



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108467431 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201710530059.5

刘立明 珍妮弗·杜蒙

(22)申请日 2009.04.24

阿龙·萨托

(30)优先权数据

61/048,152 2008.04.25 US

61/048,500 2008.04.28 US

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 章蕾

(62)分案原申请数据

200980124409.1 2009.04.24

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(71)申请人 戴埃克斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 比奥贝拉蒂治疗公司

(72)发明人 克里斯托弗·滕霍尔

阿鲁穆加姆·穆鲁加南达姆

罗伯特·查尔斯·拉德纳

克莱夫·伍德 艾伦·J·比通蒂

詹姆斯·斯泰托 凯文·麦克唐奈

权利要求书2页 说明书78页

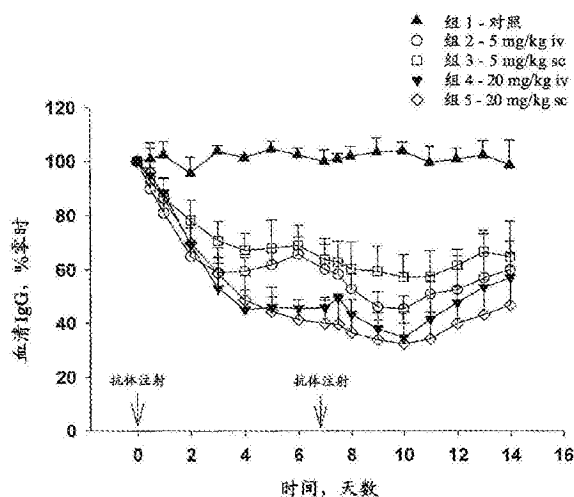
序列表63页 附图31页

(54)发明名称

针对FCRN的抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及针对FcRn的抗体及其用途,并提供了一种分离的抗体,包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,其中所述HC和LC免疫球蛋白可变域序列形成与人FcRn结合的抗原结合位点。FcRn结合蛋白可用于治疗多种疾病包括自身免疫性疾病。



1. 一种分离的抗体,其结合到含有 α 亚基和 β 亚基并被正确组装的人FcRn,其中所述抗体针对人FcRn或其片段的重链产生,其中所述抗体功用为结合人FcRn的IgG的非竞争性抑制剂,并且其中所述抗体不结合 β 2-微球蛋白。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中当将所述抗体施用于受试者时,所述抗体不影响受试者血清白蛋白的血清水平。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体,其中所述抗体在大约pH 5-7.4以小于100nM的解离常数(K_D)结合人FcRn。

4. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体,其中所述抗体相对于大鼠FcRn优先结合人FcRn。

5. 根据权利要求1所述的分离的抗体,包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,以及其中

所述HC包括:

包含与EYAMG (SEQ ID NO:144) 或VYAMG (SEQ ID NO:156) 至少85%相同的氨基酸序列的HC CDR1,

包含与SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:145) 或SIGSSGGPTKYADSVKG (SEQ ID NO:157) 至少85%相同的氨基酸序列的HCCDR2,和

包含与LSTGELY (SEQ ID NO:146),LSIRELV (SEQ ID NO:158),LSIVDSY (SEQ ID NO:164),LSLGDSY (SEQ ID NO:170) 或LAIGDSY (SEQ ID NO:176) 至少85%相同的氨基酸序列的HC CDR3;以及

所述LC包括:

包含与TGTGSDVGSYNLVS (SEQ ID NO:141) 至少85%相同的氨基酸序列的LC CDR1,

包含与GDSQRPS (SEQ ID NO:142) 至少85%相同的氨基酸序列的LCCDR2,以及

包含与CSYAGSGIYV (SEQ ID NO:143) 至少85%相同的氨基酸序列的LC CDR3。

6. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述HC包含:

包含氨基酸序列EYAMG (SEQ ID NO:144) 的HC CDR1,

包含氨基酸序列SIGSSGGQTKYADSVKG (SEQ ID NO:145) 的HC CDR2,和

包含氨基酸序列LAIGDSY (SEQ ID NO:176) 的HC CDR3。

7. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述LC包含与SEQ ID NO:182至少85%相同的氨基酸序列。

8. 根据权利要求7所述的分离的抗体,其中所述HC包含与SEQ ID NO:184至少95%相同的氨基酸序列和/或所述LC包含与SEQ ID NO:182至少95%相同的氨基酸序列。

9. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述HC由相对于SEQ ID NO:184的多达五个取代组成和/或所述LC由相对于SEQ ID NO:182的多达五个氨基酸取代组成。

10. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述HC由相对于SEQ ID NO:184的多达三个氨基酸取代组成和/或所述LC由相对于SEQ ID NO:182的多达三个氨基酸取代组成。

11. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述HC包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列和/或所述LC由相对于SEQ ID NO:182的1-3个氨基酸取代组成。

12. 根据权利要求1或权利要求2所述的分离的抗体,其结合的FcRn片段选自SEQ ID NO:24-27组成的群组。

13. 根据权利要求1或权利要求2所述的分离的抗体,其中所述抗体在pH约为6时以小于约800nM、小于约600nM、小于约300nM、小于约100nM、小于约50nM、小于约25nM、小于约10nM或小于约5nM的 IC_{50} 抑制IgG-Fc的结合。

14. 根据权利要求1、2和5-11中任一项所述的分离的抗体,其被配制为以足以抑制个体中IgG抗体水平的量给予个体。

15. 根据权利要求14所述的分离的抗体,其中所述IgG抗体是治疗性IgG抗体。

16. 根据权利要求15所述的分离的抗体,其中所述治疗性IgG抗体是那他珠单抗。

17. 根据权利要求13所述的分离的抗体,其中所述IgG抗体结合非自身人类白细胞抗原。

18. 一种权利要求1、2和5-11中任一项所述的抗体的用途,用于制备治疗自身免疫疾病的药物。

针对FCRN的抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2009年4月24日,申请号为201410357602.2,发明名称为“针对FCRN的抗体及其用途”的第一分案申请的又一分案申请;

[0002] 第一分案申请为申请日为2009年4月24日,申请号为200980124409.1,发明名称为“针对FCRN的抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 要求2008年4月25日提交的第61/048,152号美国临时申请,和2008年4月28日提交的第61/048,500号美国临时申请的权益,其全部内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及针对FcRn的抗体及其用途。

背景技术

[0006] 血清中最丰富的抗体同种型为IgG并且其在介导抗病原体的保护作用和介导促进免疫系统组分募集到组织、粘膜和皮肤表面的过敏和炎症反应中起到关键作用(Junghans, Immunologic Research 16(1):29(1997))。此外,其也为多种自身免疫性疾病的关键组分。在正常情况下,血清中IgG的半衰期在小鼠中在5-7天的范围内并且在人中在22-23天的范围内,其相对其他血浆蛋白的血清半衰期为较长时间的周期。这个较长的周期的发生一部分是由于新生儿的FcRn受体(FcRn)将胞饮的IgG从降解溶酶体中解救出来并将其回收到细胞外区室(Junghans和Anderson,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:5512 (1996),Roopenian等J.Immunology 170:3528(2003))。

[0007] FcRn与IgG的Fc部分结合。IgG Fc区和FcRn之间的相互作用为pH依赖型。当通过液相内吞作用进入细胞的时候,IgG被隔绝到内体(endosome)内并以高亲和性在酸性pH(6~6.5)下与FcRn结合;当该IgG-FcRn复合物循环到质膜时,IgG在微碱性 pH(~7.4)下迅速从血流中的FcRn上解离下来。通过该受体介导的回收机制,FcRn有效地将IgG从在溶酶体中的降解中解救出来,从而延长循环IgG的半衰期。

[0008] FcRn为通常位于内皮细胞和表皮细胞的内体的非共价异源二聚体。其作为一种具有三个重链 α ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$)以及一个单独的可溶轻链 $\beta 2$ -微球蛋白($\beta 2M$)域的单通跨膜的膜结合受体。结构上,其属于具有 $\beta 2M$ 作为共同轻链的主要组织相容性复合物1类分子家族。FcRn α 链为由包含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 重链域的胞外域,跨膜区,和相对短的胞质尾区组成的46kD蛋白(Burmeister等Nature 372:366(1994))。

[0009] FcRn最先在新生大鼠肠中发现,其中其作用于介导从母鼠的乳汁中吸收IgG抗体并协助其转运到循环系统中(Leach等J Immunol 157:3317(1996))。FcRn也已从人胎盘中被分离出来,其中其也介导将母体IgG吸收和转运到胎儿的循环中。在成年人中,FcRn在许多组织中表达,包括肺、肠、肾,以及鼻腔、阴道和胆道系统(biliary tress) 表面的上皮组织中(第6,030,613和6,086,875号美国专利;Israel等,Immunology 92:69 (1997);

Kobayashi等Am J Physiol (2002);Renal Physiol 282:F358 (2002))。

[0010] 为了研究FcRn对IgG动态平衡的作用,工程化小鼠使得至少一部分编码B2M和FcRn重链的基因被“敲除”以致这些蛋白无法表达(WO 02/43658;Junghans和 Anderson, Proc Natl Acad Sci US 93:5512 (1996))。在这些小鼠中,IgG的血清半衰期和浓度被显著降低,说明IgG的动态平衡的FcRn依赖型机制。

[0011] 也有人建议可在这些FcRn敲除小鼠中生成抗人FcRn抗体并且这些抗体可阻止IgG与FcRn的结合。然而,还未生成或检测所述抗体(WO 02/43658)。

[0012] 对IgG与FcRn的结合抑制通过阻止IgG回收而负向改变IgG的血清半衰期。该原理在自身免疫性皮肤水泡病(cutaneous bullous disease)小鼠模型中被表明具有治疗有效性(Li等J Clin Invest 115:3440-3450 (2005))。据此,阻止或拮抗IgG与FcRn的结合的剂可被用于治疗或预防以存在不恰当调节的IgG抗体为特征的自身免疫和炎症疾病或病症的方法。

发明内容

[0013] 本发明尤其涉及结合FcRn的抗体,以及识别和使用所述抗体的方法。

[0014] 在一方面本发明提供了一种分离的抗体,该分离的抗体包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,

[0015] 其中该重链免疫球蛋白可变域序列和轻链免疫球蛋白可变域序列形成与人FcRn结合的抗原结合位点;并且其中该抗体包括一个或多个以下特征:

[0016] (a) 人CDR或人框架区;

[0017] (b) 该LC免疫球蛋白可变域序列包含与M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500的LC可变域CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

[0018] (c) 该HC免疫球蛋白可变域序列包含与M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500的HC可变域CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

[0019] (d) 该LC免疫球蛋白可变域序列与M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500的LC可变域至少85%相同;

[0020] (e) 该HC免疫球蛋白可变域序列与M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500的HC可变域至少85%相同;并且

[0021] (f) 该抗体结合与被M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11 或DX2500结合的表位重叠的表位。

[0022] 在一方面本发明提供了一种分离的抗体,该分离的抗体与选自M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11和DX2500组成的组的抗体至少85%相同。

[0023] 在一方面本发明提供了一种分离的抗体,该分离的抗体选自M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11和DX2504组成的组。

[0024] 在一方面本发明提供了一种包含M0161-B04的CDR的分离的抗体。在一方面本发明提供了一种与M0161-B04至少85%相同的分离的抗体。M0161-B04的CDR如表17A 所示。

[0025] 在一方面本发明提供了一种包含M0171-A03的CDR的分离的抗体。在一方面本发明提供了一种与M0171-A03至少85%相同的分离的抗体。M0171-A03的CDR如表17A 所示。

[0026] 在一方面本发明提供了一种包含M0171-A01的CDR的分离的抗体。在一方面本发明

提供了一种与M0171-A01至少85%相同的分离的抗体。M0171-A01的CDR如表17A 所示。

[0027] 在一方面本发明提供了一种包含M0159-A07的CDR的分离的抗体。在一方面本发明提供了一种与M0159-A07至少85%相同的分离的抗体。M0159-A07的CDR如表17A 所示。

[0028] 在一方面本发明提供了一种包含M0090-F11的CDR的分离的抗体。在一方面本发明提供了一种与M0090-F11至少85%相同的分离的抗体。M0090-F11的CDR如表17A 所示。

[0029] 在一方面本发明提供了一种包含DX-2500的CDR的分离的抗体。在一方面本发明提供了一种与DX-2500至少85%相同的分离的抗体。DX-2500的CDR如表17A所示。

[0030] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含M0161-B04的可变域序列,并且LC可变域序列包含M0161-B04的可变域序列。

[0031] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含M0171-A03的可变域序列,并且LC可变域序列包含M0171-A03的可变域序列。

[0032] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含M0171-A01的可变域序列,并且LC可变域序列包含M0171-A01的可变域序列。

[0033] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含M0159-A07的可变域序列,并且LC可变域序列包含M0159-A07的可变域序列。

[0034] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含M0090-F11的可变域序列,并且LC可变域序列包含M0090-F11的可变域序列。

[0035] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,HC可变域序列包含DX2500的可变域序列,并且LC可变域序列包含DX2500的可变域序列。

[0036] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,该抗体与被M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500结合的FcRn表位结合。

[0037] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中,该抗体与M0171-A03、M0171A01、M0159-A07、M0161-B04、M0090-F11或DX2500竞争与FcRn的结合。

[0038] 本文中所用M0171-A03也称为M171-A03和M00171-A03。本文中所用M0171-A01 也称为M171-A01和M00171-A01。本文中所用M0159-A07也称为M159-A07和 M00159-A07。本文中所用M0161-B04也称为M161-B04、M00161-B04和DX-2504。本文中所用M0090-F11也称为M090-F11和M90-F11。

[0039] 在一方面本发明提供了一种与人FcRn结合的分离的抗体或其片段,其中该抗体针对人FcRn重链或其片段生成,其中该抗体功用为结合于人FcRn的IgG的非竞争性抑制剂,并且其中该抗体不与 β 2-微球蛋白结合。

[0040] 在一方面本发明提供了一种与人FcRn结合的分离的抗体或其片段,其中该抗体针对人FcRn重链或其片段生成,其中当不与FcRn复合时,该抗体不与 β 2-微球蛋白结合,并且其中该抗体不产生自FcRn-/-敲除小鼠。

[0041] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体选自由3B3.11、31.1、4B4.12和17D3 组成的组。

[0042] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与人FcRn在大约pH范围5-7.4以小于100nM的解离常数(K_D)结合。

[0043] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗原结合位点与人FcRn特异性结合。

[0044] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与稳定表达FcRn的细胞系结合。

- [0045] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体调节(例如,抑制)FcRn与抗体/免疫球蛋白恒定区的结合。
- [0046] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的 α 亚基结合。
- [0047] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的 α 链的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、或者 $\alpha 3$ 域结合。
- [0048] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体不与FcRn的 β 亚基结合,即,该蛋白仅与 α 亚基结合。
- [0049] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的 β 亚基结合,其中该 β 亚基与 α 亚基相关联。
- [0050] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中 α 和 β 亚基正确地组装为FcRn。
- [0051] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与包括 α 亚基和 β 亚基并正确组装的 FcRn结合。
- [0052] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体在大约pH 6下以大约800nM、小于600nM、小于300nM、小于100nM、小于50nM、小于25nM、小于10nM、或者小于5nM的 IC_{50} 抑制IgG-Fc的结合。
- [0053] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为可溶性Fab。
- [0054] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体通过其抗原结合域以及其Fc区与FcRn结合。
- [0055] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的结合在2-10的范围内大致上独立于pH。
- [0056] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的结合在6-8的范围内大致上独立于pH。
- [0057] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体在pH 7.5具有小于0.01、0.001、0.0001、0.00001s⁻¹的 $k_{\text{解}}$ 。
- [0058] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体与FcRn的结合大致上依赖于pH。
- [0059] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中相对于大鼠FcRn,该抗体以pH-依赖性 or pH-独立性的方式优先与人FcRn结合。
- [0060] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体在内体中或在内体条件下与FcRn结合。
- [0061] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体在pH 7.5不释放FcRn。
- [0062] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中当施用于受治疗者时,该抗体引起与自身免疫性病症相关联的症状的改善。
- [0063] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中HC和LC可变域序列为同一多肽链的组分。
- [0064] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中HC和LC可变域序列为不同多肽链的组分。
- [0065] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为全长抗体。
- [0066] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为人抗体或人源化抗体或者在人中具有非免疫原性。
- [0067] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体包含人抗体框架区。
- [0068] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体包含Fc域。

- [0069] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为鼠抗体。
- [0070] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为单克隆抗体。
- [0071] 在本文中提供的抗体的一些实施方案中该抗体为嵌合的或人源化的。
- [0072] 在本文中提供的抗体的一些实施方案该抗体选自由Fab、F(ab)'₂、Fv和ScFv组成的组。
- [0073] 在本文中提供的抗体的一些实施方案该抗体与FcRn的结合在pH 6.0到8.0的范围内独立于pH。
- [0074] 在一方面本发明提供了一种包含本文提供的任何一种抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0075] 在一方面本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸包含编码多肽的序列,该多肽包括与M0171-A03、M0171-A01、M0159-A07或M0161-B04的可变域序列至少80%相同的序列。
- [0076] 在一方面本发明提供了一种分离的核酸,该分离的核酸包含编码多肽的序列,该多肽包括本文中提供的任何一种抗体的第一和/或第二免疫球蛋白可变域。
- [0077] 在一方面本发明提供了包含本文提供的核酸序列的载体或宿主细胞。
- [0078] 在一方面本发明提供了在样品中检测FcRn的方法,该方法包括:使用本文提供的任何一种抗体与样品相接触并且在抗体和FcRn之间存在相互作用的情况下,检测该相互作用。在一些实施方案中该抗体还包含可检测标记。
- [0079] 在一方面本发明提供了一种在受治疗者中检测FcRn的方法,该方法包括:向受治疗者施用还包含可检测标记的本文提供的任何一种抗体;并且在受治疗者中检测该标记。在一些实施方案中检测包括对受治疗者成像。
- [0080] 在一方面本发明提供了一种调节FcRn活性的方法,该方法包括:使用本文提供的任何一种抗体与FcRn相接触,由此调节FcRn的活性。在一些实施方案中该FcRn位于人受治疗者中。在一些实施方案中该抗体阻止FcRn与内源性Ig的结合。在一些实施方案中该抗体阻止FcRn与治疗性抗体结合。在一些实施方案中该FcRn位于上皮细胞的内体。在一些实施方案中该FcRn位于内皮细胞的内体。在一些实施方案中该FcRn位于细胞表面。
- [0081] 在一方面本发明提供了一种治疗自身免疫性病症和/或调节自身免疫性病症症状的方法,该方法包括:施用足以调节症状的量的本文所提供的任何一种抗体。在一些实施方案中该自身免疫性病症是选自以下组成的组的病症:类风湿关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力(MG)、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、格林-巴利综合征、自身免疫性心肌炎、膜性肾小球肾炎、糖尿病、I型或II型糖尿病、多发性硬化症、雷诺氏综合征、自身免疫性甲状腺炎、胃炎、乳糜泻、白癜风、肝炎、原发性胆汁性肝硬化、炎症性肠病、脊椎关节病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、免疫性嗜中性粒细胞减少症、青少年发病型糖尿病、和与细胞因子、结核中常见的T淋巴细胞介导的迟发型超敏反应相关的免疫反应、结节病和多肌炎、多动脉炎、皮肤血管炎、天疱疮、类天疱疮、肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、川崎氏病、系统性硬化症、抗磷脂综合征和干燥综合征(Sjogren's syndrome)。在一些实施方案该抗体缩短内源性IgG的半衰期。
- [0082] 在一方面本发明提供了一种调节循环IgG的半衰期/水平的方法,该方法包括:确认需要调节循环IgG的半衰期/水平的受治疗者;并且向受治疗者施用有效调节受治疗者体

内的循环IgG的半衰期/水平的量的本文所提供的任何一种抗体。在一些实施方案中该方法降低循环IgG的半衰期/水平。在一些实施方案中该受治疗者为人。在一些实施方案中施用该抗体并联合非本文提供的任何一种抗体的抗自身免疫性病症的剂或疗法以降低循环IgG的半衰期/水平。在一些实施方案中非本文所提供的任何一种抗体的该抗自身免疫性病症的剂或疗法包括静脉内Ig疗法；非类固醇抗炎药物 (NSAID)；皮质类固醇；环孢菌素、雷帕霉素、子囊霉素，或其免疫抑制类似物，例如，环孢菌素A、环孢菌素 G、FK-506、雷帕霉素、40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素；环磷酰胺；硫唑嘌呤；甲氨蝶呤；布喹那；FTY 720；来氟米特；咪唑立宾，霉酚酸，霉酚酸酯 (mycophenolate mofetil)，15-脱氧精胍菌素 (deoxyspergualine)；免疫抑制性单克隆抗体，例如，白细胞受体的单克隆抗体，例如，MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、或CD58 或其配体；其他免疫调节化合物，例如 CTLA4Ig；或其他粘附分子抑制剂，如mAb或低分子量抑制剂，包括选择蛋白拮抗剂和VLA-4拮抗剂。

[0083] 在一方面本发明提供了一种治疗或预防自身免疫性病症的方法，该方法包括：向患有该病症或有发展该病症的风险的受治疗者施用本文所提供的任何一种抗体。在一些实施方案中该自身免疫性病症以不需要的循环IgG为特征。在一些实施方案中该抗体缩短内源性IgG的半衰期。在一些实施方案中该自身免疫性病症为选自以下的病症：类风湿关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE)、重症肌无力 (MG)、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、格林-巴利综合征、自身免疫性心肌炎、膜性肾小球肾炎、糖尿病、I型或II型糖尿病、多发性硬化症、雷诺氏综合征、自身免疫性甲状腺炎、胃炎、乳糜泻、白癜风、肝炎、原发性胆汁性肝硬化、炎症性肠病、脊椎关节病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、免疫性嗜中性粒细胞减少症、青少年发病型糖尿病、和与细胞因子、结核病中常见的T淋巴细胞介导的迟发型超敏反应相关的免疫反应、结节病和多肌炎、多动脉炎、皮肤血管炎、天疱疮、类天疱疮、肺出血肾炎综合征、川崎氏病、系统性硬化症、抗磷脂综合征和干燥综合征。在一些实施方案中该天疱疮为寻常性天疱疮、落叶性天疱疮或副肿瘤性天疱疮。

[0084] 在一方面本发明提供了一种治疗或预防自身免疫性病症的方法，该方法包括：向患有该病症或有发展该病症的风险的受治疗者联合治疗或预防该病症的第二疗法施用本文所提供的任何一种抗体。在一些实施方案中该第二疗法包括静脉内Ig疗法；非类固醇抗炎药物 (NSAID)；皮质类固醇；环孢菌素、雷帕霉素、子囊霉素、或其免疫抑制类似物，例如，环孢菌素A、环孢菌素G、FK-506、雷帕霉素、40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素；环磷酰胺；硫唑嘌呤；甲氨蝶呤；布喹那；FTY 720；来氟米特；咪唑立宾，霉酚酸，霉酚酸酯，15-脱氧精胍菌素；免疫抑制性单克隆抗体，例如，白细胞受体的单克隆抗体，例如，MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、或 CD58或其配体；其他免疫调节化合物，例如：CTLA4Ig；或其他粘附分子抑制剂，如 mAb或低分子量抑制剂，包括选择蛋白拮抗剂和VLA-4拮抗剂。

[0085] 在一方面本发明提供了一种在个体内降低不需要的抗体的浓度的方法，该方法包括向个体施用治疗有效剂量的本文提供的任何一种抗体或抗体片段的步骤。在一些实施方案中该抗体或其片段在药学上可接受的载体中施用。在一些实施方案中该个体为人。在一些实施方案中该抗体或其片段与佐剂一起施用。在一些实施方案中该不需要的抗体为那他珠单抗。在一些实施方案中该不需要的抗体为非自身人类白细胞抗原。在一些实施方案中所施用的抗体或其片段与器官移植联合施用。

[0086] 在一方面本发明提供了一种在个体内减少IgG与FcRn结合的方法,该方法包括以下步骤:提供与人FcRn结合、针对抗人FcRn重链或其片段而生成、为IgG与人FcRn结合的非竞争性抑制剂并且不与 β 2-微球蛋白结合的抗体或其片段;并且以足够降低在个体内IgG与FcRn结合的量向个体施用该抗体或其片段。在一些实施方案中该个体患有自身免疫性或同种免疫疾病。在一些实施方案中该个体为器官移植接受者。在一些实施方案中已向该个体施用治疗性抗体。在一些实施方案中该自身免疫性病症为免疫性血小板减少症。在一些实施方案中该自身免疫性病症为免疫性天疱疮。在一些实施方案中该个体为人。在一些实施方案中以1mg/kg到2g/kg的剂量施用该抗体。在一些实施方案中以1mg/kg到200mg/kg的剂量施用该抗体。

[0087] 在一方面本发明提供了一种在个体内抑制IgG抗体水平的方法,该方法包括以下步骤:提供与人FcRn结合、针对抗人FcRn重链或其片段而生成、为IgG与人FcRn结合的非竞争性抑制剂并且不与 β 2-微球蛋白结合的抗体或其片段;并且以足够抑制在个体内IgG抗体水平的量向个体施用该抗体或其片段。在一些实施方案中该IgG抗体为治疗性IgG抗体。在一些实施方案中该治疗性IgG抗体为那他珠单抗。在一些实施方案中该IgG抗体为非自身人类白细胞抗原。在一些实施方案中该方法还包括血浆置换步骤。

