



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월17일

(11) 등록번호 10-2452173

(24) 등록일자 2022년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/4703 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2016-7020339

(22) 출원일자(국제) 2014년12월23일

심사청구일자 2019년12월23일

(85) 번역문제출일자 2016년07월25일

(65) 공개번호 10-2016-0111937

(43) 공개일자 2016년09월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/072087

(87) 국제공개번호 WO 2015/100299

국제공개일자 2015년07월02일

(30) 우선권주장

61/920,547 2013년12월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02013074598 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 30 항

(73) 특허권자

더 보드 오브 리전츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템

미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트

아르제넥스 비브이비에이

벨기에, 주에나르드 9052, 인터스트리파크 7

(72) 발명자

피터 올리히츠

네덜란드, 엔엘-4811 에이에이치 브레다, 빌렘스트라트 5, 아르젠-엑스 비. 브이. 씨/오

크리스토프 블랑슈토츠

네덜란드, 엔엘-4811 에이에이치 브레다, 빌렘스트라트 5, 아르젠-엑스 비. 브이. 씨/오

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

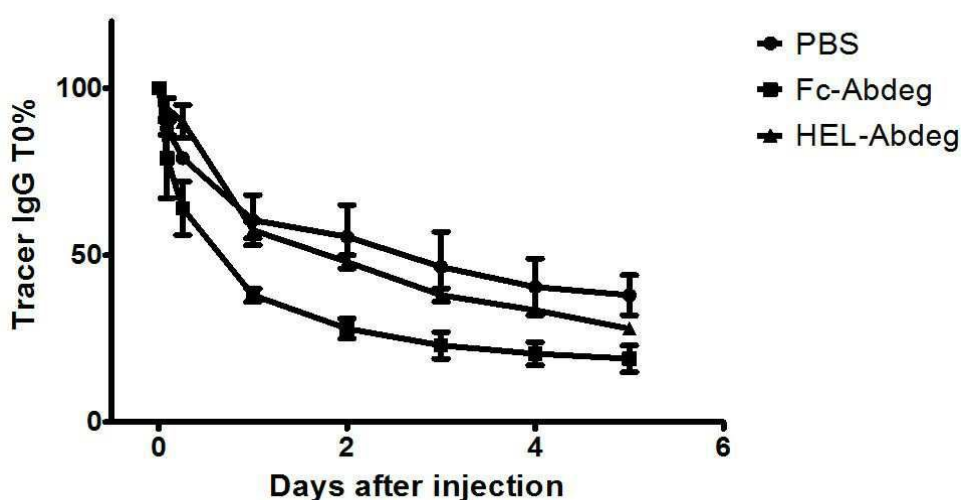
이원희

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 FCRN 길항제 및 사용방법

(57) 요약

네이티브 Fc 영역에 상대적으로 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존성 FcRn에 특이적으로 결합하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 신규한 FcRn 길항제 조성물을 제공한다. 또한 강화된 CD16 결합 친화도를 가지는 FcRn 길항제를 제공한다. 또한 상기 FcRn 길항제 조성물, 및 상기 FcRn 길항제 조성물을 포함하는 약학적 조성물의 제조를 위한 FcRn 길항제 조성물, FcRn 길항제 조성물을 인코딩하는 핵산, 제조할 발현 벡터 및 숙주 세포를 사용하는 항체-매개 질환의 항치료 방법 (예 :자가 면역 질환)을 제공한다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/524 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

토르스텐 드라이어

네덜란드, 엔엘-4811 에이에이치 브레다, 빌렘스트라트 5, 아르젠-엑스 비. 브이. 씨/오

요하네스 드 하츠

네덜란드, 엔엘-4811 에이에이치 브레다, 빌렘스트라트 5, 아르젠-엑스 비. 브이. 씨/오

샬리 이. 워드 오버

미국 텍사스 78701, 오스틴, 웨스트 7th 스트리트 201, 더 보드 오브 리전즈 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템 씨/오

니콜라스 헤이.하. 온허네

네덜란드, 엔엘-4811 에이에이치 브레다, 빌렘스트라트 5, 아르젠-엑스 비. 브이. 씨/오

(56) 선행기술조사문헌

JP2013507128 A
 WO2006130834 A2
 WO2009100105 A2
 WO2010014909 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

변이체 IgG1 Fc 영역 또는 이의 FcRn-결합 단편으로 구성되는 단리된 FcRn-길항제이되, 여기서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 3로 설명되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역은 야생형 IgG1 Fc 영역과 비교하여 FcRn과 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존성으로 결합하는 것인, FcRn-길항제.

청구항 3

제1항에 있어서, 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것인, FcRn-길항제.

청구항 4

제1항에 있어서, 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것인, FcRn-길항제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 FcRn-길항제는 자유 시스테인 잔기(free cysteine residue)를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역은 CD16a에 증가된 친화도를 가지는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인은 EU 포지션 297에 N-연결 글리칸(N-linked glycan)을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인은 EU 포지션 297에 어푸코실화된(어푸코실화) N-연결 글리칸(N-linked glycan)을 가지는 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인은 Fc 도메인의 EU 포지션 297에 바이섹팅(bisecting) GlcNac를 가지는 N-연결 글리칸(N-linked glycan)을 포함하는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 Fc 영역은 반감기 연장부(half-life extender)에 연결된 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 반감기 연장부는 폴리에틸렌 글리콜 또는 인간 혈청 알부민인 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 12

제8항에 있어서, 복수의 제8항의 FcRn-길항제 분자를 포함하는 FcRn-길항제 이고, 상기 분자의 적어도 50%는 어푸코실화 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 Fc 영역, 또는 이의 FcRn-결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 13

제9항에 있어서, 복수의 제9항의 FcRn-길항제 분자를 포함하는 FcRn-길항제 이고, 상기 분자의 적어도 50%는 바이섹팅(bisecting) GlcNac를 가지는 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 Fc 영역, 또는 이의 FcRn-결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 FcRn-길항제.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 FcRn-길항제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 동종 체장섬 이식편거부반응, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 항인지질 증후군, 자가 면역 애디슨 병, 알츠하이머 병, 항호중구 세포질 자가항체 (ANCA), 부신의 자가면역질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역성 감염, 자가면역성 심근염, 자가면역성 호중구감소증, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 저혈소판증, 자가면역성 두드러기, 베체트 병, 수포성 유사천포창, 심근증, 캐슬맨 증후군, 복강 스프루 피부염복강 스프루 피부염, 만성 피로 면역 부전 증후군, 만성 염증성 탈수 초성 신경 병증 (CIDP), 척-스트라우스증후군, 반흔성 유사천포창, 크레스트 증후군, 한랭응집소증, 크론병, 피부근염, 확장형 심근증, 원판성 루푸스, 후천성표피수포증, 한랭 글로불린 혈증(essential mixed cryoglobulinemia), 요소 VIII 결핍(factor VIII deficiency), 섬유근육통-섬유근염(fibromyalgia-fibromyositis), 사구체신염, 그레이브스 병, 길랑-바레(Guillain-Barre), 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 이식편대숙주병(GVHD), 하시모토 갑상선염, 혈우병 A, 특발성 막성 신경병증, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP), IgA 신경병증, IgM 다발성 신경병증, 면역 매개 혈소판 감소증, 청소년 관절염, 가와사키 병, 평편태선, 경화태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합 결합 조직 병, 점막 유전 포창, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 다초점 운동 신경병증(MMN), 중증 근무력증, 부종형 수포성 유사천포창, 임신유천포창, 심상성천포창, 낙엽상 천포창, 악성빈혈, 결절성 다발 동맥염, 다발 연골염, 분비선 증후군, 류마티스 성 다발성 근육통, 다발 근육염 및 피부근염, 1차 저감마글로브린 혈증, 원발성 담즙 성 간경변, 건선, 건 선성 관절염, 재발 성 다발 연골염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 고형 장기 이식 거부, 근강직 증후군, 전신성 홍 반성 루푸스, 타카야 수 동맥염,

독성 표피 괴사 (TEN), 스티븐 존슨 증후군(SJS), 측두동맥염/일시적 동맥염, 혈전성 혈소판 감소성 자반, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진 혈관염 피부염(dermatitis herpetiformis vasculitis), 항중성구 세포질 항체 연관 혈관염(anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides), 백반증, 베게너 육아 종증, 자가면역 변연계 뇌염, 간질, 시신경 척수염, 램버트 - 이튼 근무력 증후군, 중증 근무력증, 항-N-메틸-D-아스파테이트(anti- N-Methyl-D-aspartate, NMDA) 수용체 뇌염, 항- α -아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이소옥사졸프로피오닉 애시드(AMPA) 수용체 뇌염, 물반 증후군, 신경근긴장증, 연쇄상 구균 감염과 관련된 소아 자가면역 신경정신장애(PANDAS), 글리신 수용체 항체-연관 질환 또는 글로불린과잉혈증 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 Fc 함유제의 혈청 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 Fc 함유제는 항체 또는 면역어드헤신(immunoadhesin)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 Fc 함유제는 치료 또는 진단용 제제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 Fc 함유제는 영상화용 제제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 Fc 함유제는 항체 약물 접합체(drug conjugate)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 FcRn 길항제는 동시 또는 순차적으로 추가적인 치료제를 대상체에 투여하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 추가적인 치료제는 항-염증제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 추가적인 치료제 림프구 방혈 작용제(leucocyte depleting agent)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 림프구 방혈 작용제는 B-세포 방혈 작용제인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 B-세포 방혈 작용제는 항체인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 항체는 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, 또는 CD86에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 26

제20항에 있어서, 상기 추가적인 치료제는 리툭시맙(rituximab), 다클리주맙(daclizumab), 바실릭시맙(basiliximab), 무로노맙(muronomab)-CD3, 인플릭시맙(infliximab), 아달리주맙(adalimumab), 오말리주맙(omalizumab), 에팔리주맙(efalizumab), 나탈리주맙(natalizumab), 토실리주맙(tocilizumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 골리주맙(golimumab), 카나키주맙(canakinumab), 우스테키주맙(ustekinumab), 벨리주맙(belumumab), 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 FcRn-길항제를 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 28

제27항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 29

제28항의 발현벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포(host cell).

청구항 30

제29항의 숙주 세포를 FcRn-길항제가 발현될 수 있는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 FcRn-길항제의 제조방법.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본 출원은 2013년 12월 24일에 미국 가출원 61/920,547호를 우선권으로 주장하며, 이는 전문이 본 발명에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 이뮤노글로불린 감마 (IgG) 항체는 자가면역 질환, 염증 질환 및 IgG 항체 의 과발현이 특징인 질병 다양한 질병(예를 들어, 하이퍼감마글로불린혈증)의 병리학에서 핵심 역할을 한다(e.g. Junghans, Immunologic Research 16 (1):29 (1997) 참조).

[0004] 상기 IgG의 혈청에서의 반감기는 다른 혈장단백질의 혈청 반감기에 상대적으로 길어진다(Roopenian et al., J. Immunology 170:3528 (2003); Junghans 및 Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5512 (1996)). 이러한 긴 반감기는 어느정도는 Fc 수용체인 FcRn에 IgG의 Fc 영역이 결합됨에 기인한다.

[0005] FcRn가 원래 모체 IgG를 위한 신생아의 트랜스포트 수용체인 것을 특징으로 하지만, 또한 성인에서 IgG의 열화를 방지하기 위한 기능도 한다. FcRn는 음세포화된 IgG에 결합하고, 세포의 구획으로 되돌리기 위해 리사이클링 함으로써, 트랜스포트에서 격하된 리소좀까지 IgG를 보호한다. 상기 리사이클링은 IgG/ FcRn에 상호 작용은 세포 외 생리학적 pH에서보다 산성 엔도솜의 pH에서 강한 FcRn에로의 IgG의 결합에 의존 산도에 의해 촉진된다.

