



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109313183 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780038584.3

(22)申请日 2017.06.21

(30)优先权数据

62/353,784 2016.06.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/065219 2017.06.21

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/220645 EN 2017.12.28

(71)申请人 埃博灵克斯股份有限公司

地址 比利时茨维纳德

(72)发明人 维尔勒·斯诺尔克

莉泽洛特·拜廷克

索菲耶·珀尔曼斯 谢尔·莫蒂尔

玛丽-安格·比斯 利斯·德凯泽

尤迪特·鲍迈斯特

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表4页 附图8页

(54)发明名称

免疫球蛋白单可变结构域的改进的药代动力学测定

(57)摘要

本发明总体上涉及用于测量生物样品中免疫球蛋白单可变结构域(在本文中也称为“ISV”或“ISVD”)以及包含至少一个ISV(如本文进一步描述)的蛋白质和多肽的水平的改进的药代动力学测定。

1. 用于确定至少一个ISVD或包含至少一个ISVD的蛋白质或多肽在样品中的量和/或浓度的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 使所述样品与捕获剂接触,使得所述ISVD,蛋白质,或多肽被所述捕获剂捕获;
- b) 使所述捕获剂捕获的ISVD,蛋白质,或多肽与检测剂接触,使得所述检测剂结合所述捕获剂捕获的ISVD,蛋白质,或多肽;
- c) 产生对应于与所述捕获剂捕获的ISVD,蛋白质,或多肽结合的检测剂的量的信号,其中所述方法在猝灭剂存在下进行,所述猝灭剂是先前存在的抗体能够结合但所述捕获剂和所述检测剂都不能结合的蛋白质或多肽。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中用作所述猝灭剂的蛋白质或多肽是由单克隆抗体21-4以好于1微摩尔( $\mu\text{M}$ )例如1000-1nM的亲和力结合的蛋白质或多肽。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中用作所述猝灭剂的蛋白质或多肽是由预期的捕获剂和预期的检测剂以小于/差于3微摩尔、优选小于10微摩尔、更优选小于50微摩尔例如差于100微摩尔的亲和力结合的蛋白质或多肽。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述猝灭剂是单价免疫球蛋白单可变结构域或包含不超过五个例如四个、三个、两个或一个免疫球蛋白单可变结构域的融合蛋白或构建体。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中存在于所述猝灭剂中的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有暴露的C末端。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述具有暴露的C末端的免疫球蛋白单可变结构域中的至少一个在其C末端具有序列VTVSS (SEQ ID NO:1)。

7. 根据权利要求4或5所述的方法,其中至少所述猝灭剂在其C末端具有免疫球蛋白单可变结构域。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中在所述猝灭剂的C末端(和,通过扩展,整个猝灭剂)的免疫球蛋白单可变结构域在其C末端具有序列VTVSS (SEQ ID NO:1)。

## 免疫球蛋白单可变结构域的改进的药代动力学测定

[0001] 本发明总体上涉及用于测量生物样品中免疫球蛋白单可变结构域(本文也称为“ISV”或“ISVD”)和包含至少一个ISV(如本文进一步描述)的蛋白质和多肽的水平的改进的药代动力学测定法。

[0002] 特别地,本发明涉及用于进行这种测定的改进的方法。

[0003] 从下面的进一步描述中,本发明的其他方面,实施方案,用途和优点将变得清楚。

[0004] 在药物开发中,进行药物的药代动力学(PK)分析以确定施用动物或人后药物的命运(例如,分布,吸收和/或分泌)。通常,这种分析涉及通常在多个时间点确定从受试者获得的生物样品(例如血液,血清或血浆)中药物的存在,水平或浓度。

[0005] 为此目的,使用药代动力学测定,并且用于进行此类测定的方法和技术通常是技术人员已知的。通常,进行药代动力学测定的常用方法包括以下步骤:使样品与能结合待测化合物的捕获剂接触(即,在所述捕获剂可以捕获待测化合物的条件下),然后确定已经被捕获剂捕获的待测化合物的量(其用作样品中化合物的量的量度)。在实践中,通常使用“夹心”构造,其中捕获剂固定在表面(例如多孔板或芯片的表面)上并且捕获剂捕获的化合物的量通过添加可以生成可以检测和/或测量的信号的检测剂来确定。在定量PK测定中,该信号的强度是捕获剂捕获的待测化合物的量的量度,所述量度又是起始样品中待测化合物的量的量度。

[0006] 如上所述,用于进行这些测定的合适技术(例如ELISA,来自MesoScale Diagnostic LLC的MSD平台,来自Gyros AB的Gyrolab™平台和来自Merck Millipore的Singulex™平台)在本领域中是公知的。通常,捕获剂是抗体(多克隆但优选单克隆),其可以与待测化合物结合(并且通常已经针对待测化合物特异性地产生)(尽管本发明还设想使用其他捕获剂,例如ISVD或待测化合物的靶标;参见例如图2,4和5以及本文的进一步描述)。检测剂可以是可用于提供可检测/可测量信号的任何合适的试剂。例如,检测剂可以是针对待测化合物的(优选单克隆)抗体,其已经与可检测标记或标签缀合。在实践中经常使用的一些非限制性实例包括荧光标记,可以使用电化学发光技术(例如用作MSD平台的一部分的基于钌的SULFO-TAG™标记)检测的标记或标签,或辣根过氧化物酶或另一种可将底物转化为可检测/可测量产物的酶。众所周知,对于夹心免疫测定(例如夹心ELISA),也可以使用与待测化合物结合的检测抗体和能够催化底物转化为可检测产物的酶联二抗的组合作为检测剂。对于这些技术和类似技术的一般描述,参考标准手册,以及例如‘O Kennedy等., Biochemical Education 18(3),1990,和Gan和Patel,Journal of Investigative Dermatology(2013),133,e12.doi:10.1038/jid.2013.287(在线出版物)。

[0007] 图1至6示意性地显示了一些优选但非限制性的设置,用于进行本申请所设想的那种药代动力学测定。

[0008] 在图1和其他附图中,本发明是通过使用二价ISVD构建体(即,包括两个ISVD,其各自自由一个椭圆表示,并且在示出的构建体通过由实线表示的适合的接头彼此连接)作为待测化合物(在图1-6中的每一个中表示为(1))进行说明。应当注意,如本文进一步描述的,这种二价ISVD构建体的选择仅用于说明目的,并且本发明通常可以应用于任何用于确定生物

样品中包含至少一个ISVD(并且特别地,如本文所述,包含至少一个具有暴露的C末端的ISVD,即,使得所述C末端-并且通过扩展,蛋白质,多肽,化合物或构建体-在进行测定时存在被样品中先前存在的抗体结合的风险)的任何蛋白质,多肽或构建体。基于本文的公开内容,此类蛋白质,多肽,化合物或构建体的其他实例是本领域技术人员清楚的,并且如本文所提及地例如包括单价,二价,三价,单特异性,双特异性,三特异性和/或双互补位ISVD多肽或构建体(例如,在实施例1中,使用ALX-0171,抗RSV的三价纳米抗体构建体)。

[0009] 在图1的测定中,使用通过共价键或其他合适的接头或固定技术(3)与固体支持物(4)连接的单克隆抗体(2)来捕获待测化合物(1)。除去任何未结合的化合物(1)(即通过洗涤)后,通过添加检测剂来确定单克隆(2)捕获的化合物(1)的量,所述检测剂在图1所示的设置中是通过接头(7)或另一种合适的缀合技术(例如链霉抗生物素蛋白-生物素对)与可检测标记(6)缀合的单克隆抗体(5)。然后除去任何过量的检测剂(即再次通过洗涤),之后使用由可检测标记(6)提供的信号确定与捕获剂捕获的化合物(1)结合的检测剂的量。

[0010] 图2中所示的测定设置基本上与图1中所示的设置相同,除了代替针对化合物(1)的单克隆抗体,化合物(1)的靶(8)被固定在固体支持物(4)上(即使用接头(3))。

[0011] 在图3所示的测定设置中,待测化合物(1)再次被与固体支持物(4)连接的单克隆抗体(2)捕获,但在这种情况下,测定在待测纳米抗体构建体(1)的(可溶性)靶标(8)的存在下进行,并且检测剂(包含通过接头(7)连接的单克隆(5)和可检测标记(6))针对靶标(8)而不是化合物(1)。

[0012] 图4中所示的测定设置与图3中所示的设置基本相同,除了使用“抗ISVD ISVD”(9)(例如针对VHH的框架序列的纳米抗体)作为捕获剂代替单克隆抗体。

[0013] 图5中所示的测定设置与图2中所示的设置基本相同,除了代替单克隆抗体(5),使用生物素化(11)抗ISVD ISVD(10)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉抗生物素蛋白(12)的组合用作检测剂。

[0014] 图6中所示的测定设置与图2中所示的设置基本相同,除了使用检测抗体(13)和经标记的二抗(5)/(6)/(7)的组合作为检测剂。

[0015] 基于本文的公开内容和实施例,本领域技术人员将清楚除了附图中明确描述的那些之外的合适的测定设置,并且如上所述,可以使用基于本文公开内容通常技术人员将清楚的通常已知的技术和方法进行图1-6中所示的测定和类似的测定。