[0088] 在一方面本发明涉及抑制IgG分子恒定区与FcRn结合的抗体。本发明因此涉及包含特异性结合于FcRn分子表位的至少一个可变区的抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体与人FcRn结合。在其他实施方案中,该抗体与啮齿类或猴FcRn结合。本发明的一些示例性抗体包括,例如,4B4.12、3B3.11、31.1、和17D3。

[0089] 在一方面本公开以包括重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列的抗体(例如,分离的抗体)为特征。第一和第二免疫球蛋白可变域序列形成与FcRn(例如,人FcRn)结合的抗原结合位点。在一个实施方案中,该抗体具有一个或多个以下特征:

[0090] (a) 其LC免疫球蛋白可变域序列与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的LC可变域,或其一个或多个CDR至少85%相同;

[0091] (b) 其HC免疫球蛋白可变域序列与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的HC可变域,或其一个或多个CDR至少85%相同;并且

[0092] (c) 该抗体结合与被3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11结合的表位相重叠的表位。

[0093] 在一个实施方案中,该抗体与FcRn(例如,人FcRn)结合,例如,在pH范围5-8,例如,具有小于100、50、10、5、1、或0.1nM的解离常数(K_D)。在一个实施方案中,该抗原结合位点与人FcRn特异性结合。本文中,“特异性结合”或“特异性结合于”指FcRn结合抗体优先与人FcRn结合的能力,具有比其对不同于FcRn的非特异性抗原(例如,肌动蛋白,酪蛋白)结合的亲和性强至少2倍、10倍、50倍、100倍或更强的亲和性(更小的 K_D)。在一个实施方案中,该抗体以小于0.01、0.001、0.0001、0.00001 s^{-1} 的 k_{off} 与人FcRn结合。

[0094] 在一个实施方案中,该抗体与FcRn的胞外域结合;例如,FcRn的一个 α 亚基,即,

FcRn α 链的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、或 $\alpha 3$ 域。在一个实施方案中,该抗体不与FcRn的 β ($\beta 2M$) 亚基结合,例如,该抗体只与 α 亚基结合。在一个实施方案中,该抗体确实与FcRn的 β 亚基结合,但是,只有在当 $\beta 2M$ 与 α 亚基相关联的时候。例如,除非 α 亚基和 β 亚基两者都存在并正确地组装为FcRn,否则该抗体不与 α 或 β 亚基结合。在一个实施方案中,该抗体与包括 α 亚基和 β 亚基并正确地组装的FcRn结合。

[0095] 在一个实施方案中,该抗体调节(例如,抑制)FcRn与抗体/免疫球蛋白恒定区的结合。例如,该抗体可具有优于(例如,数值上小于)5nM、500pM、200pM、150pM、100pM、或75pM的 K_i ,例如,介于50nM和1pM,或200pM和5pM之间的 K_i 。

[0096] 在一个实施方案中,该抗体与FcRn结合并且降低或防止FcRn与抗体/免疫球蛋白恒定区的结合。例如,该抗体可与FcRn(例如,人FcRn)以强于(即,数值上小于) $1 \times 10^{-8}M$ 的亲合性(K_D)结合。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式FcRn结合并在pH 6具有大约3.0–82nM范围的 K_D 的Fab。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式与FcRn结合并在pH7.5具有大约9.7到大约39.7nM范围的 K_D 的Fab。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式与FcRn结合并在pH6具有大约0.409–大约29.5nM、大约2.44–大约29.5nM、大约0.13–大约1.03nM、大约6.43–大约30.2nM、大约0.2–大约2.87nM、大约0.34–大约2.87nM、或大约0.2–大约30.2nM范围的 K_D 的IgG。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式与FcRn结合并在pH7.5具有大约0.675–24.2nM、2.1–24.2nM、0.158–10nM、或大约2.04–大约80nM范围的 K_D 的IgG。

[0097] 在一个实施方案中,该抗体抑制FcRn与IgG–Fc的结合,并在大约pH 6具有小于800nM、600nM、或300nM、200nM、100nM、1nM、50pM的 IC_{50} 。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式抑制FcRn与IgG–Fc结合并在pH6具有大约13–754nM或大约13–80nM范围的 IC_{50} 的Fab。在一个实施方案中,该抗体为以大致上独立于pH或大致上依赖于pH的方式抑制FcRn的结合并在pH6具有大约1.2–36nM、36–120nM、120–562nM、1.5–5.4nM、5.4–50nM、51–161nM范围的 IC_{50} 的IgG。

[0098] 在一个实施方案中,该抗体为,例如,单链抗体、Fab、sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv、或dAb片段。

[0099] 在一些实施方案中,该抗体为单特异性,例如,单克隆抗体或重组抗体。术语“单特异性抗体”指对特定靶标,例如,表位,表现出单独的结合特异性和亲和性的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,如本文所用,其指具有单分子组成的抗体的制品。

[0100] 在一个实施方案中,该抗体为重组或修饰的抗-FcRn抗体,例如,嵌合、人源化、去免疫化或体外生成抗体。如本文所用,术语“重组”或“修饰的”人抗体意为包括通过重组方法制备、表达、生成或分离的所有抗体,比如使用重组表达载体转染进入宿主细胞表达的抗体,从重组组合抗体库中分离的抗体,从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如,小鼠)中分离的抗体或者通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、生成或分离的抗体。所述重组抗体包括人源化、CDR嫁接、嵌合、去免疫化、体外生成抗体,并可任选地包括由人种系免疫球蛋白序列衍生的恒定区。在一个实施方案中,该抗体不在人体内引起抗球蛋白反应。

[0101] 还公开了与本文所公开的抗FcRn抗体的重叠表位结合、或竞争性抑制其与FcRn

的结合的抗体(包括全长抗体或其抗原结合片段),例如,与sFab 532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的重叠表位结合,或竞争性抑制其与FcRn结合的抗体。也有可能使用抗FcRn抗体的组合,例如,与FcRn不同区结合的两个或多个抗体,例如,与FcRn胞外域上的两个不同表位性结合的抗体。可选择地,可使用双特异性抗体。双特异性抗体为具有两个可变重域和两个可变轻域以使得该单分子具有两种特异性结合能力的分子;该可变域或特异性中的一个或多个可为本文所述抗体的并与FcRn结合。

[0102] 在一个实施方案中,抗FcRn抗体(例如,全长抗体或其抗原结合片段)包括至少一个轻链或重链可变域序列(例如,至少一个轻链免疫球蛋白和至少一个重链免疫球蛋白)。在一些实施方案中,每个免疫球蛋白包括具有至少一个,两个或三个互补决定区(CDR)的轻链或重链可变域序列,该互补决定区大致上与同FcRn相互作用的抗体的轻链或重链可变域序列的CDR相同该抗体例如,本文中所述的sFab,例如,532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11。

[0103] 在一个实施方案中,该抗体使用其抗原结合域并通过其Fc区与FcRn结合。在一个实施方案中,该抗体仅使用其抗原结合域与FcRn结合。例如,该抗体不包括Fc区或包括不与FcRn相互作用的修饰的Fc区。在一个实施方案中,该抗体通过其抗原结合域与FcRn结合比通过其Fc域更加紧密至少1000倍。

[0104] 在一个实施方案中,在2-10、4-9、5-8、6-8、或6-7.5的范围内,抗体与FcRn的结合大致上是pH独立的。术语“pH独立”指抗体在2-10、4-9、5-8、6-8,或6-7.5范围的pH下与FcRn结合/和或保持结合的能力。该亲和性可在不同pH值下变化。在一些实施方案中, K_D 在该范围内的任何值下不高于200nM、50nM、10nM、1nM或100pM。例如,该抗体在pH 6与FcRn结合并在pH 7.5保持结合。在一个实施方案中,抗体与FcRn的结合大致上依赖于pH。术语“pH独立”指在第一pH下抗体与FcRn结合/和或保持结合的能力以及在第二pH下与FcRn结合或保持结合的能力,其中第二pH在第一pH的给定数量的pH单位内(例如,6、5、4、3、2、1.5个单位)。例如,该抗体可在pH6与FcRn结合并可在pH7.5仍与FcRn结合或保持结合。术语“pH依赖”指抗体在第一pH下与FcRn结合/和或保持结合的能力以及在第二pH下缺乏与FcRn结合或保持结合的能力,其中第二pH在第一个pH的给定数量的pH单位内(例如,6、5、4、3、2、1.5个单位)。例如,该抗体可在pH6与FcRn结合并且在pH7.5不能与FcRn结合或保持结合。

[0105] 在一个实施方案中,相对于大鼠或猴FcRn该抗体以pH依赖或pH独立的方式优先与人FcRn结合。在一个实施方案中,该抗体以相差不超过2倍、5倍或10倍的亲和性与人FcRn以及合适的实验动物(例如,大鼠或猴)的FcRn二者结合。在一个实施方案中,该抗体在pH范围6.0-7.5以 $K_D \leq 5nM$ 与人FcRn和合适的实验动物的FcRn结合。在一个实施方案中,该抗体在内体内或在内体条件下与FcRn结合。例如,该抗体在酸性条件例如pH 6下与FcRn结合。在一个实施方案中,该抗体在pH6与FcRn结合,例如,比在pH7.5更优至少1.5、2、5、8、10、20、或50倍。在一个实施方案中,该抗体在pH 7.5释放FcRn,例如,比在pH6更迅速至少1.5、2、5、8、10、20、或50倍。在一个实施方案中,该抗体在pH 7.5与FcRn结合,例如,比在pH 6更优至少1.5、2、5、8、10、20、或50倍。在一个实施方案中,该抗体在pH 6释放FcRn,例如,比在pH7.5更迅速至少1.5、2、5、8、10、20、或50倍。在一个实施方案中,该抗体在pH 7.5不释放FcRn。

在一个实施方案中,该抗体在pH 6不释放FcRn。

[0106] 在一个实施方案中,与FcRn的相互作用延长该抗体的半衰期。在一个实施方案中,该抗体引起其他IgG分子的半衰期缩短,例如,至少5、10、20、40、50、60、70、80、或90%。例如,90%缩短将使抗体的半衰期由20天改变到2天。

[0107] 在一个实施方案中,当施用于受治疗者时,该抗体引起与自身免疫性疾病相关联的症状的改善。例如,该抗体可减轻或降低诸如以下的症状的严重性:关节肿胀,疼痛,或僵硬;循环抗体水平比如自身性抗体水平;关节疼痛(关节痛);发烧;极度疲劳;皮肤疹;贫血;胸部疼痛或深呼吸疼痛;脸颊和鼻部的蝴蝶形皮疹;光敏性;脱发;抽搐;口或鼻溃疡;雷诺氏现象;轻度红斑;神经精神表现;血小板减少;和胸腔积液等。

[0108] 在一个实施方案中,HC和LC可变域序列为同一多肽链的组分,也就是说其为单链抗体的部分。在一个实施方案中,HC和LC可变域序列为不同多肽链的组分。

[0109] 在一个实施方案中,该抗体为全长抗体。例如,该抗体可为人抗体或人源化抗体和/或可在人中具有非免疫原性。在一个实施方案中,该抗体包含人抗体框架区。在一个实施方案中,该抗体包含Fc域。

[0110] 在一个实施方案中,HC可变域序列包含3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的可变域序列,并且LC可变域序列包含3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的可变域序列。在一个实施方案中,该抗体与被3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11结合的FcRn表位结合。在一个实施方案中,该抗体与532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11竞争与FcRn的结合。

[0111] 在一方面,本发明涉及一种制备单克隆抗体的方法,其包括:用FcRn蛋白或其至少一个片段或用编码FcRn分子或其片段的多核苷酸序列免疫啮齿类动物;从所述啮齿类动物中获得B细胞;将所述B细胞与骨髓瘤细胞系相融合以获得杂交瘤细胞;在使其分泌单克隆抗体的条件下培养所述杂交瘤细胞,其中所述抗体包含至少一个可变区,其特异性结合于FcRn分子,其中所述FcRn分子包含可以结合至少IgG恒定区的一部分的域,其中所述抗体与所述FcRn分子的结合抑制IgG恒定区的部分与所述FcRn分子的结合;并分离该抗体。

[0112] 在一方面,本公开以一种识别与FcRn例如人FcRn结合的抗体的方法为特征,并且包括:提供FcRn抗原或其片段;提供抗体库,例如,展示库;并且识别该库中存在的与FcRn抗原结合的成员,其中该库的每个成员均在其表面展示异源性抗体组分并且每个成员包括编码该异源性抗体组分的核酸,该异源性抗体组分为一组多样化的抗体组分的成员。该方法可包括从已识别的成员中分离核酸分子,并且该核酸分子编码特异性结合于FcRn抗原的多肽。在一个实施方案中,该抗体与人FcRn特异性结合。

[0113] 在一个实施方案中,该库为噬菌体库,例如,噬菌体展示库。在一个实施方案中,使用竞争配体将被识别的噬菌体洗脱,例如,与FcRn和/或竞争性抗人FcRn抗体结合的IgG Fc。

[0114] 在另一方面,本公开以一种在样品中检测FcRn的方法为特征,该方法包括:将样品与FcRn结合抗体(例如,本文所述抗体)相接触并且如果存在抗体和FcRn的相互作用,检测该相互作用。在一个实施方案中,该抗体包含可检测标记比如荧光标签(例如,在存在显色或化学发光底物下进行检测的氟硼荧(bodipy)、荧光素-5-异硫氰酸酯、罗丹明、和过氧化物酶或碱性磷酸酶和过氧化物酶)。

[0115] 在一方面,本公开以一种调节FcRn活性的方法为特征,该方法包括:将FcRn与FcRn结合抗体(例如,本文所述抗体)相接触,从而调节FcRn的活性(例如,与IgG Fc 的结合)。在一个实施方案中,该FcRn位于人受治疗者内;该FcRn可位于人受治疗者的上皮或内皮细胞内或在血液内(例如,在血液中可溶或在血液中循环的细胞内)。在一个实施方案中,该抗体阻止FcRn与底物结合,例如,内源性底物比如IgG Fc和/或血清白蛋白。在一个实施方案中,该FcRn位于上皮或内皮细胞内体内。

[0116] 在一方面,本公开以一种治疗、预防和/或调节病症的症状的方法为特征,该病症例如自身免疫性病症或与非正常FcRn活性相关的病症。该方法包括:向受治疗者施用FcRn结合抗体(例如,本文所述抗体),例如,患有该病症或有发展该病症的风险的受治疗者。在一个实施方案中,以足够调节病症症状的量和/或时间施用该配体。

[0117] 在一个实施方案中,该自身免疫性病症为选自以下组成的组的病症:类风湿关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力(MG)、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、格林-巴利综合征、自身免疫性心肌炎、膜性肾小球肾炎、糖尿病、I型或II型糖尿病、多发性硬化症、雷诺氏综合征、自身免疫性甲状腺炎、胃炎、乳糜泻、白癜风、肝炎、原发性胆汁性肝硬化、炎症性肠病、免疫性嗜中性粒细胞减少症、脊椎关节病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、青少年发病型糖尿病、和与细胞因子、结核病中常见的T淋巴细胞介导的迟发型超敏反应相关的免疫反应、结节病和多肌炎、多动脉炎、皮肤血管炎、天疱疮、类天疱疮、肺出血肾炎综合征、川崎氏病、系统性硬化症、抗磷脂综合征和干燥综合征。

[0118] 在一个实施方案中,本发明的抗体可被用于抑制IgG穿越血脑屏障的转运。在另一实施方案中,本发明的抗体可被用于治疗脑瘤或阿尔茨海默氏病。

[0119] 在一个实施方案中,该抗体缩短内源性IgG的半衰期。在一个实施方案中,该自身免疫性病症以不需要的循环IgG为特征,例如,不需要的循环病原性IgG。

[0120] 在一方面,本公开以一种在受治疗者中检测FcRn的方法为特征,该方法包括:向受治疗者施用包括可检测标记的FcRn结合抗体(例如,本文中所述抗体);并在该受治疗者中检测该标记。该方法可包括对受治疗者成像,例如,使用断层摄影术,例如,MRI。

[0121] 在一方面,本公开以一种调节循环IgG的半衰期/水平的方法为特征,该方法包括:确定需要调节循环IgG半衰期/水平的受治疗者,例如,人;并以足够调节循环IgG半衰期/水平的量向该受治疗者施用FcRn结合抗体(例如,本文中所述抗体)。在一个实施方案中,该方法降低循环IgG的半衰期/水平。在一个实施方案中,施用该抗体并联合另一种抗自身免疫性病症的剂或疗法以降低循环IgG的半衰期/水平。联合施用FcRn抗体和其他抗自身免疫性病症的剂或疗法可导致调节或降低循环IgG的半衰期/水平所需的其他抗自身免疫性病症的剂或疗法的水平的降低。

[0122] 在另一方面,本公开以一种分离的核酸为特征,该分离的核酸包括编码第一多肽的第一序列,包括与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、

M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或 M0090-F11的第一可变域序列的序列至少80、85、90、92、94、95、96、97、98、99、或100%相同的序列，或与编码3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的可变域的序列的核酸杂交(例如，在严格条件下)的序列。在一个实施方案中，该核酸还包括编码包括(相应可变域的)第二可变域序列的第二多肽的第二序列，例如，与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或 M0090-F11的第二可变域序列的序列至少80、85、90、92、94、95、96、97、98、99、或100%相同的序列，或与编码3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的可变域的序列的核酸杂交(例如，在严格条件下)的序列。在一个实施方案中，该核酸还包括调控序列(例如，启动子序列，非翻译的5'区和非翻译的3'区)和/或载体序列。例如，该核酸构成载体。

[0123] 在另外一个方面，本公开以一种可表达抗体的宿主细胞为特征。该宿主细胞包括一种或多种核酸，其集合包括：(1) 编码第一可变域序列的第一序列，包括与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的第一可变域序列的序列至少80、85、90、92、94、95、96、97、98、99、或100%相同的序列，或与编码3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的第一可变域的序列的核酸杂交(例如，在严格条件下)的序列，以及(2) 编码包括(相应可变域的)第二可变域序列的第二可变域序列的第二序列，例如，与3B3.11、31.1、532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的第二可变域序列的序列至少80、85、90、92、94、95、96、97、98、99、或100%相同的序列，或与编码532A-M0090-F09、M0084-B03、M0056-G05、M0084-B11、M0092-D02、M0055-G12、M0057-F02、M0062-C09、M0064-H04、M0073-E10、或M0090-F11的可变域的序列的核酸杂交(例如，在严格条件下)的序列。

[0124] 在一方面，本公开以一种治疗或预防自身免疫性病症的方法为特征，该方法包括：施用FcRn结合抗体(例如，本文中所述抗体)，例如，联合施用第二疗法，给患有自身免疫性病症或有发展该病症的风险的受治疗者。例如，该第二疗法可为适合治疗或预防病症的疗法。在一个实施方案中，该第二疗法可包括：静脉内Ig疗法；非类固醇抗炎药物(NSAID)；皮质类固醇；环孢菌素、雷帕霉素、子囊霉素、或其免疫抑制类似物，例如，环孢菌素A、环孢菌素G、FK-506、雷帕霉素、40-O-(2-羟基)乙基-雷帕霉素；环磷酰胺；硫唑嘌呤；甲氨蝶呤；布喹那；FTY 720；来氟米特；咪唑立宾、霉酚酸、霉酚酸酯、15-脱氧精脒菌素；免疫抑制性单克隆抗体，例如，白细胞受体的单克隆抗体，例如，MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、或CD58或其配体；其他免疫调节化合物，例如：CTLA4Ig；或其他粘附分子抑制剂，如mAb或低分子量抑制剂，包括选择蛋白拮抗剂。

[0125] 在另一方面，本公开以一种治疗胎儿的方法为特征，该方法包括：将小分子或大分子药物，例如，抗生素或疫苗(例如，病毒疫苗)，辄合于FcRn结合抗体；并且在子宫内向怀有

胎儿的孕妇施用该轭合物。在一个实施方案中,该胎儿患有病症或有患病症的风险。示例性病症包括免疫系统病症(例如,自身性免疫病症),代谢紊乱,或感染性病症,例如,细菌或病毒感染,例如,肠道感染(例如,幽门螺杆菌(*Helibacter pylori*) 感染)。

[0126] 在另一方面,本公开以一种治疗婴儿的方法为特征,该方法包括:将小分子或大分子药物轭合于与FcRn结合的抗体,例如,本文中所述抗体;并将该轭合抗体加入母乳内。可将该母乳施用于婴儿。在一个实施方案中,将该轭合抗体施用于妇女并且该妇女直接,例如,哺乳,或间接地向婴儿提供母乳。

[0127] 尽管本发明主要以抗体的最优实施方案进行讨论,本领域普通技术人员将易于理解非抗体的结合蛋白或配体在本公开范围内。

附图说明

[0128] 图1描绘了关于与hFcRn或人 β 2M反应性的,来自使用编码hFcRn或GPI连接的hFcRn的DNA;以及使用编码人 β 2M的DNA进行免疫的动物的,在免疫56天以后所得小鼠血清中的抗体的ELISA分析结果。小鼠#180-184使用编码hFcRn的质粒免疫;小鼠#185-189使用编码hFcRn的质粒和编码h β 2M的质粒免疫;小鼠#190-194使用编码 GPI-连接的hFcRn的质粒免疫;小鼠#195-199使用编码GPI-连接的hFcRn的质粒和编码h β 2M的质粒免疫。

[0129] 图2描绘了关于与hFcRn或人 β 2M反应性的,来自使用编码hFcRn或GPI连接的hFcRn的DNA;以及使用编码人 β 2M的DNA进行免疫的动物的,在免疫94天以后所得小鼠血清中的抗体的ELISA分析结果。

[0130] 图3描绘了FACS分析的结果,该FACS分析用于确定#182小鼠所衍生的克隆的上清是否能够阻止293C11细胞(工程化以过表达FcRn的HEK 293细胞)上的hFcRn的 hIgG结合。将293C11细胞与杂交瘤上清一起培养60-90分钟,然后使用PBS清洗,随后与Alexa fluor-488标记的hIgG一起培养。所得结果以(A) 总体平均荧光强度(TMFI) 或(B) 人IgG与FcRn结合改变(抑制或加强)的百分比的方式表现。

[0131] 图4描绘了FACS分析的结果,该FACS分析使用实施例6中所述方法确定#187小鼠所衍生的杂交瘤上清的阻止活性的。所得结果以(A) 总体平均荧光强度(TMFI) 或(B) 人IgG与FcRn结合改变(抑制或加强)的百分比的方式表现。

[0132] 图5描绘了FACS分析的结果,该FACS分析用于确定在(A) mAb 31.1、mAb 4.13、和hIgG1;或(B) mAb 3B3.11、mAb 4B4.12、和hIgG1的各种浓度下的FcRn阻止活性的效价,所述确定是通过检测在Alexa-488-标记的hIgG和抗FcRn阻止单克隆抗体或 hIgG1存在下培养的293C11细胞(工程化用以过表达FcRn的HEK 293细胞)的表面染色进行。所得结果以结合于293C11细胞的hIgG的百分比表示,其定义为各浓度下的 TMFI除以不加竞争剂的样品的TMFI乘以100%。

[0133] 图6描绘了FACS分析的直方图,该FACS分析用于确定mAb 3B3.11、mAb 31.1、mAb 4.13、mAb 4B4.12、和mAb 15B6.1与表达hFcRn的293C11细胞(工程化用以过表达FcRn的HEK 293细胞)的细胞表面的结合。

[0134] 图7描绘了FACS分析的直方图,该FACS分析用于确定mAb 3B3.11、mAb 31.1、mAb 4.13和mAb 4B4.12与表达FcRn的大鼠细胞(工程化用以过表达大鼠FcRn的大鼠成纤维细胞)的细胞表面的结合。

[0135] 图8描绘了FACS分析的直方图,该FACS分析用于确定mAb 3B3.11、mAb 4.13、mAb 31.1、mAb 4B4.12、和mAb 15B6.1与表达FcRn的小鼠3T3细胞(工程化用以过表达小鼠FcRn的NIH 3T3细胞)的细胞表面的结合。

[0136] 图9描绘了FACS分析的直方图,该FACS分析用于确定mAb 3B3.11、mAb 4.13、mAb 31.1、mAb 4B4.12、和mAb 15B6.1与THP细胞(人单核细胞系)细胞内表达的 hFcRn的结合。

[0137] 图10描绘了FACS分析的直方图,该FACS分析用于确定mAb 3B3.11、mAb 4.13、mAb 31.1、mAb 4B4.12、和mAb 15B6.1与Caco-2细胞(人肠上皮细胞系)细胞内表达的hFcRn的结合。

[0138] 图11描绘了与mAb 4B4.12或同种型对照mIgG2a (1813) 在表面或细胞内反应的(A) 小鼠脾脏的巨噬细胞群和(B) 小鼠脾脏总细胞群的百分比。