[0006] IgG의 혈청 농도가 가능한 FcRn에 분자를 초과하는 수준에 도달 할 때, 비결합 IgG는 분해 메커니즘으로부터 보호되지 않고, 따라서 감소된 혈청 반감기를 가질 것이다. 따라서, IgG의 FcRn에로의 결합 억제제는 IgG의 엔도솜 리사이클링을 방지하여 IgG의 혈청 반감기를 감소시킨다. 이에따라, FcRn에로의 IgG의 결합을 길항제화하는 제제가 면역 질환, 염증성 질환 등의 항체 - 매개 질환을 조절, 치료 또는 예방하는데 유용할 수있다. 일례로, IgG Fc가 FcRn에 결합하는 것을 길항화 하는 방법은 FcRn에 대한 차단 항체의 생산을 포함한다(예를 들어 WO2002 / 43658 참조). FcRn에 결합하고 FcRn 기능을 길항화하는 펩타이드 또한 확인되었다(예를 들어 US6,212,022 및 US8,101,186를 참조). 또한, 강화된 FcRn 결합 및 감소된 pH 의존성을 가지는 변이체 Fc 수용체를 포함하는 전체 길이의 IgG 항체가 Rcn이 IgG에 결합하는 것을 길항화하는 것을 확인하였다(예를 들어 8,163,881 참조). 그러나, FcRn에 항체 - 매개 질환의 치료에 사용하기 위한 IgG에 결합하는 FcRn을 길항화 하는 제제의 개선이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 신규한 FcRn 길항제 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 일반적으로 변이체 Fc 영역, 또는 이의 FcRn-결합 단편을 포함하고, 네이티브 Fc영역과 상대적으로 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존도로 특이적으로 FcRn에 결합한다. 본 발명은 놀라운 발견에 부분적으로 기초하는 단리된 변이체 Fc 영역 (예를 들어, EU 포지션에서 아미노산의 Y, T, E, K, F, 및 Y를 포함하는 변이체 Fc 영역 (각각 EU 포지션 지정) 252 254, 256, 433, 434, 436)의 변이체 Fc 영역을 포함하는 전체 길이의 항체보다 생체 내에서보다 효과적인 FcRn 길항제다. FcRn 길항제 조성물의 본 발명의 Fc 함유제(예를 들어, 항체 및 면역억제제)의 혈청 수준을 감소에 특히 유용하다. 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 FcRn 길항제 조성물 를 사용하여 항체- 매개 질환(예를 들어, 자가 면역 질환)의 치료 방법을 제공한다. 또한, 상기 FcRn 길항제 조성물, 및 상기 FcRn 길항제 조성물을 포함하는 약학적 조성물의 제조를 위한 FcRn 길항제 조성물을 인코딩하는 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.

[0008] 본 발명에 개시된 FcRn 길항제는 항체 - 매개 질환에 대한 이전 FcRn 길항제 조성물의 설명 및 알려진 치료를 통해 특히 유리하다. 예를 들어, 본 발명에 개시된 FcRn 길항제는 정맥 감마 글로불린 (IVIG), 항체 - 매개 질환에 대한 현재의 치료보다 더 작고 보다 잠재력 있다. 따라서, 개시된 FcRn 길항제의 효과적인 투여량은 IVIG 보다 훨씬 작을 수 있다. 게다가, 결과적으로 IVIG는 인간 공여자로부터 분리 및 정제되고, 상당한 배치-배치 다양화(batch-batch variatio)가 일어난다. 본 발명에 개시된 조성물의 FcRn 길항제는 따라서, 재조합으로 생성하거나, 화학적으로 합성할 수 있고, 훨씬 더 균일하다. 본 발명에서 설명된 바와 같이, 본 발명에 개시된 FcRn 길항제는 Vaccaro et al., Nature Biotech 23(9) 1283-1288 (1997)에 설명된 바와 같은 변이체 Fc 수용체를 포함하는 전체 길이의 IgG 항체보다 훨씬 더 효과적이다.

[0009] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 변이체 Fc 영역 또는 이의 Fc 결합 단편을 포함하는 단리된 FcRn 길항제, 여기서, 상기 Fc 영역 또는 단편은 EU 포지션 254, 252 256, 433, 434 및 436에서 각각 아미노산은 Y, T, E, K, F, 및 Y를 포함하고, 상기 FcRn 길항제는 전체 길이 항체가 아닌 것을 특징으로 하는 단리된 FcRn 길항제를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 항체 가변 영역 또는 CH1 도메인을 포함하지 않는다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제 프리 시스템인 잔기를 포함하지 않는다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG의 Fc 영역 (예를 들어, 인간 IgG Fc 영역)이다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG1의 Fc 영역 (예를 들어, 인간의 IgG1 Fc 영역)이다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 영역은 키메라 Fc 영역이다.

[0011] 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 SEQ ID NO: 1으로 설명되는 아미노산 서열의 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제 조성물은 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:1, 2, 또는 3로 설명되는 아미노산 서열로 이루어지는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항

제는 상기 아미노산 SEQ ID NO: 2로 설명되는 아미노산 서열으로 구성되는 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열을 가지는 변이체 Fc 영역으로 이루어진다.

- [0012] 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 Fc 감마 수용체에서의 야생형 IgG1 Fc 영역의 친화도에 상대적으로 변경 (증가 또는 감소)된 Fc 수용체에서의 친화도를 가지는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 변이체 Fc는 CD16a에 대하여 증가된 친화도를 가진다.
- [0013] 특정 실시 양태에서, 상기 FcRn 길항제는 EU 포지션 297에서의 N-연결 글리칸을 포함하지 않는 변이체가 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 EU 포지션 297에서 어푸코실화 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 EU 포지션 297에서 바이섹팅 GlcNAc를 갖지는 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체가 Fc 영역을 포함한다.
- [0014] 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 반감기 연장부에 연결된 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 상기 반감기 연장부는 폴리에틸렌 글리콜 또는 사람 혈청 알부민을 포함한다. 본 발명은 FcRn 길항제 조성물은 적어도 50%(석택적으로, 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 또는 99%)는 어푸코실화 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 Fc 영역, 또는 이의 FcRn-결합 단편을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 FcRn 길항제 조성물은 적어도 50%(석택적으로, 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 또는 99%)는 바이섹팅(bisecting) GlcNAc를 가지는 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 Fc 영역, 또는 이의 FcRn-결합 단편을 포함 복수의 FcRn 길항제 분자를 포함한다.
- [0015] 특정 실시 양태에서, 본 발명의 조성물에서 단량체 (예를 들어, 95, 96, 97, 98 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 % 이상)인 95 % 이상의 복수의 FcRn 길항제 분자를 포함하는 FcRn 길항제 조성물을 제공한다.
- [0016] 특정 실시 양태에서, 본 발명은 FcRn 길항제 조성물은, 조성물에서 집합체(예를 들어, 5, 4, 3 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 % 이하)인 5% 미만의 복수의 FcRn 길항제 분자를 포함하는 FcRn 길항제 조성물을 제공한다.
- [0017] 특정 실시 양태에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 조성물은 FcRn 길항제 분자 분해 생성물이 실질적으로 없는 것을 특징으로 하는 복수의 FcRn 길항제 분자를 포함하는 FcRn 길항제 조성물을 제공한다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 FcRn 길항제 또는 FcRn 길항제 조성물은 본 발명에서 개시되고 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에 FcRn-길항제의 유효량을 투여하는것을 포함하는 대상체에서 FcRn에 기능을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 FC 함유제, FcRn-길항제의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 투여 대상체에서 Fc 함유제의 혈청 수준을 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 함유제는 항체 또는 면역 어드 헤신이다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 함유제는 치료제 또는 진단제이다. 특정 구체 예에서 FC 함유제는 영상화제이다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 함유제는 항체 약물 접합체이다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 - 매개 질환 대상체에서 대상체에 FcRn-길항제의 유효량을 투여하는 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 항체 - 매개 질환은 글로불린 과잉혈증이다. 특정 실시예에서, 항체 - 매개 질환은 정맥 이뮤노글로불린 (IVIG)을 사용하여 치료가능한 질병 또는 장애 질환이다. 특정 실시예에서, 항체 - 매개 질환은 혈장 분리 교환 방법 및 / 또는 면역 흡착을 사용하여 치료할 수있는 질병이나 질환이다.
- [0022] 특정 실시 양태에서, 상기 항체-매개 질환은 자가면역 질환이다. 특정 실시 양태에서, 상기 자가면역질환은 동종 체장섬 이식편거부반응, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 항인지질 증후군, 자가 면역 애디슨 병, 알츠하이머 병, 항호중구 세포질 자가항체 (ANCA), 부신의 자가면역질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역성 감염, 자가면역성 심근염, 자가면역성 호중구감소증, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 저혈소판증, 자가면역성 두드러기, 베체트 병, 수포성 유사천포창, 심근증, 케슬맨 증후군, 복강 스프루 피부염, 만성 피로 면역 부전 증후군, 만성 염증성 탈수 초성 신경 병증 (CIDP), 척-스트라우스증후군, 반흔성 유사천포창, 크레스트 증후군, 한랭응집소증, 크론병, 피부근염, 확장형 심근증, 원판성 루푸스, 후천성표피수포증, 한랭 글로불린 혈증, 요소 VIII 결핍, 심근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 병, 길랑-바레, 굿파스처 증후군, 이식편대숙주병 (GVHD), 하시모토 갑상선염, 혈우병 A, 특발성 막성 신경병증(idiopathic membranous 신경병증), 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP), IgA 신경병증, IgM 다발성 신경병증, 면역 매개 혈소판 감소증, 청소년 관절염, 가와사키 병, 평편태선(lichen plantus), 경화태선(lichen

sclerosus), 홍반성 루푸스, 메니에르병(Meniere's disease), 혼합 결합 조직병, 점막 유전 포창, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 다초점 운동 신경병증(MMN), 중증 근무력증, 부종형 수포성 유사천포창, 임신유천포창, 심상성천포창, 낙엽상 천포창, 악성빈혈, 결절성 다발 동맥염, 다발 연골염, 분비선 증후군, 류마티스 성 다발성 근육통, 다발 근육염 및 피부근염, 1차 저감마글로브린 혈증, 원발성 담즙 성 간경변, 건선, 건 선성 관절염, 재발 성 다발 연골염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 고형 장기 이식 거부, 근강직 증후군, 전신성 홍 반성 루푸스, 타카야 수 동맥염, 독성 표피 괴사 (TEN), 스티븐 존슨 증후군(SJS), 측두동맥염/일시적 동맥염, 혈전성 혈소판 감소성 자반, 궤양성 대장염, 포도막염, 포진 혈관염 피부염(dermatitis herpetiformis vasculitis), 항중성구 세포질 항체 연관 혈관염(anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides), 백반증, 및 베게너 육아 종증으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0023] 특정 실시 양태에서, 상기 자가면역질환은 자가면역 이온통로병증이다. 특정 실시 양태에서, 상기 이온통로병증 자가면역 변연계 뇌염, 간질, 시신경 척수염, 램버트 - 이튼 근무 력 증후군, 중증 근무력증, 항-N-메틸-D-아스파테이트(anti- N-Methyl-D-aspartate, NMDA) 수용체 뇌염, 항- α -아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이소옥사졸프로피오닉 애시드(AMPA) 수용체 뇌염, 몰반 증후군, 신경근긴장증, 연쇄상 구균 감염과 관련된 소아 자가면역 신경정신장애(PANDAS), 및 글리신 수용체 항체-연관 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0024] 특정 실시 양태에서, 상기 FcRn 길항제는 대상체에 동시 또는 순차적으로 추가적인 치료제를 투여한다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 항-염증제이다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 리툭시맙, 다클리주맙, 바실릭시맙, 무로노맙-cd3, 인플릭시맙, 아달리무맙, 오말리주맙, 에팔리주맙, 나탈리주맙, 토실리주맙, 에쿨리주맙, 골리무맙, 카나키무맙, 우스테키무맙, 또는 벨리무맙이다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 림프구 방혈 작용제이다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 B-세포 방혈 작용제이다. 특정 실시 양태에서, 상기 B-세포 방혈 작용제 는 항체로, 예를들어 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, 또는 CD86에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0025] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 FcRn-길항제를 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 FcRn-길항제를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 FcRn-길항제를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 FcRn-길항제가 발현될 수 있는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 FcRn-길항제의 제조방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 사이 노물 거스 원숭이에 트레이서 항체 (FR70-hIgG1)의 혈청 수준에서의 Fc- Abdeg 및 HEL-Abdeg의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 2는 cynomolgous 원숭이 총 IgG의 혈청 수준에서의 Fc- Abdeg 및 HEL-Abdeg의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 3은 실험 결과 cynomolgous 원숭이 알부민 수치에서의 Fc- Abdeg 및 HEL-Abdeg의 효과를 나타낸다.

