列中。

[0162] 通过下列方式来构建轻链 -dAb 融合物: 将合成的基因的 SacI-ApaI 片段亚克隆到能够表达 FabA 的质粒的相应位点中, 所述合成的基因编码经由柔性接头 (SGGGGSE (SEQ ID NO :1)) 或刚性接头 (G (APAPA)₂ (SEQ ID NO :34)) 与 dAbL3 或 dAbH4 相融合的 C- 末端 c κ 。

[0163] 通过下列方式来构建重链 -dAb 融合物: 将合成的基因的 ApaI-EcoRI 片段亚克隆到能够表达 FabA 的质粒的相应位点中, 所述合成的基因编码经由 DKTHTS 接头与 dAbL3 或 dAbH4 相融合的 C- 末端 CH1。

[0164] Fab'A 源自 IL-1 β 结合抗体, 其重链和轻链序列分别提供在图 7 中所示的 SEQ ID NO :74 和 75 中。在其中轻链具有附着的 dAb 的 Fab'A 中, 将重链的铰链改变为 DKTHTS, 即使当无 dAb 与重链 (SEQ ID NO :76) 相附着时。

[0165] FabA 包含相同的轻链序列 (SEQ ID NO :75) 和在链间半胱氨酸处终止的截短的重链序列 (SEQ ID NO :77)。

[0166] dAbL3 和 dAbH4 分别为结合人血清白蛋白的轻链和重链结构域抗体。

[0167] 用于在大肠杆菌中表达的 FabA-didAb 融合物质粒的构建

[0168] 通过将编码 CH1-dAb 融合物的 ApaI-EcoRI 片段亚克隆到现有的 Fab-dAb 质粒 (其中 dAb 经由柔性接头与轻链相融合) 中来构建在轻链和重链上均具有 dAbL3 或 dAbH4 的 FabA-didAb。

[0169] 用于在哺乳动物细胞中表达的 FabB-dAb 融合物质粒的构建

[0170] FabB-dAbs、FabB-dAbH1 (CH1-G₄Sx2)、FabB-dAbH2 (CH1-G₄Sx2)、FabB-dAbL1 (CH1-G₄Sx2)、FabB-dAbL2 (CH1-G₄Sx2) 都通过 PCR 进行装配, 然后克隆到哺乳动物表达载体中从而在 HCMV-MIE 启动子和 SV40E polyA 序列的控制下。这些与包含 FabB 轻链的相似载体相配对以用于在哺乳动物细胞中表达 (参见下文)。

[0171] FabB 源自结合细胞表面共刺激分子的抗体。

[0172] 如实施例 3 中所描的, 获得 dAbH1、dAbH2、dAbL1 和 dAbL2。

[0173] 用于在哺乳动物细胞中表达的 FabB-dAb 融合质粒的构建

[0174] FabB-dAbs、FabB-dAbH1 (CH1-G₄Sx2)、FabB-dAbH2 (CH1-G₄Sx2)、FabB-dAbL1 (CK-G₄Sx2)、FabB-dAbL2 (CK-G₄Sx2) 都通过 PCR 进行装配, 然后克隆到哺乳动物表达载体中从而在 HCMV-MIE 启动子和 SV40E polyA 序列的控制下。

[0175] FabB-dAbs 和 didAbs 的哺乳动物表达

[0176] 根据制造商的说明书,使用 Invitrogen 的 293fectin 转染试剂,用重链和轻链质粒转染 HEK293 细胞。简而言之,使 2 μ g 重链质粒 +2 μ g 轻链质粒与 10 μ l 293fectin+340 μ l Optimem 介质一起在 RT 下温育 20 分钟。然后,将该混合物添加至处于悬浮的 5×10^6 个 HEK293 细胞,并且于 37°C 在摇动下温育 4 天。

[0177] Biacore

[0178] 使用 CM5 传感器芯片和 HBS-EP (10mM HEPES (pH7.4), 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 表面活性剂 P20) 运行缓冲液,通过在 BiacoreT100 上进行的表面等离子共振 (SPR) 来测定关于 Fab-dAb 构建体的相互作用的结合亲和力和动力学参数。使用人 F(ab')₂- 特异性山羊 Fab (Jackson ImmunoResearch, 109-006-097) 或内部产生的抗人 CH1 单克隆抗体来将 Fab-dAb 样品捕获至传感器芯片表面。通过标准的胺偶联化学来达到捕获抗体的共价固定。

[0179] 每个试验循环由下述组成:首先采用 1 分钟注射来捕获 Fab-dAb,随后为由 3 分钟的抗原注射组成的缔合阶段,在这之后监控解离 5 分钟。在每个循环后,采用下列方式来使捕获表面再生:2 \times 1 分钟的 40mM HCl 注射,随后为 30 秒的 5mM NaOH。所使用的流速对于捕获来说为 10 μ l/分钟,对于缔合和解离阶段来说为 30 μ l/分钟,和对于再生来说为 10 μ l/分钟。

[0180] 关于动力学试验,执行抗原滴定法(对于人血清白蛋白通常为 62.5nM-2 μ M,对于 IL-1 β 为 1.25-40nM),将空白流动池 (flow-cell) 用于参照扣除,并且包括了缓冲液空白注射以扣除仪器噪声和偏移。

[0181] 使用 Biacore T100 评价软件,通过所得到的传感图 (sensorgram) 与标准 1 : 1 结合模型的同时总体配合 (simultaneous global-fitting) 来测定动力学参数。

[0182] 为了测试同时的结合,在被捕获的 Fab-dAb 上注射分开的 5 μ M HSA 或 100nM IL-1 β ,或者 5 μ M HSA 和 100nM IL-1 β 的混合溶液的 3 分钟注射。

