



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112142843 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 18

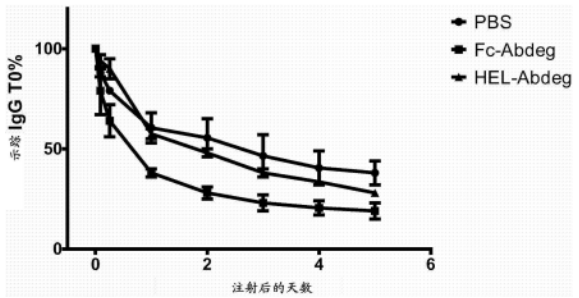
(21) 申请号 202010983097.8  
(22) 申请日 2014.12.23  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 112142843 A  
(43) 申请公布日 2020.12.29  
(30) 优先权数据  
    61/920,547 2013.12.24 US  
(62) 分案原申请数据  
    201480070435.1 2014.12.23  
(73) 专利权人 阿尔金克斯有限公司  
    地址 比利时根特兹维纳尔德  
    专利权人 德克萨斯大学系统董事会  
(72) 发明人 彼得·乌尔里希茨  
    克里斯托弗·布朗什托  
    托尔斯滕·德赖尔  
    乔纳斯·德哈德  
    E·萨利·沃德欧泊  
    尼古拉斯·G·H·恩根内  
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
    专利代理师 郑斌 刘振佳  
(51) Int.Cl.  
    C07K 16/28 (2006.01)  
    C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 1/04 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 19/04 (2006.01)  
A61P 25/08 (2006.01)  
A61P 9/00 (2006.01)  
A61P 19/00 (2006.01)  
A61P 5/14 (2006.01)  
A61P 17/04 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 7/04 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01)  
A61P 17/02 (2006.01)  
A61P 17/14 (2006.01)  
A61P 21/02 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01)  
A61P 25/28 (2006.01) (续)  
(56) 对比文件  
    US 2010266530 A1, 2010.10.21 (续)  
    审查员 陈盛峰  
    权利要求书1页 说明书21页  
    序列表4页 附图10页

(54) 发明名称  
    FcRn拮抗剂及使用方法

(57) 摘要  
    本发明涉及FcRn拮抗剂及使用方法。提供了新的FcRn拮抗剂组合物,其包含相对于天然Fc区以增加的亲和力和降低的pH依赖性与FcRn特异性结合的变体Fc区。还提供了具有增强的CD16结合亲和力的FcRn拮抗剂。还提供了使用这些FcRn拮抗剂组合物来治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病)的方法、编码所述FcRn拮抗剂组合物的核酸、用于制备所述FcRn拮抗剂组合物的重组表

达载体和宿主细胞以及包含所述FcRn拮抗剂组合物的药物组合物。



CN 112142843 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*A61P 27/02* (2006.01)

*A61P 1/02* (2006.01)

*A61P 7/06* (2006.01)

*A61P 37/06* (2006.01)

*A61P 7/00* (2006.01)

*A61P 19/02* (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2006118772 A2, 2006.11.09

1. 由变体Fc区组成的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID N0:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。
2. 权利要求1所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID N0:1中所示的氨基酸序列组成。
3. 权利要求1所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID N0:2中所示的氨基酸序列组成。
4. 权利要求1所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID N0:3中所示的氨基酸序列组成。
5. 权利要求1至4中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述FcRn拮抗剂不包含游离的半胱氨酸残基。
6. 权利要求1至4中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区对CD16a的亲和力增加。
7. 权利要求1至4中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区的Fc结构域在EU第297位包含N-连接的聚糖。
8. 权利要求1至4中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区的Fc结构域在所述Fc结构域之EU第297位包含具有等分GlcNac的N-连接聚糖。
9. 权利要求1至4中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区与半衰期延长体连接。
10. 权利要求9所述的FcRn拮抗剂,其中所述半衰期延长体是聚乙二醇或人血清白蛋白。
11. 权利要求9所述的FcRn拮抗剂,其中所述半衰期延长体是与人血清白蛋白特异性结合的结合分子。
12. 拮抗剂组合物,其包含多个权利要求7所述的FcRn拮抗剂,其中至少50%,或任选地至少60%、70%、80%、90%、95%或99%的所述FcRn拮抗剂包含变体Fc区或其FcRn结合片段,所述变体Fc区或其FcRn结合片段包含N-连接聚糖。
13. 药物组合物,其包含权利要求1至11中任一项所述的FcRn拮抗剂或权利要求12 所述的FcRn拮抗剂组合物,以及可药用载体。
14. 药物组合物,其包含权利要求1至11中任一项所述的FcRn拮抗剂或权利要求12 所述的FcRn拮抗剂组合物,以及赋形剂。
15. 核酸分子,其编码权利要求1至8中任一项所述的FcRn拮抗剂。
16. 表达载体,其包含权利要求15所述的核酸分子。
17. 宿主细胞,其包含权利要求15所述的核酸分子。
18. 宿主细胞,其包含权利要求16所述的表达载体。
19. 产生FcRn拮抗剂的方法,其包括在使得FcRn拮抗剂表达的条件下培养权利要求18 所述的宿主细胞。

## FcRn拮抗剂及使用方法

[0001] 本申请是申请号为201480070435.1的中国专利申请的分案申请,原申请是2014年12月23日提交的PCT国际申请PCT/US2014/072087于2016年6月22日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2013年12月24日提交的美国临时申请61/920,547的优先权,其在此通过引用整体并入。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及FcRn拮抗剂及使用方法。

### 背景技术

[0005] 免疫球蛋白  $\gamma$  (IgG) 抗体在很多病症的病理学中起关键作用,例如自身免疫病、炎症性疾病和其中病理学以过表达IgG抗体为特征的病症(例如,高丙球蛋白血症)(参见,例如Junghans, Immunologic Research 16(1):29(1997))。

[0006] IgG在血清中的半衰期相对于其他血浆蛋白的血清半衰期而言延长(Roopenian等, J. Immunology 170:3528(2003); Junghans和Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512(1996))。这一长半衰期部分地归因于IgG的Fc区与Fc受体(FcRn)的结合。尽管FcRn最初表征为母体IgG的新生转运受体,但是其还在成体中起保护IgG免受降解的功能。FcRn与胞饮的IgG结合并且保护IgG免于通过将其再循环回胞外室而转运至降解性溶酶体。IgG与FcRn的pH依赖性结合促进该再循环,其中与在细胞外生理pH下相比, IgG/FcRn相互作用在酸性内体pH下更强。

[0007] 当IgG的血清浓度达到超过可利用FcRn分子的水平时,未结合的IgG无法受到保护而免受降解机制并且因此血清半衰期将降低。因此,抑制IgG与FcRn结合通过阻止IgG的IgG内体再循环而降低IgG的血清半衰期。因此,拮抗IgG与FcRn结合的药剂可用于调节、治疗或预防抗体介导的病症(antibody-mediated disorder),例如自身免疫病、炎症性疾病等。拮抗IgGFc与FcRn结合之方法的一个实例涉及产生针对FcRn的封闭抗体(blocking antibody)(参见例如W02002/43658)。而且,已鉴定到结合并拮抗FcRn功能的肽(参见例如US6,212,022和US8,101,186)。另外,还已鉴定到包含FcRn结合增强并且pH依赖性降低的变体Fc受体的全长IgG抗体,其拮抗FcRn与IgG结合(参见,例如8,163,881)。然而,本领域中需要拮抗FcRn与IgG结合以用于治疗抗体介导的病症的改良药剂。

### 发明内容

[0008] 本公开内容提供了新的FcRn拮抗剂组合物。这些组合物一般性地包含相对于天然Fc区以增加的亲合力和降低的pH依赖性与FcRn特异性结合的变体Fc区或其FcRn结合片段。本发明部分地基于以下出人意料的发现:分离的变体Fc区(例如,在EU第252、254、256、433、434和436位(EU编号)分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y的变体Fc区)是在体内比包含该变体Fc

区之全长抗体更有效的FcRn拮抗剂。本公开内容的FcRn拮抗剂组合物特别地可用于降低含Fc剂(例如,抗体和免疫粘附素)的血清水平。因此,本公开内容还提供了使用本文中公开的FcRn拮抗剂组合物来治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病)的方法。还提供了编码FcRn拮抗剂组合物的核酸、用于制备FcRn拮抗剂组合物的重组表达载体和宿主细胞,以及包含FcRn拮抗剂组合物的药物组合物。

[0009] 本文中公开的FcRn拮抗剂特别地优于先前所述的FcRn拮抗剂组合物和用于抗体介导之病症的已知治疗。例如,本文中公开的FcRn拮抗剂比静脉内 $\gamma$ 球蛋白(intravenous gamma globulin, IVIG)(用于很多抗体介导之病症的当前治疗)更小且更有效。因此,所公开FcRn拮抗剂的有效剂量可远远低于IVIG的有效剂量。此外,IVIG分离且纯化自人供体,因而具有相当大的批间差异。本文中公开的FcRn拮抗剂组合物可重组产生或化学合成,因此具有远远更高的同质性。如本文中所证明的,本文中公开的FcRn拮抗剂还出人意料地比包含变体Fc受体的全长IgG抗体更有效,例如如Vaccaro等,Nature Biotech 23(9)1283-1288(1997)中所示。

[0010] 因此,在一个方面,本公开内容提供了包含变体Fc区或其FcRn结合片段的分离的FcRn拮抗剂,其中所述Fc区或片段在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y,并且其中所述FcRn拮抗剂不是全长抗体。

[0011] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂不包含抗体可变区或CH1结构域。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂不包含游离的半胱氨酸残基。在某些实施方案中,所述Fc区是IgG Fc区(例如,人IgG Fc区)。在某些实施方案中,所述Fc区是IgG1 Fc区(例如,人IgG1 Fc区)。在某些实施方案中,所述Fc区是嵌合Fc区。

[0012] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含SEQ ID NO:1中所示的变体Fc区氨基酸序列。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含变体Fc区,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂由变体Fc区组成,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列组成。

[0013] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含这样的变体Fc区:相对于野生型IgG1 Fc区对Fc $\gamma$ 受体的亲和力,其对Fc受体的亲和力改变(增加或降低)。在某些实施方案中,所述变体Fc对CD16a的亲和力增加。

[0014] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含在EU第297位不含N-连接聚糖的变体Fc区。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含在EU第297位含有无岩藻糖基化之N-连接聚糖的变体Fc区。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含在EU第297位含有具有等分(bisecting)GlcNac的N-连接聚糖的变体Fc区。

[0015] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含与半衰期延长体(half-life extender)连接的变体Fc区。在某些实施方案中,所述半衰期延长体是聚乙二醇或人血清白蛋白。在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中至少50%(任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%)的所述分子包含具有无岩藻糖基化之N-连接聚糖的变体Fc区或其FcRn结合片段。在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中至少50%(任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%)的所述分子包含变体Fc区或其FcRn

结合片段,所述变体Fc区或其FcRn结合片段包含具有等分GlcNac的N-连接聚糖。

[0016] 在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中所述组合物中超过95%的FcRn拮抗剂分子是单体(例如,超过95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%)。

[0017] 在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中所述组合物中少于5%的FcRn拮抗剂分子以聚集体存在(例如,少于5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%)。

[0018] 在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中所述组合物基本不含FcRn拮抗剂分子的降解产物。

[0019] 在另一个方面,本公开内容提供了药物组合物,其包含本文中公开的FcRn拮抗剂或FcRn拮抗剂组合物,以及可药用载体或赋形剂。

[0020] 在另一个方面,本公开内容提供了在对象中抑制FcRn功能的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的本文中公开的FcRn拮抗剂组合物。

[0021] 在另一个方面,本公开内容提供了在已施用含Fc剂(Fc-containing agent)的对象中降低所述含Fc剂的血清水平的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的本文中公开的FcRn拮抗剂组合物。在某些实施方案中,所述含Fc剂是抗体或免疫粘附素。在某些实施方案中,所述含Fc剂是治疗剂或诊断剂。在某些实施方案中,所述含Fc剂是成像剂。在某些实施方案中,所述含Fc剂是抗体药物缀合物。

[0022] 在另一个方面,本公开内容提供了在对象中治疗抗体介导的病症的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的本文中公开的FcRn拮抗剂组合物。在某些实施方案中,所述抗体介导的病症是高球蛋白血症。在某些实施方案中,所述抗体介导的病症是使用静脉内免疫球蛋白(IVIG)可治疗的疾病或病症。在某些实施方案中,所述抗体介导的病症是使用血浆去除术和/或免疫吸附可治疗的疾病或病症。

[0023] 在某些实施方案中,抗体介导的病症是自身免疫病。在某些实施方案中,自身免疫病选自同种异体胰岛移植排斥、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生病(autoimmune Addison's disease)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、抗嗜中性粒细胞胞质自身抗体(antineutrophil cytoplasmic autoantibody, ANCA)、自身免疫性肾上腺疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性嗜中性粒细胞减少、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、自身免疫性荨麻疹、贝赫切特病(Behcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼综合征(Castleman's syndrome)、腹型斯泼卢腹泻-皮炎(celiac spruce-dermatitis)、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)、丘-斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病(Crohn's disease)、皮炎、扩张型心肌病、盘状狼疮(discoid lupus)、获得性大疱性表皮松解、特发性混合型冷球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)、因子VIII缺乏、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯病(Grave's disease)、格林-巴利(Guillain-Barre)、古德帕斯丘综合征(Goodpasture's

syndrome)、移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)、桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、血友病A、特发性膜性神经病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP)、IgA神经病、IgM多神经病、免疫介导的血小板减少、幼年型关节炎、川崎病 (Kawasaki's disease)、扁平苔藓、硬化性苔藓、红斑狼疮 (lupus erthematosus)、梅尼埃病 (Meniere's disease)、混合性结缔组织病、粘膜类天疱疮、多发性硬化、1型糖尿病、多灶性运动神经病 (Multifocal motor neuropathy, MMN)、重症肌无力、副肿瘤性大疱性类天疱疮、妊娠性类天疱疮、寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、复发性多软骨炎、雷诺现象 (Reynauld's phenomenon)、赖特尔综合征 (Reiter's syndrome)、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、合格伦综合征 (Sjorgen's syndrome)、实体器官移植排斥、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安动脉炎、中毒性表皮坏死松解症 (toxic epidermal necrolysis, TEN)、史-约综合征 (Stevens Johnson syndrome, SJS)、颞动脉炎 (temporal arteritis)/巨细胞动脉炎、血栓性血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、疱疹样皮炎血管炎、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎、白斑和韦格纳肉芽肿病 (Wegner's granulomatosis)。