4는 cynomolgous 원숭이 추적자 항체 (FR70-hIgG1)의 혈청 수준에서의 Fc- Abdeg 및 IVIG의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 5는 ELISA의 결과가 Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT과 Fc-Abdeg-S239D 인간 CD16a에 대한 / I332E의 친화의도를 비교 분석한 것을 나타낸다.

도 6은 ELISA의 결과가 Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT 및 쥐 CD16-2을 위한 Fc-Abdeg-S239D는 / I332E의 친화의도를 비교 분석 한 것을 나타낸다.

도 7은 Fc- Abdeg, Abdeg-POT과의 Fc- AbdegS239D /를 프로 메가 (Promega)의 라지 기반 ADCC 리포터 생물 검정법을 이용하여 항 CD20 유도 ADCC 신호에 I332E의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 8은 시험 관내에서 CD70 + U266 세포를 항 CD70에 의해 유도 용해 Fc-Abdeg 및 Abdeg- POT의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 9는 면역 혈소판 감소증에 대한 급성 쥐 모델에서 혈소판 농도에서의 Fc- Abdeg,의 Fc- Abdeg-POT,의 Fc-

Abdeg-S239D / I332E 및 IVIG의 효과를 결정하는 실험 결과를 도시한다.

도 10은 Fc- Abdeg의 예시적인 겔 여과 정제의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 신규한 FcRn 길항제 조성물을 제공한다. 이 조성물은 일반적으로 네이티브 Fc 영역에 상대적으로 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존도로 FcRn에 특이적으로 결합하는 변이체 Fc 영역, 또는 FcRn-결합 단편을 포함한다. 본 발명은 놀라운 발견에 부분적으로 기초하는 단리된 변이체 Fc 영역(예를 들어, EU 포지션 252, 254, 256, 433, 434, 436에서 아미노산의 Y, T, E, K, F 및 Y를 포함하는 변이체 Fc 영역)은 생체내에서 변이체 Fc 영역을 포함하는 전체 길이 항체보다 보다 효과적이다. 본 발명의 FcRn 길항제 조성물은 특히 Fc 함유제(예를 들어, 항체 및 면역 어드헤신)의 혈청 수준을 감소시키는데 특히 유용하다. 따라서, 본 발명은 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물을 사용하는 항체-매개 질환(예 :자가 면역 질환)의 치료방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 FcRn 길항제 조성물 및 FcRn 길항제 조성물을 포함하는 약학적 조성물의 제조를 위한 FcRn 길항제 조성물을 인코딩하는 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다.
- [0028] **I. 정의**
- [0029] 다르게 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 일반적으로 당업자에 의해 이해되는 의미를 갖는다. 그러나, 어떠한 잠재적 모호성의 경우에, 용어의 의미 및 범위는 본 명세서에 제공된 정의는 사전 또는 외부 정의를 통해 선행한 것으로, 명확해야 한다. 문맥적으로 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하며, 복수 용어는 단수를 포함한다. 일반적 명명법과 관련하여 사용되며, 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화의 기술은 잘 알려져 있으며 당업계에서 통상적으로 사용된다.
- [0030] 본 발명이 더 쉽게 이해 될 수 있도록, 특정 용어들은 먼저 정의한다.
- [0031] 본 발명에 사용한 용어 "FcRn 길항제"는 Fc 영역 및 FC 영역(예를 들어, 본 발명에 기재된 변이체 Fc 영역)을 포함하는 어느 제제를 지칭한다. 단 상기 제제는 전체 길이 IgG 항체가 아님을 단서로 상기 Fc 영역을 통해 FcRn에 특이적으로 결합하고, FcRn에 이뮤노글로불린의 결합을 저해한다.
- [0032] 본 발명에서 사용한 용어 "Fc 영역"은 기본 이뮤노 글로불린 두 개의 중쇄의 Fc 영역에 의해 형성된 부분을 지칭한다. 네이티브 Fc 영역은 동중 이량체이다.
- [0033] 본 발명에서 사용한 용어 "변이체 Fc 영역"은 네이티브 Fc 영역에 하나 이상의 변형을 갖는 상대적 Fc 영역을 말한다. 변형은 아미노산 치환, 추가 및 / 또는 삭제, 추가 부분, 및 / 또는 변형 기본 글리칸의 결합을 포함할 수 있다. 구성의 Fc 영역의 각각 다른 곳에 용어는 이중 Fc 영역을 포함한다. 이러한 이중 Fc 영역의 예는 본 발명에 전체적으로 참고되는 예를 들어 US 8,216,805에 설명된 "knobs and holes"기술을 사용하여 제조된 Fc 영역이라면 제한 없이 포함된다. 상기 용어는 또한 본 발명에 전체적으로 참고되는 예를 들어 US20090252729A1 및 US20110081345A1에 설명된 링커 모이어티로 함께 결합되는 연속적인 Fc 도메인의 단일체를 포함한다.
- [0034] 본 발명에서 사용한 용어 "Fc 도메인"은 하나의 이뮤노글로불린 항체의 C 말단에 바로 파파인 절단 부위의 상류 끝 힌지 영역에서 시작하는 중쇄 부분을 의미한다. 따라서, 완전한 Fc 도메인은 (예를 들어, 상부, 중간 및 / 또는 하부 힌지 영역)도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 적어도 한 일부를 포함한다.
- [0035] 본 발명에 사용한 바와 같이 "FcRn결합 단편"이라는 용어는 FcRn에 결합을 부여하기에 충분한 Fc 영역의 부분을 의미한다.
- [0036] 본 발명에서 사용한 용어 "EU 포지션"은 Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) 및 Kabat et al, in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991에 설명된 Fc 영역에 대한 EU 넘버링 협약에서 아미노산 위치를 의미한다.
- [0037] 본 발명에서 사용한 용어 "CH1 도메인"은 이뮤노 글로불린 중쇄 EU 포지션로부터 연장 약 118-215의 첫번째 (가장 아미노 말단) 일정 영역 도메인을 말한다. CH1 도메인은 이뮤노 글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역의 VH 도메인 및 아미노 말단에 인접하고 이뮤노 글로불린 중쇄의 Fc 영역의 일부를 형성하지 않는다.
- [0038] 본 발명에서 사용한 용어 "힌지 영역"은 CH2 도메인에 CH1 도메인을 결합시키는 중쇄 분자의 일부분을 말한다. 이 힌지 영역은 약 25 잔기를 포함하고, 유연하고, 따라서 독립적으로 이동하기 위한 두개의 N-말단 항원 결합 영역을 허락한다. 힌지 영역은 세 가지 도메인으로 분할될 수 있다: 상부, 중부 및 하부 힌지 도메인(Roux et

al. J. Immunol. 161: 4083 (1998)). 상기 본 발명의 FcRn 길항제는 전부 또는 일부분의 힌지 영역을 포함 할 수 있다.

- [0039] 본 발명에서 사용한 용어 "CH2 도메인" EU 포지션 231-340으로부터 확장된 중쇄 이뮤노글로불린 분자의 부분을 말한다.
- [0040] 본 발명에서 사용한 용어 "CH3 도메인"은 CH2 도메인의 N- 말단, 예를들어 포지션 341-446 (EU 넘버링 시스템) 으로부터 확장된 약 110 잔기를 포함하는 중쇄 이뮤노글로불린 분자의 부분을 포함한다.
- [0041] 본 발명에서 사용한 용어 "FcRn"는 신생아 Fc 수용체를 의미한다. 예시적인 FcRn 분자는 RefSeq NM_004107로 설명되는 FCGRT 유전자에 의해 인코딩된 인간 FcRn를 포함한다.
- [0042] 본 발명에서 사용한 용어 "CD16"은 항체 - 의존성 세포 매개 세포 독성 (ADCC)에 요구되는 FcγRIII Fc 수용체를 의미한다. 예시적인 CD16는 분자는 RefSeq NM_000569로 설명되는 인간 CD16a를 포함한다.
- [0043] 본 발명에서 사용한 용어 "자유 시스템"은 성숙한 FcRn 길항제에 실질적으로 환원 형태로 존재하거나 기본 설계 시스템 아미노산 잔기를 지칭한다.
- [0044] 본 발명에서 사용한 용어 "항체"는 이뮤노글로불린 분자 지칭하고, 이는 네 개의 폴리펩티드 체인을 포함하고, 두개는 중쇄 (H) 및 두개의 경쇄(L)는 이황화 결합에 의해 연결된 것일 뿐만아니라, 이의 다량체(예를 들어, IgM)를 포함한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (약칭 VH) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄는 일정 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (약칭 VL)과 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄는 하나의 도메인 (CL)를 포함한다. VH 및 VL 영역의 추가로 영역의 하이퍼 변동성으로 세분화 할 수있고, 더 보존되어 영역에 산재되어 있는 프레임 워크 영역(FR), 상보성 결정영역 (CDR)으로 명명된다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어 "N-연결 글리칸"은 Fc 영역의 CH2 도메인에서 존재하는 sequon에서 아스파라긴의 측쇄 (예를 들어, Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr, 여기서 X는 프롤린을 제외한 어느 아미노산)에서의 질소에 부착된 N- 연결 글리칸을 지칭한다. Glycobiology 2 nd ed., 의 인트로덕션은 본 발명에 전체적으로 인용되었다.
- [0046] 본 발명에서 "어푸코실화"는 본 발명에 참조로 포함되는 US8067232에 기술된 바와 같이 코어 푸코스 분자가 결합된 N- 연결 글리칸을 의미한다.
- [0047] 본 발명에서 사용되는 US8021856에 기술된 용어 "바이섹팅 GlcNAc"은 그 내용으로는 본 발명에 참고로 인용되고, 코어 만노스 분자에 연결 N- 아세틸 글루코사민 (GlcNAc) 분자를 갖는 N- 연결 글리칸을 의미한다.
- [0048] 본 발명에서 사용한 용어 "항체 - 매개 질환"은 임의의 질환 또는 장애 발생 또는 대상체의 항체의 존재에 의해 악화를 의미한다.
- [0049] 본 발명에서 사용한 용어 "Fc 함유제"는 FC 영역을 포함하는 분자이다.
- [0050] 본 발명에 사용한 용어 "림프구 방혈 작용제"투여시 대상체에서 백혈구의 수를 감소시키는 작용제를 의미한다.
- [0051] 본 발명에서 사용한 용어 "B- 세포 방혈 작용제" 투여시 대상체에서 B 세포의 수를 감소시키는 작용제를 의미한다.
- [0052] 본 발명에서 사용한 용어 "T 세포 고갈제"는 투여시 대상체에서 T 세포의 수를 감소시키는 작용제를 의미한다.
- [0053] 본 발명에 사용 바와 같이, 용어 "자가 면역 이온 통로 병증"은 자가 항체에 의한 이온 채널 소단위 또는 채널을 조절하는 분자에 대해 질환을 의미한다.
- [0054] 상기 용어 "치료(treat)" 본 발명에 사용 "치료(treating)" 및 "치료(treatment)"는 본 발명에 기재된 치료 또는 예방 방법을 참조한다. 상기 "치료" 방법은 대상체를 "치료"고용 투여 방법 항체 또는 항원 대상체는 IL-6 관련 질환 또는 장애 (예를 들어 염증, 암)을 가지거나 가질예정인, 예를 들어, 본 발명의 이들 단편 바인딩 질병 또는 질환을 예방하기 위해서는, 경화가 지연, 또는 예상 이상으로 환자의 생존을 연장하기 위해 심각도를 줄이거나, 질환 또는 장애 또는 반복되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화 이러한 치료의 부재. 본 발명에서 사용한 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다.
- [0055] 본 발명에 사용한 용어 "면역 어드 헤신"은 Fc 영역과의 결합 단백질 (예, 수용체, 리간드, 또는 세포 접착 분자)의 기능적 도메인을 포함하는 항체 -유사 분자를 의미한다.

[0056] **II. FcRn 길항제**

[0057] 한 측면에서, 본 발명은 신규한 FcRn 길항제 조성물을 제공한다. 일반적으로, 이들 조성물은 네이티브 Fc 영역에 상대적으로 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존성으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 Fc 영역 또는 이들 FcRn-결합 단편을 포함한다. 이 FcRn 길항제는 상기 제제의 혈청수준을 감소시키는 것을 수반하여 Fc-함유제의 분해율을 증가시키는 결과를 초래하여 Fc 함유제(예를 들어, 항체 및 면역 어드 헤신들)가 생체내에서 FcRn에 결합하는 것을 억제한다.

