# 一种抗白蛋白抗体或其抗原结合片段及其应用

## 技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及一种抗白蛋白抗体或其抗原结合片段及其应用。

## 背景技术

白蛋白（albumin）是血浆中含量最丰富的蛋白（浓度约为 40 mg/mL），它对于维持血浆渗透压至关重要，同时白蛋白是内源配体（如脂肪酸、金属离子、激素等）和外源配体（如药物）的重要运输载体。

白蛋白分子量为 66.5 kDa，并在弱酸性条件下能结合细胞表面的受体 FcRn（neonatal Fc receptor），而在中性条件下结合力较弱，因此，白蛋白结合 FcRn 后，内吞进入内体（endosome），随着内体环境酸化，白蛋白与 FcRn 结合力增强，并被 FcRn 重新带回细胞表面，或实现跨细胞转运。因此，白蛋白能借助于 FcRn 的循环利用机制，实现较长半衰期。人血白蛋白在血浆中的半衰期约为 3 周，因此，与白蛋白结合的小分子化合物，或是与白蛋白融合表达的蛋白（如上市药物 Tanzeum®和 Idelvion®），具有显著改善的药代动力学性质，获得更长的半衰期，能潜在延长给药间隔，为患者提供更好的用药方案。

但由于不同物种的白蛋白序列有差异，不同物种白蛋白与其对应物种的 FcRn 的亲和力也不同。因此，对于白蛋白结合的小分子药物或者白蛋白融合蛋白而言，在小动物体内开展的药代动力学评估和药效评价，不一定能反映在人体中的效果。因此，不同种属的白蛋白的序列差异给以白蛋白为载体的药物，或白蛋白融合蛋白药物的转化研究带来了巨大挑战。

因此，开发能交叉结合多个物种白蛋白的抗体，能够潜在解决这一问题。由于抗白蛋白抗体能以近似的亲和力结合不同物种的白蛋白，因此将小分子化合物与抗白蛋白抗体偶联，或者将结合特定抗原的抗体与抗白蛋白抗体融合表达，该药物分子在小动物（如小鼠和大鼠）中开展的药代动力学和药效试验，能为未来药物在人体中的药代和药效表现提供可靠的参考价值。

单域抗体或纳米抗体是骆驼类动物体内天然缺失轻链的重链抗体（heavy-chain antibody）的可变区结构域，结构简单，是具有完整抗原结合活性的最小抗体单元。纳米抗体的分子量约为 13 kDa，具有易于改造、热稳定性高且水溶性好的特性。

为预测活性分子未来在人体的效果，通常要在相关的动物模型中验证它在动物体内的行为，如分析活性分子的药效、药代动力学、药物分布和药物代谢等。啮齿类动物，如小鼠和大鼠，因其动物个体较小、繁殖周期短、个体间遗传背景近似、实验成本较低，是常用的实验动物模型，这就要求活性分子具有能结合人源、小鼠源、大鼠源靶点的特性。对于抗白蛋白的单域抗体或者纳米抗体而言，需要该抗体能结合多物种白蛋白，如人、小鼠、大鼠，便于在啮齿类动物中，如小鼠和大鼠，开展抗白蛋白纳米抗体及其融合构建体的动物体内评价实验。

## 发明内容

为克服现有技术的缺陷，本申请提供了一种抗白蛋白抗体或其抗原结合片段及其应用，以及亲和力提升的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，该抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以以高亲和力结合不同种属白蛋白，同时，所述抗白蛋白抗体可以与生物活性效应分子连接，形成融合构建体，而不影响生物活性效应分子的活性。具体的，

本发明的第一方面，提供了一种抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和/或 CDR-H3。

CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：1 或 58，或与 SEQ ID NO：1 或 58 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：3-4、6、40 中的任一种或与 SEQ ID NO：3-4、6、40 中的任一种所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：7-8、59 中的任一种或与 SEQ ID NO：7-8、59 中的任一种所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

其中，所述的 SEQ ID NO：58（$X_1$YYMS）、SEQ ID NO：40（GISV$X_2X_3X_4X_5$LDYADAV$X_6$G）、SEQ ID NO：59（ASGP $X_7X_8$LR$X_9X_{10}$AP）中的 $X_{1-10}$ 可以为任意天然氨基酸残基，例如丙氨酸（A）、精氨酸（R）、天冬酰胺（N）、天冬氨酸（D）、半胱氨酸（C）、谷氨酰胺（Q）、谷氨酸（E）、甘氨酸（G）、组氨酸（H）、异亮氨酸（I）、亮氨酸（L）、赖氨酸（K）、甲硫氨酸（M）、苯丙氨酸（F）、苏氨酸（T）、脯氨酸（P）、丝氨酸（S）、色氨酸（W）、酪氨酸（Y）、缬氨酸（V）。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 SEQ ID NO：58（$X_1$YYMS）中的 $X_1$ 代表 N 或 E；

所述的 SEQ ID NO：40（GISV$X_2X_3X_4X_5$LDYADAV$X_6$G）中的 $X_2X_3$ 代表 DS、DA、EG、DM 或 DG，$X_4X_5$ 代表 SF 或 WY，$X_6$ 代表 K、A、R 或 H；优选的，

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：5）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DA，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：20）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DS、$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：21）；

所述 $X_2X_3$ 代表 EG、$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：22）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 A（SEQ ID NO：31）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 R（SEQ ID NO：32）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 H（SEQ ID NO：33）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 WY，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：50）；或者，

所述 $X_2X_3$ 代表 DM，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：51）。

所述的 SEQ ID NO：59（ASGP$X_7X_8$LR$X_9X_{10}$AP）中的 $X_7X_8$ 代表 QG、IW、LW 或 VG，$X_9X_{10}$ 代表 LG 或 WW。优选的，

所述 $X_7X_8$ 代表 QG，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：9）；

所述 $X_7X_8$ 代表 IW，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：52）；

所述 $X_7X_8$ 代表 LW，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：53）；

所述 $X_7X_8$ 代表 QG，$X_9X_{10}$ 代表 WW（SEQ ID NO：54）；或者，

所述 $X_7X_8$ 代表 VG，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：55）。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列包含下列任一组（具体见表 1）：

A）SEQ ID NO：1、3、7；

B）SEQ ID NO：1、4、8；

C）SEQ ID NO：2、5、9；

D）SEQ ID NO：2、6、9；

E）SEQ ID NO：2、20、9；

F）SEQ ID NO：2、21、9；

G）SEQ ID NO：2、22、9；

H）SEQ ID NO：2、31、9；

I）SEQ ID NO：2、32、9；

J）SEQ ID NO：2、33、9；

K）SEQ ID NO：2、5、52；

L）SEQ ID NO：2、50、53；

M）SEQ ID NO：49、5、53；

N）SEQ ID NO：49、5、54；

O）SEQ ID NO：2、51、55。

表 1 候选抗体 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列

| 候选抗体编号 | SEQ ID NO：x | CDR-H1 | SEQ ID NO：x | CDR-H2 | SEQ ID NO：x | CDR-H3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2049 | 1 | YYAIG | 3 | CINSSGYSTNYANSVKG | 7 | AALECRTYEYDY |
| 3004 | 1 | YYAIG | 4 | CISSSGGSTNYADSVKG | 8 | ALLECRRDYRYLEG |
| 3005 | 2 | NYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3007 | 2 | NYYMS | 6 | GISIDSSILDYTDAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005Hz6 (DA) | 2 | NYYMS | 20 | GISVDASFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005Hz6 (DS) | 2 | NYYMS | 21 | GISVDSSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005Hz6 (EG) | 2 | NYYMS | 22 | GISVEGSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005 K65A | 2 | NYYMS | 31 | GISVDGSFLDYADAVAG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005 K65R | 2 | NYYMS | 32 | GISVDGSFLDYADAVRG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005 K65H | 2 | NYYMS | 33 | GISVDGSFLDYADAVHG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 1004 | 2 | NYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 52 | ASGPIWLRLGAP |
| 1012 | 2 | NYYMS | 50 | GISVDGWYLDYADAVKG | 53 | ASGPLWLRLGAP |
| 1036 | 49 | EYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 53 | ASGPLWLRLGAP |
| 1068 | 49 | EYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 54 | ASGPQGLRWWAP |
| 2028 | 2 | NYYMS | 51 | GISVDMSFLDYADAVKG | 55 | ASGPVGLRLGAP |

优选的，所述的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 的氨基酸序列以从 N 端到 C 端的顺序排列。本申请中抗体 CDR 区氨基酸的划分采用 Kabat 编号系统。所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包括人源化序列，所述的人源化序列的改造位点位于非 CDR 区，进一步优选的，所述的人源化序列的改造位点位于抗体的框架区和/或恒定区。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的结构包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体（single chain antibody fragment，scFv）或线性抗体。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以为单域抗体或纳米抗体。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段为纳米抗体，与全长 IgG 抗体、Fab、scFv 相比，在相同质量下，纳米抗体具有更高的摩尔浓度，可结合更多的抗原分子。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以结合哺乳动物白蛋白。

优选的，所述的哺乳动物包括人或非人哺乳动物，所述的非人哺乳动物可以为野生动物、动物园动物、经济动物、宠物、实验动物等等。优选的，所述的非人哺乳动物包括但不限于猪、牛、羊、马、驴、狐、貉、貂、骆

驼、狗、猫、兔、鼠（例如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、龙猫、松鼠）或猴等等。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：10-13、16-19、23-25、34-36、44-48 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：10-13、16-19、23-25、34-36、44-48 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

在本发明的一个具体实施方式中，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO：10-13、16-19、23-25、34-36、44-48 中的任一氨基酸序列所示。

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以采用现有技术任何常规方法进行构建。例如人工合成或者真核表达或原核表达。

本发明的第二方面，提供了一种上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的应用，所述应用包括：

A 在制备融合构建体中的应用，所述融合构建体包括上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和生物活性效应分子，所述的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接；

B 在筛选生物活性效应分子中的应用，将候选的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接，检测候选的生物活性效应分子的生物活性；或者，

C 在检测白蛋白中的应用。

本发明的第三方面，提供了一种融合构建体，所述的融合构建体包含一个或者多个上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或生物活性效应分子，所述的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接。

优选的，所述融合构建体包括多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，所述多个可以是相同或者不同的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段。

优选的，所述生物活性效应分子可以是一个或多个，所述多个可以是相同或者不同的生物活性效应分子。

优选的，所述的生物活性效应分子包括但不仅限于小分子化合物或者大分子化合物。

优选的，所述的小分子化合物包括但不仅限于任意的小分子药物，例如抗肿瘤药物、蛋白激酶抑制剂、抗病毒药物、抗生素、抗阿尔兹海默症药物、抗帕金森病药物、抗炎药物、抗过敏药物、抗高血压药物、抗血栓栓塞药物、抗癫痫类药物、抗抑郁药物、中风类药物或者自闭症类药物等等。

优选的，所述的小分子药物包括但不仅限于多奈哌齐、雷沙吉兰、恩他卡朋、罗替戈汀、喜树碱、紫杉醇、舒尼替尼、索拉非尼、华法林、姜黄素、甲氨蝶呤、多西他赛、卡马西平、赛乐特、奥氮平、格列本脲、尼莫地平、艾地苯醌、舒必利或德鲁替康中的一种或几种。

在一个具体实施方式中，所述的小分子药物为德鲁替康。

优选的，所述大分子化合物包括但不仅限于抗体、激活或抑制受体、蛋白的配体、生物活性酶、核酸药物、或其组合。

优选的，所述的大分子化合物中的抗体包括其他靶点的抗体或其抗原结合片段，所述其他靶点是不同于白蛋白的靶点。

进一步优选的，所述的其他靶点的抗体或其抗原结合片段的结构包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体（single chain antibody fragment，scFv）或线性抗体中的一种或两种以上的组合。

优选的，所述的其他靶点选自血管内皮生长因子 A (Vascular endothelial growth factor A，VEGFA)、血管内皮生长因子 B (Vascular endothelial growth factor B，VEGFB)、血管内皮生长因子受体 (Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor，FGF)、成纤维生长因子受体(Fibroblast growth factor receptor，FGFR) 、胎盘生长因子（PLacental growth factor，PIGF)、血小板源

性生长因子（Platelet-derived growth factor，PDGF）、转化生长因子（Transforming growth factor, TGF）、整合素(Integrin)、整合素受体（Integrin Receptor）、白细胞介素（Interleukin，如 IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23 等）、白细胞介素受体（Interleukin Receptor，如 IL1R1、IL2Rα、IL3R、IL4Rα、IL10R、IL12R、IL15Rα、IL17R、IL23R 等）、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9（Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9，PCSK9）、α 肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor α，TNFα）、肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor，TNFR)、破骨细胞分化因子（Receptor Activator of Nuclear Factor-κ B Ligand，RANKL）、G 蛋白偶联受体（G Protein-Coupled Receptor，GPCR）、胰高糖素样肽-1 受体（glucagon-like peptide-1 receptor，GLP1R）、分化簇 3（Cluster of Differentiation 3，CD3）、分化簇 105（Cluster of Differentiation 105，CD105）、分化簇 19（Cluster of Differentiation 19，CD19）、分化簇 20（Cluster of Differentiation 20，CD20）、分化簇 22（Cluster of Differentiation 22，CD22）、分化簇 25（Cluster of Differentiation 25，CD25）、分化簇 27（Cluster of Differentiation 27，CD27）、分化簇 28（Cluster of Differentiation 28，CD28）、分化簇 30（Cluster of Differentiation 30，CD30）、分化簇 33（Cluster of Differentiation 33，CD33）、分化簇 38（Cluster of Differentiation 38，CD38）、分化簇 40（Cluster of Differentiation 40，CD40）、分化簇 47（Cluster of Differentiation 47，CD47）、分化簇 80（Cluster of Differentiation 80，CD80/B7-1）、分化簇 86（Cluster of Differentiation 86，CD86/B7-2）、分化簇 96（Cluster of Differentiation 96，CD96）、分化簇 99（Cluster of Differentiation 99，CD99）、分化簇 111（Cluster of Differentiation 111，CD111）、分化簇 112（Cluster of Differentiation 112，CD112）、分化簇 123（Cluster of Differentiation 123，CD123）、分化簇 133（Cluster of Differentiation 133，CD133）、分化簇 138（Cluster of Differentiation 138，CD138）、分化簇 155（Cluster of Differentiation 155，CD155）、分化簇 171（Cluster of Differentiation 171，CD171）、紧密连接蛋白 18.2（Claudin 18.2，CLDN18.2）、TNF 受体超家族成员 4(Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4，TNFRSF4/OX40/CD134)、T-细胞可诱导共刺激分子(Inducible T-Cell Co Stimulator，ICOS)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4，CTLA4）、TNF 受体超家族成员 9(Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9，TNFRSF9/4-1BB/CD137)、T 细胞抗原受体(T cell receptor，TCR)、B/T 淋巴细胞衰减因子（B- and T-Lymphocyte Attenuator，BTLA） 、T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3)、淋巴细胞激活基因 3(Lymphocyte Activation Gene 3，LAG3)、半乳糖凝集素-9(Galectin-9，GAL9)、细胞程序性死亡-配体 1（Programmed cell death 1 ligand 1，PD-L1）、细胞程序性死亡-配体 2（Programmed cell death 1 ligand 2，PD-L2）、程序性死亡受体 1（Programmed cell death protein 1，PD-1）、T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白（T cell immune receptor with Ig and ITIM domains，TIGIT）、表皮生长因子受体（Epidermal growth factor receptor，EGFR）、人表皮生长因子受体-2（Human Epidermal GrowthFactor Receptor 2，HER2）、前列腺干细胞抗原(Prostate Stem Cell Antigen，PSCA)、癌胚抗原（Carcinoembryonic antigen，CEA）、家族性腺瘤性息肉病(Familial adenomatous polyposis，FAP)、表皮生长因子受体 III 型突变体抗体(Epidermal growth factor receptor variant type Ⅲ，EGFRvIII)、B 细胞成熟抗原（B cell maturation antigen，BCMA）、前列腺特异性膜抗原（Prostate Specific Membrane Antigen，PSMA）、糖类抗原 125（Cancer antigen 125，CA125）、酪氨酸蛋白激酶受体 A2 (Ephrin A Receptor 2，EphA2)、细胞间质上皮转换因子（Cellular-mesenchymal epithelial transition factor，c-Met）、L1-细胞粘附分子(L1-Cell Adhesion Molecule，L1CAM)、人信号淋巴细胞激活分子家族成员 7(Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family, Member 7，SLAMF7/CS1)、酪氨酸激酶样孤儿素受体 1 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1，ROR1)、重组结核杆菌融合蛋白(Recombinant Mycobacterium Tuberculosis Fusion Protein)、人食管鳞状上皮癌抗原 1(New York esophageal squamous cell carcinoma-1，NY-ESO-1)、粘蛋白 1（Mucin 1，MUC1）、粘蛋白 16（Mucin 16，MUC16）、间皮素(Mesothelin)、分化簇 174（Cluster of Differentiation 174，LewisY/CD174）、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(Glypican