[0024] 在某些实施方案中,所述自身免疫病是自身免疫性离子通道病 (autoimmune channelopathy)。在某些实施方案中,所述离子通道病选自自身免疫性边缘系脑炎、癫痫、视神经脊髓炎、兰-伊肌无力综合征 (Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、重症肌无力、抗-N-甲基-D-天冬氨酸 (anti-N-Methyl-D-aspartate, NMDA) 受体脑炎、抗- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (anti- $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) 受体脑炎、莫尔旺综合征 (Morvan syndrome)、神经性肌强直、与链球菌感染相关的小儿自身免疫性神经精神障碍 (pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection, PANDAS), 和甘氨酸受体抗体相关性病症。

[0025] 在某些实施方案中,将FcRn拮抗剂与另外的治疗剂同时或依次施用于对象。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是抗炎剂。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是利妥昔单抗、达克珠单抗 (daclizumab)、巴利昔单抗 (basiliximab)、莫罗单抗-cd3 (muronomab-cd3)、英夫利昔单抗、阿达木单抗、奥马珠单抗 (omalizumab)、依法利珠单抗 (efalizumab)、那他珠单抗 (natalizumab)、托珠单抗 (tocilizumab)、依库珠单抗 (eculizumab)、戈利木单抗 (golimumab)、卡那单抗 (canakinumab)、优特克单抗 (ustekinumab) 或贝利木单抗 (belimumab)。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是白细胞消耗剂 (depleting agent)。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是B细胞消耗剂。在某些实施方案中,所述B细胞消耗剂是抗体,例如与CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD70、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85或CD86特异性结合的抗体。

[0026] 在另一个方面,本公开内容提供了编码本文中公开的FcRn拮抗剂的核酸分子。在另一个方面,本公开内容提供了表达载体,其包含编码本文中公开的FcRn拮抗剂的核酸分子。在另一个方面,本公开内容提供了宿主细胞,其包含编码本文中公开的FcRn拮抗剂的表达载体或核酸。在另一个方面,本公开内容提供了产生FcRn拮抗剂的方法,所述方法包括在使得FcRn拮抗剂表达的条件下培养本文中公开的宿主细胞。

## 附图说明

[0027] 图1描绘了确定Fc-Abdeg和HEL-Abdeg对食蟹猴(cynomolgous monkey)中示踪抗体(FR70-hIgG1)之血清水平的作用的实验的结果。

[0028] 图2描绘了确定Fc-Abdeg和HEL-Abdeg对食蟹猴中总IgG血清水平之作用的实验的结果。

[0029] 图3描绘了确定Fc-Abdeg和HEL-Abdeg对食蟹猴中白蛋白水平之作用的实验的结果。

[0030] 图4描绘了确定Fc-Abdeg和IVIG对食蟹猴中示踪抗体(FR70-hIgG1)之血清水平的作用的实验的结果。

[0031] 图5描绘了比较Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT和Fc-Abdeg-S239D/I332E对人CD16a之亲和力的ELISA测定的结果。

[0032] 图6描绘了比较Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT和Fc-Abdeg-S239D/I332E对鼠CD16-2之亲和力的ELISA测定的结果。

[0033] 图7描绘了使用Promega的基于RajiADCC报道子生物测定来确定Fc-Abdeg、Abdeg-POT和Fc-AbdegS239D/I332E对抗CD20诱导之ADCC信号的作用的实验的结果。

[0034] 图8描绘了确定Fc-Abdeg和Abdeg-POT在体外对抗CD70诱导之CD70+U266细胞裂解的作用的实验的结果。

[0035] 图9描绘了确定Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT、Fc-Abdeg-S239D/I332E和IVIG对免疫血小板减少的急性鼠模型中血小板水平之作用的实验的结果。

[0036] 图10描绘了Fc-Abdeg的示例性凝胶过滤纯化的结果。

## 具体实施方式

[0037] 本公开内容提供了新的FcRn拮抗剂组合物。这些组合物一般性地包含相对于天然Fc区以增加的亲合力和降低的pH依赖性与FcRn特异性结合的变体Fc区或其FcRn结合片段。本发明部分地基于以下出人意料的发现:分离的变体Fc区(例如,在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y的变体Fc区)是在体内比包含该变体Fc区之全长抗体更有效的FcRn拮抗剂。本公开内容的FcRn拮抗剂组合物特别地可用于降低含Fc剂(例如,抗体和免疫粘附素)的血清水平。因此,本公开内容还提供了使用本文中公开的FcRn拮抗剂组合物来治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病)的方法。还提供了编码FcRn拮抗剂组合物的核酸、用于制备FcRn拮抗剂组合物的重组表达载体和宿主细胞,以及包含FcRn拮抗剂组合物的药物组合物。

### [0038] I. 定义

[0039] 除非本文中另外定义,否则结合本发明使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。术语的含义和范围应是清楚的,但是在任何潜在不明确的情况下,本文中提供的定义优先于任何字典或外在定义。此外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。一般来说,本文中所述之结合细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学及杂交使用的命名及其技术是本领域中公知且常用的那些。

[0040] 为了可更容易地理解本发明,首先对某些术语进行了定义。



[0041] 本文中使用的术语“FcRn拮抗剂”指包含Fc区(例如,本文中公开的变体Fc区)的任何药剂,其通过Fc区与FcRn特异性结合并且抑制免疫球蛋白与FcRn结合,前提是所述药剂不是全长IgG抗体。

[0042] 本文中使用的术语“Fc区”指天然免疫球蛋白之由其两条重链的Fc结构域形成的部分。天然Fc区是同二聚体。

[0043] 本文中使用的术语“变体Fc区”指相对于天然Fc区具有一个或更多个改变的Fc区。改变可包括氨基酸替换、添加和/或缺失,额外部分的连接,和/或天然聚糖的改变。该术语涵盖其中组成Fc结构域(constituent Fc domain)彼此不同的异二聚Fc区。这样的异二聚Fc区的实例包括但不限于使用“结和孔”(knob and hole)技术制备的Fc区,如例如US 8216805中所述的,其通过引用整体并入本文。该术语还涵盖其中组成Fc结构域通过接头部分连接在一起的单链Fc区,如例如US20090252729A1和US20110081345A1中所述的,其通过引用整体并入本文。

[0044] 本文中使用的术语“Fc结构域”指在抗体之恰好位于木瓜蛋白酶切割位点上游的铰链区中开始并且在其C-末端结束的单免疫球蛋白重链部分。因此,完整的Fc结构域包含铰链(例如,上、中和/或下铰链区)结构域的一部分、CH2结构域和CH3结构域。

[0045] 本文中使用的术语“FcRn结合片段”指Fc区的足以赋予FcRn结合的部分。

[0046] 本文中使用的术语“EU位”指Fc区之根据EU编号惯例的氨基酸位置,其在Edelman, GM.等,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969)和Kabat等“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Dept.Health and Human Services,第5版,1991中进行了描述。

[0047] 本文中使用的术语“CH1结构域”指从约EU第118-215位延伸的免疫球蛋白重链的第一(最接近氨基末端)恒定区结构域。CH1结构域邻近免疫球蛋白重链分子的VH结构域和铰链区的氨基末端,但是不形成免疫球蛋白重链之Fc区的一部分。

[0048] 本文中使用的术语“铰链区”指连接CH1结构域与CH2结构域的重链分子部分。该铰链区包含约25个残基并且具有柔性,由此使得两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可细分为三个不同的结构域:上、中和下铰链结构域(Roux等J.Immunol.161:4083(1998))。本公开内容的FcRn拮抗剂可包含铰链区的全部或一部分。

[0049] 本文中使用的术语“CH2结构域”指从约EU第231-340位延伸的重链免疫球蛋白分子部分。

[0050] 本文中使用的术语“CH3结构域”包括从CH2结构域之N-末端延伸约110个残基,例如从约第341-446位(EU编号系统)延伸的重链免疫球蛋白分子部分。

[0051] 本文中使用的术语“FcRn”指新生Fc受体。示例性的FcRn分子包括由RefSeq NM\_004107中所示的FCGRT基因编码的人FcRn。

[0052] 本文中使用的术语“CD16”指抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity,ADCC)所需的Fc $\gamma$ RIII Fc受体。示例性的CD16分子包括RefSeq NM\_000569中所示的人CD16a。

[0053] 本文中使用的术语“游离的半胱氨酸”指以基本还原形式存在于成熟FcRn拮抗剂中的天然或工程化半胱氨酸氨基酸残基。

[0054] 本文中使用的术语“抗体”指包含通过二硫键相互连接的四条多肽链(两条重(H)

链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子以及其多聚体(例如,IgM)。每条重链包含重链可变区(缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域:CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL)。VH和VL区可进一步细分为称为互补决定区(complementarity determining region,CDR)的高变区,散布有称为框架区(framework regions,FR)的更保守区域。

[0055] 本文中使用的术语“N-连接聚糖”指这样的N-连接聚糖,其与Fc区之CH2结构域中存在的序列肽段(sequon)(即,Asn-X-Ser或Asn-X-Thr序列,其中X是除脯氨酸之外的任意氨基酸)中天冬酰胺侧链中的氮(N)连接。这样的N-聚糖在例如Drickamer K,Taylor ME (2006).Introduction to Glycobiology,第2版中进行了充分描述,其通过引用整体并入本文。

[0056] 本文中使用的术语“无岩藻糖基化的”指缺乏核心岩藻糖分子的N-连接聚糖,如US8067232中所述,其内容通过引用整体并入本文。

[0057] 本文中使用的术语“等分GlcNAc”指具有与核心甘露糖分子连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)分子的N-连接聚糖,如US8021856中所述,其内容通过引用整体并入本文。

[0058] 本文中使用的术语“抗体介导的病症”指由对象中抗体存在引起或加重的任何疾病或病症。

[0059] 本文中使用的术语“含Fc剂”指包含Fc区的任何分子。

[0060] 本文中使用的术语“白细胞消耗剂”指在施用之后降低对象中白细胞数目的药剂。

[0061] 本文中使用的术语“B细胞消耗剂”指在施用之后降低对象中B细胞数目的药剂。

[0062] 本文中使用的术语“T细胞消耗剂”指在施用之后降低对象中T细胞数目的药剂。

[0063] 本文中使用的术语“自身免疫性离子通道病”指由针对离子通道亚基或调节该通道之分子的自身抗体引起的疾病。

[0064] 本文中使用的术语“治疗”指本文中所述的治疗或预防措施。“治疗”的方法采用向对象(例如,患有IL-6相关性疾病或病症(例如炎症和癌症)或者易患这样的疾病或病症的对象)施用本发明的抗体或其抗原结合片段,以预防、治愈、延迟、降低疾病或病症或者复发疾病或病症的严重程度或者改善其一种或更多种症状,或者使对象的存活延长至超过在不存在此类治疗下所预期的存活。本文中使用的术语“对象”包括任何人和非人动物。

[0065] 本文中使用的术语“免疫粘附素”指包含结合蛋白(例如,受体、配体或细胞粘附分子)的功能性结构域以及Fc区的抗体样分子。

[0066] II.FcRn拮抗剂

[0067] 在一个方面,本发明提供了新的FcRn拮抗剂组合物。一般地,这些组合物包含相对于天然Fc区以增加的亲和力和降低的pH依赖性与FcRn特异性结合的变体Fc区或其FcRn结合片段。这些FcRn拮抗剂在体内抑制含Fc剂(例如,抗体和免疫粘附素)与FcRn的结合,这导致所述含Fc剂的降解速率提高并且伴随地这些药剂的血清水平降低。

[0068] 本说明书首次公开了:分离的变体Fc区(例如,在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y的变体Fc区)是在体内比包含相同变体Fc区之全长抗体更有效的FcRn拮抗剂。因此,在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物不是全长抗体。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物不包含抗体可变结构域。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物不包含抗体可变结构域或CH1结构域。然而,在某些实施方案中,所述

FcRn拮抗剂组合物可包含与一个或更多个额外的结合结构域或部分(包括抗体可变结构域)连接的变体Fc区。

[0069] 任何Fc区均可被改变以产生用于本文中公开的FcRn拮抗剂组合物的变体Fc区。一般来说,Fc区或其FcRn结合片段来自于人免疫球蛋白。然而,应理解,Fc区可来源于任何其他哺乳动物物种的免疫球蛋白,包括例如骆驼科动物(Camelid)物种、啮齿类动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠)或非人灵长类动物(例如,黑猩猩、猕猴)物种。此外,Fc区或其一部分可来源于任何免疫球蛋白种类,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,并且可来源于任何免疫球蛋白同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在某些实施方案中,Fc区是IgG Fc区(例如,人IgG区)。在某些实施方案中,Fc区是IgG1 Fc区(例如,人IgG1区)。在某些实施方案中,Fc区是包含数个不同Fc区部分的嵌合Fc区。嵌合Fc区的合适实例在US20110243966A1中示出,其通过引用整体并入本文。多种Fc区基因序列(例如,人恒定区基因序列)均可以以公共可获得的保藏物的形式得到。应认识到,本发明的范围涵盖Fc区的等位基因、变体和突变。

[0070] 可将Fc区进一步截短或内部缺失以产生其最小的FcRn结合片段。Fc区片段与FcRn结合的能力可使用本领域认可的任何结合测定(例如ELISA)来确定。

[0071] 为了增强本文中公开的FcRn拮抗剂的可制备性,优选地组成Fc区不包含任何非二硫键键合的半胱氨酸残基。因此,在某些实施方案中,所述Fc区不包含游离的半胱氨酸残基。

[0072] 本文中公开的FcRn拮抗剂组合物中可使用相对于天然Fc区以增加的亲和力和降低的pH依赖性与FcRn特异性结合的任何Fc变体或其FcRn结合片段。在某些实施方案中,所述变体Fc区包含赋予期望特征的氨基酸改变、替换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,所述变体Fc区或片段在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y。可用于变体Fc区的氨基酸序列的非限制性实例示于本文的表1中。在某些实施方案中,所述变体Fc区的Fc结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述变体Fc区的Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,FcRn拮抗剂由变体Fc区组成,其中所述变体Fc区的Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。