[0058] 본 발명의 단리된 변이체 Fc 영역(예를 들어, EU 포지션 252, 254, 256, 433, 434, 436에서 아미노산의 Y, T, E, K, F 및 Y를 포함하는 변이체 Fc 영역)은 생체내에서 변이체 Fc 영역을 포함하는 전체 길이 항체보다 보다 효과적이다. 따라서, 특정 실시 양태에서의 FcRn 길항제 조성물은 전체 길이의 항체가 아니다. 특정 실시 양태에서의 FcRn 길항제 조성물은 항체 가변 도메인을 포함하지 않는다. 특정 실시 양태에서의 FcRn 길항제 조성물은 항체 가변 도메인 또는 CH1 도메인을 포함하지 않는다. 그러나, 특정 실시 양태에서의 FcRn 길항제 조성물은 항체 가변 도메인을 포함하는 하나 이상의 추가의 결합 도메인 또는 잔기에 결합된 Fc 변이체를 포함하는 영역이 있다.

[0059] 어느 Fc 영역은 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물에 사용되는 변이체 Fc 영역을 생성하기 위해 변경될 수 있다. 일반적으로, Fc 영역, 또는 FcRn-이 결합 단편은 인간 이뮤노글로불린에서 기인한다. Fc 영역이 예를 들어 포함하는 임의의 다른 포유류 종(카멜 리드 종 설치류(예 : 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그) 또는 비 - 인간 영장류(예를 들면 침팬지, 원숭이) 종)의 이뮤노글로불린으로부터 유래 될 수 있음을 이해해야한다. 또한, Fc 영역 또는 부분은 IgM, IgG, IgD 및 IgE를 포함하는 이뮤노글로불린 군 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 이뮤노글로불린 아이소타입을 포함하는 이뮤노글로불린 군에서 파생될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 Fc 영역은 IgG의 Fc 영역(예를 들어, 인간 IgG 영역)이다. 특정 실시 양태에서, Fc 영역은 IgG1의 Fc 영역(예를 들어, 인간 IgG1의 영역)이다. 특정 실시 양태에서, Fc 영역은 여러 Fc 영역의 일부를 포함하는 키메라가 Fc 영역이다. 키메라 Fc 영역의 적절한 예는 본 발명에 참고 문헌으로 도입된 US20110243966A1에 기술된다. Fc 영역 유전자 서열들(예를 들어 인간의 일정 영역 유전자 서열들)의 다양한 공개적으로 액세스할 수 있는 예금의 형태로 사용할 수 있다. 본 발명의 범위는 대립 유전자 변이체와 Fc 영역의 변이를 포함하는 것으로 이해 될 것이다.

[0060] Fc 영역이 더 잘리거나 내부적으로 이들의 최소한의 FcRn- 연결 단편을 생산 삭제 될 수 있다. FcRn에 결합하는 Fc-영역 단편의 능력은, 예를 들어 통상적으로 알려진 ELISA 결합 분석 기술을 통하여 결정될 수 있다.

[0061] FcRn 길항제의 제조 가능성을 향상시키기 위해서는, Fc 영역의 비 이황화 결합 시스테인 잔기를 포함하지 않는 것이 바람직하다. 따라서, 특정 실시 양태에서는 Fc 영역의 자유 시스테인 잔기를 포함하지 않는다.

[0062] 네이티브 Fc 영역에 상대적으로 증가된 친화도 및 감소된 pH 의존성으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 변이체 Fc 영역, 또는 FcRn- 연결 단편은 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물에 사용할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 변경, 치환, 삽입 및 원하는 특성을 부여 / 또는 삭제를 포함한다. 특정 실시 양태에서 상기 변이체 Fc 영역 또는 단편은 EU 포지션 각각 252, 254, 256, 433, 434 및 436에서 아미노산 Y, T, E, K, F 및 Y를 포함한다. 변이체 Fc 영역에 사용될 수 있는 아미노산 서열의 미제한적인 예시는 표 1에 설명된다. 특정 실시 양태에서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1로 설명되는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시 양태에서, 상기 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1, 2 또는 3으로 설명되는 아미노산 서열로 이루어진다. 특정 실시 양태에서, FcRn- 길항제는 변이체 Fc 영역의 Fc 도메인의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 1, 2 또는 3으로 설명되는 아미노산 서열로 이루어지는 변이체 Fc 영역으로 이루어진다.

표 1

[0063] 변이체 Fc 영역의 비 제한적인 예시의 아미노산 서열

SEQ ID NO	아미노산 서열
1	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG

2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSP GK
3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSP G
EU 포지션 252, 254, 256, 433, 및 434에서의 아미노산은 밑줄표시.	

[0064] 특정 실시 양태에서, 변이체 Fc 영역은 추가 Fc 수용체에 대한 변경된 결합 친화도(예를 들어, 증가 또는 감소)가진다. 변이체 Fc 영역은 하나 이상의 Fc γ 수용체, 예를 들어 Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a) 및 Fc γ RIIIB(CD16b)에 대한 변경된 결합 친화도(예를 들어, 증가 또는 감소)를 가질 수 있다. 추가 Fc 수용체에 대한 친화도를 변경하는 임의의 기술 인식 수단을 사용할 수 있다. 특정 실시 양태에서 변이체 Fc 영역의 아미노산이 서열 변경된다.

[0065] 특정 실시 양태에서 상기 변이체 Fc 영역은 EU 인덱스에 의해 넘버링된 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, 및 334로 이루어지는 군으로 부터 선택되는 하나 이상의 포지션에서 인공적으로 일어나는 아미노산 잔기를 포함한다. 선택적으로, 상기 Fc 영역은 본 기술 분야에서 당업자에게 공지 추가의 및 / 또는 다른 위치에서 인공적으로 발생된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publications WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 and WO 05/040217, 상기 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다).

[0066] 특정 실시 양태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 적어도 하나의 비-천연으로 이루어지는 아미노산 잔기를 포함한다. 상기 아미노산 잔기는 Kabat 에서 설명된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 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, 241 L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 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, 및 332A 로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 선택적으로, 상기 Fc 영역은 추가적으로 및/또는 대안적으로 문헌에서 당업자에게 알려진 비-천연으로 이루어진 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT Patent Publications WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 and WO 05/040217, 상기 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다).

[0067] 다른 알려진 Fc 변이체는 하기에 개시된 것에 제한되지 않고 본 발명에 개시된 FcRn 길항제에 사용될 수 있다. Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan et al, 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657-2662; Lund et al, 1992, Mol. Immunol., 29:53-59; Alegre et al, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA, 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, Immunol Lett., 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J., 9:115-119; Jefferis et al, 1996, Immunol Lett., 54:101-104; Lund et al, 1996, J. Immunol., 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, J. Immunol., 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, J. Immunol., 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol., 200:16-26; Idusogie et al, 2001, J. Immunol., 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol. Chem., 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, Immunol Lett., 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans., 30:487-490); U.S. Pat. Nos. 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; U.S. Patent Publication Nos. 2004/0002587 and PCT Publications WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO

04/063351, 의 내용은 그 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

- [0068] 특정 실시 양태에서, 변이체 Fc 영역은 각각 다른 Fc 도메인 성분의 이중이다. 상기 Fc 이중의 제조방법 (예를 들어 본 발명에 참고로 인용되는 US 8,216,805을 참조)은 당 업계에 공지되어있다. 특정 실시 양태에서, 상기 변이체 Fc 영역은 Fc 도메인 성분의 링커 잔기에 의해 서로 연결 단일쇄 Fc 영역이다. 단일쇄 Fc 영역의 제조 방법은(각각 그 전체가 본 발명에 참고로 인용되는 예컨대, US20090252729A1 및 US20110081345A1를 참조) 본 기술 분야에 공지되어있다.
- [0069] 이는 병원성의 IgG 항체가 관찰 것으로 여겨진다. 자가 면역 질환의 발병이 질환 유발하거나 질병의 진행에 기여하는 세포의 Fc 수용체의 부적절한 활성화를 통해 질병을 매개한다. 집계자가 항체 및 / 또는 자가 항체 복합체 자기 항원 (면역 복합체) (때문에 자기 조직에 대한 면역 매개 염증의 일부에서 발생하는) 다수의 자가 면역 질환을 일으키는 Fc 수용체를 활성화에 결합(see e.g., Clarkson et al., NEJM 314(9), 1236-1239 (2013)); US20040010124A1; US20040047862A1; and US2004/0265321A1, 각각 그 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)한다. 따라서, 항체 - 매개 질환(예 :자가 면역 질환)을 치료하는 것은 제거가능한 자가항체 및 활성화된 Fc 수용체와 항체의 면역 복합체의 상호작용을 막는 두가지 모두 이점이다(예를 들면, Fc γ 수용체, Fc 수용체를 활성화하여 항체 이들의 면역 복합체의 상호 작용을 차단하는 CD16a).
- [0070] 따라서, 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제의 변이체 Fc 영역은 CD16a (예를 들어, 인간 CD16a)에 증가된 결합을 나타냈다. 이것은 추가로 자가 면역 복합체에 의한 염증 반응을 길항하는 FcRn 길항제일 수 있다는 점에서 특히 유리하다. 항체 FcRn에 억제에 의해 제거 대상이 된다. (예를 들어, 인간 CD16a) CD16a에 대한 친화도를 증가시키는 임의의 기술 인식 수단이 사용될 수 있다. 특정 실시 양태에서의 FcRn-길항제(EU 포지션 297에서, 예를 들어,)는 N-연결 글리칸을 포함하는 변이체 FC-을 영역 포함한다. 이 경우는 글리칸 구조를 변경하여 CD16a 대한 FcRn- 길항제의 결합 친화도를 증가시킬 수있다. Fc 영역 의 N- 연결 글리칸의 변형은 당 업계에 잘 알려져있다. 예를 들어, 바이섹팅 GlcNAc의 구조를 갖는 N- 연결 글리칸 또는 N- 글리칸은 CD16a 증가 친화도를 나타내는 것으로 밝혀졌다 어푸코실화. 따라서, 특정 실시 양태에서, N- 연결 글리칸은 어푸코실화된다. 어푸코실화는 당분야의 알려진 수단을 이용하여 달성될 수있다. 예를 들어, FcRn- 길항제는 푸코스화는 US 8,067,232의 내용 예를 들어 변이체 Fc 영역 (참조의 EU 포지션 297에서의 N- 연결 글리칸에 추가되지 않도록 푸코실 트랜스퍼가 부족한 세포에서 발현 될 수있다)을 포함하고, 그 전체가 본 발명에 참고로 인용된다. 특정 실시 양태에서, N- 연결 글리칸은 바이섹팅 GlcNAc의 구조를 가지고 있다. 바이섹팅 GlcNAc의 구조는 임의의 알려진 기술 수단을 사용하여 달성될 수있다. 예를 들어, FcRn- 길항제 (예 : GlcNAc가 변이체 Fc 영역의 EU 포지션 297에서의 N- 연결 글리칸에 첨가되어 바이섹팅되도록 beta1-4-N 아세틸 글루코사민 III를 발현하는 세포 (GnTIII)로 표현 될 수있다, 본 발명에 참고로 포함되어있는 내용은 US 8,021,856, 에 개시되어 있다). 추가적으로 또는 대안적으로, N- 연결 글리칸 구조의 변화는 또한 시험관 내에서 효소적 수단에 의해 달성 될 수있다.
- [0071] 특정 실시 양태에서, 본 발명은 FcRn- 길항제의 일부 분자 안에 포함되는 글리칸 구조를 변경하는 단계를 포함하는 방법 FcRn- 길항제의 제조방법을 제공한다. 특정 실시 양태에서 상기 FcRn- 길항제 조성물을 포함하는 복수의 FcRn- 길항제 분자 개시된 본원의 적어도 50 % (임의로, 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 99 %)를 포함하는 분자, 여기서 Fc 영역 또는 FcRn- 결합 단편은 어푸코실화 N-연결 글리칸을 갖는다. 특정 실시 양태에서 상기 FcRn- 길항제 조성물은, 본원에 개시된 복수의 FcRn- 길항제 분자 적어도 50 % (임의로, 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 99 %)를 포함하는 분자를 포함한다. 여기서 Fc 영역 또는 FcRn- 결합 단편은 이들의 바이섹팅 GlcNAc를 갖는 N- 연결 글리칸을 포함하는 방법이다.
- [0072] 특정 실시 양태에서, 변이체 Fc 영역은 N- 연결 글리칸을 포함하지 않는다. 상기는 모든 알려진 기술 방법을 이용하여 달성 될 수있다. 예를 들어, 상기 Fc 변이체는 N - 연결 글리코실화 능력이 있는 세포 내에서 발현 될 수있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 Fc 변이체의 아미노산 서열이(예를 들어, NXT sequon의 돌연변이에 의해) N - 연결 글리코실화를 방지하거나 억제하기 위해 변경될 수있다. 대안적으로, 상기 Fc 변이체는 무세포 시스템 (예를 들어, 화학 합성)으로 합성할 수있다.
- [0073] 특정 실시 양태에서, FcRn- 길항제 분자는 변형될 수있다, 예를 들어, FcRn에 특이적으로 결합으로부터 FcRn-길항제를 막을수 없는 공유결합과 같은 FcRn 길항제에 공유결합하는 분자(예를 들어, 결합 또는 이미징 모이어티)에 의해 변형될 수 있다. 예를 들면, 제한적인 것은 아니나, FcRn- 길항제는 세포 리간드 또는 다른 단백질들을 보호하는 것으로 알려져 보호 블로킹 군, 단백질 분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 결합 등으로 알려진 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 유도체화에 의해 변형될 수 있다.
- [0074] 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 반감기 연장부에 결합된 변이체 Fc 영역을 포함한다. 본 발명에서 사용한