[0183] 从大肠杆菌中纯化 Fab-dAb

[0184] 周质提取

[0185] 将在周质内包含 Fab-dAbs 的大肠杆菌粒状沉淀重悬浮在具有 100mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH 7.4 的原始培养体积中。然后,使这些悬浮液于 4°C 在 250rpm 下温育 16 小时。使重悬浮的粒状沉淀于 4°C 以 10000xg 离心 1 小时。去除上清液,并且进行 0.45 μ m 过滤。

[0186] G 蛋白捕获

[0187] 通过 G 蛋白色谱法从经过滤的上清液中捕获 Fab-dAbs。简而言之,以 20 分钟的停留时间将上清液施加至在 20mM 磷酸盐, 150mM NaCl pH7.1 中平衡的 Gammabind Plus Sepharose (GE Healthcare) 柱。用 20mM 磷酸盐, 150mM NaCl pH7.1 洗涤该柱,并且用 0.1M 甘氨酸 /HCl pH2.8 洗脱下结合的材料。收集洗脱峰,并且用 1M 乙酸钠将 pH 调整至 \sim pH5。将 pH 经调整的洗出液浓缩,并且使用 10k MWC0 膜而渗滤到 50mM 乙酸钠 pH4.5 中。

[0188] 离子交换

[0189] 用 NaCl 洗脱梯度,在 pH4.5 下,通过阳离子交换色谱法来进一步纯化 Fab-dAbs。简而言之,将经渗滤的 G 蛋白洗出液施加至在 50mM 乙酸钠 pH4.5 中平衡的 Source15S (GE

Healthcare) 柱。用 50mM 乙酸钠 pH4.5 洗涤该柱,并且用 20 柱体积的在 50mM 乙酸钠 pH4.5 中 0 至 1M NaCl 的线性梯度来洗脱下结合的材料。在该梯度自始至终收集第三柱体积级分。通过 A280 和 SDS-PAGE 来分析所述级分,并且汇集相关级分。

[0190] 凝胶过滤

[0191] 如果需要,通过凝胶过滤来进一步纯化 Fab-dAbs。简而言之,将 FabA-dAbL3(CK-SG₄SE) 汇集的离子交换洗脱级分施加至在 50mM 乙酸钠,125mM NaCl pH 5.0 中平衡的 Superdex200(GE Healthcare) 柱,并且用 50mM 乙酸钠,125mM NaCl pH 5.0 的等度梯度(isocratic gradient)来进行洗脱。在该梯度自始至终收集 1/120 柱体积级分。通过 A280 和 SDS-PAGE 来分析所述级分,并且汇集相关级分。

[0192] 对于未经历凝胶过滤的 Fab-dAbs,将汇集的离子交换洗脱级分浓缩,并且使用 10k MWC0 膜而渗滤到 50mM 乙酸钠,125mM NaCl pH 5.0 中。

[0193] SDS-PAGE

[0194] 当需要时用水稀释样品,然后向 10 μ l 中添加 10 μ L 2X 样品走样缓冲液。对于非还原的样品,在这一点上添加 2 μ L 100mM NEM,而对于还原的样品,添加 2 μ L 10X 还原剂。使样品涡旋振荡,于 85°C 温育 5 分钟,冷却,并且在 12500rpm 下离心 30 秒。将准备好的样品加载到 4-20% 丙烯酰胺 Tris/甘氨酸 SDS 凝胶上,并且在 125V 下走样 100 分钟。将凝胶转移到 PVDF 膜上以用于 Western 印迹法,或者用考马斯蓝蛋白质染料进行染色。

[0195] Western 印迹法

[0196] 在 150mA 下,在 12mM Tris,96mM 甘氨酸 pH8.3 中,将凝胶转移至 PVDF 膜,共 16 小时。用在 PBS+0.1% Tween20 中的 2% Marvel™(封闭缓冲液)使 PVDF 膜封闭 1 小时。

[0197] 抗-轻链

[0198] HRP-兔抗人 κ 轻链,在封闭缓冲液中的 1/5000 稀释度,共 1 小时。

[0199] 抗-重链

[0200] 小鼠抗人重链,在封闭缓冲液中的 1/7000 稀释度,共 1 小时。随后为 HRP-山羊抗小鼠,在封闭缓冲液中的 1/2000 稀释度,共 1 小时。

[0201] 抗-His 标签

[0202] 兔抗 His6,在封闭缓冲液中的 1/1000 稀释度,共 1 小时。随后为 HRP-山羊抗兔 IgG,在封闭缓冲液中的 1/1000 稀释度,共 1 小时。

[0203] 所有印迹用 100ml PBS+0.1% Tween20 洗涤 6 次,每次洗涤 10 分钟。印迹用下列方式进行显现:用 ECL 试剂 1 分钟,随后暴露于 Amersham Hyperfilm;或者用金属增强的 DAB 试剂 20-30 分钟,随后为水。

[0204] 高温反相 HPLC

[0205] 样品(2 μ g)于 80°C 在 2.1mm C8 Poroshell1 柱上进行分析,其中使用 2ml/分钟的流速和 18-38% B 的梯度,经过 4 分钟。

[0206] A = 0.1% TFA,在 H₂O 中

[0207] B = 0.065% TFA,在 80 : 20 IPA : MeOH 中

[0208] 通过在 214nm 处的吸收来进行检测。

[0209] ELISA

[0210] 使用夹心 ELISA 来测量 Fab-dAb 的产率。简而言之,用抗-CH1 抗体来捕获

Fab-dAb, 随后用抗- κ -HRP 来揭示。

[0211] 实施例 3:

[0212] 产生抗白蛋白抗体

[0213] 用重组的 chromapure 人血清白蛋白 (购自 Jackson) 对 1/2 垂耳兔进行免疫接种。兔以皮下方式接受 100ug HSA 蛋白的 3 次免疫接种, 第一次免疫接种在完全弗氏佐剂中, 而后续的免疫接种在不完全弗氏佐剂中。使用 W004/051268 中描述的方法来分离出结合人、小鼠和大鼠血清白蛋白的抗体 1 和 2。分离出抗体 1 和 2 的重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL) 的基因, 并进行测序, 在经由反转录 PCR 进行克隆后。

[0214] 将所嫁接的轻链序列亚克隆到兔轻链表达载体 pVRbcK 中, 所述表达载体包含编码兔 C- κ 恒定区的 DNA。将所嫁接的重链序列亚克隆到兔重链表达载体 pVRbHFab 中, 所述表达载体包含编码兔 Fab' 重链恒定区的 DNA。将质粒共转染到 CHO 细胞中, 并且就白蛋白结合和亲和力来筛选所产生的抗体 (表 1)。根据制造商的说明书 (Invitrogen, 目录号 11668), 使用 Lipofectamine™2000 操作程序来进行 CHO 细胞的转染。

[0215] 产生人源化的结构域抗体 dAbL1、dAbH1、dAbL2 和 dAbH2

[0216] 通过使用人 V- 区接纳体构架和供体残基 (在构架区中) 来设计人源化的 VL 和 VH 区。对于抗体 1 和 2 中的每一种, 设计一个所嫁接的 VL 区 (L1 (SEQ ID NO :53) 和 L2 (SEQ ID NO :55)) 和一个 VH 区 (H1 (SEQ ID NO :52) 和 H2 (SEQ ID NO :54)), 并且通过寡核苷酸装配和 PCR 诱变来构建基因。所嫁接的结构域抗体及其 CDRs 显示在图 5 中。

[0217] 表 1: 抗白蛋白抗体的亲和力

[0218]

	作为兔 Fab		作为人源化的 IgG
	人 SA nM	鼠类 SA nM	人 SA nM
抗体 1	0.31	2.6	0.82
抗体 2	0.33	12	0.13

[0219] 实施例 4: 在哺乳动物细胞中表达的 FabB-dAbs 的分析

[0220] 如在“方法”中所描述的, 产生 FabB-dAb 构建体, 并且在 BIAcore 中直接测试包含 FabB-dAbs 的来自经转染的 HEK293 细胞的上清液。

[0221] 进行动力学分析以评估 HSA 与 FabB-dAb 构建体的相互作用。这些构建体由与 FabB 的 CH1 的 C- 末端相融合的 dAbL1、dAbH2 或 dAbL3 组成 (参见图 6)。FabB-dAbL1 对于 HSA ($K_D = 170\text{nM}$) 具有比 FabB-dAbL3 ($K_D = 392\text{nM}$) 更高的亲和力。FabB-dAbH2 显示出具有最差的针对 HSA 的亲和力 ($K_D = 1074\text{nM}$), 参见表 2。

[0222] 表 2

[0223]

构建体	k_a ($\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{M}$)
FabB-dAbL1 (CH1-G ₄ Sx2)	1.91 ± 0.74	2.18 ± 1.21	170 ± 78
FabB-dAbH2 (CH1-G ₄ Sx2)	2.66 ± 0.39	29 ± 4.76	1074 ± 42
FabB-dAbL3 (CH1-G ₄ Sx2)	2.63 ± 0.39	9.87 ± 1.63	392 ± 119

[0224] 关于 HSA 与融合至 dAbL1、dAbH2 或 dAbL3 的 FabBs 的结合而测定的亲和力和动力学参数。所显示的数据为平均值 ± SEM。(对于 FabB-dAbL1 和 FabB-dAbH2, n = 4。对于 FabB-dAbL3, n = 2)。

[0225] FabB-dAb 蛋白质的 SDS-PAGE 和 Western 印迹法证实了,所产生的 FabB-dAbs 具有预期的大小。

[0226] 实施例 5:在哺乳动物细胞中表达的 FabB-didAbs 的分析

[0227] 如在“方法”中所描述的,产生 FabB-didAb 构建体,并且在 BIAcore 中直接测试包含 didAbs 的来自经转染的 HEK293 细胞的上清液。

[0228] 使用其中将单 dAbs 与 Fab 的重链和轻链 C-末端两者相融合的 didAb 构建体来进行进一步的分析。与单独的单 dAb 相比较而言,其中 didAb 源自天然重链和轻链可变结构域配对的构建体显示出亲和力的显著改善(表 2 和 3)。由两个等同的 dAbL1s 组成的 didAb 融合物未显示出超过对于单个 dAbL1 所看到的那种的在亲和力方面的改善(数据未显示)。

[0229] 表 3

[0230]

构建体	k_a ($\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{M}$)
FabB-didAb, -dAbL1 (CK-G ₄ Sx2) & dAbH1 (CH1-G ₄ Sx2)	1.78	0.16	9
FabB-didAb, -dAbL2 (CK-G ₄ Sx2) & dAbH2 (CH1-G ₄ Sx2)	0.54	0.21	39

[0231] 关于 HSA 与融合至 dAbL1 & dAbH1 或 dAbL2 & dAbH2 的 FabBs 的结合而测定的亲和力和动力学参数。

[0232] FabB-didAb 蛋白质的 SDS-PAGE 证实了,所述 FabB-didAbs 良好地表达并且具有预期的大小(参见图 4a)。注意:该 SDS PAGE 凝胶为由细胞所表达的总蛋白质。