[0016] 在WO 12/175741中,描述了在用于分析包含ISVD的生物样品(例如血液样品(包括全血,血清和血浆),眼液,支气管肺泡液/BALF,脑脊髓液或其他生物液体样品)的一些测定(例如,在ADA免疫测定中)中可能发生蛋白质干扰,并且这些蛋白质干扰可能在这些测定中的一些和/或这些样品中的一些中产生非特异性信号。WO 12/175741还提到这样的蛋白质干扰不仅可以在从已经用ISVD治疗的受试者和/或已经施用ISVD的受试者(例如患者或临床试验受试者)获得的样品中发生,而且还可以在来自未接受过ISVD的受试者的样品中发生。如在WO 12/175741中进一步提到的,这表明这种干扰可能是由于与先前存在的蛋白质的非特异性蛋白质-蛋白质相互作用而不是与任何新出现的ADA相互作用。WO 12/175741进一步指出,这些干扰因子最可能是(先前存在的)可以结合可变结构域的C末端(如果它被暴露)的IgG(参见例如WO 13/024069,Holland等.,J.Clin.Immunol.2013,33(7):1192-203和WO 2015/173325)。

[0017] 由于药代动力学测定通常涉及使用血清样品(即来自施用ISVD或包含ISVD的药物的受试者),可能的是:当存在于这些样品中时,这种针对ISVD的暴露的C末端的“先前存在的抗体”可能干扰所述测定。鉴于此,本发明旨在提供改进的药代动力学测定和用于执行该测定的方法,其中减少了这种干扰(和/或发生这种干扰的风险)。

[0018] 通常,本发明通过在(足够量)“猝灭剂”(即样品中存在的任何先前存在的抗体能结合的蛋白质或多肽)存在下进行测定来解决可能的蛋白质干扰问题。结果,干扰因子不能(或不再能)干扰捕获剂,待测化合物和检测剂之间的缔合(即以可能影响或扭曲测定的方式干扰)。

[0019] 通常,如本文进一步描述的,本文使用的猝灭剂是ISVD或包含具有暴露的C末端的ISVD的蛋白质和多肽,其中ISVD,蛋白质或多肽进一步使得它们不能被捕获剂捕获标签不被待测化合物或检测剂结合。

[0020] 因此,在第一方面,本发明涉及用于确定样品中至少一个ISVD,或包含至少一个ISVD的蛋白质,多肽或其他化合物或构建体(所述蛋白质,多肽或其他化合物或构建体是如在本文中所述)的量和/或浓度的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] a) 使样品与捕获剂接触,使得ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体被所述捕获剂捕获;

[0022] b) 使捕获剂捕获的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体与检测剂接触,使得所述检测剂结合捕获剂捕获的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体;

[0023] c) 产生对应于与捕获剂已经捕获的ISVD,蛋白质,多肽化合物或构建体结合的检测剂的量的信号,

[0024] 其中所述方法在猝灭剂存在下进行,所述猝灭剂是先前存在的抗体能够结合(即特异性结合)但是捕获剂和检测剂(基本上)不能结合(即除了非特异性结合)的蛋白质或多肽。为此目的,猝灭剂优选如本文进一步描述。

[0025] 如本领域技术人员基于本文的公开内容将清楚的,通常,在上述方法中,样品将是已知含有和/或怀疑含有针对ISVD暴露的C末端的先前存在的抗体的生物流体样品。特别地,样品将是已知含有和/或怀疑含有针对ISVD(特别是针对纳米抗体或另一种从或已经从VH或VHH结构域衍生的ISVD)暴露的C末端的先前存在的抗体的生物流体样品。

[0026] 样品将进一步含有待测量的(至少一个)ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体。特别地,所述待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体可以是已经向已经从其获得样品(即作为临床试验的一部分,或用于治疗或诊断目的)的受试者施用的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体。在一个方面,已经获得样品以确定待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体的药理学性质,并且特别是其药代动力学性质(例如其PK或血清半衰期参数)。

[0027] 样品可以从受试者获得的任何所希望的和合适的生物流体样品,例如全血样品,血清,血浆,淋巴液,眼液,支气管肺泡液/BALF,脑脊液或其他生物液体(例如痰或鼻洗);特别是全血,血清或血浆样品。所述样品也可以/已经适当地制备用于本发明的测定(例如,如果合适通过合适的稀释或提取方法,和/或通过本领域本身已知的一种或多种合适的预处理步骤,例如合适的酸解离步骤)。实际上,通常,已知样品含有或预期含有一定量的待测量的ISVD,蛋白质,多肽化合物或构建体,例如因为-如本文所述-所述样品是从已经施用所述ISVD,蛋白质,多肽化合物或构建体的受试者获得的。

[0028] 有待使用本发明的测定法测量的ISVD,蛋白质,多肽化合物或构建体可以包含单个ISVD或基本上由其组成,或者可以是包含一个或个种(例如一个,两个,三个,四个或五个)ISVD或基本上由其组成的蛋白质,多肽,化合物或构建体。这些可以例如包括以下蛋白质,多肽,化合物或构建体,其包含至少一个(例如一个,两个或三个)ISVD,和任选地一个或多个其他部分或实体,它们例如通过直接化学键或使用一种或多种合适的接头彼此适当地连接。参考本文提及的进一步描述和现有技术。

[0029] 在一个方面,在此类蛋白质,多肽,化合物或构建体中,存在的ISVD中的至少一个将针对治疗相关的靶标。在一个具体方面,这种蛋白质,多肽,化合物或构建体在人体中具有至少一天,例如至少三天,例如至多5天或更多的半衰期(表示为 $t_{1/2-\beta}$ )。为此目的,蛋白质,多肽,化合物或构建体可含有为至少一个“治疗性”ISVD提供这种增加的半衰期的部分,结合结构域或结合单元。这可以是例如针对(人)血清蛋白例如针对(人)血清白蛋白的ISVD。参考本文的进一步公开内容。

[0030] 在另一方面,此类蛋白质,多肽,化合物或构建体将包含至少一个针对(人)血清蛋白(例如(人)血清白蛋白)的ISVD,其再次参考本文的进一步公开内容。通常,在这方面,蛋白质,多肽,化合物或构建体通常还含有至少一个治疗活性部分,结合结构域或结合单元,例如针对一个或多个治疗相关的靶标的一个或多个结合结构域或结合单元(同样包括ISVD,例如纳米抗体)。在这种蛋白质,多肽,化合物或构建体中,结合血清白蛋白的ISVD通常用于增加一个或多个治疗部分或实体的半衰期。同样,这种蛋白质,多肽,化合物或构建体在人体中具有至少一天,例如至少三天,例如至多5天或更多的半衰期(表示为 $t_{1/2-\beta}$ )。

[0031] 本文提及的蛋白质和多肽优选是融合蛋白。在一个方面,蛋白质和多肽包含任选地通过一个或多个合适的接头连接的ISVD或基本上由其组成。

[0032] 通常,在本发明中,待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体将包含至少一个ISVD(例如针对治疗靶标的ISVD和/或延长半衰期的ISVD,例如针对血清蛋白的ISVD),其易于被先前存在的抗体结合,特别是被针对所述ISVD的暴露的C末端的先前存在的抗体结合和/或处于这样的风险之下。通常,所述ISVD将位于待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体的C末端。

[0033] 在一个特定方面,待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体将使得其包含至少一个重链ISVD(即,作为纳米抗体的ISVD或者另一种来自或已经来自如本文进一步描述的VHH或VH结构域的ISVD),其易于被先前存在的抗体结合,特别是被针对所述ISVD的暴露的C末端的先前存在的抗体结合和/或处于这样的风险之下。通常,所述重链ISVD将位于待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体的C末端。

[0034] 存在于待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体中的一个或多个ISVD也可以是针对降低的先前存在的抗体结合例如通过C末端延伸(例如,如在WO 12/175741所述)和/或通过降低先前存在的抗体的结合的框架突变(参见WO 2015/173325)而序列优化的。

[0035] 对于可以使用本发明的方法和测定法测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体,进一步参考本文公开的内容和引用的现有技术。

[0036] 使用的猝灭剂可以是具有暴露的C末端的任何ISVD,或包含至少一个具有暴露的C末端的ISVD(并且特别地,在其C末端具有ISVD)的任何蛋白质,多肽,化合物或构建体。例如,在一个具体但非限制性的方面,猝灭剂包含两个(或甚至可以包含三个)使用本身已知

的合适的接头彼此连接的ISVD。

[0037] 选择猝灭剂使得样品中任何先前存在的抗体可以(特异性地)与其结合,特别是以如本文所述的亲和力结合。

[0038] 为了确保先前存在的抗体与猝灭剂结合(即不与待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体结合),可以选择猝灭剂使得猝灭剂与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力比待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力更高/更好(如本文所述)(例如但不限于,当待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体含有降低先前存在的抗体的结合的C-末端延伸和/或框架突变时,这可以通过选择不含这种C末端延伸和这种突变的猝灭剂而容易地实现)。

[0039] 因此,在一个非限制性方面,选择本发明方法中使用的猝灭剂,使得猝灭剂与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力比待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力至少10倍(例如至少100倍)更高/更好(如本文所述)(通常,在本申请的上下文中,通过示例说明,10nM的亲和力被认为比100nM的亲和力10x“更好”或“更高”)。

[0040] 如本文进一步描述的,为了比较前面段落中描述的亲和力,猝灭剂和抗体21-4(其可以用作先前存在的抗体的模型/替代物)之间的结合相互作用的亲和力可以与待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体与抗体21-4之间的结合相互作用的亲和力进行比较。因此,在一个具体但非限制性的方面,在本发明的方法中,可以选择猝灭剂,使得猝灭剂和抗体21-4之间的结合相互作用的亲和力比待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体与抗体21-4之间的结合相互作用的亲和力更好/更高(如本文所定义,并且特别是至少10倍更好,例如至少100倍更好)。