[0139] 图12描绘了使用OVA加CFA免疫和经过mAb 4B4.12、同种型对照mIgG2a (1813) 或PBS处理的小鼠的(A) 脾脏和(B) 腹股沟淋巴结的平均重量。使用OVA加CFA 将小鼠免疫并以1mg的4B4.12或同种型对照1813的10次注射进行IP处理。

[0140] 图13描绘了对Balb/c小鼠的抗卵清蛋白(OVA) 的IgG的血清水平的影响,该小鼠已使用OVA免疫,并随后使用mAb 4B4.12、阳性对照mIgG2a (1813) 或PBS处理。抗体处理由三次每日腹膜内(IP)注射抗体,随后10次每隔一日的IP注射抗体组成。所示结果在抗体处理9天后(5次注射)得到。

[0141] 图14描绘了对CD-1小鼠的人IgG血清水平的影响,该小鼠已使用1mg/kg的人IgG (Synagis) 进行腹膜内(IP)注射,并随后在72小时后使用20mg/kg mAb 4B4.12,20mg/kg 同种型对照mIgG2a (1813),或PBS的单次IP注射进行处理。血清样品在mAb注射前(Synagis注射后72小时),mAb注射后72,和168小时获得。所示结果由抗体处理后 24小时的血清中得到。

[0142] 图15描绘了与图14所述的同样的实验,并有两个另外的血清取样点(72和168 小时)。该结果表示为与mAb注射前的Synagis的水平相比保留的Synagis的百分比。

[0143] 图16描绘了使用mAb 4B4.12、同种型对照mIgG2a (1813)、或PBS处理对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG) 的严重性的影响的时程。通过如下对愈加严重的症状分配零到四的等级评估该病症的严重性:0,无症状;1,弱握力、易疲劳和时喘;2,一般性虚弱,休息时驼背(hunched posture at rest),体重降低,发抖;3,严重虚弱,濒死;以及4,死亡。

[0144] 图17描绘了使用mAb 4B4.12、同种型对照mIgG2a (1813),或PBS处理对实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG) 造成的体重降低的影响,体重降低以克报告(如y轴所示)。

[0145] 图18描绘了Tg32B小鼠(hFcRn+/+,hβ2M+/+,mFcRn-/-,mβ2M-/-) 中生物素化的人IgG(生物素-hIgG) 与未标记的人IgG(hIgG) 的清除动力学的比较。使用5mg/kg 生物素化的人IgG(Synagis) 和495mg/kg未标记的hIgG对动物进行静脉内(IV)注射。在图中所示的时间点收集血清并使用亲和素平板(Pierce Chemicals) 确定血清中生物素-hIgG浓度并使用ELISA测量未标记的hIgG。

[0146] 图19描绘了将动物经过mAb 3B3.11处理后的Tg32B小鼠(hFcRn+/+,hβ2M+/+,mFcRn-/-,mβ2M-/-) 中生物素化的人IgG(生物素-hIgG) 的清除动力学。使用5mg/kg 生物素化的人IgG(Synagis) 和495mg/kg未标记的hIgG对动物进行静脉内(IV)注射。24小时以后,开始每日一次的IV注射50mg/kg的mAb 3B3.11并持续5天的时间。在图中所示的时间点收集

血清并使用亲和素平板 (Pierce Chemicals) 确定血清中生物素 -hIgG 浓度。

[0147] 图20描绘了FACS分析的条形图,该FACS分析用来确定mAb 3B3.11、mAb 4.13、mAb 31.1、mAb 4B4.12、和mAb 15B6.1与转染了猴FcRn/ β 2M的COS1细胞的结合。结果表示为TMFI。

[0148] 图21描绘了用来确定mAb3B3.11、15B6.1、4.13、和31.1与hFcRn α 链的特异性结合以及mAb 3B5.4和5A4.9与 β 2M的特异性结合的蛋白质免疫印迹。

[0149] 图22描绘了用来确定这些mAb识别的表位的Biacore表位分析。

[0150] 图23描绘了M90-F11, M84-B11和M55-G12的四个连续的每日静脉内剂量对TG32B小鼠的生物素IgG分解代谢的影响。

[0151] 图24描绘了M90-F11对hFcRn Tg小鼠中hIgG分解代谢的剂量反应(四个连续的每日静脉内剂量)。

[0152] 图25描绘了M90-F11对hFcRn Tg小鼠中hIgG分解代谢的单次剂量反应。

[0153] 图26描绘了用于使种系化M90-F11亲和成熟的方法。

[0154] 图27描绘了在20mg/kg静脉内剂量下亲和成熟的IgG和可溶性FAB对加速Tg32B小鼠中hIgG分解代谢的影响(生物素IgG&总IgG)。

[0155] 图28描绘了在5mg/kg静脉内剂量亲和成熟IgG的和可溶性FAB对加速Tg32B小鼠中hIgG分解代谢的影响(生物素IgG&总IgG)。

[0156] 图29描绘了加入轻链而非重链的M90-F11种系变化(以粗体突出显示)。

[0157] 图30描绘了IgG的异型变化。

[0158] 图31描绘了静脉内施用的抗FcRn抗体对Tg32B小鼠中hIgG分解代谢的影响。

[0159] 图32描绘了皮下施用的M161-B04 (DX2504) 抗FcRn抗体对Tg32B小鼠中hIgG 分解代谢的影响。

[0160] 图33描绘了抗FcRn抗体对食蟹猴中hIgG分解代谢的影响。图33A描绘了取得血液样品的时间。图33B描绘了没有施用抗体FcRn抗体M161-B04时的总体血清IgG水平。

[0161] 图34描绘了以静脉内(图34A)和皮下(图34B)施用的5mg/kg M161-B04抗-FcRn 抗体在猴中的效果。所示为猴的个体数据。

[0162] 图35描绘了以静脉内(图35A)和皮下(图35B)施用的20mg/kg M161-B04抗 -FcRn 抗体在猴中的效果。所示为猴的个体数据。

[0163] 图36描绘了以静脉内和皮下施用的各种浓度的M161-B04抗FcRn抗体在猴中的效果(根据给药前数据标准化数据)。

[0164] 图37描绘了以静脉内和皮下施用的M161-B04抗FcRn抗体对猴中血清IgA(图37A)、血清IgM(图37B)和血清白蛋白(图37C)的浓度的影响(根据给药前数据标准化数据)。

[0165] 图38描绘了DX-2504序列及其比对。

具体实施方式

[0166] 在正常情况下, FcRn可延长循环IgG的半衰期。与FcRn结合的抗体可用于例如, 通过阻止与IgG的相互作用调节FcRn的功能。特别的, 阻止FcRn与IgG的相互作用的抗体可用于缩短IgG分子的半衰期。

[0167] 这些抗体及相关策略可用于治疗甚至预防抗体介导的自身免疫性病症, 比如, 多

发性硬化症, 炎性肠道病症, 类风湿关节炎 (RA) 和系统性红斑狼疮 (SLE), 或本文中所述的其他自身免疫性病症。在大鼠被动模型中, 30mg/kg 的剂量的拮抗性抗大鼠 FcRn 单克隆抗体 (mAb) 1G3 成功地预防了实验性自身免疫重症肌无力 (EAMG); 该剂量比在 MG、SLE 和 ITP 的治疗中使用的静脉内 IgG (IVIg) 低大约 100 倍。此外, 遗传上易染自身免疫性病症比如狼疮或关节炎的 FcRn 缺陷小鼠在病症的严重性上有明显减缓。因此, 抗人 FcRn 的性抗体在人类自身免疫性病症的治疗上具有治疗潜力。

[0168] 本公开进一步提供, 尤其是, 可用于治疗自身免疫性病症和降低 IgG 的循环水平的人拮抗性抗人 FcRn 抗体。另外公开的为对具有通过抗原结合域结合并阻止 IgG-Fc 和人 FcRn 或大鼠 FcRn 相互作用的能力的高亲和性可溶性 Fab (sFab) (如在可溶蛋白测定和使用工程化以过表达人 FcRn 或大鼠 FcRn 的细胞系的活细胞结合测定中所评估的) 的识别。该 sFab 可以 pH 独立的方式或以 pH 依赖的方式结合并阻止 IgG-Fc 和人 FcRn 或大鼠 FcRn 相互作用, 例如, 在酸性 pH 比如 pH 6。该 sFab 可转化为 IgG 抗体。

[0169] 定义

[0170] 术语“结合蛋白”可指可与靶标分子相互作用的蛋白。该术语与“配体”可交换使用。“FcRn 结合蛋白”或“FcRn 结合配体”指可以与 FcRn 相互作用的蛋白, 并且, 特别包括优先与 FcRn 相互作用的蛋白, 例如, IgG。

[0171] 如本文所用, 术语“抗体”指包括至少一个免疫球蛋白可变域或免疫球蛋白可变域序列的蛋白。例如, 抗体可包括一个重 (H) 链可变区 (在本文中缩写为 VH), 和一个轻 (L) 链可变区 (在本文中缩写为 VL)。在另一个实例中, 抗体包括两个重 (H) 链可变区和两个轻 (L) 链可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段 (例如, 单链抗体、Fab 和 sFab 片段、F(ab')₂、Fd 片段、Fv 片段、scFv、和 dAb 片段) 以及完全抗体。

[0172] VH 和 VL 区可进一步细分成高变区, 其命名为“互补决定区” (“CDR”), 散布在更加保守的区内, 其命名为“框架区” (“FR”)。框架区和 CDR 的范围已被准确的定义 (参见, Kabat, E.A., 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学上重要的蛋白序列), 第 5 版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242, 和 Chothia, C. 等 (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, 另参见 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>)。本文中使用 Kabat 定义。每个 VH 和 VL 通常包括三个 CDR 和四个 FR, 根据以下顺序从氨基末端向羧基末端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0173] 术语全长抗体的“抗原结合片段” (或简单称为“抗体部分”或“片段”), 如本文所用, 指全长抗体的一个或多个保留了特异性结合于所感兴趣的靶标的能力的片段。术语全长抗体的“抗原结合片段”中包括的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 包括在铰链区由二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 由 VH 和 CH1 域组成; (iv) Fv 片段, 由抗体单臂的 VL 和 VH 域组成; (v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341:544-546), 其由 VH 域组成; 以及 (vi) 保留了功能的分离的互补决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个域, VL 和 VH, 由不同的基因编码, 但可使用重组方法, 通过使其制备为单独的蛋白链的合成连接体将其连接在一起, 其中 VL 和 VH 区配对形成被称为单链 Fv (scFv) 的单价分子。参见, 例如, Bird 等 (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

[0174] 抗体片段可使用包括为本领域技术人员已知的常规技术的任何合适的技术获得。

术语“单特异性抗体”指对特定靶标,例如,表位,表现出单独的结合特异性和亲和性的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,如本文所用,指具有单分子组成的抗体或其片段的制品。如本文所用,“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0175] 如本文所用,“结合亲和性”指表观结合常数或 K_a 。 K_a 为解离常数(K_d)的倒数。结合蛋白可能,例如,对特定靶标分子具有至少 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 和 10^{-11} M的结合亲和性。结合配体对第一靶标相对于第二靶标更高的结合亲和性可由比与第二靶标结合的 K_a (或数值 K_d),更高的与第一靶标结合的 K_a (或更小的数值 K_d)表示。在所述情况下,相对于第二靶标(例如,同一蛋白的第二构型或其模拟物;或第二蛋白),结合蛋白对第一靶标(例如,蛋白的第一构型或其模拟物)具有特异性。结合亲和性的区别(例如,特异性或其他比较)可为至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、50、70、80、100、500、1000、或 10^5 倍。

[0176] 结合亲和性可通过包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子体共振、或光谱法(例如,使用荧光测定)的各种方法确定。示例性的测量结合亲和性的条件为30℃和pH 7.2下的PBS(磷酸盐缓冲液)。这些技术可用于测量已结合的和游离的结合蛋白的浓度作为结合蛋白(或靶标)浓度的函数。已结合的结合蛋白([已结合])的浓度通过以下方程与游离的结合蛋白的浓度([游离])以及在靶标上对结合蛋白的结合位点的浓度相关,其中(N)为每个靶标分子的结合位点的数目:

[0177] $[已结合] = N \cdot [游离] / ((1/K_a) + [游离])$ 。

[0178] 但是并不是总是需要准确地确定 K_a ,因为有时获得亲和性的量化测量已经足够,例如,使用比如ELISA或FACS分析的方法确定的结果与 K_a 成比例,并因此可用于比较,比如确定是否较高亲和性是,例如,2倍高,以获得亲和性的量化测量,或获得亲和性的推导,例如,通过功能性测定中的活性,例如,体外或体内测定。

[0179] 术语“同源配体”指FcRn的天然生成的配体,包括其天然生成的变异体(例如,剪接变异体、天然生成的突变体、和同等型(isoform))。

[0180] “保守氨基酸替代”为使用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的一种替代。本领域内已定义具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸,精氨酸,组氨酸)、酸性侧链(例如,天门冬氨酸,谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,蛋氨酸,色氨酸), β -分支侧链(例如,苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)的氨基酸。很多的框架和CDR氨基酸残基包括一个或多个保守性替代是可能的。

[0181] 生物高分子的共有序列可包括在不同氨基酸间变化的位点。例如,在所述上下文中的符号“X”一般指任何氨基酸(例如,二十种天然氨基酸中的任何一种或十九种非半胱氨酸氨基酸中的任何一种)。其它被允许的氨基酸还可例如使用括号和斜线标明。例如,“(A/W/F/N/Q)”意为在特定位点上允许丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。

[0182] “人效(effectively human)”免疫球蛋白可变区为包括足够数量的人框架氨基酸位置以致该免疫球蛋白可变区在正常人体内不引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“人效”抗体为包括足够数量的人氨基酸位置以致该抗体在正常人体内不引起免疫原性反应的抗体。

[0183] “表位”指被结合蛋白(例如,抗体比如Fab或全长抗体)结合的靶标化合物上的位点。在该靶标化合物为蛋白的情况下,该位点可完全由氨基酸组分组成,完全由该蛋白的氨基酸的化学修饰(例如,糖基部分)组成,或由其组合组成。重叠表位包括至少一个共同氨基酸残基。

[0184] 对两种序列之间“同源性”或“序列同一性”(在本文中以上术语可交换使用)进行的计算如下所示。将序列比对以用于最佳比较目的(例如,为了最佳比对,可在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个序列中引入缺口,并且为了比较目的可以忽略非同源性序列)。最佳比对确定为以Blosum 62评分矩阵并以缺口罚分为12、缺口延长罚分为4、以及移码缺口罚分为5使用GCG软件包中的GAP程序确定的最佳评分。然后比较位于相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置与第二序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在该位置为相同的(如本文所用,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。该两种序列之间的同一性百分比为所述序列共有的相同位置的数量的函数。

[0185] 在一个实施方案中,用于比较的参考序列的长度为该参考序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%或100%。例如,该参考序列可为免疫球蛋白可变域序列的长度。

[0186] “人源化”免疫球蛋白可变区为被修饰以包括足够数量的人框架氨基酸位置以至于免疫球蛋白可变区在正常人体内不引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。对“人源化”免疫球蛋白的描述包括,例如,US 6,407,213和US 5,693,762。

[0187] 如在本文中所用,术语“在低严谨性、中严谨性、高严谨性或非常高严谨性的条件下杂交”描述了杂交和清洗的条件。进行杂交反应的指南可在Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学实验指南),John Wiley&Sons,N.Y.(1989)6.3.1-6.3.6 中发现,其通过引用并入本文。水相和非水相方法已在该参考文献中描述并可使用其中任何一种。本文中所指特异性杂交条件如下:(1)低严谨性杂交条件为在大约45℃下在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,随后在至少50℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中清洗两次(对于低严谨性条件清洗的温度可以增高到55℃);(2)中严谨性杂交条件为在大约45℃下在6X SSC中,随后在60℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中清洗一次或多次;(3)高严谨性杂交条件为在大约45℃下在6X SSC中,随后在65℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中清洗一次或多次;并且(4)非常高严谨性条件为在65℃下在0.5M磷酸钠、7%SDS,随后在65℃下在0.2X SSC、0.1%SDS中清洗一次或多次。非常高严谨性条件(4)为优选条件,并且除非另外说明,否则应使用该条件。本公开包括在低、中、高、非常高严谨性条件下与本文所述核酸或其互补序列的杂交的核酸,例如,本文中所述的编码结合蛋白的核酸。该核酸可为参考核酸的同样长度或在其长度的30%、20%、或10%之内。该核酸可对应于编码免疫球蛋白可变域序列的区。

[0188] FcRn结合蛋白可具有相对本文中所述的结合蛋白的突变(例如,至少一个\两个或四个,和/或少于15、10、5、或3个)(例如,保守或非必须氨基酸替代),其对蛋白功能上没有显著影响。可预测特定替代是否可以耐受,即,将不会负面影响生物特性,比如结合活性,例如使用Bowie,等(1990)Science 247:1306-1310的方法。

[0189] “免疫球蛋白域”指源自免疫球蛋白分子的可变或恒定域的结构域。免疫球蛋白域通常包括两个由大约七个 β -链形成的 β -折叠,以及一个保守二硫键(参见,例如,A.F.

Williams和A.N.Barclay 1988Ann.Rev Immunol.6:381-405)。

[0190] 如在本文中所用,“免疫球蛋白可变域序列”指可形成免疫球蛋白可变域的结构以致一个或多个CDR区位于合适于抗原结合位点的构型的氨基酸序列。例如,该序列可包括天然生成的可变域的全部或部分氨基酸序列。例如,该序列可能省略一个、两个或更多个N-或C-末端氨基酸、内部氨基酸,可包括一个或更多个插入或额外末端氨基酸,或可包括其他改变。在一个实施方案中,包括免疫球蛋白可变域序列的多肽可与另一免疫球蛋白可变域序列缔合形成靶标结合结构(或“抗原结合位点”),例如,优先与FcRn 结构相互作用的结构。

[0191] 抗体的VH或VL链还可包括重链或轻链恒定区的全部或部分,以由此分别形成重或轻免疫球蛋白链。在一个实施方案中,该抗体为两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的四聚体,其中重和轻免疫球蛋白链通过例如二硫键相互连接。重链恒定区包括三个结构域,CH1,CH2和CH3。轻链恒定区包括一个CL域。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主细胞或因子的结合,所述宿主细胞或因子包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。术语“抗体”包括IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型(以及其亚型)的完整免疫球蛋白。免疫球蛋白轻链可为以下类型:κ或λ。在一个实施方案中,抗体为糖基化的。抗体可在抗体依赖型细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性中具有功能。

[0192] 抗体的一个或多个区可为人或人效区。例如,一个或多个可变区可为人的或人效的。例如,一个或多个CDR可为人的,例如,HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、和LC CDR3。每个轻链CDR均可可为人的。HC CDR3可为人的。一个或多个框架区可为人的,例如,HC或LC的FR1、FR2、FR3、和FR4。在一个实施方案中,所有的框架区均为人的,例如,源自人体细胞,例如,产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一个实施方案中,人序列为种系序列,例如,由种系核酸编码。一个或多个恒定区可为人的或人效的。在一个实施方案中,抗体的至少70、75、80、85、90、92、95、或98%、或全部可为人的或人效的。

[0193] 抗体全部或者部分可由免疫球蛋白基因或其区段编码。示例性人免疫球蛋白基因包括κ、λ、α(IgA1和IgA2)、γ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、δ、ε和μ恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(大约25KDa或214个氨基酸)由可变区基因在NH2-末端(大约110个氨基酸)以及κ或λ恒定区基因在COOH-末端编码。全长免疫球蛋白“重链”(大约50KDa或446个氨基酸),相似地由可变区基因(大约116个氨基酸)和一个前述的其他恒定区基因编码,例如,γ(编码大约330个氨基酸)。

[0194] “分离的组合物”指从可以获得该分离的组合物天然样品的至少一种组分的至少90%中提取出来的组合物。如果所感兴趣的物类(species)或群体在重量-重量基础上为至少5、10、25、50、75、80、90、92、95、98、或99%纯,则合成或天然生成的组合物可为“至少某一纯度的组合物”。

[0195] 在FcRn或其部分的构型的模拟物的上下文里,术语“模拟物”指相对天然生成的FcRn或其部分具有对至少一种特定构型的偏好的修饰的FcRn。

[0196] “非必需”氨基酸残基为可在结合剂(例如,抗体)的野生型序列中改变而不消除或不显著改变其生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基将导致所述改变。

[0197] 本文所用措辞“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”意为有别于肠内施用和外用(topical administration)的施用模式,通常通过注射,并非限制性地包括静脉内、肌肉

内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮、关节内、包膜下、蛛网膜下腔、椎管内、硬膜外和胸骨内注射以及输注。

[0198] 术语“多肽”或“肽”（其可交替使用）指由肽键连接的三个或多个氨基酸的聚合物，例如，在长度上介于3和30个氨基酸之间，12和60个氨基酸之间，或30和300个氨基酸之间，或超过300个氨基酸。多肽可包括一个或多个非天然氨基酸。通常，多肽仅包括天然氨基酸。“蛋白”可包括一个或多个多肽链。相应的，术语“蛋白”包含多肽。蛋白或多肽也可包括一种或多种修饰，例如，糖基化，酰胺化，磷酸化，亚硝基化，等等。术语“小肽”可用于描述在长度上介于3个和30个氨基酸之间的多肽，例如，在长度上介于8个和24个氨基酸之间。

[0199] “预防有效量”指在必要的剂量和时间段内有效地达到所期预防结果的量。通常，因为预防剂量在受治疗者患病前或在病的早期阶段使用，所以预防有效剂量将比治疗有效剂量小。

[0200] 如本文所用，术语“大致上相同”（或“大致上同源”）在本文中用于指第一氨基酸或核酸序列包含足够数量的与第二氨基酸或核酸序列相同或等同（例如，具有相似的侧链，例如，保守氨基酸替代）的氨基酸残基或核苷酸，以至于该第一和第二氨基酸或核酸序列具有相似活性（或编码具有相似活性的蛋白），所述活性例如，结合活性、结合偏好、或生物活性。对于抗体，第二抗体对于相同的抗原具有相同的特异性和至少50%的亲和性。

[0201] 与本文中所公开的序列相似或同源（例如，至少大约85%序列同一性）的序列也是本申请的一部分。在一些实施方案中，序列同一性可为大约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。另外，当核酸区段在选择性杂交条件（例如，高严谨性杂交条件）下与该链的互补序列杂交时存在大致同一性。核酸可存在于完整细胞中、细胞溶解产物中，或以部分纯化或大致上纯化的形式存在。

[0202] 可使用本领域内任何已知的方法确定统计显著性。示例性统计检验包括：学生T检验、曼惠特尼U非参数检验（Mann Whitney U non-parametric test）和魏氏非参数统计检验（Wilcoxon non-parametric statistical test）。一些统计显著关系具有小于0.05或0.02的P值。特定结合蛋白可显示统计显著的（例如，P值<0.05或0.02）例如特异性或结合的差异。术语“诱导”、“抑制”、“加强”、“升高”、“增加”、“降低”或类似术语，例如，其指明在两种状态之间可分辨的质量或数量区别，并可指两种状态之间的区别，例如统计显著的区别。

[0203] “治疗有效剂量”调节可测量的参数，例如，循环IgG抗体水平，达相对未处理的受治疗者统计显著程度或至少大约20%、至少大约40%、至少大约60%、或至少大约80%。化合物调节可测量的参数例如自身免疫性的能力可在预测人类自身免疫性病症的动物模型系统中进行评估。另外，可通过检查该化合物在体外调节参数的能力来评估组合物的这个特性，例如，通过本领域技术人员已知的测定。

[0204] 本发明的其他特征和优势将在以下详细描述和权利要求中更加清楚。本发明的实施方案可包括本文所述的特征的任何组合。在任何情况下，术语“实施方案”都不排除本文所公开的一个或多个其它特征。

[0205] FcRn序列

[0206] 以下序列比对为人FcRn α 链氨基酸序列与小鼠FcRn α 链氨基酸序列的比对。示例性FcRn蛋白可包括该两种序列中的一种，或其片段，例如，不包括信号序列的片段：

[0207]

	信号序列	α_1 域
α _人类:	MCVFPFQFWALGGLLFLFPGSLG	AESHLSELLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGFPQQYLS
α _大鼠:	MGMSQPGV-LLSLLLVLLPQTWG	AEPRLPFMYHLAAVSDLSTGLPSFWATGWLGAQQYLT

	α_1 域	α_2 域
α _人类:	YNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGGK--GP	YTLQGGLLG
α _大鼠:	YNNLRQEADPCGAWIWENQVSWYWEKETTDLKSKEQLFLEAIRTLENQINGT	FTLQGGLLG

	α_2 域
α _人类:	CELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAIQRWQQDKAANKELTFL
α _大鼠:	CELAPDNSSLPTAVFALNGEEFMRFNPRTGNWSGEWPETDIVGNLWMKQPEAARKESEFL

	α_2 域	α_3 域
α _人类:	LFSCPHRLREHLERGRGNLEWK	EPFSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFPPELQLRFLRN
α _大鼠:	LTSCPERLLGHLEGRGNLEWK	EPFSMRLKARPGNSGSSVLTCAAFSFPPELKFRFLRN

