



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103619353 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201280031902. 0

(22) 申请日 2012. 06. 01

(30) 优先权数据

61/492, 617 2011. 06. 02 US

61/498, 266 2011. 06. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/040409 2012. 06. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/167039 EN 2012. 12. 06

(73) 专利权人 戴埃克斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·J·塞克斯顿 C·汤乎尔

M·维斯瓦纳坦

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

C07H 21/04(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009324614 A1, 2009. 12. 31,

US 2009123479 A1, 2009. 05. 14,

US 2009324614 A1, 2009. 12. 31,

审查员 张艳青

权利要求书2页 说明书42页

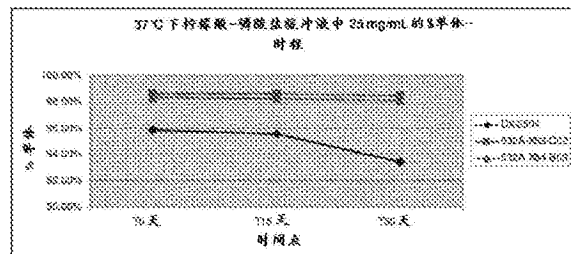
序列表28页 附图13页

(54) 发明名称

Fc 受体结合蛋白

(57) 摘要

本公开涉及结合 FcRn 的抗体和使用这些抗体的方法。



1. 一种分离的抗体,所述分离的抗体包含轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H), 其中所述抗体与人 FcRn 结合 ;且其中

所述 V_L 包含 :

- (i) TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14) 所示的 V_L CDR1 ;
 - (ii) GDSQRPS (SEQ ID NO:15) 所示的 V_L CDR2 ;和
 - (iii) SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13) 所示的 V_L CDR3 ;和
- 所述 V_H 包含 :

- (i) EYAMG (SEQ ID NO:22) 所示的 V_H CDR1 ;
- (ii) SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23) 所示的 V_H CDR2 ;和
- (iii) LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 所示的 V_H CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体,其中所述分离的抗体的所述 V_L 由 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 所述的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求 1 所述的分离的抗体,其中所述分离的抗体的所述 V_H 由 SEQ ID NO:9 所述的氨基酸序列组成。

4. 一种分离的抗体,所述分离的抗体包含轻链可变区 (V_L)、重链可变区 (V_H), 和重链恒定区 (C_H), 其中所述抗体与人 FcRn 结合 ;和其中

所述 V_L 包含 :

- (i) TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14) 所示的 V_L CDR1 ;
- (ii) GDSQRPS (SEQ ID NO:15) 所示的 V_L CDR2 ;和
- (iii) CSYAGSGIYV (SEQ ID NO:25)、SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13) 所示的 V_L CDR3 ;和

所述 V_H 包含 :

- (i) EYAMG (SEQ ID NO:22) 所示的 V_H CDR1 ;
- (ii) SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23) 所示的 V_H CDR2 ;和
- (iii) LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 所示的 V_H CDR3 ;和

所述 C_H 在与 SEQ ID NO:17 的最后位置的 C- 末端赖氨酸残基对应处具有缺失。

5. 根据权利要求 4 所述的分离的抗体,其中所述分离的抗体的所述 V_L 由 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 所述的氨基酸序列组成。

6. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求 1 或 4 所述的抗体和药学上可接受的载体。

7. 一种分离的核酸,所述分离的核酸由编码权利要求 1 或 4 所述的抗体的核苷酸序列组成。

8. 一种载体,所述载体包含权利要求 7 所述的核酸。

9. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 8 所述的载体。

10. 一种在样品中检测 FcRn 的体外方法,所述方法包括 :

将所述样品与权利要求 1 或 4 所述的抗体相接触,和
若存在所述 FcRn,检测所述抗体和所述 FcRn 之间的相互作用。

11. 根据权利要求 1 或 4 所述的抗体在制造用于在受试者中检测 FcRn 的诊断试剂中的用途。

12. 权利要求 1 或 4 所述的抗体在制造用于调节 FcRn 活性的药物中的用途。
13. 权利要求 1 或 4 所述的抗体在制造用于在受试者中治疗免疫病症的药物中的用途。
14. 权利要求 1 或 4 所述的抗体在制造用于在受试者中调节循环 IgG 的半衰期 / 水平的药物中的用途。
15. 一种在样品中检测人 FcRn 的方法,所述方法包括:
将所述样品与权利要求 1 或 4 所述的抗体相接触,其中根据权利要求 1 或 4 所述的抗体以小于 10nM 的解离常数 (K_D) 结合样品中的人 FcRn,
检测权利要求 1 或 4 所述的抗体和所述 FcRn 之间的相互作用。
16. 根据权利要求 1 或 4 所述的抗体,其中所述抗体是人类抗体或人源化的抗体或在人类中是非免疫原性的。
17. 根据权利要求 1 或 4 所述的抗体,其中所述抗体是嵌合的。
18. 根据权利要求 1 或 4 所述的抗体,其中所述抗体选自由 Fab、F(ab)' 2、Fv 和 scFv 组成的组。

Fc 受体结合蛋白

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119 要求 2011 年 6 月 2 日提交的美国临时申请 No. 61/492, 617 和 2011 年 6 月 17 日提交的美国临时申请 No. 61/498, 266 的优先权。两篇临时申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明的领域涉及结合 Fc 受体的蛋白。

[0004] 发明背景

[0005] 血清中最丰富的抗体同种型是 IgG, 并且它在介导对病原体的保护以及介导加速免疫系统组分向组织、粘膜和真皮表面的募集的过敏和炎症反应中具有关键作用 (Junghans, Immunologic Research 16(1):29(1997))。此外, 它也是多种自身免疫性疾病的关键组分。在正常条件下, IgG 在血清中的半衰期范围为小鼠内 5 至 7 天和人体内 22 至 23 天, 这相对于其它血浆蛋白的血清半衰期而言是较长的时间。在某种程度上, 这发生是因为新生儿 FcRn 受体 (FcRn) 从降解的溶酶体中援救出被胞饮的 IgG 并且将其再循环回到细胞外室 (Junghans 和 Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512(1996), Roopenian 等, J. Immunology 170:3528(2003))。

[0006] FcRn 结合 IgG 的 Fc 部分。IgG 的 Fc 区域和 FcRn 之间的相互作用是 pH 依赖性的。通过液相内吞作用进入细胞后, IgG 被封存到胞内体中, 并在酸性 pH (6 ~ 6.5) 下以高亲和力结合 FcRn; 当 IgG-FcRn 复合物循环到质膜上, 在微碱性 pH (~ 7.4) 下在血流中 IgG 与 FcRn 迅速解离。通过这种受体介导的再循环机制, FcRn 从降解的溶酶体中有效援救出 IgG, 从而延长了循环 IgG 的半衰期。

[0007] FcRn 是非共价的异源二聚体, 其通常位于内皮细胞和上皮细胞的胞内体中。它是单跨膜的膜结合受体, 具有三个重链 α 结构域 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$) 和一个单一的可溶性轻链 $\beta 2$ - 微球蛋白 ($\beta 2M$) 结构域。在结构上, 它属于具有 $\beta 2M$ 作为共同轻链的主要组织相容性复合物 1 类分子家族。FcRn α 链是由包含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 重链结构域的细胞外结构域、跨膜区域和相对短的胞质尾区组成的 46kD 蛋白 (Burmeister 等, Nature 372:366(1994))。

[0008] FcRn 首次在新生大鼠肠道中鉴定出, FcRn 在其中起作用以介导从母乳中对 IgG 抗体的吸收, 并且促进其运输到循环系统 (Leach 等, J Immunol 157:3317(1996))。FcRn 也已从人胎盘中分离, 其中 FcRn 也介导母体 IgG 吸收和运输到胎循环。在成人中, FcRn 在包括肺上皮组织、小肠、肾, 以及鼻、阴道和胆道发辫表面 (biliary tress surfaces) 的许多组织中表达 (美国专利第 6, 030, 613 号和第 6, 086, 875 号; Israel 等, Immunology 92:69(1997); Kobayashi 等, Am J Physiol (2002); Renal Physiol 282:F358(2002))。

[0009] 为了研究 FcRn 对 IgG 动态平衡的贡献, 已将小鼠工程改造为使得编码 $\beta 2M$ 和 FcRn 重链的基因的至少部分已被“敲除”, 以便不表达这些蛋白 (W002/43658; Junghans 和 Anderson, Proc Natl Acad Sci US 93:5512(1996))。在这些小鼠中, IgG 的血清半衰期和浓

度急剧降低,这表明 IgG 动态平衡的 FcRn 依赖性机制。

[0010] 还表明,抗-人 FcRn 抗体可以在这些 FcRn 敲除小鼠中产生,并且这些抗体可以阻止 IgG 与 FcRn 结合。然而,这样的抗体还未产生或未经测试 (W002/43658)。

[0011] 对 IgG 与 FcRn 结合的抑制通过阻止 IgG 再循环而负面地改变了 IgG 的血清半衰期。已证实此原理在自身免疫性皮肤大疱疾病的小鼠模型中治疗上有效 (Li 等, J Clin Invest 115:3440-3450 (2005))。因此,阻断或拮抗 IgG 与 FcRn 结合的试剂可以用于治疗或阻止以存在不当调节的 IgG 抗体为特征的自身免疫和炎性疾病或病症。在大鼠被动模型中,在 30mg/kg 剂量下,拮抗性抗-大鼠 FcRn 单克隆抗体 (mAb) 1G3 以成功阻止了实验性自身免疫性重症肌无力 (EAMG);该剂量比用于治疗 MG、SLE 和 ITP 的静脉内 IgG (IVIG) 低约 100 倍。另外,发生如红斑狼疮或关节炎的自身免疫病症有遗传性倾向的 FcRn-缺陷性小鼠在疾病的严重性上显著降低。

[0012] 发明概述

[0013] 本公开提供了结合人 Fc 受体的分离的抗体、编码这些抗体的核酸以及使用这些抗体以检测 FcRn 的存在、调节 Fc 受体活性和治疗自身免疫病症的方法。

[0014] 因此,本公开的一个方面的特征是与 FcRn 结合的分离的抗体。这种抗-FcRn 抗体包含轻链可变区 (V_L),该区包含 V_L CDR1、 V_L CDR2 和 V_L CDR3 区,其中 V_L CDR3 区与 SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13) 的 V_L CDR3 区具有至少 85% (例如 90% 或 95%) 的同源性。任选地,抗-FcRn 抗体的 V_L CDR1 和 V_L CDR2 分别与 V_L CDR1 区 TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14) 和 V_L CDR2 区 GDSQRPS (SEQ ID NO:15) 具有至少 85% (例如 90% 或 95%) 的同源性。抗-FcRn 抗体在至少一个 CDR3 区,例如 V_L CDR3 区中至少一个的第一位上不具有半胱氨酸。

[0015] 在一些实施方案中,上述抗-FcRn 抗体包含与 TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14) 具有至少 90% 同源性的 V_L CDR1、与 GDSQRPS (SEQ ID NO:15) 具有至少 90% 同源性的 V_L CDR2,和 / 或与 SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13) 具有至少 90% 同源性的 V_L CDR3。在一个实施例中,抗-FcRn 抗体包含 V_L CDR1 区 TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14)、 V_L CDR2 区 GDSQRPS (SEQ ID NO:15),和 / 或 V_L CDR3 区 SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13)。

[0016] 在其它实施方案中,本文公开的分离的抗-FcRn 抗体包含 V_L ,该 V_L 包含与 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 具有至少 85% (例如至少 90%、95% 或 98%) 同源性的氨基酸序列。在一个实施例中,分离的抗体的 V_L 包含 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0017] 本公开的另一个方面的特征是分离的抗-FcRn 抗体,这种抗体包含轻链可变区 (V_L),该区包含 V_L CDR1、 V_L CDR2 和 V_L CDR3 区,其中 V_L CDR3 区与下列序列 SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13) 相比具有多达 3 个氨基酸替换,并且其中分离的抗体在至少一个 CDR3 区,例如 V_L CDR3 区中至少一个的第一位上不具有半胱氨酸。任选地,与下列序列相比,抗-FcRn 抗体的 V_L CDR1 和 V_L CDR2 和 V_L CDR3 总共包含多达 10 个氨基酸替换

[0018] (a) CDR1: TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14)

[0019] (b) CDR2: GDSQRPS (SEQ ID NO:15)

[0020] (c) CDR3: SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13)。

[0021] 上述抗-FcRn 抗体中的任一个可进一步包含重链可变区 (V_H), 该区包含 V_H CDR1、 V_H CDR2 和 V_H CDR3 区, 其中 V_H CDR3 与 LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 具有至少 85% (例如 90% 或 95%) 的同源性。任选地, 抗-FcRn 抗体的 V_H CDR1 和 V_H CDR2 分别与 EYAMG (SEQ ID NO:22) 和 SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23) 具有至少 85% (例如 90% 或 95%) 的同源性。

[0022] 在一些实施方案中, 抗-FcRn 抗体包含与 EYAMG (SEQ ID NO:22) 具有至少 90% 同源性的 V_H CDR1、与 SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23) 具有至少 90% 同源性的 V_H CDR2, 和 / 或与 LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 具有至少 90% 同源性的 V_H CDR3。在一个实施例中, 抗-FcRn 抗体包含 V_H CDR1 区 EYAMG (SEQ ID NO:22)、 V_H CDR2 区 SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23), 和 / 或 V_H CDR3 区 LAIGDSY (SEQ ID NO:24)。

[0023] 在其它实施方案中, 本文公开的抗-FcRn 抗体包含 V_H , 该 V_H 与 SEQ ID NO:9 具有至少 85% (例如至少 90%、95% 或 98%) 的序列同一性。在一个实施例中, 分离的抗体的 V_H 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列。

[0024] 在另一个方面, 本公开提供了包含重链的分离的抗-FcRn 抗体, 该重链包含重链可变区 (V_H) 和重链恒定区, 其中 V_H 包含与 LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 具有至少 85% (例如至少 90% 或 95%) 的同源性的 CDR3 区, 且恒定区在与 SEQ ID NO:17 的 C-末端赖氨酸残基对应的位置上具有缺失。在一些实施例中, 这种抗-FcRn 抗体的重链可变区进一步包含 V_H CDR1 和 V_H CDR2, 二者分别与 EYAMG (SEQ ID NO:22) 和 SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:23) 具有至少 85% (例如至少 90% 或 95%) 的同源性。在其它实施例中, 抗-FcRn 抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列。

[0025] 上述抗-FcRn 抗体可进一步包含轻链可变区 (V_L), 该区包含与 DX-2504 (CSYAGSGIYV; SEQ ID NO:25) 具有至少 85% (例如至少 90% 或 95%) 同一性的 V_L CDR3, 并且任选地, V_L CDR1 与 TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14) 具有至少 85% (例如至少 90% 或 95%) 的同一性, 且 V_L CDR2 与 GDSQRPS (SEQ ID NO:15) 具有至少 85% (例如至少 90% 或 95%) 的同一性。在一个实施例中, 抗-FcRn 抗体包含 V_L CDR1 区 TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:14)、 V_L CDR2 区 GDSQRPS (SEQ ID NO:15), 和 / 或 V_L CDR3 区 CSYAGSGIYV (SEQ ID NO:25)、SSYAGSGIYV (SEQ ID NO:12) 或 ASYAGSGIYV (SEQ ID NO:13)。在另一个实施例中, 抗-FcRn 抗体的 V_L 包含 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。

[0026] 上述抗-FcRn 抗体中的任一个可结合人 FcRn, 解离常数 (K_D) 小于 10nM。本公开提供的抗-FcRn 抗体可以是人或人源化抗体, 或在人体内具有非免疫原性。例如, 它们可以包含人抗体框架区。可选地, 抗-FcRn 抗体可以是鼠抗体。在其它实施例中, 它们可以是嵌合抗体。

[0027] 在一些实施方案中, 本文提供的抗-FcRn 抗体是全长抗体 (包含 Fc 结构域)。可选地, 它们可以是抗原结合片段例如 Fab、F(ab)'₂、Fv 或 ScFv。需要时, 抗-FcRn 抗体是单克隆抗体。

[0028] 本文还公开了: (i) 药物组合物, 其包含本文描述的任何抗体和药学上可接受的载体, (ii) 分离的核酸, 其包含编码本文提供的任何抗体的序列, (iii) 载体, 其包含任何核酸, 所述核酸包含编码本文提供的任何抗体的序列, 和 (iv) 宿主细胞, 其包含载体, 所述载体包含任何核酸, 所述核酸包含编码本文提供的任何抗体的序列。

[0029] 本文描述的任何抗-FcRn 抗体可以用来在体内或体外检测 FcRn 的存在或者调节

FcRn 的活性。

[0030] 一方面,本文提供的是检测样品中 FcRn 的方法,该方法包括:使抗体与本文提供的任何抗体接触,且如果存在,则检测抗体和 FcRn 之间的相互作用。

[0031] 另一方面,本公开提供了检测受试者中 FcRn 的方法,该方法包括:向受试者施用本文提供的任何抗体,所述抗体可与可检测的分子例如成像标记物(荧光或放射性)共轭,且如果存在,则检测抗体和 FcRn 之间的相互作用。

[0032] 另一方面,本公开提供了调节 FcRn 活性的方法,该方法包括:使 FcRn 与本文提供的任何抗体接触从而调节 FcRn 活性。

[0033] 一方面,本发明提供了治疗自身免疫病症或调节受试者中循环 IgG 的半衰期/水平的方法。该方法包括:向受试者施用可有效治疗自身免疫病症或调节受试者中循环 IgG 的半衰期/水平的量的本文提供的任何抗体。

[0034] 本公开的范围内还包括 (a) 药物组合物,其用以调节 FcRn 活性、调节循环 IgG 的半衰期/水平,和/或治疗有此需要的受试者的自身免疫病症,其中所述药物组合物各包含一种或多种本文描述的抗-FcRn 抗体和药学上可接受的载体,(b) 本文描述的任何抗-FcRn 抗体针对任何刚提到的目的的用途,和 (c) 所述任何抗-FcRn 抗体在制备用于调节受试者(例如人患者)中 FcRn 活性、调节循环 IgG 的半衰期/水平,和/或治疗自身免疫病症的药剂中的用途。

[0035] 在下文更详细地描述本发明的这些和其它方面以及实施方案。

[0036] 本发明的每个限制可涵盖本发明的各种实施方案。因此,预期本发明的每个方面可包括涉及任何一个元素或元素组合的本发明的每个限制。本发明没有限制其应用于在下面描述中提出的或在下图中阐述的组分的构造和安排的细节。本发明能够具有其它实施方案,并且可以各种方式进行实践和实施。另外,本文使用的措辞和术语用于描述目的,而不应该被视为限制。本文使用的“包括”、“包含”,或“具有”、“含有”、“涉及”和其变化,意在涵盖后面所列的项目和其等同物以及另外的项目。

[0037] 附图简述

[0038] 图仅是阐述性的,且对本公开的发明的实施不是所必需的。

[0039] 图 1 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 的尺寸排阻色谱 (SEC) 分析;

[0040] 图 2 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 的 SDS-PAGE 分析;

[0041] 图 3 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 的温度稳定性;

[0042] 图 4 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 的 pH 稳定性;

[0043] 图 5 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 在 pH8.3 时的稳定性;

[0044] 图 6 显示 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 的对化学变性的稳定性;

[0045] 图 7 显示 pH6 时 hFcRn 与固定的 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 之间的相互作用的动力学分析;

[0046] 图 8 显示 pH7.5 时 hFcRn 与固定的 DX-2504、532A-X53-C02 和 532A-X54-B03 之间的相互作用的动力学分析;

[0047] 图 9 显示 DX2504 (SEQ ID NO:8)、532A-X53-C02 (SEQ ID NO:10) 和 532A-X54-B03 (SEQ ID NO:11) 的序列。

[0048] 图 10 显示抗-hFcRn H-CDR3 对 Fab-310 的长度分布。

[0049] 图 11 显示表征所选抗 -FcRn 结合蛋白的一些特性的两个图表。

[0050] 图 12 显示 TG32B 小鼠中抗 -FcRn 抗体对 hIgG 分解代谢的影响。

[0051] 图 13 显示施用于猕猴的 DX-2504 和 DX-2507 的血清浓度。

[0052] 图 14 显示施用 DX-2504 和 DX-2507 后猕猴中 IgG 的水平。

[0053] 发明详述

[0054] 本文公开的是能结合人 FcRn 的分离的抗体和其在检测 FcRn 存在、调节 FcRn 活性、调节循环 IgGs 的半衰期 / 水平, 和 / 或治疗与 IgG 异常有关的病症, 例如自身免疫病症 (例如多发性硬化、类风湿性关节炎、狼疮、免疫性血小板减少症、强直性脊柱炎和天疱疮) 和炎性病症例如炎症性肠病中的用途。优选地, 这些抗 -FcRn 抗体可以 (a) 阻断非特异性人 IgG/Fc 部分与 FcRn-Fc 相互作用位点的结合; (b) 结合人和大鼠 FcRn (可溶性和细胞); (c) pH6 时结合 FcRn 和 / 或 (d) 不仅仅结合 β 2M。

[0055] 在正常情况下, FcRn 可延长循环 IgG 的半衰期。结合 FcRn 的抗体可用于调节 FcRn 功能, 例如通过阻止其与 IgG 的相互作用。具体而言, 阻断 FcRn 和 IgG 相互作用的抗体可用于减少 IgG 分子的半衰期。

[0056] 一方面, 本公开尤其提供了可用于治疗自身免疫病症并减少循环 IgG 水平的人拮抗性抗 - 人 FcRn 抗体。还公开了高亲和力的可溶性 Fabs (sFab), 其可通过抗原结合结构域进行结合并阻断 IgG-Fc 和人 FcRn 或大鼠 FcRn 之间的相互作用。

[0057] 定义

[0058] 术语“结合蛋白”是指可与靶分子相互作用的蛋白。该术语和“配体”可互换使用。“FcRn- 结合蛋白”或“FcRn- 结合配体”是指可与 FcRn 相互作用的蛋白, 具体而言包括优先和 FcRn 例如 IgG 相互作用的蛋白。

[0059] 如本文所用, 术语“抗体”是指包括至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白。例如, 抗体可包括重 (H) 链可变区 (本文缩写成 V_H) 和轻 (L) 链可变区 (本文缩写成 V_L)。在另一个实施例中, 抗体包括两个重 (H) 链可变区和两个轻 (L) 链可变区。术语“抗体”涵盖抗体的抗原 - 结合片段 (例如单一的链抗体 Fab 和 sFab 片段、 $F(ab')_2$ 、Fd 片段、Fv 片段、scFv 和 dAb 片段) 以及完全抗体 (全长抗体)。

[0060] V_H 和 V_L 区能进一步被细分成高度可变区, 称为“互补性决定区” (“CDR”), 穿插有更保守的区域, 称为“骨架区” (“FR”)。已经精确定义了框架区和 CDR 的范围 (参见 Kabat, E. A., 等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 和 Chothia, C. 等, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, 也参见 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>)。本文采用 Kabat 定义。每个 V_H 和 V_L 通常由三个 CDR 和四个 FR 组成, 从氨基端至羧基端以下列顺序 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 排列。

[0061] 如本文所用, 术语全长抗体的“抗原 - 结合片段” (或者简单讲“抗体部分”, 或“片段”) 是指保留了特异性结合目标靶的能力的全长抗体的一个或多个片段。涵盖在术语全长抗体的“抗原 - 结合片段”之内的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的一价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 包括在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由 V_H 和 C_H1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段; (v) 由 V_H 结构域组成的 dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341:544-546); 和

(vi) 分离的保留功能性的互补性决定区 (CDR)。此外,虽然 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由单独基因编码,但是可以用重组方法通过合成的接头连接它们,该接头能够使它们成为单一蛋白链,其中 V_L 和 V_H 区配对形成称为单链 Fv 的单价分子 (scFv)。参见 Bird 等, (1988) Science 242:423-426 ;和 Huston 等, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

[0062] 可用包括本领域的技术人员已知的传统技术的任何适当的技术来获得抗体片段。术语“单特异性抗体”是指对特定靶例如表位显示单一的结合特异性和亲和力的抗体。本术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,如本文所用,该术语是指制备单分子组合物的抗体或其片段。如本文所用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如 IgM 或 IgG1)。

[0063] 如本文所用,“结合亲和力”是指表观缔合常数或 K_a 。 K_a 是解离常数 (K_d) 的倒数。例如结合蛋白对特定靶分子可具有至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 和 10^{11} M 的结合亲和力。相对于第二靶标,结合配体与第一靶标的更高的亲和结合可通过比结合第二靶标的 K_a (或更小数值的 K_d) 更高的结合第一靶标的 K_a (或 K_d 的数值) 来显示。在这些情况下,相对于第二靶标(例如第二构象或其类似物的相同蛋白;或第二蛋白),结合蛋白对第一靶标有特异性(例如第一构象或其类似物的蛋白)。结合亲和力的差异(例如对特异性或其它比较)至少是 1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、1000 或 10^5 倍。

[0064] 可以通过各种方法,包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子体共振或光谱学(例如使用荧光测定)确定结合亲和力。测定结合亲和力的示例性条件是在 pH7.2 的 30°C 的 PBS (磷酸盐缓冲的生理盐水) 中。这些技术可以用来测量起结合蛋白(或靶标)浓度功能的结合的和游离的结合蛋白的浓度。通过下列等式,结合的结合蛋白的浓度 ([结合]) 与游离的结合蛋白的浓度 ([游离]) 和靶标上用于结合蛋白的结合位点的浓度有关,其中 (N) 是每个靶向分子的结合位点数:

[0065] $[结合] = N \cdot [游离] / ((1/K_a) + [游离])$ 。

[0066] 尽管并不总是有必要精确确定 K_a , 因为有时足够获得亲和力的定量测量,例如使用如 ELISA 或 FACS 分析的方法来确定,与 K_a 成比例,因此可以用于比较,比如确定是否如 2 倍高的更高的亲和力以获得亲和力的定量测量,或者例如通过如体外或体内测定的功能测定的活性以获得对亲和力的推断。

[0067] 术语“同源配体”是指天然存在的 FcRn 配体,包括其天然存在的变异体(例如剪接变体、天然存在的突变体和亚型)。

[0068] “保守性氨基酸替换”是指氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代。本领域定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。很多框架和 CDR 氨基酸残基可包括一个或多个保守性替换。

[0069] 生物聚合物的共有序列可包括在各种氨基酸之间发生变化的位置。例如在这样的上下文中符号“X”通常是指任何氨基酸(例如任何二十种天然氨基酸或任何十九种非-半胱氨酸氨基酸)。其它允许的氨基酸也可用例如括号和斜杠来表明。例如“(A/W/F/N/Q)”

意指丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺在那个特别的位置也被允许。

[0070] “有效人”免疫球蛋白可变区是包括足够数量的人框架氨基酸位置以致在正常人中免疫球蛋白可变区不产生免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“有效人”抗体是包括足够数量的人氨基酸位置以致在正常人中抗体不产生免疫原性反应的抗体。

[0071] “表位”是指目标化合物上被结合蛋白结合（例如抗体如 Fab 或全长抗体）的位点。在目标化合物是蛋白的情况下，该位点可完全由氨基酸组分组成，可完全由蛋白的氨基酸的化学修饰组成（例如糖基部分），或由其组合组成。重叠表位包括至少一种常见的氨基酸残基。

[0072] 两个序列之间“同源性”或“序列同一性”（本文术语可互换使用）的计算如下进行。为了最佳的比较目的比对序列（例如为了最佳比对，可在第一和第二氨基酸或核酸序列的一个或两个中引入空位，且非同源序列可以不考虑比较目的）。使用 GCG 软件包的 GAP 程序的 B1osum62 评分矩阵将最佳比对确定为最佳分数，空位罚 12 分，空位延伸罚 4 分且移码空位罚 5 分。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当与第二个序列相应的位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据第一个序列的位置时，然后在那个位置上分子是相同的（如本文所用，氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”）。两个序列同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数。

[0073] 在一个实施方案中，比对用于比较目的参考序列的长度是参考序列长度的至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、80%、90%、92%、95%、97%、98% 或 100%。例如，参考序列可以是免疫球蛋白可变结构域序列的长度。

[0074] “人源化”免疫球蛋白可变区是被修饰的以包括足够数量的人框架氨基酸位置以致在正常人中免疫球蛋白可变区不产生免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“人源化”免疫球蛋白的描述包括例如 US6, 407, 213 和 US5, 693, 762。

[0075] 如本文所用，术语“在低严格、中等严格、高严格或极高严格条件下杂交”描述了杂交和洗涤条件。实施杂交反应的指南可见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6, 其以引用的方式并入。该参考文献中水性的和非水性方法，且可使用任一方法。本文提到的特异性杂交条件如下：(1) 在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中在约 45°C 的低严格杂交条件下，然后用 0. 2X SSC、0. 1%SDS 在至少 50°C 下洗涤两次（低严格条件洗涤温度可增加到 55°C）；(2) 在 6X SSC 中在约 45°C 的中等严格杂交条件下，然后用 0. 2X SSC、0. 1%SDS 在 60°C 下洗涤一次或多次；(3) 在 6X SSC 中在约 45°C 的高严格杂交条件下，然后用 0. 2X SSC、0. 1%SDS 在 65°C 下洗涤一次或多次；和 (4) 极高严格杂交条件是 0. 5M 磷酸钠、7%SDS 在 65°C 下，然后用 0. 2X SSC、0. 1%SDS 在 65°C 下洗涤一次或多次。极高严格杂交条件 (4) 是优选的条件且应该使用该条件，除非另外说明。本公开包括和本文描述的核酸或其互补序列等在低、中等、高或极高严格下杂交的核酸、编码本文描述的结合蛋白的核酸。该核酸可以和引用核酸长度相同或在引用核酸长度的 30%、20%，或 10% 之内。该核酸可对应于编码免疫球蛋白可变结构域序列的区域。

[0076] 相对于本文描述的结合蛋白（例如保守或非必需氨基酸替换），FcRn 结合蛋白可以有突变（例如至少 1、2 或 4 个，和 / 或少于 15、10、5 或 3 个），对蛋白功能没有实质影响。例如使用 Bowie, 等 (1990) Science247:1306-1310 的方法，无论特殊替换耐受与否，即均不会不利地影响生物性质，例如可预测结合活性。

[0077] “免疫球蛋白结构域”是指来自免疫球蛋白分子可变或恒定结构域的结构域。免疫球蛋白结构域通常包含由约七条 β -链形成的两个 β -折叠和保守的二硫键(参见例如 A. F. Williams 和 A. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6:381-405)。

[0078] 如本文所用,“免疫球蛋白可变结构域序列”是指能形成例如一个或多个 CDR 区定位于适合抗原结合位点的构象的免疫球蛋白可变结构域结构的氨基酸序列。例如,序列可包括全部或部分天然存在的可变结构域的氨基酸序列。例如序列可省去一个、两个或多个 N- 或 C- 末端氨基酸、内部氨基酸;可包括一个或多个插入或另外的末端氨基酸;或可包括其它改变。在一个实施方案中,包括免疫球蛋白可变结构域序列的多肽可结合另一个免疫球蛋白可变结构域序列以形成目标结合结构(或“抗原结合位点”),例如优先和 FcRn 结构相互作用的结构。

[0079] 抗体的 V_H 或 V_L 链可进一步包括全部或部分重或轻链恒定区,从而分别形成重链或轻链免疫球蛋白链。在一个实施方案中,抗体是两条重免疫球蛋白链和两条轻免疫球蛋白链的四聚体,其中重和轻免疫球蛋白链之间通过例如二硫键连接。重链恒定区包括三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。轻链恒定区包括 CL 结构域。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典互补系统的第一组分(C1q)。术语“抗体”包括 IgA、IgG、IgE、IgD、IgM 型(和其亚型)完整的免疫球蛋白。免疫球蛋白的轻链类型有 κ 或 λ 。在一个实施方案中,抗体是糖基化的。抗体可对抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性起作用。

[0080] 抗体的一个或多个区可以是人的或有效人的。例如,一个或多个可变区可以是人的或有效人的。例如,一个或多个 CDR 可以是人的,如 HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 和 LC CDR3。每个轻链 CDR 可以是人的。HC CDR3 可以是人的。一个或多个框架区可以是人的,例如 HC 或 LC 的 FR1、FR2、FR3 和 FR4。在一个实施方案中,所有的框架区是人的,例如来源于人体细胞,例如,产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一个实施方案中,人序列是生殖细胞序列,例如,由生殖细胞核酸编码。一个或多个恒定区可以是人的或有效人的。在一个实施方案中,抗体的至少 70、75、80、85、90、92、95 或 98%,或全部抗体可以是人的或有效人的。

[0081] 抗体的全部或部分可由免疫球蛋白基因或其片段编码。示例性人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1 和 IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约 25KDa 或 214 个氨基酸)由 NH₂- 末端可变区基因(约 110 个氨基酸)和 COOH- 末端 κ 或 λ 恒定区基因编码。同样地,全长免疫球蛋白“重链”(约 50KDa 或 446 个氨基酸)由可变区基因(约 116 个氨基酸)和前述的恒定区基因例如 γ (约 330 个氨基酸)其中的另一个编码。

[0082] “分离的组合物”是指从能获得分离的组合物天然样品中的至少一种组分的至少 90% 移除的组合物。如果目标物种或种群按重量-重量计为至少 5、10、25、50、75、80、90、92、95、98 或 99% 纯的,则人工或天然产生的组合物可以为具有“至少一定纯度的组合物”。

[0083] 在 FcRn 或其部分的模拟构象的语境中,术语“模拟”是指相对于天然存在的 FcRn 或其部分对至少一个特定构象具有偏向的经修饰的 FcRn。

[0084] “非必需”氨基酸残基是可以改变自结合剂例如抗体的野生型序列的残基而未破

坏或未实质性改变生物学活性,然而“必需”氨基酸残基会导致这样的变化。

[0085] 如本文所用,短语“肠胃外施用”和“经胃肠外施用”意指除肠内和局部施用之外的施用模型,通常经注射,且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外的和胸骨内的注射和输注。

[0086] 术语“多肽”或“肽”(可互换使用)是指由肽键连接的三个或多个氨基酸的聚合物,例如长度介于3和30个氨基酸之间、12和60个氨基酸之间,或30和300个氨基酸之间,或超过300个氨基酸。多肽可包括一种或多种非天然氨基酸。通常多肽只包括天然氨基酸。“蛋白质”可包括一条或多条多肽链。因此术语“蛋白质”涵盖多肽。蛋白质或多肽还可包括一种或多种修饰,例如糖基化、酰胺化、磷酸化、亚硝基化,等等。术语“小肽”可用于描述长度介于3和30个氨基酸之间的多肽,例如长度介于8和24个氨基酸之间。

[0087] “预防有效量”是指有效量、剂量且有必要长期,以获得期望的预防结果。通常,因为治疗剂量用于疾病之前或者早期的受试者,预防有效量将少于治疗有效量。

[0088] 如本文所用,本文使用的术语“实质上同一的”(或“实质上同源的”)是指包含足够数量的相同的或等效的(例如有类似侧链,例如保守氨基酸替换)氨基酸残基或核苷酸的第一个氨基酸或核酸序列与第二个氨基酸或核酸序列以使第一个和第二个氨基酸核酸序列具有(或编码蛋白质具有)相似的活性,例如结合活性、结合偏好或生物学活性。就抗体而言,第二抗体相对于相同的抗原具有相同的特异性并且具有至少50%的亲合力。

[0089] 与本文公开的序列相似或同源的序列(例如,至少约85%序列同一性)也是本应用的一部分。在一些实施方案中,序列同一性可以是约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。此外,当核酸片段在所选杂交条件(例如高严格杂交条件)下与互补链杂交时,存在实质同一性。核酸可存在于全部细胞、细胞裂解物或在部分纯化或基本上纯的形式中。

[0090] 统计显著性可由任何领域已知的方法来确定。示例性统计测验包括:斯氏T检验、Mann Whitney U非参数检验和Wilcoxon非参数统计检验。一些统计显著性关系的P值小于0.05或0.02。特定结合蛋白可例如在特异性或结合方面表现出统计学显著的差异(例如P值<0.05或0.02)。例如表示两种状态间可区别的定性或定量差异的术语“诱导”、“抑制”、“加强”、“提高”、“增加”、“减少”等,可以指例如统计学显著性差异的两种状态间的差异。

[0091] 相对于未治疗的受试者,“治疗有效量”可将可测量的参数,例如循环IgG抗体的水平调节到统计上显著的程度或调节至少约20%、至少约40%、至少约60%、或至少约80%。在预测人自身免疫病症功效的动物模型系统中可以评估化合物调节可测量的参数例如自身免疫性的能力。可选地,通过检测化合物调节体外参数的能力,例如通过对有经验的从业者已知的测定来评估组合物的这种性质。

[0092] 本发明的其它特征和优点将通过下列详细描述和权利要求而变得更加明显。本发明的实施方案可包括本文描述的特征的任何组合。术语“实施方案”决不排除本文公开的一个或多个其它特征。

[0093] FcRn 序列

[0094] 下列是人FcRn α 链氨基酸序列和大鼠FcRn α 链氨基酸序列的序列比对。示例性

FcRn 蛋白可包括这两个序列之一或其片段,例如不具有信号序列的片段:

[0095]

	信号序列		α ₁ 结构域
α ₁ 人:	MGVFRPQFWALGILLFLIPGSLG		AESHLELLYNYLIYAVSOPRPQTPAFKVVGGWLGFPQQYLS
α ₁ 大鼠:	MGMSQFGV-LLSLLLVLLPQTWG		AEPRLPINYNLAAYSDLSLTGLPSPFWATGWLGAAQYLYT
		α ₂ 结构域	α ₃ 结构域
α ₂ 人:		YNSLRGEAEPCGANVWENQVSNYWENETTDLNIIEKLFLEAFKALGGE---GP	YTLQGLLG
α ₂ 大鼠:		YENLRQEADEPGAWINENQVSNYWEKETTDELSKEQLFLEAIRTLENGINRT	FTLQGLLG
		α ₄ 结构域	
α ₄ 人:		CELQPDRTSVPTARFALNGEEFMNFDLQQTWGGDWFBALAIQQRWQQQDKAANKELTYL	
α ₄ 大鼠:		CELAPDDES LPTAVFALNGEEFMRFNFRICGNWGGEPETDIVGNLWNEQPEAARKESSEFL	
	α ₅ 结构域		α ₆ 结构域
α ₅ 人:		LFSCPHPLREHLERGRGNLEWK	EPPSMPLKAPFSQPGFVLTCEAFSFPPELQLRFLRN
α ₅ 大鼠:		LTCSPERLLCHLERGRQNLEWK	ESFPMRLKARPNQSGSEVLTCAAFSFPPELKFRLRN
		α ₇ 结构域	
α ₇ 人:		GLAAGTSGGDFGPNSDOLFHASSELIVKSGDERHYCCIVQHACLAQFLVPELE	
α ₇ 大鼠:		GLAEGGQNCSTGPRGEGFHWZLLEVERGDERHYCCQVEHEGLAQPLTVDLG	
	跨膜		胞浆域
α ₈ 人:		EPAKSSVIVYGVIVIGVLLLTAAAVGCALLW	RNRSGCLPAPWICLRGDEIGVLLPTPGEAQ
α ₈ 大鼠:		EPARSSVPVVGIIIGLILVVVAIAGGVLLW	NRNRSGLEPAPWLSLEGDDSGDILLPGGNLFF
α ₈ 人:	DADLKDVNVIPATA		(SEQ ID NO:1)
α ₈ 大鼠:	EAEPOGVNAFPATS		(SEQ ID NO:2)

[0096] 下列是人 β2 微球蛋白氨基酸序列和大鼠 β2 微球蛋白氨基酸序列的序列比对。示例性 FcRn 蛋白可包括这两序列之一或其片段,例如不具有信号序列的片段:

[0097]

	信号序列		β2 微球蛋白
β2m 人:	MSRSVALAVLALLSLSGLEA		IQRTPYIQVYSRRPAENGNKSNFLRCYVSGFRPQSDIEVDLL
β2m 大鼠:	MARSVTVIFLVLVSLAVVLA		IQKTPQIQVYERHPPENGNKPRFLNRCYVSGFRPQISIELL
		β2 微球蛋白	
β2m 人:		KNGERIEKVEHSDLSFCKDWEFYLLYTFEFTPTTEKDEYACRVNHHVTLSPKHIVKWRDRM	(SEQ ID NO:3)
β2m 大鼠:		KNGKNIPRIENSDLSFCKDWEFYLLAHTEFTPTTEIDVYACRVNHHVTLNEPKIVTDRDM	(SEQ ID NO:4)

[0098] 编码 FcRn 蛋白 α 链的示例性核酸序列可包括下列序列:

[0099] FcRn α 核苷酸序列 (智人):

[0100] GTTCTTCAGGTACGAGGAGGGCATTGTTGTCAGTCTGGACCGAGCCCGCAGAGCCCCTCCTCGGCGTCC

TGGTCCCGGCCGTGCCCGCGGTGTCCCGGGAGGAAGGGGCGGGCCGGGGGTTCGGGAGGAGTCACGTGCCCCCTCCCG
 CCCCAGGTCGTCTCTCAGCATGGGGGTCCCGCGGCCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCTCTTTCTCCTTCT
 GGGAGCCTGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCTCGCTGCCCGGGGACTCC
 TGCCTTCTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCGGGGCGAGGCGGAGCCCT
 GTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAGGTGTCTGGTATTGGGAGAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAG
 CTCTTTCTGGAAGCTTTCAAAGCTTTGGGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGGGCTGTGAAGTGGG
 CCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTCATGAATTTGACCTCAAGCAGG
 GCACCTGGGGTGGGGACTGGCCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCAGGACAAGGCGGCCAACAAG
 GAGCTCACCTTCTGCTATTCTCCTGCCCGACCGCCTGCGGGAGCACCTGGAGAGGGGCCGCGAAACCTGGAGTG
 GAAGGAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCCAGCAGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCT
 CCTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTTCCTGCGGAATGGGCTGGCCGCTGGCACCAGGCGAGGGTACTTCCGGC
 CCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCTCGTCGTCCTAACAGTCAAAGTGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCAT
 TGTGCAGCACGCGGGCTGGCGCAGCCCCCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCTCCGTGCTCGTGGTGG
 GAATCGTCATCGGTGTCTTGTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGGAGCTCTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGG
 CTGCCAGCCCCCTGGATCTCCCTTCGTGGAGACGACACCGGGTCTCCTGCCACCCAGGGGAGGCCAGGATGC
 TGATTTGAAGGATGTAATGTGATTCCAGCCACCGCCTGACCATCCGCCATTCCGACTGCTAAAAGCGAATGTAGTC
 AGGCCCTTTTCATGCTGTGAGACCTCCTGGAACACTGGCATCTCTGAGCCTCCAGAAGGGTCTGGGCTAGTTGT
 CCTCCCTCTGGAGCCCCGTCCTGTGGTCTGCCTCAGTTTCCCCTCCTAATACATATGGCTGTTTTCCACCTCGATAA
 TATAACACGAGTTTGGGCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO :5)

[0101] 示例性人 FeRn (胞外域) 核酸序列加 GPI DNA 序列 (小写粗体) 在下面示出。

[0102] ATGGGGTCCCGCGCCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCTCTTTCTCCTTCTGGGAGCC
 TGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCTCGCTGCCCGGGGACTCCT
 GCCTTCTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCGGGGCGAGGCGGA
 GCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACCAGGTGTCTGGTATTGGGAGAAAGAGACCACAGATCTGAGGAT
 CAAGGAGAAGCTCTTTCTGGAAGCTTTCAAAGCTTTGGGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGC
 TGGGCTGTGAAGTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTC
 ATGAATTTGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGGTGGGGACTGGCCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTG
 GCAGCAGCAGGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCTGCTATTCTCCTGCCCGCACCCTGCGGG
 AGCACCTGGAGAGGGGCCGCGAAACCTGGAGTGAAGGAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCC
 AGCAGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTCCTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTT
 CCTGCGGAATGGGCTGGCCGCTGGCACCGGCCAGGGTACTTCCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTTCCAGC
 CCTCGTCGTCCTAACAGTCAAAGTGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCGGGGCTGG
 CGCAGCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCTCCTCC **cgcccgctcgacgggctacgagcatcagt**
aacactactaggcgagggcctactactatcactactaccagcaactactacgatttgggcatata (SEQ ID NO :6)

[0103] 编码 β-2-微球蛋白 (β 2M) 的示例性核酸序列可包括下列序列：

[0104] β-2-微球蛋白 (B2M) 核苷酸 (智人)：

[0105] AATATAAGTGGAGGCGTCGCGCTGGCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTCCGGCCGAGATGTCTCGC
 TCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT
 TTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACA

TTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAAATTGAAAAAGTGGAGCATTTCAGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGG
TCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGAC
TTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGCATCATGGAGGTTTGAAGATGCCGCATTTG
GATTGGATGAATCCAAATTCTGCTTGCTTGTCTTTTAATATTGATATGCTTATACACTTACACTTTATGCACAAAA
TGTAGGGTTATAATAATGTTAACATGGACATGATCTTCTTTATAATTCTACTTTGAGTGTCTCCATGTTTGATG
TATCTGAGCAGGTTGCTCCACAGGTAGCTCTAGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGTGGGAGCAGAGAATTCTCTTATC
CAACATCAACATCTTGGTCAGATTTGAACTCTTCAATCTCTTGCCTCAAAGCTTGTTAAGATAGTTAAGCGTGCAT
AAGTTAACTCCAATTTACATACTCTGCTTAGAATTTGGGGGAAAAATTTAGAAATATAATTGACAGGATTATTGGAA
ATTTGTTATAATGAATGAAACATTTTGTATATAAGATTCATATTTACTTCTTATACATTTGATAAAGTAAGGCAT
GGTTGTGGTTAATCTGGTTTATTTTGTCCACAAGTTAAATAAATCATAAACTTGATGTGTTATCTCTTA (SEQ
ID NO :7)

[0106] FcRn 结合抗体

[0107] DX2504 是在 W02009/131702 和 US-2009-0324614-A1 中描述的 FcRn 结合抗体。
W02009/131702 和 US-2009-0324614-A1 通过引用整体并入本应用。使用 FcRn 多肽或细
胞表达的 FcRn 作为靶标,通过结合单克隆抗体技术和噬菌体展示实验产生 DX2504。此外,
DX2504 序列的种系有较低的免疫原性。DX2504 轻链和重链的序列如下所示 :

[0108] 轻链可变区 (SEQ ID NO :8) :

[0109]

FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
QEALTPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMY	GDSQRPS
FR3-L	CDR3-L	FR4-L	
GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL	

[0110] 轻链全长 (SEQ ID NO :16 ;C_L下划线) :

[0111] SALTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKLMYGDSQRPSGVSNRFSGSKSG
NTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSGIYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0112] 重链可变区 (SEQ ID NO :9) :

[0113]

FR1-H	CDR1-H	FR2-H	CDR3-H
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	EYAMG	WVRQAPGKGLEWVS	SIGSSGGQTKYADSVK
FR3-H	CDR3-H	FR4-H	
RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	LAIGDSY	WGQGTMTVSS	

[0114] 重链全长 (SEQ ID NO :17 ;C_H下划线)

[0115] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYAMGWVRQAPGKGLEWVSSIGSSGGQTKYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLAIGDSYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
PKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0116] 除了结合 FcRn、DX2504 或前体抗体,已显示阻断 IgG-Fc 结合 FcRn 表达的细胞上(WO2009/131702 实施例 21)。此外,向 Tg32B 小鼠(其中鼠 FcRn 被人 FcRn 代替)施用 DX2504,降低了预先施用于小鼠的人 IgG 的水平(WO2009/131702 实施例 27)。而且,对猕猴施用 DX2504 导致了 IgG 血清水平的降低(WO2009/131702 实施例 27)。

[0117] 本文中意外地发现当与 DX2504 比较时,改变轻链的 CDR3(例如本文描述的半胱氨酸突变体)或 DX2504 的重链恒定区(例如本文描述的缺失突变体)导致 FcRn 结合抗体性质改善。这一发现至少在某种程度上是意外的,因为通常已经过这样多轮序列优化的抗体,例如 DX2504,不能进一步通过引入另外的突变而容易被优化。

[0118] 半胱氨酸突变体

[0119] 本文描述的 DX2504 的半胱氨酸突变体在至少一个 CDR3 的第一位缺少半胱氨酸残基,例如,DX2504 的 V_L CDR3 的第一位被另一个氨基酸残基例如丙氨酸、丝氨酸或其保守的替换而代替。示例性半胱氨酸突变体包括但不限于 532A-X53-C02(具有如 SEQ ID NO:10 示出的 V_L)和 532A-X53-B03(具有如 SEQ ID NO:11 示出的 V_L)。这样的突变保留了 FcRn-结合活性,例如以小于 10nM 的解离常数 (K_D) 结合人 FcRn,可通过常规方法来确定。在一些实施例中,半胱氨酸突变体包含两条 V_L 链,其中之一或两者在 V_L CDR3 区的第一位均不具有半胱氨酸。

[0120] 本文描述的半胱氨酸突变体可包含 V_L 链,其中 CDR1、CDR2 和 CDR3 与 DX2504 的 V_L CDR1 和 V_L CDR2(SEQ ID 分别为 NO:14 和 15;与在 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 中的同一)以及 DX2504 的改变的 V_L CDR3(SEQ ID NO:12 或 13,532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 的 V_L CDR3)具有至少 70%(例如至少 75%、80%、85%、90% 或 95%)的序列同一性。在一些实施方案中,一个或多个 V_L CDR 与对应 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 的 CDR 具有至少 70%的序列同一性。例如,半胱氨酸突变体在 V_L CDR3 区与序列 SSYAGSGIYV(SEQ ID NO:12)或 ASYAGSGIYV(SEQ ID NO:13)具有至少 70%的同源性(至少 75%、80%、85%、90% 或 95%)。

[0121] 在其它实施方案中,半胱氨酸突变体的 V_L CDR 的组合与 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 的组合具有至少 70%的序列同一性。例如在 CDR1、CDR2 和 CDR3 区与参考 CDR 序列具有至少 90%同源性的抗体是指在结合的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区每 10 个氨基酸中至少有 9 个与在 532A-X53-C02 结合的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区发现的氨基酸相同的抗体。

[0122] 可选地,与序列 SSYAGSGIYV(SEQ ID NO:12)或 ASYAGSGIYV(SEQ ID NO:13)相比,在 V_L CDR3 区抗体可有多达 1 个、多达 2 个、多达 3 个、多达 4 个或多达 5 个的氨基酸替换。在一些实施方案中,与 DX2504 的 CDR3 区相比,在 V_L CDR3 区半胱氨酸突变体可包含多达 3 个替换。一个或多个氨基酸替换可以是保守的氨基酸替换。

[0123] 而且,与 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区序列相比,在 CDR1、CDR2 和 CDR3 区半胱氨酸突变体的抗体可有多达 1 个、多达 2 个、多达 3 个、多达 4 个、多达 5 个、多达 6 个、多达 7 个、多达 8 个、多达 9 个、多达 10 个或多达 15 个氨基酸替换。在一些实施方案中,在 V_L CDR1、CDR2 和 CDR3 区它们可总共包含多达 10 个替换。在一个实施例中,一个或多个氨基酸替换是保守的氨基酸替换。