[0041] 确保先前存在的抗体与猝灭剂(即,而不是待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体)结合的另一种方式是使用与预期(最大)存在于样品中的待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体的量相比而言合适的过量(例如至少10倍过量,例如在,至少100倍过量)。通常,当(预期)猝灭剂与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力与待测量的蛋白质,多肽,化合物或构建体和先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力大致相同或甚至更差/更低(通常,在本申请的上下文中,通过说明,100nM的亲和力被认为比10nM的亲和力10x“更差”或“更低”)时,应当使用这样的合适的过量。此外,当(预期)猝灭剂与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力好于待测量的蛋白质,多肽,化合物和构建体与先前存在的抗体之间的结合相互作用的亲和力时,也可以使用合适过量的猝灭剂。

[0042] 优选地,猝灭剂(特别是先前存在的抗体要与之结合的猝灭剂中的ISVD)没有针对减少先前存在的抗体的结合进行序列优化。例如,它可以以没有任何C末端延伸的序列VTVSS结束,并且优选地也不包含旨在减少先前存在的抗体的结合的突变。除此之外,可以使用ISVD或包含具有暴露的C-末端的ISVD的蛋白质,多肽,化合物或构建体,只要它不干扰测定(例如,因为它能结合测定中使用的任何其他组分和/或被其结合)。

[0043] 在实践中,关于(可能的)先前存在的抗体与猝灭剂的结合以及关于选择先前存在的抗体可以结合的合适猝灭剂,注意到在样品中先前存在的抗体可以形成异质多克隆群体,并且先前存在的抗体(及其对ISVD的亲和力)有时也可能因样品之间和/或受试者之间的不同而不同。

[0044] 为了解释这一点,在本发明中,小鼠单克隆抗体克隆“21-4-3”(在本文中也称为“21-4”或“ABH0015”)的结合(即亲和力)可用作模型/工具用于确定候选猝灭剂是否将被先前存在的抗体结合。从WO 12/175741(参见第19页,第3-28行)已知21-4-3(和产生它的杂交瘤,也称为“ABH0015”),其中它被描述并用作确定含有具有暴露的C末端的ISVD的蛋白质或多肽是否将具有经历蛋白质干扰的倾向(即,被存在于已经从受试者获得的生物样品中的先前存在的抗体结合)的替代物/模型。WO 12/175741也给出了ABH0015的VH和VL序列(参见WO 12/175741,SEQ ID NO:35和36)。如WO 12/175741的实施例7中所述,使用杂交瘤技术从用WO 2006/122825中的SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体免疫的小鼠起始产生21-4,并且表达21-4的杂交瘤细胞系(称为“ABH0015”)已于2012年6月4日在比利时根特(Ghent, Belgium)的BCCM保藏,保藏号为LMBP-9680-CB。如WO 12/175741的实施例8中所示,单克隆21-4识别WO 2006/122825中SEQ ID NO:98的纳米抗体构建体的C末端,其C末端由针对Von Willebrand因子(vWF)产生的纳米抗体(人源化VHH)组成,可用于预测ISV是否有经历特异性蛋白质干扰的倾向。在实施例9中,WO 12/175741也给出了方案,其中ABH0015用于预测/确定蛋白质或多肽(特别是包含具有暴露的C末端的ISVD的蛋白质或多肽)是否具有或不具有经历蛋白质干扰的倾向(即,被存在于从受试者获得的生物样品中的先前存在的抗体集合)。

[0045] 在本发明中,与21-4结合/被21-4结合可用作替代物以测量/确定蛋白质或多肽是否适合用作猝灭剂(也参见本文实施例5)。

[0046] 通常,在本发明中,蛋白质或多肽在以下情况下适合用作猝灭剂:当根据实施例5中描述的方案使用BIAcore确定时,它以好于1微摩尔( $\mu\text{M}$ ),例如1000-1nM的亲和力(表示为KD)被21-4结合(为了清楚起见,并且通过非限制性实施例,注意到通常地在本发明的本说明书中,1nM的亲和力被认为是比1微摩尔/1000nM的亲和力“更高/更好”)。

[0047] 如上所述,当在本发明的方法中时,意图使用对于先前存在的抗体具有比对待测量的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体的亲和力更高/更好亲和力的猝灭剂,然后优选地,所用的猝灭剂将结合21-4,其亲和力比其与待测量的结合21-4的ISVD,蛋白质,多肽,化合物或构建体的亲和力10x(10倍)更高/更好,优选100x(100倍)更高/更好(同样,在本文中,通过说明,10nM的亲和力被认为是100nM的亲和力10倍“更高”)。

[0048] 因此,在一个方面,本发明涉及如上所述的方法,其中用作猝灭剂的蛋白质或多肽是例如当使用BIAcore根据实施例5中描述的方案确定时以优于1微摩尔( $\mu\text{M}$ )例如1000至1nM之间的亲和力被21-4结合的蛋白质或多肽。

[0049] 猝灭剂还应基本上不被(或不与(除了非特异性结合))捕获剂或检测剂结合。实际上,这意味着猝灭剂对捕获剂和检测剂的亲和力(反之亦然,捕获剂对猝灭剂的亲和力和检测剂对猝灭剂的亲和力)应该小于/差于3微摩尔,优选小于10微摩尔,更优选小于50微摩尔,例如差于100微摩尔(为了清楚起见,并且通过非限制性实例,注意到通常地在本发明的说明书中,10微摩尔的亲和力被认为比1微摩尔的亲和力“更差/更低”。一旦选择了(候选)捕获剂和(候选)检测剂,确定(候选)猝灭剂对其的亲和力应该在技术人员的技能范围内,因此选择适合于与预期的捕获剂和检测剂一起使用的猝灭剂。

[0050] 因此,在另一方面,本发明涉及如上所述的方法,其中用作猝灭剂的蛋白质或多肽是以下蛋白质或多肽:(i)当使用BIAcore根据实施例5中描述的方案测定时,以好于1微摩

尔( $\mu\text{M}$ ),例如1000-1nM的亲合力与21-4结合;以及(ii)以小于/差于3微摩尔,优选小于10微摩尔,更优选小于50微摩尔,例如差于100微摩尔的亲合力与预期的捕获剂和预期的检测剂结合。

[0051] 在本发明中,所用的猝灭剂可以是单价ISVD(例如单价纳米抗体)或包含两个或更多个(例如两个或三个)ISVD(其中至少一个具有暴露的C-末端)的融合蛋白或构建体。在实践中,猝灭剂通常是多肽,在C末端具有ISVD(然后ISVD通过形成多肽,蛋白质或构建体的C末端而具有暴露的C末端)的(融合)蛋白质或构建体。

[0052] 由于猝灭剂应该能够被先前存在的抗体结合,形成猝灭剂的C末端的VHH优选不具有任何C末端延伸(如WO 12/175741中所述),也不具有旨在降低先前存在的抗体的结合的任何突变(如WO 2015/173325中描述的那些)。

[0053] 因此,并且优选地,猝灭剂是在其C末端具有ISVD的蛋白质或多肽(并且优选为纳米抗体),并且猝灭剂(形成猝灭剂的C-末端的ISVD)优选在其C末端具有氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:1)。猝灭剂可以例如合适地是单价,二价,双特异性,三价或三特异性构建体ISVD构建体。优选地,猝灭剂是单价纳米抗体,二价纳米抗体构建体(可以是单特异性的或双特异性的)或三价纳米抗体构建体(可以是单特异性的,双特异性的或三特异性的)。

[0054] 如图2-6所示,在用于本发明测定的一些可能的设置中,可以使用待测化合物的靶标(如图2至6中的(8)所示),作为捕获剂的一部分或作为检测剂(或两者)的一部分。因此,尽管猝灭剂中存在的ISVD可以针对任何靶标,但如果所述靶标用作测定的一部分,则不应针对待测化合物的靶标。

[0055] 因此,在另一方面,本发明涉及如上所述的方法,其中用作猝灭剂的蛋白质或多肽是含有至少一个具有暴露的C末端的ISVD的蛋白质或多肽,其中所述ISVD以C末端氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:1)结束。同样,所述猝灭剂优选地:(i)当使用BIAcore根据实施例5中描述的方案测定时,以好于1微摩尔( $\mu\text{M}$ ),例如1000-1nM的亲合力与21-4结合;以及(ii)以小于/差于3微摩尔,优选小于10微摩尔,更优选小于50微摩尔,例如差于100微摩尔的亲合力与预期的捕获剂和预期的检测剂结合。

[0056] 另一方面,本发明涉及如上所述的方法,其中用作猝灭剂的蛋白质或多肽是在其C末端具有ISVD的蛋白质或多肽,其中所述C末端ISVD(并且因此,用作猝灭剂的蛋白质或多肽)以C末端氨基酸序列VTVSS(SEQ ID NO:1)结束。同样,所述猝灭剂优选地:(i)当使用BIAcore根据实施例5中描述的方案测定时,以好于1微摩尔( $\mu\text{M}$ ),例如1000-1nM的亲合力与21-4结合;以及(ii)以小于/差于3微摩尔,优选小于10微摩尔,更优选小于50微摩尔,例如差于100微摩尔的亲合力与预期的捕获剂和预期的检测剂结合。