[0073] 表1:变体Fc区的非限制性实例的氨基酸序列

[0074]

| SEQ ID NO                               | 氨基酸序列  |
|---|--|
| 1                                       | CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT<br>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKSLSP<br><br>G     |
| 2                                       | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKS<br>LSLSPGK |
| 3                                       | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD <u>TL</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>E</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKS<br>LSLSPG  |
| EU 第 252、254、256、433 和 434 位的氨基酸以下划线表示。 |  |

[0075] 在某些实施方案中,所述变体Fc区改变(例如,增加或降低)对其他Fc受体的结合亲和力。所述变体Fc区可改变(例如,增加或降低)对一种或更多种Fc  $\gamma$  受体的结合亲和力,例如Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RIIA (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIB (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIB (CD16a) 和Fc  $\gamma$  RIIB (CD16b)。可采用本领域认可的改变对其他Fc受体之亲和力的任何方式。在某些实施方案中,改变变体Fc区的氨基酸序列。

[0076] 在某些实施方案中,如通过Kabat中所示的EU索引编号,所述变体Fc区在选自以下的一个或更多个位置处包含非天然存在的氨基酸残基:第234、235、236、239、240、241、243、244、245、247、252、254、256、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、326、327、328、329、330、332、333和334位。任选地,所述Fc区可在本领域技术人员已知的另外和/或替代位置包含非天然存在的氨基酸残基(参见,例如美国专利No.5,624,821、6,277,375、6,737,056;PCT专利公开W0 01/58957、W0 02/06919、W0 04/016750、W0 04/029207、W0 04/035752和W0 05/040217,其内容通过引用整体并入本文)。

[0077] 在某些实施方案中,如通过Kabat中所示的EU索引编号,所述变体Fc区包含选自以下的至少一个非天然存在氨基酸残基:234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、244A、247V、247G、252Y、254T、256E、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、269H、269Y、269F、269R、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、

296I、296H、269G、297S、297D、297E、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、313F、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y和332A。任选地,所述Fc区可包含本领域技术人员已知的另外和/或替代的非天然存在氨基酸残基(参见,例如美国专利No.5,624,821、6,277,375、6,737,056;PCT专利公开WO 01/58957、WO 02/06919、WO 04/016750、WO 04/029207、WO 04/035752和WO 05/040217,其内容通过引用整体并入本文)。

[0078] 可用于本文中公开的FcRn拮抗剂的其他已知Fc变体包括但不限于以下中公开的那些:Ghetie等,1997,Nat.Biotech.15:637-40;Duncan等,1988,Nature 332:563-564;Lund等,1991,J.Immunol.,147:2657-2662;Lund等,1992,Mol.Immunol.,29:53-59;Alegre等,1994,Transplantation 57:1537-1543;Hutchins等,1995,Proc Natl.Acad Sci USA,92:11980-11984;Jefferis等,1995,Immunol Lett.,44:111-117;Lund等,1995,Faseb J.,9:115-119;Jefferis等,1996,Immunol Lett.,54:101-104;Lund等,1996,J.Immunol.,157:4963-4969;Armour等,1999,Eur J Immunol 29:2613-2624;Idusogie等,2000,J.Immunol.,164:4178-4184;Reddy等,2000,J.Immunol.,164:1925-1933;Xu等,2000,Cell Immunol.,200:16-26;Idusogie等,2001,J.Immunol.,166:2571-2575;Shields等,2001,J Biol.Chem.,276:6591-6604;Jefferis等,2002,Immunol Lett.,82:57-65;Presta等,2002,Biochem Soc Trans.,30:487-490);美国专利No.5,624,821、5,885,573、5,677,425、6,165,745、6,277,375、5,869,046、6,121,022、5,624,821、5,648,260、6,528,624、6,194,551、6,737,056、6,821,505、6,277,375;美国专利公开No.2004/0002587和PCT公开WO 94/29351、WO 99/58572、WO 00/42072、WO 02/060919、WO 04/029207、WO 04/099249、WO 04/063351,其内容通过引用整体并入本文。

[0079] 在某些实施方案中,所述变体Fc区是其中组成Fc结构域彼此不同的异二聚体。产生Fc异二聚体的方法在领域中是已知的(参见,例如US 8216805,其通过引用整体并入本文)。在某些实施方案中,所述变体Fc区是其中组成Fc结构域通过接头部分连接在一起的单链Fc区。产生单链Fc区的方法在领域中是已知的(参见,例如US20090252729A1和US20110081345A1,其各自通过引用整体并入本文)。

[0080] 认为在自身免疫病中观察到的致病性IgG抗体是这些疾病的致病性诱因或者通过不适当地活化细胞Fc受体而导致疾病发展和介导疾病。聚集的自身抗体和/或与自身抗原复合的自身抗体(免疫复合物)与活化Fc受体结合,从而引起多种自身免疫病(其发生部分地由于免疫介导的针对自身组织的炎症)(参见,例如Clarkson等,NEJM 314(9),1236-1239(2013));US20040010124A1;US20040047862A1;和US2004/0265321A1,其各自通过引用整体并入本文)。因此,为了治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病),除去有害的自身抗体和阻断这些抗体之免疫复合物与活化Fc受体(例如,Fc  $\gamma$  受体,例如CD16a)的相互作用二者均将是有益的。

[0081] 因此,在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂的变体Fc区表现出与CD16a(例如,人CD16a)增加的结合。其特别有利之处在于:其允许FcRn拮抗剂额外地拮抗自身抗体的免疫复合物诱导的炎性应答,所述自身抗体通过FcRn抑制被靶向除去。可采用本领域认可的增

加对CD16a(例如,人CD16a)之亲和力的任何方式。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含含有N-连接聚糖(例如,在EU第297位)的变体Fc区。在此情况下,可通过改变聚糖结构来增加FcRn拮抗剂对CD16a的结合亲和力。对Fc区之N-连接聚糖的改变在领域中是公知的。例如,已表明,无岩藻糖基化的N-连接聚糖或具有等分GlcNac结构的N-聚糖表现出对CD16a的亲和力增加。因此,在某些实施方案中,N-连接聚糖是无岩藻糖基化的。无岩藻糖基化可使用本领域认可的任何方式来实现。例如,可在缺乏岩藻糖基转移酶的细胞中表达FcRn拮抗剂,以使得岩藻糖不会加成至变体Fc区之EU第297位的N-连接聚糖(参见,例如US 8,067,232,其内容通过引用整体并入本文)。在某些实施方案中,N-连接聚糖具有等分GlcNac结构。等分GlcNac结构可使用本领域认可的任何方式来实现。例如,可在表达 $\beta$ 1-4-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)的细胞中表达FcRn拮抗剂,以使得等分GlcNac加成至变体Fc区之EU第297位的N-连接聚糖(参见,例如US 8021856,其内容通过引用整体并入本文)。另外地或作为替代地,N-连接聚糖结构的改变还可通过体外酶促方式来实现。

[0082] 在某些实施方案中,本公开内容提供了FcRn拮抗剂组合物,其中所述组合物中包含的一部分FcRn拮抗剂分子含有经改变的聚糖结构。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中至少50%(任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%)的所述分子包含Fc区或其FcRn结合片段,所述Fc区或其FcRn结合片段具有无岩藻糖基化的N-连接聚糖。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物包含多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子,其中至少50%(任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%)的所述分子包含Fc区或其FcRn结合片段,所述Fc区或其FcRn结合片段包含具有等分GlcNac的N-连接聚糖。

[0083] 在某些实施方案中,所述变体Fc区不包含N-连接聚糖。这可使用本领域认可的任何方法来实现。例如,可在不能够进行N-连接糖基化的细胞中表达Fc变体。另外地或作为替代地,可改变Fc变体的氨基酸序列以防止或抑制N-连接糖基化(例如,通过突变NXT序列肽段)。或者,可在无细胞系统中合成Fc变体(例如,化学合成)。

[0084] 在某些实施方案中,可对FcRn拮抗剂分子进行修饰,例如通过使分子(例如,结合或成像部分)与FcRn拮抗剂共价连接以使得共价连接不阻止FcRn拮抗剂与FcRn特异性结合。例如,但不限于,可通过糖基化、乙酰化、peg化、磷酸化、酰胺化、经已知保护性封闭基团的衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质连接等对FcRn拮抗剂进行修饰。

[0085] 在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂包含与半衰期延长体连接的变体Fc区。本文中使用的术语“半衰期延长体”指当与本文中公开的FcRn拮抗剂连接时增加FcRn拮抗剂半衰期的任何分子。FcRn拮抗剂可与任何半衰期延长体连接(共价或非共价)。在某些实施方案中,所述半衰期延长体是聚乙二醇或人血清白蛋白。在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂与特异性结合对象中存在的半衰期延长体的结合分子连接,例如载血分子或细胞,例如血清白蛋白(例如,人血清白蛋白)、IgG、红细胞等。

[0086] 本文中公开的FcRn拮抗剂具有优异的可制备性。例如,如本文的实施例5中所示,其可在哺乳动物细胞中以高水平表达(例如,以6g/L在10L搅拌罐式生物反应器中的CHO细胞中)。此外,在经蛋白A纯化之后,得到的经纯化FcRn拮抗剂组合物具有非常高百分比的FcRn拮抗剂单体,并且包含极低水平的FcRn拮抗剂蛋白聚集体和降解产物。因此,在某些实施方案中,本公开内容提供了含有多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子的FcRn拮抗剂组合

物,其中所述组合物中超过95%的FcRn拮抗剂分子是单体(例如,超过95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%)。在某些实施方案中,本公开内容提供了含有多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子的FcRn拮抗剂组合物,其中所述组合物中少于5%的FcRn拮抗剂分子以聚集体存在(例如,少于5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%)。在某些实施方案中,本公开内容提供了含有多个本文中公开的FcRn拮抗剂分子的FcRn拮抗剂组合物,其中所述组合物基本不含FcRn拮抗剂分子的降解产物。

### [0087] III.FcRn拮抗剂的用途

[0088] 本公开内容的FcRn拮抗剂组合物特别地可用于降低含Fc剂(例如,抗体和免疫粘附素)的血清水平。因此,在一个方面,本公开内容提供了在对象中抑制FcRn功能的方法,所述方法一般性地包括向所述对象施用有效量的本文中公开的FcRn拮抗剂组合物(例如,药物组合物)。

[0089] 降低含Fc剂(例如,抗体和免疫粘附素)的血清水平特别地适用于治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病)。因此,在一个方面,本公开内容提供了使用本文中公开的FcRn拮抗剂组合物来治疗抗体介导的病症(例如自身免疫病)的方法。

[0090] 任何抗体介导的病症均可使用本文中公开的FcRn拮抗剂组合物来治疗。在某些实施方案中,抗体介导的病症是适合通过IVIG进行治疗的病症。在某些实施方案中,抗体介导的病症是自身免疫病。非限制性的自身免疫病包括同种异体胰岛移植物排斥、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生病、阿尔茨海默病、抗嗜中性粒细胞胞质自身抗体(ANCA)、自身免疫性肾上腺疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性嗜中性粒细胞减少、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、自身免疫性荨麻疹、贝赫切特病、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼综合征、腹型斯泼卢腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、丘-斯综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病、皮炎、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、因子VIII缺乏、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利、古德帕斯丘综合征、移植物抗宿主病(GVHD)、桥本甲状腺炎、血友病A、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、IgM多神经病、免疫介导的血小板减少、幼年型关节炎、川崎病、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、1型糖尿病、多灶性运动神经病(MMN)、重症肌无力、副肿瘤性大疱性类天疱疮、寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺现象、赖特综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、实体器官移植排斥、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安动脉炎、中毒性表皮坏死松解症(TEN)、史-约综合征(SJS)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血栓性血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、疱疹样皮炎血管炎、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎、白斑和韦格纳肉芽肿病。

[0091] 在某些实施方案中,自身免疫病是自身免疫性离子通道病。非限制性的离子通道病包括视神经脊髓炎、兰-伊肌无力综合征、重症肌无力、抗-N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体脑炎、抗- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸(AMPA)受体脑炎、莫尔旺综合征和甘氨酸受体抗体相关性病症。

[0092] 本公开内容的FcRn拮抗剂组合物特别地适于治疗以过量产生血清免疫球蛋白为特征的抗体介导的病症。因此,在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物用于治疗高丙球蛋白血症。

[0093] 所述FcRn拮抗剂组合物还可与一种或更多种其他的治疗剂组合使用。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是抗炎剂。任何抗炎剂均可与本文中公开的组合物组合使用。在某些实施方案中,所述治疗剂是利妥昔单抗、达克珠单抗、巴利昔单抗、莫罗单抗-CD3、英夫利昔单抗、阿达木单抗、奥马珠单抗、依法利珠单抗、那他珠单抗、托珠单抗、依库珠单抗、戈利木单抗、卡那单抗、优特克单抗或贝利木单抗。在某些实施方案中,所述另外的治疗剂是白细胞消耗剂(例如,B细胞或T细胞消耗剂)。任何白细胞消耗剂均可与本文中公开的FcRn拮抗剂组合物组合使用。在某些实施方案中,所述白细胞消耗剂是B细胞消耗剂。在某些实施方案中,所述白细胞消耗剂是针对细胞表面标志物的抗体。合适的细胞表面标志物包括但不限于CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD70、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85或CD86。所述FcRn拮抗剂和另外的治疗剂可通过相同或不同的施用途径同时或依次施用于对象。

[0094] 本公开内容的FcRn拮抗剂组合物还非常适于在对象中快速降低含Fc剂的血清水平。这样的快速清除在其中含Fc剂有毒性(例如,抗体-药物缀合物或具有免疫原性的药剂)的情况下是有利的,因为其降低对象对药物的暴露。快速清除在其中含Fc剂是需要低血清水平所述剂以有利于成像的成像剂的情况下也是有利的。因此,在某些实施方案中,所述FcRn拮抗剂组合物用于在已施用含Fc剂的对象中降低所述含Fc剂的血清水平。可使用本文中公开的FcRn拮抗剂组合物来降低任何含Fc剂(例如,治疗剂或诊断剂)的血清水平。含Fc剂的非限制性实例包括成像剂(例如,经标记的抗体)、抗体药物缀合物或免疫原剂(例如,非人抗体或免疫粘附素)。所述FcRn拮抗剂可与含Fc剂同时施用或依次施用(例如,在所述含Fc剂之前或之后)。