[0233] 实施例 6:经纯化的 FabA-dAbs 的分析

[0234] 如在“方法”中所描述的,构建出用于在大肠杆菌中表达 Fab-dAbs, Fab' A-dAbL3(CK-SG₄SE)Fab' A-dAbL3(CK-G[APAPA]₂)的质粒。如在“方法”中所描述的,将 Fab-dAbs 表达到大肠杆菌的周质中,并且纯化至均质。通过高温反相 HPLC、SDS-PAGE 和 Western 印迹法来评估 Fab-dAbs 的纯度。还通过 Biacore 就抗原结合来对 Fab-dAbs 进行评估。

[0235] 高温反相 HPLC

[0236] 如在“方法”中所描述的来施行的高温反相 HPLC 给出了在 FabA-dAbL3(CK-SG₄SE)和 FabA-dAbL3(CK-G[APAPA]₂)中所包含的所有种类的定量分析。所存在的每种种类的百分比显示在表 4 中。

[0237] 表 4 :在 Fab-dAb 批次中存在的种类的定量

[0238]

种类	Fab' A-dAbL3(CK-SG ₄ SE)	Fab' A-dAbL3(CK-G[APAPA] ₂)
1	0.6%	1.8%
2	0.6%	0.0%
3	1.0%	0.3%
4	0.9%	0.8%
Fab-dAb	85.5%	92.9%
Di Fab-dAb	11.5%	4.2%

[0239] SDS-PAGE

[0240] 如在“方法”中所描述的,在非还原和还原条件下准备 Fab-dAb 样品,并且在凝胶上走样。对凝胶进行考马斯染色。Fab' A-dAbL3(CK-SG₄SE) 和 Fab' A-dAbL3(CK-G[APAPA]₂) 这两种 Fab-dAb 样品的条带图谱与通过高温反相 HPLC 所观察到的图谱良好地相符合(图 3)。

[0241] Western 印迹

[0242] 如在“方法”中所描述的,对 Fab-dAb 样品实施非还原 SDS-PAGE,随后为用抗-轻链和抗-重链抗体进行的 Western 印迹分析。这证实了,dAb 在 Fab 的轻链上,并且重链在两种样品中均是未修饰的(图 4)。还证明了,通过经考马斯染色的非还原 SDS PAGE 而检测出的所有条带都是 Fab-dAb 相关产物。

[0243] Biacore

[0244] 将如在“方法”中所描述的通过 SPR 的动力学分析用于评估人血清白蛋白与 Fab' A-dAbL3(CK-SG₄SE) 和 Fab' A-dAbL3(CK-G[APAPA]₂) 的结合。表 5 中的结果证明,这两种构建体均能够以大约 1 μM 的相似的亲和力(K_D) 结合人血清白蛋白。

[0245] 表 5

[0246]

构建体	k_a ($\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{M}$)
Fab' A-dAbL3 (CK-SG ₄ SE)	3.44	1.42	411
Fab' A-dAbL3 (CK-G[APAPA] ₂)	9.61	2.85	296

[0247] 进一步的动力学分析证明,所有融合构建体保留了原始 FabA 针对 IL-1β 的相互作用特征(表 6),其中在动力学和亲和力参数方面仅可见很小的差异。

[0248] 表 6

[0249]

构建体	k_a ($\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-5} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-12} \text{M}$)
Fab'A-dAbL3 (CK-SG ₄ SE)	1.90	4.21	221
Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA] ₂)	2.17	3.99	184
Fab'A	2.02	6.46	320

[0250] 通过将每种构建体捕获至传感器芯片表面来评估每种构建体同时与人血清白蛋白和 IL-1 β 抗原两者相结合的潜力,然后施行分开的 3 分钟的 5 μ M 人血清白蛋白或 100nM IL-1 β 注射,或者 5 μ M 人血清白蛋白和 100nM IL-1 β 两者的混合溶液注射。对于每种 Fab-dAb 构建体,对于组合的 HSA/IL-1 β 溶液所看到的应答与独立注射的应答之和几乎等同,参见表 7。这显示,所述 Fab-dAbs 能够同时与 IL-1 β 和人血清白蛋白两者相结合,并且 IL-1 β 或人血清白蛋白的结合不抑制另一个的相互作用。原始 FabA 仅与 IL-1 β 结合,并且有着可忽略的与人血清白蛋白的结合。

[0251] 表 7

[0252]

构建体	分析物	结合 (RU)
Fab'A-dAbL3 (CK-SG ₄ SE)	HSA + IL-1 β	37.6
	HSA	13.2
	IL-1 β	24.7
		(37.9)
Fab'A-dAbL3 (CK-G[APAPA] ₂)	HSA + IL-1 β	61.9
	HSA	30.7
	IL-1 β	32.9
		(63.6)
Fab'A	HSA + IL-1 β	30.3
	HSA	1.3
	IL-1 β	28.7
		(30.0)

[0253] 上表显示了在分开注射 HSA 或 IL-1 β ,或者注射预混合的 HSA 和 IL-1 β 后,对于每种构建体所看到的结合应答 (RU)。在每种情况下,终浓度对于 HSA 来说为 5 μ M,和对于 IL-1 β 来说为 100nM。独个的 HSA 和 IL-1 β 应答之和显示在括号中。