	α_3 域
α _人类:	GLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCTVQHAGLAQPLRVELE
α _大鼠:	GLASGSGNCSTGPNGDGSFHAWSLLEVKRGDEHHYQCQVEHEGLAQPLTVDLDD

	跨膜	胞质域
α _人类:	SPAKSSVLVVGIVIGVLLLLTAAVGGALLW	RRMRSGLPAPWISLRGDDTGVLPTPGEAQ
α _大鼠:	SPARSSVPVVGIIIGLLLVVAIAGGVLLW	NRMRSGLPAPWLSLSGDDSGDLLPGGNLPP

α _人类:	DADLKDVNVIPATA (SEQ ID NO:1)
α _大鼠:	EAEFPQGVNAFPATS (SEQ ID NO:2)

[0208] 以下序列比对为人 $\beta 2$ 微球蛋白链氨基酸序列与大鼠 $\beta 2$ 微球蛋白链氨基酸序列的比对。示例性FcRn蛋白可包括该两种序列中的一种,或其片段,例如,不包括信号序列的片段:

[0209]

信号序列

 β 2 微球蛋白 β 2m_人类: MSRSVALAVLALLSLSGLEA IQRTFKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLL β 2m_大鼠: MARCVTVIFLVLSLAVVLA IQKTPQIQVYSRHPPENGKFNFLNCYVSGFHPPQIEIELL β 2 微球蛋白 β 2m_人类: KNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM (SEQ ID NO:3) β 2m_大鼠: KNGKKIPNIEMSDLSFSKDWSEFYILAHTTEFTPTETDVYACRVKHVTLKEPKTVTWDRDM (SEQ ID NO:4)[0210] 编码FcRn蛋白 α 链的示例性核酸序列可包括以下序列:[0211] FcRn α 核酸序列,人(Homo sapiens)

[0212]

GTTCTTCAGGTACGAGGAGGGCATTGTTGTCAGTCTGGACCGAGCCCGCAGAGCCCCTCCTCGGCGTCCT
GGTCCCGGCCGTGCCCCGCGGTGTCCCGGGAGGAAGGGGCGGGCCGGGGTTCGGGAGGAGTCACGTGCCCC
CTCCCGCCCCAGGTCGTCTCTCAGCATGGGGGTCCCGCGGCCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCT
CTTTCTCCTTCTGGGAGCCTGGGCGCAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCC
TCGCCTGCCCCGGGGACTCCTGCCTTCTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACA
ATAGCCTGCGGGGCGAGGCGGAGCCCTGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACAGGTGTCCTGGTATTGGGA
GAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAAGGAGAAGCTCTTTCTGGAAGCTTTCAAAGCTTTGGGGGAAAA
GGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGGGCTGTGAACTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCCACCGCCA
AGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTCATGAATTTGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGGTGGGGACTGGCC
CGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCAGCAGCAGGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCCTG
CTATTCTCCTGCCCCGACCGCCTGCGGGAGCACCTGGAGAGGGGCGCGGAAACCTGGAGTGGAAGGAGC
CCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCCAGCAGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTC
CTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTTCCTGCGGAATGGGCTGGCCGCTGGCACCGGCCAGGGTGAC
TTCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCTCGTCGTCATAACAGTCAAAAGTGCGGATGAGCACC
ACTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCGGGGCTGGCGCAGCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAA
GTCTTCCGTGCTCGTGGTGGGAATCGTCATCGGTGTCTTGCTACTCACGGCAGCGGCTGTAGGAGGAGCT
CTGTTGTGGAGAAGGATGAGGAGTGGGCTGCCAGCCCCTTGATCTCCCTTCGTGGAGACGACACCGGGG
TCCTCCTGCCCACCCAGGGGAGGCCAGGATGCTGATTTGAAGGATGTAAATGTGATTCCAGCCACCGC
CTGACCATCCGCCATTCCGACTGCTAAAAGCGAATGTAGTCAGGCCCTTTTCATGCTGTGAGACCTCCTG
GAACACTGGCATCTCTGAGCCTCCAGAAGGGGTTCTGGGCCTAGTTGTCCTCCCTCTGGAGCCCCGTCT
GTGGTCTGCCTCAGTTTCCCTCCTAATACATATGGCTGTTTTCCACCTCGATAATATAACACGAGTTTG
GGCCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:5)

[0213] 示例性的人FcRn(胞外域)加GPI DNA序列(小写加粗)的核酸序列如下所示。

[0214]

ATGGGGGTCCCGCGGCTCAGCCCTGGGCGCTGGGGCTCCTGCTCTTTCTCCTTCCTGGGAGCCTGGGCG
CAGAAAGCCACCTCTCCCTCCTGTACCACCTTACCGCGGTGTCTCGCCTGCCCCGGGACTCCTGCCTT
CTGGGTGTCCGGCTGGCTGGGCCCCGAGCAGTACCTGAGCTACAATAGCCTGCGGGGCGAGGCGGAGCCC
TGTGGAGCTTGGGTCTGGGAAAACAGGTGTCCTGGTATTGGGAGAAAGAGACCACAGATCTGAGGATCAA
GGAGAAGCTCTTTCTGGAAGCTTTCAAAGCTTTGGGGGAAAAGGTCCCTACACTCTGCAGGGCCTGCTGG
GCTGTGAACCTGGGCCCTGACAACACCTCGGTGCCACCGCCAAGTTCGCCCTGAACGGCGAGGAGTTCATG
AATTTTCGACCTCAAGCAGGGCACCTGGGGTGGGACTGGCCCCGAGGCCCTGGCTATCAGTCAGCGGTGGCA
GCAGCAGGACAAGGCGGCCAACAAGGAGCTCACCTTCCTGCTATTCTCTGCTGCCCGCACCGCCTGCGGGAGC
ACCTGGAGAGGGGCCGCGAAACCTGGAGTGGAAGGAGCCCCCTCCATGCGCCTGAAGGCCCGACCCAGC
AGCCCTGGCTTTTCCGTGCTTACCTGCAGCGCCTTCTCCTTCTACCCTCCGGAGCTGCAACTTCGGTTCCT
GCGGAATGGGCTGGCCGCTGGCACCGGCCAGGGTGACTTCGGCCCCAACAGTGACGGATCCTTCCACGCCT
CGTCGTCACCTAACAGTCAAAAGTGGCGATGAGCACCCTACTGCTGCATTGTGCAGCACGCGGGGCTGGCG
CAGCCCCCTCAGGGTGGAGCTGGAATCTCCAGCCAAGTCCTCC**cgggccgctcgacgggctacgagcatcagt**
aacactactaggcgcaggcctactactatcactactaccagcactactacgatttggggccataa

(SEQ ID NO: 6)

[0215] 编码β2-微球蛋白 (β2M) 的示例性核酸序列可包括以下序列:

[0216] >β-2-微球蛋白 (β2M) 核苷酸, 人 (Homo sapiens)

[0217]

AATATAAGTGGAGGCGTCGCGCTGGCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCATTGCGGGCCGAGATGTCTCGCT
CCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGAT
TCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTT
CATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTGAGACT
TGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATGA
GTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGTAA
GCAGCATCATGGAGGTTTGAAGATGCCGCATTTGGATTGGATGAATTCCAAATTCTGCTTGCTTGCTTTT
TAATATTGATATGCTTATACACTTACACTTTATGCACAAAATGTAGGGTTATAATAATGTTAACATGGAC
ATGATCTTCTTTATAATTCTACTTTGAGTGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCTGAGCAGGTTGCTCCACA
GGTAGCTCTAGGAGGGCTGGCAACTTAGAGGTGGGGAGCAGAGAATTCTCTTATCCAACATCAACATCTT

GGTCAGATTTGAACTCTTCAATCTCTTGCACTCAAAGCTTGTTAAGATAGTTAAGCGTGCATAAGTTAAC
TTCCAATTTACATACTCTGCTTAGAATTTGGGGGAAAATTTAGAAATATAATTGACAGGATTATTGAAAA
TTTGTATAATGAATGAAACATTTTGT CATATAAGATTCATATTTACTTCTTATACATTTGATAAAGTAA
GGCATGGTTGTGGTTAATCTGGTTTATTTTGTTCACAAGTTAAATAAATCATAAAACCTTGATGTGTTA
TCTCTTA (SEQ ID NO:7)

[0218] 小鼠抗人FcRn抗体

[0219] 抗体结构和序列

[0220] 本发明涉及特异性结合于至少一个FcRn表位的抗体,其中该抗体与FcRn表位的结合抑制IgG的Fc部分与FcRn结合。本发明因此涉及与FcRn阻断性抗体。该阻断性抗体可为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。在一个实施方案中,该阻断性抗体为IgG。在一个实施方案中,本发明的抗体将具有 $10^{10}M^{-1}$ 的结合亲和性。在另一实施方案中,本发明的抗体将具有 $10^{11}M^{-1}$ 的结合亲和性。

[0221] 在一个实施方案中,本发明涉及由3B3.11杂交瘤、31.1杂交瘤、4B4.12杂交瘤、或17D3杂交瘤生成的单克隆抗体。

[0222] 在一个实施方案中,本发明涉及结合于FcRn线性表位的抗体。在另一个实施方案中,本发明涉及结合于FcRn构象表位(conformational epitope)的抗体。在一个实施方案中,本发明的抗体与包含EPPSMRLKAR (SEQ ID NO:105) 或其片段的氨基酸序列结合。在另一实施方案中,本发明的抗体与包含CSAFYPPELQLRFFLRNGL (SEQ ID NO:106) 或其片段的氨基酸序列结合。

[0223] 在某些实施方案中,本发明的抗体与被3B3.11和31.1识别的相同的表位特异性反应。可通过竞争性结合检测法确定所述抗体。

[0224] 本发明的抗FcRn抗体,包括其 V_H 和 V_L 域,以及CDR,的说明性实施方案的氨基酸(AA)序列均在表1中列举。抗体的两个特异性实施方案被鉴别为3B3.11和31.1。

[0225] 表1:本发明的小鼠抗体的CDR。

[0226]

抗体	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
3B3.11	SASSSISSNYLH (SEQ ID NO:8)	RTSNLAS (SEQ ID NO:9)	QQGSNIPLT (SEQ ID NO:10)	RSWMN (SEQ ID NO:11)	RIHPGDGDTN YNGKFKG (SEQ ID NO:12)	EGSPYFDY (SEQ ID NO:13)
31.1	KASQDINNYIA (SEQ ID NO:14)	YTSTLQPL (SEQ ID NO:15)	LQYDNLLRT (SEQ ID NO:16)	DYAMH (SEQ ID NO:17)	VITNYYGDAS YNQKFKG (SEQ ID NO:18)	GGYDGYYVDFDY (SEQ ID NO:19)

[0227] 3B3.11轻链的氨基酸序列如下所示。CDR区以下划线表示并且恒定区为斜体。

[0228]

CDR 1

CDR 2

1 DIQLTQSPTT VAASPGEKIT ITC**SASSIS SNYLHWYQQK** PGFSPKLLIY **RTSNLAS**GVP

CDR 3

CL 1

61 ARFSGSGSGT SYSLTIGTME AEDVATYYCQ **QGSNIPLT**FG AGTKLELKRA DAAPTVSIFP

CL 1

121 PSSEQLTSGG ASVVCFLNNF YPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTL

CL 1

181 TLTKEDEYERH NSYTCEATHK TSTSPIVKSF NKNE (SEQ ID NO:20)

[0229] 3B3.11重链的氨基酸序列如下所示。CDR区以下划线表示并且恒定区为斜体。

[0230]

CDR 1

CDR 2

1 VKLQESGP EL VKPGASVKIS CKASGYAFSR **SWMN**WVKQRP GQGLEWIGRI **HPGDGDTN**YN

CDR 2

CDR 3

CH 1

61 **GKFKG**KATLT VAKSSSTAYM QLSSLTSVDS AVYFCAN**EGS** **PYFDY**WGQGT TLTVSSAKTT

CH 1

121 PPSVYPLAPG SAAQTNSMVT LGCLVKGYFP EPVTVTWNSG SLSSGVHTFP AVLQSDLYTL

CH 1

181 SSSVTVPSSST WPSETVTCNV AHPASSTKVD KKLE (SEQ ID NO:21)

[0231] 31.1轻链的氨基酸序列如下所示。CDR区以下划线表示并且恒定区为斜体。

[0237] 本发明的范围内包括其CDR序列与包括或包含在SEQ ID NO: 20、21、22或23中的序列内的那些抗体不具有本质上区别的抗体。通常这涉及使用具有相似电荷、疏水性、或立体化学特征的氨基酸的氨基酸替代。与CDR区不同的是,只要对抗体的结合特性没有负面影响(例如,相比较未替代的抗体,亲和性降低多于50%),在FR区内也可以进行更加彻底的替代。替代也可用于种系化抗体或稳定抗原结合位点。

[0238] 制备小鼠单克隆抗体的方法

[0239] 制备单克隆抗体的方法已被描述(Harlow等, *Antibodies A Laboratory Manual* (实验室抗体手册), 冷泉港实验室, 冷泉港, NY (1988))。在一些情况下,作为第一步,使用抗原多肽将啮齿类动物,例如,小鼠,进行免疫以生成抗体反应。由于FcRn广泛表达并在物种之间显出高程度的同源性,多肽免疫未成功地产生高亲和性FcRn特异性单克隆抗体或FcRn单克隆阻断抗体。为了解决这个问题可进行DNA疫苗接种。(Castagliola等, *J. Immunology* 160:1458 (1998))。DNA疫苗接种涉及使用编码FcRn 或其片段的cDNA构建体将啮齿类动物例如,小鼠免疫。免疫可肌肉内、腹膜内、皮下、静脉内、皮内施用或直接施用到淋巴结。在一个实施方案中,肌肉内施用免疫。DNA疫苗接种可与佐剂一起施用,例如,弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂。DNA疫苗接种可伴有心脏毒素施用以增加抗体效价。施用心脏毒素引起促进对所施用 DNA疫苗的细胞摄取的细胞死亡和细胞再生。心脏毒素也可增强导致更强免疫反应的炎症。

[0240] 从啮齿类动物中分离抗体分泌细胞(B细胞)。通常可从啮齿动物的脾脏中分离B细胞并将其与骨髓瘤细胞融合。骨髓瘤细胞系为不产生抗体的永生细胞系。骨髓瘤细胞系可选自但不限于:P3-X63Ag8、X63Ag8.653、Sp2/0-Ag14、F0、NSI/1-Ag4-1、NS0/1、FOX-NY、Y3-Ag1.2.3、YB2/0和IR983F。

[0241] 将脾脏细胞与骨髓瘤细胞系融合形成杂交瘤。可通过将这两种细胞类型与聚乙二醇混合一段合适的时间(例如,五分钟)来介导融合。将所形成的杂交瘤在使用合适的选择性培养基(例如HAT)的细胞培养物中进行培养并对其生产抗FcRn单克隆抗体的能力进行筛选。可使用已知免疫技术,例如,ELISA,进行筛选。

[0242] 另一种制备FcRn特异性单克隆抗体的方法为使用可溶性人FcRn将转基因FcRn 敲除小鼠免疫,参见PCT申请WO 02/43658。WO 02/43658表述了一种其基因组在其内源性FcRn基因内包含纯合打断的转基因小鼠,其中所述纯合打断阻碍了功能性FcRn 蛋白的表达。其基因组在其内源性FcRn基因内包含纯合打断的转基因小鼠不产生本发明的单克隆抗体,其中所述纯合打断阻碍了功能性FcRn蛋白的表达。本发明的单克隆抗体不包括来自其基因组在其内源性FcRn基因内包含纯合打断的转基因小鼠的 B细胞,其中所述纯合打断阻碍了功能性FcRn蛋白的表达。

[0243] 人源化抗FcRn抗体展示库

[0244] 可使用展示库鉴别与FcRn结合的抗体。展示库为实体的集合;每个实体包括可及多肽组分和编码或鉴别该多肽组分的可回收组分。该多肽组分被改变以代表不同氨基酸序列。多肽组分可为任何长度,例如,从三个氨基酸到多于300个氨基酸。在选择中,使用FcRn探检该库中的每个成员的多肽组分,并且如果该多肽组分与FcRn结合,将该展示库成员鉴别出来,通常通过保留在支持物上。另外,展示库实体可包括多于一个的多肽组分,例如,sFab的两个多肽链。

[0245] 保留的展示库成员从支持物上回收并进行分析。该分析可包括扩增和随后在相似或不相似条件下的选择。例如,可交替使用正选择和负选择。该分析也可包括确定该多肽组分的氨基酸序列和纯化该多肽组分以用于详细的表征。

[0246] 展示库可使用多种形式。实例包括以下所述。

[0247] 噬菌体展示。一种形式使用病毒,尤其是细菌噬菌体(bacteriophage)。该形式被称为“噬菌体展示。”通常将蛋白组分共价连接到细菌噬菌体外壳蛋白上。该连接由翻译编码融合于外壳蛋白的蛋白组分的核酸导致。该连接可包括柔性肽连接体、蛋白酶位点、或由于抑制终止密码子而掺入的氨基酸。噬菌体展示已被描述例如,在U.S.5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard等(1999) J. Biol. Chem 274:18218-30; Hoogenboom等(1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom等(2000) Immunol Today 2:371-8; Fuchs等(1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay等(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse等(1989) Science 246:1275-1281; Griffiths等(1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins等(1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson等(1991) Nature 352:624-628; Gram等(1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard等(1991) Bio/Technology 9:1373-1377; 和Hoogenboom等(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137中。

[0248] 已开发噬菌体展示系统用于丝状噬菌体(噬菌体f1、fd、和M13)以及其他细菌噬菌体。丝状噬菌体展示系统通常使用与次要外壳蛋白比如基因III蛋白和主要外壳蛋白基因VIII蛋白的融合,但是也可使用与其他外壳蛋白比如基因VI蛋白、基因VII蛋白、基因IX蛋白、或其结构域(参见,例如,WO 00/71694)的融合。在一个实施方案中,该融合为与基因III蛋白的域的融合,例如,锚定域或“残株(stump),”(基因III蛋白锚定域的描述参见,例如,美国专利第5,658,727号)。也可能使用非肽连接将展示的蛋白物理连接到外壳上。

[0249] 可使用标准噬菌体制备方法培养和收获展示蛋白组分的细菌噬菌体,例如,从生长培养基里PEG沉淀。在选择个体展示噬菌体后、可在扩增后将编码该所选蛋白组分的核酸从感染了所选噬菌体的细胞或噬菌体本身中分离出来。可挑选个体菌落或噬菌斑,分离核酸并测序。

[0250] 其他展示形式。其他展示形式包括基于细胞的展示(参见,例如,WO 03/029456)、蛋白-核酸融合(参见,例如,US 6,207,446)、和核糖体展示(参见,例如,Mattheakis等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022和Hanes等(2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92; Hanes等(2000) Methods Enzymol. 328:404-30; 和Schaffitzel等(1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35)。

[0251] 支架。展示的支架可包括:抗体(例如,Fab片段、单链Fv分子(scFv)、单域抗体、骆驼抗体(camelid antibody)、和骆驼化抗体(camelize antibody)); T-细胞受体; MHC蛋白; 胞外域(例如,纤连蛋白类型III重复,EGF重复); 蛋白酶抑制剂(例如,库尼兹域(Kunitz domain)、大肠杆菌素(ecotin)、BPTI等); TPR重复; 三叶结构; 锌指域; DNA-结合蛋白; 特别单体DNA结合蛋白; RNA结合蛋白; 酶,例如,蛋白酶(特别是灭活的蛋白酶), RNA酶; 伴侣蛋白,例如,硫氧还蛋白和热休克蛋白; 胞内信号域(比如SH2和SH3域); 线性和约束肽; 以及线性肽底物。展示库可包括合成和/或天然多样性。参见,例如,US 2004-0005709。

[0252] 展示技术还可用于获取结合于靶标特定表位的抗体。这可通过,例如,使用缺乏该

特定表位或在该表位内突变(例如,丙氨酸)的竞争性非靶标分子实现。所述非靶标分子可用于以下所述的负选择步骤中,作为展示库与靶标结合时的竞争性分子,或作为前洗脱剂,例如,在清洗溶液中捕获对靶标不具特异性的解离的展示库成员。

[0253] 迭代选择。在一个实施方案中,展示库技术以迭代模式使用。第一展示库被用于鉴别一个或多个结合于靶标的抗体。然后将这些被鉴别的抗体通过诱变方法改变以形成第二展示库。然后从第二库中选择更高亲和性的抗体,例如,通过使用更高的严谨性或更具竞争性的结合和清洗条件。

[0254] 在一些实施中,将诱变靶向于已知或可能位于结合界面的区。对于抗体,可如本文中所述将诱变导向重链或轻链的CDR区。进一步,可将诱变导向接近或邻近CDR的框架区。对于抗体,也可将诱变限制于一个或多个CDR内,例如,用来产生精确的逐步的改进。示例性诱变技术包括:易错PCR、重组、DNA改组、定点诱变和盒式诱变。

[0255] 在迭代选择的一个实例中,本文中所述的方法被用于从展示库中首先鉴别以至少对靶标的最低特异性或最低活性与FcRn结合的抗体,例如,结合平衡解离常数小于1nM、10nM、或100nM。编码最初鉴别的抗体的核酸序列被用作引入变异的模板核酸,例如,用来鉴别相对最初抗体具有增强特性(例如,结合亲和性、动力学、或稳定性)的第二抗体。

[0256] 离解速率(Off-Rate)选择。因为慢离解速率可以预测高亲和性,特别是就抗体和其靶标的相互作用而言,本文中所述方法可用于分离对靶标的结合相互作用具有所需动力学离解速率(例如,降低的)的抗体。

[0257] 为了从展示库中选择慢离解速率抗体,将该库与固定的靶标相接触。然后使用除去非特异性或弱结合生物分子的第一溶液清洗该固定的靶标。然后使用包括饱和量的游离靶标或靶标特异性高亲和性竞争性单克隆抗体(即不附加于颗粒上的靶标的复制品)的第二溶液将结合的抗体洗脱。游离靶标与从靶标上离解的生物分子结合。通过使用相对固定的靶标非常低浓度的饱和量的游离靶标有效防止再结合。

[0258] 该第二溶液可具有本质上生理性或严谨的溶液条件。通常,第二溶液的溶液条件与第一溶液的溶液条件相同。根据时间顺序收集第二溶液的级分以区分早期级分和晚期级分。相对于早期级分中的生物分子,较晚的级分包括从靶标上以较慢速率离解的生物分子。

[0259] 进一步,即使在长期的培育以后,也可能将保持结合在靶标上的展示库成员回收。可通过使用离液条件将所述成员离解或在所述成员附加在靶标上时将其扩增。例如,可将结合到靶标上的噬菌体与细菌细胞接触。

[0260] 选择或筛选特异性。本文所述的展示库筛选方法可包括丢弃与非靶标分子结合的展示库成员的选择或筛选过程。非靶标分子的实例包括磁珠上的链霉亲和素蛋白,阻断剂比如牛血清白蛋白,脱脂牛奶,任何捕获或靶标固定单克隆抗体,或不表达人FcRn靶标的未转染细胞。

[0261] 在一项实施中,使用被称为“负选择”的步骤分辨靶标和与其相关的非靶标分子以及相关、但不同的非靶标分子。将展示库或其集合与非靶标分子接触。收集样品中不与非靶标结合的成员并用于随后的与靶标分子的结合的选择中,或甚至用于随后的负选择中。负选择步骤可在选择与靶标分子结合的库成员之前或之后。

[0262] 在另一项实施中,使用筛选步骤。在分离与靶标分子结合的展示库成员后,检测每个分离的库成员结合于非靶标分子(例如,以上所列非靶标)的能力。例如,可使用高通量

ELISA筛选获得该数据。也可使用ELISA筛选获得每个库成员与靶标结合以及对相关靶标或该靶标的亚基(例如,大鼠FcRn; β 2微球蛋白)的跨物种的反应性以及在不同条件下比如pH6或pH7.5的条件下的量化数据。将非靶标和靶标结合数据进行比较(例如,使用计算机和软件)以鉴别特异性结合于靶标的库成员。

[0263] 其它表达库

[0264] 蛋白的其他类型的集合(例如,表达库)可用于鉴别具有特定性质的蛋白(例如,结合FcRn的能力和/或调控FcRn的能力),包括,例如,抗体的蛋白芯片(参见,例如,De Wildt等(2000)Nat.Biotechnol.18:989-994), λ gt11库,双杂交库等。

[0265] 抗体库

[0266] 在一个实施方案中,库呈现多种多肽的集合,其中每一种包括一个免疫球蛋白域,例如,免疫球蛋白可变域。展示库对于,例如,鉴别识别人抗原的人或“人源化”抗体。特别有用。所述抗体可用作治疗人类病症比如自身免疫性病症的治疗剂。由于该抗体的恒定区和框架区为人恒定区和框架区,这些治疗抗体可避免自身被识别并靶定为抗原。也可优化恒定区以募集人免疫系统的效应功能。该体外展示选择过程超越了正常人免疫系统不能产生抗自身抗原的抗体的局限。