[0095] 此外,在需要施用治疗剂的疾病或病症中,对象将常常产生针对该治疗剂的抗体(例如,抗药物抗体),其转而在所述对象中阻止治疗剂可用于其预期治疗目的或者引起不良反应。因此,本文中公开的FcRn拮抗剂组合物还可用于除去对象中产生的针对治疗剂的抗体(例如,抗药物抗体)。

[0096] 本文中公开的FcRn拮抗剂组合物还可与治疗性蛋白质组合使用以通过降低IgG的水平来增强所述治疗性蛋白质的益处;其中IgG抗体导致治疗性蛋白质的生物利用度降低。在某些实施方案中,本公开内容提供了治疗由针对凝血因子之免疫应答而引起的病症的方法,其包括向对象施用治疗有效量的本文中公开的FcRn拮抗剂组合物。合适的凝血因子包括但不限于纤维蛋白原、凝血酶原、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII、因子XIII或冯·维勒布兰德因子(von Willebrand's factor)。该方法可用于在患有例如血友病A或血友病B的患者中调节或治疗或者预防针对凝血因子的免疫应答。在某些实施方案中,所述方法可用于在患有纯红细胞再生障碍(pure red cell aplasia,PRCA)的患者中调节或治疗针对例如治疗性红细胞生成素的免疫应答。

[0097] FcRn在妊娠女性中负责将母体抗体通过胎盘运输至胎儿。因此,如果向妊娠雌性施用含Fc剂(例如,治疗性抗体),则所述剂可由于FcRn介导之通过胎盘的运输而与胎儿接触。为了避免含Fc剂对胎儿发育的任何潜在有害影响,阻断FcRn的功能将是有利的。因此,



本公开内容提供了在妊娠女性中阻止含Fc剂(例如,治疗性抗体)向胎儿的胎盘转移的方法,所述方法包括将本文中公开的FcRn拮抗剂组合物与含Fc剂同时或依次(之前或之后)施用于女性。

[0098] 本文中公开的FcRn拮抗剂组合物还可用于治疗炎性病症,所述炎性病症包括但不限于哮喘,溃疡性结肠炎和炎性肠综合征变态反应,包括变应性鼻炎/鼻窦炎、皮肤变态反应(荨麻疹/风疹、血管性水肿、特应性皮炎)、食物变态反应、药物变态反应、昆虫变态反应,肥大细胞增多症,关节炎(包括骨关节炎、类风湿性关节炎和脊椎关节病)。

[0099] 用于治疗疾病或病症之基因治疗的成功实施可被对转基因所编码的治疗性蛋白质以及可能地用于递送转基因的载体具有特异性之抗体的产生所阻碍。因此,本文中公开的FcRn拮抗剂组合物可与基因治疗组合施用以通过降低IgG的水平来增强所编码治疗性蛋白质的益处。这些方法特别地可用于其中IgG抗体导致基因治疗载体或所编码的治疗性蛋白质之生物利用度降低的情形。基因治疗载体可以是例如病毒载体,例如腺病毒和腺相关病毒。可使用基因治疗来治疗的疾病包括但不限于囊性纤维化、血友病、PRCA、肌营养不良或溶酶体贮积症,例如,如戈谢病(Gaucher's disease)和法布里病(Fabry's disease)。

[0100] 本领域技术人员将能够通过常规实验来确定可用于治疗抗体介导的病症目的之FcRn拮抗剂组合物的有效无毒量是多少。例如,多肽的治疗活性量可根据以下因素而改变,例如对象的疾病期(例如,I期相对于IV期)、年龄、性别、医疗并发症(例如,免疫抑制性病症或疾病)和体重,以及抗体在对象中引发期望应答的能力。可对剂量方案进行调整以提供最佳治疗应答。例如,可每日施用数个分开的剂量,或者可根据治疗情况的迫切情况的指示按比例地减少剂量。然而,一般来说,预期有效剂量为约0.1至10,000mg/kg体重/天,例如约1至1000、约10至500,或者约50至250mg/kg体重/天(例如,约70mg/kg体重/天)。

#### [0101] IV. 药物组合物

[0102] 在另一个方面,本公开内容提供了药物组合物,其包含本文中公开的FcRn拮抗剂或FcRn拮抗剂组合物,以及可药用载体或赋形剂。合适的药用载体的实例在Remington's Pharmaceutical Sciences中由E.W.Martin进行了描述。赋形剂的实例可包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。所述组合物还可包含pH缓冲剂,和湿润剂或乳化剂。

[0103] 所述药物组合物可配制成用于通过推注肠胃外施用(例如,静脉内或肌内)。注射用制剂可以以单位剂量形式存在于例如添加有防腐剂的安瓿或多剂量容器中。所述组合物可采用例如在油性或水性载剂中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式,并且包含配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可为用于与合适载剂(例如,无热原水)组合的散剂的形式。

[0104] FcRn拮抗剂可与螯合剂(例如美国专利No.5,326,856中所述的那些)连接。然后,可对肽-螯合剂复合物进行放射性标记以提供用于诊断或治疗涉及调节IgG水平的疾病或病症的成像剂。

#### [0105] V. FcRn拮抗剂的产生

[0106] 在一个方面,本发明提供了编码本文中公开的FcRn拮抗剂的多核苷酸、载体和宿主细胞。还提供了制备FcRn拮抗剂的方法,其包括表达这些多核苷酸。

[0107] 通常将编码本文中公开的FcRn拮抗剂的多核苷酸插入在表达载体中以用于引入宿主细胞中,所述宿主细胞可用于产生期望量的所要求保护的FcRn拮抗剂。因此,在某些方面,本发明提供了包含本文中公开的多核苷酸的表达载体以及包含这些表达载体和多核苷酸的宿主细胞。

[0108] 出于说明书和权利要求书的目的,术语“载体”或“表达载体”在此用于意指根据本发明作为用于将期望基因引入到细胞中并在细胞中表达该期望基因的媒介物(vehicle)使用的载体。本领域技术人员知道,这样的载体可容易地选自质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒。一般来说,适于本发明的载体将包含选择标志物、有利于克隆期望基因的合适限制性位点以及进入真核生物或原核生物细胞和/或在其中复制的能力。

[0109] 多种表达载体系统均可用于本发明的目的。例如,一类载体利用来源于动物病毒的DNA元件,所述动物病毒例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒。另一些涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外地,已使DNA整合到其染色体中的细胞可通过引入允许选择经转染宿主细胞的一种或更多种标志物来选择。所述标志物可赋予营养缺陷型宿主原养型、赋予杀生物剂抗性(例如,抗生素)或针对重金属(例如铜)的抗性。可使可选择标志物基因与待表达的DNA序列直接连接,或者通过共转化将其引入到同一细胞中。mRNA的最佳合成还可需要其他元件。这些元件可包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0110] 更一般地,一旦已经制备了编码FcRn拮抗剂的载体或DNA序列,就可将表达载体引入到合适的宿主细胞中。即,可转化宿主细胞。质粒向宿主细胞中的引入可通过本领域技术人员公知的多种技术来完成。这些技术包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、与有包膜的DNA的细胞融合、微注射和用完整病毒感染。参见,Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors"第24.2章,第470-472页Vectors,Rodriguez and Denhardt,编辑(Butterworths,Boston,Mass.1988)。更优选地,通过电穿孔来将质粒引入宿主中。将经转化的细胞在适于产生FcRn拮抗剂的条件培养,并测定FcRn拮抗剂的表达。示例性的测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或荧光激活细胞分选仪分析(FACS)、免疫组织化学等。

[0111] 本文中使用的术语“转化”应以广泛含义使用,指将DNA引入接受者宿主细胞中,从而改变基因型并由此导致接受者细胞的改变。

[0112] 同样地,“宿主细胞”指已转化有载体的细胞,所述载体使用重组DNA技术构建并且编码至少一种异源基因。除非另外明确指出,否则在描述用于从重组宿主分离多肽的方法时,术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用,指代FcRn拮抗剂的来源。换言之,从“细胞”回收FcRn拮抗剂可意指从沉降的全细胞,或者从同时含有培养基和悬浮细胞的细胞培养物回收。

[0113] 在一个实施方案中,用于FcRn拮抗剂表达的宿主细胞系来源于哺乳动物;本领域技术人员可确定最适于待在其中表达期望基因产物的特定宿主细胞系。示例性的宿主细胞系包括但不限于DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR<sup>-</sup>)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(具有SV40 T抗原的CVI衍生物)、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)、293(人肾)。在一个实施方案中,所述细胞系使得由其表达的FcRn拮抗剂的

糖基化改变,例如无岩藻糖基化(例如,PER.C6.RTM.(CruCell)或FUT8敲除CHO细胞系(Potelligent™ Cells)(Biowa,Princeton,N.J.))。在一个实施方案中,可使用NS0细胞。特别地优选CHO细胞。宿主细胞系通常可从商业服务美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)获得,或者可从公开文献获得。

[0114] 体外产生允许扩大规模以得到大量的期望FcRn拮抗剂。用于在组织培养条件下进行哺乳动物细胞培养的技术在本领域中是已知的并且包括在例如气升式反应器或连续搅拌反应器中的均匀悬浮培养,或者在例如中空纤维、微胶囊中、在琼脂糖微珠或陶瓷筒(ceramic cartridge)上的固定化或截留式细胞培养。如果需要和/或期望的话,可通过常规的色谱方法(例如凝胶过滤、离子交换色谱法、经DEAE-纤维素的色谱法和/或(免疫-)亲和色谱法)纯化多肽的溶液。

[0115] 还可在非哺乳动物细胞(例如细菌或酵母或植物细胞)中表达编码本发明FcRn拮抗剂的基因。就此而言,应认识到,还可转化多种单细胞非哺乳动物微生物,例如细菌;即,能够在培养物中生长或发酵的那些。易经受转化的细菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae)的成员,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽胞杆菌科(Bacillaceae),例如枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌属(*Pneumococcus*);链球菌属(*Streptococcus*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)。还应认识到,当在细菌中表达时,FcRn拮抗剂可变成包涵体的一部分。必须将FcRn拮抗剂分离、纯化并随后组装成功能性分子。除原核生物之外,还可使用真核微生物。真核微生物中最常用的是酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)或常见的面包酵母(baker's yeast),但是多种其他菌株通常也是可利用的。

[0116] 除基于细胞的表达系统之外,还可使用无细胞或化学合成方法来产生FcRn拮抗剂。在某些实施方案中,通过体外化学合成来产生FcRn拮抗剂。

#### [0117] IV. 举例说明

[0118] 通过以下实施例对本发明进行进一步举例说明,所述实施例不应理解为进行进一步限制。序列表、附图以及本申请通篇引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容均明确地通过引用并入本文。

#### [0119] 实施例1:Fc-Abdeg对食蟹猴中血清IgG水平的作用

[0120] 在食蟹猴中确定人抗溶菌酶IgG(HEL-Abdeg)和人IgG Fc区(Fc-Abdeg)(在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y)(Fc-Abdeg;SEQ ID NO:2)对示踪抗体之血清IgG水平的作用。具体地,通过i.v.推注向食蟹猴施用1mg/kg的抗鼠CD70 hIgG1示踪抗体(FR70-hIgG1;Oshima等,Int Immunol 10(4):517-26(1998))。5分钟后,向动物输注7mg/kg Fc-Abdeg、20mg/kg HEL-Abdeg或PBS(每组两只猴)。在1小时之内进行输注并且向动物施用10ml/kg的体积。在给药前("pre-dose")5分钟以及输注完成后5分钟、2小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时和120小时采集血样(3x 150μl)。通过mCD70结合ELISA来确定示踪剂水平并将数据相对于给药结束时的示踪剂水平绘图(图1)。还确定了食蟹猴的总IgG水平(图2)。这些实验的结果示出Fc-Abdeg比等摩尔量的HEL-Abdeg更有效地降低示踪抗体。

[0121] 除在IgG补救途径中的关键作用之外,FcRn还参与白蛋白稳态(Chaudhury等,J Exp Med.197(3):315-22(2003))。FcRn在不同的位点与IgG-Fc和白蛋白相互作用并且可同

时发生结合(Andersen等,Nat Commun.3:610(2012))。从概念上讲,使用经Abdeg修饰的分子阻断IgG再循环应不会干扰白蛋白-FcRn相互作用。这种假设在小鼠体内研究中得到证实,其中作者表明带有Abdeg的hIgG1分子对白蛋白水平无影响(Patel等,J Immunol 187(2):1015-22(2011))。在上述实验中,还在输注完成后第-3天、第3天和第17天确定白蛋白水平。与小鼠研究类似,在Fc-Abdeg或HEL-Abdeg处理之后未观察到白蛋白水平的显著改变(参见图3)。

[0122] 在后续实验中,将Fc-Abdeg的抗体消耗效力与IVIG进行比较。具体地,向食蟹猴施用1mg/kg示踪抗体(FR70-hIgG1),2天后给药70mg/kg Fc-Abdeg或2g/kg IVIG(每组2只猴)。在4小时之内进行Fc-Abdeg和IVIG的输注,并且向动物施用20ml/kg的体积。在给药前(“pre-dose”)5分钟以及输注完成后5分钟、2小时、6小时、24小时、48小时、72小时、96小时、120小时和168小时采集血样(3x 150 $\mu$ l)。通过mCD70结合ELISA来确定示踪剂水平并相对于给药前水平绘图(图4)。与临床剂量(2g/kg)的IVIG治疗相比,70mg/kg Fc-Abdeg示出示踪剂清除的显著增强动力学并且还能够更有效地清除(Abdeg在4天内具有>95%的示踪剂清除相对于IVIG在7天内的约75%)。