[0124] 在一些实施方案中,半胱氨酸突变体包含与 532A-X53-C02 的 V_L 序列(SEQ ID NO:10)或 532A-X53-B03 的 V_L 序列(SEQ ID NO:11)具有至少 70%(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 98%)序列同一性的 V_L 链。在一个实施例中,半胱氨酸突变体包含与

532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 相同的 V_L CDR3 区,并且任选地,与两个示例性突变体相同的 V_L CDR1 和 CDR2 区。

[0125] 确定两个氨基酸序列的“百分比同一性”可用 Karlin 和 Altschul 算法 Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:2264-68, 1990, 按照 Karlin 和 Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:5873-77, 1993 修改。此类算法并入 Altschul, 等, J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版)。BLAST 蛋白质检索可用 XBLAST 程序来进行,分数 =50, 字长 =3 以获得与目标蛋白质分子同源的氨基酸序列。如在 Altschul 等, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997 中描述的,在存在于两个序列的空位处可使用空位 (Gapped) BLAST。当使用 BLAST 和空位 BLAST 程序,可用各自程序的默认参数 (例如 XBLAST 和 NBLAST)。

[0126] 在一些实施方案中,与上述及下文实施例 1 中描述的两个示例性突变体相比,本文描述的半胱氨酸突变体可包含框架区 (FR) 内的一个或多个突变 (例如保守的氨基酸替换)。如在本领域已知,在 FR 区内的突变不太可能会影响抗体的抗原-结合活性。在其它实施方案中,与 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 相比在一个或多个 CDR 区内,本文描述的半胱氨酸突变体可包含一个或多个突变 (例如 1、2 或 3 个诸如保守的氨基酸替换的突变)。优选地,这类突变体保留了与亲本相同的负责抗原结合的区/残基,例如 CDR 内的相同的特异性决定残基。

[0127] 一般而言,半胱氨酸残基提供独特性质的蛋白质,因为半胱氨酸残基能形成共价键和其它半胱氨酸。半胱氨酸突变经常导致蛋白质具有显著地改变的性质。因此意外的是,通过尺寸排阻色谱 (图 1) 和 SDS-PAGE 分析 (图 2) 测量发现轻链 CDR3 上半胱氨酸突变成丝氨酸 (C54-C02) 或丙氨酸 (X54-B03) 的抗体比 DX-2504 更有同源性。还意外的是,关于单体 IgG 物类的百分比,在 37°C 下孵育,孵育超过 30 天 (图 3) 或随后在 pH8.3 下孵育 15 天 (图 4),半胱氨酸突变体将更稳定。抗体的 CDR 突变往往会减少抗原结合的亲和力。因此,DX-2504 轻链的 CDR3 中半胱氨酸的突变没有影响抗原结合的亲和力更是意料之外的 (图 7 和 8)。

[0128] 上述任何半胱氨酸突变体还可进一步包含重链可变区 (V_H),该 V_H 包含 V_H CDR1、 V_H CDR2 和 V_H CDR3 区。 V_H 可以和 DX2504 (SEQ ID NO:9) 的或其功能性变体相同。在一些实施方案中,功能性变体中的 V_H CDR 与 DX2504 (SEQ ID NOs:22、23 和 24) 的具有至少 70% (例如至少 75%、80%、85%、90% 或 95%) 的序列同一性。在一个实施例中,一个或多个 V_H CDR 与对应的 DX2504 的 V_H CDR(s) 具有至少 70% 的序列同一性,例如在 V_H CDR3 区与序列 LAIGDSY (SEQ ID NO:24) 具有至少 70% 的同源性 (至少 75%、80%、85%、90% 或 95%)。

[0129] 在另一个实施例中,功能性变体的 V_H CDR 组合与 DX2504 的组合具有至少 70% 的序列同一性。例如在 CDR1、CDR2 和 CDR3 区与参考 CDR 序列具有至少 90% 同源性的抗体是指结合的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区每 10 个氨基酸中至少有 9 个与在 DX2504 结合的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区发现的氨基酸相同的抗体。

[0130] 可选地,与 DX2504 的 CDR3 序列 (LAIGDSY; SEQ ID NO:24) 相比,在 CDR3 区功能性突变体可包含多达 1 个、多达 2 个、多达 3 个、多达 4 个或多达 5 个氨基酸替换。在一些实施方案中,与 DX2504 的 CDR3 区相比,在 V_H CDR3 区功能性变体包括多达 3 个替换。在一个实施例中,一个或多个氨基酸替换是保守的氨基酸替换。

[0131] 而且,与 DX2504 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区序列相比,在 CDR1、CDR2 和 CDR3 区功能性变体可包含多达 1 个、多达 2 个、多达 3 个、多达 4 个、多达 5 个、多达 6 个、多达 7 个、多达 8 个、多达 9 个、多达 10 个、多达 11 个、多达 12 个、多达 13 个、多达 14 个或多达 15 个氨基酸替换。在一些实施方案中,在 V_H CDR1、CDR2 和 CDR3 区它们总共包含多达 10 个替换。在一个实施例中,一个或多个氨基酸替换是保守的氨基酸替换。

[0132] 在一些实施方案中,功能性变体包含与 DX2504 的 V_H 序列 (SEQ ID NO:9) 具有至少 70% (例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97% 或 98%) 的序列同一性的 V_H 链。在一个实施例中,功能性变体包含与 DX2504 相同的 V_H CDR3 区,并且任选地,与 DX2504 相同的 V_H CDR1 和 CDR2 区。

[0133] 当需要时,在 DX2504 的框架区 (FRs) 内如本文描述的 DX2504 重链的功能性变体可包含一个或多个突变 (例如保守的氨基酸替换) (参见上述)。如在本领域已知,在 FR 区内的突变不可能影响抗体的抗原结合活性。在其它实施方案中,与 DX2504 相比,在一个或多个 CDR 区内本文描述的半胱氨酸突变体可包含一个或多个突变 (例如 1、2 或 3 种如保守的氨基酸替换的突变)。优选地,此类变体保留了与亲本相同的负责抗原结合的区 / 残基,例如在 CDR 内相同的特异性决定残基。

[0134] 在一个实施例中,本文描述的 DX2504 半胱氨酸突变体包含与 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 具有至少 70% (例如至少 75%、80%、85%、90% 或 95%) 同源性的轻链和包含与 DX2504 具有相同 CDR 的重链 (例如与 DX2504 相同的重链可变区)。在另一个实施例中,突变包含与 532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 相同的 V_L 和与 DX2504 相同的 V_H 。

[0135] 缺失突变体

[0136] 已意外地发现,在动物模型中与 DX2504 相比,DX2504 重链 C- 末端赖氨酸残基的缺失导致抗 -FcRn 抗体 (DX2507) 具有增加的抗体保留和 IgG 的较高程度地减少 (图 13 和 14)。

[0137] 因此,本文还描述了与 DX2504 重链相比,重链缺少 C- 末端赖氨酸残基的缺失突变体。更具体地,本文描述的缺失突变体的重链另外与 DX2504 的重链 (SEQ ID NO:17) 相同或者与上述除了与 DX2504 重链 (SEQ ID NO:17) C- 末端赖氨酸残基相对应的氨基酸残基缺失的任何 DX2504 功能性变体的重链相同。这种重链的一个实例是下面实施例 2 描述的 DX2507 (SEQ ID NO:19)。

[0138] 上述的缺失突变体可进一步包含轻链,该轻链包含 DX2504 的 V_L 区或本文描述的任何半胱氨酸突变体的 V_L 区。

[0139] 在一些实施例中,缺失突变体包含包含与 DX2504、532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 相同的 V_L CDR (例如与 DX2504、532A-X53-C02 或 532A-X53-B03 相同的 V_L) 的轻链、包含与 DX2504 相同的 V_H CDR (例如与 DX2504 相同的 V_H) 的重链以及在与 DX2504 重链 C- 末端赖氨酸残基对应的位置具有缺失的重链恒定区。

[0140] 本文描述的任何半胱氨酸和缺失突变体可以小于 10nM 的解离常数 (K_D) 结合人 FcRn。

[0141] 除了有本文描述的氨基酸序列之外,本文描述的抗 -FcRn 抗体可具有任何结构性框架。因此,例如上述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区可嵌入“传统的”抗体框架,或可嵌入 scFv 或 Fab 框架。本文描述的抗 -FcRn 抗体可以是全长抗体或其抗原结合片段,例如 Fab、F(ab)' 2、

Fv 或 ScFv 抗体。它可能是非-人抗体例如鼠抗体（例如由杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体）、嵌合抗体或人源化抗体。

[0142] 在本公开的范围还包括编码本文描述的任何抗-FcRn 抗体 V_H 和 / 或 V_L 的核苷酸序列的核酸（例如任何半胱氨酸突变体或任何上述缺失突变体）。这些核酸序列能插入到表达载体中,通过重组技术该载体能被引入合适的宿主细胞（例如细菌细胞如大肠杆菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞）用于产生抗-FcRn 抗体。

[0143] 制备小鼠单克隆抗体的方法

[0144] 已经描述了制备单克隆抗体的方法 (Harlow 等, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988))。在一些情况下,作为第一步,将啮齿类动物例如小鼠用抗原性多肽免疫以产生抗体反应。因为 FcRn 的表达无所不在并且展示物种间的高度同源性,多肽没有成功在产生高亲和力的 FcRn 特异性单克隆抗体或 FcRn 单克隆封闭抗体。为解决这个问题,可进行 DNA 接种 (Castagliola 等, *J. Immunology* 160:1458 (1998))。DNA 接种涉及免疫啮齿类动物,例如有编码 FcRn 或其片段的 cDNA 构建体的小鼠。免疫可以施用肌内、腹腔内、皮下、静脉内、皮内或直接施用到淋巴结。在一个实施方案中,免疫肌内施用。DNA 接种可和佐剂施用,例如弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。DNA 接种可伴随施用心脏毒素以增加抗体滴度。施用心脏毒素引起细胞死亡和促进细胞摄取施用的 DNA 疫苗的细胞再生。心脏毒素还能增加导致更加强健的免疫反应的炎症。

[0145] 抗体分泌细胞 (B 细胞) 分离自啮齿类动物。通常 B 细胞分离自啮齿类动物脾脏并且和骨髓瘤细胞系融合。骨髓瘤细胞系是不能产生抗体的永生细胞系。骨髓瘤细胞系可选自但不限于 P3-X63Ag8、X63Ag8.653、Sp2/0-Ag14、F0、NSI/1-Ag4-1、NS0/1、FOX-NY、Y3-Ag1.2.3、YB2/0 和 IR983F。

[0146] 脾细胞和骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤。通过用聚乙二醇混合两种细胞型适当一段时间（例如五分钟）来介导融合。形成的杂交瘤在细胞培养中生长,用适当选择培养基（例如 HAT）且筛选它们产生对 FcRn 的单克隆抗体的能力。用已知的免疫学技术例如 ELISA 来筛选。

[0147] 制备 FcRn 特异性单克隆抗体的另外方法是用可溶性人 FcRn 免疫转基因 FcRn 敲除小鼠,参见 PCT 申请 W002/43658。W002/43658 描述了基因组的内源性 FcRn 基因上包含纯合破坏的转基因小鼠,其中所述纯合破坏阻止了功能性 FcRn 蛋白质的表达。本发明的单克隆抗体不在基因组的内源性 FcRn 基因上包含纯合破坏的转基因小鼠中制备,其中所述纯合破坏阻止了功能性 FcRn 蛋白质的表达。本发明的单克隆抗体不包含来自基因组的内源性 FcRn 基因上包含纯合破坏的转基因小鼠的 B 细胞,其中所述纯合破坏阻止了功能性 FcRn 蛋白质的表达。

[0148] 人源化抗-FcRn 抗体展示文库

[0149] 展示文库可用于鉴定结合 FcRn 的抗体。展示文库是实体的收集;每个实体包括可及的多肽组分和编码或鉴定多肽组分的可收回的组分。多肽组分是不同的以便代表不同的氨基酸序列。多肽组分可以是任何长度,例如从 3 个氨基酸至超过 300 个氨基酸。在选择中,用 FcRn 探测文库每个成员的多肽组分,并且如果多肽组分结合 FcRn 上,通常通过支持物保留鉴定展示文库。此外,展示文库实体可包括不止一个多肽组分,例如 sFab 的两条多

肽链。

[0150] 保留的展示文库成员从支持物中回收并分析。在相似或不相似的分析条件下分析可包括扩大和随后的选择。例如积极和负选择可以交替。分析还可包括决定多肽组分的氨基酸序列和详细表征的多肽组分的纯化。

[0151] 多种形式可用于展示文库。实施例包括以下。

[0152] 噬菌体展示。一种形式利用病毒,特别是噬菌体。这种形式被称为“噬菌体展示”。蛋白质组分通常共价结合噬菌体外壳蛋白上。连接由编码融合到外壳蛋白的组分的核酸的翻译引起。连接可包括柔性肽接头、蛋白酶位点或由终止密码子的抑制导致的氨基酸合并。噬菌体展示描述例如在 U. S. 5, 223, 409; Smith(1985) Science228:1315-1317; W092/18619; W091/17271; W092/20791; W092/15679; W093/01288; W092/01047; W092/09690; W090/02809; de Haard 等, (1999) J. Biol. Chem274:18218-30; Hoogenboom 等, (1998) Immunotechnology4:1-20; Hoogenboom 等, (2000) Immunol Today2:371-8; Fuchs 等, (1991) Bio/Technology9:1370-1372; Hay 等, (1992) Hum Antibod Hybridomas3:81-85; Huse 等, (1989) Science246:1275-1281; Griffiths 等, (1993) EMBO J12:725-734; Hawkins 等, (1992) J Mol Biol226:889-896; Clackson 等, (1991) Nature352:624-628; Gram 等, (1992) PNAS89:3576-3580; Garrard 等, (1991) Bio/Technology9:1373-1377; 和 Hoogenboom 等, (1991) Nuc Acid Res19:4133-4137。

[0153] 已为丝状噬菌体(噬菌体 f1、fd 和 M13) 以及其它噬菌体开发了噬菌体展示系统。丝状噬菌体展示系统通常使用融合到例如基因 III 蛋白和基因 VIII 蛋白的次要外壳蛋白上和主要外壳蛋白上,但也可使用与其它外壳蛋白例如基因 VI 蛋白、基因 VII 蛋白、基因 IX 蛋白或其结构域的融合(参见例如 W000/71694)。在一个实施方案中,融合到例如锚定结构域或“残端(stump)”的基因 III 蛋白的结构域上(参见例如美国专利 No. 5, 658, 727, 描述基因 III 蛋白锚定结构域)。还可能的是用非-肽连接生理上联系展示到外壳的蛋白质。

[0154] 用标准的噬菌体制备方法例如来自生长培养基的 PEG 沉淀可生长和收获噬菌体展示蛋白质组分。选择单独展示噬菌体之后,编码选择的蛋白质组分的核酸能分离自感染所选择的噬菌体的细胞或分离自扩增后的噬菌体本身。可挑取单独的克隆或菌斑,分离核酸并测序。

[0155] 其它展示形式。其它展示形式包括基于细胞的展示(参见例如 W003/029456)、蛋白质-核酸融合(参见例如 US6, 207, 446) 和核糖体展示(参见例如 Mattheakis 等, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA91:9022 and Hanes 等, (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92; Hanes 等, (2000) Methods Enzymol. 328:404-30; 和 Schaffitzel 等, (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35)。

[0156] 支架。用于展示的支架可包括:抗体(例如 Fab 片段、单链 Fv 分子(scFV)、单结构域抗体、骆驼科动物抗体和骆驼科化的抗体); T-细胞受体; MHC 蛋白; 细胞外结构域(例如纤连蛋白 III 型重复、EGF 重复); 蛋白酶抑制剂(例如 Kunitz 结构域、大肠杆菌素、BPTI 等); TPR 重复; 三叶草结构; 锌指结构域; DNA-结合蛋白; 特别是单体 DNA 结合蛋白; RNA 结合蛋白; 酶例如蛋白酶(特别是灭活的蛋白酶)、RNA 酶; 分子伴侣例如硫氧还蛋白和热击蛋白; 细胞内信号结构域(例如 SH2 和 SH3 结构域); 线性约束肽; 和线性肽底物。展示文库可包括合成的和/或天然的多多样性。参见例如 US2004-0005709。

[0157] 展示技术还可用于获得结合靶标特殊表位的抗体。这可以例如通过使用竞争缺少特殊表位的非靶向分子或在例如丙氨酸的表位内突变来实现。这些非靶向分子可用于如下所述负选择程序,如当展示文库结合靶标时竞争分子,或如洗脱试剂前,例如在洗涤溶液中为捕获对靶标没有特异性的分离的展示文库成员。

[0158] 迭代选择。在一个实施方案中,展示文库技术用于迭代模型。第一个展示文库用于鉴定结合靶标的一种或多种抗体。然后用诱变的方法使这些鉴定的抗体发生变化以形成第二个展示文库。然后从第二个文库选择较高亲和力的抗体,例如通过使用更高严格或更加竞争性的结合和洗涤条件。

[0159] 在一些实施方式中,诱变靶向到已知的区或可能在结合界面。就抗体而言,诱变可被引导至本文描述的重链或轻链的 CDR 区。另外,诱变可被引导至接近或邻近 CDR 的框架区。就抗体而言,诱变还可被引导至一个或几个 CDR,例如以形成精确的阶梯式改善。示例性诱变技术包括:易错 PCR、重组、DNA 改组、定点诱变和盒式诱变。

[0160] 在迭代选择的一个实施例中,本文描述的方法用于从展示文库中第一次鉴定抗体,其以至少最小的靶标结合特异性或最小活性结合 $FcRn$,例如小于 1nM、10nM 或 100nM 结合的平衡解离常数。编码最初鉴定的抗体的核酸序列用作引入变异的模板核酸,例如以鉴定相对于最初抗体有增强的性质(例如结合亲和力、动力学或稳定性)的第二抗体。

[0161] 解离速率选择。因为慢解离速率可预示高亲和力,特别是关于抗体与其靶标之间的相互作用,所以本文描述的方法可用于对靶标结合的相互作用以期望的动力学解离速率(例如减少的)来分离抗体。

[0162] 为了从展示文库中选择低解离的抗体,文库与固定的靶标接触。然后用移除非特异性或弱结合的生物分子的第一溶液洗涤固定的靶标。用第二溶液洗脱结合抗体,该溶液包括饱和量的游离靶标或竞争单克隆抗体的特异性高亲和力的靶标,即没有附接到颗粒的靶标的复制物。游离靶标结合从靶标解离的生物分子上。通过相对于很多更低浓度的固定靶标的饱和量的游离靶标有效阻止了重结合。

[0163] 第二溶液可具有大体上生理学的或严格的溶液条件。通常,第二溶液的溶液条件与第一溶液的溶液条件相同。按时间顺序收集第二溶液的级分以区分早晚级分。比早级分的生物分子较晚的级分包括从靶标以较低速率解离的生物分子。

[0164] 另外,还可能恢复甚至在延长孵育后仍结合靶标的展示文库成员。这些可在使用离液条件时被解离或附接到靶标时被扩增。例如结合靶标的噬菌体可以和细菌细胞接触。

[0165] 特异性的选择或筛选。本文描述的展示文库筛选方法可包括弃去结合非靶分子的展示文库成员的选择或筛选过程。非靶分子的实例包括磁珠上的链霉亲和素、例如牛血清白蛋白的阻断剂、脱脂牛奶、任何捕获的或靶标固定的单克隆抗体或不表达 $FcRn$ 靶标的非转染细胞。

[0166] 在一个实施方式中,所谓的“负选择”步骤用于区别靶标和相关的非靶分子以及相关的但是不同的非靶分子。展示文库或其池与非靶分子接触。收集不结合非靶标的样品成员并用于随后结合靶分子的选择或甚至用于随后的负选择。负选择步骤可在选择结合靶分子的文库成员之前或之后。

[0167] 在另一个实施方式中,采用筛选步骤。展示文库成员被分离用于结合靶分子后,测试每个分离的文库成员结合非靶分子的能力(例如以上所列的非靶标)。例如可用高通量

ELISA 筛选以获得这个数据。ELISA 筛选还可用于获得每个文库成员结合靶标以及相关靶标或靶标亚单位（例如大鼠 FcRn； β 2 微球蛋白）的跨物种反应性的定量数据，并且还在例如 pH6 或 pH7.5 的不同条件下。比较非靶和靶结合数据（例如使用计算机和软件）以鉴定特异性结合靶标的文库成员。

[0168] 其它表达文库

[0169] 蛋白收集的其它类型（例如表达文库）可用于鉴定有特殊性质的蛋白质（例如结合 FcRn 的能力和 / 或调节 FcRn 的能力），包括例如抗体的蛋白质阵列（参见例如 De Wildt 等，(2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994）、 λ gt11 文库、两个杂交文库等。

[0170] 抗体文库

[0171] 在一个实施方案中，文库显示了多样性的多肽池，其中每个池包括免疫球蛋白结构域，例如免疫球蛋白可变结构域。展示文库特别有用，例如用于鉴定识别人抗原的人或“人源化”抗体。这样的抗体可用于治疗学，以治疗例如自身免疫病症的人病症。因为抗体的恒定区和框架区是人的，所以这些治疗性抗体可避免自身被识别和标靶为抗原。恒定区还可被优化以募集人免疫系统的效应子功能。体外展示选择过程克服了正常人免疫系统的无能以产生抗自身抗原的抗体。

[0172] 典型的抗体展示文库显示了包括 VH 结构域和 VL 结构域的多肽。“免疫球蛋白结构域”是指来自免疫球蛋白分子的可变或恒定结构域的结构域。免疫球蛋白结构域通常包含两个由约七个 β -链形成的 β -折叠和保守的二硫键（参见例如 A. F. Williams 和 A. N. Barclay, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6:381-405）。展示文库可用 Fab 片段（例如用两条多肽链）或单链 Fv（例如用单一多肽链）以展示抗体。也可用其它形式。

[0173] 如在 Fab 和其它形式的情况下，展示的抗体可包括一个或多个恒定区作为轻链和 / 或重链的一部分。在一个实施方案中，每个链包括一个恒定区，例如，如在 Fab 的情况下。在其它实施方案中，展示了另外的恒定区。

[0174] 通过很多过程可构建抗体文库（参见例如 de Haard 等, 1999, J. Biol. Chem. 274:18218-30; Hoogenboom 等, 1998, Immunotechnology 4:1-20; 和 Hoogenboom 等, 2000, Immunol. Today 21:371-378。另外，每个过程的元件可用其它过程的那些来结合。可用这些过程以使变异引入到单一的免疫球蛋白结构域（例如 V_H 或 V_L ）或引入到多个免疫球蛋白结构域（例如 V_H 和 V_L ）。参考重链和轻链可变结构域之一或二者的区，变异可引入到免疫球蛋白可变结构域，例如一个或多个 CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3 和 FR4 的区。在一个实施方案中，变异引入到给定的可变结构域的所有三个 CDR 中。在另一个实施方案中，变异引入到 CDR1 和 CDR2，例如重链可变结构域的。任何结合是可行的。在一种方法中，通过将不同的编码 CDR 的寡核苷酸插入到核酸的相应区来构建抗体文库。可用单体核苷酸或三核苷酸合成寡核苷酸。例如 Knappik 等, 2000, J. Mol. Biol. 296:57-86 描述了用三核苷酸合成来构建编码寡核苷酸的 CDR 且有设计的限制性位点的模板来接受寡核苷酸的方法。

[0175] 在另一种方法中，用 FcRn 免疫动物例如啮齿类动物。将动物任选地用抗原激发以进一步刺激反应。然后从动物中分离脾脏细胞并且扩增和克隆编码 V_H 和 / 或 V_L 结构域的核酸以在展示文库中表达。

[0176] 在又一种方法中，抗体文库构建自首次用于实验的种系免疫球蛋白基因扩增的核酸。扩增的核酸包括编码 V_H 和 / 或 V_L 结构域的核酸。编码免疫球蛋白的核酸来源如下所

述。扩增可包括 PCR, 例如用退火至保守的恒定区的引物或另外的扩增方法。

[0177] 编码免疫球蛋白结构域的核酸可获自例如人、灵长类、小鼠、兔子、骆驼、美洲驼或啮齿类动物的免疫细胞。在一个实施例中, 选择特殊性质的细胞。可选择不同成熟阶段的 B 细胞。在另一个实施例中, B 细胞是首次用于实验的。

[0178] 在一个实施方案中, 荧光激活细胞分选 (FACS) 用于分选表达表面结合的 IgM、IgD 或 IgG 分子的 B 细胞。另外, 可分离表达不同的同种型 IgG 的 B 细胞。在另一个实施方案中, 体内培养 B 或 T 细胞。例如通过用培养层细胞培养或通过添加有丝分裂原或其它调节试剂, 如 CD40 或 CD40 配体或 CD20 的抗体、豆蔻酸 - 佛波醇 - 乙酸酯、细菌脂多糖、伴刀豆球蛋白 A、植物凝集素或美洲商陆有丝分裂原以体内刺激细胞。

[0179] 在又一个实施方案中, 细胞分离自有自身免疫病症的受试者, 例如系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、血管炎、Sjogren 综合症、系统性硬化或抗磷脂综合症。受试者可以是人或动物, 例如人疾病的动物模型或有类似病症的动物。在又一个实施方案中, 细胞分离自包括人免疫球蛋白基因座的转基因非人动物。

[0180] 在一个实施方案中, 细胞激活了躯体的高突变程序。刺激细胞经历免疫球蛋白基因的躯体诱变, 例如通过用抗免疫球蛋白、抗 CD40 和抗 CD38 抗体 (参见例如 Bergthorsdottir 等 2001, J. Immunol. 166:2228) 治疗。在一个实施方案中, 细胞是首次用于实验的。