[0267] 典型的抗体展示库展示包括VH域和VL域的多肽。“免疫球蛋白域”是指源自免疫球蛋白分子可变或恒定区域的域。免疫球蛋白域通常包含两个由大约七条 β 链组成的 β 折叠,和保守二硫键(参见,例如,A.F.Williams和A.N.Barclay,1988,Ann.Rev. Immunol.6:381-405)。展示库可以Fab片段(例如,使用两个多肽链)或单链Fv(例如,使用单独的多肽链)的形式展示抗体。也可使用其他形式。

[0268] 在Fab和其它形式中,被展示的抗体可包括作为轻链和/或重链的部分的一个或多个恒定区。在一个实施方案中,每条链包括一个恒定区,例如,在Fab的实例中。在其他实施方案中,展现了其他的恒定区。

[0269] 可通过多种方法构建抗体库(参见,例如,de Haard等,1999,J.Biol.Chem. 274:18218-30;Hoogenboom等,1998,Immunotechnology 4:1-20;和Hoogenboom等,2000,Immunol.Today 21:371-378。另外,每种方法的元素可以与其他方法的元素组合。可使用这些方法向单个免疫球蛋白域(例如,VH或VL)或多个免疫球蛋白域(例如,VH和VL)中导入变异。可在免疫球蛋白可变域中导入变异,例如,在CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3、和FR4中的一个或多个的区域中,针对重链和轻链可变域其中之一或两者的所述区域。在一个实施方案中,在所给可变域的全部三个CDR中导入变异。在另一个实施方案中,在CDR1和CDR2,例如,重链可变域的CDR1和CDR2中导入变异。任何的组合都可能实现。在一种方法中,通过向核酸的相应区中插入编码CDR的多样的寡核苷酸来构建抗体库。寡核苷酸可通过使用单体核苷酸或三核苷酸合成。例如,Knappik等,2000,J.Mol.Biol 296:57-86中描述了使用三核苷酸合成和具有用来接收寡核苷酸的工程化的限制性位点的模板构建编码CDR的寡核苷酸方法。

[0270] 在另一方法中,将动物,例如,啮齿类动物,使用FcRn进行免疫。可选择性地用抗原对动物进行加强来进一步刺激反应。从该动物中分离出脾脏细胞,并扩增编码VH和/或VL域的核酸并将其克隆以用于在展示库中表达。

[0271] 在又一方法中,使用扩增自幼稚种系免疫球蛋白基因的核酸构建抗体库。被扩增

的核酸包括编码VH和/或VL域的核酸。编码免疫球蛋白的核酸来源如下所述。扩增可包括PCR,例如,使用对保守恒定区退火的引物,或另一种扩增方法。

[0272] 编码免疫球蛋白域的核酸可从免疫细胞中获得,例如,人、灵长类、小鼠、兔、骆驼、大羊驼或啮齿类动物的免疫细胞。在一个实例中,根据特定的性质选择细胞。可选择各个成熟阶段的B细胞。在另一个实例中,B细胞为幼稚的。

[0273] 在一个实施方案中,使用荧光激活细胞分选法(FACS)分选表达表面结合IgM、IgD、或IgG分子的B细胞。另外,可分离表达IgG不同的同种型的B细胞。在另一个实施方案中,在体外培养B或T细胞。可在体外刺激细胞,例如,通过与饲养细胞共同培养或通过加入促细胞分裂剂或其他调控试剂,比如抗CD40抗体、CD40配体或CD20、豆蔻酰佛波醇乙酯(phorbol myristate acetate)、细菌脂多糖、伴刀豆球蛋白A、植物凝集素、或商陆丝裂素(pokeweed mitogen)。

[0274] 在又一实施方案中,从患有自身免疫性病症的受治疗者中分离细胞,例如,系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎、血管炎、干燥综合征、系统性硬化症、或抗磷脂综合征。受治疗者可为人,或动物,例如,人类疾病的动物模型,或患有类似疾病的动物。在又一实施方案中,从包括人免疫球蛋白基因座的转基因非人类动物中分离细胞。

[0275] 在一个实施方案中,细胞已激活了体细胞高度突变的程序。可刺激细胞经历免疫球蛋白基因的体细胞诱变,例如,通过使用抗-免疫球蛋白、抗-CD40、和抗-CD38抗体进行处理(参见,例如,Bergthorsdottir等,2001,J. Immunol. 166:2228)。在一个实施方案中,细胞为幼稚的。

[0276] 可通过以下示例性方法从天然库中分离编码免疫球蛋白可变域的核酸。首先,从免疫细胞中分离RNA。将全长(即,加帽的)mRNA(例如,通过使用小牛肠磷酸酶降解未加帽的RNA)分离。然后使用烟草酸性焦磷酸酶去除帽并使用逆转录生成cDNA。

[0277] 可使用任何合适的引物以任何方式进行第一(反义)链的逆转录。参见,例如,de Haard等,1999,J. Biol. Chem. 274:18218-30。引物结合区在不同的免疫球蛋白中可为恒定的,例如,为了逆转录免疫球蛋白的不同同种型。引物结合区也可对免疫球蛋白的同种型具有特异性。通常,引物对编码至少一个CDR的3' 的区具有特异性。在一个实施方案中,可使用聚-dT引物(对于重链基因可为优选)。

[0278] 可将合成序列连接在逆转录链的3' 末端。该合成序列可用作在逆转录后的PCR扩增中结合正向引物的引物结合位点。使用合成序列可避免需要使用不同正向引物的集合来完全捕获可提供的多样性。

[0279] 然后将可变域编码基因扩增,例如,使用一轮或多轮。如果使用多轮,可使用嵌套引物来增加保真度。然后将扩增的核酸克隆到展示库载体中。

[0280] 第二筛选方法

[0281] 选择了结合于靶标的候选库成员以后,可对每个候选库成员进行进一步的分析,例如,进一步表征其对靶标的结合特性。每个候选库成员可进过一个或多个第二筛选检测。该检测可针对结合特性、催化特性、抑制特性、生理特性(例如,细胞毒性、肾清除、免疫原性)、结构特性(例如,稳定性、构象、寡聚状态)或另一种功能特性。可在变化的条件下重复使用同一检测,例如,用来确定pH、离子、或热敏感性。

[0282] 在合适的情况下,该检测可直接使用展示库成员,使用由编码所选多肽的核酸产

生的重组多肽,或使用根据所选多肽的序列合成的合成肽。示例性的针对结合特性的检测法包括以下所述。

[0283] ELISA.也可使用ELISA对选自表达库的抗体进行结合特性筛选。例如,将每个抗体与底部表面包被有靶标例如有限量的靶标的微量滴定平板接触。使用缓冲液清洗该平板以去除非特异性结合的多肽。然后使用识别测试抗体例如抗体的标签或恒定部分的抗体探检该平板来确定结合在平板上的抗体的量。在该检测抗体上连接例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶(HRP)的酶,其在提供合适的底物时产生比色产物。

[0284] 在抗体来自展示库的情形中,可从细胞中纯化该抗体或在展示库的形式下进行检测,例如,作为与丝状噬菌体外壳的融合。在另一种形式的ELISA中,选自表达库的每一个抗体被用于包被一个微量滴定平板的不同孔。然后使用恒定的靶标分子查询每个孔来进行ELISA。

[0285] 同质结合检测法.可使用同质检测法分析候选抗体和靶标的结合相互作用,即,在加入检测法的所有组分以后,不需要额外的流体操作。例如,荧光共振能量转移可用作同质检测法(参见,例如,Lakowicz等,第5,631,169号美国专利;Stavrianopoulos等,第4,868,103号美国专利)。如果第二分子在第一分子的附近,可选择在第一分子上(例如,在级分中鉴别出来的分子)的荧光团标记使得其发出的荧光能量能够被第二分子(例如,靶标)上的荧光标记吸收。第二分子上的荧光标记在吸收了转移的能量时发出荧光。由于在标记间转移能量的效率与分子间隔的距离相关,可对分子间的空间关系进行评估。在分子间发生结合的情况下,在检测中“接受者”分子标记的荧光发射应为最强。可以使用本领域内公知的标准荧光检测方法方便地测量(例如,使用荧光计)配置为使用FRET监测的结合事件。通过滴定第一或第二结合分子的量,可以生成用来估计平衡结合常数的结合曲线。

[0286] 另一个同质检测的实例为ALPHA SCREEN™(Packard Bioscience,Meriden CT)。ALPHA SCREEN™使用两种标记珠。当受到激光刺激的时候一种珠产生单线态氧。当单线态氧从第一种珠扩散并与另一种珠发生碰撞时,另一种珠产生光信号。只用当两种珠相接近的时候才能产生信号。可将一种珠附加在展示库成员上,另一种附加在靶标上。测量信号来确定结合的程度。

[0287] 同质检测可以在候选多肽附加于展示库媒介物例如细菌噬菌体的时候进行。

[0288] 表面等离子体共振 (SPR).可以使用SPR分析从表达库分离的分子和靶标之间的结合相互作用。SPR或生物分子相互作用分析(BIA)在不标记任何相互作用物的条件下实时检测生物特异性相互作用。BIA芯片上结合表面的质量改变(表示发生结合)导致接近该表面的光的折射率的改变(表面等离子体共振 (SPR) 的光学现象)。折射的改变产生了可检测的信号,将其作为分子之间的实时反应的指示进行测量。使用SPR的方法已有所描述,例如,在第5,641,640号美国专利中;Raether,1988,Surface Plasmons (表面等离子体),Springer Verlag;Sjolander和Urbaniczky,1991,Anal.Chem. 63:2338-2345;Szabo等,1995,Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705和由BIAcore International AB(Uppsala,Sweden)提供的在线资源。

[0289] SPR所得信息可用于提供对生物分子和靶标结合的平衡解离常数(K_d)和动力学参数,包括 $K_{结合}$ (K_{on})和 $K_{解离}$ (K_{off})的准确和定量的测量。所述数据可用于比较不同的生物分子。例如,可对选自表达库的蛋白进行比较来鉴别对靶标具有高亲和性或具有缓慢 $K_{解离}$ 的蛋白。

该信息也可用于开发结构-活性关系(SAR)。例如,可将亲代蛋白的成熟版本的动力学和平衡结合参数与该亲代蛋白的参数进行比较。可以鉴别所给位置上与特定结合参数相关的变异氨基酸,所述结合参数例如,高亲和性和缓慢 $K_{\text{离解}}$ 。可将该信息与结构建模结合(例如,使用同源建模,能量最小化,或使用x-射线晶体学或NMR 确定结构)。由此,可以提出对该蛋白和其靶标之间的物理相互关系的理解,并用于指导其他设计过程。

[0290] 细胞检测法,可在瞬时或稳定表达并在细胞表面展示所感兴趣的靶标的细胞中对候选抗体库(例如,先前通过展示库或其他方法鉴别的)进行靶标结合筛选。例如,靶标可包括载体核酸序列,该载体核酸序列包括只编码多肽的胞外部分的区段,从而使得嵌合靶标多肽在细胞内生成,从细胞分泌,或通过锚附加到细胞表面,例如,与膜锚定蛋白比如Fc融合。细胞表面表达靶标可用于筛选结合于FcRn并阻断IgG-Fc结合的抗体。例如,可将非特异性人IgG-Fc进行荧光标记并且通过使用流式细胞术(例如,FACS 仪器)检测荧光强度的改变以检测其在存在或不存在拮抗性抗体的情况下与FcRn的结合。

[0291] 获得FcRn-结合抗体的其他方法

[0292] 除了使用展示库,也可采用其他方法获得FcRn-结合抗体。例如,FcRn蛋白或其区域可在非人类动物中,例如,啮齿类动物中,用作抗原。

[0293] 在一个实施方案中,该非人类动物包括人免疫球蛋白基因的至少一部分。例如,可能使用大片段的人Ig基因座将具有小鼠抗体生产缺陷的小鼠品系进行工程化。通过使用杂交瘤技术,可生成和选择源自所述基因的具有所需特异性的抗原特异性单克隆抗体(Mab)。参见,例如,XENOMOUSETM,Green等,1994,Nat.Gen.7:13-21;U.S. 2003-0070185,1996年10月31日公布的W096/34096,和递交于1996年4月29日的第PCT/US96/05928号PCT申请。

[0294] 在一个实施方案中,由非人的动物中获得单克隆抗体,并对其进行修饰,例如,人源化或去免疫化(deimmunized)。Winter描述了一种可用于制备人源化抗体的CDR嫁接方法(递交于1987年3月26日的英国专利申请GB 2188638A;第5,225,539号美国专利。特定的人抗体的所有CDR均可被非人CDR的至少一部分替代或者仅一些CDR 可被非人的CDR替代。仅需要将人源化抗体与预定的抗原结合所需的数量的CDR替换。

[0295] 可通过使用人Fv可变区的等效序列替换不直接涉及抗原结合的Fv可变区的序列来制备人源化抗体。制备人源化抗体的一般方法已由Morrison,S.L.,1985,Science 229:1202-1207,Oi等,1986,BioTechniques 4:214,和Queen等在第5,585,089号,第5,693,761号和第5,693,762号美国专利中提供。这些方法包括分离、操作、和表达编码源自重链或轻链中的至少一个的全部或部分免疫球蛋白Fv可变区的核酸序列。所述核酸的来源为本领域内技术人员所熟知,并且例如,如上所述,可以从产生抗预定靶标的抗体的杂交瘤中获得。编码人源化抗体或其片段的重组DNA然后可克隆进入合适的表达载体。

[0296] 还可通过特异性缺失人T细胞表位或通过公开在W0 98/52976和W0 00/34317(其内容通过引用明确并入本文)中的“去免疫化”方法对FcRn-结合抗体进行修饰。简要地,可通过对抗体的重链和轻链可变区分析找到结合于MHC II类的肽;这些肽代表可能的T细胞表位(如W0 98/52976和W0 00/34317中所定义)。为了检测可能的T-细胞表位,可使用被称为“肽线程(peptide threading)”的计算机建模方法,并且另外可以在人MHC II类结合肽的数据库中搜索VH和VL序列中存在的基序,如W0 98/52976和W0 00/34317中所述。这些基

序与18种主要MHC II类DR异型的任何一种结合,并因此构成可能的T细胞表位。可通过在可变区替换少量的氨基酸残基或单个氨基酸替换来除去检测到的可能的T-细胞表位。只要进行了可能的保守替代,常常但是不排除其他情况,可使用在人种系抗体序列中此位置的共同氨基酸。人种系序列在 Tomlinson, I. A. 等, 1992, J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G. P. 等, 1995, Immunol. Today 第16 (5) 卷: 237-242; Chothia, D. 等, 1992, J. Mol. Bio. 227: 799-817中公布。V BASE目录提供了人免疫球蛋白可变区序列的综合目录(由Tomlinson, I. A. 等汇编, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK)。在鉴别去免疫化改变以后,可通过诱变或其他合成方法构建编码V_H和V_L的核酸(例如,从头合成,盒式替代等)。诱变的可变序列可任选地融合到人恒定区,例如,人IgG1或κ恒定区。

[0297] 在某些情况下,可能的T细胞表位将包括已知或预期将对抗体功能重要的残基。例如,可能的T细胞表位通常倾向于CDR。另外,可能的T细胞表位可发生在对抗体的结构和结合重要的框架残基中。删除这些可能表位的改变在某些情况下将需要更仔细的检查,例如,通过生成和检测具有改变和不具改变的链。在可能的情况下,通过CDR 外的替代将与CDR重叠的可能的T细胞表位删除。在某些情况下,在CDR内的改变为仅有的选项,因此应该测试具有该替代或不具有该替代的变异体。在其他情况下,除去可能的T细胞表位所需的替代位于可能对抗体结合至关重要的框架中的残基位置上。在这些情况下,应该测试具有该替代或不具有该替代的变异体。因此,在某些情况下,为了鉴别最佳的去免疫化抗体,设计多个变异的去免疫化重链和轻链可变区并测试各种重/轻链组合。然后可通过考虑不同变异体的结合亲和性以及去免疫化程度(即,保留在可变区的可能的T细胞表位的数量)对最终去免疫化抗体作出选择。可使用去免疫化来修饰任何抗体,例如,包括非人序列的抗体,例如,合成抗体、鼠抗体、其他非人的单克隆抗体、或由展示库分离的抗体。

[0298] 种系抗体。

[0299] 用于治疗IgG-介导的自身免疫性疾病的抗体可用于多种施用。可能降低治疗抗体的免疫原性的预防措施包括将框架区内的一个或多个非种系氨基酸恢复为该抗体(特别是Fab)的相应种系氨基酸(例如,只要大致保留结合性质)。

[0300] 可对结合FcRn的抗体例如本文中所述抗体进行修饰,以使得该抗体的可变区与一种或多种种系序列更相似。例如,抗体可包括例如在框架区、CDR、或恒定区的一个、两个、三个、或更多的氨基酸替代,以使其与参考种系序列更相似。一种示例性种系化的方法可包括鉴别与分离抗体的序列相似的一种或多种种系序列(例如,在特定数据库中最相似的)。然后可在分离抗体中增量进行或与其他突变结合进行突变(在氨基酸水平上)。例如,生成包括编码一些或全部可能的种系突变的序列的核酸库。然后对突变抗体进行评估,例如,鉴别相对于分离的抗体具有一个或多个额外种系残基并仍然可用(例如,具有功能性活性)的抗体。在一个实施方案中,将尽可能多的种系残基导入分离的抗体中。

[0301] 在一个实施方案中,使用诱变向框架和/或恒定区替代或插入一个或多个种系残基。例如,种系框架和/或恒定区残基可来自与被修饰的非可变区相似(例如,最相似)的种系序列。经过诱变之后,可对抗体的活性(例如,结合或其他功能活性)进行评估以确定种系残基是否被耐受(即,不取消活性)。可在框架区进行相似的诱变。

[0302] 可通过不同方法选择种系序列。例如,可选择达到预定的选择性或相似性标准的种系序列,例如,至少一定百分比的同一性,例如,至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、

97、98、99、或99.5%同一性。可使用至少2、3、5、或10种种系序列进行选择。对于CDR1和CDR2,鉴别相似的种系序列可包括选择一种所述序列。对于 CDR3,鉴别相似的种系序列可包括选择一种所述序列,但可包括使用分别提供氨基末端部分和羟基末端部分的两种种系序列。在其他实施中,使用多于一种或两种的种系序列,例如,形成共有序列。

[0303] 在一个实施方案中,对于特定的参考可变域序列,例如,本文中所述序列,相关可变域序列具有至少30、40、50、60、70、80、90、95或100%与参考CDR序列中的残基,即与人种系序列(即,由人种系核酸编码的氨基酸序列)中相应位置残基相同的残基,不相同的CDR氨基酸位置。

[0304] 在一个实施方案中,对于特定的参考可变域序列,例如,本文中所述序列,相关可变域序列具有至少30、50、60、70、80、90或100%的与人种系序列的FR序列相同的FR区,所述人种系序列例如,与参考可变域序列相关的种系序列。

[0305] 相应的,可分离与所感兴趣的所给的抗体具有相似活性的,但是与一种或多种种系序列、特别是一种或多种人种系序列更相似的抗体。例如,抗体可与种系序列在CDR 以外的区(例如,框架区)至少90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、或99.5%相同。进一步,抗体在CDR区可包括至少1、2、3、4、或5个种系残基,该种系残基来自与被修饰的可变区相似(例如,最相似)的种系序列。最让人感兴趣的种系序列为人种系序列。抗体的活性(例如,结合活性)可在原始抗体的100、10、5、2、0.5、0.1、和0.001因数范围内。

[0306] V_k 的示例性种系参考序列包括:012/02、018/08、A20、A30、L14、L1、L15、L4/18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、011/01、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10、和A14。参见,例如, Tomlinson等,1995,EMBO J.14(18):4628-3。

[0307] HC可变域的种系参考序列可基于具有特定标准结构的序列,例如,H1和H2高变环中的1-3个结构。可根据其序列推断免疫球蛋白可变域的高变环的标准结构,如 Chothia等,1992,J.Mol.Biol.227:799-817;Tomlinson等,1992,J.Mol.Biol. 227:776-798);以及 Tomlinson等,1995,EMBO J.14(18):4628-38中所述。具有1-3个结构的示例性序列包括:DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53和DP-54。

[0308] 配体生成

[0309] 可使用标准重组核酸方法表达结合于FcRn的抗体。一般情况下,将编码抗体的核酸序列克隆进入核酸表达载体上。当然,如果该抗体包括多个多肽链,可将每条链克隆进入在相同或不同细胞中表达的表达载体,例如,相同或不同载体。

[0310] 抗体生成。某些抗体,例如,Fab,可在细菌细胞中生成,例如,大肠杆菌细胞。例如,如果Fab由在展示实体和细菌噬菌体蛋白(或其片段)之间包括可遏制的终止密码子的噬菌体展示载体中的序列编码,则可将该载体核酸转移到不能遏制终止密码子的细菌细胞中。在该情况下,Fab不融合入基因III蛋白并将被分泌到周质和/或培养基中。

[0311] 也可在真核细胞中生成抗体。在一个实施方案中,将抗体(例如,scFv)在酵母细胞比如毕赤酵母(Pichia)(参见,例如,Powers等,2001,J.Immunol.Methods. 251:123-35)、汉逊酵母(Hansenula)、或酿酒酵母(Saccharomyces))中表达。

[0312] 在一个实施方案中,在哺乳动物细胞中生成抗体。用于表达克隆抗体或其抗原结

合片段的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,在 Urlaub 和 Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 中描述,与 DHFR 选择性标记一起使用,例如,如 Kaufman 和 Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621 中所述),淋巴细胞系,例如, NS0 骨髓瘤细胞和 SP2 细胞, COS 细胞,和来自转基因动物例如转基因哺乳动物的细胞。例如,该细胞为乳腺上皮细胞。

[0313] 除了编码多样的免疫球蛋白域的核酸序列,重组表达载体可能携带有其他的序列,比如在宿主细胞中调控载体复制的序列(例如,复制起点)和选择性标记基因。选择性标记基因有助于对载体导入的宿主细胞进行选择(参见例如,第 4,399,216 号、第 4,634,665 号和第 5,179,017 号美国专利)。例如,通常选择性标记基因对导入载体的宿主细胞赋予对药物比如 G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于使用甲氨蝶呤选择/扩增的 dhfr⁻宿主细胞)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

[0314] 在抗体或其抗原结合部分的重组表达的示例性系统中,使用磷酸钙介导的转染将编码抗体重链和抗体轻链二者的重组表达载体导入 dhfr⁻CHO 细胞中。在重组表达载体中,抗体重链和轻链基因各自可操作地连接到增强子/启动子调控元件上(例如,来自 SV40, CMV、腺病毒等,比如 CMV 增强子/AdMLP 启动子调控元件或 SV40 增强子/AdMLP 启动子调控元件)以驱使该基因的高水平转录。重组表达载体也携带 DHFR 基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增已经转染的 CHO 细胞。培养所选的转化宿主细胞使得抗体重链和轻链得以表达并从培养基中回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体,转染宿主细胞,选择转化体,培养宿主细胞并从培养基中回收抗体。例如,一些抗体可使用带有蛋白 A 或蛋白 G 偶联的基质的亲和性色谱法分离。

[0315] 对于包括 Fc 域的抗体,抗体生产系统可生产其中 Fc 区被糖基化的抗体。例如,在 CH2 域的天冬酰胺 297 将 IgG 分子的 Fc 域糖基化。该天冬酰胺为双触角型低聚糖修饰位点。已证明该糖基化为 Fcγ 受体和补体 C1q 介导的效应功能所必需的(Burton and Woof, 1992, Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis 等, 1998, Immunol. Rev. 163:59-76)。在一个实施方案中,在正确地糖基化相应于天冬酰胺 297 残基的哺乳细胞表达系统中生成 Fc 域。Fc 域还可包括其他真核翻译后修饰。

[0316] 也可在转基因动物中生成抗体。例如,第 5,849,992 号美国专利描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建包括乳汁特异性启动子和编码感兴趣的抗体以及分泌信号序列的核酸的转基因。所述转基因哺乳动物的雌性生产的乳汁包括分泌于其中的感兴趣的抗体。可从乳汁中直接纯化抗体,或者在一些应用中,直接使用乳汁。

[0317] 一种生成转基因小鼠的方法如下。简要地,将编码抗体的靶标构建体微注射进入受精卵母细胞的雄性原核中。将该卵母细胞注射进入假怀孕养母的子宫内使之发育成为成活的幼鼠。一些后代中嵌有该转基因。

[0318] FcRn 候选抗体的检测系统

[0319] 可在测量 FcRn 候选抗体对 FcRn 或其片段的调控活性的体外或体内检测法中对它们进行进一步表征。例如,可在允许 FcRn 与底物反应的检测条件下将 FcRn 与底物比如非特异性 IgG 或 IgG 的 Fc 部分或白蛋白结合。在不存在 FcRn 候选抗体的情况下进行检测法,也在存在浓度升高的 FcRn 候选抗体的情况下进行检测法。使得 50% 的 FcRn 活性(例如,与底物结合)被候选抗体抑制的候选抗体的浓度为该抗体的 IC₅₀ 值(抑制浓度 50%)或 EC₅₀(有效浓度