[0254] 实施例 7:FabA didAbs

[0255] FabA-didAbs 在大肠杆菌中的表达

[0256] 在大肠杆菌中表达 C-末端 HIS6 标签终止的 FabA-dAbs 和 FabA-didAb 融合物。在周质提取后,经由 C-末端 His6 标签来纯化 dAb 融合蛋白。通过用抗 -CH1 和抗 -c κ 抗体来进行的非还原凝胶的 Western 印迹法来分析 Fab 表达。将 FabA-dAb 和 FabA-didAb 表达为全长蛋白质,并且显示出与所述两种抗体检测试剂反应。

[0257] 在大肠杆菌中表达的 FabA-didAbs 的分析

[0258] 进行进一步的分析以表征 HSA 与已向其融合了一个或多个 dAbs 的 FabA 构建体的结合。对于其中 dAbL3 或 dAbH4 与 FabA 的轻链或重链相融合的各种构建体进行结合试验(关于构建体的细节和结合数据的概括参见表 8)。尽管看到仅在轻链或重链上携带 dAbH4

的构建体以相当差的亲和力（分别 $\approx 9 \mu\text{M}$ 和 $3 \mu\text{M}$ ）结合 HSA，但对于携带 dAbL3（作为单一融合物（在轻链或重链上）或者与在相对链上的第二个 dAb（dAbL3 或 dAbH4）搭档）的构建体观察到较高亲和力结合。

[0259] 表 8

[0260]

构建体	k_a ($\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)	K_D ($\times 10^{-9} \text{M}$)
FabA	—	—	nb
FabA-dAbL3 (LC-SG ₄ SE)	4.46	16.2	363
FabA-dAbH4 (LC SG ₄ SE)	—	—	9142
FabA-dAbL3 (HC-DKTHTS)	8.24	15.4	187
FabA-dAbH4 (HC-DKTHTS)	—	—	2866
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG ₄ SE) & -dAbL3 (HC-DKTHTS)	3.00	15.1	502
FabA-didAb, -dAbL3 (LC-SG ₄ SE) & -dAbH4 (HC-DKTHTS)	4.36	16.3	373

[0261] 关于 HSA 与在轻链 (LC) 或重链 (HC) 或两者上携带 dAbL3 或 dAbH4 的 FabAs (如所示的) 的结合而测定的亲和力和动力学参数。未检测到 HSA 与原始 FabA 的结合 (nb)。关于 HSA 与具有 (在 HC 上的 dAbH4) 或 (在 LC 上的 dAbH4) 的 FabA 的结合的相互作用动力学太快而无法测定, 因此由稳态结合来测定亲和力 (K_D)。

序列表

<110>UCB Pharma SA
 Humphreys, David P
 Dave, Emma

<120> 双特异性抗体融合物

<130>G0045-W001

<160>77

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>1

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 1 5

<210>2

<211>6

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>2

Asp Lys Thr His Thr Ser
 1 5

<210>3

<211>5

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>3

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210>4

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>4

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ala Ser

1 5 10

<210>5

<211>16

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<220>

<221>misc_feature

<222>(7)..(7)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<400>5

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10 15

<210>6

<211>13

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<220>

<221>misc_feature

<222>(7)..(7)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<400>6

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Ser Gly Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

<210>7

<211>28

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>7

Pro Gly Gly Asn Arg Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr
 20 25

<210>8

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>8

Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10

<210>9

<211>6

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>9

Ala Thr Thr Thr Gly Ser
1 5

<210>10

<211>21

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>10

Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Ser Pro Pro Ser Lys Glu
1 5 10 15
Ser His Lys Ser Pro
 20

<210>11

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>11

Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
1			5					10					15	

<210>12

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>12

Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala	Pro	Ser	Met	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210>13

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>13

Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5				10						15

<210>14

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>14

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210>15

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>15

Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Leu	Ile	Thr	Ile	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210>16

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>16

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

<210>17

<211>12

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>17

Gly	Gly	Glu	Lys	Ser	Ile	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5						10	

<210>18

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>18

Arg	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Pro	Pro	Phe	Pro	Phe	Gly	Phe	Pro	Ser	Val
1				5						10				15	

Arg Pro

<210>19

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>19

Tyr	Pro	Arg	Ser	Ile	Tyr	Ile	Arg	Arg	Arg	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Leu
1				5						10				15	

Thr Thr

<210>20

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>20

Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr

1 5 10 15

Phe Asn

<210>21

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>21

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu

1 5 10 15

Pro Ala

<210>22

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>22

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile

1 5 10 15

Arg Thr

<210>23

<211>18
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>23

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala
 1 5 10 15
 Phe Gly

<210>24
 <211>18
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>24

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala

<210>25
 <211>18
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>25

Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro
 1 5 10 15
 Asp Leu

<210>26

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>26

Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu

<210>27

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>27

Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Ile Ser

<210>28

<211>17

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>28

Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro

<210>29

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>29

Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro

<210>30

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>30

Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
 1 5 10 15
 Pro Tyr

<210>31

<211>17

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>31

Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro

<210>32

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>32

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
 1 5 10 15
 Leu Arg

<210>33

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>33

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
 1 5 10 15
 Phe Pro

<210>34

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>34

Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala
1 5 10

<210>35

<211>4

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>35

Pro Pro Pro Pro
1

<210>36

<211>8

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>36

Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
1 5

<210>37

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>37

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10

<210>38

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>38

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15
Pro Ala

<210>39

<211>25

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15
Pro Ala Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 20 25

<210>40

<211>30

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>40

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu
1				5					10					15	
Tyr	Asn	Ser	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Thr	Ala	Gly	Thr	Cys	Tyr		
			20					25					30		

<210>41

<211>31

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>41

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Gly	Lys	Pro	Thr	His
1				5					10					15	
Val	Asn	Val	Ser	Val	Val	Met	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Cys	Tyr	
			20					25					30		