[0181] 通过下列示例性方法, 编码免疫球蛋白可变结构域的核酸可分离自天然谱系。首先 RNA 分离自免疫细胞。分离全长 (即加帽的) mRNA (例如通过用小牛肠磷酸酶降解未加帽的 RNA)。然后用烟草酸焦磷酸酶将帽移除并且用反转录产生 cDNA。

[0182] 第一条 (反义) 链的反转录可用任何合适的引物以任何方式进行。参见例如 de Haard 等, 1999, J. Biol. Chem. 274:18218-30。引物结合区可以是恒定的在不同的免疫球蛋白之间, 例如为了反转录不同的同种型免疫球蛋白。对特殊的同种型免疫球蛋白, 引物结合区也可以是特异性的。通常引物对编码至少一个 CDR 的序列的 3' 区是特异性的。在一个实施方案中, 可使用多 -dT 引物 (且对重链基因可以是优选的)。

[0183] 合成序列可与反转录链的 3' - 端连接。反转录后在 PCR 扩增期间, 合成序列可用作引物结合位点以结合正向引物。合成序列的使用可排除用不同正向引物池以全面捕获可获得的多样性的需要。

[0184] 然后扩增可变结构域编码基因, 例如用一轮或多轮。如果用多轮, 可用巢式引物以增加保真度。然后将扩增的核酸克隆到展示文库载体。

[0185] 二次筛选方法

[0186] 选择结合靶标的候选文库成员后, 可进一步分析每个候选文库成员, 例如进一步表征其结合靶标的性质。每个候选文库成员可经历一个或多个二次筛选测定。可测定结合性质、催化性质、抑制性质、生理学性质 (例如细胞毒性、肾脏清除率、免疫原性)、结构性质 (例如稳定性、构象、齐聚反应状态) 或另外的功能化性质。相同的测定可反复使用, 但需用变化的条件, 例如以测定 pH、离子或热敏感性。

[0187] 适当时, 测定可直接用展示文库成员, 产生自编码所选多肽的核酸的重组多肽, 或基于所选多肽的序列合成的合成肽。结合性质的典型测定包括以下。

[0188] ELISA。用 ELISA 还可筛选选自表达文库的抗体的结合性质。例如每个抗体接触

底面涂覆靶标的微量滴定板,例如靶标的限制量。用缓冲液洗涤该板以移除非特异性结合的多肽。然后通过用能识别测试抗体的抗体探测该板以确定结合板上的抗体的量,例如抗体的标签或恒定部分。探测抗体连接到酶上,例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶 (HRP),当提供适当的底物时其产生比色产物。

[0189] 就展示文库的抗体而言,可从细胞中纯化抗体或用展示文库形式测定,例如融合到丝状噬菌体外壳上。在 ELISA 的另一个版本中,每个选自表达文库的抗体用于涂覆微量滴定板的不同的孔。然后用恒定的靶标分子查询每个孔进行 ELISA。

[0190] 同源结合测定。候选抗体和靶标的结合相互作用可用同源测定进行分析,即加入所有的测定组分后,不需要另外的液体操作。例如荧光共振能量转移 (FRET) 可用作同源测定(参见例如 Lakowicz 等,美国专利 No. 5, 631, 169; Stavrianopoulos 等,美国专利 No. 4, 868, 103)。如果第二个分子和第一个分子接近,选择第一个分子(例如在级分中鉴定的分子)上的荧光标记以使其发射的荧光能量能被第二个分子(例如靶标)上的荧光标记吸收。当吸收转移的能量时,第二个分子的荧光标记发出荧光。因为标记物之间的能量转移效率和分开分子的距离相关,所以可对分子间的空间关系进行评估。在结合发生在分子之间的情况下,测定中“受体”分子标记的荧光发射应该最大化。通过对本领域熟知的标准荧光检测手段(例如用荧光计)可方便地测量被配置以通过 FRET 检测的结合事件。通过滴定第一或第二结合分子的量,可产生结合曲线以估计平衡结合常数。

[0191] 另一个同源性测定的实例是 ALPHASCREEN™ (Packard Bioscience, Meriden CT)。ALPHASCREEN™ 使用两个标记的珠。当被激光激发时,一个珠产生单峰氧。当单峰氧从第一个珠扩散并和它碰撞时,另一个珠产生光信号。信号只产生在两个珠接近时。一个珠可附接到展示文库成员,另一个珠可附接到靶标。测量信号以确定结合程度。

[0192] 当候选多肽附接到展示文库媒介物例如噬菌体时可进行同源测定。

[0193] 表面等离子体共振 (SPR)。分离自表达文库和靶标的分子的结合相互作用可用 SPR 进行分析。SPR 或生物分子相互作用分析 (BIA) 实时检测生物特异性相互作用,没有标记任何相互作用物。BIA 芯片结合表面质量的变化(预示结合事件)导致接近表面的光折射指数的改变(表面等离子体共振 (SPR) 的光学现象)。折射率的改变引起可探测的信号,其作为生物分子间实时反应的指示而被测量。描述了使用 SPR 的方法,例如在美国专利 No. 5, 641, 640; Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander 和 Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo 等, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 和 BIAcore International AB (Uppsala, Sweden) 提供的在线资源。

[0194] 来自 SPR 的信息可用来提供生物分子结合靶标的平衡解离常数 (K_d) 和动力学参数包括 K_{on} 和 K_{off} 的精确和定量的测量。这些数据可用来比较不同的生物分子。例如可比较从表达文库中选择的蛋白以鉴定对靶标有高亲和力或有低 K_{off} 的蛋白。这种信息还可用于开发结构活性关系 (SAR)。例如亲本蛋白质成熟形式的动力学和平衡结合参数可与亲本蛋白质的参数进行比较。可鉴定给定位置变化的氨基酸,其与特殊的结合参数例如高亲和力和低 K_{off} 相关联。这种信息可与结构模型相结合(例如用同源性模型、能量最小化或通过 x-射线晶体学或 NMR 的结构测定)。因此,对蛋白质和其靶标间物理相互作用的理解可得到阐述并且用于指导其它设计过程。

[0195] 细胞测定。候选抗体的文库(例如由展示文库或另外的预先鉴定的)可用于筛选

细胞上的靶标结合,其瞬时或稳定表达并展示细胞表面的目标靶标。例如,靶标可包括载体核酸序列,该序列包括仅编码多肽的细胞外部分的片段,以使嵌合靶标多肽在细胞内产生、从细胞分泌或通过锚定例如与膜锚定蛋白如 Fc 融合以附接到细胞表面。细胞表面表达的靶标可用于筛选结合 FcRn 并阻止 IgG-Fc 结合的抗体。例如非特异性人 IgG-Fc 能被荧光标记,并且在没有拮抗性抗体存在下用流式细胞仪通过荧光强度的变化检测其与 FcRn 的结合,例如 FACS 机器。

[0196] 获得 FcRn- 结合抗体的其它方法

[0197] 除了使用展示文库外,可用其它方法获得 FcRn- 结合抗体。例如在非人动物例如啮齿类动物中 FcRn 蛋白或其区域可用作抗原。

[0198] 在一个实施方案中,非人动物包括至少人免疫球蛋白基因的一部分。例如,在小鼠抗体产生中可用人 Ig 基因座的大片段设计小鼠链缺陷。用杂交瘤技术,可制备和选择获自具有所需特异性的基因的抗原特异性单克隆抗体 (Mabs)。参见例如 XENOMOUSE™, Green 等,1994, Nat. Gen. 7:13-21; U. S. 2003-0070185、公布于 1996 年 10 月 31 日的 W096/34096 和提交于 1996 年 4 月 29 日的 PCT 申请 No. PCT/US96/05928。

[0199] 在一个实施方案中,单克隆抗体获自非人动物,然后被修饰,例如人源化或去免疫。Winter 描述了可用于制备人源化抗体的 CDR 移植方法(美国专利申请 GB2188638A 提交于 1987 年 3 月 26 日;美国专利 No. 5, 225, 539。特定人抗体的所有 CDR 可被非人 CDR 的至少一部分代替或只有一些 CDR 可被非人 CDR 代替。仅需要代替人源化抗体结合预定的抗原所需要的 CDR 数量。

[0200] 人源化抗体可通过代替 Fv 可变区序列而产生,该区不直接参与抗原与来自人 Fv 可变区的等效序列结合。通过 Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207, 通过 Oi 等, 1986, BioTechniques 4:214, 和通过 Queen 等, 美国专利 No. 5, 585, 089、US5, 693, 761 和 US5, 693, 762 提供了产生人源化抗体的一般方法。这些方法包括分离、操作和表达来自至少一条重链或轻链的编码所有或部分免疫球蛋白的 Fv 可变区的核酸序列。这些核酸的来源对本领域技术人员而言是熟知的,且如上所述例如可获自产生预定靶标的抗体的杂交瘤。然后将编码人源化抗体或其片段的重组 DNA 克隆到适当的表达载体。

[0201] FcRn- 结合抗体的修饰还可通过人 T 细胞表位的特异性缺失或通过公开在 W098/52976 和 W000/34317 的“去免疫化”方法,该公开的内容通过引用并入本文。简而言之,抗体的重链和轻链可变区可分析于结合 MHC II 类的肽;这些肽代表了潜在的 T-细胞表位(如 W098/52976 和 W000/34317 所定义的)。对于潜在 T-细胞表位的缺失,可应用称作“肽穿线(peptide threading)”的计算机模型方法,且此外人 MHC II 类结合肽数据库可用于检索存在于 V_H和 V_L序列的基序,如 W098/52976 和 W000/34317 中所述。这些基序结合任何 18 种主要的 MHC II 类 DR 同种异型,并因此构成了潜在的 T 细胞表位。检测到的潜在的 T-细胞表位可通过代替少量的可变区氨基酸残基或通过单一的氨基酸替换被消除。经常但不是唯一的,可用在人的种系抗体序列位置上共同的氨基酸进行尽可能保守的替换。人种系序列公开于 Tomlinson, LA. 等,1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. 等, 1995, Immunol. Today Vol. 16(5):237-242; Chothia, D. 等,1992, J. Mol. Bio. 227:799-817。V BASE 目录提供人免疫球蛋白可变区序列综合的目录(Tomlinson, LA. 等, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK 编辑)。鉴定去免疫化变化后,通过诱变或其它合成

方法（例如从头合成 (de novo synthesis)、盒式代替等）可构建编码 V_H 和 V_L 的核酸。诱变的可变序列可任选地被融合到人恒定区，例如人 IgG1 或 κ 恒定区。

[0202] 在一些情况下，潜在的 T 细胞表位将包括已知的或预测的对抗体功能重要的残基。例如潜在的 T 细胞表位通常偏向于 CDR。此外，潜在的 T 细胞表位可发生在对抗体结构和结合重要的框架残基。在一些情况下，消除这些潜在的表位的变化将需要更多的注意力，例如通过制备和测试有和没有变化的链。如有可能，潜在的与 CDR 重叠的 T 细胞表位被 CDR 外的替换消除。在一些情况下，在 CDR 内的改变是唯一的选择，且此外应该检测有和没有这个替换的变异。在其它情况下，要求移除潜在 T 细胞表位的替换是在框架内的残基位置，其对抗体结可能是关键的。在这些情况下，应检测有和没有这个替换的变异。因此在一些情况下，为了鉴定最佳的去免疫化抗体，设计将重链和轻链可变区去免疫化的几个变异并且测试不同的重链 / 轻链组合。然后可通过考虑不同变异与去免疫化程度结合的结合亲和力，即保留在可变区的潜在的 T 细胞表位的数量而做出最终去免疫化抗体的选择。去免疫化可用于修饰任何抗体，例如包括非人序列的抗体，例如合成抗体、鼠抗体、其它非人单克隆抗体或从展示文库中分离的抗体。

[0203] 种系抗体。

[0204] 用于治疗 IgG 调节的自身免疫疾病的抗体可用于多次施用。可降低治疗性抗体免疫原性的防范包括将框架区的一种或多种非种系氨基酸回复到抗体（尤其是 Fab）对应的种系氨基酸（例如只要结合性质大体保留）。

[0205] 为使抗体可变区与一种或多种种系序列更加相似，可修饰结合 FcRn 的抗体，例如本文描述的抗体。例如抗体可包括一种、两种、三种或更多的氨基酸替换，如在框架、CDR 或恒定区，以使其与参考种系序列更加相似。一个示例性种系方法可包括鉴定与分离的抗体的序列相似的一种或多种种系序列（例如在特殊的库中大多数相似）。突变（在氨基酸水平）可在分离的抗体中进行，或递增或与其它突变结合。例如建立包括编码一些或全部可能的种系突变的序列的核酸文库。然后评估突变抗体，例如鉴定分离的抗体相比有一种或多种另外的种系残基的抗体且其仍有用（例如有功能化活性）。在一个实施方案中，给分离的抗体引入尽可能多的种系残基。

[0206] 在一个实施方案中，诱变用于在框架和 / 或恒定区替代或插入一个或多个种系残基。例如种系框架和 / 或恒定区残基可来自与被修饰的非可变区相似的（例如大多数相似）种系序列。诱变后，可评估抗体的活性（例如结合或其它功能化活性）以确定是否种系残基或残基是耐受的（即不消除活性）。相似的诱变可在框架区进行。

[0207] 选择种系序列可以不同的方式进行。例如如果种系序列满足选择或相似度的预定标准，如至少一定的百分比同一性，如至少 75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 99.5% 同一性，其可被选择。可用至少 2、3、5 或 10 种种系序列进行选择。在 CDR1 和 CDR2 的情况下，鉴定相似的种系序列可包括选择一个这样的序列。在 CDR3 的情况下，鉴定相似的种系序列可包括选择一个这样的序列，但可包括使用两种独自贡献于氨基末端部分和羧基末端部分的种系序列。在其它的实施中，使用多于一个或两个种系序列，例如以形成共有序列。

[0208] 在一个实施方案中，关于特殊的参考可变结构域序列，例如本文描述的序列，相关的可变结构域序列具有至少 30、40、50、60、70、80、90、95 或 100% 的 CDR 氨基酸位置，其与参

考 CDR 序列的残基不相同,残基与在人种系序列中相应位置的残基相同(即由人种系核酸编码的氨基酸序列)。

[0209] 在一个实施方案中,关于特殊的参考可变结构域序列,例如本文描述的序列,相关的可变结构域序列具有至少 30、50、60、70、80、90 或 100% 的 FR 区与来自人种系序列的 FR 序列是相同的,例如与参照可变结构域序列相关的种系序列。

[0210] 因此,可分离与给定目标抗体有相似活性但与一种或多种种系序列尤其是一种或多种人种系序列更相似的抗体。例如抗体可与 CDR 之外的区(例如框架区)的种系序列具有至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 99.5% 的同一性。另外,抗体可包括 CDR 区的至少 1、2、3、4 或 5 个种系残基,该种系残基来自与被修饰的可变区相似的(例如大多数相似的)种系序列。主要目标的种系序列是人种系序列。抗体活性(例如结合活性)可在原始抗体的 100、10、5、2、0.5、0.1 或 0.001 倍以内。

[0211] 示例性 V_{κ} 种系参考序列包括:012/02、018/08、A20、A30、L14、L1、L15、L4/18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、011/01、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10 和 A14。参见例如 Tomlinson 等,1995,EMBO J. 14(18):4628-3。

[0212] 可变结构域的种系参考序列可基于有特殊规范结构的序列,例如在 H1 和 H2 高变环的 1 至 3 级结构。如在 Chothia 等,1992, J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinson 等,1992, J. Mol. Biol. 227:776-798); 和 Tomlinson 等,1995,EMBO J. 14(18):4628-38. 中提出的,免疫球蛋白可变结构域的高变环的规范结构可由其序列推出。1 至 3 级结构的典型序列包括:DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53 和 DP-54。

[0213] 配体的产生

[0214] 标准的重组核酸方法可用于表达结合 FcRn 的抗体。一般地,编码抗体的核酸序列克隆到核酸表载体。当然,如果抗体包括多条多肽链,每条链可被克隆到表达载体,例如在相同的或不同的细胞表达的相同的或不同的载体。

[0215] 抗体的产生。一些抗体例如 Fab 可在细菌细胞中产生,例如大肠杆菌细胞。例如如果在展示实体和噬菌体蛋白质(或其片段)之间,Fab 被包括抑制性的终止密码子的噬菌体展示载体中的序列编码,载体核酸可被转移至不能抑制终止密码子的细菌细胞。在这种情况下,Fab 不融合到基因 III 蛋白质且被分泌至周质和/或培养基。

[0216] 抗体还可在真核细胞中产生。在一个实施方案中,抗体(例如 scFv 的)表达于酵母细胞例如毕赤酵母(Pichia)(参见例如 Powers 等,2001, J. Immunol. Methods. 251:123-35)、汉逊酵母(Hansenula)或酵母属(Saccharomyces)。

[0217] 在一个实施方案中,抗体在哺乳动物细胞中产生。表达克隆抗体或其抗原结合片段的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)(包括 dhfr-CHO 细胞,描述于 Urlaub 和 Chasin,1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA77:4216-4220, 使用 DHFR 可选择的标记,例如如描述于 Kaufman 和 Sharp,1982, Mol. Biol. 159:601621)、淋巴细胞系,例如 NS0 骨髓瘤细胞和 SP2 细胞、COS 细胞和来自转基因动物的细胞,例如转基因哺乳动物。例如细胞是哺乳动物上皮细胞。

[0218] 除了编码多样化的免疫球蛋白结构域的核酸序列外,重组表达载体可携带另外的序列,例如调节宿主细胞载体(例如复制的起源)和可选择的标记基因的复制的序列。可

选择的标记基因促进对引入载体的宿主细胞的选择（参见例如美国专利 No. 4, 399, 216、4, 634, 665 和 5, 179, 017）。例如通常可选择的标记基因赋予已引入载体的宿主细胞以药物例如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。可选择的标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（用于 dhfr 宿主细胞甲氨蝶呤选择 / 扩增）和 neo 基因（用于 G418 选择）。

[0219] 在抗体或其抗原结合部分的示例性重组表达系统中,通过磷酸钙介导的转染,将编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体引入到 dhfr CHO 细胞。在重组表达载体中,每个抗体重链和轻链基因有效地连接至增强子 / 启动子调控元件（例如来源于 SV40、CMV、腺病毒等,例如 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调控元件或 SV40 增强子 / AdMLP 启动子调控元件）以驱动基因的高水平转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因,允许选择已用载体转染的用甲氨蝶呤选择 / 扩增的 CHO 细胞。培养选择的转化体宿主细胞以允许表达抗体重链和轻链并且完整的抗体从培养基中恢复。标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞以及从培养基中恢复抗体。例如一些抗体可用蛋白质 A 或蛋白质 G 偶联的基质通过亲和层析进行分离。

[0220] 对包括 Fc 结构域的抗体,抗体产生系统可产生 Fc 区被糖基化的抗体。例如 IgG 分子的 Fc 结构域在 CH2 结构域的天冬酰胺 297 处被糖基化。天冬酰胺是双触角型 (biantennary-type) 寡糖的修饰位点。已显示这种糖基化对由 Fcγ 受体和互补 C1q 调节的效应子功能是需要 (Burton 和 Woof, 1992, Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis 等, 1998, Immunol. Rev. 163:59-76)。在一个实施方案中, Fc 结构域产生与使天冬酰胺 297 对应的残基适当糖基化的哺乳动物表达系统。Fc 结构域还可包括其它的真核翻译后修饰。

[0221] 还可通过转基因动物产生抗体。例如美国专利 No. 5, 849, 992 描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建出转基因,其包括乳特异性启动子和编码目标抗体的核酸以及用于分泌的信号序列。由这些转基因哺乳动物的雌性产生乳汁,包括在其中分泌目标抗体。抗体可从乳汁中纯化,或对一些应用而言直接使用。

[0222] 产生转基因小鼠的一种方法如下。简言之,编码抗体的靶标构建体显微注射到已受精的卵母细胞的雄性原核中。卵母细胞注射到假孕的养母子宫中以发育成能成活的幼崽。一些后代包含转基因。

[0223] FcRn 候选抗体测定系统

[0224] 可在测定中进一步表征 FcRn 候选抗体以测量体外或体内其对 FcRn 或其片段的调节活性。例如在测定条件下, FcRn 可与底物例如非特异性的 IgG 或 IgG 的 Fc 部分或白蛋白结合,从而允许 FcRn 和底物反应。在缺少 FcRn 候选抗体以及存在渐增浓度的 FcRn 候选抗体下进行测定。50% 的 FcRn 活性（例如结合底物）被候选抗体抑制时,候选抗体的浓度是该抗体的 IC₅₀ 值（抑制浓度 50%）或 EC₅₀（有效浓度 50%）值。在一系列或一组候选抗体中,与那些有高 IC₅₀ 或 EC₅₀ 值的抗体相比,那些有低 IC₅₀ 或 EC₅₀ 值的抗体被认为是 FcRn 更有效的抑制剂。在一些实施方案中,如在体外对 FcRn 活性抑制的测定中所测量,抗体具有 800nM、400nM、100nM、25nM、5nM、1nM 或更低的 IC₅₀ 值。

[0225] 还可评估候选抗体对 FcRn 的选择性。例如可测定 FcRn 候选抗体对 FcRn 和一组细胞表面受体的效力,例如也用 β2M 结构域的受体,且可确定每个受体蛋白的 IC₅₀ 值或 EC₅₀ 值。在一个实施方案中,显示对 FcRn 有低 IC₅₀ 值或 EC₅₀ 值且对测试组的其它受体有高 IC₅₀ 值或 EC₅₀ 值的化合物（例如 MHC I 类分子）被认为对 FcRn 有选择性。

[0226] 在不同的 pH 和温度条件下,表达内源性 FcRn 的离体内皮细胞或上皮细胞可用于跟踪候选抗体的内吞作用或胞移作用。在各种化学物质存在或不存在的条件下在已知的改变或影响细胞内运输途径的不同条件下,可用下列标记抗体来测量通过 FcRn 的 IgG 的胞移或再循环。

[0227] 可用 pH 依赖和非依赖的 FcRn 结合抗体进行大鼠、小鼠或猴子中的药代动力学研究,以确定它们在血清中的半衰期。同样地,可体内评估抗体在免疫调节治疗中的潜在用途或在标记的 IgG 或标记的 IgG 的 Fc 部分存在和不存在的条件下通过注射抗体而作为补救免疫疗法中的保护性影响。在候选抗体存在下,标记的 IgG/Fc 半衰期的减少是抗体治疗功效的指示。

[0228] 药物组合物

[0229] 在另一方面,本公开提供组合物,例如药学上可接受的组合物或药物组合物,其包含 FcRn 结合抗体。FcRn 结合抗体可与药学上可接受的载体一起配制。药物组合物包括治疗组合物和诊断组合物,例如包括体内成像的标记的 FcRn 结合抗体组合物。

[0230] 药学上可接受的载体包括任何和全部生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌药和抗真菌药、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体对静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)是适当的。依赖于施用途径,FcRn 结合抗体可包覆在材料中以保护化合物免受酸作用和其它可使化合物失活的自然条件。

[0231] 药学上可接受的盐是保留亲本化合物的期望的生物活性且不对其赋予不期望的毒理学作用的盐(参见例如 Berge, S. M. 等,1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这些盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些来源于非毒性无机酸的盐,例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸等,以及来源于非毒性无机酸的盐,例如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的羧酸、羟基羧酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸等。碱加成盐包括那些来源于碱土金属的盐,例如钠、钾、镁、钙等,以及来源于非毒性有机胺的盐,例如 N, N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0232] 组合物可以是各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射的难溶溶液)、分散剂或混悬剂、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。形式可依赖于期望的施用模式和治疗应用。很多组合物是以可注射的非熔溶液形式,例如与那些和抗体用于人注射的相似的组合物。示例性施用模式是肠胃外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一个实施方案中,FcRn 结合抗体通过静脉输注或注射而施用。在另一个实施方案中,FcRn 结合抗体通过肌肉内或皮下注射而施用。

[0233] 组合物可配制成溶液、微乳液、分散剂、脂质体或与高药物浓度相配的其他有序的结构。无菌注射溶液可通过将活性化合物以需要的量(即配体)合并到有一种或组合物成分的上述列举的适当溶剂中来制备,根据需要,然后过滤灭菌。一般来讲,分散剂通过将活性化合物合并到包含基本的分散剂介质和需要的其它成分的上述列举的灭菌的媒介物中来制备。在用无菌粉末制备无菌可注射溶液的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从其预先灭菌过滤的溶液中生成活性成分的粉末和任何另外期望的成分。例如通过包衣如卵磷脂的使用,通过在分散剂的情况下且通过使用表面活性剂以保持需要的粒度来保持溶液适当的流动性。可通过组合物中包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸盐和明胶)引起可注射组合物的延长吸收。

[0234] 可通过本领域已知的各种方法施用 FcRn 结合抗体, 尽管对很多应用而言, 施用的路径 / 模式是注射注射或输注。例如对治疗应用而言, FcRn 结合抗体可通过静脉输注以小于 30、20、10、5 或 1mg/min 的速率而施用以达到约 1 至 100mg/m² 或 7 至 25mg/m² 的剂量。施用的路径和 / 或模式将根据期望的结果而不同。在某些实施方案中, 活性化合物可用能保护化合物避免快速释放的载体来制备, 例如包括植入物和微胶囊化的递送系统的可控的释放配方。可使用生物降解的生物相容性的聚合物, 例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚正酯和聚乳酸。制备这些配方的很多方法以申请专利或普遍已知。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编辑, 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