50%)值。在一系列或者一组候选抗体中,具有较低 IC_{50} 或 EC_{50} 值的抗体被认为是比具有较高 IC_{50} 或 EC_{50} 值的抗体更有效的FcRn抑制剂。在一些实施方案中,如在FcRn活性的抑制的体外检测中测量的,抗体具有800nM、400nM、100nM、25nM、5nM、1nM、或更低的 IC_{50} 值。

[0320] 也可对候选抗体对FcRn的选择性进行评估。例如,可检测FcRn候选抗体对FcRn 和一组细胞表面受体的效力,比如也使用 $\beta 2M$ 域的受体,并可确定每个受体蛋白的 IC_{50} 值或 EC_{50} 值。在一个实施方案中,表现出对FcRn具有低 IC_{50} 值或 EC_{50} 值,并对测试组中的其他受体(例如,MHC I类分子)表现出较高 IC_{50} 值或 EC_{50} 值的复合物被认为对FcRn具有选择性。

[0321] 间接体内(ex vivo)表达内源性FcRn的内皮细胞或上皮细胞可用于在不同的pH和温度条件下追踪候选抗体的胞饮作用或穿胞运输。IgG的穿胞运输或经过FcRn的回收可通过在存在或不存在各种化学物和已知将改变或影响细胞内运输通路的不同的条件下追踪经过标记的抗体来测量。

[0322] 可使用pH依赖型和独立型FcRn-结合抗体在大鼠,小鼠,或猴中进行药物动力学研究以确定其在血清中的半衰期。同样地,可在体内评估该抗体的保护性效应以用于可能的免疫调节疗法或通过在存在或不存在标记了的IgG或标记了的IgG的Fc部分的条件下注射该抗体用作抢救免疫疗法。在存在候选抗体的条件下标记了的IgG/Fc的半衰期的缩短是该抗体的治疗效能的指示。

[0323] 药物组合物

[0324] 在另一方面,本公开提供组合物,例如,包括FcRn-结合抗体的药学上可接受的组合物或药物组合物。FcRn结合抗体可与药学上可接受的载体一起配制。药物组合物包括治疗组合物和诊断组合物,例如,包括用于体内成像的标记了的FcRn结合抗体的组合物。

[0325] 药学上可接受的载体包括任何和全部溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂、以及生理上相容的类似剂。优选地,该载体适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊椎、或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径的不同,可在FcRn结合抗体上包被材料以保护该化合物免受酸或其他可能灭活该化合物的自然条件的作用。

[0326] 药学上可接受的盐为保留了所需的母化合物的生物活性并且不具有任何不需要的毒理效应的盐(参见例如,Berge,S.M.,等,1977,J.Pharm.Sci.66:1-19)。所述盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸,比如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸及类似无机酸的盐,以及衍生自无毒有机酸比如脂肪族单元和二元酸、苯基取代烷酸、羟基烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸及类似有机酸的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属,比如钠、钾、镁、钙和类似金属的盐,以及衍生自无毒有机胺,比如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因和类似有机胺的盐。

[0327] 组合物可有各种形式。这些包括,例如,液体,半固体和固体剂型,比如液体溶液(例如,可注射用和可输注用的溶液),分散液或悬浮液、片剂、丸、粉末、脂质体和栓剂。形式可取决于预期的施用模式和治疗应用。许多组合物为可注射或可输注的溶液的形式,比如与向人体施用的抗体相似的组合物。示例性的施用模式为肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一个实施方案中,通过静脉内输注或注射施用FcRn结合抗体。在另一实施方案中,通过肌肉内或皮下注射施用FcRn结合抗体。

[0328] 组合物可配制成为溶液、微型乳剂、分散液、脂质体、或适用于高药物浓度的其他

有序结构。可通过将活性化合物(即,配体)以所需的量掺入合适的溶剂以及如果需要,以上列举的一种成分或成分的组合,随后过滤灭菌来配置无菌的可注射用的溶液。一般情况下,通过将活性化合物掺入包含基本分散介质和来自以上所列举的那些的所需的其他成分的无菌媒介物中来制备分散液。对于用于制备无菌的可注射用的溶液的无菌粉末,制备方法为真空干燥和冷冻干燥以产生活性成分和来自其预先无菌过滤的溶液的任何其他所需成分的粉末。可通过,例如,使用比如卵磷脂的包衣,在分散液的情形中维持所需的粒度和使用表面活性剂,来维持溶液的合适的流动性。可通过在组合物中包括延缓吸收的剂,例如,单硬脂酸盐和明胶,来产生可注射的组合物延长吸收。

[0329] 可使用多种本领域内已知的方法施用FcRn-结合抗体,尽管在很多应用中,施用的途径/模式为静脉内注射或输注。例如,在治疗性应用中,可通过静脉内输注以小于30、20、10、5、或1mg/min的速率达到大约1到100mg/m²或7到25mg/m²的剂量来施用FcRn结合抗体。施用的途径和/或模式将根据所需的结果变化。在某些实施方案中,可使用保护该化合物以防其迅速释放的载体一起配置活性化合物,比如控释制剂,包括植入物,和微囊输送系统。可使用可生物降解的、生物相容性聚合物,比如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、多正脂、和聚乳酸。许多制备所述制剂的方法已获得专利或是通常已知的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (缓释和控释药物输送系统), J.R. Robinson编辑, 1978, Marcel Dekker, Inc., New York。

[0330] 在某些实施方案中,可口服施用抗体,例如,使用惰性稀释剂或可同化的食用载体。也可将化合物(如果需要,以及其他成分)装入硬壳或软壳明胶胶囊,压制成片剂,或直接掺入受治疗者的饮食中。对于口服治疗性施用,可将化合物掺入赋形剂并以可摄取的片剂、含片、锭剂、胶囊、药酒、悬浮液、糖浆、薄片(wafer)和类似形式使用。为了通过除肠胃外施用的其他方式施用本文中公开的化合物,可能有必要使用防止其失活的物质将化合物包被或一起共施用。

[0331] 可使用本领域内已知的医疗设备施用药物组合物。例如,在一个实施方案中,可使用设备例如无针皮下注射装置、泵、或植入物来施用本文中公开的药物组合物。

[0332] 在某些实施方案中,可将FcRn结合抗体配制以保证体内的合理分布。例如,血脑屏障(BBB)阻止许多高度疏水的化合物。为了保证本文公开的治疗化合物跨越BBB(如果需要),可将其配制,例如,在脂质体中。生产脂质体的方法,参见,例如,第4,522,811号;第5,374,548号;和第5,399,331号美国专利。脂质体可包括选择性运输到特定细胞或器官的一个或多个部分,由此增强靶定药物的递送(参见,例如, V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685)。

[0333] 将给药方案进行调整以达到最佳的预期反应(例如,治疗性反应)。例如,可施用单次推注,可在一段时间内施用多个分开的剂量或者可以根据治疗情况的紧急需要适当的降低或升高剂量。将肠胃外组合物配制成为剂量单位的形式对方便施用和统一剂量非常有利。本文中所用的剂量单位形式指适于对受治疗对象统一给药的物理上离散的单位;每个单位包括经过计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物加上所需的药物载体。剂量单位的规格可受支配和直接依赖于(a)该活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果,以及(b)本领域内复合此类用于治疗个体敏感性的活性化合物的固有的局限性。

[0334] 本文中公开的抗体的治疗或预防有效量的示例性,无限制的范围为0.1-20mg/kg,

或1-10mg/kg。可通过,例如,静脉内输注,施用抗FcRn抗体,例如,以小于30、20、10、5、或1mg/min的速度达到大约1到100mg/m²或大约5到30mg/m²的剂量。剂量值可根据待缓解的疾病类型和严重性变化。对于特定的受治疗者,可根据个体需要和施用该组合物的人或监督人员的专业判断调整特定的给药方案。

[0335] 本文公开的药物组合物可包括治疗有效量或预防有效量的本文公开的FcRn结合抗体。“治疗有效量”指在必须的剂量和时间内有效达到预期治疗结果的量。组合物的治疗有效量可根据比如疾病状态、年龄、性别和个体体重以及该抗体在个体中引发预期反应的能力等因素变化。治疗有效量也指当该组合物的治疗的有益的效果超过其任何毒性或有害效果的量。

[0336] 稳定和滞留

[0337] 在一个实施方案中,在FcRn结合抗体上物理附加了在循环中增强其稳定和/或滞留的部分,例如,在血液、血清、淋巴或其他组织中,例如,至少增强1.5、2、5、10、或50倍。例如,可在FcRn结合抗体上附加聚合物,例如,本质上非抗原性聚合物,比如聚亚烷基氧化物或聚乙烯氧化物。合适的聚合物将在重量上有本质不同。可使用分子数平均重量的范围在大约200到大约35,000(或大约1,000到大约15,000,和2,000到大约12,500)的聚合物。例如,可将FcRn结合抗体与可溶于水的聚合物轭合,例如,亲水性聚氯乙烯聚合物,例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。所述聚合物的非限制性名单包括聚亚烷基氧化均聚物比如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、及其共聚物和嵌段共聚物,条件是保持嵌段共聚物的水溶性。

[0338] 药盒

[0339] 可在药盒中提供本文中所述FcRn-结合抗体,例如,作为药盒的组分。例如,该药盒包括(a)FcR-结合抗体,例如,包括FcRn结合抗体的组合物,以及,可选性地包括(b)信息材料。信息材料可为描述性、指导性、宣传性或其他与本文中所述的方法和/或使用FcR-结合抗体用于本文中所述的方法的材料。

[0340] 药盒的信息材料的形式不限。在一个实施方案中,信息材料可包括关于化合物的生产、化合物分子量、浓度、失效期、批次或生产地点等的信息。在一个实施方案中,信息材料与使用抗体进行治疗、预防、或诊断本文中所述的病症例如自身免疫性病症相关。

[0341] 在一个实施方案中,信息材料可包括对以合适的方式施用FcRn-结合抗体以进行本文中所述方法的说明,例如,以合适的剂量、剂型、或施用模式(例如,本文中所述的剂量、剂型、或施用模式)。在一个实施方案中,信息材料可包括向合适的受治疗者施用FcR-结合抗体的说明,所述受治疗者例如,人,例如,患有或具有患自身免疫性病症(例如,类风湿关节炎或系统性红斑狼疮)的风险的人。例如,该材料可包括向患有狼疮的患者或患有另一种自身免疫性病症的患者施用FcRn-结合抗体的说明。

[0342] 药盒的信息材料的形式不限。在很多情况下,信息材料,例如,说明书,以印刷品形式提供,例如,印刷的文本,绘图和/或照片,例如,标签或印刷页。然而,信息材料也可以其他形式提供,比如计算机可读材料,录像或录音。在一个实施方案中,药盒的信息材料为联系信息,例如,物理地址,email地址,网页,或电话号码,通过这些联系信息药盒的使用者可获得大量的关于FcR-结合抗体和/或其在本文中所述的方法中的使用的信息。当然,还可以形式的任何组合提供信息材料。

[0343] 除了FcRn-结合抗体,药盒的组合物可包括其他成分,比如溶剂或缓冲液、稳定剂、防腐剂、调味剂(例如,苦味拮抗剂或甜味剂)、香味剂或其他装饰性原料,和/或用于治疗本文中所述的自身免疫性病症(例如,类风湿关节炎或系统性红斑狼疮)的第二剂。可选择地,药盒中也可包括其他成分,但是与FcRn-结合抗体在不同的组合物或容器内。在所述实施方案中,药盒可包括将FcRn-结合抗体与其他成分混合的说明,或将FcRn-结合抗体与其他成分一起使用的说明。

[0344] 可以任何形式提供FcRn-结合抗体,例如,液体,干燥或冻干的形式。优选FcRn-结合抗体为大致纯和/或无菌的。当在液体溶液提供FcRn-结合抗体时,该液体溶液最好为水溶液,无菌水溶液为最佳。当以干燥的形式提供FcRn-结合抗体时,通常通过加入合适的溶剂重建抗体。溶剂,例如,无菌水或缓冲液,可选择性地在药盒中提供。

[0345] 药盒可包括包含FcRn-结合抗体的组合物中的一个或多个容器。在某些实施方案中,药盒包括分开的容器,分隔物或区室用于组合物和信息材料。例如,组合物可装在瓶、管瓶、或注射器中,而信息材料可装载塑料袋或包中。在其他实施方案中,药盒的各个元素都包含在单独的没有分隔的容器内。例如,组合物包含在瓶、管瓶或注射器中并在其上附有标签形式的信息材料。在一些实施方案中,药盒包括多个(例如,一盒)单独的容器,每个包括FcRn-结合抗体的一个或多个单位剂型(例如,本文中所述的剂型)。例如,药盒包括多个注射器、安瓿、铝箔包或吸塑包装,每个均包含单独单位剂量的FcRn-结合抗体。药盒的容器可为密封、防水(例如,在潮湿或蒸发的改变下不透水)、和/或不透光。

[0346] 药盒任选地包括适用于施用组合物的装置,例如,注射器、吸入器、移液器、镊子、量勺、滴管(例如,眼滴管)、药签(例如,棉药签或木药签)、或任何此类递送装置。在一个实施方案中,该装置为分发抗体的计量剂量的可植入装置。本公开也以一种提供药盒的方法为特征,例如,通过组合本文所述的组分。

[0347] 治疗

[0348] 通过本文所述和/或详述方法鉴别的结合FcRn的抗体具有治疗和预防功用。可将这些抗体施于受治疗者用来治疗、预防、和/或诊断多种病症,包括自身免疫性病症,或者甚至施用于培养中的细胞,例如,体外或间接体内。

[0349] 术语“治疗”可指在统计上显著的程度或在本领域内技术人员可检测的程度或以对缓解疾病,症状或疾病相关的参数或防止疾病的发展有效的量,形式和/或模式施用疗法。有效的量、形式、或模式可根据受治疗者改变并可根据受治疗者定制。受治疗者可为人或非人的动物,例如,非人的哺乳动物。

[0350] 可以治疗有效量施用FcRn-结合抗体,例如,由此当对受治疗者施用单独或多剂量时,该受治疗者表现出疾病症状,例如,自身免疫性病症(例如,类风湿关节炎或系统性红斑狼疮)或表明存在疾病或患病风险的参数的改善。

[0351] 示例性的影响体内许多器官或局部器官的疾病包括:多发性硬化症、类风湿关节炎、炎性肠病(IBM)、狼疮、和强直性脊柱炎。对一些疾病讨论如下。在一个方面,本发明提供了治疗癌症的方法。其他可以使用FcRn-结合抗体治疗的疾病包括:硬皮病、干燥综合征、古德帕斯蒂尔综合征、韦格纳肉芽肿、风湿性多肌痛、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)、自身免疫性血小板减少性紫癜

(ATP)、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳综合征性免疫缺陷综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、CREST 综合征、克罗恩病、Dego's 病、皮炎、儿童皮炎、盘状红斑狼疮、原发性混合冷球蛋白血症、纤维肌痛、纤维肌炎、甲状腺机能亢进、格林巴利综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病、胰岛素依赖型糖尿病 (I 型)、青少年关节炎、美尼尔氏症、混合性结缔组织病、重症肌无力、寻常性天疱疮、落叶性天疱疮、副肿瘤性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎、皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、雷诺氏现象、瑞特综合征、风湿热、结节病、僵人综合征、大动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风。

[0352] 在某些实施方案中,施用抗-FcRn 结合抗体来从血流中排出不需要的治疗抗体。

[0353] 在某些实施方案中,施用抗-FcRn 结合抗体来抑制抗-HLA 抗体的水平。在某些实施方案中抑制抗-HLA 抗体的水平与器官移植相关。

[0354] 施用 FcRn-结合抗体的方法在“药物组合物”中有所描述。所用分子的合适的剂量将依赖于受治疗者的年龄、体重和所用的特定药物。抗体可用作抑制或减轻不需要的相互作用的竞争剂,例如,天然或病理剂和 FcRn 之间的相互作用。

[0355] FcRn-结合抗体可用于递送大分子或微分子,例如,将基因递送入细胞用于基因疗法,进入内皮或上皮并仅仅靶定于表达 FcRn 的组织。抗体可用于递送多种细胞毒性药物包括治疗性药物、发射辐射的化合物、植物、真菌或细菌来源的分子、生物蛋白、及其混合物。细胞毒性药物可为胞内作用的细胞毒性药物,比如短距离辐射发射物,包括,例如,短距离,高能量 α 发射物,如本文中所述。

[0356] 在多肽毒素的情况下,重组核酸技术可用于构建作为翻译融合的编码抗体和细胞毒素(或其多肽组分)的核酸。然后表达该重组核酸,例如,在细胞中,并将所编码的融合多肽分离。

[0357] 另外,可将 FcRn-结合抗体连接到高能量发射物上,例如,放射性同位素,比如 γ -发射物 ^{131}I ,当其位于某位点时,在多个细胞直径的范围内导致细胞死亡。参见,例如, S.E.Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy (对在癌症疗法中放射性标记的抗体的治疗用途的分析、结果、和未来展望)", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy (用于癌症检测和治疗的单克隆抗体), R.W.Baldwin 等(编辑), 第303-316页 (Academic Press 1985)。其他合适的放射性同位素包括 α 发射物,比如 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、和 ^{211}At , 和 β 发射物,比如 ^{186}Re 和 ^{90}Y 。而且, ^{177}Lu 也可用作成像和细胞毒性剂。

[0358] 使用 ^{131}I 、 ^{90}Y 、和 ^{177}Lu 标记的抗体的放射性免疫疗法 (RIT) 正在经历紧张的临床研究。这三种核素在物理特性上具有显著区别,因此为了向所感兴趣的组织递送最高辐射量,放射核素的选择非常关键。 ^{90}Y 的较高能量的 β -粒子可能对大体积的肿瘤为佳。 ^{131}I 的相对低能量的 β -粒子为理想情况,但是对于内在化抗体,一个主要缺点为放射碘化的分子的体内脱卤反应。相反, ^{177}Lu 具有只有0.2-0.3mm范围的低能量 β -粒子并且相对于 ^{90}Y 向骨髓递送低得多的辐射剂量。此外,由于较长的物理半衰期(相对 ^{90}Y),其滞留期较长。因此,可施用 ^{177}Lu 标记的较高活性(更多mCi量)的剂而对骨髓具有相对较少的辐射剂量。已有几项临床研究调查了在多种癌症的治疗中使用 ^{177}Lu 标记的抗体 (Mulligan T等,1995, Clin.Canc.Res.1:

1447-1454;Meredith RF,等,1996, J.Nucl.Med.37:1491-1496;Alvarez RD,等,1997, Gynecol.Oncol.65:94-101)。

[0359] 使用治疗性方法治疗自身免疫有很多好处。由于抗体特异性的识别FcRn,可不影响其他组织并将高水平的剂直接递送到需要治疗的位点。可根据临床参数有效的监测治疗。另外,这些参数可用于指示需要使用所述治疗的时间。

[0360] FcRn-结合抗体可与一种或多种现有的用于治疗自身免疫性病症的方式一起施用,包括但不限于:静脉内IgG疗法;非类固醇抗炎药物(NSAID);皮质类固醇;环孢菌素、雷帕霉素或子囊霉素,或其免疫抑制类似物,例如,环孢菌素A、环孢菌素G、FK-506、雷帕霉素、40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素等;环磷酸胺;硫唑嘌呤;甲氨蝶呤;布喹那;FTY720;来氟米特;咪唑立宾,霉酚酸,霉酚酸酯,15-脱氧精脒菌素;免疫抑制性单克隆抗体,例如,白细胞受体的单克隆抗体,例如,MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD25、CD28、B7、CD45、或CD58或其配体;或其他免疫调节化合物,例如:CTLA4Ig;或其他粘附分子抑制剂,如mAb或低分子量抑制剂,包括选择蛋白拮抗剂和VLA-4拮抗剂。这些结合疗法可为免疫调节方案或者用于治疗或预防异体或异种移植急性或慢性排斥反应、炎症疾病、或自身免疫性病症的方案中的一部分。

[0361] 多发性硬化

[0362] 多发性硬化(MS)为一种以髓鞘的炎症和丧失为特征的中枢神经系统疾病。

[0363] 患有MS的患者可通过MS诊断的研讨会确定的建立临床确诊MS的诊断的标准来鉴别(Poser等,Ann.Neurol.13:227,1983)。也可通过两次发作和脑脊液里的IgG寡克隆带或者通过一次发作、两种病变的临床证据和脑脊液里的IgG寡克隆带的组合来诊断MS。McDonald标准也可用于诊断MS。McDonald等(2001)Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis:guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis(多发性硬化的推荐诊断标准:来自关于多发性硬化诊断的国际小组的准则),Ann Neurol 50:121-127。McDonald标准包括在不存在多次临床发作的情况下,使用随着时间的推移CNS损伤的MRI证据诊断MS。

[0364] 可通过多种不同方法对多发性硬化的有效治疗进行评估。以下参数可被用于判断治疗的有效性。两项示例性标准包括:EDSS(扩展残疾状态量表),和在MRI(磁共振成像)上的表现加重。EDSS为一种对由于MS造成的临床损伤分级的方法(Kurtzke, Neurology 33:1444,1983)。对八个功能性系统进行了神经损伤的类型和严重性的评估。简要地,在治疗之前,对患者进行了以下系统的损伤的评估:锥体、小脑、脑干、感官、肠和膀胱、视觉、大脑和其他。以一定的时间间隔进行随访。该量表的范围为0(正常)到10(MS引发的死亡)。下降一个完整的量度可意味着有效的治疗(Kurtzke,Ann.Neurol. 36:573-79,1994)。

[0365] 示例性的可通过本文所述的方法治疗的多发性硬化相关的症状包括:视神经炎、复视、眼球震颤、眼辨距障碍、核间眼肌麻痹、运动和声音幻视、瞳孔传入缺陷、麻痹、单肢轻瘫、轻截瘫、偏瘫(hemiparesis)、四肢轻瘫、瘫痪、截瘫(paraplegia)、半身不遂(hemiplegia)、四肢瘫痪(tetraplegia)、四肢麻痹(quadraplegia)、强直、构音障碍、肌肉萎缩、抽搐、痉挛、肌无力、阵挛、肌阵挛、肌纤维颤搐、不安腿综合征、足下垂、反射功能失调、感觉异常、麻醉、神经痛、神经病性和神经性疼痛、莱尔米特征(l'hermitte's)、本体感觉障碍、三叉神经痛、共济失调、意向性震颤、辨距障碍、前庭性共济失调、眩晕、言语共济失

调、肌张力障碍、轮替动作障碍、频繁排尿、膀胱痉挛、弛缓性膀胱、逼尿肌括约肌协同失调、勃起功能障碍、性感缺失、性冷淡、便秘、粪便的紧迫性、粪便失禁、抑郁症、认知障碍、痴呆、情绪波动、情绪不稳、欣快感、双极症、焦虑、失语、吞咽困难、疲劳、Uhthoff症、食道回流、和睡眠障碍。

[0366] 除了人体研究或在人体研究之前,可使用动物模型对两种剂的效能进行评估。示例性的多发性硬化的动物模型为实验性自身免疫性脑炎(EAE)的小鼠模型,例如,如(Tuohy等(J. Immunol. (1988) 141:1126-1130), Sobel等(J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401),和Traugott (Cell. Immunol. (1989) 119:114-129)中所述。可在诱发EAE之前对小鼠使用本文所述的第一和第二剂。然后使用特征标准对小鼠进行评估来确定在该模型内使用这两种剂的效能。

[0367] IBD

[0368] 炎症性肠病(IBD)通常包括慢性、复发型肠炎。IBD可指两种不同的疾病,克罗恩病和溃疡性结肠炎(UC)。IBD的临床症状包括间歇性直肠出血、痉挛性腹痛、体重降低和腹泻。也可使用临床指数比如溃疡性结肠炎的临床活动指数来检测IBD。也参见, Walmsley等 Gut. 1998年7月; 43 (1):29-32和Jowett等(2003) Scand J Gastroenterol. 38 (2):164-71。可使用FcRn-结合抗体改善IBD的至少一项症状或改善IBD的临床指数。

[0369] 类风湿关节炎

[0370] 类风湿关节炎为一种在关节引起疼痛、肿胀、僵硬和功能丧失的自身免疫性炎症性疾病。类风湿关节炎常以对称的模式出现。该疾病可影响腕关节和最靠近手的指关节。也可影响除了关节以外的身体的其他部分。此外,患有类风湿关节炎的人可能有疲劳、偶尔发烧、和全身不适的症状。诊断类风湿关节炎的正因素包括“类风湿因子”血液抗体和瓜氨酸抗体。FcRn-结合抗体可用于治疗、预防或减轻类风湿关节炎或一项或多项类风湿关节炎的症状中。

[0371] 狼疮

[0372] 系统性红斑狼疮(SLE)为一种导致炎症和各种人体组织损害的自身免疫性疾病。SLE可由针对自身DNA的自身抗体介导。狼疮可影响身体的许多部分,包括关节、皮肤、肾、心脏、肺、血管、和脑。尽管可存在各种症状,一些最常见的症状包括极度疲劳、关节疼痛或肿胀(关节炎)、原因不明的发热、皮疹、和肾脏问题。示例性的狼疮症状包括关节疼痛或肿胀、原因不明的发热、和极度疲劳。跨越鼻和脸颊可能出现特征性的红色皮疹。皮疹也可能出现在脸部和耳朵、上臂、肩膀、胸部、和手上。狼疮的其他症状包括胸部疼痛、脱发、贫血、口腔溃疡、和由于冷和压力导致的手指和脚趾苍白或发紫。一些患者还经历头疼、头晕、抑郁、精神错乱、或癫痫。诊断SLE的正因素包括循环抗-核抗体、抗-DNA抗体、和抗-Sm抗体。FcRn-结合抗体可用于治疗、预防或减轻SLE或一项或多项SLE的症状。狼疮,如在本文中所用,包括皮肤狼疮和狼疮肾炎。