3，GPC3)、双唾液酸神经节苷脂（Disialoganglioside-GD2，GD2）、真核分裂因子样和增殖相关蛋白（Eukaryotic division factor-like and proliferation-associated protein，EPG）、Delta 样配体 3 (Delta-Like Ligand 3, DLL3)或滋养层细胞糖蛋白(Trophoblast Glycoprotein，TPBG/5T4)。

在一个具体实施方式中，所述的其他靶点为 VEGFA。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与生物活性效应分子之间直接连接或间接连接。

优选的，所述的间接连接可以为通过接头、功能结构域和/或用于偶联的连接子连接。

其中，所述的接头选自连接肽、寡肽、寡肽聚合物、多肽、多肽聚合物、PEG、核酸、多糖、脂肪链、生物素、链霉亲和素或亲和素。

所述的功能结构域为 Fc 片段、血清白蛋白、细胞因子、转铁蛋白、支架蛋白中的一种或两种以上的组合。

所述的用于偶联的连接子包括功能团连接子。

所述的功能团连接子包括巯基、氨基、羟基和/或羧基反应活性基团，可以使抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与生物活性效应分子之间共价偶联。

优选的，所述的生物活性效应分子直接或者间接连接在所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的 N 端、C 端和/或内部残基上。

优选的，所述的融合构建体中包含一个或多个生物活性效应分子。

例如，所述的融合构建体中从 N 端到 C 端，抗体或其抗原结合片段和生物活性效应分子的连接顺序如下：

抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、生物活性效应分子；

生物活性效应分子、连接肽、抗白蛋白抗体或其抗原结合片段；

抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、第一个生物活性效应分子、连接肽、第二个生物活性效应分子；或者，

第一个生物活性效应分子、连接肽、抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、连接肽、第二个生物活性效应分子，等等；其中，所述的连接可以不包括连接肽。

在一个具体实施方式中，所述的生物活性效应分子包含 SEQ ID NO：26-27 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：26-27 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

在一个具体实施方式中，所述的融合构建体包含 SEQ ID NO：28-30、61 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：28-30、61 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

在一个具体实施方式中，所述的融合构建体包括 Fc 片段。

进一步优选的，所述的 Fc 片段包含 SEQ ID NO：38，或与 SEQ ID NO：38 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性。

在一个具体实施方式中，所述的融合构建体包含 SEQ ID NO：14-15 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：14-15 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

优选的，所述的融合构建体还包含分泌肽。所述的分泌肽连接在融合构建体的 N 端。进一步优选的，所述的分泌肽的氨基酸序列可以为 SEQ ID NO：37 或 42。

优选的，所述的融合构建体中还包含标签。

优选的，所述的标签连接在任一抗体或其抗原结合片段，或者，融合构建体的 C 端。

优选的，所述的融合构建体包括抗白蛋白抗体与药物的偶联物，其包含上述任意的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，生物活性效应分子为药物，所述的药物与上述任意的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段共价结合。

本发明的第四方面，提供了一种核酸，所述的核酸编码上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或上述的融合

构建体。例如，所述核酸包含 DNA 和/或 mRNA。

在一些实施方案中，所述核酸为 DNA，其编码本申请所述的抗体或抗原结合片段，或上述的融合构建体。

优选的，所述编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：63-75、79-81、83-87 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：63-75、79-81、83-87 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段功能的核苷酸序列。

优选的，所述编码上述融合构建体的核苷酸序列包含 SEQ ID NO：76-78、82 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：76-78、82 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码上述融合构建体功能的核苷酸序列。

本发明的第五方面，提供了一种载体，所述的载体包含上述的核酸。

所述的载体能够在体内或体外或离体条件下表达。优选的，所述的载体为原核表达载体、病毒表达载体或真核表达载体。例如大肠杆菌系列载体、噬菌体等等。

本发明的第六方面，提供了一种宿主细胞，所述的宿主细胞包含上述的核酸或上述的载体。

所述的宿主细胞可以为真核细胞或原核细胞。

真核细胞包括动植物细胞，例如 T 细胞、酵母细胞、HEK293 细胞、293F 细胞或 CHO 细胞等等。

原核细胞例如大肠杆菌等。

本发明的第七方面，提供了一种宿主细胞的制备方法，所述的制备方法包括将上述核酸或载体导入宿主细胞。

本发明的第八方面，提供了一种上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或上述的融合构建体的制备方法，所述的制备方法包括培养上述的宿主细胞，表达所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或所述的融合构建体。

本发明的第九方面，提供了一种治疗和/或诊断疾病的产品，所述的治疗和/或诊断疾病的产品包含下列任一种：

A）上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段；

B）上述的融合构建体；

C）上述的核酸；

D）上述的载体；或，

F）上述的宿主细胞。

优选的，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或所述的生物效应分子具有治疗和/或诊断疾病的活性，进一步优选的，所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段作为治疗和/或诊断疾病的产品中的载体。

所述的疾病包括但不限于肿瘤、感染性疾病、阿尔兹海默症、帕金森病、炎性疾病、癫痫、抑郁症、中风、自闭症、过敏性疾病、高血压、血栓或与所述其他靶点信号通路相关疾病。

优选的，所述的融合构建体为一种抗白蛋白抗体与药物的偶联物，其包含上述任意的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，生物活性效应分子为药物，所述的药物与上述任意的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段共价结合。

本发明的第十方面，提供了一种白蛋白的检测方法，所述的检测方法包括将待检样品与上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段接触，然后检测白蛋白与抗白蛋白抗体或其抗原结合片段形成的复合物的含量。

所述的检测方法为检测白蛋白的存在或含量。其中，所述的存在表示有无，所述的含量可以为表达量或蛋白浓度等。优选的，所述的白蛋白来自哺乳动物，更为优选的，所述的哺乳动物来自人、鼠或者猴。

本发明的第十一方面，提供了一种治疗和/或预防疾病的方法，所述的方法包括向个体施加上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体、上述的宿主细胞或上述的治疗和/或诊断疾病的产品。

所述的疾病包括但不限于肿瘤、感染性疾病、阿尔兹海默症、帕金森病、炎性疾病、癫痫、抑郁症、中风、

自闭症、过敏性疾病、高血压、血栓或与所述其他靶点信号通路相关疾病。

在一个具体实施方式中，所述的疾病包括与 VEGFA 信号通路相关的疾病。进一步优选可以为肿瘤、血管异常增生、眼科涉及血管新生的疾病（例如眼底血管病）等等。

优选的，所述的靶细胞选自表达 VEGFA 的细胞，例如心肌细胞、近端肾小管细胞、肝细胞、血管内皮细胞、颗粒细胞、特化的上皮细胞、间充质细胞、巨噬细胞、血小板、树突状细胞、活化的 T 细胞、视网膜色素上皮细胞、视网膜中的 Muller 细胞、星形胶质细胞、成骨细胞、支气管与肺泡上皮细胞、周细胞、血管平滑肌细胞、肌成纤维细胞、角质形成细胞、肾系膜细胞或肿瘤细胞等等。

本发明的第十二方面，提供了一种上述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、上述的融合构建体、上述的核酸、上述的载体或上述的宿主细胞在制备治疗和/或预防疾病的产品中的应用，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或所述的生物活性效应分子具有治疗和/或诊断疾病的活性。

优选的，所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段作为治疗和/或诊断疾病的产品中的载体。

所述的疾病包括但不限于肿瘤、感染性疾病、阿尔兹海默症、帕金森病、炎性疾病、癫痫、抑郁症、中风、自闭症、过敏性疾病、高血压、血栓或与所述其他靶点信号通路相关疾病。

在一个具体实施方式中，所述的疾病包括与 VEGFA 信号通路相关的疾病。进一步优选可以为肿瘤、血管异常增生、眼科涉及血管新生的疾病（例如眼底血管病）等等。

本文使用的“融合构建体”定义了本发明的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与另外的化合物的融合。所述的融合构建体可以包含一个或多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，所述的多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段可以相同或不同。所述的融合构建体可以包含一个或多个另外的化合物，所述的多个另外的化合物也可以相同或不同。所述的化合物可以是蛋白质化合物或非蛋白质化合物。在化合物是蛋白质化合物或者融合构建体仅包含多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的情况下，融合构建体也可以称为融合蛋白。在化合物是以偶联形式与抗白蛋白抗体或其抗原结合片段融合情况下，融合构建体也可以称为偶联物。

本申请所述的产品可以为试剂盒或药物或芯片或抗体药物偶联物等。

本发明所述的“药物”可以用于治疗人或非人动物，例如非人哺乳动物。所述的药物可以包含现有技术常见的药学上可接受的载体、辅料或盐。所述的药物可以采用任何合适的给药途径，例如胃肠道给药（例如口服）或非胃肠道给药（例如，静脉内、肌内、皮下、皮内、器官内、鼻内、眼内、滴注、脑内、鞘内、透皮、直肠内等）途径。所述的药物可以为任何合适的剂型，例如经胃肠道给药剂型或非经胃肠道给药剂型，优选包括但不限于片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂、锭剂、糖浆剂、液体、乳剂、微乳剂、混悬剂、注射剂、喷雾剂、气雾剂、粉雾剂、洗剂、软膏剂、硬膏剂、糊剂、贴剂、滴眼剂、滴鼻剂、舌下片剂、栓剂、气雾剂、泡腾片、滴丸剂、凝胶剂等等。所述的药物的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。所述的药物可以含有重量比为 0.01-99.5%（具体如，0.01%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%）的所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、所述的融合构建体、所述的核酸、所述的载体、所述的宿主细胞、所述的免疫细胞等等。所述的药物可以制备为蛋白浓度为 1-300mg/mL（例如 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300mg/mL）的试剂。所述的药物的单次给药剂量可以为 0.1-1000mg，例如 0.1、0.2、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、3、5、10、20、50、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg。

本发明所述的“药学上可接受的”是指既不显著刺激生物体也不抑制所施用的产品的活性物质的生物学活性及

特性。

本发明所述的“…方法”可以为疾病的诊断和治疗目的，也可以为非疾病的诊断和治疗目的。

本发明所述的“抗原结合片段”是保留抗体的特定结合活性的抗体的一部分，即抗体的任何部分能够与抗体的靶分子上的表位特异结合。它包括例如 Fab，Fab'，F（ab'）2、Fv、Fd 和这些片段的变体。例如，抗体的重链和/或轻链，抗体的重链可变区和/或轻链可变区，或来自抗体的重链或轻链的单个或 2 个以上 CDR。其中，

纳米抗体或单域抗体是指抗体重链的可变区（variable domain of heavy chain，VHH），具有独立的抗原结合活性。

嵌合抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链及/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

单链抗体，是由抗体重链可变区和轻链可变区通过连接肽（linker）连接而成的抗体。

Fab，即由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段。

Fab'，是在 CH1 结构域的 C 端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段。

F(ab')2，即包含由铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段。

Fd，由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段。

Fv，由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段。

dAb 片段，是由 VH 结构域组成的抗体片段。

本发明所述的“线性抗体”包括一对或多对串联的抗体片段，所述抗体片段可以是 Fd 区段（VH-CH1）、单链抗体（scFv）、抗体片段（Fab）、或单域抗体（VHH），这些片段通过连接肽串联在一起，以形成连续的抗体结构。

其中，VH 代表重链可变区，VL 代表轻链可变区，CL 代表轻链恒定区，CH 代表重链恒定区。

本发明所述的“Fc”区含有包含抗体的 CH2 和 CH3 结构域的两个重链片段。两个重链片段由铰链区的两个或多个二硫键形成二聚体并通过 CH3 结构域的疏水作用保持在一起。

本发明所述的“包含”或“包括”为开放式写法，当用于描述蛋白质或核酸的序列时，所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成，或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸，但仍然具有与原序列相同或相似的活性。

本发明所述的“同源性” 或“同一性”，是指在使用蛋白序列或核苷酸序列的方面，本领域技术人员可以根据实际工作需要对序列进行调整，使使用序列与现有技术获得的序列相比，具有（包括但不限于）1%，2%，3%，4%，5%，6%，7%，8%，9%，10%，11%，12%，13%，14%，15%，16%，17%，18%，19%，20%，21%，22%，23%，24%，25%，26%，27%，28%，29%，30%，31%，32%，33%，34%，35%，36%，37%，38%，39%，40%，41%，42%，43%，44%，45%，46%，47%，48%，49%，50%，51%，52%，53%，54%，55%，56%，57%，58%，59%，60%，70%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，99.1%，99.2%，99.3%，99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%，99.9%的同源性。

本发明所述的“人源化抗体” 指抗体的框架区和/或恒定区部分（例如 CH 区）或抗体的全部或部分由人类抗体基因所编码。在本发明的一个具体实施方式中，抗体的 CDR 区未经过人源化改造。

本发明所述的“个体”可以为人或非人哺乳动物，所述的非人哺乳动物可以为野生动物、动物园动物、经济动物、宠物、实验动物等等。优选的，所述的非人哺乳动物包括但不限于猪、牛、羊、马、驴、狐、貉、貂、骆驼、狗、猫、兔、鼠（例如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、龙猫、松鼠）或猴等等。