[0235] 在某些实施方案中, 抗体可被口服施用, 例如用惰性稀释剂或可吸收可食用的载体。化合物 (和其它成分, 如果期望) 可附上硬壳或软壳明胶胶囊剂, 被压缩成片剂或直接合并到受试者的饮食中。对于口服治疗施用, 化合物可与赋形剂合并并以可吸收的片剂、颊部片剂、含片 (troche)、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆剂、干胶片 (wafer) 等形式使用。为通过除了肠胃外施用之外的方法施用本文公开的化合物, 有必要用材料涂覆化合物或辅助施用化合物以防止其失活。

[0236] 可用本领域已知的医疗装置来施用药物组合物。例如在一个实施方案中, 本文公开的化合物组合物可用例如无针皮下注射装置、泵或植入物的装置来施用。

[0237] 在某些实施方案中, 可配制 FcRn 结合抗体以确保体内合适分布。例如血脑屏障 (BBB) 排除很多高亲水性化合物。例如可用脂质体制配以确保本文公开的治疗化合物穿过 BBB (如果期望)。对于制备脂质体的方法可参见例如美国专利 No. 4, 522, 811; 5, 374, 548; 和 5, 399, 331。脂质体可包含选择性地运输到特异性细胞或器官的一个或多个部分, 因而增强靶向的药物递送 (参见例如 V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685)。

[0238] 调整给药方案以提供最佳的期望的反应 (例如治疗反应)。例如可施用单一的大丸剂、随时间多次分剂量施用或根据治疗形式的紧急状态成比例地减少或增加剂量。为方便施用和剂量均匀, 制备单位剂型的肠胃外组合物是尤其有优点的。如本文所用的单位剂型是指物理上分离的单位, 作为单位剂量适合治疗受试者; 经计算每个单位包含预定量的活性化合物, 与需要的药学上的载体联合以产生期望的治疗效果。单位剂量的规格可口述并直接取决于 (a) 活性化合物的独特特性和取得的特殊治疗效果, 以及 (b) 在合成这样的活性化合物以对个体有治疗敏感性的领域中的固有限制。

[0239] 本文公开的用于治疗上或预防上的抗体有效量的示例性非限制性的范围是 0.1-20mg/kg 或 1-10mg/kg。例如可通过静脉输注施用抗 -FcRn 抗体, 例如以小于 30、20、10、5 或 1mg/min 的速率以达到约 1 至 100mg/m² 或约 5 至 30mg/m² 的剂量。剂量值可随需缓解的病症的类型和严重程度而不同。对于特殊的受试者, 根据其个体需要和施用或监督组合物施用的人的职业判断, 可随时间而调整特异性给药方案。

[0240] 本文公开的化合物组合物可包括本文公开的 FcRn- 结合抗体的治疗有效量或预防有效量。“治疗有效量”是指在剂量下并持续一段必要的时间以达到期望的治疗结果的有效量。组合物的治疗有效量可根据例如疾病状态、年龄、性别、个体体重和个体中引起期望反应的抗体能力的因素而不同。治疗有效量还指其中的组合物的任何毒性或有害影响被其治疗有利影响而超过。

[0241] 稳定化和保持性

[0242] 在一个实施方案中, FcRn- 结合抗体与在循环中例如在血液、血清、淋巴或其它组织中提高其稳定化和 / 或保持性的部分物理联系, 例如通过至少 1.5、2、5、10 或 50 倍。例如 FcRn- 结合抗体可与聚合物结合, 例如大体上非抗原聚合物如聚亚烷基氧化物或聚乙烯氧化物。适当的聚合物将大体上根据重量而发生变化。可使用分子数量平均重量在从约 200 至约 35,000 (或约 1,000 至约 15,000 和 2,000 至约 12,500) 范围的聚合物。例如 FcRn- 结合抗体可共轭到水溶性聚合物上, 例如亲水性聚乙烯聚合物, 例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。这些聚合物的非限制性列表包括聚亚烷基氧均聚物, 例如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇, 聚氧乙烯多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物, 条件是嵌段共聚物保持其水溶性。

[0243] 试剂盒

[0244] 本文描述的 FcRn- 结合抗体可在试剂盒中提供, 例如作为试剂盒的组分。例如试剂盒包括 (a) FcRn- 结合抗体, 例如包含 FcRn- 结合抗体的组合物, 并且任选地 (b) 信息材料。信息材料可以是描述性的、指导性的、市场化的或其它与本文描述的方法和 / 或本文描述的方法的 FcRn- 结合抗体的使用有关材料

[0245] 试剂盒的信息材料不限于其形式。在一个实施方案中, 信息材料可包括化合物的制备、化合物的分子量、浓度、药品有效期、批次或生产地点信息等。在一个实施方案中, 信息材料与治疗、预防或诊断本文描述的病症例如自身免疫病症的抗体的使用相关。

[0246] 在一个实施方案中, 信息材料可包括以适当的方式施用 FcRn- 结合抗体以进行本文描述的方法的说明, 例如以适当的剂量、剂型或施用模式 (例如本文描述的剂量、剂型或施用模式)。在一个实施方案中, 信息材料可包括对适当的受试者施用 FcRn- 结合抗体的说明, 例如人, 例如患有或有自身免疫病症 (例如类风湿性关节炎或系统性红斑狼疮) 风险的人。例如材料可包括对有狼疮的患者或有其它自身免疫病症的患者施用 FcRn- 结合抗体的说明。

[0247] 试剂盒的信息材料不限于其形式。在很多情况下, 信息材料例如说明以印刷的方式提供。例如印刷的文本、图画和 / 或照片, 例如标记的或印刷的页。然而, 信息材料还可以其它方式提供, 例如计算机可读的材料、视频记录或声音记录。在一个实施方案中, 试剂盒的信息材料是接触信息, 例如物理地址、邮件地址、网页或电话号码, 其中试剂盒的使用者可获得关于 FcRn- 结合抗体和 / 或其在本文描述的方法中的使用的大量信息。信息材料还可以形式的任何组合来提供。

[0248] 除了 FcRn- 结合抗体之外, 试剂盒的组合物可包括其它成分, 例如溶剂或缓冲液、稳定剂、防腐剂、调味剂 (例如苦的拮抗剂或甜味剂)、芳香剂或其它化妆品成分和 / 或用于治疗本文描述的自身免疫病症例如类风湿性关节炎或系统性红斑狼疮的第二种试剂。可选地, 试剂盒可包括其它成分, 但比 FcRn- 结合抗体以不同的组合物或容器。在这些实施方案中, 试剂盒可包括混合 FcRn- 结合抗体和其它成分的说明或 FcRn- 结合抗体与其它成分一起使用的说明。

[0249] FcRn- 结合抗体可以任何形式提供, 例如液体、干燥或冻干形式。优选的是, FcRn- 结合抗体是大体上纯的和 / 或灭菌的。当 FcRn- 结合抗体以液体溶液提供, 液体溶液优选水溶液, 优选灭菌的水溶液。当 FcRn- 结合抗体以干燥形式提供, 重构通常是通过添加适当的溶剂。可任选地在试剂盒提供溶剂, 例如灭菌的水或缓冲液。

[0250] 对包含 FcRn- 结合抗体的组合物, 试剂盒可包括一种或多种容器。在一些实施方案中, 试剂盒包含单独的容器、分割器或组合物区室以及信息材料。例如, 组合物可容纳在瓶、小瓶、或注射器中, 且信息材料可容纳在塑料套管或小包中。在其它实施方案中, 试剂盒单独的元件容纳在单一的未分开的容器中。例如组合物容纳在瓶、小瓶、或注射器中, 其以标签的形式另外附加到信息材料上。在一些实施方案中, 试剂盒包括多个 (例如包装) 单个的容器, 每个包含一种或多种 FcRn- 结合抗体的单位剂型 (例如本文描述的剂型)。例如试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包装或泡罩包装, 每个包含 FcRn- 结合抗体单一的单位剂量。试剂盒的容器可以是气密的、防水的 (例如对湿度或蒸发的变化不渗透) 和 / 或不透光的。

[0251] 试剂盒任选地包括适合施用组合物的装置, 例如注射器、吸入器、移液管、镊子、称量匙、滴管 (例如滴眼管)、拭子 (例如棉签或木制拭子) 或任何这样的递送装置。在一个实施方案中, 装置是分配计量的抗体剂量的植入装置。本公开还表征了例如通过结合本文描述的组分提供试剂盒的方法。

[0252] 治疗

[0253] 结合 FcRn 并通过本文描述的和 / 或本文详述的方法鉴定的抗体有治疗和预防用途。这些抗体可施用于受试者以治疗、防止和 / 或诊断各种病症包括自身免疫病症或甚至到例如体外或离体培养的细胞。

[0254] 术语“治疗”是指以统计学上的显著程度或以本领域的技术人员可检测的程度, 以有效的数量、方式和 / 或模式施用疗法以改善病况、症状或与病症有关的参数以阻止病症进展。有效的量、方式和 / 或模式可根据受试者而变化, 且可被调节以适应受试者。受试者可以是人或非人动物例如非人哺乳动物。

[0255] FcRn- 结合抗体可以治疗有效量而施用, 例如向受试者施用单一的或多个剂量, 受试者展示出病症例如自身免疫病症 (例如类风湿性关节炎或系统性红斑狼疮) 的症状改善或病症存在或风险的表示参数的改善。

[0256] 影响身体很多器官或局部器官的示例性病症包括: 多发性硬化、类风湿性关节炎、炎症性肠病 (IBD)、狼疮和强直性脊柱炎。一些这样的病症在下面讨论。一方面, 本发明提供治疗癌症的方法。还有其它可用 FcRn- 结合抗体治疗的病症包括: 硬皮病、斯耶格伦氏综合征 (Sjogren's syndrome)、肺出血肾炎综合征 (Goodpasture, s syndrome)、韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、风湿性多肌痛、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合症、自身免疫性阿狄森病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴细胞增生性疾病 (ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜 (ATP)、贝切特病 (Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎、慢性疲劳免疫失调综合症 (CFIDS)、慢性脱髓鞘性神经炎、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、CREST 综合症、克罗恩氏病、恶性萎缩性丘疹病 (Dego's disease)、皮炎、幼年型皮炎、盘状红斑狼疮、必需混合性冷球蛋白血症、纤维组织肌痛、纤维性肌炎、格雷夫斯病、格 - 巴二氏综合症、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病、胰岛素依赖糖尿病 (I 型)、幼年型关节炎、美尼尔氏病、混合性结蒂组织病、重症肌无力、寻常天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合症、风湿性多肌痛、多肌炎、皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、雷诺氏

现象、莱特尔氏综合征、风湿热、结节病、僵人综合征、大动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风。

[0257] 在一些实施方案中,施用抗 FcRn- 结合抗体以从血流中移除不需要的治疗性抗体。

[0258] 在一些实施方案中,施用抗 FcRn- 结合抗体以抑制抗 -HLA 抗体水平。在一些实施方案中,抗 -HLA 抗体的水平被抑制与器官移植有关。

[0259] 施用 FcRn- 结合抗体的方法描述于“Pharmaceutical Compositions”。所用分子的合适剂量将依赖于受试者的年龄和体重以及所用的特殊药物。抗体可用作竞争性试剂以抑制或减少不期望的例如天然或病理学试剂和 FcRn 之间的相互作用。

[0260] FcRn- 结合抗体可用于将大分子和微分子例如基因递送到细胞到内皮或上皮并仅靶向那些表达 FcRn 的组织用于基因治疗目的。抗体可用于递送各种细胞毒性药物,包括治疗药物、散发辐射的化合物、起源于植物、真菌或细菌的分子、生物蛋白和其混合物。细胞毒性药物可以是细胞内发挥作用的细胞毒性药物,例如短距离辐射发射体包括例如如本文描述的,短距离高能量 α -发射体。

[0261] 在多肽毒素的情况下,重组核酸技术可用于构建编码抗体和细胞毒素(或其多肽组分)的核酸作为翻译融合。然后重组核酸表达例如在细胞中且分离编码的融合多肽。

[0262] 可选地, FcRn- 结合抗体可偶联到高能辐射发射体上,例如放射性同位素,如 ^{131}I 、 γ -发射体,当定位于位点,其导致几个细胞直径的杀伤。参见例如 S. E. Order, “Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin 等, (编), pp303316 (Academic Press 1985)。其它适当的放射性同位素包括 α 发射体例如 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 和 ^{211}At , 和 β 发射体例如 ^{186}Re 和 ^{90}Y 。而且, ^{177}Lu 也可用作成像和细胞毒素试剂。

[0263] 使用 ^{131}I 、 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 标记的抗体的放射免疫疗法 (RIT) 处于紧密的临床观察之中。这三个核素的物理特征有显著差异,并且结果为了给目标组织递送最大的辐射剂量,放射性核素的选择是非常关键的。 ^{90}Y 较高的 β 能量颗粒对体积大的肿瘤可能是好的。 ^{131}I 相对低能量的 β 颗粒是理想的,但在体内放射性碘化的分子的脱卤作用对内在化抗体是主要的缺点。相比之下, ^{177}Lu 有低能量的仅 0.2 至 0.3mm 范围的 β 颗粒且给骨髓递送与 ^{90}Y 相比低得多的辐射剂量。此外,由于较长的物理半衰期(与 ^{90}Y 相比),居留时间更高。结果,可施用 ^{177}Lu 标记的试剂的较高活性(更多的 mCi 量),对骨髓有相对低的辐射剂量。有几个临床研究观察到在各种癌症的治疗中 ^{177}Lu 标记的抗体的使用 (Mulligan T 等, 1995, Clin. Cane. Res. 1:1447-1454; Meredith RF, 等, 1996, J. Nucl. Med. 37:1491-1496; Alvarez RD, 等, 1997, Gynecol. Oncol. 65:94-101)。

[0264] 治疗自身免疫的治疗方法的使用有许多益处。因为抗体特异性识别 FcRn, 其它组织是备用的且高水平的试剂被直接递送到需要治疗的位点。可有效监控治疗的临床参数。可选地,这些参数可用于指示何时应采用这种治疗。

[0265] FcRn- 结合抗体可与一种或多种存在的形式联合施用以治疗自身免疫病症,包括但不限于:静脉 Ig 治疗、非甾体抗炎药物 (NSAID) 和皮质类固醇;抗炎治疗例如环孢菌素、雷帕霉素或子囊霉素或其免疫抑制类似物,例如环孢菌素 A、环孢菌素 G、FK-506、雷

帕霉素、40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素等;环磷酰胺;咪唑硫嘌呤;甲氨蝶呤;布喹那;FTY720;来氟米特;咪唑立宾;霉酚酸;霉酚酸酯;15-去氧精肌菌素;免疫抑制单克隆抗体,例如白细胞受体的单克隆抗体,例如 MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45 或 CD58 或其配体;或其它免疫调节化合物,例如 CTLA4Ig,或其它粘附分子抑制剂,例如 mAbs 或低分子量抑制剂包括选择拮抗剂和 VLA-4 拮抗剂。这些组合疗法可以是部分免疫调节方案或治疗方案或阻止同种或异种移植的急性和慢性排斥、炎症病症或自身免疫病症。

[0266] 多发性硬化

[0267] 多发性硬化 (MS) 是以炎症和髓鞘的缺失为特征的中枢神经系统疾病。

[0268] 通过诊断 MS 的研讨通过诊断 MS 的临床确立诊断的建立标准鉴定有 MS 的患者 (Poser 等, *Ann. Neurol.* 13:227, 1983)。还可通过两次发作的迹象和脑脊髓液体中 IgG 的寡克隆带或通过结合发作、两个病灶的临床迹象和脑脊髓液体中 IgG 的寡克隆带来诊断 MS。McDonald 标准也可用于诊断 MS。McDonald 等, (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis, *Ann Neurol* 50:121-127。McDonald 标准包括在没有多次临床发作的情况下,使用 CNS 缺损随时间的 MRI 迹象以用于诊断 MS。

[0269] 多发性硬化的有效治疗可以几种不同的方式进行评估。下列参数可用于测量治疗效力。两种示例性标准包括:EDSS(残疾状态扩展评分)以及 MRI 恶化的表现(磁共振成像)。EDSS 是由于 MS 将临床缺损分级的手段 (Kurtzke, *Neurology* 33:1444, 1983)。用八种功能化的系统评估神经功能缺损的类型和严重程度。简言之,治疗前用下列系统评估患者的缺损:椎体、小脑、脑干、感觉、肠和膀胱、视觉、大脑和其它。下列按限定的间隔来进行。规模在 0(正常)至 10(归因于 MS 的死亡)的范围。一个完整步骤的减少可指示治疗有效 (Kurtzke, *Ann. Neurol.* 36:573-79, 1994)。

[0270] 与可用本文描述的方法进行治疗的多发性硬化有关的典型症状可包括:视神经炎、复视、眼球震颤、眼部测距不准、核间眼肌麻痹、运动和声音光幻视、瞳孔传入障碍、麻痹性痴呆、单肢轻瘫、下肢轻瘫、轻偏瘫、四肢轻瘫、瘫痪、截瘫、偏瘫、四肢瘫痪、四肢麻痹、痉挛状态、构音障碍、肌肉萎缩、痉挛、抽筋、肌张力减退、阵挛、肌阵挛、肌纤维颤搐、不宁腿综合征、足下垂、机能失调反应、感觉异常、麻醉、神经痛、神经性和神经源性疼痛、莱尔米特氏 (L'Hermitte's) 体征、本体感觉障碍、三叉神经痛、共济失调、意向震颤、测距不准、前庭共济失调、眩晕、演讲共济失调、肌张力障碍、轮替运动障碍、频繁排尿、膀胱痉挛状态、弛缓性膀胱、逼尿肌-括约肌协同失调、男性勃起功能障碍、性快感缺乏、性冷感、便秘、粪便紧迫性、大便失禁、抑郁、认知功能障碍、痴呆、情绪波动、情绪不稳定性、兴奋、双相情感障碍综合征、焦虑、失语症、语言障碍、疲劳、乌托夫症状 (Uhthoff's symptom)、胃食管反流和睡眠障碍。

[0271] 除了或在人研究之前,动物模型可用于评估使用两种试剂的功效。多发性硬化的典型动物模型是例如 (Tuohy 等, (*J. Immunol.* (1988) 141:1126-1130), Sobel 等, (*J. Immunol.* (1984) 132:2393-2401) 中所述实验性自身免疫脑炎 (EAE) 小鼠模型和 Traugott (*Cell Immunol.* (1989) 119:114-129)。在 EAE 感应之前可给小鼠施用本文描述的第一种和第二种试剂,然后评估小鼠的特征标准以确定在模型中使用两种试剂的功效。

[0272] 炎性肠道疾病

[0273] 炎性肠道疾病 (IBD) 一般包括慢性、复发肠炎。IBD 是指两种不同的病症, 克罗恩病和溃疡性结肠炎 (UC)。IBD 的临床症状包括: 间歇性直肠出血、腹部痉挛疼痛、体重下降和腹泻。临床指标例如溃疡性结肠炎的临床活性指标还可用于监测 IBD。另外参见 Walmsley 等, Gut. 1998 Jul; 43(1): 29-32 和 Jowett 等, (2003) Scand J Gastroenterol. 38(2): 164-71。FcRn- 结合抗体可用于改善 IBD 的至少一种症状或改善 IBD 的临床指标。

[0274] 类风湿性关节炎

[0275] 类风湿性关节炎是引起疼痛、肿胀、僵硬和关节功能丧失的自身免疫炎性疾病。类风湿性关节炎经常提呈匀称的模式。疾病可影响腕关节和最靠近手的指关节。它还可影响关节之外的身体的其它部分。此外, 患有类风湿性关节炎的人可能有疲劳、偶尔发烧和一般的不舒服。诊断类风湿性关节炎的积极因素包括“类风湿因子”血液抗体和瓜氨酸抗体。FcRn- 结合抗体在治疗、防止或缓解类风湿性关节炎或类风湿性关节炎的一种或多种症状中是有用的。

[0276] 狼疮

[0277] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是导致各种身体组织炎症和损害的自身免疫病症。SLE 可通过指导对抗其自身 DNA 的自身抗体来调节。狼疮可影响身体的很多部分, 包括关节、皮肤、肾脏、心脏、肺、血管和大脑。虽然可提呈各种症状, 最普遍的一些包括极度疲劳、关节疼痛或肿胀 (关节炎)、原因不明的发热、皮疹、和肾脏问题。狼疮的典型症状包括关节疼痛或肿胀、不明原因的发热和极度疲劳。特有的红色皮疹可能出现在鼻子和脸颊。皮疹还可能出现在脸上和耳朵、上臂、肩膀、胸部和手。狼疮的其它症状包括胸痛、头发丧失、贫血、口腔溃疡和来自冷和压力的苍白或紫的手指和脚趾。也有些人经历头痛、眩晕、抑郁、困惑或癫痫发作。SLE 诊断的积极因素包括循环的抗核抗体、抗 DNA 抗体和抗 -Sm 抗体。FcRn- 结合抗体可用于治疗、防止或缓解 SLE 或 SLE 的一种或多种症状。如本文所用的狼疮包括皮肤狼疮和肾炎狼疮。

[0278] 免疫性血小板减少症 (ITP)

[0279] ITP 是增加外围血小板破坏的疾病, 其中患者生成结合特异性的血小板膜蛋白的抗体。抗血小板抗体使血小板接受调理素作用, 导致了巨噬细胞的破坏。治疗 ITP 的尝试通常涉及抑制引起血小板水平增加的免疫系统。FcRn- 结合抗体可用于治疗、阻止或缓解 ITP 或其一种或多种症状。

[0280] 强直性脊柱炎

[0281] 强直性脊柱炎是不仅影响脊柱, 还可在骨骼和关节周围的肌腱和韧带发炎导致疼痛和僵硬时影响髋部、肩膀和膝盖的自身免疫病症。强直性脊柱炎倾向于影响后青春期和成年早期的人。FcRn- 结合抗体可用于治疗、防止或缓解强直性脊柱炎或其一种或多种症状。

[0282] 天疱疮

[0283] 天疱疮是影响黏膜和皮肤的自身免疫病症。病症以产生对桥粒芯蛋白的自身抗体为特征。桥粒芯蛋白是钙粘素家族的蛋白质且涉及将细胞互相连接的细胞桥粒的形成。可将天疱疮分类为三种类型之一: 寻常天疱疮, 病症最普遍的形式, 其中自身抗体靶向桥粒芯蛋白 3。落叶型天疱疮产生对桥粒芯蛋白 1 的自身抗体。第三种类型且最不普遍的病症是

副肿瘤天疱疮,其中自身抗体靶向与癌症例如淋巴瘤有关的桥粒斑蛋白。通常通过皮肤科医生对皮肤外观且遵照对桥粒芯蛋白自身抗体的检测来诊断病症。治疗方法包括施用类固醇和 / 或施用 CD20 抗体例如利妥昔单抗 (Rituxan)。

[0284] 癌症

[0285] 如本文所用的“癌症”是指细胞不可控制地生长,其干涉了身体器官和系统的正常功能。癌症从它们起源的位置迁移并种植在可通过受影响的器官功能性的恶化最终导致受试者死亡的至关重要的器官。癌是产生于上皮细胞并包括腺瘤和鳞状细胞癌的恶性癌症。肉瘤是连接或支持组织的癌症并包括骨肉瘤、软骨肉瘤和胃肠道间质瘤。造血癌症例如白血病,能胜过受试者正常的造血隔间,从而导致造血失败(以贫血、血小板减少和嗜中性白血球减少症的形式)最后引起死亡。本领域的普通技术人员可将癌症分为肉瘤、癌或造血癌症。

[0286] 如本文所用,癌症包括下列类型的癌症:乳腺癌、胆汁束癌、膀胱癌、脑癌包括恶性胶质瘤和成神经细胞瘤、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、血液肿瘤包括急性淋巴细胞和粒细胞性白血病、T 细胞急性淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤、毛细胞白血病、铬骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、AIDS- 相关的白血病和成人 T 细胞白血病淋巴瘤、上皮内肿瘤包括博文氏病和佩吉特氏疾病、肝癌、肺癌、淋巴瘤包括何杰金氏病和淋巴细胞淋巴瘤、成神经细胞瘤、口腔癌包括鳞状细胞癌、卵巢癌(包括那些来源于上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间叶细胞)、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤(包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤)、皮肤癌包括黑素瘤、卡波西氏肉瘤、嗜碱性粒细胞癌、和鳞状细胞癌、睾丸癌包括例如精原细胞瘤和非精原细胞瘤(畸胎瘤、绒膜癌)的胚肿瘤、间质肿瘤、和生殖细胞肿瘤、甲状腺癌包括甲状腺腺癌和髓癌、和肾癌包括腺癌和肾母细胞瘤。其它癌症将被本领域的普通技术人员所熟知。

[0287] 胎儿治疗

[0288] FcRn 介导母体 IgG 跨过上皮细胞障碍运输到胎儿。本文描述的抗体可用于递送大分子药物例如抗生素和 / 或小分子到子宫的胎儿。胎儿可能患需要治疗的病况或病症(例如肠感染或代谢病症)。用于治疗病况或病症的药物或分子可共轭到 FcRn- 结合抗体并施用于子宫中的胎儿需要治疗的孕妇。共轭的 FcRn- 结合抗体结合 FcRn 并且从而经过胎盘被运输到胎儿。胎儿接受药物或分子治疗。

[0289] 免疫吸附

[0290] 在一些实施方案中,本发明提供了从个体中移除不需要的治疗性抗体的方法。在一些实施方案中,不需要的治疗性抗体是 IgG 抗体。在一些实施方案中,不需要的治疗性抗体是抗 VLA4 抗体例如那他珠单抗 (Tysabri, Biogen Idec/Elan)、依法珠单抗 (Raptiva, Genentech)、贝伐珠单抗 (Avastin, Genentech) 和 Fc 融合蛋白例如依那西普 (Enbrel, Amgen/Wyeth)。那他珠单抗单克隆抗体治疗和进行性多灶性白质脑病 (PML) 有关。治疗性抗体从血流和 / 或身体其它部位的消耗可改变 PML 的进展。