[0373] 免疫性血小板减少症(ITP)

[0374] ITP为一种增加的外周血小板破坏的疾病,其中患者形成与特异性血小板膜蛋白结合的抗体。抗-血小板抗体调理(opsonize)血小板,导致其被巨嗜细胞破坏。治疗ITP 的努力一般涉及抑制免疫系统,其引起血小板水平的升高。FcRn-结合抗体可用于治疗、预防或减轻ITP或一项或多项其症状。

[0375] 强直性脊柱炎

[0376] 强直性脊柱炎为一种不但影响脊柱,而且当骨和关节周围的肌腱和韧带发炎时,也可能影响臀部、肩膀、和膝盖,引起疼痛和僵硬的自身免疫性病症。强直性脊柱炎往往影响青春期后期或成年人早期的人。FcRn-结合抗体可用于治疗、预防或减轻强直性脊柱炎或一项或多项其症状。

[0377] 天疱疮

[0378] 天疱疮为一种影响粘膜和皮肤的自身免疫性病症。该病症以生成抗桥粒芯蛋白的自身抗体为特征。桥粒芯蛋白为钙粘着蛋白家族中的一个蛋白并且涉及桥粒的形成,桥粒将细胞连接到另一细胞。天疱疮可分成三类中的一种:寻常性天疱疮,该病症最常见的形式,其中自身抗体靶定于桥粒芯蛋白3。在落叶性天疱疮中产生了抗桥粒芯蛋白1的自身抗体。第三种类型,也是最不常见疾病为副肿瘤性天疱疮,其中自身抗体靶定于桥粒伴蛋白并且其与比如淋巴瘤的癌症相关。这些病症通常由皮肤科医生通过皮肤的表现诊断并通过检测抗桥粒芯蛋白的自身抗体来确认。治疗的方法包括施用类固醇和/或施用 CD20 抗体比如利妥昔单抗 (Rituxan)。

[0379] 癌症

[0380] “癌症”在本文中可指干扰了身体器官和系统的正常功能的不受控制的细胞生长。从其原来的位置转移并在转移到重要器官中的癌症可通过使受影响的器官功能恶化而最终导致受治疗者的死亡。癌瘤 (Carcinoma) 为源自上皮细胞的恶性癌症并包括腺细胞和鳞状细胞癌。肉瘤为结缔组织或支持组织的癌症并包括骨肉瘤、软骨肉瘤、和胃肠道间质瘤。造血癌症,比如白血病,能在受治疗者中超越正常的造血机能,从而导致造血失败 (以贫血、血小板减少和嗜中性白血球减少的形式),最终造成死亡。本领域内的一般技术人员可以区分肉瘤、癌瘤或造血癌症。

[0381] 癌症,在本文中包括以下类型的癌症,乳腺癌、胆道癌、膀胱癌;脑癌包括胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤;子宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食道癌;胃癌;包括急性淋巴细胞和髓细胞白血病的血液肿瘤;T细胞急性淋巴母细胞白血病/淋巴瘤;毛细胞白血病;铬粒细胞性白血病,多发性骨髓瘤;艾滋病相关的白血病和成人T 细胞白血病淋巴瘤;包括博文氏病及佩吉特氏病的内上皮肿瘤;肝癌;肺癌;包括霍奇金病和淋巴细胞性淋巴瘤的淋巴瘤;神经母细胞瘤;口腔癌,包括鳞状细胞癌;包括源自上皮细胞,基质细胞,生殖细胞和间叶细胞的卵巢癌;胰脏癌;前列腺癌;直肠癌;包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤肉瘤、与骨肉瘤的肉瘤;包括黑色素瘤、卡波西氏肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌的皮肤癌;包括诸如精原细胞瘤、非精原细胞瘤 (畸胎瘤,绒毛膜癌)、间质肿瘤、和生殖细胞肿瘤的睾丸癌;包括甲状腺腺癌及髓质癌的甲状腺癌;以及包括腺癌和肾母细胞瘤的肾癌。其他癌症将为本领域内技术人员所知。

[0382] 对胎儿的治疗

[0383] FcRn介导母体IgG跨越上皮细胞屏障进入胎儿。本文中所述抗体可用于向子宫内的胎儿递送大分子药物,例如,抗生素,和/或小分子。胎儿可能患有需要治疗的疾患或病症 (例如,肠道感染或代谢紊乱)。可将用于治疗疾患或病症的药物或分子轭合到 FcRn-结合抗体上并施用于子宫内怀有需要治疗的胎儿的怀孕的妇女。轭合的FcRn-结合抗体与FcRn结合并因此经过胎盘运输到胎儿。胎儿接受该药物或分子治疗。

[0384] 免疫吸附

[0385] 在一些实施方案中,本发明提供从个体中去除不需要的治疗抗体的方法。在一些实施方案中,不需要的治疗抗体为IgG抗体。在一些实施方案中不需要的治疗抗体为抗-VLA4抗体比如那他珠单抗(Tysabri,Biogen Idec/Elan)、依法利珠单抗(Raptiva, Genentech)、贝伐单抗(Avastin,Genentech)以及Fc融合蛋白比如依那西普(Enbrel, Amgen/Wyeth)。那他珠单抗单克隆抗体疗法与进行性多灶性白质脑病(PML)相关。将该治疗性抗体从血流和/或身体的其余部分去除可能改变PML的进程。

[0386] 在一些实施方案中,本文中提供的治疗方法可能与从患者血流中除去或部分除去治疗性抗体的方法相结合。在一些实施方案中,本文中提供的抗-FcRn抗体可与可结合治疗抗体的捕获蛋白组合使用,该组合导致治疗抗体从血管中的清除增加。在一些实施方案中,从患者的血流中除去或部分除去治疗性的方法为血浆置换(PLEX)。在一些实施方案中,抗-FcRn抗体可对正在进行血浆置换的患者施用。在一些实施方案中,抗-FcRn 抗体可在血浆置换过程中用作FcRn的免疫吸附剂。

[0387] 在血浆置换中(也称作血浆分离置换法或血浆除去法)从体内取出血液并将包含不需要的剂比如胆固醇或治疗性抗体的血浆使用细胞分离器从血液中除去。可分次从体内取血或以连续流动模式取血,后者允许将处理过的血液重新注入体内。可将包含不需要剂的除去的血浆丢弃,并且作为回报该患者可以接受捐献者的血浆或含有加入蛋白的盐水。在一些实施方案中,可能需要多次的血浆置换来从血液中除去不需要的剂,或在血液中将不需要的剂的水平降低到可接受的水平。在一些实施方案中,在将血液返回到患者体内前,将血液“过滤”并将不需要的剂除去。本领域内已知血浆置换的方法并如,例如,US 6,960,178,中所述。

[0388] 血浆置换已被显示在患者的血液中降低治疗抗体的水平并恢复其平衡(参见例如, Khatri等;2009;Neurology 72:402-409)。

[0389] 可通过使血液与捕获蛋白葡萄球菌蛋白A接触将基于IgG的治疗抗体(比如那他珠单抗)从血液、血浆或血清中除去,葡萄球菌蛋白A将与IgG的Fc区结合并将IgG抗体从血流中除去。其他的捕获蛋白可用于不同的同种型抗体。在一些实施方案中,抗-FcRn抗体可在血浆置换过程中用作捕获蛋白,导致在血流中除去FcRn,由此增加“游离”治疗抗体的量。所得“游离”治疗抗体将比处理前存在的抗体具有较短的半衰期和/或可使用不同捕获蛋白(比如蛋白A)更轻易的从血液中除去。在一些实施方案中,将抗-FcRn抗体在血液置换中或之前施用于患者。在一些实施方案中,抗-FcRn抗体可被固定并用于柱内,导致FcRn的结合。在一些实施方案中,包含治疗性抗体的患者的血液与固定的抗-FcRn抗体和固定的蛋白A二者相接触。

[0390] 在一些实施方案中,本文中提供的抗-FcRn抗体可用于对已经施用并表现出副作用的治疗性抗体的“补救”疗法中。在一些实施方案中,抗-FcRn抗体可用作血浆置换的替代方法。施用抗-FcRn抗体可完成治疗性抗体去除而避免与血浆分离置换和血浆置换相联系的风险比如血管通路、柠檬酸疗法和捐献者血浆来源。

[0391] 人白细胞抗原

[0392] 人白细胞抗原(HLA)呈递细胞外的肽和抗原,其随后被T-细胞识别,然后可活化B细胞。可提供的HLA基因的组对每个人都是独特的。任何展示“非自身”的HLA的细胞将导致

诱发免疫反应。一般来说,该“非自身”HLA与自身HLA越不相同,免疫反应越强烈。比如,在器官移植的情况下,优选具有相似HLA基因的受治疗者以将免疫反应最小化。供体特异性HLA抗体已被发现与肾、心脏、肺和肝移植的嫁接失败相关。

[0393] 在一些实施方案中,本发明提供了在个体中降低“非自身”HLA抗体水平的方法。“非自身”HLA抗体水平的降低可导致免疫反应的抑制,例如,在器官移植期间。在一些实施方案中,对将要进行器官移植的人施用抗-FcRn抗体。在一些实施方案中,对正在进行器官移植的人施用抗-FcRn抗体。在一些实施方案中,对已经接受了器官移植的人施用抗-FcRn抗体。用于测量HLA抗体的水平的检测法在本领域内是熟知的。

[0394] 诊断用途

[0395] 结合FcRn并且使用本文中所述和/或所详述的方法鉴别的抗体可具有体外和体内诊断的用途。

[0396] 在一方面,本公布提供了在体外或体内检测FcRn的存在的诊断方法(例如,对受治疗者的体内成像)。该方法可包括将FcRn定位到亚细胞位置,例如,内体。该方法可包括:(i)将样品与FcRn-结合抗体接触;并且(ii)检测在FcRn-结合抗体和样品之间形成的复合物。该方法也可包括将参考样品(例如,对照样品)与抗体接触,并确定相对参考样品该抗体和样品之间形成复合物的程度。在样品中或受治疗者中相对对照样品或受治疗者的复合物形成上的改变,例如,统计上显著的改变,可以表明FcRn在样品中存在。

[0397] 另一示例性方法包括:(i)对受治疗者施用FcRn-结合抗体;并且(ii)检测FcRn-结合抗体和受治疗者之间复合物的形成。检测可包括确定复合物形成的位置或时间。

[0398] 可使用可检测的物质直接或间接的标记FcRn-结合抗体以辅助检测结合或未结合的抗体。合适的检测物质包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。

[0399] 可通过测量或目测结合于FcRn的抗体或未结合的抗体来检测FcRn-结合抗体和FcRn之间的复合物的形成。可使用传统的检测法,例如,酶联免疫吸附检测法(ELISA),放射免疫测定(RIA)或免疫组织化学。除了标记FcRn-结合抗体,可使用可检测物质标记的标准和未标记的FcRn-结合抗体的竞争免疫检测法检测FcRn在样品内的存在。在该检测法的一个实例中,将生物样品、标记的标准和FcRn-结合抗体组合并确定结合于未标记抗体的标记标准的量。样品中FcRn的量与结合于FcRn-结合抗体的标记标准的量成反比例。

[0400] 可制备荧光团和生色团标记的抗体。由于抗体和其他蛋白吸收最长大约310nm波长的光,应选择在高于310nm最好是400nm波长上具有大量吸收的荧光部分。多种合适的荧光剂和生色剂已在Stryer,1968,Science 162:526和Brand,L.等,1972,Annu.Rev.Biochem.41:843-868中描述。可使用传统步骤,比如公开于第3,940,475号,第4,289,747号,和第4,376,110号美国专利中的步骤,对抗体进行荧光生色基团标记。一组具有多个以上所述的所需特质的荧光剂为咕吨(xanthene)染料,包括荧光素和罗丹明。另一组荧光化合物为萘胺。一旦经过荧光团或生色团标记后,抗体可用于检测样品内FcRn的存在或位置,例如,使用荧光显微术(比如共聚焦或解卷积显微术)。

[0401] 组织学分析。可使用本文中所述的抗体进行免疫组织化学。例如,可在合成抗体时加入标记(比如纯化或表位标记),或对抗体进行可检测的标记,例如,通过轭合标记或标记结合基团。例如,可将螯合剂附加在抗体上。随后将抗体与组织学制品接触,例如,在显微镜载玻片上的固定的组织切片。在结合孵育之后,清洗该制品以除去未结合的抗体。然后分析

该制品,例如,使用显微术,确定抗体是否结合到制品上。

[0402] 当然,该抗体在结合的时候可为未标记的。在结合和清洗之后,可将该抗体标记以使其变得可检测。

[0403] 蛋白阵列。也可将FcRn-结合抗体固定到蛋白阵列上。蛋白阵列可用作诊断工具,例如,用于筛选医疗样本(比如分离的细胞、血液、血清、组织切片等)。当然,蛋白阵列也可包括其他配体,例如,结合于FcRn或其他靶标分子的配体。

[0404] 生产多肽阵列的方法已被描述,例如,在De Wildt等,2000,Nat.Biotechnol. 18:989-994;Lueking等,1999,Anal.Biochem.270:103-111;Ge,2000,Nucleic Acids Res. 28,e3,I-VII;MacBeath和Schreiber,2000,Science 289:1760-1763;WO 01/40803和 WO 99/51773A1中。用于阵列中的多肽可以高速率点样,例如,使用市售的机器人设备,例如,来自Genetic MicroSystems或BioRobotics。阵列的基质可为,例如,硝化纤维、塑料、玻璃,例如,表面改性玻璃。阵列也可包括多孔基质,例如,丙烯酰胺、琼脂糖、或其他聚合物。

[0405] 例如,该阵列可为抗体阵列,例如,如在De Wildt,同上中所述。可在过滤器中以阵列的形式培养生成抗体的细胞。诱导抗体生成,然后将表达的多肽固定到过滤器中的细胞位置上。可将抗体阵列与标记的靶标接触来确定靶标与每种固定抗体结合的程度。可将有关阵列上每个地址上结合的程度信息存储为数据图表,例如,在计算机数据库中。抗体阵列可复制生产并用于比较结合数据图表,例如,靶标和非靶标。

[0406] FACS(荧光激活细胞分选法)。FcRn-结合抗体可用于标记细胞,例如,样品中的细胞(例如,患者样品)。抗体也附加于(或也可附加于)荧光化合物。然后可使用荧光激活细胞分选器将细胞进行分选(例如,使用从Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA可获得的分选器;也参见第5,627,037号;第5,030,002号;和第5,137,809号美国专利)。当细胞经过分选器的时候,激光束激发荧光化合物同时检测器对经过的细胞计数并通过检测荧光确定细胞上是否附加了荧光化合物。可将结合在每个细胞上的标记的量进行定量并分析以表征样品。

[0407] 分选器也可使细胞转向并将结合于抗体和未结合于抗体的细胞分离。可培养和/或表征分离的细胞。

[0408] 体内成像。另一特征为在体内检测FcRn表达组织的存在的方法。该方法包括(i)将轭合到可检测标志物上的抗FcRn抗体施用于受治疗者(例如,患有自身免疫性病症的患者);(ii)将该患者暴露于检测FcRn表达组织或细胞的所述可检测标志物的方法。例如,对患者成像,例如,通过NMR或其他层析成像方法。

[0409] 对于诊断性成像有用的标记的实例包括放射性标记比如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、和 ^{188}Rh ,荧光标记比如如荧光素和罗丹明,核磁共振活性标记,可使用正电子发射断层扫描(“PET”)扫描仪探测的正电子发射同位素,化学发光剂如萤光素,酶标志物如过氧化物或磷酸酶。也可使用短距离辐射反射物,比如可被短距离探测探针检测到的同位素。可使用已知技术将抗体使用所述试剂标记。例如,关于放射性标记抗体的技术参见Wensel和Meares,1983,Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy(放射性免疫成像和放射性免疫疗法),Elsevier,New York和D.Colcher等,1986,Meth. Enzymol.121:802-816。

[0410] 放射性标记的抗体也可用于体外诊断测试。同位素标记的抗体的比活性依赖于其

半衰期,该放射性标记的同位素纯度,以及该标记是如何掺入抗体中的。

[0411] 使用放射性同位素(比如 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{131}I)标记多肽的步骤广泛已知。例如,氙标记的步骤在第4,302,438号美国专利中描述。碘化、氙标记、和 ^{35}S 标记的步骤,例如,如适用于鼠单克隆抗体的步骤,已被描述于,例如,Goding,J.W.,(Monoclonal antibodies: principles and practice:production and application of monoclonal antibodies in cell biology,biochemistry,and immunology(单克隆抗体:原理和实施:单克隆抗体的生成和在细胞生物学、生物化学和免疫学中的使用)第2版.London;Orlando:Academic Press,1986.第124 126页)以及其中引用的参考文献。碘化多肽(比如抗体)的其他的步骤在Hunter和Greenwood,1962,Nature 144:945,David等,1974,Biochemistry 13:1014 1021,和第3,867,517号和第4,376,110号美国专利中描述。用于成像中的放射性标记元素包括例如 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。碘化抗体的步骤在Greenwood,F.等,1963,Biochem. J.89: 114 123;Marchalonis,J.,1969,Biochem.J.113:299 305;和Morrison,M.等,1971,Immunochemistry 289 297中描述。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的步骤被Rhodes,B.等在Burchiel,S.等(编辑)Tumor Imaging:The Radioimmunochemical Detection of Cancer(肿瘤成像:癌症的放射性免疫化学检测),New York:Masson 111 123(1982)中以及其中引用的参考文献中描述。合适的 ^{111}In 标记抗体的步骤在Hnatowich,D.J.等,1983,J.Immunol.Methods, 65:147 157,Hnatowich,D.等,1984,J.Applied Radiation,35:554 557,和Buckley,R.G.等,1984,F.E.B.S.166:202 204中描述。

[0412] 对于放射性标记的抗体,抗体被施用于患者,定位于带有与抗体反应的抗原的细胞,并使用已知的技术,比如使用例如 γ 相机或发射断层技术的放射性核素扫描,在体内检测或“成像”。参见例如,A.R.Bradwell等,“Developments in Antibody Imaging(抗体成像的发展)”,Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy(用于癌症检测和疗法的单克隆抗体),R.W.Baldwin等,(编辑),第65 85页(Academic Press 1985)。另外,可使用正电子发射轴向断层扫描仪(transaxial tomography scanner),比如位于Brookhaven国家实验室的指定的Pet VI,其中放射性标记发射正电子(例如, ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、和 ^{13}N)。

[0413] MRI造影剂。磁共振成像(MRI)使用NMR将活体受治疗者的内部特征可视化,并可用于预后、诊断、治疗和手术。MRI的使用不需要放射性示踪化合物并由此带来明显的好处。一些MRI技术已在EP-A-0 502 814中总结。一般来说,与不同环境下水质子的弛豫时间常数T1和T2相关的差异被用于生成图像。然而,这些差异可能不足以提供锐利的高分辨率的图像。

[0414] 这些弛豫时间常数的差异可通过造影剂增强。所述造影剂的实例包括许多磁剂,顺磁剂(主要改变T1)和铁磁或超顺磁剂(主要改变T2反应)。可使用螯合剂(例如,EDTA、DTPA和NTA螯合剂)附加(并减轻毒性)一些顺磁物质(例如, Fe^{+3} 、 Mn^{+2} 、 Gd^{+3})。其他剂可为微粒形式,例如,直径小于10mm到大约10nM)。微粒可具有铁磁、抗铁磁、或超顺磁特性。微粒可包括,例如,磁铁(Fe_3O_4)、 $-\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、铁氧体、及过渡元素的其他磁性矿物化合物。磁性微粒可包括:具有或不具有非磁性物质的一种或多种磁性晶体。非磁性物质可包括合成或天然聚合物(比如琼脂糖、葡聚糖、糊精、淀粉和类似聚合物)。

[0415] 也可使用包含NMR活性的 ^{19}F 原子或者在以下限度内的多个所述原子的指示基团标记的FcRn-结合抗体:(i)大体上所有的天然丰富的氟原子均为 ^{19}F 同位素,并且因此,所有的

包含氟的化合物均为NMR活性；(ii) 许多化学活性的聚氟化合物比如三氟乙酸酐可以较低的价格通过市售获得；并且(iii) 许多氟化化合物已被发现可在医疗上接受的用于人体比如全氟聚醚用作血红蛋白的替代物运输氧。在经过所述时间的培育以后，使用如Pykett, 1982, Sci. Am. 246:78-88中所述的设备进行全身MRI以对FcRn表达组织进行定位和成像。

[0416] 本公开也以包括结合于FcRn的抗体及其用于诊断的说明书为特征的药盒，例如，使用FcRn-结合抗体或其抗原结合片段以在体外检测FcRn，例如，在样品中，例如，来自患有自身免疫性病症的患者的组织切片或细胞，或在体内，例如，通过对受治疗者成像。药盒还可包括至少一种其他的试剂，比如标记或其他的诊断剂。用于体内使用的抗体可配制为药物组合物。

[0417] 以下实施例进一步说明本发明，其在任何情况下均不应解释为进一步限制。贯穿本申请所引用的所有参考文献的全部内容(包括文献参考、已批准的专利、已公布的专利申请、和正在申请的专利申请)均在此明确通过引用并入，特别是以上所引用的教导。

[0418] 实施例

[0419] 实施例1：克隆FcRn、FcRn-GPI和 β_2 M

[0420] 用于这些实施例的全长FcRn cDNA构建体最初在Simister实验室(布兰代斯大学，Waltham MA)使用pcDNA6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 作为质粒载体 (FcRn:pcDNA6) 构建。这些实施例中使用的 β_2 m cDNA构建体最初在Blumberg实验室(哈佛医学院，Boston, MA) 使用pcDNA3 (Invitrogen) 作为质粒载体 (β_2 M:pcDNA3) 构建。

[0421] 根据生产商的说明，将质粒转染进入One Shot TOP10化学感受大肠杆菌 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。从每个转化平板中挑取单个菌落，接种到500-1000ml的LB培养基中并在振荡仪中过夜培养。使用Maxi Prep试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 将质粒DNA从这些培养物中纯化。使用NheI和XbaI酶切pcDNA6-全长hFcRn质粒构建体。使用Hind III和Xba I酶切pCDNA3.1- β_2 -M质粒构建体。使用NheI和XbaI酶切 pCDNA6-hFcRn-GPI质粒构建体。将酶切产物在1%琼脂糖胶中解析以验证插入片段的大小是正确的。全长FcRn和GPI-FcRn的正确大小是长大约1kb。人 β_2 M的长度大约为0.4kb。在进行肌肉内注射之前，将质粒DNA (4mg/ml在乙醇中) 在无菌DPBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) 里稀释到2mg/ml。

[0422] 实施例2：使用编码FcRn的质粒DNA免疫小鼠

[0423] 在进行质粒DNA注射之前5天，使用100 μ l的10mM的心脏毒素 (Calbiochem, San Diego) 将Balb/c小鼠进行处理。心脏毒素处理用于引发炎症反应并将抗原提呈细胞(例如，树突细胞) 招募到注射区域，由此增强当质粒编码的蛋白表达时的抗原提呈。

[0424] 将重悬于50 μ l PBS的100 μ g全长或GPI-hFcRn质粒构建体注射到小鼠的胫前肌。使用hFcRn和 β_2 M的组合免疫的小鼠接受了在25 μ l PBS中50 μ g的hFcRn质粒和在25 μ l PBS中50 μ g的 β_2 M质粒的剂量。所有的肌肉内注射均在使用苯巴比妥 (50mg/kg，腹膜内注射) 或氯胺酮 (100mg/kg) / 甲苯噻嗪 (10mg/kg) 系统麻醉下进行。在第一次免疫后的第21天和第42天，使用和第一次注射所用的同样的剂量和体量，用hFcRn 质粒的再次注射对动物进行免疫加强。

[0425] 还在初始免疫以后的第76天使用可溶形式的重组hFcRn (shFcRn, 100 μ g/小鼠，腹膜内) 对小鼠进行免疫加强。随后，在初始免疫以后的第56和94天通过尾静脉出血得到30到50 μ l血清。然后如以下实施例3中所述检测血清的抗体效价。此外，在融合之前，在第129、

130、和131天使用重组shFcRn (50 μ g/小鼠) 给予第182号小鼠静脉内 (IV) 免疫加强。在第132天, 如以下实施例4中所述, 将来自第182号小鼠的脾脏细胞与NS-1或SP2/0骨髓瘤细胞(ATCC, Manassas, VA) 融合。由这项融合生成大约 35个抗-人FcRn特异性mAB杂交瘤系。