용어 "반감기 연장부"는 본 발명에 개시된 길항제 FcRn에 연결 때, FcRn 길항제의 반감기를 증가시키는 분자를 의미한다. 모든 반감기 연장부는 FcRn 길항제로 (공유 또는 비공유)결합 될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 반감기 연장부는 폴리에틸렌 글리콜 또는 인간 혈청 알부민이다. 특정 실시 양태에서, FcRn 길항제는 결합 분자, 특히, 대상체에 존재하는 반감기 연장부에 결합하는 혈액 전달 분자 또는 세포와 같은, 혈청 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민), IgG, 적혈구 등에 결합된다.

[0075] 본 발명에 개시된 FcRn 길항제는 여기에 우수한 제조능을 가진다. 본원 실시예 5와 같이(예를들어, 6g / L의 CHO 세포를 10 L 탱크 생물 반응기에서 교반) 예를 들어, 이들은 포유 동물 세포에서 높은 수준으로 발현 될 수 있다. 또한, 단백질 정제 후, FcRn 길항제 조성물 정제 결과는 FcRn 길항제 단량체의 매우 높은 비율을 갖고, FcRn 길항제 단백질 응집 및 분해 생성물의 극히 낮은 레벨을 포함한다. 따라서, 특정 실시 양태에서, 본 발명의 FcRn 길항제 조성물은 복수의 FcRn 길항제 분자 본 발명에 개시된 95 % 이상의 단량체 (95, 96, 97, 98, 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9 %이상)포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 FcRn 길항제 조성물은, 복수의 FcRn 길항제 분자 본 발명에 개시된 상기 FcRn 길항제 분자 조성물의 집합체에 존재하는 5 % 미만 (예컨대, 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 %이하)를 포함한다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 FcRn 길항제 조성물은, 복수의 FcRn 길항제 분자, 본 발명에 개시된, FcRn 길항제 분자 분해 생성물이 실질적으로 없는 것을 특징한다.

[0076] III. FcRn 길항제의 용도

[0077] FcRn에 길항제 조성물은 Fc 함유제(예를 들어, 항체 및 면역억제제)의 혈청 수준을 감소에 특히 유용하다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 FcRn에 기능을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은, 일반적으로 대상체에 FcRn 길항제 조성물 (예컨대, 약학적 조성물)의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0078] Fc 함유제의 혈청 수준의 감소 (예를 들어, 항체 및 면역억제제)는 항체 - 매개 질환의 치료 (예를 들어 자가 면역 질환)에 특히 적용 가능하다. 따라서, 일 양태에서 본 발명은 FcRn 길항제 조성물을 사용하여 항체 - 매개 질환(예를 들어, 자가 면역 질환)의 치료 방법을 제공한다.

[0079] 어느 항체-매개 질환은 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물을 사용하여 치료될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 항체-매개 질환은 IVIG에 의해 치료될 수 있는 것 중 하나이다. 특정 실시 양태에서, 상기 항체-매개 질환은 자가면역 질환이다. 특정 실시 양태에서, 상기 자가면역질환은 비제한적이나, 동종 채장섬 이식편거부반응, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 항인지질 증후군, 자가 면역 애디슨 병, 알츠하이머 병, 항호중구 세포질 자가항체 (ANCA), 부신의 자가면역질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역성 감염, 자가면역성 심근염, 자가면역성 호중구감소증, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 저혈소판증, 자가면역성 두드러기, 베체트 병, 수포성 유사천포창, 심근증, 케슬렌 증후군, 복강 스프루 피부염, 만성 피로 면역 부전 증후군, 만성 염증성 탈수 조성 신경 병증 (CIDP), 척-스트라우스증후군, 반흔성 유사천포창, 크레스트 증후군, 한랭응집소증, 크론병, 피부근염, 확장형 심근증, 원판성 루푸스, 후천성표피수포증, 한랭 글로불린 혈증, 요소 VIII 결핍, 섬근육통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 병, 길랑-바레, 굿파스치 증후군, 이식편대숙주병(GVHD), 하시모토 갑상선염, 혈우병 A, 특발성 막성 신경병증(idiopathic membranous 신경병증), 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP), IgA 신경병증, IgM 다발성 신경병증, 면역 매개 혈소판 감소증, 청소년 관절염, 가와사키 병, 평편태선(lichen plantus), 경화태선(lichen sclerosus), 홍반성 루푸스, 메니에르병(Meniere's disease), 혼합 결합 조직병, 점막 유전 포창, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 다초점 운동 신경병증(MMN), 중증 근무력증, 부종성 수포성 유사천포창, 임신유천포창, 심상성천포창, 낙엽상 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발 동맥염, 다발 연골염, 분비선 증후군, 류마티스 성 다발성 근육통, 다발 근육염 및 피부근염, 1차 저감마글로브린 혈증, 원발성 담즙 성 간경변, 건선, 건 선성 관절염, 재발 성 다발 연골염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 고형 장기 이식 거부, 근 강직 증후군, 전신성 홍 반성 루푸스, 타카야 수 동맥염, 독성 표피 괴사 (TEN), 스티븐 존슨 증후군(SJS), 측 두동맥염/일시적 동맥염, 혈전성 혈소판 감소성 자반, 켈양성 대장염, 포도막염, 포진 혈관염 피부염 (dermatitis herpetiformis vasculitis), 항중성구 세포질 항체 연관 혈관염(anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides), 백반증, 및 베케너 육아 증후군으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0080] 특정 실시 양태에서, 상기 자가면역질환은 자가면역 이온통로병증이다. 특정 실시 양태에서, 상기 이온통로병증은 비제한적이나 자가면역 변연계 뇌염, 간질, 시신경 척수염, 램버트 - 이튼 근무 력 증후군, 중증 근무력증, 항-N-메틸-D-아스파테이트(anti- N-Methyl-D-aspartate, NMDA) 수용체 뇌염, 항- α -아미노-3-하이드록시-5-메틸-4-이소옥사졸프로피오닉 애시드(AMPA) 수용체 뇌염, 몰반 증후군, 신경근긴장증, 연쇄상 구균 감염과 관련된

소아 자가면역 신경정신장애(PANDAS), 및 글리신 수용체 항체-연관 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

- [0081] 본 발명의 FcRn에 길항제 조성물은 혈청 이뮤노글로불린의 이상 생산이 특징인 항체 - 매개 질환 치료에 특히 적합하다. 따라서, 특정 실시 양태에서 FcRn 길항제 조성물은 하이퍼감마 글로불리네미아를 치료하는데 사용된다.
- [0082] FcRn에 길항제 조성물들과 같은 하나 이상의 추가 치료제를 과 함께 사용될 수있다. 특정 실시 양태에서의 추가적인 치료제는 항-염증제이다. 어떤 염증제라도 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물과 함께 조합하여 사용할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 치료제는 리톡시맵, 다클리주맵, 바실릭시맵, 무로노맵-cd3, 인플릭시맵, 아달리무맵, 오말리주맵, 에팔리주맵, 나탈리주맵, 토실리주맵, 에쿨리주맵, 골리무맵, 카나키무맵, 우스테키무맵, 또는 벨리무맵이다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 림프구 방혈 작용제이다. 특정 실시 양태에서, 상기 추가적인 치료제는 B-세포 방혈 작용제이다. 어떤 림프구 방혈 작용제라도 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물과 함께 조합하여 사용할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 B-세포 방혈 작용제는 항체로, 예를 들어 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD70, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, 또는 CD86에 특이적으로 결합하는 항체이다. 상기 FcRn 길항제 및 추가적인 치료제는 동일하거나 상이한 경로를 통해, 동시에 또는 순차적으로 환자에게 투여 될 수있다.
- [0083] FcRn에 길항제 조성물은 신속하게 대상체에 Fc 함유제의 혈청 수준을 감소하는데 적합하다. 상기 신속한 제거는 약물을 환자에 노출을 줄일 수 있기 때문에 FC 함유제(예를 들어, 항체 - 면역 원성 약물 접합체 또는 제제)가 독성일 경우에 유익하다. 신속한 제거는 또한 Fc 함유제가 제제의 낮은 혈청 수준을 요구하는 영상 화제일 경우에 용이하다. 따라서, 특정 실시 양태에서 FcRn 길항제 조성물은 Fc 함유제 투여시에 Fc 함유제의 혈청 수준을 감소하는 데 사용된다. 임의의 Fc 함유제 (예를 들어, 치료제 또는 진단 제)의 혈청 수준은 FcRn 길항제 조성물을 사용하여 감소될 수 있다. Fc 함유제의 비 제한적인 예는 활상(항체 표지)제, 항체 약물 접합체또는 면역 원성 제제 (예를 들어, 비 - 인간 항체 또는 면역 어드 헤신)를 포함한다. FcRn 길항제는 Fc 함유제와 순차적 또는 동시에 투여 될 수있다 (예를 들면, FC 함유제 투여 전 또는 후).
- [0084] 또한, 치료제의 투여가 요구되는 조건 또는 질환에서, 대상체는 종종 대상체에서 의도 한 치료 목적으로 사용되는 것을 치료제를 방지하거나 주제에 부작용 을 일으킬 치료제에 대항하는 항체(예를 들어, 항 약물 항체)를 개발한다. 따라서, FcRn 길항제 조성물은 대상체에서 개발된 치료제에 대항하는 항체(예를 들어, 항 약물 항체)를 제거하는데 사용될 수 있다.
- [0085] 상기 FcRn 길항제 조성물 또한 IgG의 수준을 감소시킴으로써 치료 학적 단백질의 효과를 향상시키기 위해 치료 단백질과 조합하여 사용할 수있다. IgG의 항체는 치료 단백질의 감소 생체 이용률에 대한 책임이 있다. 특정 실시 양태에서 환자에게 본 발명에 개시된 FcRn 길항제 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 응고 인자에 대한 면역 반응으로 인한 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 적절한 응고 인자는 제한되는 것은 아니나, 피브리노겐, 트롬빈, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, X 인자, 인자 XI, 인자 XII, 인자 XIII, 또는 폰 빌레 브란트 인자를 포함한다. 이 방법은 혈우병 A 또는 혈우병 B.에서, 예를 들면, 조절 또는 치료 또는 앓는 환자의 혈액 응고 인자에 대한 면역 반응을 방지하기 위해 사용될 수있다. 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 조절 또는 면역 반응을 치료하는 데 사용될 수있다. 특정 실시 양태에서, 예를 들면, 본 발명의 방법은 순수 적혈구 무형성증 (PRCA)을 앓고 있는 환자의 치료에서 면역반응을 조절 또는 치료하는데 사용할 수 있다.
- [0086] FcRn는 임신한 여성 태아에서 태반을 통해 모체의 항체를 수송 역할을 한다. 따라서, 임신 여성이 Fc 함유제(예를 들어, 치료 항체)를 투여할 경우, FcRn 매개 수송의 결과로서 제제는 태반을 가로 질러 태아와 접촉 할 수있다. Fc 함유제의 태아 발달에서의 잠재적인 악영향을 방지하기 위해, FcRn에 그 기능을 차단하는 것이 유리할 것이다. 따라서, 본 발명은, 여성에 Fc 함유제 투여와 동시 또는 순차적(사전 또는 사후)으로 FcRn 길항제 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 임신부에서의 태아로 Fc 함유제 (예를 들어, 치료 항체)의 태반 전송을 방지하는 방법을 제공한다. 임신부에서의 태아로 Fc 함유제 (예를 들어, 치료 항체)의 태반 전송을 방지하는 방법을 제공한다.
- [0087] 또한, FcRn 길항제 조성물은 염증성 질환을 치료하는데 사용될 수있다. 본 명세서에 개시되어 있지만, 상기 염증성 질환은 제한되지 않으나, 천식, 궤양성 대장염 및 알레르기 비염 / 부비동염, 피부 알레르기 (두드러기 (urticaria) / 두드러기(hives), 혈관 부종, 아토피 성 피부염을 비롯한 염증성 장 증후군 알레르기), 골관절염, 류마티스 관절염 및 척추 관절 병증을 포함하여 식품 알레르기, 약물 알레르기, 곤충 알레르기, 비만 세포증, 관절염, 및 척추 관절병증을 포함한다.