[0123] 实施例2:无岩藻糖基化针对人CD16a和鼠CD16-2的Fc-Abdeg亲和力的作用

[0124] 确定Fc-Abdeg对hCD16a的结合亲和力并与无岩藻糖基化形式(Fc-Abdeg-POT)进行比较。在相同实验中,包括示出对所有Fc  $\gamma$  R的亲和力均改善的Fc-Abdeg变体(“Fc-Abdeg-S239D/I332E”)。具体地,用100ng/孔的Neutravidin生物素结合蛋白(ThermoScientific,31000)包被Maxisorp板并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,在室温下用PBS+1%酪蛋白封闭该板2小时。随后,向该板添加100 $\mu$ l/孔的生物素化hCD16a(Sino Biological Inc.,10389-H27H1-B)的250ng/ml溶液(在PBS+0.1%酪蛋白中稀释)并在室温下孵育1小时,之后施加Fc-Abdeg或Fc-Abdeg-POT分子的浓度梯度(1 $\mu$ M至0.005nM),再持续1小时。使用HRP缀合的多克隆山羊抗人Fc抗体(Jackson ImmunoResearch,109-035-008)来检测与hCD16a的结合(在室温下孵育1小时,在PBS+0.1%酪蛋白中以1/50,000稀释),之后添加100 $\mu$ l室温平衡的TMB(SDT试剂#s TMB)。将板孵育10分钟,之后添加100 $\mu$ l 0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>并进行OD450nm测量。使用GraphPad Prism软件来确定EC<sub>50</sub>值。图5中所示之这些实验的结果示出Fc-Abdeg分子的无岩藻糖基化导致对hCD16a的亲和力增加>30倍(Fc-Abdeg-POT的EC<sub>50</sub>=13nM相对于岩藻糖基化Fc-Abdeg的EC<sub>50</sub>>0.4 $\mu$ M)。如所预期的,与野生型Fc-Abdeg相比,Fc-Abdeg-S239D/I332E变体对hCD16a的结合亲和力增加(EC<sub>50</sub>=6nM)。

[0125] 使用与上述类似的实验操作,确定对鼠CD16-2(Sino Biological Inc.,50036-M27H-B)的结合亲和力。图6中所示之这些实验的结果再次示出,与野生型Fc-Abdeg相比,无岩藻糖基化变体的亲和力增加(EC<sub>50</sub>>100nM相对于EC<sub>50</sub>=11nM)。相比于对于结合人CD16a所观察到的,Fc-Abdeg-POT变体相对于野生型Fc-Abdeg之对mCD16-2的亲和力的增加倍数较低。对Fc-Abdeg-S239D/I332E变体(EC<sub>50</sub>=2nM)未观察到这一作用,其相对于野生型Fc-Abdeg在对人和鼠CD16二者的亲和力方面具有近似的增加倍数(EC<sub>50</sub>=2nM)。

[0126] 与自身抗原复合的自身抗体结合活化的Fc  $\gamma$  R并且由此触发自身免疫病,其发生部分地归因于免疫介导的针对自身组织的炎症。在两种基于ADCC的测定中评价Fc-Abdeg拮抗自身免疫抗体和Fc  $\gamma$  RIII受体在NK细胞上之相互作用的能力。

[0127] 首先,使用ADCC报道子生物测定(Promega,G7016)来分析Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT

和Fc-Abdeg-S239D/I332E的竞争性hCD16a结合效力。具体地,将10,000个表达CD20的Raji细胞(靶细胞)与60,000个表达hCD16a的Jurkat细胞(效应细胞)在100ng/ml抗CD20抗体和递增浓度的竞争物存在下孵育。将细胞在37°C下孵育6小时,之后测量生物发光信号,其为ADCC活性的量度。将荧光素酶信号相对于在不存在竞争物下通过100ng/ml抗CD20获得的信号绘图(参见图7)。这些实验证明Fc-Abdeg-POT和Fc-Abdeg-S239D/I332E二者均有效地阻断抗CD20诱导的ADCC信号,同时与野生型Fc-Abdeg孵育未导致对Jurkat细胞上表达的hCD16a的竞争性结合。

[0128] 在接下来的ADCC测定中,测试Fc-Abdeg和Fc-Abdeg-POT对抗hCD70抗体(27B3-hIgG1)之裂解活性的抑制作为竞争性hCD16结合的量度。具体地,在50ng/ml抗hCD70抗体以及Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT和IVIG的浓度梯度存在下,将约50,000个表达hCD70的U266细胞参加至约300,000个从健康供体新鲜纯化的PBMC中。将U266细胞孵育两天,并使用U266细胞特异性的标志物(CD28)通过FACS来分析随后的细胞裂解。图8中所示之这些实验的结果示出抗CD70抗体有效地裂解U266细胞并且通过添加Fc-Abdeg-POT可以以剂量依赖性方式减弱这一消耗,但野生型Fc-Abdeg或IVIG则并非如此。这些数据证明:相对于野生型Fc-Abdeg和IVIG,Fc-Abdeg POT具有增强的竞争性CD16a结合特性。

#### [0129] 实施例3:鼠急性ITP模型

[0130] 在急性免疫血小板减少的小鼠模型中测试了Fc-Abdeg、Fc-Abdeg-POT、Fc-Abdeg-S239D/I332E分子的治疗效力。具体地,通过腹膜内输注用IVIG(20mg/动物)、Fc-Abdeg(1mg/动物)、Fc-Abdeg-POT(1mg/动物)、Fc-Abdeg-S239D/I332E(1mg/动物)或盐水处理C57BL/6小鼠(每组5只动物)。在处理之前,取出血样以用于血小板计数的基线测量。1小时之后,用5 $\mu$ g/动物的抗小鼠血小板抗体MWR30(Nieswandt等,Blood 94:684-93(1999))处理小鼠。在24小时内监测血小板计数。将血小板计数相对于每只小鼠的初始计数归一化并使用流式细胞术通过抗CD61染色来确定血小板数目。图9中所示之这些实验的结果证明:与高7倍摩尔剂量的IVIG相比,用Fc-Abdeg进行预处理以近似的效力降低了MWR30诱导的血小板减少;并且还证明:在该模型中,Fc-Abdeg POT和Fc-Abdeg-S239D/I332E对Fc  $\gamma$  R的封闭具有协同的有益作用,如通过在180和1440分钟时间点时改善的血小板计数可见。

#### [0131] 实施例4:Fc-Abdeg的可制备性

[0132] 通过瞬时转染在CHO细胞(Evitria,Switzerland)中产生Fc-Abdeg(包含具有SEQ ID NO:2的Fc结构域)。在转染之后,在上清液中检测到高效价的Fc-Abdeg(200至400mg/ml)。当由稳定地整合到CHO GS-XCEED细胞系(Lonza,Great-Britain)中的表达构建体来表达Fc-Abdeg时,观察到类似的有利产生谱。平均地,稳定转染子的产量为3g/L,并且鉴定到数个克隆在10L搅拌罐式生物反应器中产生多至6g/L的Fc-Abdeg。

[0133] 通过在对前述Fc-Abdeg产生操作的蛋白A纯化之后分析聚集体和降解产物来进一步研究Fc-Abdeg的可制备性。具体地,将137 $\mu$ g Fc-Abdeg上样在与ÄktaPurifier色谱系统偶联的Superdex 200 10/300 GL凝胶过滤柱(GE Healthcare)上。图10中所示之该实验的结果示出,仅观察到极小百分比的Fc-Abdeg聚集体(约0.5%),同时未检测到Fc-Abdeg降解产物。另外地,向经蛋白A纯化的Fc-Abdeg施加不同的应激条件(冷冻-解冻、旋转或温度应激)未导致物理化学和功能特性发生任何明显变化。总而言之,这些数据证明Fc-Abdeg具有优异的可制备性。

[0134] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0135] 1. 包含变体Fc区或其FcRn结合片段的分离的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成,并且其中所述FcRn-拮抗剂不包含抗体可变区或CH1结构域。

[0136] 2. 项1所述的FcRn拮抗剂,其中相对于野生型IgG1 Fc区对Fc $\gamma$ 受体的亲和力,所述变体Fc区对Fc $\gamma$ 受体的亲和力增加。

[0137] 3. 包含变体Fc区或其FcRn结合片段的分离的FcRn拮抗剂,其中所述Fc区的Fc结构域在EU第252、254、256、433、434和436位分别包含氨基酸Y、T、E、K、F和Y,并且其中相对于野生型IgG1 Fc区对Fc $\gamma$ 受体的亲和力,所述Fc区对Fc $\gamma$ 受体的亲和力增加。

[0138] 4. 项3所述的FcRn拮抗剂,其中所述Fc区是IgG Fc区。

[0139] 5. 项3所述的FcRn拮抗剂,其中所述Fc区是IgG1 Fc区。

[0140] 6. 项3所述的FcRn拮抗剂,其中所述Fc区是嵌合Fc区。

[0141] 7. 项3所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列。

[0142] 8. 项3所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。

[0143] 9. 项3所述的FcRn拮抗剂,其由变体Fc区组成,其中所述变体Fc区之Fc结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1、2或3中所示的氨基酸序列组成。

[0144] 10. 项2至9中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述FcRn拮抗剂不包含抗体可变区或CH1结构域。

[0145] 11. 项1至10中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述FcRn拮抗剂不包含游离的半胱氨酸残基。

[0146] 12. 项1至11中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区对CD16a的亲和力增加。

[0147] 13. 项1至12中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区的Fc结构域在EU第297位不包含N-连接的聚糖。

[0148] 14. 项1至12中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区的Fc结构域包含在EU第297位具有无岩藻糖基化之N-连接聚糖的Fc结构域。

[0149] 15. 项1至12中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区的Fc结构域在所述Fc结构域之EU第297位包含具有等分GlcNAc的N-连接聚糖。

[0150] 16. 前述项中任一项所述的FcRn拮抗剂,其中所述变体Fc区与半衰期延长体连接。

[0151] 17. 项16所述的FcRn拮抗剂,其中所述半衰期延长体是聚乙二醇或人血清白蛋白。

[0152] 18. FcRn拮抗剂组合物,其包含多个项14所述的FcRn拮抗剂分子,其中至少50% (任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%) 的所述分子包含变体Fc区或其FcRn结合片段,所述变体Fc区或其FcRn结合片段包含无岩藻糖基化的N-连接聚糖。

[0153] 19. FcRn拮抗剂组合物,其包含多个项15所述的FcRn拮抗剂分子,其中至少50% (任选地,至少60%、70%、80%、90%、95%或99%) 的所述分子包含变体Fc区或其FcRn结合片段,所述变体Fc区或其FcRn结合片段包含具有等分GlcNAc的N-连接聚糖。

[0154] 20. 药物组合物, 其包含前述项中任一项所述的FcRn拮抗剂或FcRn拮抗剂组合物, 以及可药用载体或赋形剂。

[0155] 21. 在对象中抑制FcRn功能的方法, 所述方法包括向所述对象施用有效量的项20所述的药物组合物。

[0156] 22. 在已施用含Fc剂的对象中降低所述含Fc剂的血清水平的方法, 所述方法包括向所述对象同时或依次施用有效量的项20所述的药物组合物。

[0157] 23. 项22所述的方法, 其中所述含Fc剂是抗体或免疫粘附素。

[0158] 24. 项22所述的方法, 其中所述含Fc剂是治疗剂或诊断剂。

[0159] 25. 项22所述的方法, 其中所述含Fc剂是成像剂。

[0160] 26. 项22所述的方法, 其中所述含Fc剂是抗体药物缀合物。

[0161] 27. 在对象中治疗抗体介导的病症的方法, 所述方法包括向所述对象施用有效量的项20所述的药物组合物。

[0162] 28. 项27所述的方法, 其中所述抗体介导的病症是自身免疫病。

[0163] 29. 项28所述的方法, 其中所述自身免疫病选自同种异体胰岛移植物排斥、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生病、阿尔茨海默病、抗嗜中性粒细胞胞质自身抗体 (ANCA)、自身免疫性肾上腺疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性嗜中性粒细胞减少、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、自身免疫性荨麻疹、贝赫切特病、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼综合征、腹型斯泼卢腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、丘-斯综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病、皮肌炎、扩张型心肌病、盘状狼疮、获得性大疱性表皮松解、特发性混合型冷球蛋白血症、因子VIII缺乏、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯病、格林-巴利、古德帕斯丘综合征、移植物抗宿主病 (GVHD)、桥本甲状腺炎、血友病A、特发性膜性神经病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA神经病、IgM多神经病、免疫介导的血小板减少、幼年型关节炎、川崎病、扁平苔藓、硬化性苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、粘膜类天疱疮、多发性硬化、1型糖尿病、多灶性运动神经病 (MMN)、重症肌无力、副肿瘤性大疱性类天疱疮、妊娠性类天疱疮、寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、复发性多软骨炎、雷诺现象、赖特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、实体器官移植排斥、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安动脉炎、中毒性表皮坏死松解症 (TEN)、史-约综合征 (SJS)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血栓性血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、疱疹样皮炎血管炎、抗嗜中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎、白斑和韦格纳肉芽肿病。

[0164] 30. 项27所述的方法, 其中所述抗体介导的病症是可使用静脉内免疫球蛋白 (IVIG)、血浆去除术和/或免疫吸附治疗的。

[0165] 31. 项27所述的方法, 其中所述自身免疫病是自身免疫性离子通道病。

[0166] 32. 项31所述的方法, 其中所述离子通道病选自自身免疫性边缘系脑炎、癫痫、视神经脊髓炎、兰-伊肌无力综合征、重症肌无力、抗-N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体脑炎、抗- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (AMPA) 受体脑炎、莫尔旺综合征、神经性肌强

直、链球菌感染相关的小儿自身免疫性神经精神障碍 (PANDAS), 和甘氨酸受体抗体相关性病症。

[0167] 33. 项27所述的方法, 其中所述抗体介导的病症是高球蛋白血症。

[0168] 34. 项27所述的方法, 其中将所述FcRn拮抗剂与另外的治疗剂同时或依次施用于所述对象。

[0169] 35. 项34所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是抗炎剂。

[0170] 36. 项34所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是白细胞消耗剂。

[0171] 37. 项36所述的方法, 其中所述白细胞消耗剂是B细胞消耗剂。

[0172] 38. 项37所述的方法, 其中所述B细胞消耗剂是抗体。

[0173] 39. 项38所述的方法, 其中所述抗体与CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD70、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85或CD86特异性结合。