本发明所述的“治疗”表示在疾病已开始发展后减缓、中断、阻止、控制、停止、减轻、或逆转一种体征、症

状、失调、病症、或疾病的进展或严重性，但不一定涉及所有疾病相关体征、症状、病症、或失调的完全消除。

本发明所述的“预防”表示为了阻止或延迟疾病或病症或症状在机体内的发生而实施的方式。

本发明所述的“诊断”是指以查明患者过去、诊断时或将来是否患有疾病或病症，或者是查明疾病的进展或将来可能的进展。

本发明所述的“肿瘤”可以是任何不良的细胞增殖(或本身表现为不良细胞增殖的任何疾病)、赘生物，或不良细胞增殖、赘生物或肿瘤的倾向性或风险增加。其可以是良性或恶性的，也可以是原发性或继发性(转移性)。赘生物可以是细胞的任何异常生长或增殖，并且可以位于任何组织中。组织的实例包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、盲肠、中枢神经系统(包括或排除大脑)、小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮细胞)、胆囊、食道、神经胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌骨、纵隔、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。进一步优选的，所述的肿瘤选自前列腺癌、乳腺癌、肝癌、胶质瘤（例如神经胶质瘤）、肠癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、皮肤癌、横纹肌癌、舌鳞癌、鼻咽癌、卵巢癌、胎盘绒毛癌、淋巴瘤（例如非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤）、白血病、直肠腺癌、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤（例如神经纤维肉瘤）、室管膜瘤、神经鞘瘤、星形细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、慢性粒细胞白血病、急性髓性白血病、骨髓增生异常综合征、慢性淋巴细胞白血病、表皮样癌、结肠癌、胸腺癌、血液癌、头颈癌或口咽癌。

本发明所述的“眼底血管病”指的是发生在视网膜动脉或静脉的疾病的总称。包括但不限于年龄相关性黄斑变性（AMD）、糖尿病性黄斑水肿（DME）、糖尿病性视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞、病理性近视、新生血管性青光眼等等。

本发明获得了以高亲和力结合白蛋白的抗体或其抗原结合片段,该抗白蛋白纳米抗体具有以下优点：

1. 获得的抗白蛋白纳米抗体可以以高亲和力结合不同种属白蛋白，包括人、猴、小鼠、大鼠等物种，同时完成了人源化改造，人源化抗白蛋白抗体结合人白蛋白和小鼠白蛋白，且能结合大鼠白蛋白。而小鼠和大鼠是常用的实验动物，使得本发明的抗白蛋白纳米抗体具有更广泛的应用前景。

2. 通过对优选的人源化抗白蛋白抗体开展亲和力提升改造，获得了与人白蛋白亲和力提升 3.7 倍或 35.7 倍的抗体。

3. 白蛋白有在炎症、肿瘤部位富集的特性，人源化后的抗白蛋白纳米抗体可以用于制备治疗免疫疾病、肿瘤等疾病的药物，通过将抗白蛋白纳米抗体融合其他抗体，得到的融合构建体在体内能够结合白蛋白，具备与白蛋白类似的在炎症、肿瘤部位富集的特性。

**附图说明**

以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

图 1：含 His 标签的抗体 Alb Nb、2049、3004、3007 和 3005 经 Ni 柱纯化后的考染胶图，（A）为抗体 Alb Nb、2049、3004、3007 考染胶图，（B）为抗体 3005 考染胶图。

图 2：融合蛋白 3005-Fc、3007-Fc 和 Alb Nb-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 测试，（A）为 HSA 结合测试（HSA binding ELISA），（B）为 MSA 结合测试（MSA binding ELISA），（C）为大鼠白蛋白结合测试（Rat albumin binding ELISA）。

图 3：含 His 标签的 3005 人源化抗体经 Ni 柱纯化后的考染结果。

图 4：抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 活性测试。

图 5：抗体 3005 及其人源化抗体 3005Hz6 和对照抗体 Alb Nb 结合 HSA 和大鼠白蛋白的 ELISA 活性测试，（A）为 HSA 结合测试（HSA binding ELISA），（B）为大鼠白蛋白结合测试（Rat albumin binding ELISA）。

图 6：人源化抗体 3005Hz6 与 HSA 和 MSA 的结合和解离曲线（SPR 方法），（A）为抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线，（B）为抗体 3005Hz6 与 MSA 的结合和解离曲线，纵坐标为响应值，横坐标为时间。

图 7：人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (DA)纯化后的 SDS-PAGE 考染胶图，（A）为 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)的 SDS-PAGE 考染胶图，（B）为 3005Hz6 (DA)的 SDS-PAGE 考染胶图。

图 8：人源化抗体 3005Hz6 及其突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)结合 HSA 的 ELISA 活性检测（HSA binding ELISA）。

图 9：融合蛋白 V1SA-3005Hz6、3005Hz6-V1SA 以及 V1DP-3005Hz6 经 Ni 柱纯化后的 SDS-PAGE 胶图，（A）为 V1SA-3005Hz6、3005Hz6-V1SA 的 SDS-PAGE 考染胶图，（B）为 V1DP-3005Hz6 的 SDS-PAGE 考染胶图。

图 10：人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合蛋白、人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 的 ELISA 活性检测。

图 11：融合蛋白和单价纳米抗体 V1-SA1 在不预孵育或预孵育 HSA 时的 VEGFR2 竞争 ELISA 活性测试，（A）为不预孵育 HSA 结果，（B）为预孵育 HSA 结果。

图 12：纳米抗体-德鲁替康偶联物（NDC）的偶联和纯化流程图。

图 13：（A）为 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC）的结构示意图，（B）为 3005 K65A 和三种不同的 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-1、NDC-2、NDC-3）的 SDS-PAGE 考染胶图。

图 14：（A）为 3005 K65A 和 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）结合 HSA 的 ELISA 活性测试（HSA binding ELISA），（B）为德鲁替康以及 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）对 Mia Paca-2 细胞的增殖抑制实验结果。

图 15：亲和力提升的候选抗体纯化后的考染结果。

图 16：亲和力提升的候选抗体结合 HSA 的 ELISA 实验结果（HSA binding ELISA）（包被抗体的方法，coat antibody），（A）为在 pH=7.4 时的 ELISA 实验结果，（B）为在 pH=6.0 时的 ELISA 实验结果。

图 17：亲和力提升的候选抗体结合大鼠白蛋白的 ELISA 实验结果（Rat albumin binding ELISA）（包被抗原的方法），（A）为在 pH=7.4 时的 ELISA 实验结果，（B）为在 pH=6.0 时的 ELISA 实验结果。

图 18：亲和力提升的抗体和对照抗体与 HSA 的结合和解离曲线（SPR 方法），（A）为抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线，（B）为抗体 1068 与 HSA 的结合和解离曲线，（C）为抗体 2028 与 HSA 的结合和解离曲线，（D）为对照抗体 BI-V2 与 HSA 的结合和解离曲线，纵坐标为响应值，横坐标为时间。

**具体实施方式**

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明的部分实施例，而不是全部。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

**实施例 1：羊驼免疫和抗体库构建**

1、羊驼免疫和效价检测

将人血清白蛋白 HSA（购自：Sigma-Aldrich，货号：A3782）乳化后免疫羊驼。每次免疫 1mg 人血清白蛋白，每 2 周免疫一次，共免疫羊驼三次，从第二次免疫开始，免疫一周后取血清检测效价。

血清效价检测方法为：

HSA 抗原用 CBS 缓冲液稀释到 1 μg/mL，取 100 μL/孔加入到酶标板中，4℃过夜；

PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）洗板 3 次。每孔加入 200 μL 的脱脂奶粉，室温放置 1 h，PBST 洗板 3 次；

加样：将免疫后的血清以及阴性血清分别稀释 1000 倍、3000 倍、9000 倍、27000 倍、81000 倍、243000 倍，分别取 100 μL 加入到封闭好的孔中，室温放置 1h，PBST 洗板 3 次；

二抗：每孔加入 100 μL 带有 HRP 标记的 Goat Anti-Alpaca IgG，室温放置 1h，PBST 洗板 3 次；

TMB 显色：在酶标板中加入 TMB 显色液 100 μL/孔，显色 15 min；加入终止液 50 μL/孔，将酶标板放进酶标仪，读取 450 nm 处的光吸收值（OD450）。

第二次和第三次羊驼免疫后的血清效价检测见表 2，可见血清稀释 243000 倍后，结合人血清白蛋白的信号值在 0.59 以上，均达到文库构建标准，将第三次免疫后的羊驼血清进行噬菌体文库构建。

表 2 第二次和第三次白蛋白羊驼免疫后的血清效价检测

| 抗原包被 | 人血清白蛋白 HSA（1 μg/mL） | | | |
|---|---|---|---|---|
| | OD450 | | | |
| 血清稀释倍数 | 第二次免疫后血清 | 阴性血清 | 第三次免疫后血清 | 阴性血清 |
| 1000 | 2.1439 | 0.0734 | 2.3233 | 0.0945 |
| 3000 | 1.9308 | 0.0553 | 2.3931 | 0.054 |
| 9000 | 1.5265 | 0.0541 | 2.1041 | 0.0526 |
| 27000 | 1.3957 | 0.0442 | 1.8906 | 0.0502 |
| 81000 | 1.029 | 0.0404 | 1.4248 | 0.0407 |
| 243000 | 0.592 | 0.035 | 0.8564 | 0.035 |
| 空白孔 | 0.0418 | 0.0538 | 0.0073 | 0.0538 |

2、噬菌体文库构建

抽取羊驼外周血，使用 Trizol 从分离好的羊驼 PBMC 中提取 total RNA，并进行 cDNA 的反转录，采用纳米抗体特异性引物扩增可变区 VH 片段（长度约 700bp），扩增两次。用 SfiI 酶对上述所得片段以及 pcomb3X 载体进行酶切，酶切后按适当比例混合用 T4 连接酶连接。连接后，用于电转化 XL1-Blue 感受态细胞。根据感受态细胞的稀释液在含抗性平板上的菌落生长情况，计算羊驼的转化库容量为 $6.24\times10^{8}$。

**实施例 2：抗体库筛选获得交叉结合人、小鼠、食蟹猴白蛋白的抗体**

1、噬菌体文库筛选

筛选流程为：

包被抗原人血清白蛋白 HSA 以及小鼠白蛋白 MSA（购自：Sigma-Aldrich，货号：A3559），同时设置阴性对照（用 3%脱脂奶粉包被酶标板），在室温下孵育 1 小时。丢弃封闭缓冲液并用 PBST 清洗。

加入约 $5\times10^{12}$ pfu 文库于抗原板，在 37℃下与抗原温育 2 小时，用 0.1% PBST 洗板。

用低 pH 的甘氨酸-HCl 进行洗脱，然后用 Tris-HCl 中和直至 pH 为 7.4。

将洗脱液与大肠杆菌 XL1-Blue 混合，在 37℃下孵育并摇动。

加入噬菌体后，在 30℃下培养过夜，收集上清液。

重复 1）-5）可得到第二轮文库。

包被 HSA 条件下获得的第二轮扩增文库用于 ELISA 检测时，用两种包被缓冲液包被抗原 HSA：PBS buffer 或 CBS buffer，随后进行 ELISA 结合检测，检测噬菌体采用带有 HRP 标记的 Anti-M13 Antibody（购自：义翘神州，货号：11973-MM05T-H），稀释 2500 倍使用。孵育检测抗体后，洗板，进行 TMB 显色，读取 OD450。第二轮扩增文库的检测结果如表 3。可见第二轮富集后，产生了强结合 HSA 的噬菌体信号。

表 3 包被 HSA 条件下富集获得的第二轮噬菌体文库结合 HSA 的检测结果

| 文库富集方式 | ELISA 检测时抗原包被液 | 扩增文库稀释倍数 | OD450（包被 5μg/mL HSA） | OD450（包被 3%奶粉） |
|---|---|---|---|---|
| HSA 包被富集 | CBS | 2 | 2.376 | 0.0242 |
| | | 10 | 1.9245 | 0.0358 |
| HSA 包被富集 | PBS | 2 | 2.3696 | 0.0421 |
| | | 10 | 1.7128 | 0.0382 |

对于包被 MSA 条件下获得的第二轮扩增文库，进行抗原结合 ELISA 测试。ELISA 实验中采用 CBS buffer 分别包被 HSA 和 MSA，ELISA 检测结果如表 4。可知，该富集条件下也获得了较强的能结合 HSA 和 MSA 的噬菌体。

表 4 包被 MSA 条件下富集获得的第二轮噬菌体文库结合 HSA 和 MSA 的检测结果

| 文库富集方式 | 扩增文库稀释倍数 | OD450（包被 5μg/mL HSA） | OD450（包被 5μg/mL MSA） | OD450（包被 3%奶粉） |
|---|---|---|---|---|
| MSA 包被富集 | 10 | 1.9721 | 1.7435 | 0.0826 |

总结：包被 HSA 和 MSA 富集得到的第二轮噬菌体文库的抗原结合 ELISA 检测为阳性，表明富集到了分别结合 HSA 和 MSA 的噬菌体，可开展噬菌体单克隆水平的结合筛选。

2、噬菌体单克隆筛选和测序

实验流程为：

从包被 HSA 富集到的第一轮噬菌体文库选择了 96 个单克隆菌落用于噬菌体表达，包被 HSA 蛋白用于 ELISA 结合活性检测。

从包被 MSA 富集到的第二轮噬菌体文库选择了 96 个单克隆菌落用于噬菌体表达，分别包被 HSA、MSA、猴白蛋白用于 ELISA 结合活性检测。

包被抗原 HSA、MSA、猴白蛋白，包被时蛋白浓度为 0.5μg/mL，4°C 包被过夜。

封闭：3％奶粉，200μL/孔，室温 1 小时。

加入 10 倍稀释后的噬菌体表达上清，100μL/孔，室温 1 小时。

添加检测抗体 Anti-M13 Antibody（HRP 标记）（浓度为 0.2μg/mL），100μL/孔，室温 1 小时。

加入 TMB 显色液 200μL/孔，显色 20 分钟，加入终止液 50μL/孔。酶标仪检测 OD450。

从包被 HSA 富集到的第一轮噬菌体文库的 96 个噬菌体克隆中，选择一个克隆，编号为 2049，从包被 MSA 富集到的第二轮噬菌体文库的 96 个噬菌体克隆中，选择三个克隆，分别编号为 3004、3005、3007，ELISA 检测结果见表 5 和表 6。

表 5 噬菌体单克隆 2049 结合 HSA 活性检测

| 噬菌体克隆编号 | OD450 | |
|---|---|---|
| | 包被 HSA 0.5μg/mL | 包被 3%奶粉对照 |
| 2049 | 2.3808 | 0.0671 |

表 6 噬菌体单克隆 3004、3005、3007 结合 HSA、MSA 和猴白蛋白活性检测

| 噬菌体克隆编号 | OD450 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 包被 MSA 0.5μg/mL | 包被 HSA 0.5μg/mL | 包被猴白蛋白 0.5μg/mL | 包被 3%奶粉对照 |
| 3004 | 2.5845 | 2.4568 | 2.3331 | 0.0505 |
| 3005 | 2.9804 | 4.3634 | 2.7835 | 0.0556 |
| 3007 | 2.4649 | 2.8373 | 1.5561 | 0.0374 |

经 DNA 测序获得四个噬菌体克隆的序列，四个抗体的 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3 的氨基酸序列见表 7，四个纳米抗体的氨基酸和核苷酸序列见表 8。

表 7 四个抗白蛋白纳米抗体的 CDR 区氨基酸序列

| 候选抗体编号 | SEQ ID NO：x | CDR-H1 | SEQ ID NO：x | CDR-H2 | SEQ ID NO：x | CDR-H3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2049 | 1 | YYAIG | 3 | CINSSGYSTNYANSVKG | 7 | AALECRTYEYDY |
| 3004 | 1 | YYAIG | 4 | CISSSGGSTNYADSVKG | 8 | ALLECRRDYRYLEG |
| 3005 | 2 | NYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3007 | 2 | NYYMS | 6 | GISIDSSILDYTDAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |

表 8 四个抗白蛋白纳米抗体的氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 抗体编号 | 抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 10 | 2049 | HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLTYYAIGWFRQAPGKEREGVL<br>CINSSGYSTNYANSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA<br>AALECRTYEYDYWGQGTQVTVSS |
| 11 | 3004 | QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVS<br>CISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA<br>ALLECRRDYRYLEGWGQGTLVTVSS |
| 12 | 3005 | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEW<br>VSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYC<br>ARASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| 13 | 3007 | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEW<br>VSGISIDSSILDYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCA<br>RASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 抗体编号 | 抗体核苷酸序列 |
| 63 | 2049 | CATGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGG<br>GGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTGACTTATT<br>ATGCCATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGTGAGGG<br>GGTCTTATGTATTAATAGTAGTGGTTATAGCACAAACTATGCAAACTCC<br>GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGG<br>TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAAGACACGGCCGTTTAT<br>TACTGTGCAGCAGCCGCCCTTGAATGTCGGACCTATGAGTATGACTAC<br>TGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA |
| 64 | 3004 | CAGTTGCAGCTCGTGGAGTCCGGTGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGG<br>GGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACTTTGGATTATT<br>ATGCTATAGGCTGGTTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGAGCGTGAGGGG<br>GTCTCATGTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACAAACTATGCAGACTCC<br>GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGG<br>TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTAT<br>TACTGTGCAGCAGCCCTTTTAGAATGTCGTCGAGACTACAGGTATCTC<br>GAAGGTTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCA |
| 65 | 3005 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGG<br>GGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACT<br>ATTACATGAGTTGGGCTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGG<br>GTGTCCGGTATTAGTGTTGATGGTAGTTTCCTTGACTATGCAGACGCC<br>GTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGG<br>TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCACTGTAT<br>TACTGTGCAAGAGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGCCTTGGGGCCCC<br>CCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA |
| 66 | 3007 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGG<br>GGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACT<br>ATTACATGAGTTGGGCCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGG<br>GTGTCCGGTATTAGTATTGATAGTAGTATCCTAGACTATACAGACGCCG<br>TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGT<br>GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCACTGTATT<br>ACTGTGCAAGAGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGCCTTGGGGCCCCC |

| | | |
|---|---|---|
| | | CGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA |

**实施例 3：抗白蛋白候选抗体结合不同物种白蛋白的活性检测**

1、抗白蛋白候选抗体的表达

将这四个候选抗体，在哺乳动物细胞中表达，蛋白纯化后进行抗原结合活性测试，验证候选抗体在蛋白水平结合白蛋白的活性。

通过基因合成，分别构建了 His 标签抗体 2049、3004、3005、3007 和阳性对照抗体 Alb Nb 的表达质粒，其中阳性对照 Alb Nb 抗体是抗人血清白蛋白的纳米抗体，抗体氨基酸序列来自专利 US 2007/0269422 A1 中的 SEQ ID NO: 62，氨基酸序列为：

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRD NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS（SEQ ID NO：62）。

在上述抗体的 N 端增加 tPA 分泌信号肽：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS（SEQ ID NO：37），抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：41）和 6xHis，基因序列通过酶切位点 NheI 和 XbaI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确后，经无内毒素大量提取，采用转染试剂聚乙烯亚胺（Polyethylenimine，PEI），开展悬浮 293F 细胞的瞬时表达和 Ni 柱亲和纯化。

His 标签的抗体 Alb Nb、2049、3004、3007 瞬时表达的细胞培养基上清（Input）和不能结合 Ni 柱的流穿液（FT）以及洗脱的纯化产物（Eluate）的 SDS-PAGE 染色见图 1 的（A），His 标签的抗体 3005 经 Ni 柱纯化后的产物，它的 SDS-PAGE 染色结果见图 1 的（B），它们的分子量符合预期（~15kDa）。

同时，构建抗体 3005、3007 和阳性对照抗体 Alb Nb 与 Fc 的融合蛋白，通过引物设计在抗体编码序列的 N 端增加 tPA 分泌信号肽：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS（SEQ ID NO：37）。通过同源重组法，在抗体序列的 C 端添加人 IgG1 Fc 的氨基酸序列：

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：38），将基因片段插入到哺乳动物细胞表达载体 pCDNA3.1（+）中。

抗白蛋白纳米抗体-Fc 融合蛋白的氨基酸和核苷酸序列见表 9。

表 9 抗白蛋白纳米抗体-Fc 融合蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 14 | 3005-Fc | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVD GSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCARASGPQGLRLG APRGQGTQVTVSSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK |
| 15 | 3007-Fc | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISIDS SILDYTDAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYYCARASGPQGLRLGAP RGQGTQVTVSSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |

| | | |
|---|---|---|
| 67 | 3005-Fc | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGGGGTCTC<br>TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATTACATGAGTT<br>GGGCTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGGGTGTCCGGTATTAGTGTT<br>GATGGTAGTTTCCTTGACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC<br>AGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG<br>AGGACACGGCACTGTATTACTGTGCAAGAGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGC<br>CTTGGGGCCCCCCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACCTCCTTG<br>TCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCTTCTGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCC<br>CAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG<br>GACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGT<br>GGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAATTCCACC<br>TACAGAGTGGTGAGCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA<br>AGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAG<br>ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC<br>CTCCTTCCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT<br>GAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGC<br>CTGAGAACAACTACAAGACAACACCCCCTGTGCTGGATAGCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACG<br>TGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAG<br>AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG |
| 68 | 3007-Fc | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGCGCAGCCTGGGGGGTCTC<br>TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATTACATGAGTT<br>GGGCCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTCGAGTGGGTGTCCGGTATTAGTATT<br>GATAGTAGTATCCTAGACTATACAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC<br>AGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTG<br>AGGACACGGCACTGTATTACTGTGCAAGAGCCTCTGGGCCCCAGGGACTACGC<br>CTTGGGGCCCCCCGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCACCTCCTTG<br>TCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCTTCTGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCC<br>CAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG<br>GACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGT<br>GGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAATTCCACC<br>TACAGAGTGGTGAGCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA<br>AGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAG<br>ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC<br>CTCCTTCCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT<br>GAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGC<br>CTGAGAACAACTACAAGACAACACCCCCTGTGCTGGATAGCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACG<br>TGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAG<br>AGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG |

Fc 的融合蛋白的表达质粒测序正确后，进行无内毒素大量提取，开展悬浮 293F 细胞的瞬时表达和 Protein A 亲和纯化获得目标蛋白。

2、抗白蛋白候选抗体结合白蛋白的活性检测

采用生物膜干涉技术（Bio-Layer Interferometry，BLI）方法测试单价纳米抗体结合不同种属白蛋白的亲和力。采用 8 根 NTA sensor 结合同一个 his tag 的单价纳米抗体（浓度为 1 μg/mL），抗原分别为人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）、小鼠白蛋白 MSA（购自：Equitech-bio，货号：MSA62-1000）和大鼠白蛋白 Rat albumin（购自：abcam，货号：ab198656）。BLI 实验中抗原的 8 个浓度梯度设置为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125nM，抗原和抗体结合 180 秒，解离 360 秒。

表 10 展示了经“1：1”模型拟合后，his 标签的单价纳米抗体 2049、3004、3005、3007 结合不同物种白蛋白的结合速率（ka），解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）。

表 10 纳米抗体 2049、3004、3005 和 3007 结合不同物种白蛋白的结合速率（ka），解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| Antibody | Antigen | KD (M) | ka (1/Ms) | kd (1/s) | Full R^2 |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 2049 | HSA | 5.79E-09 | 2.02E+05 | 1.17E-03 | 0.9967 |
| | MSA | 2.34E-09 | 1.36E+05 | 3.19E-04 | 0.9962 |
| | Rat albumin | No data | No data | No data | No data |
| 3004 | HSA | 8.04E-09 | 3.01E+05 | 2.42E-03 | 0.9812 |
| | MSA | 3.02E-10 | 1.84E+05 | 5.57E-05 | 0.996 |
| | Rat albumin | No data | No data | No data | No data |
| 3005 | HSA | 4.05E-09 | 1.87E+05 | 7.57E-04 | 0.9983 |
| | MSA | 5.78E-09 | 2.71E+05 | 1.57E-03 | 0.9858 |
| | Rat albumin | 5.32E-09 | 1.55E+05 | 8.26E-04 | 0.9982 |
| 3007 | HSA | 3.85E-09 | 1.79E+05 | 6.90E-04 | 0.9986 |
| | MSA | 1.15E-08 | 1.27E+05 | 1.46E-03 | 0.9969 |
| | Rat albumin | 4.08E-09 | 1.03E+05 | 4.18E-04 | 0.9985 |

数据表明，2049、3004、3005 和 3007 均能以高亲和力结合 HSA 和 MSA，3005 和 3007 还能结合大鼠白蛋白。

采用 ELISA 方法再次对比 3005 和 3007 结合不同种属白蛋白的活性，实验方法是：

用 ELISA 包被缓冲液稀释抗原，人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）的终浓度为 1μg/mL，小鼠白蛋白 MSA（购自：Equitech-bio，货号：MSA62-1000）的终浓度为 2μg/mL，大鼠白蛋白（购自：abcam，货号：ab198656）的终浓度为 2μg/mL。将抗原稀释液加入酶标板中，100μL/孔，4℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，加入用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）配置的候选抗体 3005-Fc、3007-Fc，以及阳性对照抗体 Alb Nb-Fc 的梯度稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，1，10，100nM），37℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 抗体（购自：Abbkine，货号：A21050），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

3005-Fc、3007-Fc 和 Alb Nb-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 测试结果如图 2 所示。3005-Fc 和 3007-Fc 结合 ELISA 实验的 EC50 汇总见表 11。

表 11 3005-Fc 和 3007-Fc 结合不同物种白蛋白的 ELISA 实验 EC50 汇总

| 蛋白 | 结合 HSA EC50 (nM) | 结合 MSA EC50 (nM) | 结合大鼠白蛋白 EC50 (nM) |
|---|---|---|---|
| 3005-Fc | 0.24 | 0.23 | 0.40 |
| 3007-Fc | 0.25 | 0.26 | 0.68 |

参考表 11，结果显示抗体 3005-Fc 和 3007-Fc 均能高效结合 HSA 和 MSA。参考图 2，阳性对照抗体 Alb Nb-Fc 结合大鼠白蛋白活性很弱，但是抗体 3005-Fc 和 3007-Fc 均有较好的大鼠血清白蛋白结合活性，且抗体 3005-Fc 的结合大鼠白蛋白活性优于 3007-Fc，因此，优选 3005 抗体进行后续研究。

**实施例 4：抗白蛋白候选抗体的人源化改造**

1、候选抗体人源化改造和表达纯化

通过抗体的 CDR 区移植，进行人源化改造。以候选抗体 3005（SEQ ID NO：12）作为起始抗体，进行抗体的人源化改造。先通过抗体数据库 IGBLAST 和 IMGT，比对候选抗体 3005 序列与人源抗体序列的同源性，再将同源性高的人抗体框架区序列与候选抗体 3005 的 3 个 CDR 区序列（SEQ ID NO：2，SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：9）进行组合，构建人源化抗体。

在抗体的 N 端增加分泌信号肽，抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：41）和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列，再通过酶切位点 NheI 和 XbaI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量

提取，在悬浮 293F 细胞中进行瞬时表达和 Ni 柱亲和纯化。

抗体 3005 的人源化改造蛋白的氨基酸和核苷酸序列见表 12。

表 12 3005 人源化抗体的氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 16 | 3005Hz3 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| 17 | 3005Hz4 | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| 18 | 3005Hz5 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| 19 | 3005Hz6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |
| 69 | 3005Hz3 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGG AGGATCTCTGCGGCTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTCAGC AACTACTATATGAGCTGGGTCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTG GAATGGGTGTCCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTAC GCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGATAATGCC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCCCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCTCTGGACCTCAGGGCCT CCGGCTGGGCGCCCCAAGAGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGT CCAGC |
| 70 | 3005Hz4 | CAAGTGCAGCTGGTTGAGAGCGGCGGAGGCCTGGTGAAACCTGG AGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACATTCAGC AACTACTATATGAGCTGGATCAGACAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG GAATGGGTCAGCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTAC GCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGATAATGCC AAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAGGGCCT CCGGCTGGGCGCCCCCAGAGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGT CCAGC |
| 71 | 3005Hz5 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTCCAGCCCGG CGGAAGCCTGCGGCTCTCTTGTGCTGCTTCTGGCTTTACCTTCAGC AACTACTATATGAGCTGGATCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTG GAATGGGTGTCCGGCATCAGCGTGGACGGCAGCTTCCTGGACTAC GCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCAGCAGAGACAATGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCCTGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAAGGCCT GAGACTGGGCGCCCCAAGAGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGT CCAGC |
| 72 | 3005Hz6 | GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGG CGGCAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAG CAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCT GGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTA CGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGC CAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCC TGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCAGGGTACACTGGTGACCGTGT CCAGC |

含 His 标签的人源化蛋白经 Ni 柱纯化后，经 SDS-PAGE 电泳分离，分子量符合预期（~13kDa），考染结果见图 3。

2、人源化抗体的活性检测

首先，用 ELISA 方法检测原始候选抗体 3005，与人源化改造后的抗体结合小鼠白蛋白 MSA 的活性。

实验中，包被小鼠白蛋白 MSA（包被的蛋白浓度为 5 μg/mL）于酶标板中，100μL/孔，4℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）配置待测的含 His 标签蛋白的稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，1，10，100nM），待测蛋白为原始抗体 3005 以及四个经人源化改造的抗体。蛋白稀释液加入酶标板中后，37℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 测试结果如图 4 所示。结合 ELISA 实验的 EC50 汇总见表 13。

表 13 抗体 3005 及其人源化抗体结合 MSA 的 ELISA 实验 EC50 和最大结合值汇总

| 抗体 | 结合 MSA EC50（nM） | 最大结合值 OD450 |
|---|---|---|
| 3005 | 2.3 | 1.38 |
| 3005Hz3 | 22.0 | 0.89 |
| 3005Hz4 | 49.8 | 0.79 |
| 3005Hz5 | 31.6 | 0.80 |
| 3005Hz6 | 2.9 | 1.34 |

结果显示人源化抗体 3005Hz6 结合 MSA 的活性与原始抗体 3005 近似。

采用 ELISA 方法检测原始候选抗体 3005，与人源化后的 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白（Rat albumin）的活性。

实验中，包被 HSA 或大鼠白蛋白（包被的蛋白浓度为 2 μg/mL）于酶标板中，100μL/孔，4℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，用 PBST（含 0.1% Tween20 的 PBS，pH=7.4）配置待测的含 His 标签蛋白的稀释液（0.0001，0.001，0.01，0.1，0.3，1，10，100nM），待测蛋白为阳性对照抗体 Alb Nb，以及原始抗体 3005、人源化抗体 3005Hz6。蛋白稀释液加入酶标板中后，37℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