[0057] 在本发明的方法中使用猝灭剂的一种便利方式是在捕获步骤之前用包含(过量)猝灭剂的合适稀释缓冲液稀释待测试的样品(如上所述,其可能已经经历了本身已知的一个或多个合适的预处理步骤,例如酸解离步骤)。以这种方式,在捕获和检测步骤之前,样品中先前存在的抗体将被猝灭剂结合,从而确保它们不会干扰测定的测量和/或读出。

[0058] 本发明的其它方面、实施方案、优点和应用将从本文的进一步描述中变得清楚。

[0059] 在本说明书中:

[0060] -术语“免疫球蛋白单可变结构域”(也称为“ISV”或ISVD“)通常用于指可以形成功能性抗原结合位点而不与另一可变结构域相互作用(例如没有常规4-链单克隆抗体的VH和

VL结构域之间所需的VH/VL相互作用)的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域,包括VH、VHH或VL结构域)。技术人员将清楚ISVD的实例并且例如包括纳米抗体(包括VHH,人源化VHH和/或骆驼化VH如骆驼化人VH)、IgNAR、结构域、(单结构域)抗体(例如dAb's<sup>TM</sup>) (其是VH结构域或衍生自VH结构域)和(单结构域)抗体(例如dAb's<sup>TM</sup>)的(其是VL结构域或衍生自VL结构域)。除非在本文中另外明确提及,否则通常优选基于和/或衍生自重链可变结构域(例如VH或VHH结构域)的ISVD。最优选地,除非在本文中另外明确指出,ISVD将是纳米抗体。

[0061] -术语“纳米抗体(Nanobody)”通常如WO 2008/020079或WO 2009/138519中所定义的,并且因此在特定方面通常表示VHH、人源化VHH或骆驼化VH(例如骆驼化人VH)或通常序列优化的VHH(例如针对化学稳定性和/或溶解度进行优化,与已知的人框架区最大重叠和最大表达)。注意到术语纳米抗体或纳米抗体是埃博灵克斯股份有限公司(Ablynx N.V.)的注册商标,因此也可以被称为Nanobody®和/或Nanobodies®。

[0062] -通常,除非本文另外指出,否则本文提及的ISVD、纳米抗体、多肽、蛋白质和其他化合物和构建体将预期用于预防或治疗人(和/或任选地也用于温血动物和特别是哺乳动物)的疾病或病症。因此,通常,本文描述的ISVD、纳米抗体、多肽、蛋白质和其他化合物和构建体优选是这样的,使得它们可以用作(生物)药物或其他药学或治疗活性化合物和/或药物产品或组合物或可以适当地作为其一部分。这样的药物、化合物或产品优选适合施用于人,例如用于预防或治疗需要这种预防或治疗的受试者或例如作为临床试验的一部分。如本文进一步描述的,为此目的,除了本发明提供的ISVD之外,这样的药物或化合物可以含有其它部分、实体或结合单位(其也如本文中所述可以例如是一个或多个其它治疗性部分和/或一个或多个影响基于ISVD或纳米抗体的生物的药代动力学或药效学性质(例如其半衰期)的其他部分)。这种进一步的治疗或其他部分的合适实例对技术人员来说是清楚的,例如通常可以包括任何治疗活性蛋白、多肽或其他结合结构域或结合单位,以及例如修饰例如WO 2009/138159的第149至152页描述的那些。基于ISVD的生物剂或基于纳米抗体的生物剂优选是治疗剂或预期用作治疗剂(其包括预防和诊断),并且为此优选含有至少一种针对治疗相关靶的ISVD(例如RANK-L、vWF、IgE、RSV、CXCR4、IL-23或其他白细胞介素或其受体等)。对于这种基于ISVD或纳米抗体的生物制剂的一些具体但非限制性的例子,参考实施例8至18,并且还例如由埃博灵克斯股份有限公司(Ablynx N.V.)进行各种应用(例如但不限于WO 2004/062551,WO 2006/122825,WO 2008/020079和WO 2009/068627),以及例如(但不限于)例如WO 2006/038027,WO 2006/059108,WO 2007/063308,WO 2007/063311,WO 2007/066016和WO 2007/085814。而且,如本文进一步描述的,所述另外的部分可以是本文所述的针对(人)血清蛋白如(人)血清白蛋白的ISVD或纳米抗体,并且此类ISVD或纳米抗体也可以找到治疗用途,特别是在延长本文所述TNF结合剂的半衰期中使用和/或用于延长一种或多种治疗性ISVD的半衰期。例如参考WO 2004/041865,WO 2006/122787和WO2012/175400,其通常描述了血清-白蛋白结合性纳米抗体用于延长半衰期的用途。而且,在本说明书中,除非本文另有明确提及,否则本文提及的所有术语具有在WO 2009/138519(或在WO 2009/138519中引用的现有技术)或WO 2008/020079(或在WO 2008/020079中引用的现有技术中)给出的含义。此外,在本文没有具体描述方法或技术的情况下,其可以如WO 2009/138519(或在WO 2009/138519中引用的现有技术中)或WO 2008/020079(或在WO 2008/020079中引

用的现有技术中)进行。而且,如本文所述,包含本发明的任何ISVD或化合物的任何药物产品或组合物还可包含本身已知用于药物产品或组合物中的一种或多种其他组分(即取决于预期的药物形式)和/或例如用于治疗用途的一种或多种其他化合物或活性成分(即提供组合产品)。

[0063] 而且,当在本说明书或权利要求书中使用时,以下术语具有与在WO 2009/138519的第62-75页中描述的方式相同的含义和/或在适用的情况下可以其中描述的方式确定:“激动剂”,“拮抗剂”,“反向激动剂”,“非极性不带电荷的氨基酸残基”,“极性不带电的氨基酸残基”,“极性带电的氨基酸残基”,“序列同一性”,“完全相同”和“氨基酸差异(表示两个氨基酸序列的序列比较时)”,“(以)基本上分离(的形式)”,“结构域”,“结合结构域”,“抗原决定簇”,“表位”,“针对”或“直接针对”(抗原),“特异性”和“半衰期”。另外,术语“进行调节”和“调节”,“相互作用位点”,“特异性”,“交叉阻断”,“交叉阻断的”和“进行交叉阻断”和“基本上不依赖于pH”是如在埃博灵克斯股份有限公司(Ablynx N.V.)的WO 2010/130832的第74-79页上定义的(和/或可以如其描述确定的)。此外,当提及本发明的构建体、化合物、蛋白质或多肽时,诸如“单价”、“二价”(或“多价”),“双特异性”(或“多特异性”)和“双互补位”(或“多互补位”)可以具有在WO 2009/138519,WO 2010/130832或WO 2008/020079中给出的含义。

[0064] 这里涉及的ISVD、纳米抗体、基于ISVD的生物制剂、基于纳米抗体的生物制剂或任何其他氨基酸序列、化合物或多肽的术语“半衰期”通常可以如在WO2008/020079的第57页段落o)中所述定义,并且如其中提到的是指氨基酸序列、化合物或多肽的血清浓度在体内例如由于序列或化合物的降解和/或通过天然机制清除或螯合序列或化合物而降低50%所花费的时间。本发明的氨基酸序列、化合物或多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且可以例如通常如WO 2008/020079的第57页的段落o)中所述。也如WO 2008/020079的第57页第o)段所述,可以使用诸如 $t_{1/2-\alpha}$ , $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)的参数来表示半衰期。在这方面,应该注意的是,本文所用的术语“半衰期”特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 或终末半衰期(其中 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或二者可以不要考虑)。例如参考下面的实验部分以及标准手册,例如Kenneth,A等:Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists和Peters等,Pharmacokinetic analysis:A Practical Approach(1996)。也参考“Pharmacokinetics”,M Gibaldi&D Perron,published by Marcel Dekker,2nd Rev.edition(1982)。类似地,术语“增加半衰期”或“增加的半衰期”也如WO 2008/020079第57页第o)段中所定义,特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 的增加,或者伴或不伴 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或两者的增加。

[0065] 当术语在本文中没有具体定义时,其具有其在本领域中通常的含义,这对于本领域技术人员来说是显而易见的。例如参考标准手册,例如Sambrook等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”(2nd.Ed.),Vols.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989);F.Ausubel等.,eds.,“Current protocols in molecular biology”,Green Publishing and Wiley Interscience,New York(1987);Lewin,“Genes II”,John Wiley& Sons,New York,N.Y.,(1985);Old等.,“Principles of Gene Manipulation:An Introduction to Genetic Engineering”,2nd edition,University of California Press,Berkeley,CA(1981);Roitt等.,“Immunology”(6th.Ed.),Mosby/Elsevier,

Edinburgh(2001);Roitt等.,Roitt's Essential Immunology,10th Ed.Blackwell Publishing,UK(2001);和Janeway等.,“Immunobiology”(6th Ed.),Garland Science Publishing/Churchill Livingstone,New York(2005),以及本文引用的一般背景技术。