[0174] 40. 项34所述的方法, 其中所述另外的治疗剂是利妥昔单抗、达克珠单抗、巴利昔单抗、莫罗单抗-CD3、英夫利昔单抗、阿达木单抗、奥马珠单抗、依法利珠单抗、那他珠单抗、托珠单抗、依库珠单抗、戈利木单抗、卡那单抗、优特克单抗、贝利木单抗, 或其组合。

[0175] 41. 核酸分子, 其编码项1至19中任一项所述的FcRn拮抗剂。

[0176] 42. 表达载体, 其包含项41所述的核酸分子。

[0177] 43. 宿主细胞, 其包含项42所述的表达载体。

[0178] 44. 产生FcRn拮抗剂的方法, 其包括在使得FcRn拮抗剂表达的条件下培养项43所述的宿主细胞。



|        |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| [0001] | 序列表   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0002] | <110> 阿尔金克斯有限公司   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0003] | 德克萨斯大学系统董事会   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0004] | <120> FcRn拮抗剂及使用方法  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0005] | <130> 563870: AGX5-015PC  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0006] | <140> PCT/US2014/072087   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0007] | <141> 2014-12-23  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0008] | <150> 61/920,547  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0009] | <151> 2013-12-24  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0010] | <160> 3   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0011] | <170> PatentIn version 3.5                                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0012] | <210> 1   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0013] | <211> 221   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0014] | <212> PRT   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0015] | <213> 人工序列  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0016] | <220>   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0017] | <221> 来源  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0018] | <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0019] | <400> 1   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0020] | Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0021] | 1 5 10 15   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0022] | Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0023] | 20 25 30  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0024] | Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0025] | 35 40 45  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0026] | Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0027] | 50 55 60  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0028] | Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0029] | 65 70 75 80   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0030] | Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0031] | 85 90 95  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0032] | Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0033] | 100 105 110   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0034] | Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0035] | 115 120 125   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0036] | Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0037] | 130 135 140   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| [0038] | Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|        |   |     |     |     |
|--------|---|-----|-----|-----|
| [0039] | 145   | 150 | 155 | 160 |
| [0040] | Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp |     |     |     |
| [0041] | 165   | 170 | 175 |     |
| [0042] | Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp |     |     |     |
| [0043] | 180   | 185 | 190 |     |
| [0044] | Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Lys |     |     |     |
| [0045] | 195   | 200 | 205 |     |
| [0046] | Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly             |     |     |     |
| [0047] | 210   | 215 | 220 |     |
| [0048] | <210> 2   |     |     |     |
| [0049] | <211> 227   |     |     |     |
| [0050] | <212> PRT   |     |     |     |
| [0051] | <213> 人工序列  |     |     |     |
| [0052] | <220>   |     |     |     |
| [0053] | <221> 来源  |     |     |     |
| [0054] | <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"   |     |     |     |
| [0055] | <400> 2   |     |     |     |
| [0056] | Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly |     |     |     |
| [0057] | 1   | 5   | 10  | 15  |
| [0058] | Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr |     |     |     |
| [0059] | 20  | 25  | 30  |     |
| [0060] | Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His |     |     |     |
| [0061] | 35  | 40  | 45  |     |
| [0062] | Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val |     |     |     |
| [0063] | 50  | 55  | 60  |     |
| [0064] | His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr |     |     |     |
| [0065] | 65  | 70  | 75  | 80  |
| [0066] | Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly |     |     |     |
| [0067] | 85  | 90  | 95  |     |
| [0068] | Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile |     |     |     |
| [0069] | 100   | 105 | 110 |     |
| [0070] | Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val |     |     |     |
| [0071] | 115   | 120 | 125 |     |
| [0072] | Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser |     |     |     |
| [0073] | 130   | 135 | 140 |     |
| [0074] | Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu |     |     |     |
| [0075] | 145   | 150 | 155 | 160 |
| [0076] | Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro |     |     |     |
| [0077] | 165   | 170 | 175 |     |

|        |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0078] | Val   | Leu               | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |
| [0079] |       |                   |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| [0080] | Asp   | Lys               | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
| [0081] |       |                   |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |
| [0082] | His   | Glu               | Ala | Leu | Lys | Phe | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser |
| [0083] |       |                   | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| [0084] | Pro   | Gly               | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0085] | 225   |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0086] | <210> | 3                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0087] | <211> | 226               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0088] | <212> | PRT               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0089] | <213> | 人工序列              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0090] | <220> |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0091] | <221> | 来源                |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0092] | <223> | /注="人工序列的描述：合成多肽" |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0093] | <400> | 3                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0094] | Asp   | Lys               | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly |
| [0095] | 1     |                   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| [0096] | Gly   | Pro               | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Tyr |
| [0097] |       |                   |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| [0098] | Ile   | Thr               | Arg | Glu | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
| [0099] |       |                   |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |
| [0100] | Glu   | Asp               | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
| [0101] |       |                   |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |
| [0102] | His   | Asn               | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
| [0103] | 65    |                   |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     | 80  |
| [0104] | Arg   | Val               | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| [0105] |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0106] | Lys   | Glu               | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |
| [0107] |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0108] | Glu   | Lys               | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
| [0109] |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0110] | Tyr   | Thr               | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
| [0111] |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0112] | Leu   | Thr               | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |
| [0113] | 145   |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0114] | Trp   | Glu               | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
| [0115] |       |                   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0116] | Val   | Leu               | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |

---

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0117] |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |
| [0118] | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
| [0119] |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |
| [0120] | His | Glu | Ala | Leu | Lys | Phe | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser |
| [0121] |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |
| [0122] | Pro | Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| [0123] |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