[0291] 在一些实施方案中,本文提出的治疗方法可与方法结合以从受试者的血流中移除或部分移除治疗性抗体。在一些实施方案中,本文提出的抗 -FcRn 抗体可与能结合治疗性抗体的捕获蛋白结合,结合导致治疗性抗体血流清除率的增加。在一些实施方案中,从受试者的血流中移除或部分移除治疗性抗体的方法是血浆交换 (PLEX)。在一些实施方案中,

抗-FcRn 抗体可施用于经历血浆交换的受试者。在一些实施方案中,抗-FcRn 抗体在血浆交换过程中可用作 FcRn 的免疫吸附剂。

[0292] 在血浆交换(也称血液成分分离或血浆去除法)中,血液取自身体并且通过细胞分离器从血液中移除包含不需要的试剂例如胆固醇或治疗性抗体的血浆。血液可从机体分批移除或者它可以连续流的模式移除,且后者考虑到处理过的血液再引入到身体。弃去包含不需要的试剂的移除的血浆并且患者可接受捐赠的血浆或加入蛋白质作为回报的生理盐水。在一些实施方案中,为从血液中移除不需要的试剂,可能需要多轮血浆交换以使血液中不需要的试剂的水平降到可接受的水平。在一些实施方案中,血液“被过滤”且在将血液返回患者之前移除不需要的试剂。血浆交换的方法对本领域的技术人员是已知的,并在例如 US6,960,178 中描述。

[0293] 已显示血浆交换减少了受试者的血液中治疗性抗体的水平并且恢复动态平衡(参见例如 Khatri 等,2009;Neurology72:402-409)。

[0294] 通过用结合 IgG 的 Fc 区并从血流中移除 IgG 的捕获蛋白葡萄球菌蛋白 A 接触血液,可从血液、血浆或血清中移除基于 IgG 的治疗性抗体(例如那他珠单抗)。其它获质可用于不同的同种型抗体。在一些实施方案中,在血浆交换过程中抗-FcRn 抗体可用作捕获蛋白,导致 FcRn 从血流中移除,从而增加“游离的”治疗性抗体的量。作为结果的“游离的”治疗性抗体在治疗前比现在的抗体将有较短的半衰期,和/或可用不同的捕获蛋白(例如蛋白 A)更容易地从血液中移除。在一些实施方案中,抗-FcRn 抗体在血浆交换过程中或之前施用于患者。在一些实施方案中,FcRn 抗体可以是固定的并且以柱形式使用,导致结合 FcRn。在一些实施方案中,用固定的抗-FcRn 抗体和固定的蛋白 A 接触包含治疗性抗体的患者的血液。

[0295] 在一些实施方案中,对于已经施用并且已表现出不利影响的治疗性抗体,本文提出的抗-FcRn 抗体用于“援救”治疗。在一些实施方案中,抗-FcRn 抗体可用作血浆交换的替代物。施用抗 FcRn 可实现治疗性抗体的消耗,没有与血浆去除法和血浆交换相关的风险,例如血管通路、柠檬酸治疗和捐赠血浆来源。

[0296] 人白细胞抗原

[0297] 人白细胞抗原(HLA)在细胞外提呈肽和抗原,随后被 T-细胞识别,其反过来激活 B 细胞。可用的 HLA 基因组对每个人是独特的。任何展示“非自身”HLA 的细胞将导致免疫反应的感应。一般地,“非自身”HLA 与自身 HLA 越不同,免疫反应越强。例如,在器官移植的情况下,有相似 HLA 基因的受试者优选地将免疫反应最小化。已发现,捐赠-特异性 HLA 抗体与肾、心脏、肺和肝移植的移植失败有关。

[0298] 在一些实施方案中,本发明提供降低个体内“非自身”HLA 抗体水平的方法。降低“非自身”HLA 抗体水平可导致免疫反应的抑制,例如在器官移植期间。在一些实施方案中,将抗 FcRn 抗体施用于将经历器官移植的人。在一些实施方案中,将抗 FcRn 抗体施用于正在经历器官移植的人。在一些实施方案中,将抗 FcRn 抗体施用于已经接受器官移植的人。测量 HLA 抗体水平的测定对本领域是熟知的。

[0299] 诊断用途

[0300] 结合 FcRn 且通过本文描述的和/或本文详述的方法鉴定的抗体在体外和体内有诊断用途。

[0301] 一方面,本公开提供诊断方法用以检测体外或体内 FcRn 的存在(例如受试者体内成像)。该方法可包括将 FcRn 定位于例如胞内体的亚细胞位置。该方法可包括:(i) 使样品与 FcRn-结合抗体接触;和(ii) 检测 FcRn-结合抗体和样品间复合物的形成。该方法还可包括用抗体接触参照样品(例如对照样品),并确定与参照样品与抗体形成的复合物相比,抗体和样品间复合物的形成程度。与对照样品或受试者相比,样品或受试者中复合物形成中的变化例如统计学显著性变化可象征样品中 FcRn 的存在。

[0302] 另外的示例性方法包括:(i) 向受试者施用 FcRn-结合抗体;和(iii) 检测 FcRn-结合抗体和受试者之间复合物的形成。检测可包括确定复合物形成的位置或时间。

[0303] 可用可检测的底物直接或间接标记 FcRn-结合抗体以促进结合的或未结合的抗体的检测。适当的检测底物包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。

[0304] 可通过测量或显现结合 FcRn 的抗体或未结合的抗体来检测 FcRn-结合抗体和 FcRn 之间复合物的形成。可用传统的检测测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)或免疫组化。进一步标记 FcRn-结合抗体,利用可检测的底物标记的标准和未标记的 FcRn-结合抗体,通过竞争免疫测定可测定样品中 FcRn 的存在。在本测定的一个实施例中,生物样品、标记的标准和 FcRn-结合抗体结合在一起,且确定结合未标记的抗体上的标记的标准的量。样品中 FcRn 的量与结合 FcRn-结合抗体的标记的标准的量成反比。

[0305] 可制备荧光和发光标记的抗体。因为抗体和其它蛋白质吸收波长多达约 310nm 的光,荧光部分应该选择吸收波长大致在 310nm 以上且优选地在 400nm 以上。各种合适的荧光剂和发光剂描述于 Stryer, 1968, Science 162:526 和 Brand, L. 等, 1972, Annu. Rev. Biochem. 41:843-868。通过传统的程序例如那些公开于美国专利 No. 3, 940, 475、4, 289, 747 和 4, 376, 110, 可用荧光发光基团标记抗体。具有许多期望性质的一个荧光基团是包括荧光素和罗丹明的咕吨染料。荧光化合物的另一个基团是萘胺。一旦用荧光团或发光团标记,抗体可用于检测样品中 FcRn 的存在和位置,例如用荧光显微镜(例如共焦或反卷积显微镜)。

[0306] 组织学分析。使用本文描述的抗体进行免疫组化。例如可用标记合成抗体(例如纯化或表位标签),或用可检测的标记,例如通过偶联标记或标记结合基团。例如螯合剂可附接到抗体上。然后抗体接触组织学制剂,例如显微镜载片上的组织的固定部分。孵育结合后,洗涤制剂以移除未结合的抗体。然后分析制剂,例如用显微镜以鉴定是否抗体结合制剂上。

[0307] 当然,在结合时抗体可不被标记。结合和洗涤后,标记抗体以使其可检测。

[0308] 蛋白质测定。在蛋白质阵列中, FcRn-结合抗体也可被固定。蛋白质阵列可用作诊断工具,例如为筛选医学样品(例如分离的细胞、血液、血清、活检物等)。当然,蛋白质阵列还可包括其它配体,例如结合 FcRn 或其它靶分子的配体。

[0309] 产生多肽阵列的方法描述于例如 De Wildt 等, 2000, Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking 等, 1999, Anal. Biochem. 270:103-111; Ge, 2000, Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath 和 Schreiber, 2000, Science 289:1760-1763; W001/40803 和 W099/51773A1。阵列的多肽可高速点样,例如用可商购获得的机器人器械,例如来自 Genetic MicroSystems 或 BioRobotics。阵列底物可以是例如硝化纤维、塑料、玻璃例如表面修饰的玻璃。阵列还可包括多孔矩阵,例如丙烯酰胺、琼脂糖或另外的聚合物。

[0310] 例如,阵列可以是抗体阵列,例如在 De Wildt, supra 中描述的。产生抗体的细胞

可以阵列的形式生长在滤器上。在细胞的位置诱导抗体产生且表达的多肽固定于滤器。抗体阵列可用标记的靶标接触以确定靶标到每个固定的抗体的结合程度。关于阵列每个地址结合程度的信息可储存成特征,例如在计算机数据库中。抗体阵列可复制产生并可用于比较例如靶标的和非靶标的的结合特征。

[0311] FACS(荧光激活细胞分选)。FcRn-结合抗体可用于标记细胞,例如样品中的细胞(例如患者样品)。抗体也附接(或可附接到)到荧光化合物上。然后可用荧光激活细胞分选仪分选细胞(例如使用可从Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA获得的分选仪;还参见美国专利No. 5,627,037、5,030,002和5,137,809)。当细胞穿过分选仪,激光束激发荧光化合物同时检测器计数穿过的细胞并通过检测荧光确定是否荧光化合物附接到细胞。结合每个细胞的标记量可被定量和分析以表征样品。

[0312] 分选仪还可使细胞转向并从那些没有被抗体结合的细胞中分离被抗体结合的细胞。可培养和/或表征分离的细胞。

[0313] 体内成像。还被表征的是检测体内表达FcRn的组织的存在的方法。该方法包括(i)向受试者(例如有自身免疫病症的患者)施用共轭到可检测标记物的抗-FcRn抗体;(ii)使受试者暴露于检测上述可检测的标记物到表达FcRn的组织或细胞的方法。例如使受试者成像,例如通过NMR或其它层析成像方法。

[0314] 对诊断成像有用的标记的实例包括放射性同位素标记,例如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{188}Rh ,荧光标记例如荧光素和罗丹明,核磁共振活性标记,通过正电子发射断层摄影术("PET")扫描仪检测的正电子发射同位素,化学发光物例如荧光素和酶标记物例如过氧化物酶或磷酸酶。可应用短距离辐射发射体,例如通过短距离检测器探针可检测到的同位素。用已知的技术可用这样的试剂标记抗体。例如与放射性标记的抗体有关的技术可参见Wensel和Meares,1983, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York 以及D. Colcher等,1986, Meth. Enzymol. 121:802816。

[0315] 放射性标记的抗体还可用作体外诊断测试。同位素标记的抗体的特异活性依赖于半衰期、放射性标记的同位素纯度和标记如何与抗体合并。

[0316] 普遍已知用放射性同位素(例如 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{131}I)标记多肽的程序。例如氘标记的程序描述于美国专利No. 4,302,438。碘化的、氘标记的和 ^{35}S 标记的程序,例如适用于鼠单克隆抗体,例如通过Goding, J. W. (Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 第2版, London; Orlando: Academic Press, 1986. 第124-126页)进行描述,且本文引用参考文献。碘化多肽例如抗体的其它程序由Hunter和Greenwood, 1962, Nature 144:945, David等, 1974, Biochemistry 13:10141021, 和美国专利No. 3,867,517和4,376,110描述。在成像中有用的放射性标记的元件包括例如 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。碘化抗体的程序描述于Greenwood, F.等1963, Biochem. J. 89:114123; Marchalonis, J., 1969, Biochem. J. 113:299305; 和Morrison, M.等, 1971, Immunochemistry 28:297。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的程序描述于Rhodes, B.等, in Burchiel, S.等(编), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111123(1982), 且本文引用参考文献。适合 ^{111}In 标记抗体的程序描述于

Hnatowich, D. J. 等, 1983, J. Immunol. Methods, 65:147157, Hnatowich, D. 等, 1984, J. Applied Radiation, 35:554557, 和 Buckley, R. G. 等, 1984, F. E. B. S. 166:202204。

[0317] 在放射性标记的抗体的情况下, 抗体施用于患者, 定位于细胞承受着与抗体反应的抗原, 且用已知的技术例如放射性核素扫描, 用例如 γ 照相机或发射断层摄影术, 抗体在体内被检测或“被成像”。参见例如 A. R. Bradwell 等, “Developments in Antibody Imaging”, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin 等, (编), 第 65-85 页 (Academic Press 1985)。可选地, 正电子发射断层照相术扫描仪, 例如位于布鲁克海文国家实验室指定的 Pet VI, 可用在放射性同位素标记发射正电子处 (例如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N)。

[0318] MRI 对比剂。磁共振成像 (MRI) 使用 NMR 以显现活的受试者的内部特征, 且对预后、诊断、治疗和手术是有用的。没有放射性示踪化合物时使用 MRI 有明显益处。一些 MRI 技术概括于 EP-A-0 502 814 中。一般地, 在不同环境下, 与水质子弛豫时间常数 T1 和 T2 相关的差异用于产生图像。然而这些差异不足以提供急剧的高分辨率图像。

[0319] 这些弛豫时间常数的差异可通过对比试剂来增强。这些对比试剂的实例包括许多磁性试剂、顺磁性试剂 (主要改变 T1) 和铁磁性或超顺磁性 (主要改变 T2 反应)。螯合物 (例如 EDTA、DTPA 和 NTA 螯合物) 可用于附着 (并减小毒性) 一些顺磁性物质 (例如 Fe^{+3} 、 Mn^{+2} 、 Gd^{+3})。其它试剂可以颗粒形式, 例如直径小于 10 μm 至约 10nm。颗粒可有铁磁性、反铁磁性或超顺磁性的性质。颗粒可包括例如磁铁矿 (Fe_3O_4)、 γ - Fe_2O_3 、铁氧体和其它转换元件的磁性矿物质化合物。磁性颗粒可包括有和没有非磁性物质的一种或多种磁性晶体。非磁性物质可包括合成或天然聚合物 (例如琼脂糖、右旋糖酐、糊精、淀粉等)。

[0320] 还可用指示的基团标记 FcRn- 结合抗体, 所述基团包含 NMR 活性 ^{19}F 原子或多个此类原子, 因为 (i) 大体上所有天然的丰富的氟原子是 ^{19}F 同位素, 且因此大体上所有氟包含化合物是 NMR 活性的; (ii) 很多化学上有活性的多氟化合物例如三氟醋酸酐可以低价格商业购得; 和 (iii) 已发现很多氟化的化合物医学上人用可接受, 例如全氟化的聚醚作为血红蛋白代替品用于携带氧气。允许这样的孵育时间后, 用装置 (例如描述于 Pykett, 1982, Sci. Am. 246:7888 中的装置之一) 实施全身 MRI, 以对表达 FcRn 的组织进行定位和成像。

[0321] 本公开还表征了试剂盒, 其包含结合 FcRn 的抗体并用于诊断使用说明, 例如使用 FcRn- 结合抗体或其抗原结合片段以体外检测 FcRn, 例如在样品中, 例如来自有自身免疫病症的患者的活检物或细胞, 例如通过成像受试者。试剂盒可进一步包含至少一个另外的试剂, 例如标记或另外的诊断试剂。为体内使用抗体可配制成药物组合物。

[0322] 本发明通过下列实施例进一步阐述, 其决不应该被翻译作为进一步的限制。本申请通篇引用的所有参考文献的全部内容 (包括参考文献、授权的专利、公布的专利申请和共同未决的专利申请) 在此通过引用并入本文, 特别是对上文引用的教导。

[0323] **实施例 1: DX2504 和其半胱氨酸突变体**

[0324] DX-2504 抗 FcRn 抗体的轻链在 CDR3 的第一位上具有未配对的半胱氨酸。此半胱氨酸邻近与轻链 FR1 的半胱氨酸配对的 FR3 的半胱氨酸。我们用丝氨酸或丙氨酸构建了两个突变以代替 CDR3 的半胱氨酸 (如下所示且见图 9)。

[0325] 突变体

- [0326] 1) 532A-X53-C02:cys 至 ser 突变体
- [0327] 2) 532A-X54-B03:cys 至 ala 突变体
- [0328] 轻链DX-2504 (SEQ ID NO:8)、532A-X53-C02 (SEQ ID NO:10) 和 532A-X54-B03 (SEQ ID NO:11) 的序列比对
- [0329]

```

                FRI-L          CDR1-L          FR2-L          CDR2-L
DX-2504:      QSALTQFPASVSGSPGQSITISC TGTGSDVGSYNLVS WYQQHFGKAPKLMYIY GDSQRPS
532A-X53-C02 QSALTQFPASVSGSPGQSITISC TGTGSDVGSYNLVS WYQQHFGKAPKLMYIY GDSQRPS
532A-X54-B03 QSALTQFPASVSGSPGQSITISC TGTGSDVGSYNLVS WYQQHFGKAPKLMYIY GDSQRPS

                FR3-L          CDR3-L          FR4-L
DX-2504:      GVSNRFSGSRKSGNTASLTISGLQAEDVDYIC QSYAGSGIYV FGIQTKVTVL
532A-X53-C02 GVSNRFSGSRKSGNTASLTISGLQAEDVDYIC QSYAGSGIYV FGIQTKVTVL
532A-X54-B03 GVSNRFSGSRKSGNTASLTISGLQAEDVDYIC QSYAGSGIYV FGIQTKVTVL
    
```

- [0330] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 的尺寸排阻色谱 (SEC) 分析
- [0331] 通过 Waters2695HPLC 系统, 将 50 μg 蛋白注射到在 0.2M 磷酸钠 (pH:6.9) 中平衡的 Tosoh G3000SWXL 柱上, 并以 UV 检测来评价抗体纯度。积分峰面积用 % 单体 (即完整的抗体)、% 高分子量聚集体 (%HMW) 和 % 低分子量物种 (%LMW) 表达在表 1 中。(也参见图 1)。
- [0332] 表 1. SEC 结果汇总
- [0333]

分离物	%HMWA	% 单体	%LMW
-----	-------	------	------

[0334]

DX-2504	2.71	96.8	0.5
532A-X53-C02	1.23	98.8	NA
532A-X54-B03	1.62	98.4	NA

- [0335] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 的 SDS-PAGE 分析
- [0336] 用 50mM N- 乙基马来酰亚胺处理抗体, 然后用 SDS-PAGE 样品缓冲液和 72°C 下加热 10 分钟以阻断可导致凝胶伪影的游离巯基。将抗体 (4 μg) 加样到 4-12% 梯度的 NuPAGE 凝胶并在用 UVP 系统进行光密度测定法分析之前用简易蓝色安全染色 (Simply Blue Safe Stain) 进行染色 (表 2)。(也参见图 2)
- [0337] 表 2. 光密度测定法分析汇总
- [0338]

非还原 mAb 样品的光密度测定法分析			
带编号	DX-250	532A-X54-B0	532A-X53-C0
	4	3	2
2H/2L(单体)	81.6%	92.8%	92.4%
2H/1L	13.8%	6.5%	6.8%
2H	4.5%	0.7%	0.9%

[0339] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 的温度稳定性

[0340] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03_ 样品在 37°C 下孵育 1 个月。使用分析型 SEC, 在不同的时间点取出样品用于分析。基于 % 单体的变化来显示 DX-2504 和半胱氨酸突变体的温度稳定性。(参见图 3)。

[0341] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 的 pH 稳定性

[0342] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 样品在不同的 pH 条件下室温孵育 1 个月。使用分析型 SEC, 在不同的时间点取出样品用于分析。基于 % 单体的变化来显示 DX-2504 和半胱氨酸突变体的 pH 稳定性。(参见图 4)。

[0343] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 在 pH8.3 时的稳定性

[0344] 如在表 1 上面的段落描述的, 用 SEC 评估稳定性。在 pH8.3 时抗体的 SEC 分析已示出, 因为其示出在测试 pH 条件下 DX-2504 上半胱氨酸突变体的改进的稳定性。(参见图 5)。

[0345] 用 DTNB 滴定硫醇

[0346] 通过在变性试剂 6M 盐酸胍存在或不存在下使 10 μM 抗体与 10mM DTNB(Ellman 试剂或 5, 5'-二硫代-双(2-硝基苯甲酸)) 在 37°C 反应 0.5 小时, 然后读取 412nm 处反应的吸光度 ($\epsilon = 14, 100M^{-1}cm^{-1}$), 以评价纯化抗体溶液中游离半胱氨酸硫醇的存在。用硫醇浓度除以抗体浓度以获得 mol 硫醇/mol mAb。(参见下表 3)。

[0347] 表 3. 硫醇滴定数据汇总

[0348]

DTNB 测定 - 10μM mAb		
样品编号	游离硫醇/mol mAb	游离硫醇/mol mAb
	未变性	变性
DX-2504	0.06	0.62
532A- X54- B03	0.05	0.31
532A- X53- C02	0.05	0.25

[0349] DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 对化学变性的稳定性。

[0350] 通过监测随化学变性剂盐酸胍 (GuHCl) 浓度变化的固有荧光, 测量 DX-2504 和半

胱氨酸突变体的蛋白稳定性。用不同浓度 1 至 8M 的 GuHCl 制备 1mg/ml 的每个抗体产物。测量荧光并且对随 GuHCl 浓度变化的 360/330 强度比率作图。半胱氨酸突变体显示出结构构象变化对变性试剂的更好的稳定性。(参见图 6)。

[0351] hFcRn 和固定的 DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03 相互作用的表面等离子体共振 (SPR 或 Biacore) 动力学分析

[0352] 用 Biacore3000 进行 SPR 测量。通过在 CM5 传感器芯片上进行胺偶联以 ~ 220RU 的固定密度来固定 DX-2504、532A-X53-C02 和 532-X54-B03。为测量 DX-2504 和 FcRn 分析物相互作用的动力学参数, 将由 100nM FcRn 制备的二倍连续稀释液以 50l/min 一式两份地注射 5 分钟, 解离阶段为 15 分钟。传感器芯片表面用 30 秒脉冲的 pH1.5 的流速为 75l/min 的 10mM 谷氨酸, 然后 15 秒脉冲缓冲液进行再生。用 HBS-P 作为运行缓冲液在 25°C 进行测量。参照流动细胞被激活且在模拟胺偶联反应中被阻断。用 Biaevaluation v. 4.1 软件, 将数据拟合到 1:1 结合模型。(参见表 4、图 7 和图 8)。

[0353] 表 4. SPR 结果汇总

[0354]

	样品	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(S^{-1})$	$K_D(nM)$
pH 6.0	532A-X54-B03	1.7×10^5	3.1×10^{-4}	1.8
	532A-X53-C02	3.1×10^5	4.3×10^{-4}	1.4
	DX-2504 批号 040709	2.4×10^5	3.5×10^{-4}	1.5
pH 7.5	532A-X54-B03	1.1×10^5	2.2×10^{-4}	2.0
	532A-X53-C02	1.9×10^5	3.2×10^{-4}	1.7
	DX-2504 批号 040709	1.5×10^5	2.8×10^{-4}	1.9

[0355] 实施例 2 :DX-2504 缺失突变体

[0356] DX-2504 抗 -FcRn 抗体的重链在重链最后一位 (C-末端) 包含赖氨酸。突变体 DX-2507 (轻链 SEQ ID NO:18, 重链 SEQ ID NO:19) 包含与 DX-2504 相同的轻链和突变的重链, 该重链通过缺失 DX-2504 重链 C-末端的赖氨酸残基来构建。DX-2504 重链的 C-末端片段 (SEQ ID NO:20) 和其 DX-2507 重链 (SEQ ID NO:21) 的序列比对显示如下:

[0357] DX-2504 :SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0358] DX-2507 :SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0359] 猕猴 DX-2504 和 DX-2507 的药理学特征和毒代动力学特征

[0360] 将 6 只首次用于实验的雌性猕猴分配成两个剂量组, 每组包括 3 只动物。表 5 提

供研究设计的汇总。在研究的第 0 天和研究的第 7 天,所有动物通过皮下 (SC) 注射一次给药 20mg/kg 试验抗体。第一组动物施用 DX-2504 且第二组动物施用 DX-2507。在下列时间点从所有动物收集血液:第 0 天 (给药前和给药后 2 和 12 小时)、第 1、2、3、4、5、6 天、第 7 天 (给药前和给药后 2 和 12 小时)、第 8、9、10、11、12、13、14、17、21、24、28、31 和 35 天。用合格的 ELISA 方法 (DRD-910-029) 分析 DX-2504 和 DX-2507 的毒代动力学血清样品。用合格的 ELISA 方法 (DRD_910-033) 分析总的猕猴 IgG 水平。

[0361] 表 5. 研究设计

[0362]

组	动物	试验	剂量	途	剂	剂
组	动物	Ab	水平	径	量浓度	量体积
	编号		(mg/k g/剂量)		(mg/mL)	(mL/kg)
1	3	DX-25	20	S	18.	1.1
1	3	04		C	2	0
2	3	DX-25	20	S	35.	0.5
2	3	07		C	6	6

[0363] 从第 0 天给药后 2 小时到第 11 天在两只动物中且第 13 天在一只动物中检测 DX-2504 血清浓度。从第 0 天给药后 2 小时到第 11 天、第 12 天和第 17 天在每只动物中检测 DX-2507 血清浓度。如此获得的结果显示在试验动物中,DX-2507 的血清浓度比 DX-2504 的高很多,从而表明 DX-2507 比 DX-2504 在体内更稳定。图 13。

[0364] DX-2504 和 DX-2507 施用后,猕猴 IgG 水平降低 (图 14)。第 0 天剂量施用后,DX-2504 和 DX-2507 给药组的平均总 IgG 水平分别降低至给药前基线水平的 42% 和 33%。第 7 天给药前,在相同的治疗组中平均总 IgG 水平增加到给药前基线水平的 45% 和 37%。第 7 天剂量施用后,DX-2504 组平均总 IgG 水平降低至给药前基线值的 42% 且 DX-2507 组降低至给药前基线值的 30%。在 DX-2504- 处理的动物中第 13 天且在 DX-2507- 处理的动物中第 21 天,总 IgG 水平重新调节至给药前基线值。