[0066] 而且,如本文中已经指出的,纳米抗体的氨基酸残基根据由Kabat等人(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,Publication No.91)给出的VH的通用编号进行编号,如在文章Riechmann和Muyldermans,J.Immunol.Methods 2000Jun 23;240(1-2):185-195中应用于来自Camelids的VHH结构域;或在此引用。根据该编号,纳米抗体的FR1包含第1-30位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR1包含第31-35位的氨基酸残基,纳米抗体的FR2包含第36-49位的氨基酸,纳米抗体的CDR2包含第50-65位的氨基酸残基,纳米抗体的FR3包含第66-94位的氨基酸残基,纳米抗体的CDR3包含第95-102位的氨基酸残基,并且纳米抗体的FR4包含第103-113位的氨基酸残基。[在这方面,应该注意的是-如本领域熟知的VH结构域和VHH结构域-每个CDR中氨基酸残基的总数可以变化并且可以不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置可以不被实际序列占据,或者实际序列可以含有比Kabat编号所允许的数量更多的氨基酸残基)。这意味着通常地,根据Kabat的编号与实际序列中氨基酸残基的实际编号可以相对应或可以不对应。然而,通常地,根据Kabat的编号并且不考虑CDR中氨基酸残基的数量,根据Kabat编号的第1位对应于FR1的起始,反之亦然,根据Kabat编号的第36位对应于FR2的起始,反之亦然,根据Kabat编号的第66位对应于FR3的起始,反之亦然,根据Kabat编号的第103位对应于FR4的起始,反之亦然]。

[0067] 用于编码VH结构域的氨基酸残基的备选方法,该方法也可以类似方式应用于来自骆驼科动物和纳米抗体的VHH结构域,是Chothia等人描述的方法。(Nature 342,877-883(1989)),所谓的“AbM定义”和所谓的“接触定义”。然而,在本说明书、方面和附图中,除非另有说明,否则将遵循由Riechmann和Muyldermans适用于VHH结构域的根据Kabat的编号。

[0068] 还应该注意的,附图、任何列表和实验部分/实施例仅用于进一步说明本发明,并且不应被解释或阐释为以任何方式限制本发明和/或所附权利要求的范围,除非另有明确说明。

[0069] 现在将通过以下非限制性优选方面,实施例和附图进一步描述本发明,其中图1至6示意性地说明了用于进行可用于本发明的类型的药代动力学测定的不同设置(在每种情况下,未示出本发明中使用的猝灭剂)。

[0070] 除非另有说明,否则在以下实验部分中进行的所有步骤均根据制造商的说明书或使用本领域技术人员通常已知的标准条件进行。

[0071] 实施例1:使用Mesoscale Discovery™(MSD)平台在PK测定中使用猝灭剂。

[0072] 该实施例说明了猝灭剂在用于测定人血清样品中基于纳米抗体的(融合)蛋白的总浓度的药代动力学测定中的用途。在该实施例中,Mesoscale Discovery平台用于测定掺入不同浓度的ALX-0171的人血清样品中ALX-0171(抗人呼吸道合胞病毒的三价纳米抗体构建体;参见WO 2010/139808)的浓度。测定设置基本上如图1中示意性表示的(尽管ALX-0171是三价纳米抗体构建体,而不是图1中为了说明目的而显示的二价纳米抗体构建体)。

[0073] 使用的猝灭剂是三价纳米抗体构建体(具有N末端HIS标签和C末端,其是SEQ ID NO:1的序列(即没有任何C末端延伸)),其序列在图7中给出为SEQ ID NO:2。

[0074] 将结合并中和ALX-0171纳米抗体的生物素化小鼠单克隆用作捕获剂(在PBS/0.1%酪蛋白中5.0微克/ml)并固定在链霉抗生物素蛋白-金多阵列96孔板上。将待测试的人血清样品稀释50倍(在PBS/0.1%酪蛋白中首先稀释5倍,然后在1000mM乙酸中稀释5倍)。在室温下孵育60分钟后,在含有4,0微克猝灭剂/ml的1M Tris缓冲液(pH 9.5)中稀释2倍。在室温孵育过夜后,在标准条件下将样品(以50微升的等分试样)施加到涂有捕获剂的96孔板上,使得捕获剂捕获ALX-0171。

[0075] 在孵育1小时并洗涤后,推荐价检测剂(SULFO标记的结合和中和ALX-0171纳米抗体的小鼠单克隆)并使其与固定的捕获剂捕获的ALX-0171结合。洗涤后,使用Sector Imager 2400在添加MSD Read缓冲液后10分钟内测量板的每个孔中的电致发光信号的量。

[0076] 结果发现,当ALX-0171以987pg/mL和658537pg/mL之间的已知浓度掺入人血清样品中时,在使用的人血清样品中存在任何先前存在的抗体和作为测定的一部分存在或使用的猝灭剂都不会以任何显著方式影响ALX-0171的浓度的测定。这些浓度在一般浓度范围内,尤其应该代表预期在从涉及基于纳米抗体的治疗剂的临床试验中的人受试者获得的血清样品中遇到的基于纳米抗体的治疗剂(例如用于确定基于纳米抗体的治疗剂的PK的目的)的(任选地在适当稀释后)浓度。

[0077] 实施例2:在基于ELISA的PK测定中猝灭剂的用途。

[0078] 该实施例说明了猝灭剂在用于测定人血清样品中基于纳米抗体的(融合)蛋白的总活性浓度的基于ELISA的药代动力学测定中的用途。

[0079] 在该实施例中,纳米抗体是针对IL-6受体和人血清白蛋白的双特异性构建体(参见WO 2008/020079和WO 2009/095489)。众所周知,已知IL-6受体既以膜结合形式也以可溶形式存在。该实施例中描述的测定能够测定包括“游离”纳米抗体(即不与所用血浆样品中存在的可溶性IL-6受体结合)和与存在于样品中的可溶性IL-6受体结合的纳米抗体的总活性浓度。

[0080] 测定设置基本上如图4中示意性所示。

[0081] 使用的猝灭剂是单价纳米抗体(具有N末端HIS标签和C末端,其是SEQ ID NO:1的序列(没有任何C末端延伸)),其序列在图7中给出为SEQ ID NO:3。

[0082] 将识别纳米抗体的框架的二价纳米抗体用作捕获剂(在BICA缓冲液中3.0微克/ml)并涂布在C96 Maxisorp板上。将待测试的人血清样品稀释200倍(在PBS/0.1%酪蛋白中首先稀释20倍,然后在1600mM乙酸中稀释5倍)。在室温下孵育90分钟后,在含有0.5微克/ml人sIL-6受体和4,0微克猝灭剂/ml的1M Tris缓冲液pH 9.5中稀释2倍。在室温孵育60min后,在标准条件下将样品(以100微升的等分试样)施加到涂有捕获剂的96孔板上,使得捕获剂捕获抗IL-6R纳米抗体。

[0083] 在孵育1小时并洗涤后,添加可溶性IL-6受体溶液(0.25微克/ml)并在室温下孵育30分钟。洗涤平板后,添加检测剂(0.25 $\mu$ g/ml的小鼠单克隆,其识别IL-6R上与纳米抗体不同的表位,允许同时结合抗体和纳米抗体)并使其与由纳米抗体捕获的IL-6R结合,所述纳米抗体本身被固定的捕获剂结合。洗涤后,添加0.65 $\mu$ g/ml HRP标记的兔抗小鼠Ig,并在室温下孵育30分钟。洗涤后,添加TMB底物,并使用620nm作为参考,在450nm处测量每个孔中的OD信号。

[0084] 结果发现,当抗IL-6R纳米抗体以20.0ng/mL和1483.1ng/mL之间的已知浓度掺入

人血清样品中时,在使用的人血清样品中存在任何先前存在的抗体和作为测定的一部分存在或使用的淬灭剂都不会以任何显著方式影响抗IL-6R纳米抗体的浓度的测定。这些浓度在一般浓度范围内,尤其应该代表预期在从涉及基于纳米抗体的治疗剂的临床试验中的人受试者获得的血清样品中遇到的基于纳米抗体的治疗剂(例如用于确定基于纳米抗体的治疗剂的PK的目的)的(任选地在适当稀释后)浓度。

[0085] 实施例3:使用Mesoscale Discovery™ (MSD) 平台在PK测定中使用淬灭剂。

[0086] 该实施例说明了淬灭剂在用于测定人血清样品中基于纳米抗体的(融合)蛋白的总活性浓度的药代动力学测定中的用途。在该实施例中,Mesoscale Discovery平台用于测定掺入不同浓度的ALX-0761的人血清样品中ALX-0761(针对白细胞介素17A和F的三价纳米抗体构建体)的浓度。

[0087] 测定设置基本上如图3中示意性所示。使用的淬灭剂是单价纳米抗体(其具有序列为SEQ ID NO:1而没有任何C末端延伸的C末端),其序列在图7中给出为SEQ ID NO:4。

[0088] 将识别纳米抗体框架的生物素化小鼠单克隆用作捕获剂(在PBS/0.1%酪蛋白中为1.0微克/ml)并固定在链霉抗生物素蛋白-金多阵列96孔板上。将待测试的人血清样品稀释100倍(先50倍,然后2倍,均在PBS/0.1%酪蛋白(含有20.0微克淬灭剂/mL和50.0微克抗IL-17mAb/mL)中,添加其以防止任何游离IL-17干扰测定)。在室温孵育过夜后,在标准条件下将样品(以50微升的等分试样)施加到涂有捕获剂的96孔板上,使得捕获剂捕获ALX-0761。