ELISA 结果分别为图 5 的（A）和图 5 的（B）。图 5 的结合 ELISA 曲线拟合的 EC50 值见表 14。

表 14 候选抗体 3005 及其人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白的 EC50 汇总

| 抗体名称 | 结合 HSA 的 EC50 (nM) | 结合大鼠白蛋白的 EC50 (nM) |
|---|---|---|
| 3005 | 0.31 | 2.74 |
| 3005Hz6 | 0.26 | 1.64 |
| Alb Nb | 0.66 | Weak binding |

从图 5 和表 14 中可知，人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和大鼠白蛋白的活性与原始抗体 3005 相当，均强于阳性对照抗体 Alb Nb。

采用表面等离子共振（Surface Plasmon Resonance, SPR）方法检测人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）。

实验中运用 Biacore 8K 仪器（Cytiva），利用 Series S Sensor Chip NTA 分别捕获 His 标签的人源化抗体 3005Hz6，分析物为梯度浓度的 HSA 或 MSA，用流动相缓冲液（成分为：10 mM HEPES、150 mM NaCl，0.05% v/v Tween-20，pH=7.4）稀释分析物。结合时间为 150 秒，解离时间为 900 秒。抗体 3005Hz6 与 HSA 的结合和解离曲线如图

6 的（A）所示，抗体 3005Hz6 与 MSA 的结合和解离曲线如图 6 的（B）所示。

采用“Two state reaction”模型拟合 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$），结果见表 15。

表 15 人源化抗体 3005Hz6 与 HSA 和 MSA 的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| Ligand | Analyte Solution | ka1 (1/Ms) | kd1 (1/s) | ka2 (1/s) | kd2 (1/s) | KD (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3005Hz6 | HSA | 9.04E+04 | 1.56E-03 | 3.67E-04 | 8.08E-04 | 1.19E-08 |
| 3005Hz6 | MSA | 7.57E+04 | 1.51E-02 | 5.01E-03 | 3.02E-04 | 1.14E-08 |

从表 15 可知，人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的亲和力近似，采用 SPR 方法测定的 KD 约为 11 nM。

结合实施例 3 的表 10 中，采用 BLI 方法测定原始抗体 3005 与 HSA 和 MSA 的 KD 值约为 5 nM，数值与表 15 中的 KD 相差为 3 倍以内，因此认为人源化抗体 3005Hz6 结合 HSA 和 MSA 的亲和力与原始抗体 3005 近似。

**实施例 5：人源化抗体 3005Hz6 的潜在化学修饰位点改造和活性测试**

一、人源化抗体 3005Hz6 的潜在化学修饰位点改造方案和表达纯化

对于 3005Hz6 抗体，其 CDR-H2 区（SEQ ID NO：5）含有氨基酸基序 DG。相比其他氨基酸基序（如 DS、DA），DG 更容易促进天冬氨酸 D 异构化为异天冬氨酸，可能会改变抗体的结构和抗原结合活性。天冬氨酸异构化还可能会加速蛋白水解和增强蛋白的免疫原性。

因此，本实施例对 3005Hz6 的 CDR-H2 区的氨基酸组合 DG 进行了点突变改造，降低蛋白发生结构和活性变化的风险。3005Hz6 的氨基酸组合 DG 点突变方案具体为，将天冬氨酸 D 替换为谷氨酸 E，或者将甘氨酸 G 突变为结构简单的 A 或者易形成柔性结构的 S。改造后的抗体的编号及其 CDR 区的氨基酸序列见表 16，人源化抗体 3005Hz6 潜在化学修饰位点的突变体全长氨基酸和核苷酸序列见表 17。

表 16 人源化抗体 3005Hz6 潜在化学修饰位点的突变体的 CDR 区氨基酸序列

| 候选抗体编号 | SEQ ID NO：x | CDR-H1 | SEQ ID NO：x | CDR-H2 | SEQ ID NO：x | CDR-H3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3005Hz6 (DA) | 2 | NYYMS | 20 | GISVDASFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005Hz6 (DS) | 2 | NYYMS | 21 | GISVDSSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005Hz6 (EG) | 2 | NYYMS | 22 | GISVEGSFLDYADAVKG | 9 | ASGPQGLRLGAP |

表 17 人源化抗体 3005Hz6 潜在化学修饰位点的突变体全长氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 人源化抗体 3005Hz6 突变体全长的氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 23 | 3005Hz6 (DA) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDASFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| 24 | 3005Hz6 (DS) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDSSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| 25 | 3005Hz6 (EG) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVEGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |
| 73 | 3005Hz6 (DA) | GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGG CGGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCT |

| | | |
|---|---|---|
| | | GGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACGCTAGCTTTCTGGACTA CGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGC CAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCC TGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTCAGGGTACACTGGTGACCGTGT CCAGC |
| 74 | 3005Hz6 (DS) | GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGG CGGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCT GGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACTCTAGCTTTCTGGACTAC GCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCCT GCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTCAGGGTACACTGGTGACCGTGT CCAGC |
| 75 | 3005Hz6 (EG) | GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGTGGAGGACTGGTGCAACCTGG CGGAAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAG CAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCT GGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGAGGGCAGCTTTCTGGACTA CGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGC CAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCAAGGGCTTCCGGTCCTCAGGGCC TGCGGCTGGGAGCTCCCAGAGGTCAGGGTACACTGGTGACCGTGT CCAGC |

在抗体 3005Hz6 的突变体蛋白 N 端增加分泌信号肽（SEQ ID NO：37），抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：41）和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列，再通过酶切位点 NheI 和 XhoI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，从细胞培养上清中开展 Ni 柱亲和纯化，在纯化过程中，瞬转表达 3005Hz6 (EG)、3005Hz6 (DS)的细胞培养基上清（Input）和不能结合 Ni 柱的流穿液（FT）以及洗脱的纯化产物（E），它们的 SDS-PAGE 结果见图 7 的（A）。瞬转表达 3005Hz6 (DA)蛋白的细胞上清经 Ni 柱纯化后，再经阳离子交换纯化，纯化后蛋白的 SDS-PAGE 结果见图 7 的（B）。三个突变体蛋白的分子量为 13kDa。

二、人源化抗体 3005Hz6 的潜在化学修饰位点改造体的活性测试

对人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)开展 HSA 结合活性的 ELISA 检测。ELISA 实验中，包被 2 μg/mL HSA，加入浓度梯度的 3005Hz6 或其突变体，通过 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），检测结合 HSA 的抗体水平。ELISA 实验结果见图 8，ELISA 实验的 EC50 见表 18。

表 18 人源化抗体 3005Hz6 突变体蛋白 3005Hz6 (DA)、3005Hz6 (DS)和 3005Hz6 (EG)结合 HSA 的 EC50 汇总

| 抗体名称 | 结合 HSA 的 EC50 (nM) |
|---|---|
| 3005Hz6 | 0.35 |
| 3005Hz6 (DA) | 0.44 |
| 3005Hz6 (DS) | 0.28 |
| 3005Hz6 (EG) | 0.40 |

从表 18 可知，人源化抗体 3005Hz6 及其突变体蛋白具有近似的 HSA 结合活性。

**实施例 6：人源化抗白蛋白抗体与其他抗原结合蛋白的融合表达和活性检测**

一、人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合表达和纯化

人源化抗体 3005Hz6 与结合其他抗原的抗体融合表达后，融合蛋白在体内结合白蛋白，分子量增加，或者结

合白蛋白后，参与白蛋白与 FcRn 的结合和循环利用机制，能潜在延长融合蛋白在体内的半衰期。

选用抗 VEGFA 的两个纳米抗体：V1-SA1（SEQ ID NO：26）和 V1-DP（SEQ ID NO：27）（表 19）与人源化抗体 3005Hz6 融合表达，并对比按照不同的串联方式获得的融合蛋白的活性。

表 19 抗 VEGFA 纳米抗体序列

| SEQ ID NO：x | 抗 VEGFA 纳米抗体名称 | 抗 VEGFA 纳米抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 26 | V1-SA1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPG KEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS |
| 27 | V1-DP | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPG KEREFVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNS LRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS |

人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体 V1-SA1（SEQ ID NO：26）和 V1-DP（SEQ ID NO：27）串联时，采用连接子 GGS，融合蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列见表 20。

表 20 人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合蛋白氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 融合蛋白名称 | 融合蛋白氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 28 | V1SA-3005Hz6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKERE FVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSF LDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQ GLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| 29 | 3005Hz6-V1SA | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAV YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKEREFVVAISKGGYKYDSVS LEARFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYGSSRLRL ADTYEYWGQGTLVTVSS |
| 30 | V1DP-3005Hz6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRTFSSYTMGWFRQAPGKERE FVVAISKGGYKYDSVSLEARFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVY YCAATRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSF LDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQ GLRLGAPRGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |
| 76 | V1SA-3005Hz6 | GAGGTGCAACTGGTGGAGTCCGGAGGTGGCCTGGTCCAGCCTGG CGGCAGCCTGAGACTCTCCTGCGCCGTGAGCGGCAGAACCTTCA GCAGCTACACCATGGGCTGGTTCAGACAAGCTCCAGGCAAAGAA AGGGAGTTCGTGGTGGCTATTAGCAAAGGCGGCTATAAGTACGAT AGCGTGAGCCTGGAAGCTCGGTTCACCATTAGCAGAGATAACGCC AAGAACACCGTGTACCTGCAAATGAATAGCCTGAGACCTGAGGAT ACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCACAAGAGCCTATGGCAGCTCC AGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAATATTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACAGTCAGCAGCGGCGGATCCGAAGTGCAGCTGGTCGA GAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGCAGCCTCAGACTGA GCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGAGCTG GGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGGCA TCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGG GCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACC TGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACT GCGCCCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCT AGAGGCCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC |
| 77 | 3005Hz6- | GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGG |

| | | |
|---|---|---|
| | V1SA | CGGCAGCCTCAGACTGAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAG<br>CAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCT<br>GGAATGGGTTTCCGGCATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTA<br>CGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGGGATAATGC<br>CAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGG<br>ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGC<br>CTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCAGGGTACACTGGTGACCGT<br>GTCCAGCGGCGGATCCGAGGTGCAACTGGTGGAGTCCGGAGGTG<br>GCCTGGTCCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTCTCCTGCGCCGTGA<br>GCGGCAGAACCTTCAGCAGCTACACCATGGGCTGGTTCAGACAA<br>GCTCCAGGCAAAGAAAGGGAGTTCGTGGTGGCTATTAGCAAAGG<br>CGGCTATAAGTACGATAGCGTGAGCCTGGAAGCTCGGTTCACCAT<br>TAGCAGAGATAACGCCAAGAACACCGTGTACCTGCAAATGAATAG<br>CCTGAGACCTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCGCCACAAG<br>AGCCTATGGCAGCTCCAGGCTCAGACTGGCTGATACCTACGAATAT<br>TGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACAGTCAGCAGC |
| 78 | V1DP-3005Hz6 | GAAGTTCAGTTGGTCGAATCAGGAGGAGGATTGGTTCAACCTGGT<br>GGTTCTCTCAGATTGTCTTGCGCTGTGAGTGGCAGGACATTCAGC<br>AGCTACACTATGGGATGGTTTCGCCAGGCTCCAGGCAAGGAGAGA<br>GAGTTTGTAGTCGCCATTTCTAAGGGGGGATACAAGTACGACTCT<br>GTGAGCCTGGAGGCTAGGTTCACAATCAGCAGGGATAACTCTAAG<br>AATACCGTCTACCTGCAGATGAATAGCCTCAGACCTGAGGACACT<br>GCCGTCTACTACTGCGCTGCCACTCGGGCTTACGGTTCCAGCAGG<br>CTTAGGCTGGCCGATACATATGAATACTGGGGCCAGGGCACCCTTG<br>TTACAGTGAGCAGTGGCGGATCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGAGC<br>GGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGCAGCCTCAGACTGAGCTG<br>TGCTGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGAGCTGGGCC<br>AGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTTTCCGGCATCAG<br>CGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAG<br>ATTCACAATCTCTCGGGATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCA<br>GATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC<br>CCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAG<br>GCCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCAGC |

在融合蛋白 N 端增加分泌信号肽，抗体 C 端添加连接子 GGGGS 和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列（见表 20），再通过酶切位点 NheI 和 XhoI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，从细胞培养上清中开展 Ni 柱亲和纯化。在纯化过程中，各个蛋白的瞬转后细胞培养基上清（Input）和不能结合 Ni 柱的流穿液（FT）以及洗脱的纯化产物，它们的 SDS-PAGE 结果见图 9，目标蛋白分子量约为 28 kDa。

二、人源化抗体 3005Hz6 与单价抗 VEGFA 纳米抗体的融合蛋白活性检测

1、检测构成融合蛋白的两个纳米抗体元件是否维持原来的功能。

检测融合蛋白中抗白蛋白纳米抗体 3005Hz6 结合 HSA 的活性。检测方法同实施例 4 中的“2、人源化抗体的活性检测”。ELISA 结果如图 10 所示，ELISA 实验的 EC50 见表 21。

表 21 融合蛋白或 3005Hz6 结合 HSA 的 EC50 汇总

| 蛋白名称 | 结合 HSA 的 EC50 (nM) |
|---|---|
| V1SA-3005Hz6 | 0.32 |
| 3005Hz6-V1SA | 0.33 |
| V1DP-3005Hz6 | 0.39 |
| 3005Hz6 | 0.25 |

从表 21 中可知，融合蛋白结合 HSA 的活性与单独的 3005Hz6 近似，表明 3005Hz6 融合其他抗体片段并不影

响 3005Hz6 的活性。而且，生物活性效应分子可以在抗白蛋白抗体的 N 或者 C 端，不同位置基本不影响融合蛋白结合白蛋白的活性。

2、检测融合蛋白中抗 VEGFA 纳米抗体的活性

采用 VEGFR2 竞争 ELISA 方法检测。并对比融合蛋白在结合或者不结合 HSA 时，对融合蛋白 VEGFR2 竞争活性的影响。

竞争 ELISA 实验中，酶标板包被羊抗人 IgG Fc 蛋白（购自：Solarbio，货号：SPA105），包被浓度为 5μg/mL，4°C 过夜。用 PBST 洗板和奶粉封闭后，加入 VEGFR2 胞外区-人 IgG1 Fc 融合蛋白（VEGFR2-Fc，内部制备）。将浓度梯度的融合蛋白，与恒定 1 μM HSA 或者 PBST 共孵育 30 分钟后，再与恒定终浓度（0.4 nM）的带生物素修饰的 VEGFA165-Avi-His 孵育 1 小时。VEGFA165-Avi-His 为内部制备，是在人 VEGFA165 的 C 端添加连接子和 Avi 标签和 6xHis 标签，VEGFA165-Avi-His 表达质粒与 BirA 酶表达质粒共转染 293-F 细胞，蛋白在表达过程中，经 BirA 酶催化，在 Avi 标签上进行生物素修饰。VEGFA165-Avi-His 的氨基酸序列为：APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTEESNITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRGSGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHH（SEQ ID NO：39）。

VEGFR2-Fc的氨基酸序列为：

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSERDTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTTQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLERVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVRKEDEGLYTCQACSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：43）

将融合蛋白与 VEGFA165-Avi-His 的混合物加入到已吸附 VEGFR2-Fc 的酶标板中，37°C 孵育 1 小时。用 HRP 标记的链霉亲和素抗体 Streptavidin-HRP（购自：生工生物，货号：D111054-0001）检测 VEGFA165-Avi-His 的生物素信号，室温孵育 45 分钟，洗板后，在酶标板中加入 TMB 显色液 100 μL/孔，显色 15 min；加入终止液 50 μL/孔，将酶标板放进酶标仪，读取 450 nm 处的光吸收值（OD450）。