[0088] 질병 또는 증상의 치료를 위한 유전자 치료의 성공적인 구현은 트랜스진에 의해 뿐만아니라 유전자를 전달하기 위해 사용되는 벡터를 인코딩하는 치료 단백질에 대한 특이 항체의 개발에 의해 방해될 수있다. 따라서, FcRn 길항제 조성물은 IgG의 수준을 감소시킴으로써 상기 인코딩 치료제 단백질의 장점을 향상시키는 유전자 요법과 조합하여 투여될 수있다. 이러한 방법은 IgG의 항체가 유전자 치료 벡터 또는 인코딩 치료용 단백질의 삼소된 생체 이용율에 반응하는 상황에서 특히 유용하다. 유전자 요법 벡터는, 예를 들면, 아데노 바이러스 및 아데노 - 관련 바이러스와 같은 바이러스 성 벡터일 수있다. 예컨대, 유전자 요법을 사용하는 치료를 포함는 질병이라면, 제한되는 것은 아니나, 낭포성 섬유증, 혈우병, PRCA, 근이영양증, 또는 고셔병과 파브리 병과 같은 리소좀 저장 질환이다.

[0089] 당업자는 FcRn 길항제 조성물의 항체 - 매개 질환을 치료하기 위한 목적으로 효과적이고, 비독성인 양을 결정하는 것은 통상적인 실험에 의해 결정될 수있을 것이다. 예를 들어, 폴리펩티드의 치료 활성량은 질병 단계와 같은 요소에 따라 달라질 수있다(예를 들어, 단계 I vs 단계 IV). 환자의 연령, 성별, 건강 합병증 (예, 면역 억제 상태 또는 질병) 및 무게 상기 항체의 능력은 대상체의 원하는 반응을 유도한다. 투여 처방은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수있다. 예를 들어, 여러 분할 투여는 매일 투여 할 수도 있고, 치료 상황의 위급성에 의해 나타난 바와 같이, 투여량은 비례하여 감소 될 수 있다. 일반적으로 일 예에 따라, 효과적인 투여량은 체중 1kg 당 약 0.1 내지 10,000 mg /kg의 범위이고, 예를 들어, 체중 1kg 당 약 1-1000, 약 10-500, 또는 약 50-250 mg/ kg(예를 들어 하루에 체중 1kg 당 약 70 mg / kg)이다.

[0090] IV. 약학적 조성물

[0091] 다른 측면에서, 본 발명은 FcRn에 길항제 또는 FcRn에 길항제 조성물 및 본 발명에 개시된 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 적합한 제약 담체의 예는 E. W. Martin의 레밍턴의 약제 과학에 설명되어 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 글루코스, 락토스, 수 크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르 산 나트륨, 글리세롤 모노 스테아 레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물을 포함 할 수있다 에탄올 등을 들 수있다. 상기 조성물은 또한 pH를 완충 시약 및 습윤제 또는 유화제를 함유 할 수있다.

[0092] 약학적 조성물은 볼루스 주사에 의한 비경구 투여 (예, 정맥 내 또는 근육 내)용으로 제형화 될 수있다. 주사용 제제는 앰플 또는 보존제가 첨가된 다회 투여 용기, 예를 들어 단위 투여 형태로 제시될 수있다. 조성물은 유성 또는 수성 이동체(vehicle) 중의 현탁액, 용액, 또는 에멀전과 같은 형태를 취할수 있고, 분산제 및 / 또는 안정화제, 현탁제과 같은 제형화제를 함유할 수있다. 대안적으로, 활성 성분은 적합한 이동체, 예컨대 발열원이 없는 물과 함께 구성하기 위해 분말 형태 일 수있다.

[0093] FcRn에 길항제들은 미국 특허 No.5,326,856에 설명된 킬레이트제에 결합될 수 있다. 펩티드 - 킬레이트 복합체는 IgG의 수준의 조절과 관련된 질환 또는 증상의 진단 또는 치료를 위한 영상 화제를 제공하기 위하여 방사성 표지될 수있다.

[0094] V. FcRn 길항제의 제조

[0095] 한 측면에서, 본 발명은 세포가 본 발명에 개시된 s의 길항제 FcRn도를 인코딩이냐 숙주 폴리 뉴클레오티드, 벡터를 제공한다. 이러한 폴리 뉴클레오티드를 표현한 FcRn 길항제의 제조 방법 또한 제공된다.

[0096] 코딩 폴리 뉴클레오티드 FcRn에 길항제의 개시 명세서에서 일반적으로 도입을위한 발현 벡터에 삽입되어 숙주 세포의 청구 FcRn에 길항제의 원하는 양을 생산하기 위해 사용될 수있다. 따라서, 특정 측면에서, 본 발명은 여기에 개시된 폴리 뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하고, 숙주 세포는 상기 벡터 및 폴리 뉴클레오티드를 포함한다.

[0097] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"로 도입 세포에서 목적 유전자를 발현하기 위한 수단으로 본 발명에 따라 사용 경로를 의미하는 것으로, 본 명세서 및 청구 범위의 목적을 위해 사용된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 이러한 벡터는 용이 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택 될 수있다. 일반적으로, 선별 마커를 포함할 발명과 호환 벡터를 적절한 제한 부위를 목적 유전자와 입력 및 / 또는 진핵 세포 또는 원핵 세포에서 복제 할 수 있는 능력의 클로닝을 용이하게한다.

[0098] 다양한 발현 벡터 시스템은 본 발명의 목적을 위해 사용될 수있다. 예를 들어, 벡터의 한 클래스는, 소 유두종 바이러스, 폴리오 마 바이러스, 아데노 바이러스, 우두 바이러스, 바쿨로 바이러스, 레트로 바이러스 (RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스로 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 기타 내부 리보솜

결합 부위를 가진 폴리 시스 트론 시스템의 사용을 포함한다. 또한, 염색체 DNA 내로 통합 한 세포를 형질 전환 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 지표를 도입하여 선택 될 수 있다. 마커는 구리와 같은 중금속에 대한 영양 요 호스트 항균제 내성 (예를 들면, 항생 물질) 또는 저항 prototrophy 제공 할 수 있다. 선별 마 아커 유전자 중 직접 DNA 서열들에 링크 될 수 있는 표현, 또는 동시형질전환하여 동일한 세포에 도입한다. 추가 요소는 mRNA의 최적 합성에 필요할 수 있다. 이러한 요소는 신호 서열, 스플 라이스 신호뿐만 아니라 전사 프로모터, 강화제(enhancer), 및 종결 시그널을 포함 할 수 있다.

[0099] FcRn에 길항제를 코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조 후에 더 일반적으로, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 내로 적절히 도입 될 수 있다. 즉, 숙주 세포가 변형 될 수 있다. 숙주 세포 내로 도입된 플라스미드는 당업자에게 공지 다양한 기법에 의해 달성될 수 있다. 이들은, 제한되는 것은 아니지만, 본래 포락션 바이러스 DNA, 미세 주입 법과 감염, 원형질 융합, 인산 칼슘 침전, 세포 융합 (전기 영동 및 전기 포함) 형질이다. (참조, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988).) 가장 바람직하게, 숙주에 도입 플라스미드로 전기 천공한다. 형질 전환 세포는 FcRn에 길항제의 생산에 적절한 조건 하에서 성장 및 FcRn에 길항제 발현에 대해 분석한다. 대표적인 분석 기술은 효소 면역 분석법 (ELISA), 방사선 면역 측정법 (RIA) 또는 형광 활성화 세포 정렬기 분석 (FACS), 면역 조직 화학법 등을 들 수 있다.

[0100] 본 발명에서 사용한 용어 "형질 전환"은 유전자형을 변경하고, 결과적으로 받는 세포의 변화를 초래하는 숙주 세포에 DNA를 도입하는 넓은 의미로 사용된다.

[0101] 그 같은 라인, "숙주 세포"와 함께 제조합 DNA 기술 및 인코딩 적어도 하나의 이중 유전자를 사용하여 구성 벡터로 형질 전환된 세포를 의미한다. 제조합 호스트의 폴리 펩타이드의 분리를 위한 프로세스의 설명에서, 용어 "세포"과 "세포 배양"이 명확하게 달리 명시되지 않는 한 FcRn 길항제에의 소스를 나타내는 의미로 사용된다. 즉, "세포"에서 FcRn 길항제를 회수하는 어떤 스핀다운 전체 세포, 또는 현탁 매질과 세포를 모두 함유하는 세포 배양 물에서 의미할 수 있다.

[0102] 일 실시예에서, FcRn 길항제 발현에 사용되는 숙주 세포 라인은 포유류 기원이고; 당업자는 내부 발현되는 목적 유전자 산물에 가장 적합한 특정 숙주 세포 라인을 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포 라인은 DG44 및 DUXB11 (중국어 햄스터 난소 라인 DHFR 마이너스), HELA (인간 자궁 경부암), CVI (원숭이 신장 선), COS (SV40 T 항원 CVI의 유도체), R1610 (중국어 햄스터 섬유 아세포) BALBC / 3T3 (마우스 섬유 아세포), HAK (햄스터 신장 선), SP2 / 0 (마우스 골수종), BFA - 1c1BPT (소 내피 세포), 라지 (인간 림프구), 293 (인간 신장) 를 포함 하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 실시예에서, 세포주는 변경된 글리코 실화를 제공, 예를 들어 어푸코실화는 FcRn 길항제 (예 PER.C6.RTM. (Crucell) 또는 FUT8-녹아웃 CHO 세포주 (Potelligent™ 세포) (Biowa, Princeton, N.J.)). 일 실시예에서, NS0 세포가 사용될 수 있다. CHO 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포 라인은 상용 서비스, 미국의 조직 문화 컬렉션이나 출판 문학에서 일반적으로 사용할 수 있다.

[0103] 시험관 생산에서 원하는 많은 양의 FcRn 길항제를 제공하기 위해 스케일 업을 할 수 있다. 조직 배양 조건 하에서 포유 동물 세포 배양을 위한 기술은 당 업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 균일한 현탁 배양을 포함하는 공수 반응기 또는 연속 교반 반응기에서, 고정 또는 세포 배양물, 예를 포획하거나 아가로오스 마이크로 비드 또는 세라믹 카트리지에 중공 섬유, 마이크로 캡슐을 포함한다. 필요한 경우 및 / 또는 목적하는 폴리펩티드의 용액 DEAE 셀룰로스 및 / 또는 (면역) 친화도 크로마토 그래피를 통해 예를 들어, 겔 여과, 이온 교환 크로마토 그래피, 크로마토 그래피를 위해, 통상적인 크로마토 그래피 방법으로 정제 할 수 있다.

[0104] FcRn 길항제를 코딩하는 유전자는 또한 세균 또는 효모 또는 식물 세포와 같은 비 - 포유류 세포에서 발현될 수 있다. 이점에 있어서 상기 세균과 같은 다양한 단세포 미생물은 비 포유류도 변형될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다; 즉 배지 또는 발효에서 배양될 수 있는 변형되지 쉬운 박테리아, 대장균이나 살모넬라 균주바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis) 등의 간균과; 폐렴 구균; 연쇄상 구균 및 인플루엔자균으로서 장내의 부재를 포함한다. 또한 상기 박테리아에서 발현되면, FcRn 길항제 봉입체의 일부가 될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. FcRn 길항제의 정제, 분리 후 기능 분자로 조립해야한다. 추가적으로, 원핵 생물, 진핵 미생물도 사용될 수 있다. 다른 계통의 수가 통상적으로 사용될 수 있지만 사카로마이스 세레비시에, 또는 일반적인 빵 효모가 가장 일반적으로 진핵 미생물 중에서 사용된다.