<210>42

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>42

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
1				5					10					15	

<210>43

<211>26

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>43

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp

1 5 10 15

Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala

 20 25

<210>44

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>44

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Ser Cys Pro Ala

1 5 10

<210>45

<211>10

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<400>45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210>46

<211>15
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>46

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210>47
 <211>20
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20

<210>48
 <211>25
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 接头

<400>48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210>49

<211>21

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(12).. (12)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<400>49

Ala Ala Ala Gly Ser Gly Xaa Gly Gly Gly Ser Xaa Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Ala Ser Ala Ser
20

<210>50

<211>26

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头

<220>

<221>misc_feature

<222>(7).. (7)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(12)..(12)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(17)..(17)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<400>50

Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser	Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10						15
Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Ser						
				20					25						

<210>51

<211>31

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>接头

<220>

<221>misc_feature

<222>(7)..(7)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(12)..(12)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(17)..(17)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<220>

<221>misc_feature

<222>(22)..(22)

<223>Xaa 可以为任何天然出现的氨基酸

<400>51

Ala	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser	Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10						15
Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser	Xaa	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Ser	
				20					25						30

<210>52

<211>119

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>dAbH1

<400>52

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10						15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Ser	Asn	Tyr
				20					25						30
Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35					40						45
Gly	Ile	Ile	Trp	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Phe	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys
				50					55						60
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Thr	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met
65					70						75				80
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr
				85							90				95
Val	Pro	Gly	Tyr	Ser	Thr	Ala	Pro	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly
				100							105				110
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				115											

<210>53
 <211>110
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223>dAbL1

<400>53

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Ser	Asn
			20					25						30	
Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
		35					40						45		
Ile	Tyr	Glu	Ala	Ser	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75				80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Ile
				85					90					95	
Ser	Asp	Thr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105						110	

<210>54
 <211>120
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223>dAbH2

<400>54

Glu	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	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr
			20						25					30	

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
 85 90 95
 Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>55

<211>110

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>dAbL2

<400>55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Arg
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210>56

<211>10

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH1 dAbH1

<400>56

Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn

1 5 10

<210>57

<211>16

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH2 dAbH1

<400>57

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210>58

<211>13

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH3 dAbH1

<400>58

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210>59

<211>12

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL1 dAbL1

<400>59

Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser

1 5 10

<210>60

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 dAbL1

<400>60

Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser

1 5

<210>61

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL3 dAbL1

<400>61

Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr

1 5 10

<210>62

<211>10

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH1 dAbH2

<400>62

Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ala	Met	Thr
1				5					10

<210>63

<211>16

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH2 dAbH2

<400>63

Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Ala	Lys	Gly
1					5					10					15

<210>64

<211>14

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH3 dAbH2

<400>64

Gly	Gly	Tyr	Val	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu
1					5								10

<210>65

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL1 dAbL2

<400>65

Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Ser	Arg	Leu	Ala
1				5						10

<210>66

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 dAbL2

<400>66

Tyr	Ala	Ser	Thr	Val	Ala	Ser
1					5	

<210>67

<211>12

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL3 dAbL2

<400>67

Gln	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ala
1					5						10

<210>68

<211>232

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CH1-dAbH1

<400>68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn
 130 135 140
 Tyr Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 145 150 155 160
 Ile Gly Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala
 165 170 175
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln
 180 185 190
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 195 200 205
 Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210>69

<211>233

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CH1-dAbH2

<400>69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 115 120 125
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg
 130 135 140
 Tyr Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 145 150 155 160
 Ile Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Ala
 165 170 175
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Thr Thr Val Tyr Leu Gln
 180 185 190
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 195 200 205
 Gly Gly Tyr Val Ser Tyr Ala Asp Ala Thr Glu Leu Ser Leu Trp Gly
 210 215 220
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230

<210>70

<211>223

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CH1-dAbL1

<400>70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser
 130 135 140
 Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 165 170 175
 Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser
 195 200 205
 Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 210 215 220

<210>71
 <211>223
 <212>PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223>CH1-dAbl2

<400>71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser
 130 135 140
 Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
 165 170 175
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 180 185 190
 Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Ser Ser
 195 200 205
 Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 210 215 220

<210>72

<211>227

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>Ck1-dAbL1

<400>72

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro
 130 135 140
 Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly
 195 200 205
 Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 210 215 220

Glu Ile Lys
225

<210>73

<211>227

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>Ck1-dAbl2

<400>73

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu
 115 120 125
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln
 130 135 140
Ser Ile Gly Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
145 150 155 160
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Val Ala Ser Gly Val Pro
 165 170 175
Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 180 185 190
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr
 195 200 205

Asp Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 210 215 220

Glu Ile Lys
 225

<210>74

<211>255

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>Fab' A 重链

<400>74

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe
 35 40 45

Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu
 65 70 75 80

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 85 90 95

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe
 115 120 125

Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Thr Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255

<210>75

<211>235

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>Fab A 轻链

<400>75

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 Lys Met Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Val Gln
 165 170 175
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210>76

<211>250

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>Fab' A 重链改变的铰链

<400>76

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 85 90 95
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe
 115 120 125
 Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Thr Cys Asp Lys Thr His Thr Ser
 245 250

<210>77

<211>244

<212>PRT

<213>人工的

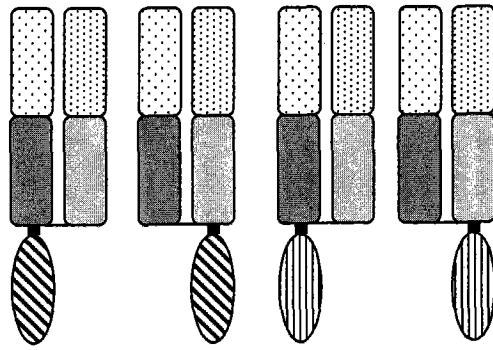
<220>

<223>Fab A 重链

<400>77

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Thr Ser Gly Val Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Thr Gln Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 85 90 95
 Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe
 115 120 125