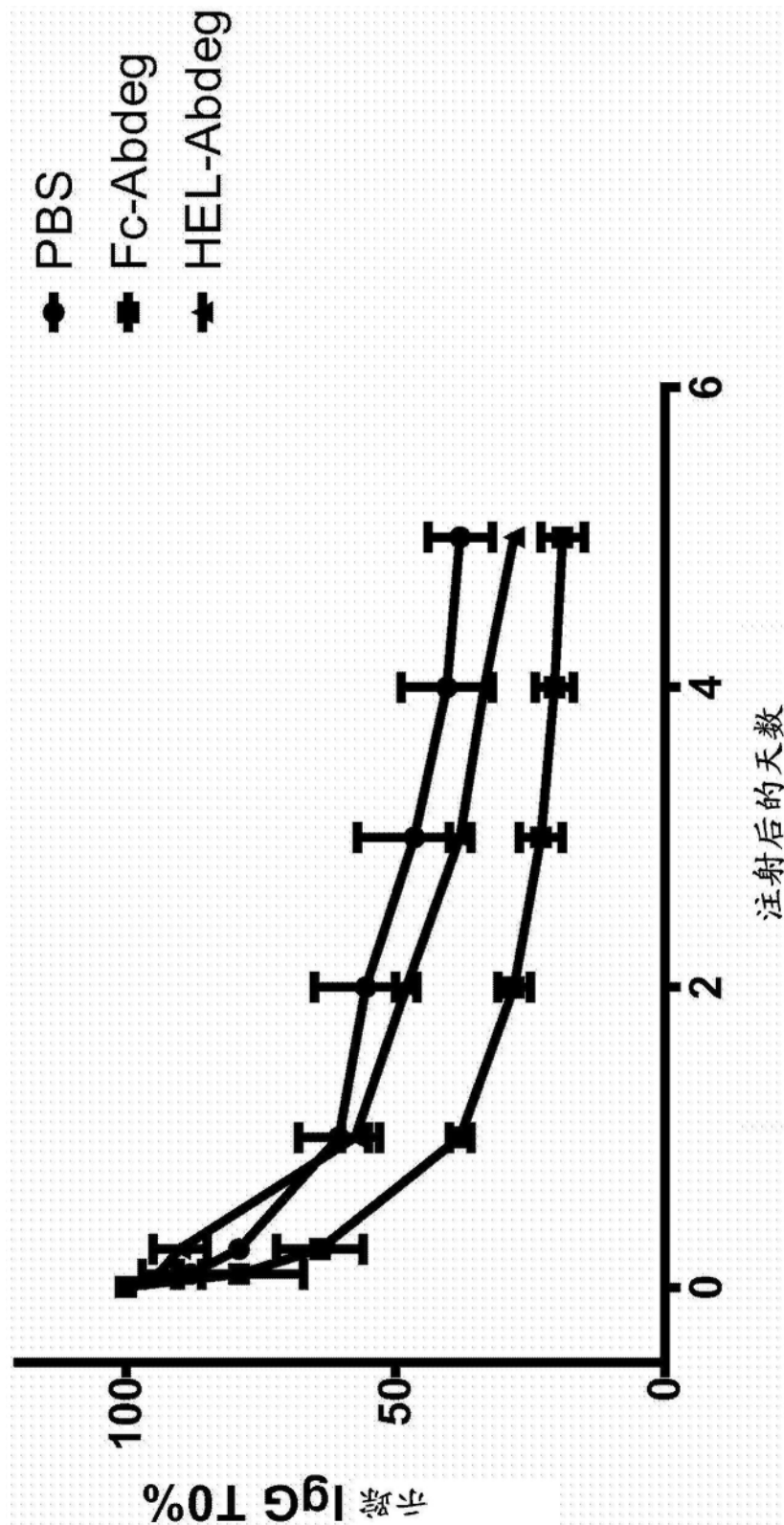


图1

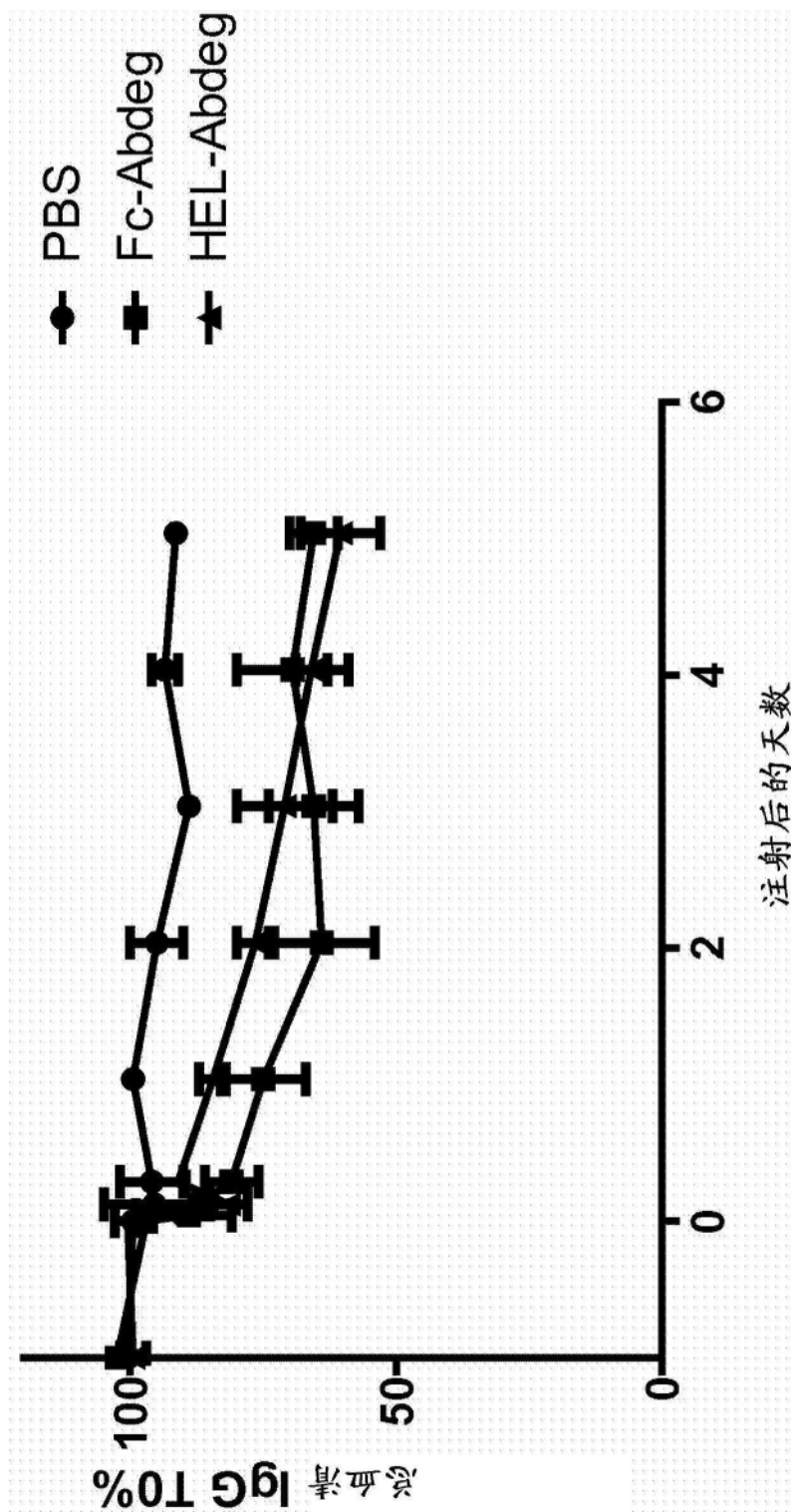


图2

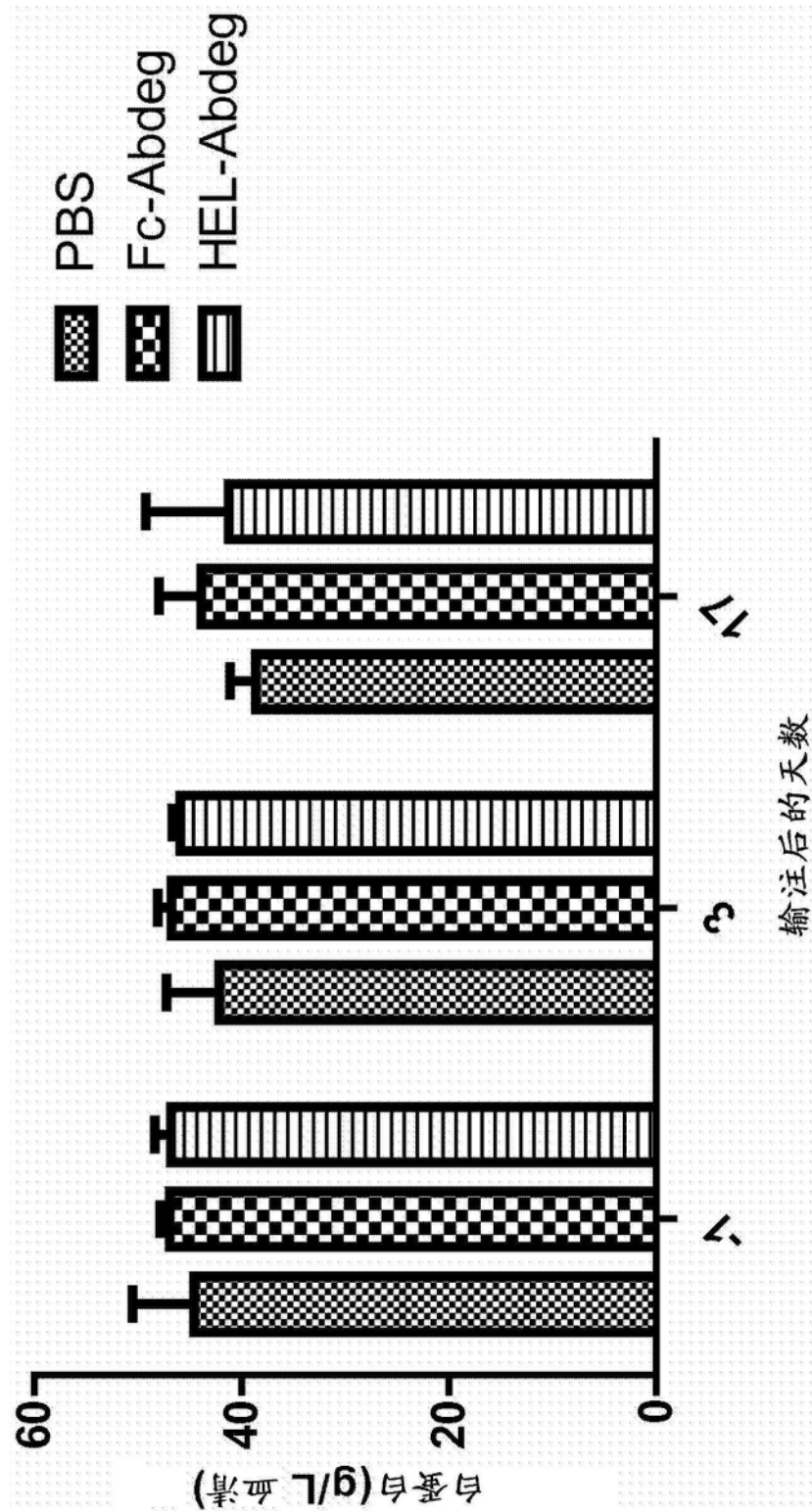


图3

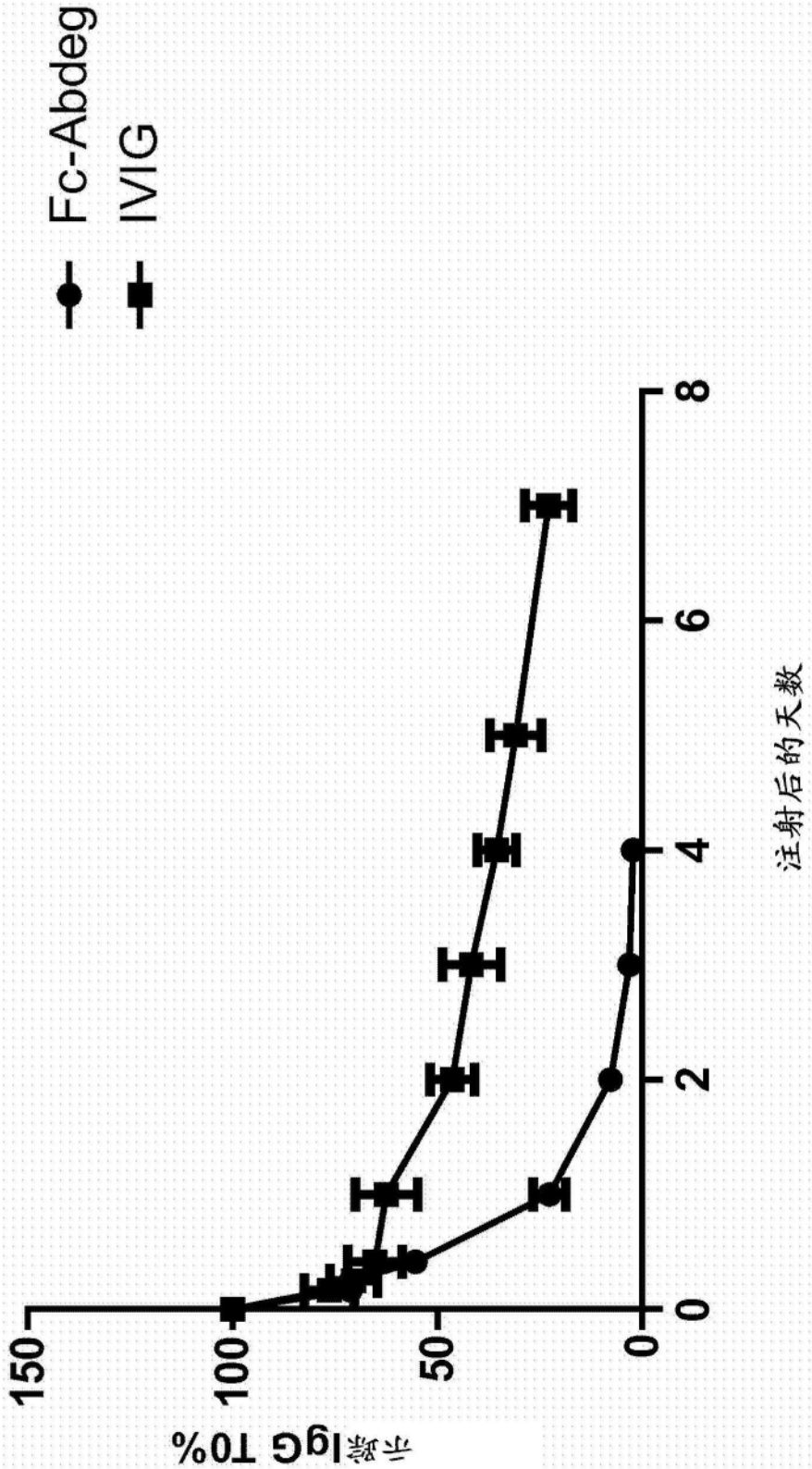


图4



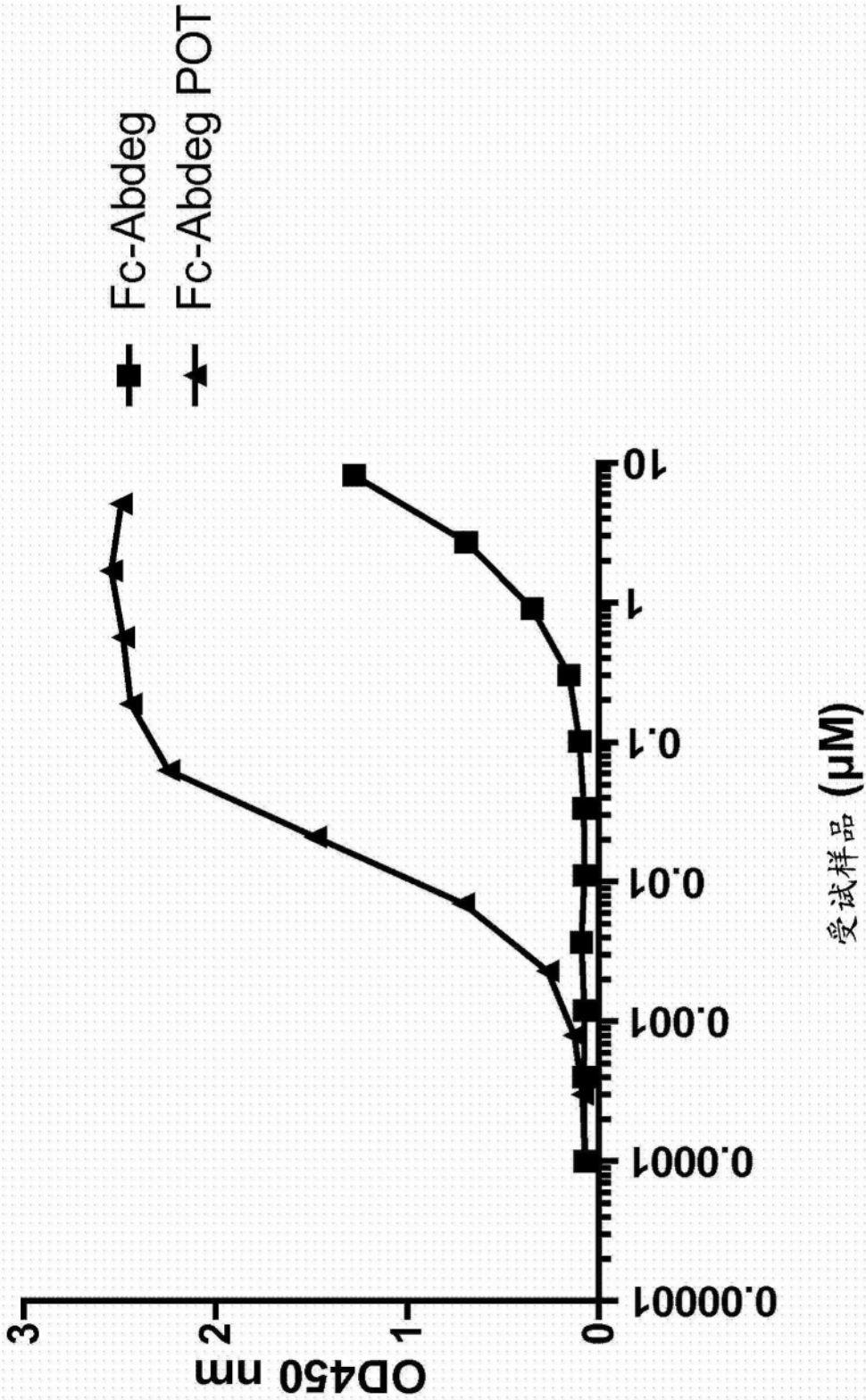


图5