[0105] 셀 기반 시스템의 발현뿐만 아니라, FcRn 길항제는 무 세포 또는 화학적 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 특정 실시 양태에서, FcRn에 길항제들 체외 화학 합성에 의해 생성된다.

[0106] **IV. 예증**

[0107] 본 발명은 하기에 예시로 더 설명될 수 있으나, 더욱 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 서열 목록, 도면 및 본 출원 전반에 걸쳐 인용 모든 참고 문헌, 특허 및 간행 특허 출원의 내용은 본 발명에 참조 문헌으로 인용된다.

[0108] **실시예 1: 사이노몰거스 원숭이에서 혈청 IgG 수준에서의 Fc - Abdeg 의 효과**

[0109] 각각 EU 포지션 252, 254, 256, 433, 434, 및 436에서 아미노산 Y, T, E, K, F 및 Y를 포함하는(FC-Abdeg; SEQ ID NO : 2) 인간 항 - 리소자임의 IgG (HEL가-Abdeg)와 인간 IgG Fc 영역 (FC-Abdeg)의 트래이서 항체의 혈청 IgG 수준에서의 효과는 사이노몰거스 원숭이에서 측정하였다. 구체적으로, 사이노몰거스 원숭이는 항 - 쥐 CD70 hIgG1 트래이서 항체의 1mg / kg를 정맥으로 루스 주사로 투여하였다(FR70-hIgG1; Oshima et al., Int Immunol 10(4): 517-26 (1998)). 동물(그룹 당 2 원숭이)에 7 mg / kg Fc-Abdeg, 20 mg / kg HEL-Abdeg, 또는 PBS를 오분 후에 주입 하였다. 1시간 내에서 주입을 수행하고, 동물은 10 ml / kg의 부피로 투여하였다. 혈액 샘플 (150 μ lX3)은 투여 5분 전에 채취하고("사전 복용량")을 투여하고, 주입 완료 후 5 분, 2 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간 및 120시간에서 채취하였다. 트래이서 수준은 투여의 끝(도 1)에서 추적 수준에 mCD70 결합 ELISA 및 데이터 플롯 상대를 수행하여 측정하였다. 사이노몰거스에서 총 IgG의 레벨(도 2)을 측정 하였다. 이러한 실험의 결과의 Fc- Abdeg이 트래이서 항체보다 더 효율적으로 HEL-Abdeg 물량을 감소시킴을 보여준다.

[0110] IgG 경로의 주요 역할에 더하여, FcRn은 또한 알부민 항상성(Chaudhury et al., J Exp Med. 197(3):315-22 (2003) FcRn가 IgG-FC 및 알부민과 상호 작용 별개의 사이트와 동시에 일어날 수 있는 결합(Andersen et al., Nat Commun. 3:610 (2012))을 포함한다. 개념적으로, 알부민 FcRn에 상호 작용을 방해하지 않아야 분자 Abdeg-변화 분자를 사용하여 사용 IgG의 리사이클링의 차단할 수 있다는 가설이 확인되었다. 저자는 알부민 수준에 Abdeg를 갖추고 hIgG1 분자의 영향을 보이지 않았다. 마우스 생체 내 연구 (Patel et al., J Immunol 187(2): 1015-22 (2011)). 상기 실험에서, 알부민 수준 또한 주입 완료 후 일 -3, 3 일 오후 17시를 측정 하였다. 마우스 연구와 유사하게, 알부민 수치에 큰 변화가 Fc-Abdeg 또는 HEL-Abdeg 처리 (도 3 참조) 이후 관찰되지 않았다.

[0111] 후속 실험에서의 Fc- Abdeg의 항체-파괴 효능을 IVIG 비교 하였다. 특히, 사이노몰거스 원숭이 (그룹 당 2 원숭이) 70 mg / kg Fc-Abdeg 또는 2g / kg IVIG와 함께 투여 2 일 전에 1 mg / kg로 트래이서항체 (FR70-hIgG1)을 투여 하였다. Fc-Abdeg 및 IVIG의 주입 4 시간 동안 수행하고, 동물을 20 ml / kg의 부피로 투여 하였다. 혈액 (3X150 μ L) 샘플은 투여 ("사전 복용량")에 5 분 전에 채취하고, 주입 완료 후 5 분, 2 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 120시간 및 168시간 채취했다. 트래이서 레벨 mCD70 - 결합 ELISA에 의해 결정 레벨 (도 4) 투여 전에 대하여 플롯 하였다. 임상 용량에서 IVIG 치료 (2g / kg)에 비해 70 mg / kg Fc-Abdeg는 현저하게 향상된 트래이서 제거의 속도를 나타내고, 또한, 보다 효율적으로 제거 할 수 있었다(>95% tracer clearance in 4 days for Abdeg versus ~75% in 7 days for IVIG).

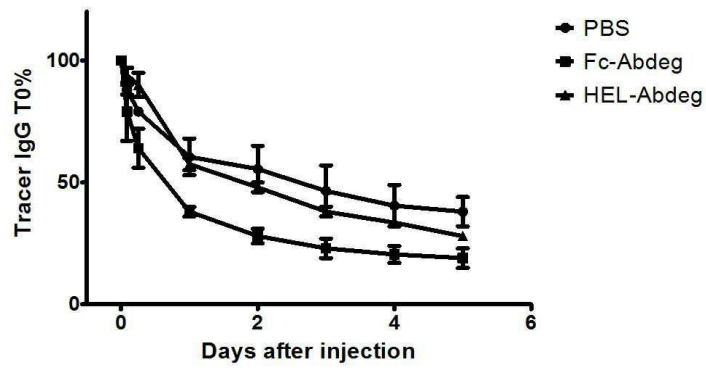
[0112] **실시예 2: 인간 CD16a 및 쥐 CD16-2을 위한 Fc - Abdeg 친화도에서의 어푸코실화의 효과**

[0113] hCD16a 용 Fc-Abdeg의 결합 친화도를 결정하고 어푸코실화 형태 (FC-Abdeg-POT)에 비교하였다. 같은 실험에서 Fc-Abdeg는 변이체 항상 보여주는 모든 Fc γ Rs에 대한 친화도가 (Fc-Abdeg-S239D / I332E)를 포함하였다. 즉, 막시 소프 플레이트는 100 ng / 웰의 비오틴 뉴트라 비딘 결합 단백질 (ThermoScientific, 31000)으로 코팅시키고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양 하였다. 다음 날, 플레이트를 실온에서 2 시간 동안 PBS + 1 % 카제인으로 차단 하였다. 이어서, 비오틴 hCD16a의 (Sino Biological Inc., 10389-H27H1-B)를 100 μ l / 웰의 250ng / ml 용액 (PBS + 0.1 % 카제인에서 희석)을 플레이트에 첨가하고 실온 이전에 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. 추가 시간동안 Fc-Abdeg이나 Fc-Abdeg-POT 분자 (1 μ M- 0.005 mM)의 농도 구배를 적용하였다. hCD16a에 바인딩을 첨가하여, HRP 접합 염소 다 클론 항 - 인간 Fc 항체 (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008) (배양 1시간 RT에서 희석 PBS에 1 / 50,000 + 0.1 % 카제인)를 사용하여 검출 하였다. 100 μ l 실내 온도 평형 TMB (TMB #S SDT-시약). 플레이트를 종래의 100 μ l 0.5N H2SO4와 OD450nm 측정 첨가 10 분 동안 인큐베이션 하였다. EC50 값은 그래프 패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 측정하였다. 도 5에 있어서,이 실험의 결과는 hCD16a (EC50 대 Fc-Abdeg-POT에 대한 EC50 = 13nm)에 대한 친화도에서> 30 배 증가는 FC-Abdeg 분자 결과의 탈푸코실화를 표시 푸코 실화 Fc-Abdeg에 대한 0.4 μ M). 예상대로, hCD16a 용은 FC-Abdeg-S239D / I332E 변이체의 결합 친화도가 야생형 Fc-Abdeg에 비해 증가 하였다 (EC50 = 6nM).

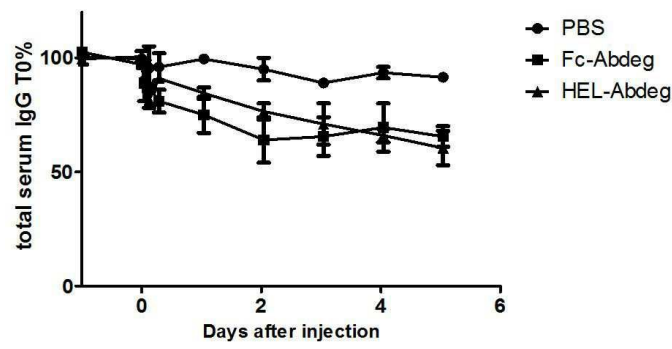
- [0114] 전술한 바와 같이, 무린 CD16-2 대한 결합 친화도 동일한 실험 과정을 사용하여 (시노 생물 사를 50036-M27H-B)를 구하였다. 도 6에 제시된 실험의 결과는 다시 증가 친화도를 보여 어푸코실화 변이체 야생형의 Fc-Abdeg (EC50 > 100 nm 대 EC50 = 11nM)에 비해. Fc-Abdeg 인간 CD16a에 결합 관찰에 비해 낮은 야생 형 이상은 FC-Abdeg-POT의 mCD16-2에 대한 친화도 변이체의 배 증가. 이 효과는 인간과 쥐 CD16 (EC50 = 2 nm) 모두 야생 형 Fc-Abdeg 이상 친화도 비슷한 배 증가가 FC-Abdeg-S239D / I332E 변이체 (EC50 = 2 nm)에 대한 관찰되지 않았다.
- [0115] 자가 항체 복합체 자기 항원과 함께 FcRs 활성화에 결합되어 있기 때문에 자기 조직에 대한 면역 매개 염증의 일부에서 발생하는자가 면역 질환을 유발. NK 세포의자가 면역 항체의 상호 작용 및 FcRIII 수용체를 길항하기의 Fc- Abdeg의 능력은 두 ADCC 기반 분석에서 평가 하였다.
- [0116] 처음 ADCC 기자 생물 검정 (프로 메가, G7016)가 Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT과 Fc-Abdeg-S239D / I332E의 경쟁력 hCD16a 결합 효능을 분석하는 데 사용되었다. 즉, 만 CD20 발현은 Raji 세포 (표적 세포)는 100 ng / ml의 항 CD20의 존재 hCD16a (이펙터 세포)를 발현하는 항체와 경쟁의 농도를 증가 60,000 Jurkat 세포를 배양 하였다. 세포는 전에 ADCC 활동의 측정은 생물 발광 신호를 측정하는 37 ° C에서 6 시간 동안 배양 하였다. 루시퍼 라제 신호 경쟁 (도 7 참조)의 부재하에 용액은 100 ng / 항 -CD20에 의해 얻어진 신호에 대하여 플롯 하였다. 이 실험 Fc-Abdeg-POT과 Fc-Abdeg-S239D 모두 / I332E 효율적으로 Jurkat 세포에서 발현 hCD16a 결합 경쟁으로 이어질하지 않는다. 야생형 Fc-Abdeg와 배양하는 동안, 항 CD20 유도 ADCC 신호를 차단하는 것이 나타났다.
- [0117] 다음 ADCC 분석에서, Fc-Abdeg과 Fc-Abdeg-POT에 의해 방지 hCD70 항체 (27B3-hIgG1)의 용균 활성의 억제는 결합 경쟁 hCD16의 척도로 시험 하였다. 특히, 약 50,000 hCD70 발현하는 U266 세포를 항 hCD70 항체와의 Fc-Abdeg의 농도 구배의 Fc- Abdeg-POT 50 ng를 / ml의 존재하에 건강한 기증자로부터 약 300,000 갓 정제 PBMC로 스파이크 하였다 와 IVIG. U266 세포 이들 동안 배양 한 다음 세포 용해는 U266 세포 (CD28)에 특이적인 마커를 사용하여 FACS로 분석 하였다. 도 8에 제시된 실험의 결과, 항 CD70 항체가 효율적 U266 세포 lyses 보여이 고 같은 wild-에서의 Fc- Abdeg-POT 첨가하여 용량 의존적 방식으로 감쇠 아니지만 수 있음 Fc-Abdeg도 IVIG를 입력한다. 이러한 데이터는 Fc-Abdeg POT는 야생형 Fc-Abdeg와 IVIG에 비해 경쟁력 CD16a 결합 특성을 향상 것을 보여준다.
- [0118] **실시예 3: 쥐의 급성 ITP 모델**
- [0119] Fc-Abdeg, Fc-Abdeg-POT, Fc-Abdeg-S239D / I332E 분자의 치료 효능은 급성 면역 혈소판 감소증의 마우스 모델에서 실험하였다. 구체적으로, C57BL / 6 마우스는 IVIG (20 mg / 동물) Fc-Abdeg (1 밀리그램 / 동물) Fc-Abdeg-POT (1 밀리그램 / 동물) Fc-Abdeg-S239D / I332E (1 mg / 동물)로 처리 하였다. 또는 복강 내 주입 (5 동물 / 그룹)를 통해 식염수. 처리 전, 혈액 시료는 혈소판의 기준 측정을 위해 회수 하였다. 1 시간 후, 마우스는 항 - 마우스의 혈소판 항체 MWReg30의 5 µg / 동물 처리 하였다 Nieswandt *et al.*, *Blood* 94:684-93 (1999)). 혈소판 수는 24 시간 동안 모니터링 하였다. 혈소판 수는 항 CD61 염색을 통해 유동 세포 계측법 사용하여 측정 각각의 마우스와 혈소판 수의 초기 카운트에 정규화상대하였다. 도 9에 제시된 실험의 결과는,의 Fc-Abdeg와 그 전처리 IVIG 높은 7 배 물 용량에 비하여 비슷한 효능으로 MWReg30 - 유도 혈소판 감소증을 감소시키고, 더을 FC Fc γ Rs의 봉쇄를 보여 180 분에서 1440 분의 시점에서 개선되고, 혈소판 수에 의해 본 -Abdeg POT과 Fc-Abdeg-S239D / I332E,이 모델의 시너지 유익한 영향을 미쳤다.
- [0120] **실시예 4: Fc-Abdeg 제조**
- [0121] 일시적 형질 감염에 의해 CHO 세포 (Evitria, 스위스)를 제조 하였다 : FC-Abdeg (2 SEQ ID NO를 갖는 Fc 영역을 포함하는). 형질 감염 후,의 Fc- Abdeg 높은 역가 (200 및 400 mg / ml 사이) 상등액에서 발견되었다. Fc-Abdeg가 안정적 CHO GS-XCEED 세포주 (론자, 그레이트 영국)에 통합 발현 작 체물로부터 발현 경우 유사한 유리한 생산 프로파일 보였다. 평균적으로, 안정적인 형질은 3g / L를 얻었다 여러 클론 탱크 생물 반응기를 교반 10 L에 6g / L Fc-Abdeg까지 생산하는 확인되었다.
- [0122] FC-Abdeg의 제조는 또한 상술한 Fc-Abdeg 생산 실험의 단백질 A 정제는 다음의 단위 및 분해물의 분석에 의해 조사하였다. 구체적 Fc-Abdeg 137 µg의 AktaPurifier는 크로마토 그래피 시스템에 결합 수퍼 텍스 200 300분의 10 GL의 겔 여과 컬럼 (GE 헬스 케어) 상에 로딩 하였다. Fc- Abdeg 분해물은 검출되지 않았다. 도 10에 제시된 실험의 결과는 Fc- Abdeg 집합체가 매우 작은 비율 (~ 0.5 %)로 관찰된 것으로 나타났다. 또한, 단백질 A-정제 Fc-Abdeg에 적용하는 다양한 스트레스 조건 (동결 - 해동, 회전 또는 온도 응력) 물리 화학적 및 기능적 특성에 명백한 변화로 이어지지 않았다. 이러한 데이터는 Fc-Abdeg의 우수한 제조를 나타낸다.