融合蛋白和单价纳米抗体 V1-SA1 在不预孵育 HSA 时竞争 VEGFR2 的活性如图 11 的（A），在预孵育 HSA 后的 VEGFR2 竞争活性如图 11 的（B）。VEGFR2 竞争实验的 IC50 汇总见表 22。

表 22 融合蛋白和单价纳米抗体 V1-SA1 竞争 VEGFR2 的 IC50 汇总

| 蛋白名称 | 不预孵育 HSA 时，VEGFR2 竞争 ELISA IC50 (nM) | 不预孵育 HSA 时，融合蛋白的 IC50 与 V1-SA1 的 IC50 比值 | 预孵育 HSA 时，VEGFR2 竞争 ELISA IC50 (nM) | 预孵育 HSA 时，融合蛋白的 IC50 与 V1-SA1 的 IC50 比值 |
|---|---|---|---|---|
| V1SA-3005Hz6 | 0.84 | 1.08 | 1.59 | 0.90 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3005Hz6-V1SA | 0.75 | 0.96 | 2.47 | 1.40 |
| V1DP-3005Hz6 | 0.63 | 0.81 | 1.55 | 0.88 |
| V1-SA1 | 0.78 | 1.00 | 1.76 | 1.00 |
| 3005Hz6 | No activity | No data | No activity | No data |

从表 22 可知，3005Hz6 与 V1-SA1 或 V1-DP 串联而成的三个融合蛋白的 VEGFR2 竞争活性，在不孵育 HSA 时，均与单价纳米抗体 V1-SA1 的活性近似（IC50 比值为 0.81-1.08），表明抗 VEGFA 抗体与 3005Hz6 融合后，不影响抗 VEGFA 的活性，而且，生物活性效应分子可以在抗白蛋白抗体的 N 或者 C 端，不同位置基本不影响融合蛋白中生物活性效应分子的活性。

为模拟抗体或融合蛋白在体内含有白蛋白的情况下的抗 VEGFA 活性，在竞争 ELISA 实验体系中，预先将 HSA 与融合蛋白或单价纳米抗体 V1-SA1 孵育，检测与 VEGFR2 竞争结合 VEGFA 的活性。表 22 说明，在预孵育 HSA 的条件下，单价纳米抗体 V1-SA1 的 IC50 值约为实验体系中不含 HSA 时的 2 倍，表明 HSA 会对竞争 ELISA 实验的 IC50 值产生系统性影响，而融合蛋白的 IC50 值与 V1-SA1 的 IC50 比值为 0.88-1.40，表明融合蛋白的 VEGFR2 竞争活性与单价纳米抗体 V1-SA1 近似。

综合表 21 和表 22 的数据说明，单价抗 VEGFA 纳米抗体（V1-SA1 或 V1-DP）和抗白蛋白纳米抗体（3005Hz6）的融合蛋白，具有很强的竞争 VEGFR2，以及结合 HSA 的活性。说明在融合蛋白中，结合不同抗原的抗体元件能独立发挥功能，抗体元件之间的相互干扰较小。因此，可以将结合其他抗原的抗体与抗白蛋白的人源化抗体 3005Hz6 融合表达，以构建多特异和多功能的融合蛋白。

**实施例 7：抗白蛋白纳米抗体 3005 突变体与小分子毒素德鲁替康的化学偶联及偶联物活性测定**

一、偶联反应适用的抗白蛋白纳米抗体 3005 突变体的构建和表达纯化

对于抗白蛋白纳米抗体 3005，其氨基酸序列中第 65 位氨基酸为具有高反应活性的赖氨酸残基 K，该反应位点位于 CDR-H2 区。位于 CDR-H2 的 K65 与小分子共价偶联后可能会显著降低偶联物与抗原白蛋白的亲和力。因此，本实施例对纳米抗体 3005 序列中的 K65 进行了点突变改造，将具有伯氨基的赖氨酸残基突变为不具有反应活性的氨基酸例如：丙氨酸 A、精氨酸 R、组氨酸 H 等。新构建的突变体命名为 3005 K65A、3005 K65R、3005 K65H 等。

表 23 抗体 3005 突变体的 CDR 区氨基酸序列

| 候选抗体编号 | SEQ ID NO：x | CDR-H1 | SEQ ID NO：x | CDR-H2 | SEQ ID NO：x | CDR-H3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3005 K65A | 2 | NYYMS | 31 | GISVDGSFLDYADAVAG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005 K65R | 2 | NYYMS | 32 | GISVDGSFLDYADAVRG | 9 | ASGPQGLRLGAP |
| 3005 K65H | 2 | NYYMS | 33 | GISVDGSFLDYADAVHG | 9 | ASGPQGLRLGAP |

表 24 抗体 3005 突变体的氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 34 | 3005 K65A | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVAGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAL YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| 35 | 3005 K65R | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE WVSGISVDGSFLDYADAVRGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAL YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| 36 | 3005 K65H | QVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLE |

| | | |
|---|---|---|
| | | WVSGISVDGSFLDYADAVGGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAL YYCARASGPQGLRLGAPRGQGTQVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |
| 79 | 3005 K65A | CAAGTGCAGCTCGTGGAAAGTGGTGGAGGTCTGGCCCAGCCTGGA GGATCTCTGCGGCTGTCTTGTGCTGCCAGCGGATTTACCTTCAGCAA CTACTATATGTCTTGGGCCAGACAGGCCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTGTCCGGTATCTCTGTGGACGGTAGCTTCCTGGACTACGCCG ACGCCGTGGCCGGCAGATTCACAATCAGTAGAGACAATGCCAAGA ACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCAGAAGATACAG CCCTGTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAGGGACTGCGCCT GGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCTTCT |
| 80 | 3005 K65R | CAAGTGCAGCTCGTGGAAAGTGGTGGAGGTCTGGCCCAGCCTGGA GGATCTCTGCGGCTGTCTTGTGCTGCCAGCGGATTTACCTTCAGCAA CTACTATATGTCTTGGGCCAGACAGGCCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTGTCCGGTATCTCTGTGGACGGTAGCTTCCTGGACTACGCCG ACGCCGTGAGAGGCAGATTCACAATCAGTAGAGACAATGCCAAGA ACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCAGAAGATACAG CCCTGTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAGGGACTGCGCCT GGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCTTCT |
| 81 | 3005 K65H | CAAGTGCAGCTCGTGGAAAGTGGTGGAGGTCTGGCCCAGCCTGGA GGATCTCTGCGGCTGTCTTGTGCTGCCAGCGGATTTACCTTCAGCAA CTACTATATGTCTTGGGCCAGACAGGCCCCTGGTAAAGGCCTGGAG TGGGTGTCCGGTATCTCTGTGGACGGTAGCTTCCTGGACTACGCCG ACGCCGTGCACGGCAGATTCACAATCAGTAGAGACAATGCCAAGA ACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCAGAAGATACAG CCCTGTACTACTGCGCCAGAGCCAGCGGACCTCAGGGACTGCGCCT GGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTGTCTTCT |

抗白蛋白纳米抗体 3005 突变体的 CDR 区氨基酸序列见表 23，突变体的氨基酸序列和核苷酸序列见表 24，突变体的表达和纯化方法与本专利实施例 3 中“1、抗白蛋白候选抗体的表达”一致。简述为，在抗体 3005 的突变体蛋白 N 端增加分泌信号肽（SEQ ID NO：37），抗体 C 端添加连接子 GGGGS（SEQ ID NO：41）和 6xHis，通过基因合成获得编码 DNA 序列，再通过酶切位点 NheI 和 XhoI 连入表达载体 pCDNA3.1（+）。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，从细胞培养上清中开展 Ni 柱亲和纯化，纯化后三个突变体蛋白 Q-tof 检测突变体分子量为 13.8kDa。

采用生物膜干涉技术（Bio-Layer Interferometry，BLI）方法测试抗体 3005 与其突变体蛋白 3005 K65A、3005 K65R 和 3005 K65H 与不同物种白蛋白的亲和力。采用 NTA sensor 结合 his tag 的抗体（浓度为 5 μg/mL），抗原分别为人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）、小鼠白蛋白 MSA（购自：Equitech-bio，货号：MSA62-1000）和大鼠白蛋白 Rat albumin（购自：abcam，货号：ab198656）。BLI 实验中抗原的 8 个浓度梯度设置为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125nM，抗原和抗体结合 180 秒，解离 360 秒。

BLI 检测结果如表 25 所示，结果显示突变体蛋白 3005 K65A、3005 K65R、3005 K65H 结合不同物种白蛋白的亲和力与抗体 3005 近似。

表 25 抗体 3005 与其突变体蛋白 3005 K65A、3005 K65R、3005 K65H 结合不同物种白蛋白的结合速率（ka），解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| 抗原 | 抗体 | $K_D$ (M) | ka (1/Ms) | kd (1/s) | Full R^2 |
|---|---|---|---|---|---|
| HSA | 3005 | 5.38E-09 | 1.31E+05 | 7.06E-04 | 0.9997 |
| | 3005 K65A | 4.67E-09 | 1.34E+05 | 6.26E-04 | 0.9997 |
| | 3005 K65R | 5.45E-09 | 1.39E+05 | 7.59E-04 | 0.9996 |
| | 3005 K65H | 5.44E-09 | 1.19E+05 | 6.45E-04 | 0.9995 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MSA | 3005 | 9.45E-09 | 1.83E+05 | 1.73E-03 | 0.9939 |
| | 3005 K65A | 8.87E-09 | 1.66E+05 | 1.47E-03 | 0.9977 |
| | 3005 K65R | 8.15E-09 | 2.12E+05 | 1.73E-03 | 0.9941 |
| | 3005 K65H | 1.04E-08 | 1.54E+05 | 1.60E-03 | 0.9979 |
| Rat albumin | 3005 | 7.79E-09 | 9.97E+04 | 7.77E-04 | 0.9981 |
| | 3005 K65A | 3.00E-09 | 1.26E+05 | 3.79E-04 | 0.9993 |
| | 3005 K65R | 8.20E-09 | 1.24E+05 | 1.02E-03 | 0.9989 |
| | 3005 K65H | 3.53E-09 | 1.13E+05 | 3.99E-04 | 0.9991 |

二、3005 K65A 与德鲁替康偶联物（Nanobody Drug Conjugate，NDC）的制备方法

本实施例中以突变体 3005 K65A 为例说明偶联物的制备、纯化和活性测定。3005 K65A 可以通过利用本领域技术人员公知的方法获得具有巯基的纳米抗体中间体(3005 K65A-SH)，例如：通过赖氨酸残基的伯氨基与 2-亚氨基硫烷盐酸盐（2-Iminothiolane hydrochloride，Traut's Reagent）反应产生巯基化中间体；通过赖氨酸残基的伯氨基与 N-琥珀酰亚胺基 S-乙酰硫代链烷酸酯（N-Succinimidyl S-Acetylthioglycolate，SATA)类连接子的共价偶联，羟基胺释放产生高活性巯基化中间体；通过赖氨酸残基与 N-琥珀酰亚胺基 3-(吡啶基二硫代)丙酸酯（N-Succinimidyl3-(2-pyridyldithio)propionate，SPDP）作用后，用还原剂二硫苏糖醇（DTT）、2-巯基乙醇、三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)等还原二硫键获得巯基化中间体；或者使用一定浓度的还原剂二硫苏糖醇（DTT）、 2-巯基乙醇、三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP) 将纳米抗体分子内的二硫键还原从而产生巯基；等等，但不限于这些方法。

巯基化的纳米抗体活性中间体与德鲁替康通过硫醚键共价偶联得到纳米抗体德鲁替康偶联物。本实施例中，以伯氨基与 2-亚氨基硫烷盐酸盐为例描述 3005 K65A 框架中的赖氨酸残基的伯氨基与 2-亚氨基硫烷盐酸盐在 pH 为 7-10 时脒键发生反应生成游离巯基，巯基化的纳米抗体中间体 3005 K65A-SH 框架上的游离巯基与德鲁替康马来酰亚胺基团通过迈克尔加成反应生成结构稳定的 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC）。

纳米抗体-德鲁替康偶联物的偶联和纯化流程图，如图 12 所示。

三、3005 K65A 德鲁替康缀合物的纯化和结构表征

3005 K65A-德鲁替康偶联物的制备工艺为：在含有巯基化的纳米抗体中间体 3005 K65A-SH 的缓冲液中，逐滴加入德鲁替康的溶液并持续震荡使其进行反应。3005 K65A-SH 与德鲁替康的反应缓冲液可使用磷酸钠盐、乙酸钠溶液或者硼酸钠等。反应时的 pH 通常为 5～9 之间，优选在 pH=7 左右。溶解德鲁替康的有机共溶剂可以选自：N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)、二甲基亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)和 N-甲基-2-吡啶酮(NMP)等有机溶剂。本实施例中，将溶解有德鲁替康的 DMAC 溶液，按照 8-15% v/v 添加到含有巯基的 3005 K65A-SH 的缓冲液中并进行反应。反应温度为 10-25℃，反应时间为 1 小时。反应结束后，向上述反应体系中加入 1～2 摩尔当量的含硫醇试剂：半胱氨酸或 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)，室温孵育 20 分钟，使未反应完的德鲁替康反应性失活进而结束反应。

偶联物纯化策略如下：采用市售的 HiTrap Desalting 柱纯化（购自：GE，货号：17140801）。用 5-10 个柱体积的磷酸缓冲液 PBS pH=7.4 平衡脱盐柱。在该 HiTrap Desalting 柱装填 NDC 反应水溶液(约 1.5 mL)，在快速蛋白纯化仪上（AKTA purifier 100, GE）按照脱盐柱使用说明进行洗脱，根据分子量的大小除去未反应的德鲁替康、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、小分子有机共溶剂等，获取 3005 K65A-德鲁替康偶联物溶液。纯化后的 3005 K65A 德鲁替康偶联物采用 SDS-PAGE 等判断偶联物是否偶联成功，RP-HPLC 检测纯化 3005 K65A 德鲁替康偶联物中游离小分子例如德鲁替康的含量。纯化后的偶联物游离小分子含量不超过 1%，方可进行后续的细胞活性测定。

本实施例中描述的 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC）的结构如图 13 的（A）所示，图 13 的（B）展示了三种不同的 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-1、NDC-2、NDC-3）的 SDS-PAGE 胶图，其中以标记为 NDC-3 的偶

联物为例，用于后续与人血清白蛋白结合 ELISA 实验，以及对胰腺癌细胞 Mia Paca-2 的增殖抑制活性评价。

四、3005 K65A-德鲁替康偶联物的亲和力以及体外活性测定

采用 ELISA 方法，对 3005 突变体蛋白 3005 K65A 和 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）开展人血清白蛋白结合活性检测。ELISA 实验中，包被 2 μg/mL 人血清白蛋白，加入浓度梯度的 3005 突变体蛋白 3005 K65A 和 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3），通过 HRP 标记的小鼠抗 His 标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），检测结合白蛋白的抗体水平。3005 突变体蛋白 3005 K65A 和 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）结合 HSA 的 ELISA 实验结果见图 14 的（A）。从图 14 的（A）可知，偶联小分子德鲁替康后，3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）与人血清白蛋白仍然具有很高的结合活性。结合 HSA 的 ELISA 实验 EC50 汇总见表 26。