[0365] DX-2504 和 DX-2507 的平均毒代动力学参数汇总在表 6 中。

[0366] 表 6 :平均 (SD) 毒代动力学参数

[0367]

试验 Ab	研究天数	C _{max} (ug/mL)	AUC _{last} (d*ug/mL)	CL/F (mL/d/Kg)	Vz/F (mL/Kg)	t1/2 (d)
DX-2504	0	51.9 (25.8)	70.8 (32.2)	341.0 (204.5)	879.1 (407.0)	1.9 (0.2)
	7*	32.0 (15.7)	47.5 (20.0)	492.3 (264.0)	312.4 (252.0)	0.4 (0.1)
DX-2507	0	75.3 (19.7)	135.6 (29.4)	152.0 (31.8)	74.1 (35.0)	0.3 (0.1)
	7*	71.6 (4.7)	120.3 (3.2)	166.3 (4.3)	73.6 (24.8)	0.3 (0.1)

[0368] * 未针对给药前的（第 7 天）基线浓度校正血清浓度特征。

[0369] DX-2504 和 DX-2507 的毒代动力学参数在第 0 天和第 7 天是基本上一致的。DX-2507 的整体暴露大于针对 DX-2504 所观察到的整体暴露。第 0 天或第 7 天 DX-2507 的平均最大浓度 (C_{max}) 和血浆 / 血清浓度时间曲线 (AUC_{last}) 值比针对 DX-2504 计算的对应值大 2 至 3 倍之间。此外, DX-2504 的对应平均表观清除率 (CL/F) 和分布体积 (Vz/F) 值比 DX-2507 大 2 至 12 倍之间。

[0370] 等同物

[0371] 上述书面说明书被认为足以使本领域技术人员实践本发明。本发明不是为了限制在提供的实施例的范围, 因为实施例旨在作为本发明一个方面的单一说明且其它功能上等价的实施方案在本发明的范围内。除了本文显示和描述的那些以外, 从前述描述各种修饰将对本领域的技术人员变得显而易见并且落在所附权利要求的范围内。本发明的优点和目的不必然涵盖于本发明的每个实施方案。

[0372] 本申请通篇所引用的所有文献、专利和公布的专利申请的内容通过引用整体并入本文, 特别是针对本文提及的用途或主题。

[0001]

序列表

<110> Dyax Corp.
Sexton, Daniel J.
TenHoor, Christopher

<120> Fc 受体结合蛋白

<130> D0617.70028WO00

<140> N/A

<141> 2012-06-01

<150> 61/492,617

<151> 2011-06-02

<150> 61/498,266

<151> 2011-06-17

<160> 26

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 365

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60

[0002]

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100 105 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115 120 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130 135 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145 150 155 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
 165 170 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
 180 185 190

Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
 195 200 205

Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
 210 215 220

Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225 230 235 240

[0003]

Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
 245 250 255

Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
 260 265 270

Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
 275 280 285

Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
 290 295 300

Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
 305 310 315 320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335

Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350

Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

<213> 黑鼠

<400> 2

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

[0004]

Leu Pro Gln Thr Trp Gly Ala Glu Pro Arg Leu Pro Leu Met Tyr His

20

25

30

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

35

40

45

Thr Gly Trp Leu Gly Ala Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Asn Leu Arg

50

55

60

Gln Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Ile Trp Glu Asn Gln Val Ser

65

70

75

80

Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu

85

90

95

Phe Leu Glu Ala Ile Arg Thr Leu Glu Asn Gln Ile Asn Gly Thr Phe

100

105

110

Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Pro Asp Asn Ser Ser

115

120

125

Leu Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Arg Phe

130

135

140

Asn Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ser Gly Glu Trp Pro Glu Thr Asp Ile

145

150

155

160

Val Gly Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Glu Ala Ala Arg Lys Glu Ser

165

170

175

Glu Phe Leu Leu Thr Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu

180

185

190

[0005]

Arg Gly Arg Gln Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu
 195 200 205

Lys Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala
 210 215 220

Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly
 225 230 235 240

Leu Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly
 245 250 255

Ser Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His
 260 265 270

His Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr
 275 280 285

Val Asp Leu Asp Ser Pro Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile
 290 295 300

Ile Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu
 305 310 315 320

Leu Trp Asn Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu
 325 330 335

Ser Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro
 340 345 350

Glu Ala Glu Pro Gln Gly Val Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser
 355 360 365

[0006]

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 黑鼠

[0007]

<400> 4

Met Ala Arg Ser Val Thr Val Ile Phe Leu Val Leu Val Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Val Val Leu Ala Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45

Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu Lys Asn Gly Lys
 50 55 60

Lys Ile Pro Asn Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Thr Asp
 85 90 95

Val Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys Glu Pro Lys Thr
 100 105 110

Val Thr Trp Asp Arg Asp Met
 115

<210> 5

<211> 1510

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

gttcctcagg tacgaggagg gcattgttgt cagtctggac cgagcccgca gagccctcc 60

tcggegfcct ggtcccgccc gtgcccggg tgicccggga ggaagggcg ggccgggggt 120

[0008]

cgggaggagt cacgtgcccc ctcccccccc aggtcgtcct ctccagcatgg gggfccccgg	180
gcctcagccc tgggcgctgg ggctcctgct cttctcctt cctgggagcc tgggcgcaga	240
aagccaccctc tccctcctgt accaccctac cgeggtgtcc tcgctgccc cggggactcc	300
tgcctcttgg gtgtccgct ggctgggccc gcagcagtac ctgagctaca atagcctgcg	360
gggcgaggcg gagccctgtg gagcttgggt ctgggaaaac caggtgtcct ggtattggga	420
gaaagagacc acagactga ggaicaagga gaagccttt ctggaagctt tcaaagcttt	480
gggggaaaaa ggtccctaca ctctgcaggg cctgctgggc tgtgaactgg gccctgacaa	540
cacctcgtg cccaccgcca agtccgacct gaacggcgag gagttcatga attcgaact	600
caagcagggc acctggggtg gggactggcc cgaggccctg gctatcagtc agcggtgcca	660
gcagcaggac aaggcggcca acaaggagct caccttctg ctattctct gcccgaccg	720
ctfgcgggag cacctggaga ggggccgagg aaacctggag tggaggagc ccccccat	780
gcgctgaag gcccgacca gcagccctgg ctttccgtg cttaacctga gcgcctctc	840
ctctacctc ccggagctgc aactcgggt cctgcggaat ggctggccg ctggcaecgg	900
ccagggtgac ttggcccca acagtacgg atcttccac gcctcgtcgt caetaacagt	960
caaaagtggc gatgagcacc actactctg cattgtcag cacgcggggc tggcgcagcc	1020
cctcagggtg gagctggaat ctccagccaa gtctccgtg ctctgtgtgg gaatcgtat	1080
cgggtcttg ctactcaagg cagcggctgt aggaggagct ctgtgtgga gaaggatgag	1140
gagtggtg ctccagccctt ggaictccct tctggagac gacaccgggg tctcctgcc	1200
cacccagggg gaggccaggt atctgattt gaaggatgta aatgtattc cagccaecgc	1260
ctgaccatcc gccattcca ctgctaaaag cgaatgtagt caggccctt tcatgctgtg	1320
agacctctg gaacactggc atctctgag ctccagaagg ggtctgggc ctagtgtcc	1380
tccctctgga gccccgtct gtggctgcc tcagttccc ctctaaac atafggctgt	1440

[0009]

ttccacctc gataatataa cacgagfttg ggcccgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1500
aaaaaaaaaa	1510
<210> 6	
<211> 984	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 6	
atggggggtcc cgcggcctca gccctgggcg ctggggctcc tgcctttct ccttctggg	60
agcctgggcg cagaaagcca cctctccctc ctgtaccacc ttaccgggt gtctctgct	120
gccccgggga ctctgcctt ctgggtgtcc ggctggctgg gcccgagca gtacctgagc	180
tacaatagcc tgcggggcga ggcggagccc tgtggagctt ggtctggga aaaccaggtg	240
tcttggattt gggagaaaga gaccacagat ctgaggatca aggagaagct ctttctggaa	300
gcttcaaag ctttgggggg aaaaggtccc tacactctgc agggcctgct gggtctgaa	360
ctgggccttg acaacacctc ggtgccacc gccaaagtcc cctgaacgg cgaggagtc	420
atgaatttcg acctcaagca gggcacctgg ggtggggact ggcccagagc cctggtatc	480
agtcagcggf ggcagcagca ggacaaggcg gccaaacaagg agctcactt cctgtatc	540
tcttccccgc accgcctgcg ggagcacctg gagaggggcc gcggaaacct ggagtggaag	600
gagccccctt ccatgctctt gaaggcccca cccagcagcc ctggctttc cgtcttacc	660
tgcagcctt tctctctta ccttccggag ctgcaactc ggttctgctg gaatggctg	720
gccgctggca ccggccaggg tgacttcgga cccaacagtg acggatcctt ccacgcctc	780
tcgtactaa cagtcaaaag tggcgtatg caccactact gctgcattgt gcagcacg	840
gggtggcgc agcccctcag ggtggagctg gaatctccag ccaagtcctc ccggccgctc	900
gacgggctac gagcatcagt aacctacta ggcgcaggcc tactactatc actactacca	960

[0010]

gcactactac gatttgggcc ataa	984
<210> 7	
<211> 987	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 7	
aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tgggcccag	60
atgtctcgtc cgtggcctt agctgtctc gcgctactc ctcttctgg cctggaggct	120
atccagcgtc ctccaaagat tcaggttac tcacgtcacc cagcagagaa tggaaagtc	180
aattcctga attgctatgt gtctgggtt catccatccg acattgaagt tgactactg	240
aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtcttcag caaggactgg	300
tctttctatc tcttgaacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc	360
cgtgtgaacc atgtgaactt gtcacagccc aagatagtta agtgggacgc agacatgtaa	420
gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca ttggattgg atgaattcca aattctgctt	480
gcttgccttt taatattgat atgcttacc acttaeactt tatgcacaaa atgtagggtt	540
ataataatgt taacatggac atgactctc ttataattc actttgagtg ctgtctccat	600
gtttgatgta tctgagcagg ttgtccaca ggtagctcta ggaggcctgg caactagag	660
gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactctca	720
atctctgca ctcaaagctt gftaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta	780
cafactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatafa atgacagga ttattggaaa	840
ttgttataa tgaatgaaac atttgtcat ataagattca tattacttc ttatacattt	900
gataaagtaa ggcattggtg tggtaactc ggtttattt tgtccacaa gttaaataaa	960
tcataaaaact tgatgtgta tctctta	987

[0011]

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DX-2504 的轻链可变区

<400> 8

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0012]

<223> DX-2504 的重链可变区

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 532A-X53-C02 的轻链可变区

[0013]

<400> 10

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 532A-X54-B03 的轻链可变区

<400> 11

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

[0014]

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 532A-X53-C02 的轻链可变区 CDR3

<400> 12

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val
 1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<223> 532A-X54-B03 的轻链可变区 CDR3

<400> 13

Ala Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val
1 5 10

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区 CDR1

<400> 14

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区 CDR2

<400> 15

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 16

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DX-2504 的全长轻链

[0016]

<400> 16

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

[0017]

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 17

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DX-2504 的全长重链

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr
 20 25 30

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

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

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

[0018]

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

Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

[0019]

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

[0020]

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 18

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DX-2507 的全长轻链

<400> 18

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

[0021]

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

130

135

140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

145

150

155

160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165

170

175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180

185

190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195

200

205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

215

<210> 19

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DX-2507 的全长重链

<400> 19

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

1

5

10

15

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

20

25

30

[0022]

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

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

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

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

Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

[0023]

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

[0024]

<223> DX-2507 重链的 C-末端片段

<400> 21

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
1 5 10 15

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 20 25 30

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 35 40 45

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链可变区 CDR1

<400> 22

Glu Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链可变区 CDR2

<400> 23

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

[0026]

Gly

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重链可变区 CDR3

<400> 24

Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr
 1 5

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DX-2504 的轻链可变区 CDR3

<400> 25

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val
 1 5 10

<210> 26
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DX-2507 的重链恒定区

<400> 26

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

[0027]

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

[0028]