[0089] 在孵育1小时并洗涤后,添加可溶性IL-17A溶液(2.0微克/mL)并在室温下孵育1小时。在洗涤平板后,添加检测剂(0.25μg/ml结合靶标IL-17A的SULFO标记的小鼠单克隆抗体)并使其结合纳米抗体捕获的IL-17A,所述纳米抗体本身被固定的捕获剂结合。洗涤后,使用Sector Imager 2400在添加MSD Read缓冲液后10分钟内测量板的每个孔中的电致发光信号的量。

[0090] 结果发现,当ALX-0761以99.7ng/mL和3280.9ng/mL之间的已知浓度掺入人血清样品中时,在使用的人血清样品中存在任何先前存在的抗体和作为测定的一部分存在或使用的淬灭剂都不会以任何显著方式影响ALX-0761的浓度的测定。这些浓度在一般浓度范围内,尤其应该代表预期在从涉及基于纳米抗体的治疗剂的临床试验中的人受试者获得的血清样品中遇到的基于纳米抗体的治疗剂(例如用于确定基于纳米抗体的治疗剂的PK的目的)的(任选地在适当稀释后)浓度。

[0091] 实施例4:在基于ELISA的PK测定中淬灭剂的用途。

[0092] 该实施例说明了淬灭剂在用于测定小鼠血浆样品中基于纳米抗体的(融合)蛋白的浓度的基于ELISA的药代动力学测定中的用途。

[0093] 在该实施例中,纳米抗体针对Her3。该实施例中描述的测定能够测定样品中存在的ALX-0751浓度。

[0094] 测定设置基本上如图5中示意性所示。

[0095] 使用的淬灭剂是双特异性纳米抗体构建体(其具有序列为SEQ ID NO:1而没有任何C末端延伸的C末端),其序列在图7中给出为SEQ ID NO:5。

[0096] 在该ELISA中,将HER3-ECD(在10:10 Trizma NaCl缓冲液中1.5微克/mL)涂布在C96 Maxisorp板上。将待测小鼠血浆样品在含有200微克淬灭剂/mL的PBS/0.1%酪蛋白中

稀释20倍。在37℃孵育2小时后,在标准条件下将样品(以50微升的等分试样)施加到涂有捕获剂(靶标)的96孔板上,使得捕获剂捕获ALX-0751。

[0097] 在孵育1小时并洗涤后,添加检测剂(识别ALX-0751纳米抗体框架的1微克/mL生物素化纳米抗体)并在室温下孵育1小时。洗涤后,添加HRP标记的链霉抗生物素蛋白并在室温下孵育30分钟。洗涤后,添加TMB底物,并使用620nm作为参考,在450nm处测量每个孔中的OD信号。

[0098] 结果发现,当ALX-0751纳米抗体以24.9ng/mL和266.7ng/mL之间的已知浓度掺入小鼠血浆样品中时,在使用的小鼠血浆样品中存在任何先前存在的抗体和作为测定的一部分存在或使用的淬灭剂都不会以任何显著方式影响ALX-0751纳米抗体的浓度的测定。这些浓度在一般浓度范围内,尤其应该代表预期在从涉及基于纳米抗体的治疗剂的临床前研究中的小鼠获得的血浆样品中遇到的基于纳米抗体的治疗剂(例如用于确定基于纳米抗体的治疗剂的PK的目的)的(任选地在适当稀释后)浓度。

[0099] 实施例5:用于确定21-4的亲力的方案。

[0100] 使用Biacore T100使用CM5传感器芯片,使用运行缓冲液HBS-EP+,25℃进行结合测量。通过固定的兔抗小鼠IgG捕获21-4,因为发现直接固定的mAb 21-4表面不能有效再生。使用的抗小鼠IgG是与所有IgG亚类IgA和IgM反应的多克隆兔抗小鼠IgG抗体(GE Healthcare;Cat#BR-1008-38;Lot#10111487)。使用手动胺偶联(使用7分钟注射EDC/NHS进行激活,并且7分钟注射1M乙醇胺HCl pH 8.5进行失活(Biacore,胺偶联试剂盒))进行抗小鼠IgG的固定化。结合条件列于表I。基于蛋白质的固定化水平和MW,mAb21-4与固定化抗小鼠IgG结合的理论Rmax为~13000RU(当一个mAb21-4分子与一个抗小鼠IgG分子结合时)。

[0101] 表I

[0102]

流动池 (FC)	蛋白质	浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	接触 时间 (s)	流速 ( $\mu\text{l/min}$ )	固定化 缓冲液	固定化 水平 (RU)
FC1	抗小鼠 IgG	30	420	5	10 mM 乙 酸盐 pH 5.0	17305 (失活后: 13440)
FC2	抗小鼠 IgG	30	420	5	10 mM 乙 酸盐 pH 5.0	17020 (失活后: 12820)

[0103] 使用以该方式固定的21-4的结合实验(Biacore T100)所用的条件在图8中给出。在捕获mAb 21-4并注射所有样品后,可以成功地再生抗小鼠IgG表面(每次再生后基线水平

的有限增加)。

[0104] 上述方案用于产生不同猝灭剂的21-4亲和力数据,如下表II所示。

[0105] 表II

[0106]

捕获	猝灭剂	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
21-4	SEQ ID NO:2	1.0E+04	3.0E-03	<b>3.0E-07</b>
	SEQ ID NO: 3	6.7E+03	3.2E-03	<b>4.8E-07</b>
	SEQ ID NO:4	4.5E+03	4.0E-03	<b>8.9E-07</b>
	SEQ ID NO: 5	9.5E+04	8.2E-04	<b>8.6E-09</b>

## 序列表

<110> 埃博灵克斯股份有限公司  
 <120> 免疫球蛋白单可变结构域的改进的药代动力学测定

<130> 197447

<150> US62/353,784

<151> 2016-06-23

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ISVD的C末端

<400> 1

Val Thr Val Ser Ser  
 1 5

<210> 2

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 猝灭剂

[0001]

<400> 2

His His His His His His Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 20 25 30

Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly  
 35 40 45

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser  
 50 55 60

Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 85 90 95

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly  
 100 105 110

Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly



<212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 猝灭剂  
  
 <400> 3  
  
 His His His His His His Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp  
 1 5 10 15  
  
 Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 20 25 30  
  
 Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 35 40 45  
  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr  
 50 55 60  
  
 Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
 65 70 75 80  
  
 Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp  
 85 90 95  
  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser  
 100 105 110  
  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0003]

<210> 4  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 猝灭剂  
  
 <400> 4  
  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30  
  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 270  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 猝灭剂

<400> 5

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Gly Ile Lys Ser Ser Gly Asp Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Ser Val  
50 55 60

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

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

[0004] Ala Lys Ser Arg Val Ser Arg Thr Gly Leu Tyr Thr Tyr Asp Asn Arg  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
130 135 140

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
145 150 155 160

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Ala Met  
165 170 175

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala  
180 185 190

Ile Thr Arg Ser Gly Val Arg Ser Gly Val Ser Ala Ile Tyr Gly Asp  
195 200 205

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr  
210 215 220

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Ala Ser Ala Ile Gly Ser Gly Ala Leu Arg Arg Phe Glu  
245 250 255