表 26 3005 突变体蛋白 3005 K65A、3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）结合 HSA 的 EC50 值汇总

| 名称 | 结合 HSA 的 EC50 (nM) |
|---|---|
| 3005 K65A | 0.43 |
| 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3） | 1.85 |

采用胰腺癌细胞 Mia Paca-2 评价偶联物的细胞增殖抑制效果。实验过程简述如下：Mia Paca-2 细胞用包含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(Gibco)制备成 $2\times10^4$ 个细胞/mL，将细胞接种于 384 孔细胞培养用微孔板，每孔 25μL。进而，向每孔添加 25μL 用 DMEM 培养基稀释的不同浓度的德鲁替康或者 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3），使得德鲁替康或者 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）的终浓度为：0.96 nM、9.6 nM、96 nM、960 nM 和 19340 nM。加入受试物后，细胞在 37°C、5% $CO_2$ 下培养 5 天。培养后，从培养箱中取出微孔板，移除 25μL 添加等量的含有 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)，室温条件下混合器震荡 10 分钟，酶标仪测量微孔板里各个样品的发光量。利用公式计算连续培养 5 天后肿瘤细胞的存活率：

细胞存活率(%) = 给药组发光量 ÷ 对照组发光量 × 100%

用浓度为 96 nM、960 nM 和 19340 nM 的受试物处理 Mia Paca-2 细胞后，Mia Paca-2 细胞的活率见图 14 的（B）和表 27 所示。

表 27 德鲁替康以及 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）处理 Mia Paca-2 细胞后的细胞活率

| 受试物名称 | 受试物为 96 nM 时 Mia Paca-2 细胞的活率（%） | 受试物为 960 nM 时 Mia Paca-2 细胞的活率（%） | 受试物为 19340 nM 时 Mia Paca-2 细胞的活率（%） |
|---|---|---|---|
| 德鲁替康 | 84.0 ± 14.7 | 76.3 ± 10.1 | 12.4 ± 5.8 |
| 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3） | 66.6 ± 6.3 | 34.4 ± 8.3 | 1.3 ± 0.8 |

从图 14 的（B）以及表 27 可以看出：在相同浓度下，德鲁替康抑制肿瘤细胞增殖的活性，明显低于 3005 K65A-德鲁替康偶联物（NDC-3）。因此，抗白蛋白抗体 3005 可以作为载体，与小分子毒素等活性分子偶联，偶联物的生物活性，如抑制细胞增殖方面，不差于甚至优于活性分子本身，偶联物能潜在改善活性分子的细胞杀伤力或靶细胞的选择性，从而提高小分子在抑制癌细胞生长中的活性。

**实施例 8：人源化抗白蛋白抗体在不同 pH 条件下与白蛋白的结合活性**

白蛋白在弱酸性条件下能结合细胞表面的受体FcRn，而在中性条件下结合力较弱，因此，白蛋白结合FcRn后，内吞进入内体，随着内体环境酸化，白蛋白与FcRn结合力增强，并被FcRn重新带回细胞表面，或实现跨细胞转运。因此，白蛋白能借助于FcRn的循环利用机制，实现较长半衰期。白蛋白结合抗体及其融合蛋白在与白蛋白结合后也会经历类似的细胞内转运过程，因此白蛋白结合抗体在中性和酸性条件下与白蛋白的结合能力对实现长循环和半衰期延长非常关键。

采用 SPR 方法在近中性条件下（pH=7.4）和在酸性条件下（pH=5.5，模拟内体微环境的 pH）检测人源化抗体 3005Hz6 与 HSA 结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）。

实验中运用 Biacore 8K 仪器（Cytiva），利用 Series S Sensor Chip CM5 氨基偶联固定抗原 HSA，分析物为浓度梯度的 3005Hz6。在中性条件下检测 HSA 与 3005Hz6 的结合和解离时，所用流动相缓冲液的成分为：10 mM HEPES pH=7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v Tween-20，使用该流动相稀释分析物 3005Hz6。在酸性条件下检测 HSA 与 3005Hz6 的结合和解离时，所用流动相缓冲液的成分为：10 mM 醋酸钠 pH=5.5、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v Tween 20，使用该流动相稀释分析物 3005Hz6。实验中结合时间为 150 秒，解离时间为 300 秒。

采用“1：1 binding”模型拟合3005Hz6在pH=7.4和pH=5.5条件下，结合HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$），结果见表28。

表28 人源化抗体3005Hz6与HSA在pH=7.4和pH=5.5条件下的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| SPR 实验的 pH 条件 | Ligand | Analyte Solution | ka (1/Ms) | kd (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|---|
| pH=7.4 | HSA | 3005Hz6 | 5.33E+05 | 1.52E-03 | 2.84E-09 |
| pH=5.5 | HSA | 3005Hz6 | 1.37E+06 | 4.53E-04 | 3.29E-10 |

从表 28 可知，采用氨基偶联 HSA 的 SPR 方法，在 pH=7.4 时，3005Hz6 与 HSA 的平衡解离常数 $K_D$ 约为 2.84 nM；在 pH=5.5 时，3005Hz6 与 HSA 的平衡解离常数 $K_D$ 约为 0.33 nM，说明人源化抗体 3005Hz6 在中性条件和酸性条件下都能强结合 HSA，并且 3005Hz6 在酸性条件下与 HSA 的亲和力比中性条件下强 8.6 倍。因此可以推断，人源化抗体 3005Hz6 在生理 pH 下能强结合 HSA，当 3005Hz6 与 HSA 的复合物共同进入内体的酸性环境后，3005Hz6 与 HSA 的亲和力增强，从而借助 HSA 与 FcRn 的结合，3005Hz6 可以实现胞内循环或跨细胞转运。

**实施例 9：3005Hz6 与 Aflibercept 的融合表达和活性检测**

将人源化抗白蛋白抗体 3005Hz6 与上市药物 Aflibercept（VEGFR1 胞外结构域 2 和 VEGFR2 胞外结构域 3 与 IgG1 Fc 的融合蛋白）进行融合表达。将 3005Hz6 连接在 Aflibercept 蛋白的 N 端，连接子为 GGSGGS（SEQ ID NO：60），融合蛋白命名为：3005Hz6-Aflibercept，融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 的氨基酸序列为：
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVDGSFLDYADAVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRLGAPRGQGTLVTVSSGGSGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRE
LVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV
LSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGL
YTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK（SEQ ID NO：61）。

在融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 的 N 端增加分泌信号肽 IgK（METDTLLLWVLLLWVPGSTG，SEQ ID NO：42），通过基因合成和分子克隆技术，将蛋白的编码 DNA 序列通过酶切位点 HindIII 和 NotI 连入表达载体中。质粒测序正确并经无内毒素大量提取，利用悬浮 293F 细胞进行瞬时表达，从细胞培养上清中开展 Protein A 亲和纯化，获得融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept。

融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 的核苷酸序列为：

GAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCAACCTGGCGGCAGCCTCAGACTGAGCTGTGCT
GCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTATATGAGCTGGGCCAGACAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGG
TTTCCGGCATCAGCGTGGACGGCTCTTTTCTGGACTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACAATCTCTCGG
GATAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCG
CCCGGGCCAGCGGCCCCCAGGGCCTGCGGCTGGGAGCCCCTAGAGGCCAGGGTACACTGGTGACCGTGTCCA
GCGGCGGAAGCGGTGGATCTTCTGATACCGGCAGACCTTTCGTGGAAATGTACTCCGAAATTCCTGAGATCATC
CACATGACAGAAGGCCGCGAACTGGTGATCCCCTGCAGAGTGACCAGCCCTAACATCACCGTGACACTGAAG
AAGTTCCCTCTGGATACCCTGATCCCTGACGGCAAGCGGATCATCTGGGACTCCCGGAAGGGCTTCATCATCTC
CAACGCTACCTACAAAGAGATCGGCCTGCTGACATGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTATAAGACTAAC
TACCTGACCCACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGGTGCTGTCTCCATCTCACGGCATCGAGCTGTCCGT
GGGCGAGAAGCTGGTCCTGAATTGCACCGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGAATCGACTTCAACTGGGAGTA
CCCCAGCTCCAAGCACCAGCACAAGAAGCTCGTCAATCGGGACCTGAAGACACAATCCGGCTCCGAGATGAA
GAAATTCCTGTCTACCCTGACCATCGATGGCGTGACCAGATCCGACCAGGGCCTGTACACCTGTGCCGCTTCTA
GCGGACTGATGACCAAGAAGAACTCCACCTTTGTGCGGGTGCACGAGAAAGACAAGACCCACACCTGCCCTC
CTTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTAC
AGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAG
CAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAGACCATTAGCAAGGCCAAGGGACAGCCTAGAGAGCCTCAAGT
GTACACCCTGCCTCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTT
CTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGACAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCC
TGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAAGG
CAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTGAGCCTGAG
CCCTGGCAAG（SEQ ID NO：82）

采用 ELISA 方法检测融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 中抗白蛋白纳米抗体 3005Hz6 结合 HSA 的活性。实验中，包被人血清白蛋白 HSA（Baxter AG）的终浓度为 2μg/mL，100μL/孔，4℃包被过夜。经 5%脱脂奶粉封闭后，加入融合蛋白的梯度稀释液，37℃孵育 1 小时，洗板后加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 抗体（购自：Abbkine，货号：A21050），室温孵育 45 分钟。洗板后，每孔加入 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。融合蛋白 ELISA 结合实验的 EC50 见表 29。

采用 VEGFR2 竞争 ELISA 方法检测融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 中抗 VEGF 蛋白 Aflibercept 的活性，对照蛋白为上市药物 Aflibercept。竞争 ELISA 实验方法同实施例 6 中的“2、检测融合蛋白中抗 VEGFA 纳米抗体的活性”。融合蛋白竞争 ELISA 实验的 IC50 见表 29。

表 29 蛋白 3005Hz6-Aflibercept 的活性检测实验结果汇总

| 蛋白名称 | 结合 HSA ELISA EC50 (nM) | VEGFR2 竞争 ELISA IC50 (nM) |
|---|---|---|
| 3005Hz6-Aflibercept | 0.17 | 3.99 |
| Aflibercept | No binding | 4.52 |

从表 29 可知，融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 具有较强的 HSA 结合活性，它的 VEGFR2 竞争活性与上市药物 Aflibercept 近似。结果表明，融合蛋白 3005Hz6-Aflibercept 中的抗白蛋白纳米抗体 3005Hz6 和抗 VEGF 蛋白 Aflibercept 互不影响活性，均能独立发挥功能。

**实施例 10：人源化抗体 3005Hz6 的亲和力提升改造**

对人源化抗体 3005Hz6 的 3 个 CDR 区进行单个氨基酸位点和相邻两个氨基酸位点的随机突变，并利用噬菌体展示技术，将突变后序列展示在噬菌体表面，通过在筛选过程中逐步降低抗原投入量和种属交叉筛选的方式，获得可同时与 HSA、食蟹猴血清白蛋白、MSA、大鼠白蛋白结合、且亲和力高于 3005Hz6 的抗白蛋白纳米抗体候选序列。最终获得了候选抗体 1004、1012、1036、1068 和 2028，候选抗体的氨基酸序列和核苷酸序列见表 30，它们的 CDR 区氨基酸序列见表 31。

表 30 亲和力提升的候选抗体氨基酸序列和核苷酸序列

| SEQ ID NO：x | 候选抗体名称 | 抗体氨基酸序列 |
|---|---|---|
| 44 | 1004 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYANYYMSWARQAPGKGLEWVSGISV DGSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPIWLRL GAPRGQGTLVTVSS |
| 45 | 1012 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVD GWYLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPLWLRL GAPRGQGTLVTVSS |
| 46 | 1036 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVD GSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPLWLRLG APRGQGTLVTVSS |
| 47 | 1068 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFREYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVD GSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPQGLRW WAPRGQGTLVTVSS |
| 48 | 2028 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPNYYMSWARQAPGKGLEWVSGISVD MSFLDYADAVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTAVYYCARASGPVGLRLG APRGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO：x | 候选抗体名称 | 抗体核苷酸序列 |
| 83 | 1004 | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCACCTATGCGAACTACTACATGTCCT GGGCCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCGT GGACGGCTCCTTTCTGGATTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC TGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGCCTCCGGACCTATTTGGCTGA GATTGGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCTTCT |
| 84 | 1012 | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCACCTTCTCCAACTACTACATGTCCT GGGCCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCGT GGACGGCTGGTATCTGGATTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC TGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGCCTCCGGACCTTTGTGGCTGA GATTGGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCTTCT |
| 85 | 1036 | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCACCTTCACTGAGTACTACATGTCCT GGGCCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCGT GGACGGCTCCTTTCTGGATTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC TGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGCCTCCGGACCTTTGTGGCTGA GATTGGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCTTCT |
| 86 | 1068 | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCACCTTCCGGGAGTACTACATGTCC TGGGCCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCG TGGACGGCTCCTTTCTGGATTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACCATC |

| | | |
|---|---|---|
| | | TCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGC<br>CTGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGCCTCCGGACCTCAAGGCCTG<br>AGATGGTGGGCTCCTAGAGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCTTCT |
| 87 | 2028 | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTC<br>TGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTCACCTTCCCGAACTACTACATGTCCT<br>GGGCCAGACAGGCTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCGT<br>GGACATGTCCTTTCTGGATTACGCCGATGCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCT<br>CCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGCC<br>TGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAGCCTCCGGACCTGTGGGCCTGA<br>GATTGGGTGCTCCTAGAGGCCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCTTCT |

表 31 亲和力提升的候选抗体 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列

| 候选抗体名称 | SEQ ID NO：x | CDR-H1 | SEQ ID NO：x | CDR-H2 | SEQ ID NO：x | CDR-H3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1004 | 2 | NYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 52 | ASGPIWLRLGAP |
| 1012 | 2 | NYYMS | 50 | GISVDGWYLDYADAVKG | 53 | ASGPLWLRLGAP |
| 1036 | 49 | EYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 53 | ASGPLWLRLGAP |
| 1068 | 49 | EYYMS | 5 | GISVDGSFLDYADAVKG | 54 | ASGPQGLRWWAP |
| 2028 | 2 | NYYMS | 51 | GISVDMSFLDYADAVKG | 55 | ASGPVGLRLGAP |

**实施例 11 ：亲和力提升的候选抗体与白蛋白的 ELISA 结合活性测试**

在亲和力提升的候选抗体（表 30 所示抗体 1004、1012、1036、1068、2028）的 N 端添加 tPA 分泌肽，C 端增加 6xHis 标签，它们的表达和纯化与实施例 3 中“1、抗白蛋白候选抗体的表达”实验步骤相同。

亲和力提升的候选抗体纯化后的考染结果见图 15，候选抗体的分子量约为 14.7kDa。

用 ELISA 方法检测亲和力提升的候选抗体结合不同种属白蛋白的活性。

ELISA 实验中，包被候选抗体（浓度为 5μg/mL），4℃过夜包被。采用不同 pH（pH=7.4 或 6.0）的 PBST 溶液稀释生物素修饰的抗原 HSA（带 Avi 和 6xHis 标签，氨基酸序列为：
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYA
PELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP
SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY
LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL
VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGSGSGLNDIFEAQKIEWHE
GGGGSHHHHHH，SEQ ID NO：56），加入酶标板中，在 37℃中孵育 1h，分别用不同 pH（pH=7.4 或 6.0）的 PBST 溶液洗板。加入 HRP 标记的链霉亲和素抗体 Streptavidin-HRP（购自：生工生物，货号：D111054-0001），室温孵育 45 分钟，洗板后加入每孔 100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色 15 分钟后，加入终止液 50μL。用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度（OD450）。