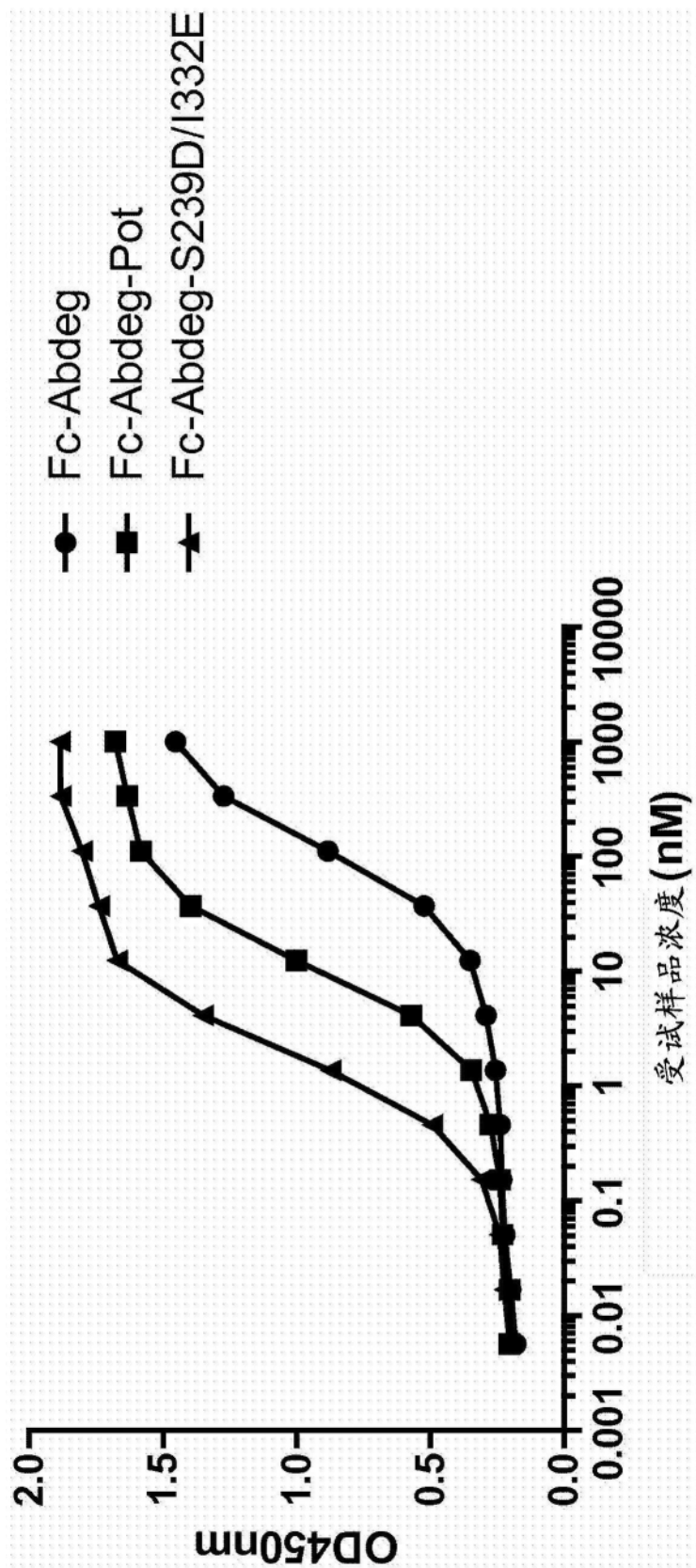


图6

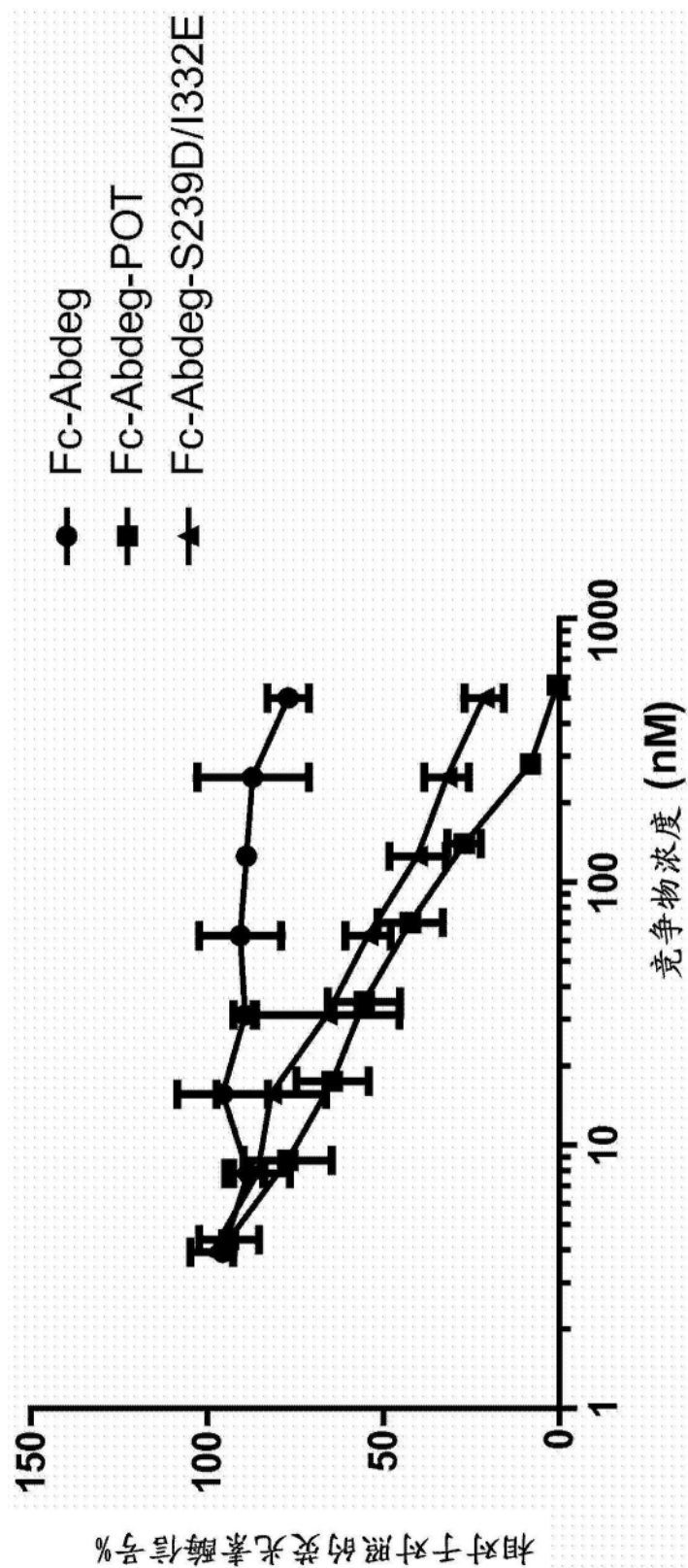


图7

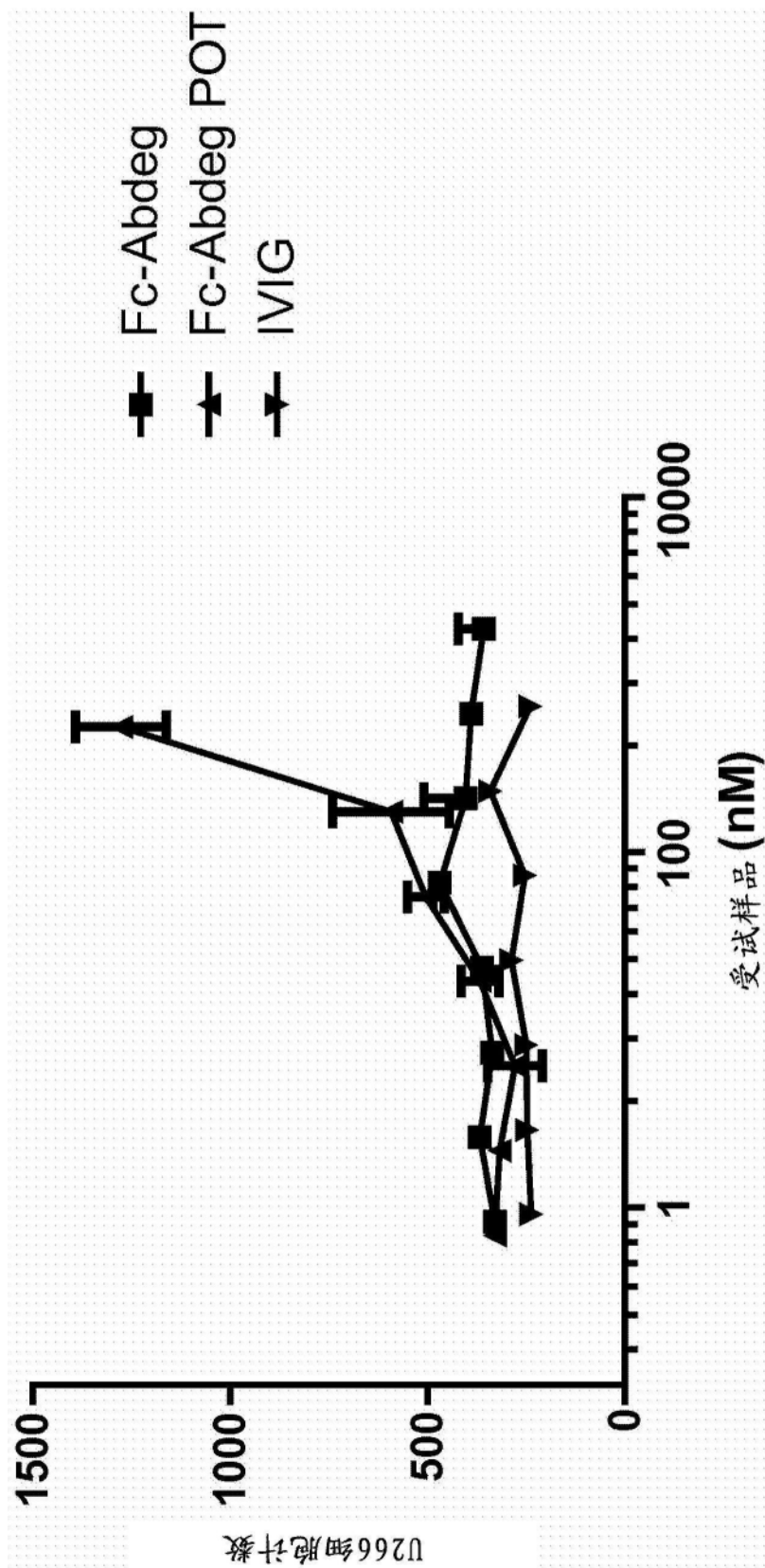


图8

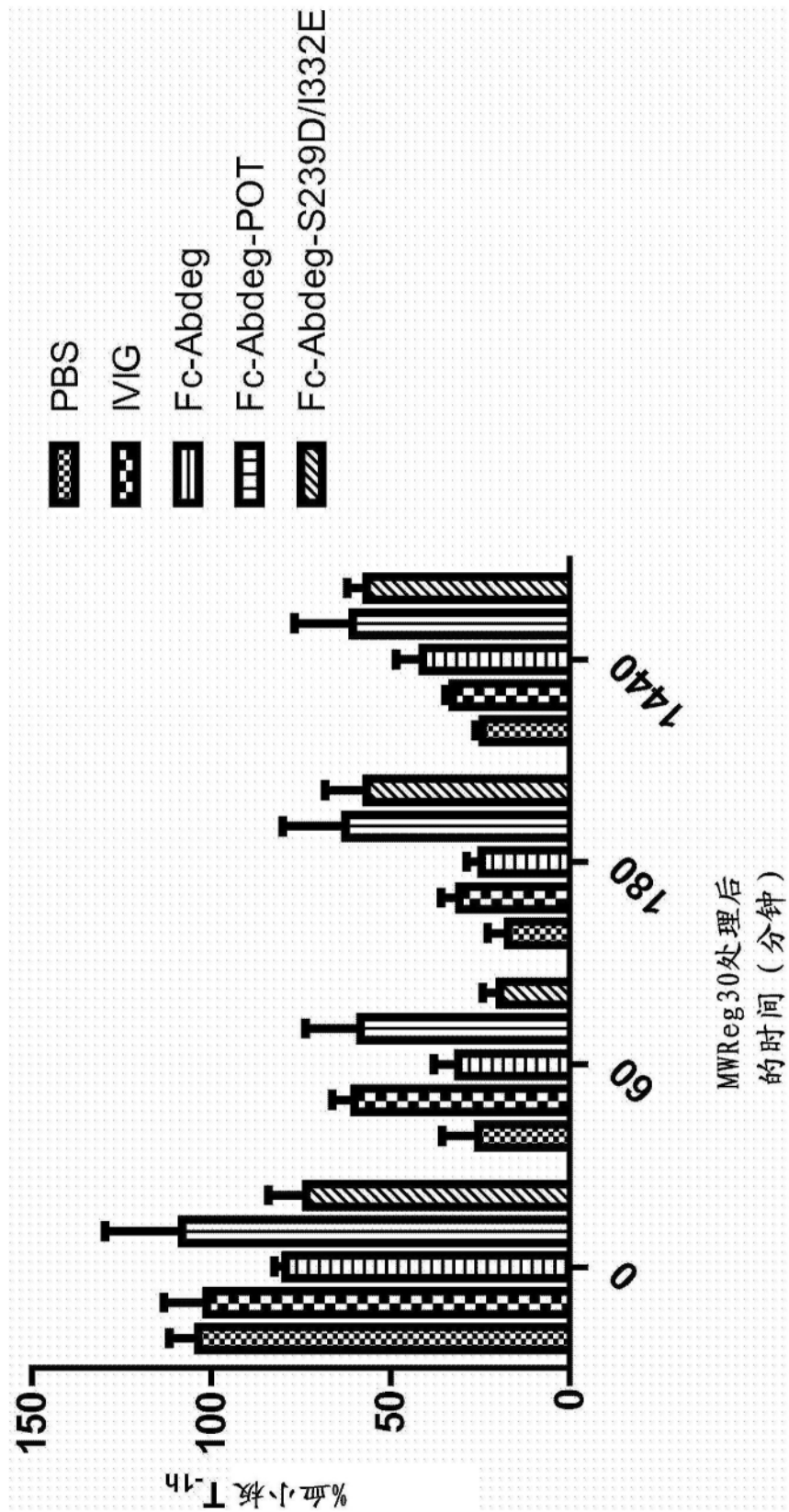


图9

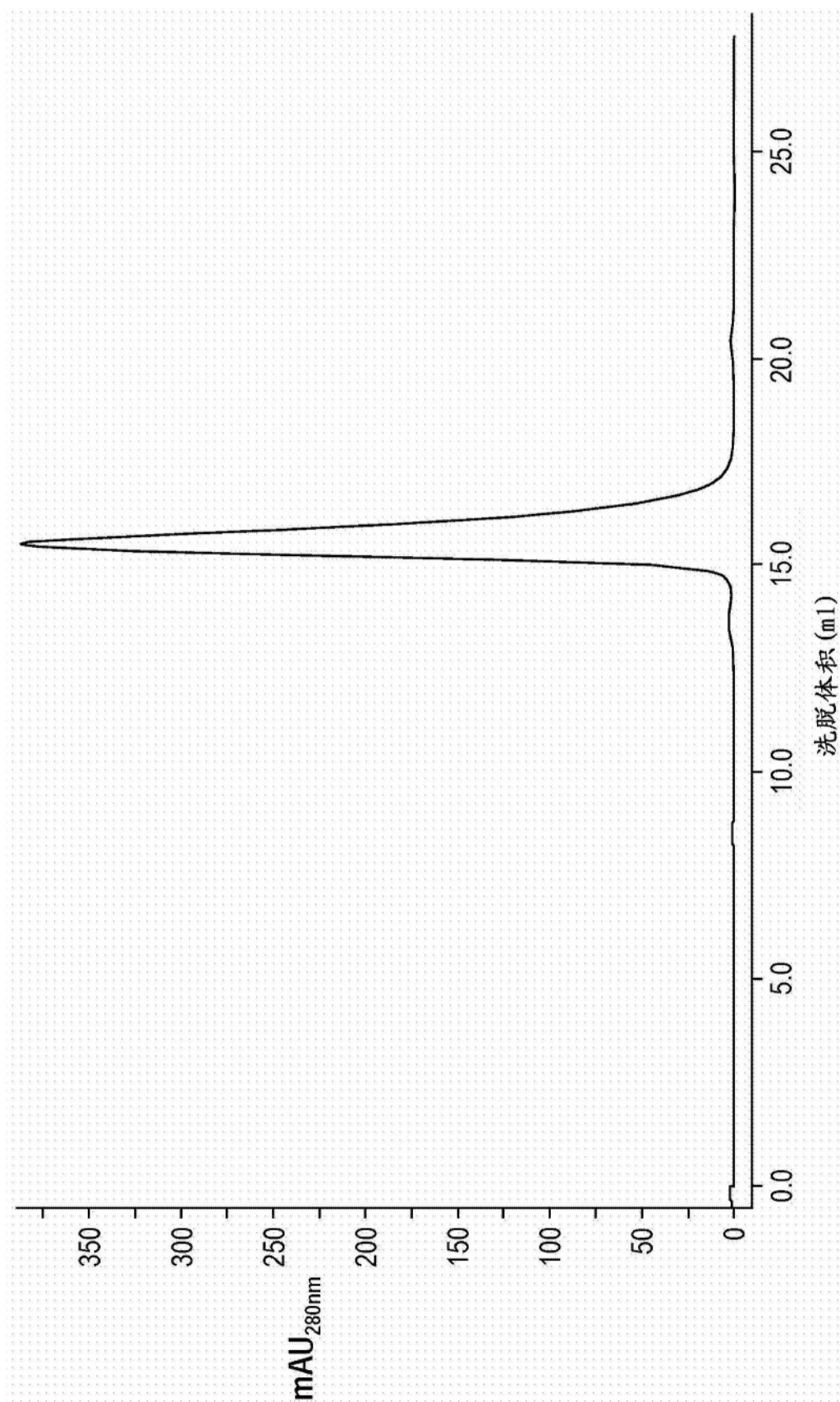


图10