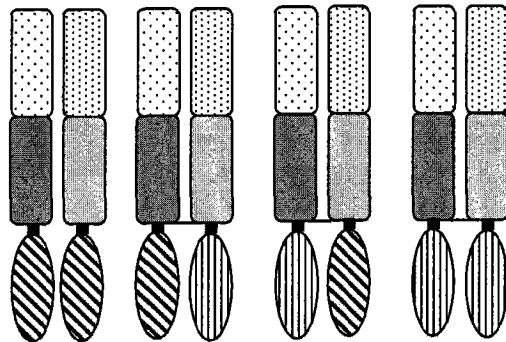
Val Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Thr Cys



经由接头(一)与轻链或重链的恒定区的 C-末端相连接的 dAbL 或 dAbH

轻链可变区 或 重链可变区 。恒定区 cκ 和 CH1 。结构域抗体片段 dAbL 和 dAbH

图 1



dAbL 和 dAbH 与每条链的恒定区的 C-末端相连接，
从而 LC-dAbL 或 LC-dAbH 融合物与 HC-dAbL 或 HC-dAbH 相配对

轻链可变区 或 重链可变区 。恒定区 cκ 和 CH1 。结构域抗体片段， dAbL 和 dAbH

图 2

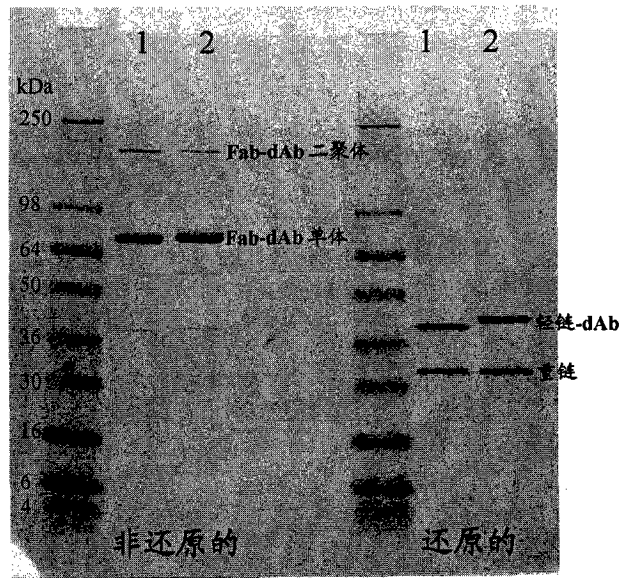


图 3

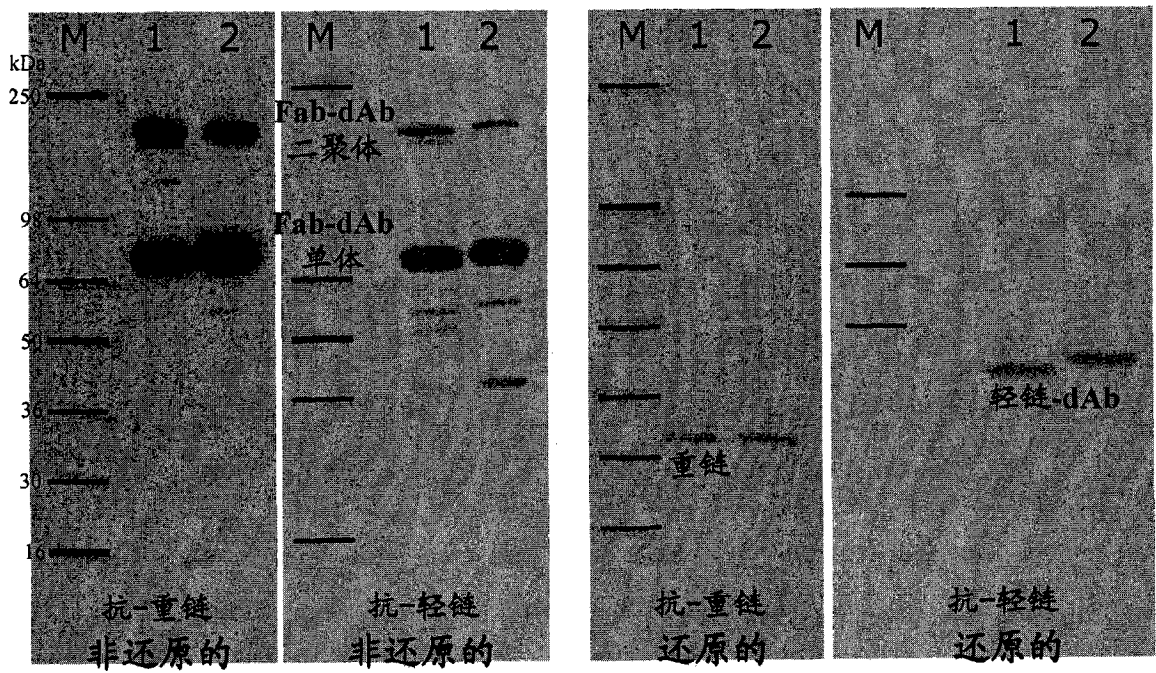


图 4

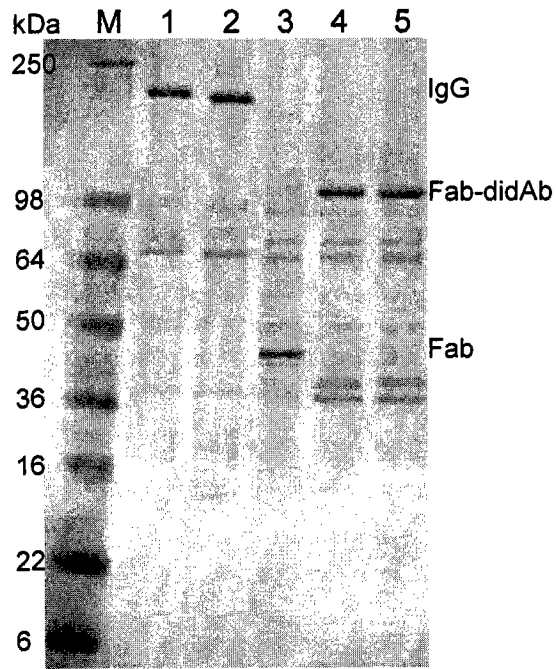


图 4a

a) dAbH1

EVQLLES^{GGGLVQP}GGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGLEWIGIIWA
SGTTFYATWAKGRFTISR^{DSTTVYLQMN}SLRAEDTAVYYCARTVPGYSTAPY
FDLWGQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:52)

b) dAbL1

DIVMTQSPSSVSASV^{GDRVTITCQSSPSV}WSNFLSWYQQKPGKAPKLLIYEAS
KLTSGVPSRFK^{SGSGTDFTLTISS}LQPEDFATYYCGGGYSSISDTTFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO:53)

c) dAbH2

EVQLVES^{GGGLVQP}GGSLRLSCAVSGFSL^{SR}YAMTWVRQAPGKGLEWIGTTT
TGGNTNYANWAKGRFTISK^{DSTTVYLQMN}SLRAEDTAVYYCARGGYVSYA
DATELSLWGQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:54)

d) dAbL2

DIVMTQSPSTLSASV^{GDRVTITCQASQ}SIGSRLAWYQQKPGKAPKLLIYYAST
VASGVPSRFK^{SGSGTEFTLTISS}LQPD^{DFATYYCQSYDYSSSSSY}AFGGGTKV
EIK (SEQ ID NO:55)

dAbH1

- e) CDRH1: GIDLSNYAIN (SEQ ID NO:56)
- f) CDRH2: IIWASGTTFYATWAKG (SEQ ID NO:57)
- g) CDRH3: TVPGYSTAPYFDL (SEQ ID NO:58)

dAbL1

- h) CDRL1: QSSPSVWSNFLS (SEQ ID NO:59)
- i) CDRL2: EASKLTS (SEQ ID NO:60)
- j) CDRL3: GGGYSSISDTT (SEQ ID NO:61)

dAbH2

- k) CDRH1: GFSLSR^{YAMT} (SEQ ID NO:62)
- l) CDRH2: TIT^{TGGNTNYANWAKG} (SEQ ID NO:63)
- m) CDRH3: GGYVSYADATELSL (SEQ ID NO:64)

dAbL2

- n) CDRL1: QASQSIGSRLA (SEQ ID NO:65)
- o) CDRL2: YASTVAS (SEQ ID NO:66)
- p) CDRL3: QSYDYSSSSSYA (SEQ ID NO:67)

图 5

FabB-dAbH1 (CH1-G₄Sx2)

FAB-B 重链可变结构域 +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNYAINWVRQAPGKGL
 EWIGIIWASGTTFYATWAKGRFTISRDTTVYLMNSLRAEDTAVYYCARTV
 PGYSTAPYFDLWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:68)

FabB-dAbH2 (CH1-G₄Sx2)

FAB-B 重链可变结构域 +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLRYAMTWVRQAPGKG
 LEWIGTITTTGGNTNYANWAKGRFTISKDSTTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR
 GGYVSYADATELSLWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO:69)

FabB-dAbL1 (CH1-G₄Sx2)

FAB-B 重链可变结构域 +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNFLSWYQQKPGKAP
 KLLIYEASKLTSQVPSRFKGSQSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT
 FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:70)

FabB-dAbL2 (CH1-G₄Sx2)

FAB-B 重链可变结构域 +

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG
GSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSRLAWYQQKPGKAPKL
 LIYYASTVASQVPSRFKGSQSGTEFTLTISSSLQPDDFATYYCQSYDYSSSSSYA
 FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:71)

FabB-dAbL1 (CK-G₄Sx2)

FABB-轻链可变结构域 +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDRTITCQSSPSVWSNFLSWYQQK

PGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFKGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYS
SISDTTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:72)

FabB-dAbL2 (CK-G₄Sx2)

FABB-轻链可变结构域 +

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
ECGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGSRLAWYQQK
PKAPKLLIYYASTVASGVPSRFKGS GSGTEFTLTISLQPD FAYYCQSYDYS
SSSSYAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:73)

图 6

Fab'A 重链

MKKTALAIIVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS
GVGVGWVVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKTHTCP CPA (SEQ
ID NO:74)

FabA 轻链

MKKTALAIIVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNY
LSWYQQKPGKAPKLLIYYTSLKLSHGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATY
YCQQGKMLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNAVQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)

Fab'A 重链 (经修饰的铰链接头)

MKKTALAIIVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS
GVGVGWVVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTCDKTHTS (SEQ ID
NO:76)

FabA 重链

MKKTALAIIVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAFSGFSLSTS
GVGVGWVVRQAPGKGLEWVAHIWWDGDESYNPSLKTQFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARNRYDPPWFVDWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKTC (SEQ ID NO:77)

图 7