[0005] Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
260 265 270

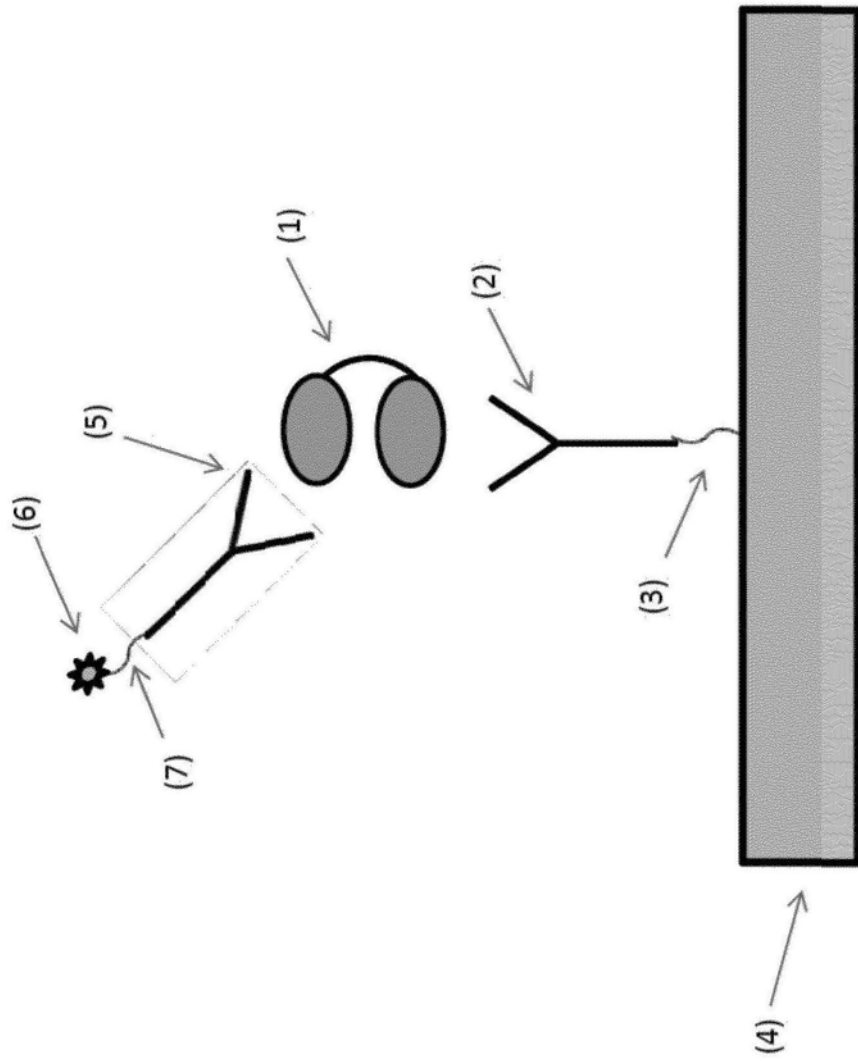


图1

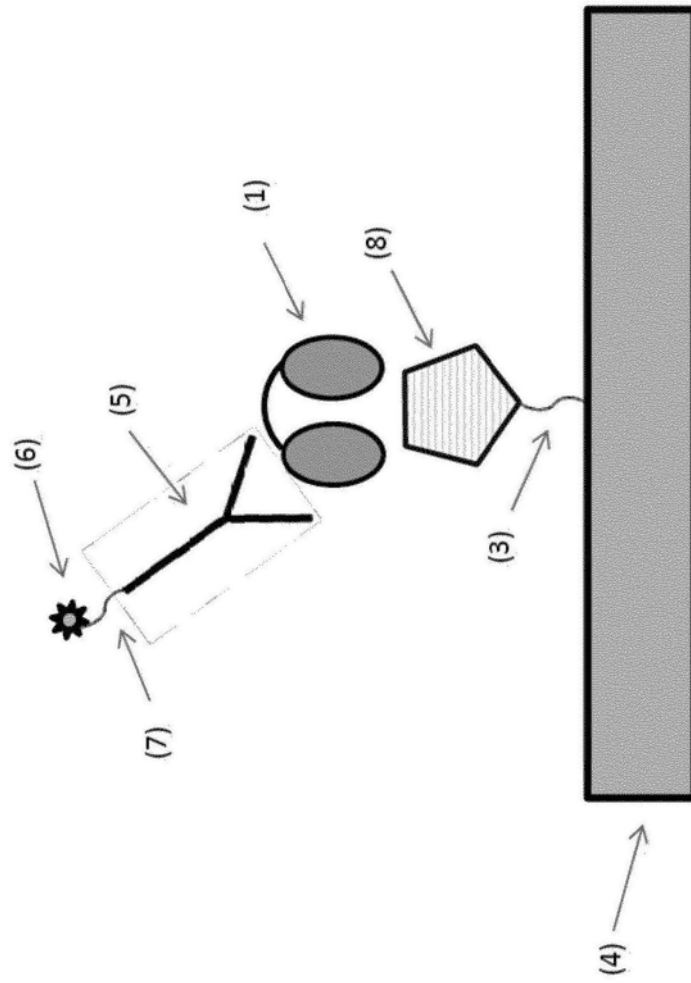


图2

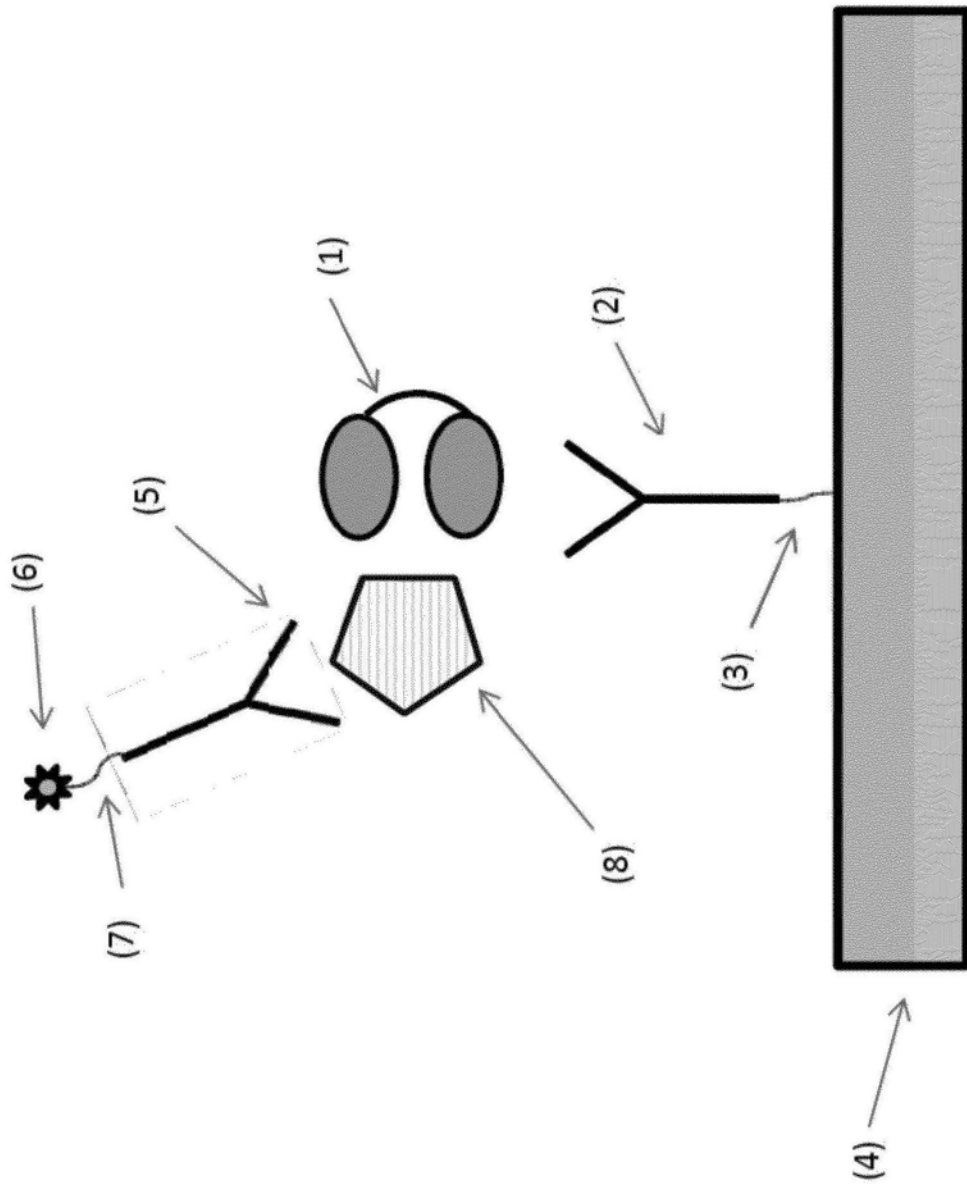


图3

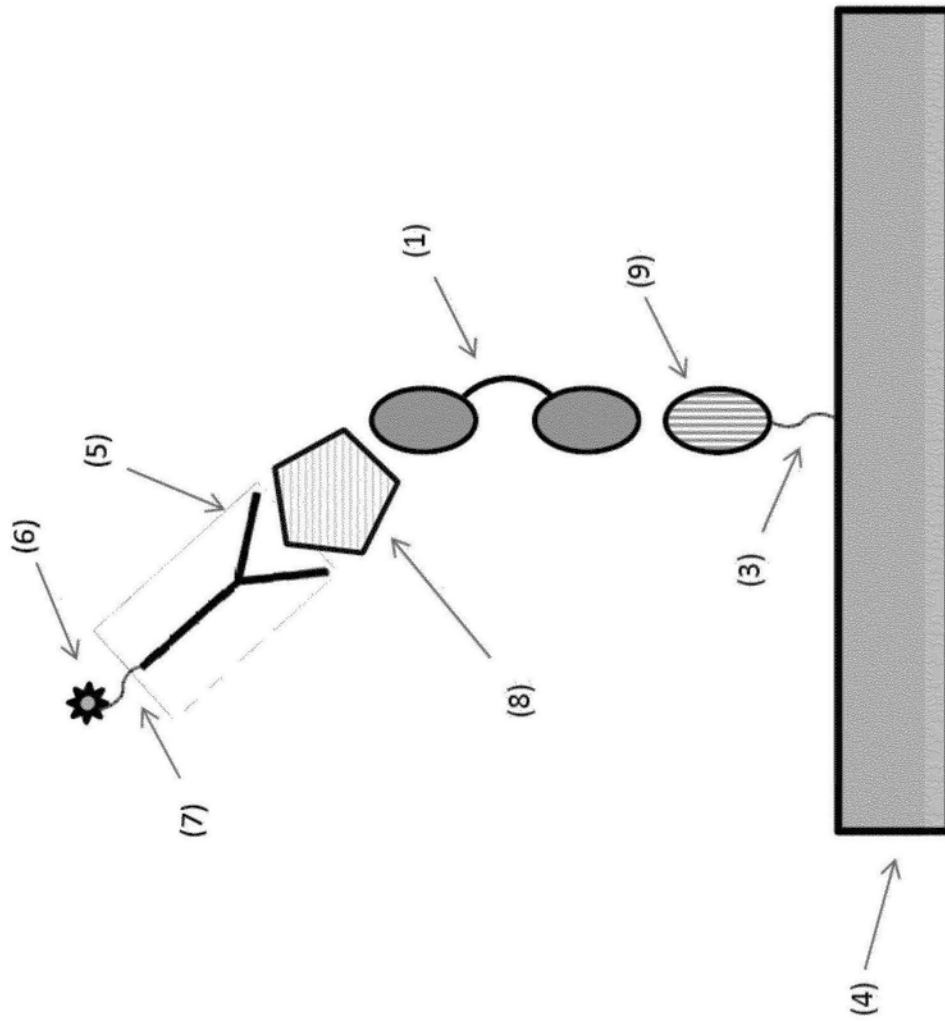


图4

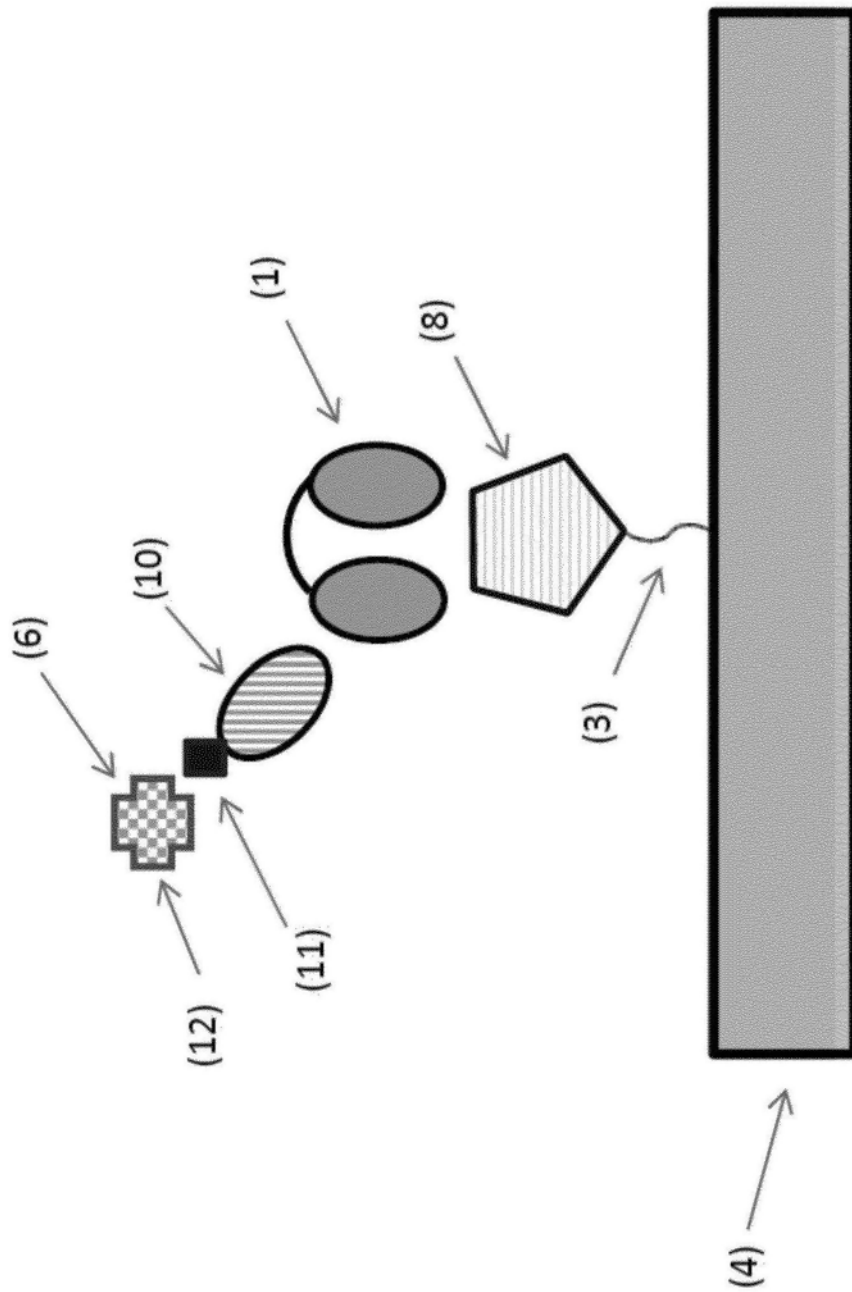


图5

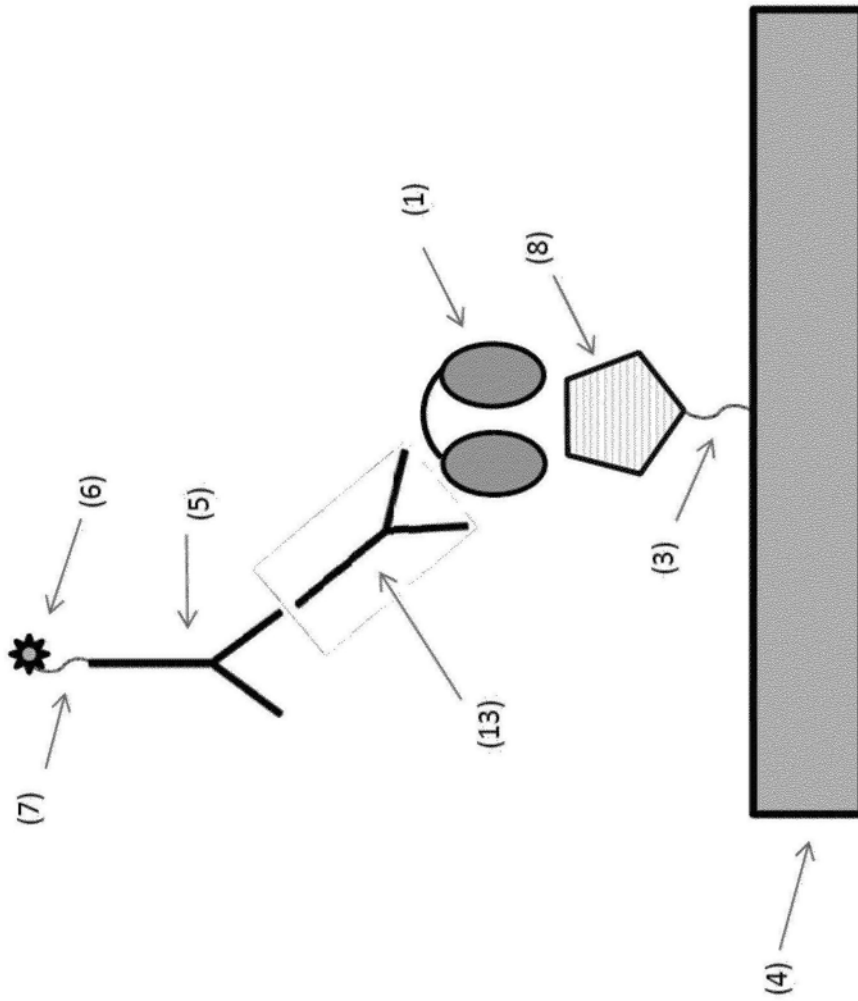


图6

SEQ ID NO:	序列
1	VTVSS
2	HHHHHHDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNHYAMGWF RQAPGKEREVFAAITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSGGQGLVTV SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNHYAMGWFRQAPGKEREVFA AITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPED TAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSGGQGLVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG TLVTVSS
3	HHHHHHEVQLVESGGDLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
4	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSGIKSSGDSTRYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKSRVSRGTGLYTYDNRGQGLVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNHYA MGWFRQAPGKEREVFAAITRSGVRSVSAIYGDSVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAASAIGSGALRRFEYDYSGGQGL LTVTVSS

图7

<b>捕获</b>	
流动路径	2
流速 ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	5
接触时间 (s)	180
浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	适合地选自 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围