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

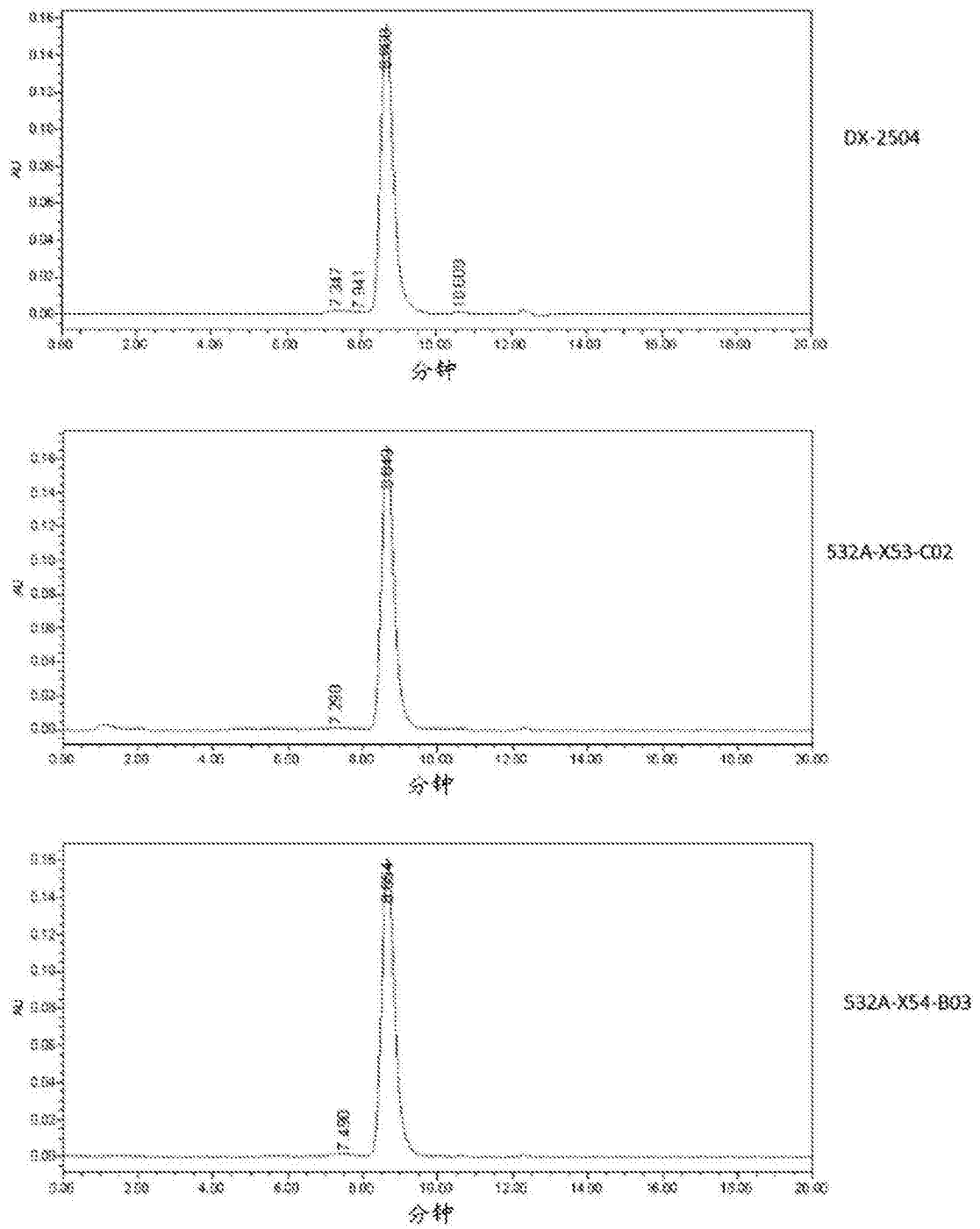


图 1

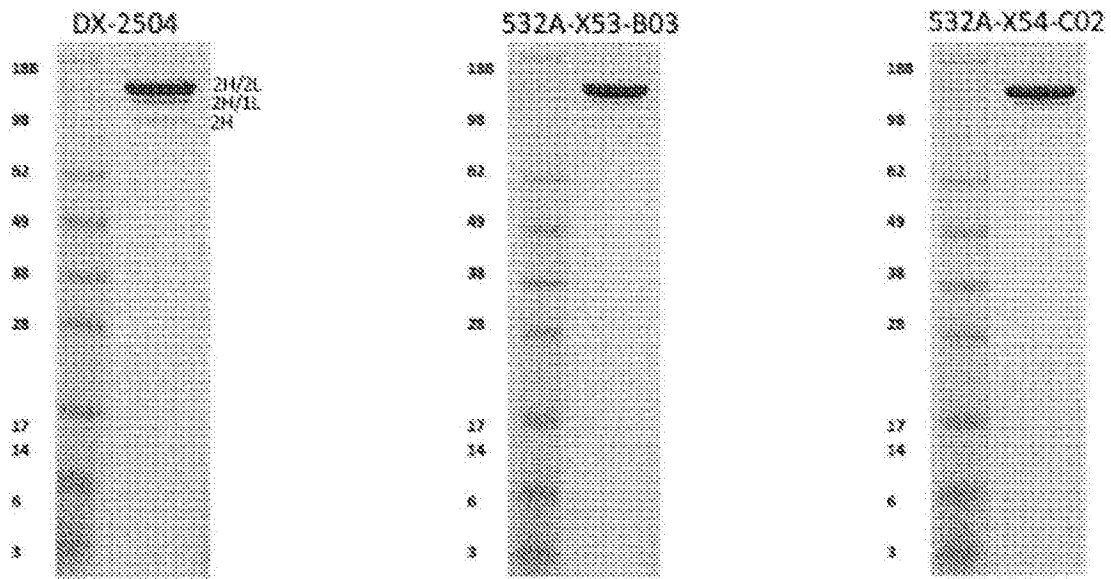


图 2

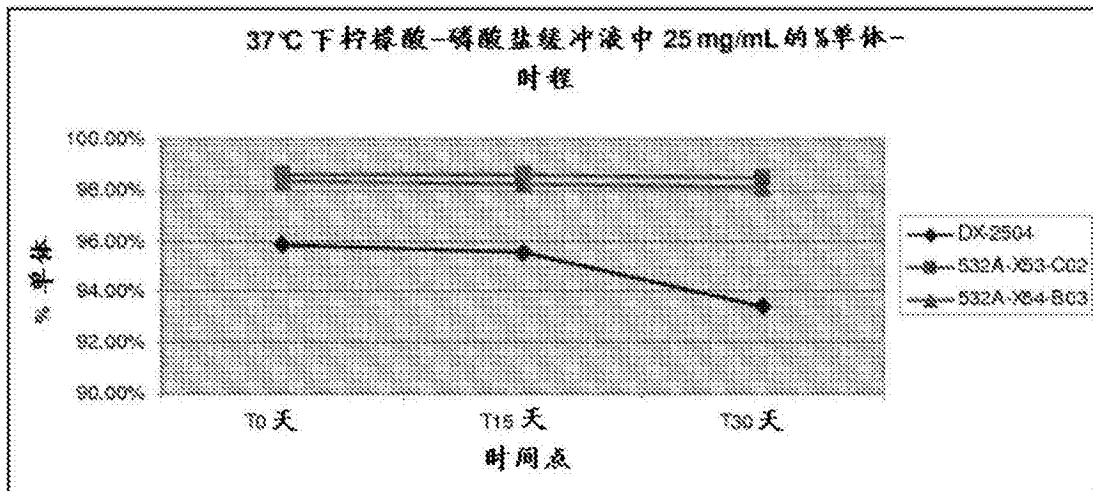


图 3

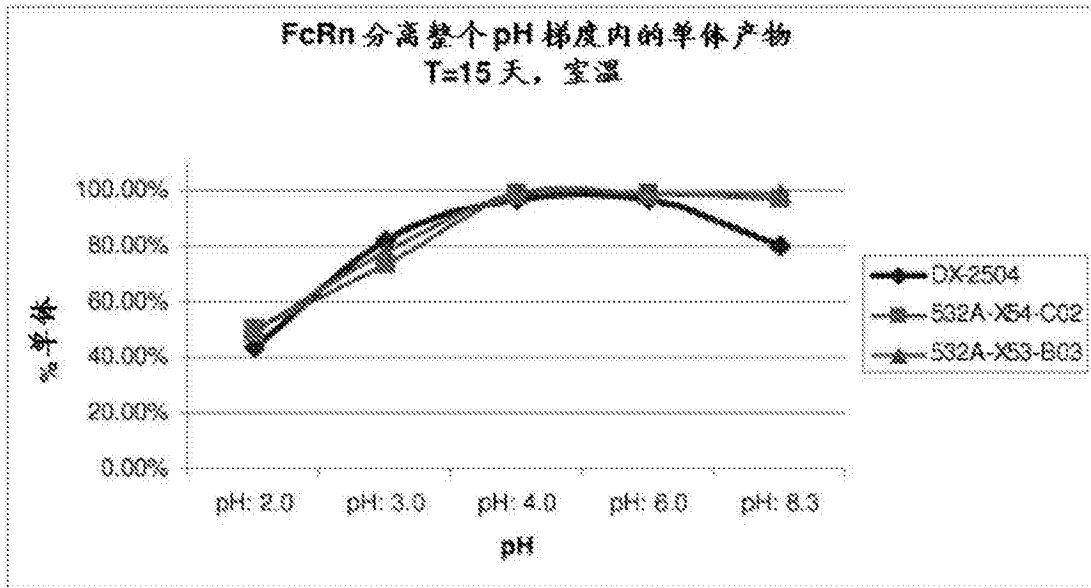


图 4

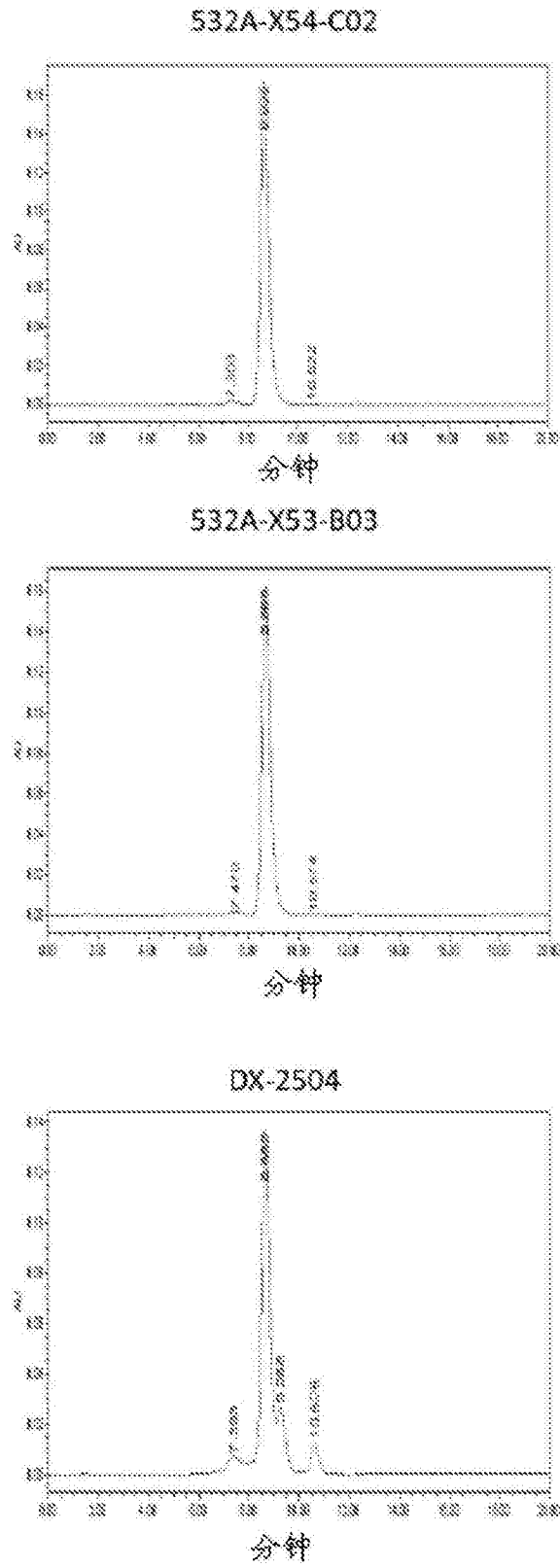


图 5

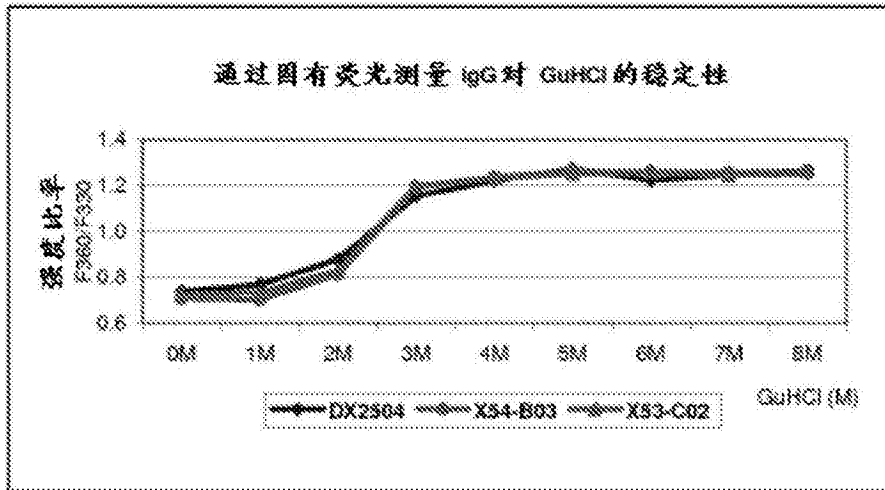


图 6

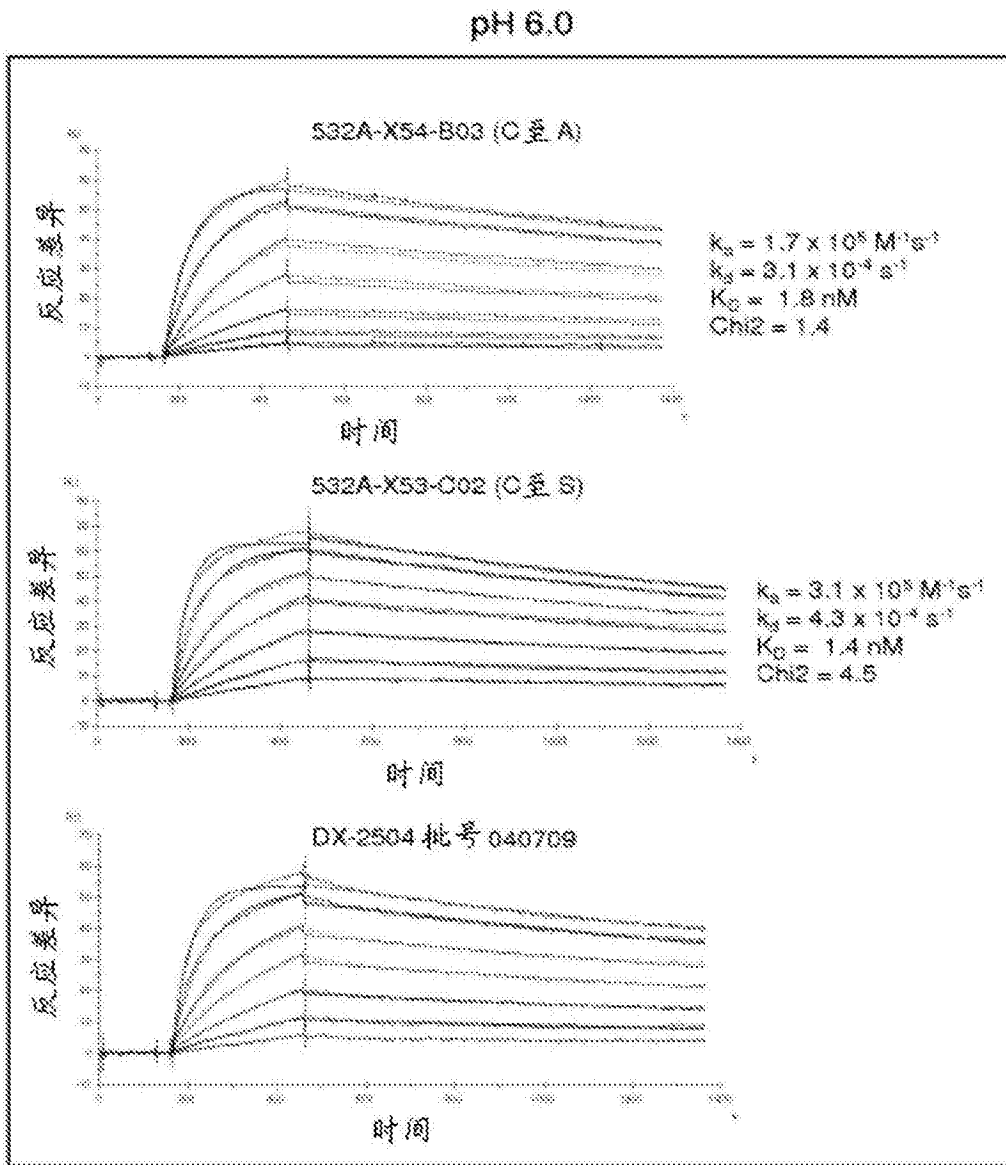


图 7

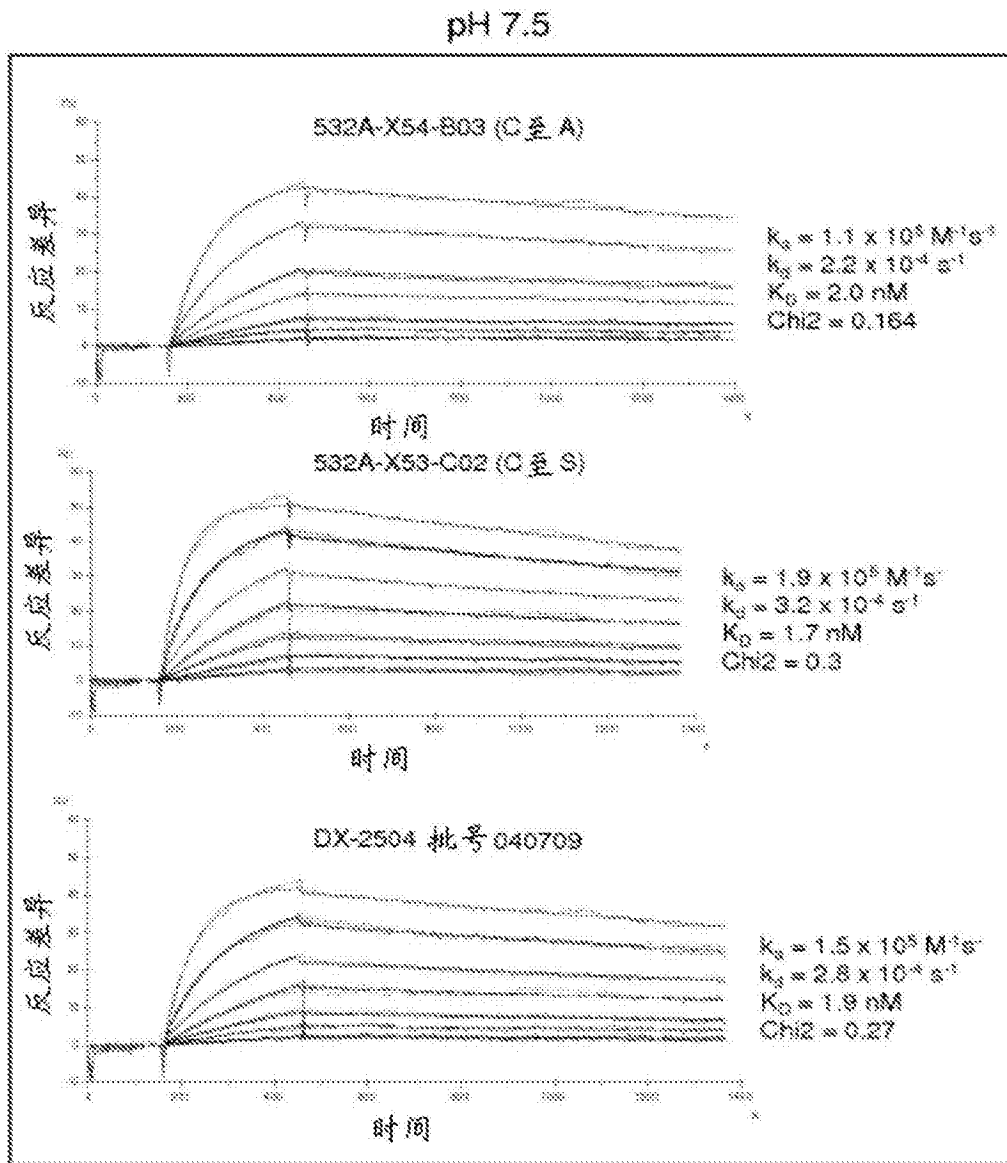


图 8

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHFGKAPKLMY	GDSQRPS
532A-X53-C02	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHFGKAPKLMY	GDSQRPS
532A-X54-B03	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQQHFGKAPKLMY	GDSQRPS

	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
DX-2504:	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X53-C02	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYAGSGIYV	FGTGTKVTVL
532A-X54-B03	GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	ASYAGSGIYV	FGTGTKVTVL

图 9

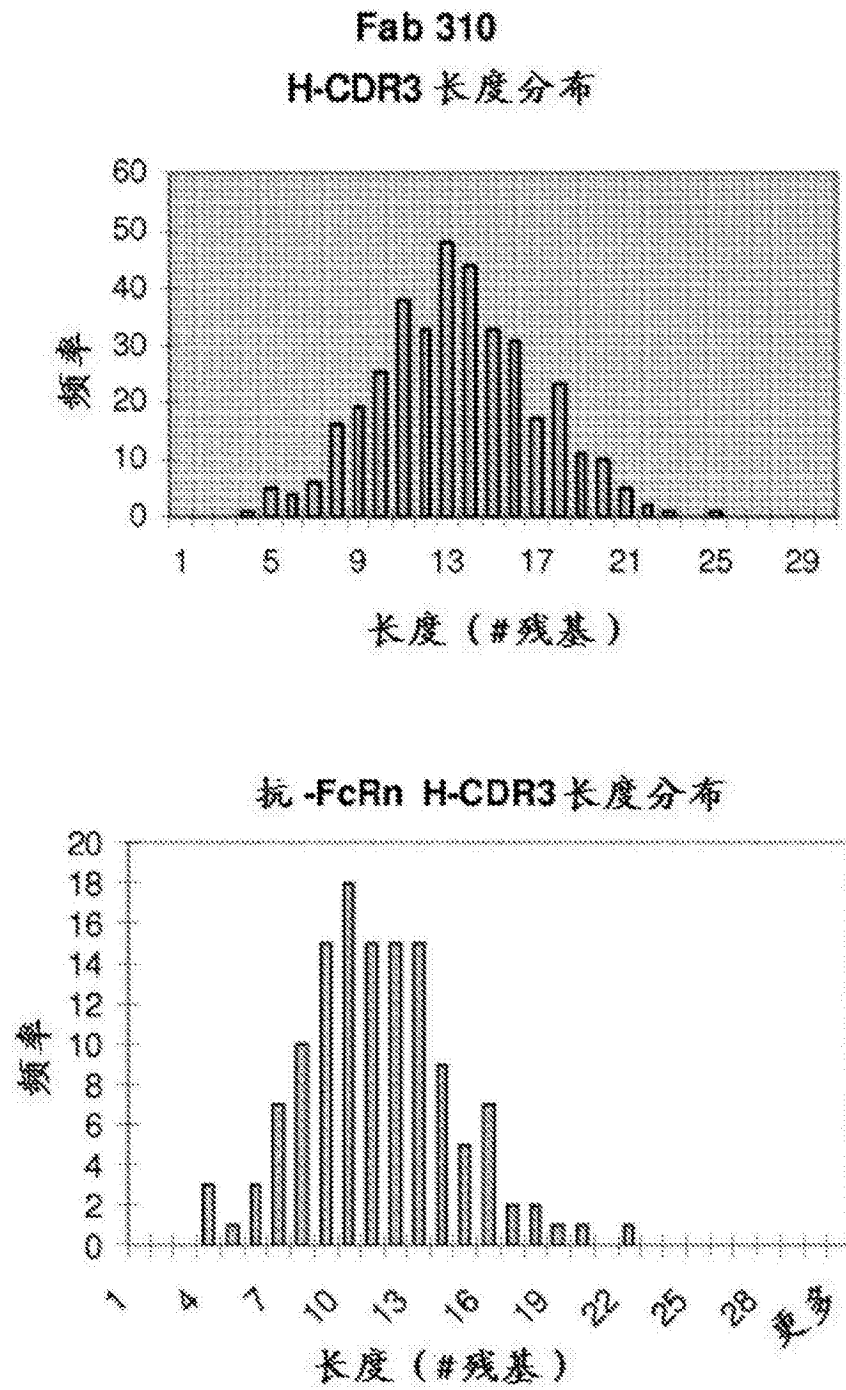


图 10

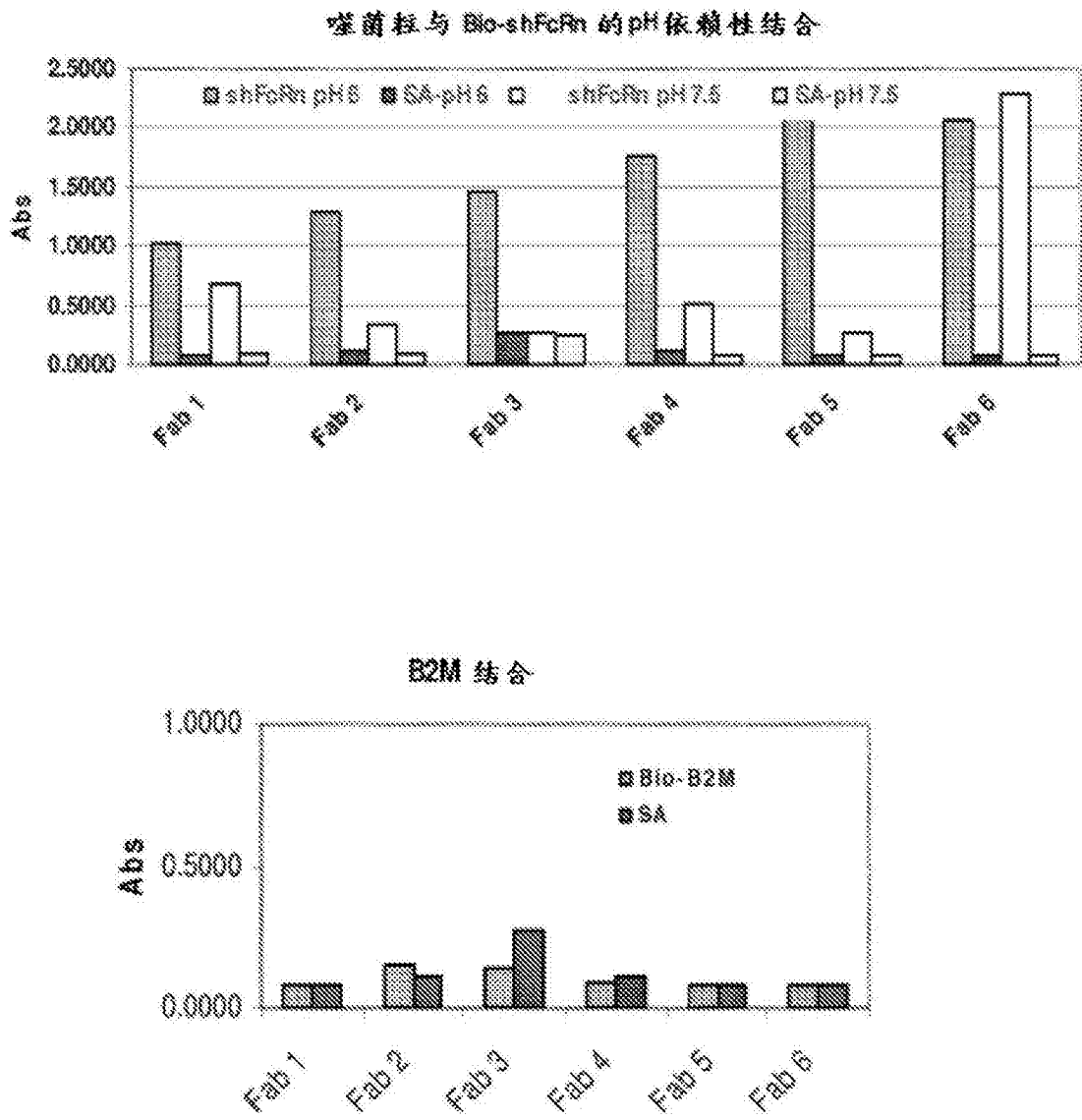


图 11

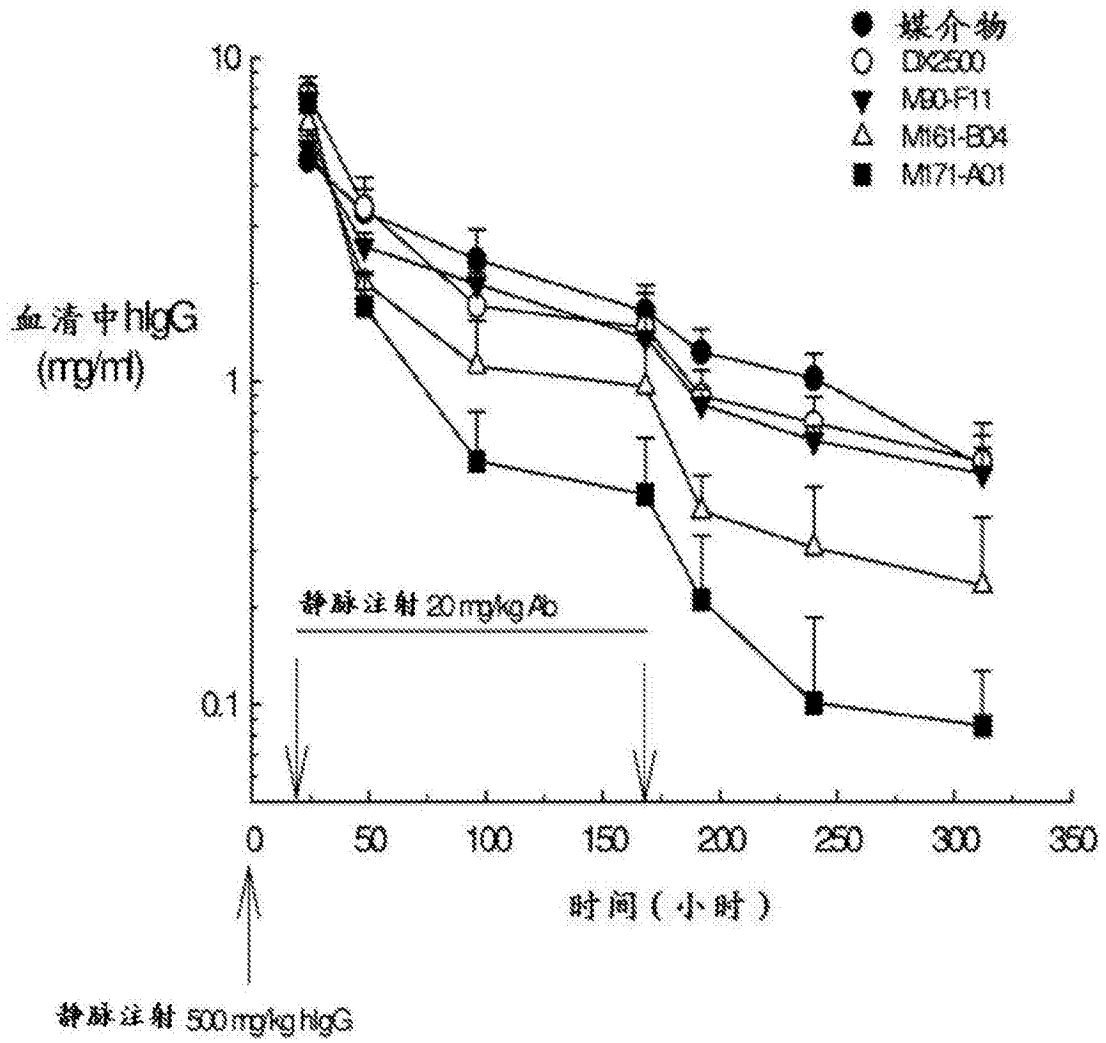


图 12

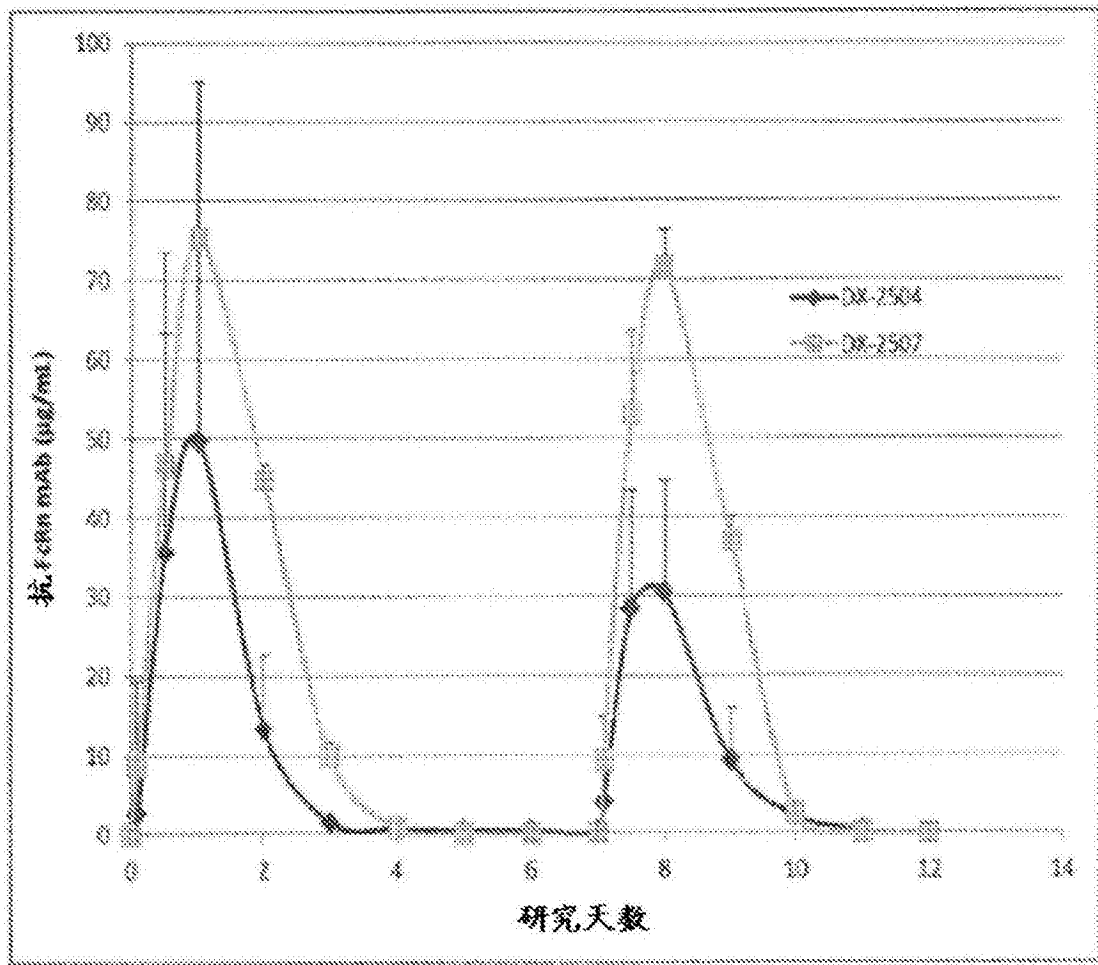


图 13

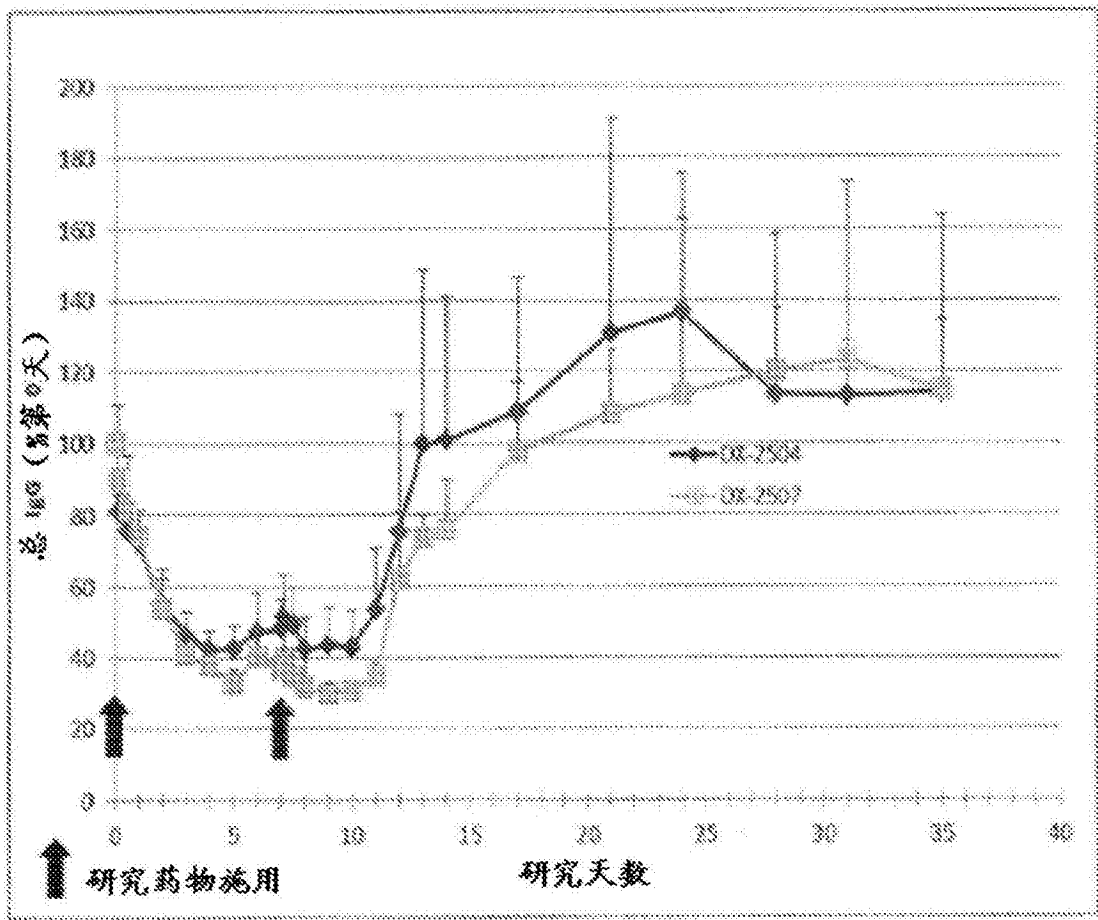


图 14