도면

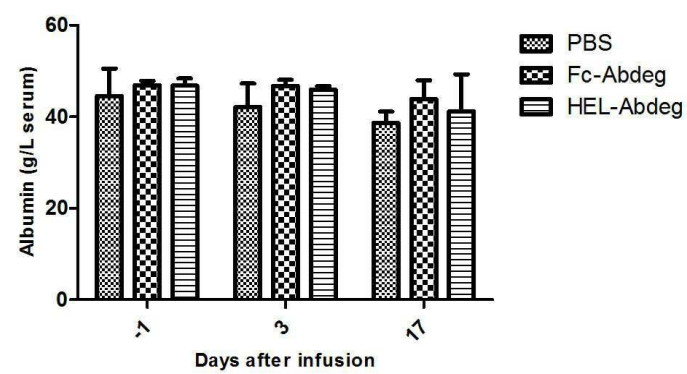
도면1



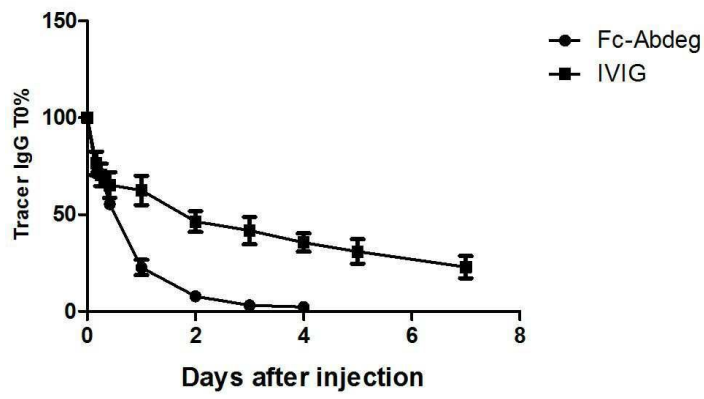
도면2



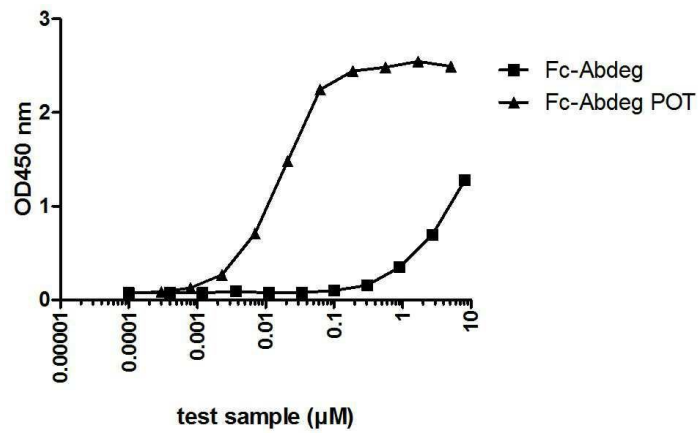
도면3



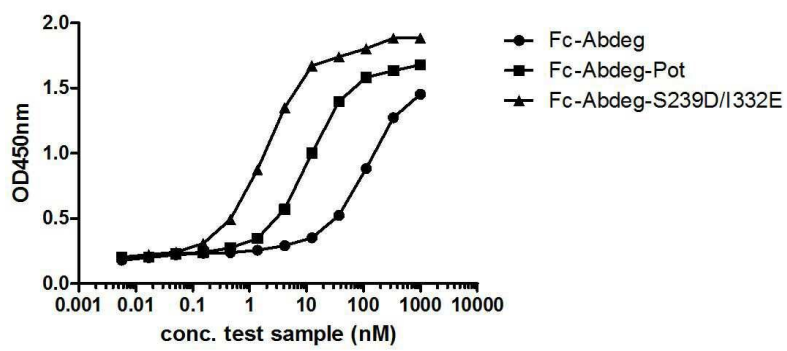
도면4



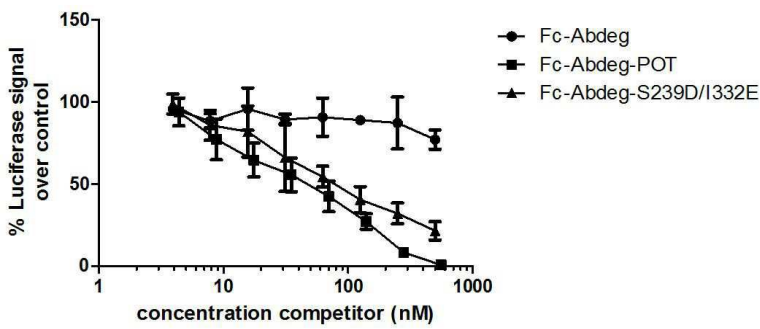
도면5



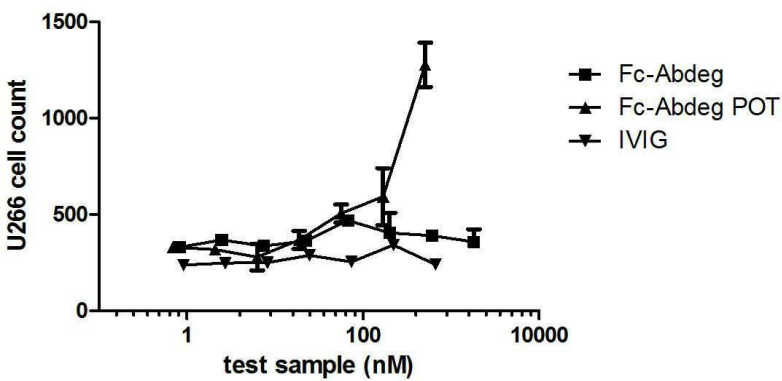
도면6



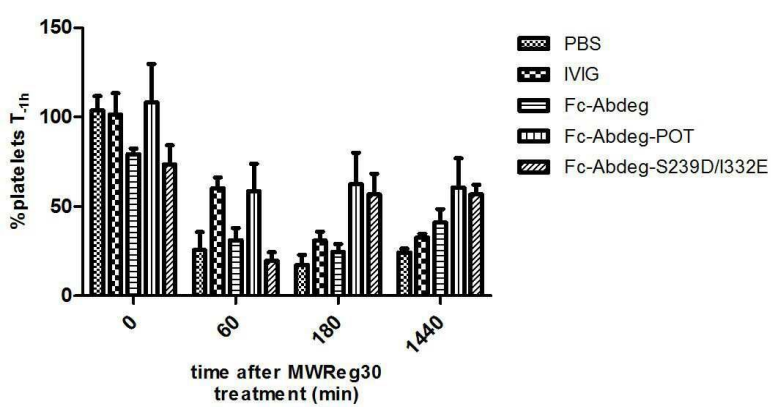
도면7



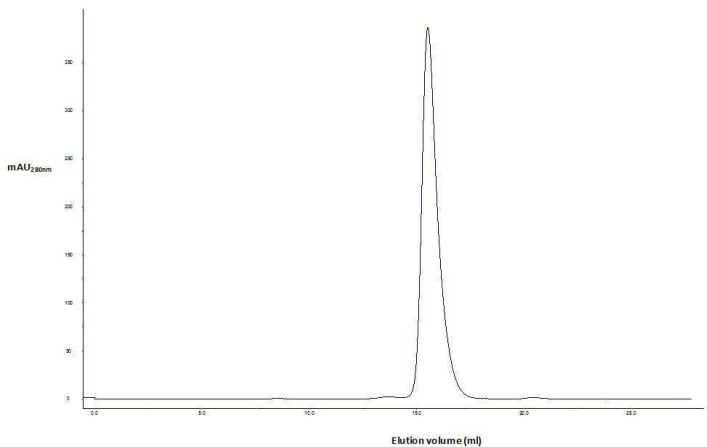
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> ARGEN-X N.V.
 THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> FCRN ANTAGONISTS AND METHODS OF USE

<130> 16fpi-06-011-us

<150> US 61/920,547

<151> 2013-12-24

<160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 1

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro

20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

115 120 125

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu Lys

195 200 205

Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210 215 220

 $\langle 210 \rangle$ 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>	Description of Artificial Sequence: Synthetic
------------	---

 $\langle 400 \rangle$ 2

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1
5
10
15

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

20 25 30

Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50

55

60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65

70

75

80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

105

110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115

120

125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145

150

155

160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180

185

190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu Lys Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210

215

220

Pro Gly Lys

225

<210> 3

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

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

20 25 30

Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu Lys Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly

225