亲和力提升的候选抗体在 pH=7.4 或 pH=6.0 时结合 HSA 的 ELISA 实验结果分别如图 16（A）和图 16（B）所示，可见，在 pH=7.4 时，除 1004 外，其余候选抗体结合 HSA 的亲和力均高于 3005Hz6，其中抗体 1068 的亲和力提升最为显著。在 pH=6.0 时，5 个候选抗体结合 HSA 的亲和力均高于 3005Hz6。

采用包被抗原的 ELISA 方法，检测亲和力提升的候选抗体结合大鼠白蛋白的活性。实验中，包被无标签的大鼠白蛋白，浓度为 5μg/mL，4℃过夜包被。采用不同 pH（pH=7.4 或 6.0）的 PBST 溶液稀释候选抗体（3005Hz6、

1004、1012、1036、1068、2028），加入酶标板中，在37℃中孵育1h，分别用不同pH（pH=7.4或6.0）的PBST溶液洗板，加入抗His标签单克隆抗体（购自：Proteintech，货号：HRP-66005），室温孵育45分钟，洗板后加入每孔100μL TMB（购自：天根生化，货号：PA107-01），37℃显色15分钟后，加入终止液50μL。用酶标仪测定OD450。其中对照组BI-V2是选取自专利US 2023/0050615 A1中的SEQ ID NO: 15，氨基酸序列为：EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSSYAMGWFRQAPGKERERVVSISRGGGYTYYADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAARYWATGSEYEFDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO：57）。

亲和力提升的候选抗体在pH=7.4或pH=6.0时结合大鼠白蛋白的ELISA实验结果分别如图17（A）和图17（B）所示。可见，在pH=7.4或pH=6.0时，抗体2028与大鼠白蛋白亲和力均高于3005Hz6，而对照蛋白BI-V2几乎不结合大鼠白蛋白。

**实施例12：亲和力提升的候选抗体与HSA的亲和力测试（SPR）**

采用两种SPR方法测定亲和力提升的候选抗体与HSA的亲和力。

第一种SPR方法中，采用仪器Biacore T200（Cytiva），在CM5芯片表面氨基偶联固定anti-His标签的抗体，捕获带有His标签的候选抗体，候选抗体浓度为20 nM，所在缓冲液为10 mM HEPES pH=7.4、150 mM NaCl、0.05% v/v Tween-20，流速为30 μL/min，捕获时间为30s。捕获了抗体的芯片随后与不同浓度的HSA结合和解离，HSA最高浓度是37.5 nM或者18.75 nM，2倍浓度梯度稀释，与芯片的结合时间是180s，解离时间是300s。对结合和解离曲线进行拟合，获得平衡解离常数$K_D$值，见表32。

表32 亲和力提升的候选抗体1004、1012、1036、1068、2028以及3005Hz6与HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| Ligand | Analyte Solution | ka (1/Ms) | kd (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| 1004 | HSA | 4.41E+05 | 1.63E-03 | 3.71E-09 |
| 1012 | HSA | 4.00E+05 | 1.41E-03 | 3.52E-09 |
| 1036 | HSA | 4.34E+05 | 1.88E-03 | 4.34E-09 |
| 1068 | HSA | 4.48E+05 | 9.91E-04 | 2.21E-09 |
| 2028 | HSA | 2.39E+05 | 1.31E-03 | 5.49E-09 |
| 3005Hz6 | HSA | 3.94E+05 | 2.93E-03 | 7.42E-09 |

从表32可知：亲和力提升的候选抗体1004、1012、1036、1068、2028与HSA的亲和力均高于3005Hz6，其中抗体1068与HSA的亲和力最高。

第二种SPR方法中，用Biacore 8K仪器（Cytiva），利用Series S Sensor Chip CM5氨基偶联固定抗原HSA（响应值约为1250 RU），分析物为浓度梯度的3005Hz6、1068、2028和对照蛋白BI-V2，蛋白所在缓冲液为10 mM HEPES pH=7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v Tween-20。SPR实验中结合时间为120秒，解离时间为1000秒（对于抗体2028，解离时间为300秒）。抗体3005Hz6、1068、2028和对照蛋白BI-V2结合HSA的结合和解离曲线分别如图18（A）、图18（B）、图18（C）、图18（D）所示。

采用“1：1 binding”模型拟合抗体结合HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$），结果见表33。

表33 抗体3005Hz6、1068、2028和对照蛋白BI-V2与HSA的结合速率（ka）、解离速率（kd）和平衡解离常数（$K_D$）

| Ligand | Analyte Solution | Ka (1/Ms) | kd (1/s) | $K_D$ (M) |
|---|---|---|---|---|
| HSA | 3005Hz6 | 7.78E+05 | 1.57E-03 | 2.02E-09 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| HSA | 1068 | 2.29E+06 | 1.29E-04 | 5.66E-11 |
| HSA | 2028 | 8.59E+05 | 4.67E-04 | 5.43E-10 |
| HSA | BI-V2 | 6.17E+05 | 9.64E-05 | 1.56E-10 |

结果显示，抗体 1068 与 HSA 的亲和力很高，约 56.6 pM，亲和力显著高于 3005Hz6（约提升 35.7 倍），且亲和力高于对照抗体 BI-V2（约提高 2.8 倍），抗体 2028 与 HSA 的亲和力高于 3005Hz6（约提升 3.7 倍）。

以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于上述实施方式中的具体细节，在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，这些简单变型均属于本发明的保护范围。
另外需要说明的是，在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征，在不矛盾的情况下，可以通过任何合适的方式进行组合，为了避免不必要的重复，本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

# 权 利 要 求 书

1、一种抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3；其中，

CDR-H1 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：1 或 58，或与 SEQ ID NO：1 或 58 所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H2 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：3-4、6、40 中的任一种或与 SEQ ID NO：3-4、6、40 中的任一种所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列；

CDR-H3 的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：7-8、59 中的任一种或与 SEQ ID NO：7-8、59 中的任一种所示氨基酸序列具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

2、根据权利要求 1 所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的 SEQ ID NO：58（$X_1$YYMS）中的 $X_1$ 代表 N 或 E，分别为 SEQ ID NO：2 或 49；

所述的 SEQ ID NO：40（GISV$X_2X_3X_4X_5$LDYADAV$X_6$G）中的 $X_2X_3$ 代表 DS、DA、EG、DM 或 DG，$X_4X_5$ 代表 SF 或 WY，$X_6$ 代表 K、A、R 或 H；优选的，

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：5）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DA，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：20）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DS、$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：21）；

所述 $X_2X_3$ 代表 EG、$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：22）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 A（SEQ ID NO：31）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 R（SEQ ID NO：32）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 H（SEQ ID NO：33）；

所述 $X_2X_3$ 代表 DG，$X_4X_5$ 代表 WY，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：50）；或者，

所述 $X_2X_3$ 代表 DM，$X_4X_5$ 代表 SF，$X_6$ 代表 K（SEQ ID NO：51）；

或者，

所述的 SEQ ID NO：59（ASGPX$_7$X$_8$LRX$_9$X$_{10}$AP）中的 $X_7X_8$ 代表 QG、IW、LW 或 VG，$X_9X_{10}$ 代表 LG 或 WW，优选的，

所述 $X_7X_8$ 代表 QG，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：9）；

所述 $X_7X_8$ 代表 IW，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：52）；

所述 $X_7X_8$ 代表 LW，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：53）；

所述 $X_7X_8$ 代表 QG，$X_9X_{10}$ 代表 WW（SEQ ID NO：54）；或者，

所述 $X_7X_8$ 代表 VG，$X_9X_{10}$ 代表 LG（SEQ ID NO：55）。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的 CDR-H1、CDR-H2 和 CDR-H3 的氨基酸序列包含下列任一组：

A）SEQ ID NO：1、3、7；

B）SEQ ID NO：1、4、8；

C）SEQ ID NO：2、5、9；

D）SEQ ID NO：2、6、9；

E）SEQ ID NO：2、20、9；

F）SEQ ID NO：2、21、9；

G）SEQ ID NO：2、22、9；

H）SEQ ID NO：2、31、9；

I）SEQ ID NO：2、32、9；

J）SEQ ID NO：2、33、9；

K）SEQ ID NO：2、5、52；

L）SEQ ID NO：2、50、53；

M）SEQ ID NO：49、5、53；

N）SEQ ID NO：49、5、54；

O）SEQ ID NO：2、51、55。

4、根据权利要求 1-3 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包括人源化序列，所述的人源化序列的改造位点位于非 CDR 区，优选的，所述的人源化序列的改造位点位于抗体的框架区和/或恒定区。

5、根据权利要求 1-4 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段包括纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体或线性抗体。

6、根据权利要求 1-5 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列包含 SEQ ID NO：10-13、16-19、23-25、34-36、44-48 中的任一氨基酸序列，或与 SEQ ID NO：10-13、16-19、23-25、34-36、44-48 中的任一氨基酸序列具有至少 80%同一性。

7、一种权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的应用，其特征在于，所述应用包括：

A 在制备融合构建体中的应用，所述融合构建体包括权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和生物活性效应分子，所述的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接；

B 在筛选生物活性效应分子中的应用，将候选的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接，检测候选的生物活性效应分子的生物活性；或者，

C 在检测白蛋白中的应用。

8、一种融合构建体，其特征在于，所述的融合构建体包含一个或者多个权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或生物活性效应分子，所述的生物活性效应分子与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段连接，优选的，所述融合构建体包括多个抗白蛋白抗体或其抗原结合片段，所述多个可以是相同或者不同的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段；所述生物活性效应分子可以是一个或多个，所述多个可以是相同或者不同的生物活性效应分子。

9、根据权利要求 8 所述的融合构建体，其特征在于，所述的生物活性效应分子包括但不仅限于小分子化合物或者大分子化合物，优选的，所述的小分子化合物包括但不仅限于任意的小分子药物，所述大分子化合物包括但不仅限于抗体、激活或抑制受体、蛋白的配体、生物活性酶、核酸药物、或其组合，

更优选的，所述的大分子化合物中的抗体包括其他靶点的抗体或其抗原结合片段，所述其他靶点是不同于白蛋白的靶点；

更优选的，所述的其他靶点的抗体或其抗原结合片段的结构为纳米抗体、嵌合抗体、Fab 片段、Fab'片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、F(ab')2 片段、单链抗体或线性抗体中的一种或两种以上的组合。

10、根据权利要求 9 所述的融合构建体，其特征在于，所述的其他靶点选自 VEGFA、VEGFB、VEGFR、FGF、

FGFR、PlGF、PDGF、TGF、Integrin、Integrin 受体、白细胞介素（如 IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23 等）、白细胞介素受体（如 IL1R1、IL2Rα、IL3R、IL4Rα、IL10R、IL12R、IL15Rα、IL17R、IL23R 等）、PCSK9、TNF-α、TNFR、RANKL、GPCR、GLP1R、CD3、CD105、CD19、CD20、CD22、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD47、CD80、CD86、CD96、CD99、CD111、CD112、CD123、CD133、CD138、CD155、CD171、Claudin 18.2、OX40、ICOS、CTLA4、4-1BB、TCR、BTLA、TIM-3、LAG3、Galectin-9、PD-L1、PD-L2、PD-1、TIGIT、EGFR、Her2、PSCA、CEA、FAP、EGFRVIII、BCMA、PSMA、CA125、EphA2、C-met、L1CAM、CS1、ROR1、重组结核杆菌融合蛋白、NY-ESO-1、MUC1、MUC16、mesothelin、LewisY、GPC3、GD2、EPG、DLL 3 或 5T4。

11、根据权利要求 10 所述的融合构建体，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段与生物活性效应分子之间直接连接或间接连接，优选的，所述的间接连接可以为通过接头、功能结构域和/或用于偶联的连接子连接；

其中，所述的接头选自连接肽、寡肽、寡肽聚合物、多肽、多肽聚合物、PEG、核酸、多糖、脂肪链、生物素、链霉亲和素或亲和素；

所述的功能结构域为 Fc 片段、血清白蛋白、细胞因子、转铁蛋白、支架蛋白中的一种或两种以上的组合；

所述的用于偶联的连接子包括功能团连接子，优选的，所述的功能团连接子包括巯基、氨基、羟基和/或羧基反应活性基团，

更优选的，所述的生物活性效应分子直接或者间接连接在所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段的 N 端、C 端和/或内部残基上。

12、一种核酸，其特征在于，所述的核酸编码权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或编码权利要求 8-11 任一所述的融合构建体。

13、根据权利要求 12 所述的核酸，其特征在于，所述的核酸还包含 SEQ ID NO：63-75、79-81、83-87 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：63-75、79-81、83-87 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码抗白蛋白抗体或其抗原结合片段功能的核苷酸序列。

14、根据权利要求 12-13 任一所述的核酸，其特征在于，所述的核酸包含 SEQ ID NO：76-78、82 中的任一核苷酸序列或其简并序列，或与 SEQ ID NO：76-78、82 中的任一核苷酸序列具有至少 80%同一性，并具有编码所述融合构建体功能的核苷酸序列。

15、一种载体，其特征在于，所述的载体包含权利要求 12-14 任一所述的核酸。

16、一种宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞包含权利要求 12-14 任一所述的核酸或权利要求 15 所述的载体。

17、一种权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或权利要求 8-11 任一所述的融合构建体的制备方法，其特征在于，所述的制备方法包括培养权利要求 16 所述的宿主细胞，表达所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段或所述的融合构建体。

18、一种权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段、权利要求 8-11 任一所述的融合构建体、权利要求 12-14 任一所述的核酸、权利要求 15 所述的载体或权利要求 16 所述的宿主细胞在制备治疗和/或诊断疾病的产品中的应用，其特征在于，所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或所述的生物活性效应分子具有治疗和/或诊断疾病的活性，优选的，所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段作为治疗和/或诊断疾病的产品中的载体。

19、一种治疗和/或诊断疾病的产品，其特征在于，所述的治疗和/或诊断疾病的产品包含下列任一种：

A）权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段；

B）权利要求 8-11 任一所述的融合构建体；

C）权利要求 12-14 任一所述的的核酸；

D）权利要求 15 所述的载体；或，

F）权利要求 16 所述的宿主细胞，

所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段和/或所述的生物活性效应分子具有治疗和/或诊断疾病的活性，

优选的，所述抗白蛋白抗体或其抗原结合片段作为治疗和/或诊断疾病的产品中的载体，

更优选的，所述生物活性效应分子为药物，所述的药物与所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段共价结合。

20、一种白蛋白的检测方法，其特征在于，所述的检测方法包括将待检样品与权利要求 1-6 任一所述的抗白蛋白抗体或其抗原结合片段接触，然后检测白蛋白与抗白蛋白抗体或其抗原结合片段形成的复合物含量，优选的，所述的白蛋白来自哺乳动物，更为优选的，所述的哺乳动物来自人、鼠或者猴。