<b>结合和解离</b>	
流动路径	1,2
流速 ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	45
样品接触时间 (s)	120
样品浓度 (nM)	范围是 0-6 微摩尔
解离时间 (s)	1200
<b>再生 1</b>	
流动路径	1,2
流速 ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	10
再生接触时间 (s)	180
再生缓冲液	10 mM 甘氨酸-HCl pH 1.7
稳定时间 (s)	60
如果...则...否则	如果再生 1 之后 Fc2 上 >15RU
	否则退出循环
<b>再生 2</b>	
流动路径	1,2
流速 ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	10
再生接触时间 (s)	240
再生缓冲液	10 mM 甘氨酸-HCl pH 1.7

图8

专利名称(译)	免疫球蛋白单可变结构域的改进的药代动力学测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN109313183A</a>	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201780038584.3	申请日	2017-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	埃博灵克斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	埃博灵克斯股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	埃博灵克斯股份有限公司		
[标]发明人	维尔勒斯诺尔克 莉泽洛特拜廷克 索菲耶珀尔曼斯 谢尔莫蒂尔 玛丽安格比斯 利斯德凯泽 尤迪特鲍迈斯特		
发明人	维尔勒·斯诺尔克 莉泽洛特·拜廷克 索菲耶·珀尔曼斯 谢尔·莫蒂尔 玛丽-安格·比斯 利斯·德凯泽 尤迪特·鲍迈斯特		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	张国梁 张莹		
优先权	62/353784 2016-06-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明总体上涉及用于测量生物样品中免疫球蛋白单可变结构域(在本文中也称为“ISV”或“ISVD”)以及包含至少一个ISV(如本文进一步描述的)的蛋白质和多肽的水平的改进的药代动力学测定。

流动池 (FC)	蛋白 质	浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	接触 时间 (s)	流速 ( $\mu\text{l/min}$ )	固定化 缓冲液	固定化 水平 (RU)
FC1	抗小 鼠 IgG	30	420	5	10 mM 乙 酸盐 pH 5.0	17305 (失活后: 13440)
FC2	抗小 鼠 IgG	30	420	5	10 mM 乙 酸盐 pH 5.0	17020 (失活后: 12820)