[0426] 在初始免疫后的第276、277、和278天, 使用50 μ g重组shFcRn对第187号小鼠进一步进行IV免疫加强。在第279天, 如以下实施例4中所述, 将来自第187号小鼠的脾脏细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合。将所得融合的10%在十一个96孔板中进行平板培养。余下的90%的融合储存于液氮中。从平板培养的融合中生成了分泌识别hFcRn的 mAB的35个系。免疫实验方案总结于表2。

[0427] 表2: 免疫实验方案

[0428]

疫苗接种	小鼠数目	第 5 天	第 0 天	第 21 天	第 42 天	第 56 天	第 76 天	第 94 天	第 129-131 天 #182	第 132 天 #182	第 276-278 天 #187	第 279 天 #187
人 FL-FcRn-DNA	5	心脏毒素处理	免疫	免疫加强	免疫加强	第一次血清测试	使用 sHFcRn 进行 IP 免疫加强	第二次血清测试	每日使用 shFcRn 进行 IV 免疫加强	融合		
人 FL-FcRn DNA + 人 β 2M DNA	5	心脏毒素处理	免疫	免疫加强	免疫加强	血清测试	使用 sHFcRn 进行 IP 免疫加强	血清测试			每日使用 shFcRn 进行 IV 免疫加强	融合
人 GPI-FcRn DNA	5	心脏毒素处理	免疫	免疫加强	免疫加强	血清测试	使用 sHFcRn 进行 IP 免疫加强	血清测试				
人 GPI-FcRn + 人 β 2M DNA	5	心脏毒素处理	免疫	免疫加强	免疫加强	血清测试	使用 sHFcRn 进行 IP 免疫加强	血清测试				
无 DNA	5	心脏毒素处理				血清测试		血清测试				

[0429] 实施例3: 小鼠血清中的抗体效价

[0430] 使用ELISA测量小鼠血清中的抗-hFcRn和抗- β 2M效价。使用在ELISA包被缓冲液(Sigma, St. Louis, MO) 中的2 μ g/ml可溶性hFcRn或h β 2M (Sigma, St. Louis, MO) 将ELISA平板

包被。将平板在37℃孵育1小时。使用PBS+0.05%吐温(PBST)洗板两次。在37℃使用含1%鱼明胶(fish gelatin)的PBS将平板阻断。使用PBST洗板两次。加入系列稀释的小鼠血清(于PBS中)(100μl/孔)并在37℃孵育2小时。使用PBST洗板5次。将山羊抗小鼠IgG-HRP(Pierce, Rockford, IL)以1到10,000的稀释加入平板,在室温孵育1小时。使用PBST洗板5次。在平板中加入四甲基联苯胺(TMB)溶液(KPL, Gaithersburg, MD)进行显色。在5分钟后当出现适当的显色时将底物反应停止。在酶标仪(microplate reader, Bio-rad, Hercules, CA)中450nm下读板。在第56天检测所有小鼠的血清(图1)。在第94天再次检测血清与hFcRn反应的小鼠并将血清效价显示于图2。

[0431] 实施例4: 杂交瘤融合

[0432] 选用第182号和第187号小鼠进行杂交瘤融合。将两只小鼠的脾脏取出,并通过将脾脏用针挑开然后反复使用10ml的DMEM培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)移液制备脾脏细胞的单细胞悬浮液。将脾脏细胞在500g离心5分钟。将脾脏细胞在2ml ACK裂解缓冲液(8.29g NH₄Cl, 1g KHC0₃, 37.2mg Na₂EDTA, H₂O得到最终体积1升, pH 7.2-7.4)中重悬裂解红血球。将细胞在冰上孵育5分钟。使用DMEM将ACK缓冲液处理的细胞清洗3次。由第182号小鼠得到的脾脏细胞总数为216×10⁶。将一半细胞与70×10⁶SP2/0骨髓瘤细胞融合并将另一半与27×10⁶NS-1细胞融合。

[0433] 根据Current Protocol of Immunology(现代免疫学实验)第2.5单元, Wayne M. Yokoyama, 出版商: John Wiley and Son Inc. 电子版中所述的方法进行#182融合。将SP2/0融合细胞在314ml的HAT培养基中稀释并接种到16.5个平板上(96孔板, 0.2ml/孔)。将NS-1融合细胞在216ml HAT培养基中稀释并接种到11个平板上(96孔板, 0.2ml/孔)。

[0434] 在#187融合中, 使用来自“Monoclonal Antibodies(单克隆抗体)”, J.H. Peters和H. Baumgarten编辑, 由Springer-Verlag出版, 1992, 第149-156页中的实验方案将2×10⁸脾脏细胞与8×10⁷SP2/0骨髓瘤细胞融合。

[0435] 融合后的第2、3、4、5、7、9天, 使用新鲜的HAT培养基替换一半HAT培养基。融合后的一到两周, 将阳性孔(由显微镜下的明显生长和肉眼观察确定)内的杂交瘤细胞转移到24孔培养平板。在融合后的2周之内, 使用包含完全培养基的HAT培养基培养杂交瘤细胞。在第16天, 将细胞转移到不含HAT的CDMEM中。

[0436] 当培养基变成淡黄色时, 收获少量的上清并如实施例3中所述使用ELISA筛选抗-hFcRn活性。总共筛选了384个来自SP2/0-#182脾脏细胞融合的杂交瘤系。总共筛选了60个来自NS-1-#182脾脏细胞融合的杂交瘤系。SP2/0融合的31个系的上清通过抗-hFcRn反应性ELISA检测为阳性。NS-1融合的8个杂交瘤系的上清通过抗-hFcRn反应性ELISA检测为阳性。通过限制性稀释将总共16个来自#182融合的杂交瘤系克隆并在每个系中挑选3个亚克隆进行进一步表征。

[0437] 实施例5: 杂交瘤克隆

[0438] 杂交瘤克隆培养基制备如下: 12.5ml HEPES缓冲液溶液(100×/1M)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5ml 丙酮酸钠(100×/100mM)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5ml 青霉素/链霉素(100×/10,000单位)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5ml 非必需氨基酸(100×/100mM)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5ml L-谷氨酰胺(100×/200mM)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.5ml 2-巯基乙醇(1000×/5.5×10⁻²M)(Invitrogen, Carlsbad, CA), 100ml FBS(杂交瘤生

长预筛选) (Cambrex, East Rutherford, NJ), 并将50ml杂交瘤克隆因子(ICN, Irvine, CA) 加入到317ml高葡萄糖DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)。将培养基通过0.22 μ m 过滤膜过滤并在4℃保存。

[0439] 克隆前两天, 使用杂交瘤克隆培养基替换cDMEM培养基。克隆当天, 使用DMEM 清洗细胞一次并对细胞计数。将细胞以 1×10^5 – 1×10^6 /ml的不同浓度重悬在克隆培养基中。将3000、300或100个细胞转移到20ml克隆培养基中达到150个细胞/ml, 15个细胞/ml或3个细胞/ml的浓度。然后将细胞转移到3个不同的(每个细胞浓度一个平板) 96孔板中。每个孔的最终量为0.2ml。将平板在37℃, 10%CO₂孵育1-2周并对阳性孔计数。在阳性孔最少的平板中选出20-30个克隆并扩展到24孔板中。通过如实施例3 中所述的抗-FcRn ELISA检测上清对可溶性FcRn的反应性。

[0440] 实施例6: 使用FcRn特异性mAB上清的细胞竞争性检测法

[0441] A. 使用Alexa-Fluor-488标记Synagis®

[0442] 根据生产商建议的实验方案使用Alexa Fluor 488蛋白标记试剂盒(Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) 标记Synagis®(人源化IgG1, MedImmune, Gaithersburg, MD)。简要地, 将50 μ l的1M碳酸氢钠, pH 9.0加入500 μ l在PBS中的2mg/ml IgG 溶液。然后将此蛋白溶液加入Alexa Fluor 488琥珀酰亚胺酯(干粉)中并在室温孵育 1小时。使用试剂盒组成部分柱(Bio-Rad BioGel P-30Fine体积排阻纯化树脂)通过体积排阻色谱法将蛋白纯化。将样品加入柱中并使用PBS洗脱。第一条显色带包含了标记的蛋白。通过测量洗脱的IgG在A280和A494的吸光度来确定标记程度。使用以下公式确定蛋白摩尔浓度:

$$[0443] \quad (M) = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0.11)] \times \text{稀释因子}}{203,000}$$

[0444] 另外, 用于推算每摩尔蛋白的染料摩尔数的公式为:

$$[0445] \quad (M) = \frac{A_{494} \times \text{稀释因子}}{71,000 \times \text{蛋白浓度}}$$

[0446] 通常, 每摩尔IgG中掺入了4到7摩尔的Alexa-Fluor 488。

[0447] B. 使用FcRn特异性上清的细胞竞争检测法

[0448] 表达hFcRn和人 β_2 M的293C11细胞被用于在使用荧光标记的IgG1的竞争检测法中测试FcRn mAB上清。使用PBS清洗300,000个293C11细胞并在台式微型离心机中以2500RPM离心5分钟形成片状沉淀。将片状沉淀的细胞在100–200 μ l来自生产FcRn 特异性mAB的克隆的上清中重悬并在冰上孵育60–90分钟。使用结合缓冲液(PBS pH 6.0 10mM EDTA)清洗细胞两次。将细胞在100 μ l结合缓冲液中重悬。根据生产商的说明使用试剂盒(Molecular Probes, Eugene, OR) 制备Alexa fluor 488(Molecular Probes, Eugene, OR) 标记的hIgG1并加入到每个试管中(100nM, 0.6–1.5 μ l)。将细胞在冰上孵育40分钟。使用结合缓冲液清洗细胞一次并通过荧光激活细胞分选器(FACS)使用 EXPO.32软件(Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) 进行分析。所得结果以总体平均荧光强度(TMFI)的形式表达。

[0449] 图3描绘了182融合所得结果。如果对照管(只含有Alexa Fluor 488而不含竞争剂)的TMFI高于含有竞争剂(mAB上清)的管的TMFI, 抑制率计算如下:

[0450] 对照管的TMFI–含有竞争剂的管的TMFI / 对照管的TMFI。

[0451] 如果对照管的TMFI低于含有竞争剂的管的TMFI,则hIgG1与FcRn表达细胞的结合有所增强。该增强可计算如下:

[0452] 含有竞争剂的管的TMFI-对照管的TMFI/ 对照管的TMFI。

[0453] 图4描绘了187融合所得结果。TMFI的计算为在门控区的细胞部分乘以该区的平均荧光。一个实验结果表明在所测试的上清中有11份抑制经过Alexa fluor 188标记的 IgG1与293C11细胞结合,而4份上清增强经过Alexa fluor 188标记的IgG1与293C11 结合(图4A)。第二个实验结果表明有3份上清抑制IgG1与293C11细胞结合,而5 份上清增强结合(图4B)。

[0454] 实施例7:使用纯化FcRn特异性mAB的细胞竞争检测法

[0455] 表达hFcRn和人 β_2 M的293C11胞被用于在使用荧光标记的IgG1的竞争检测法中测试FcRn mAB上清。使用结合缓冲液(PBS pH 6.0,10mM EDTA)清洗细胞一次并在台式离心机中以1800RPM离心形成片状沉淀。将细胞等分到微型离心管中($1-3 \times 10^5$ /管瓶/ml结合缓冲液)。将细胞在微型离心机中以2500RPM形成片状沉淀五分钟。抽取上清并将细胞片状沉淀在100 μ l结合缓冲液中重悬。以不同浓度加入纯化FcRn特异性 mAB。每管加入100nM(最终浓度)的Alexa fluor 488(Molecular Probes,Eugene, OR)标记的IgG。在4 $^{\circ}$ C孵育样品40分钟。将样品使用结合缓冲液清洗一次并重悬于结合缓冲液中用于FACS分析(Beckman Coulter, Inc.,Miami,FL)。在进行样品分析前使用结合缓冲液将FACS平衡。结果以总体平均荧光强度的形式表示。TMFI的计算为门控区的细胞百分比 $\times$ 该区的平均荧光。结果表明mAB 3B3.11、mAB 4B4.12、mAB 31.1和mAB 4.13显著抑制IgG1与293C11细胞的结合(图5)。

[0456] 实施例8:使用单克隆抗体的细胞表面FcRn染色

[0457] 通过FACS使用mAB检测FcRn的表面表达。对大鼠成纤维细胞(表达大鼠FcRn/大鼠 β_2 M)、293C11细胞(表达hFcRn/人 β_2 M)、3T3FcRn细胞(表达鼠FcRn/鼠 β_2 M)和转染了编码猴FcRn/ β_2 M的pCDNA6质粒的COS细胞进行了研究。使用微型离心机将每个细胞类型的 $1-3 \times 10^5$ 个细胞片状沉淀。弃上清并将细胞重悬于在最终体积为100 μ l的PBS/1%牛血清白蛋白(pH 7.4)中的1 μ g使用Alexa 488(Molecular Probes,Eugene, OR)标记的mAB。根据生产商的说明使用Alexa Fluor蛋白标记试剂盒(Molecular Probes, Eugene,OR)将纯化的FcRn特异性mAB用Alexa Fluor 488(Molecular Probes,Eugene, OR)预先标记。将细胞在冰上孵育45分钟然后使用PBS/1%牛血清白蛋白(pH 7.2)清洗一次。使用Beckman Coulter, Inc.FACS(Beckman Coulter, Inc.,Miami FL)进行 FACS分析。所得结果如图6、7、和8中所示。图6显示mAB 3B3.11、31.1、4.13、4B.12 和15B6.1均识别在293C11细胞表面表达的hFcRn。图7显示mAB 4.13和4B4.12也识别在表达大鼠FcRn的细胞表面表达的大鼠FcRn而mAB 3B3.11和31.1不与大鼠 FcRn交叉反应。图8显示mAB 3B3.11、4B4.12和4.13识别在小鼠3T3细胞的细胞表面表达的鼠FcRn,而15B6.1和31.1没有交叉反应。

[0458] 实施例9:各种杂交瘤细胞系的亚克隆

[0459] 选择来自小鼠187的杂交瘤进行亚克隆。选择杂交瘤6A4、6A1、5A4、7D2、4B4、3C5、3B3、10B4、1C1、和11A5进行亚克隆。通过限制性稀释进行亚克隆。3B5克隆分泌抗-h β_2 M抗体。培养介于20到30个亚克隆并使用ELISA如实施例3所述检测培养物的上清。将来自2-10个阳性克隆的培养物扩展到T150培养瓶中(每个克隆4个培养瓶)。收获总共350-400ml上清用于mAB纯化。每个克隆的mAB产量范围在3-20mg 之间。如实施例7中所述使用293C11竞争

性检测法检测纯化mAB对FcRn的阻断。从 1000nM将mAb两倍稀释至16nM用于竞争性检测法。由187亚克隆和182克隆所得的结果总结于表3。

[0460] 表3. 来自#182融合和#187融合的mAB的表征

[0461]

克隆	ELISA (shFcRn)	阻断检测 (上清) % 抑制	IgG 同种型 分型	阻断 (纯化) % 抑制
#182 融合				
4.13	+	>50	IgG1	90
15B6.1	++	>50	IgG2a	
14C5.3	+	>40	IgG2a	
31.1	+	>40	IgG1	93
3C6.2	+	>35	IgG2a	74
#187 融合				
3B3.11	++	>60	IgG1	92
3B3.16	++	>60	IgG1	73
3B3.21	++++	>60	IgG1	84
3B3.35	++	>60	IgG1	86
6A4.1	+	>40	IgG1	42
6A4.4	+	>40	IgG1	52
6A4.16	+	>40	IgG1	65
6A4.17	+	>40	IgG1	42
6A1.12	+	21	IgG1 IgG2a	35
6A1.13	+	25	IgG2a	39
6A1.29	+	33	IgG2a	81
3B5.2 (@β2m)	+++	71	IgG2a	90
3B5.4(@β2m)	+++	79	IgG2a	52
3B5.5(@β2m)	+++	63	IgG2a	
3B5.9(@β2m)	+++	71	IgG2a	80
7D2.13	+	49	IgG1 IgG2a	11
7D2.21	++	43		
7D2.22	+	49	IgG1 IgG2a	43

[0462]	7D2.27	+	46	IgG1	52
	5A4.9	+	57		
	5A4.10	+	49	IgG1	63
	5A4.25	+	54	IgG1	31
	5A4.27	+	51		39
	5A4.38	+	43		15
	5A4.39	+	49		20
	5A4.40	+	53		30
	5A4.41	+	66		35
	5A4.42	+	72		
	4B4.1	++	70	IgG2a	
	4B4.2	++	66	IgG2a	69
	4B4.12	++	70	IgG2a	71
	4B4.13	++	66	IgG2a	60
	3C5.10	+	30		
	3C5.11	+	40		
	3C5.14	+	40		
	3C5.16	+	33		
	10B4.5	+++	23		54
	10B4.9	++	23		31
	1C1.7	+++	32	IgG1	23
	1C1.22	+++	27	IgG1	61
	1C1.23	+++	32	IgG1	27
	1C1.25	++	32	IgG1	38
	11A5.5	+++	49	IgG1	13
	11A5.9	+	43		
	11A5.11	+	45		
	11A5.12	+	51	IgG1/IgG2a	76

[0463] 实施例10:FcRn的细胞内染色

[0464] 使用纯化的FcRn特异性单克隆抗体 (mAB) 研究THP-1细胞 (人单核细胞系) 和Caco-2细胞 (人肠上皮细胞系) 中的FcRn细胞内染色。将300,000个细胞/管THP-1 或Caco-2细胞的等份片状沉淀并在250μl的BD Cytofix/Cytoperm(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 中重悬。使用1ml BD Perm/清洗溶液 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 清洗细胞两次并于同样的溶液中重悬。将Alexa fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 标记的mAB (1μg/管) 加入细胞中并将细胞在冰上孵育45分钟。使用BD Perm/清洗溶液 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 清洗细胞两次并于PBS/1%牛血清白蛋白中重悬。使用FACS (Beckman Coulter, Inc., Miami FL) 分析细胞。结果如图9和10所

示,结果表明mAB 3B3.11、31.1、4B4.12和 15B6.1均有效地结合于在THP-1细胞中的细胞内FcRn(图9),而4.13mAB则不能。在Caco-2细胞中得到相似的结果(图10)。

[0465] 实施例11:使用抗-FcRn mAB对小鼠脾脏细胞进行细胞内和表面染色。

[0466] 使用镊子将细胞从小鼠脾脏中剥离。将细胞片状沉淀并重悬于ACK裂解缓冲液(8.29g NH_4Cl , 1g KHCO_3 , 37.2mg Na_2EDTA , H_2O 到达最终体积1升, pH 7.2-7.4)中并在室温下孵育5分钟。使用DMEM/5%FBS(Invitrogen, Carlsbad, CA)清洗细胞三次。将 1×10^6 个细胞转移到微离心管中并在台式微型离心机中片状沉淀。如实施例10中所述进行细胞内染色的固定和透化步骤。将细胞在含 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 小鼠同种型对照抗体的清洗缓冲液(PBS/1%BSA)中重悬并在冰上孵育20分钟。将细胞片状沉淀,并在细胞中加入含 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 同种型对照抗体的100 μl 清洗缓冲液中的Alexa 488(Molecular Probes, Eugene, OR)标记的mAB($1 \mu\text{g}/\text{管}$)。将细胞在冰上孵育40分钟并使用清洗缓冲液清洗两次。使用EXP0.32软件将散射门控为巨嗜细胞/单核细胞富集的细胞群。通过调整前向散射(forward scatter)和尺寸散射(size scatter)对巨噬细胞/单核细胞(具有大尺寸和高粒度的独特群体)富集的细胞群进行分析。使用FACS(Beckman Coulter, Inc., Miami FL)对细胞进行分析。结果如图11中所示,结果表明mAB 4B4.12在取自脾脏细胞群中的脾脏细胞和巨噬细胞/单核细胞二者中检测到在细胞表面和细胞内的小鼠FcRn。

[0467] 实施例12:抗-FcRn mAb 4B4.12对免疫反应的影响

[0468] 使用50 μl 完全弗氏佐剂与卵清蛋白1:1混合的乳浊液将6-8周大的雌性Balb/c小鼠免疫。在第0天在胁腹两侧对小鼠皮下注射免疫一次并在第10天使用100 μg 卵清蛋白/小鼠进行免疫加强。通过腹膜内注射对FcRn特异的4B4.12mAB或同种型对照(1813; ATCC1813)抗体($1 \text{mg}/\text{ml}$ 溶于PBS/小鼠)或PBS处理小鼠。在第-1天、第0天、第1天、和以后的每隔一天进行处理。在第9天对小鼠取血得到血清样品并在第16天使之安乐死。在安乐死后最大量地抽取血清。实验方案如以下表4所总结。

[0469] 表4:处理实验方案

[0470]

组#	处理						
	第-1天	第0天	第+1天	每隔一	第+9	第+10	第+16天

[0471]

		IP	SC		天	天	天	
1	4B4.12	4B4.12	OVA+CFA	4B4.12	4B4.12	抽血	OVA	检测
2	1813	1813	OVA+CFA	1813	1813	抽血	OVA	检测
3	PBS	PBS	OVA+CFA	PBS	PBS	抽血	OVA	检测

[0472] 获取脾脏和引流淋巴结并在分析天平上称重。图12中所示的结果表明与两个对照相比,经过4B4.12mAB处理的小鼠的脾脏和引流(腹股沟)淋巴结的重量均降低。

[0473] 使用ELISA测量卵清蛋白抗体效价。使用10 $\mu\text{g}/\text{m}$ 卵清蛋白将ELISA平板包被并用PBS/1%BSA阻断。将滴定过的血清(在PBS/1%BSA内以1比50开始,然后2倍稀释到2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和标准小鼠IgG1(小鼠mAB抗-OVA)加入平板内并在37 $^\circ\text{C}$ 孵育2小时。加入山羊抗-小鼠IgG HRP(Pierce, Rockford, IL)并将平板孵育30分钟。加入TMB溶液(KPL, Gaithersburg, MD)并显色。使用酶标仪在450nm测量光密度(Bio-rad, Hercules, CA)。结果如图13中所示,结果

表明4b4.12mAB显著降低抗-卵清蛋白的血清浓度。

[0474] 实施例13:CD1小鼠中4B4.12对Synagis的分解代谢的影响

[0475] 对CD1小鼠 (n=4) (Charles River Laboratories) 使用Synagis 1mg/kg进行腹膜内注射。72小时后,腹膜内注射4B4.12,MIgG1或PBS (20mg/kg)。4、6和10天后,获取小鼠血清并使用ELISA确定Synagis浓度。使用ELISA包被缓冲液 (Sigma) 中浓度为10 μ g/ml的抗-人IgG (FAB')₂抗体将ELISA平板在37 $^{\circ}$ C包被1小时。用PBST清洗两次以后,使用PBS/2%BSA将平板在37 $^{\circ}$ C阻断1小时。两次清洗后,将血清样品以1比50稀释开始两倍稀释并一式两份加入平板中 (100 μ l/孔)。将平板在37 $^{\circ}$ C孵育 2小时。用PBST清洗三次以后,在平板中加入山羊抗-人IgG Fc的HRP轭合物并在室温下孵育40分钟。用PBST清洗四次以后,在平板中加入TMB底物 (KPL) 并在室温下孵育5分钟。使用终止溶液 (KPL) 将显色反应终止并在酶标仪 (Molecular Devices) 下读板。

[0476] 第4天的结果如图14所示,结果表明与对照抗体MIgG2a或PBS相比,mAb 4B4.12 mAB增强了Synagis的分解代谢。三个处理组的10天内的Synagis浓度如图15所示,结果表明当与MIgG2a或PBS相比较时,mAb 4B4.12从第4天到第10天一贯地增强了 Synagis的分解代谢。

[0477] 实施例14:大鼠模型中mAB 4B4.12对自身免疫性疾病的治疗效能

[0478] 实验性自身免疫性疾病,重症肌无力 (EAMG),可在大鼠中通过被动转移抗-AchR mAB35诱发 (Socrates等Journal of Neuroimmunology.15:185-194 (1987))。在EAMG 大鼠模型中对与大鼠FcRn交叉反应的单克隆抗体4B4.12影响疾病状态的能力进行了评估。

[0479] 使用了4-5周大的雌性Lewis大鼠 (75-100g)。对大鼠进行了清楚的耳标。在诱发疾病前24小时,诱发疾病的当天和诱发疾病后24小时腹膜内注射施用单克隆抗体。在诱发疾病的当天,首先腹膜内给予FcRn阻断mAB或对照mAB然后在2小时后腹膜内注射mAB35。注射量为1ml。实验中使用了三组 (6只大鼠/组) 大鼠:第一组使用mAB 4B4.12处理,第二组使用1813 (对照mAB) 处理,第三组使用PBS处理。诱发疾病后的48小时,从每只大鼠获取100 μ l血清用于测量mAB35和小鼠mAB。实验方案总结于表5中。

[0480] 表5:处理实验方案

[0481]

组#	处理			样品
	第-1天	第0天	第+1天	第+2天
1	4B4.12 40mg/kg IP 第2批 - 4.98mg/ml	4B4.12 IP, 随后 (2h 后)mAB35 IP	4B4.12 40mg/kg IP	取血获得血清
2	1813 40mg/kg IP 第2批 - 4.67mg/ml	1813 IP, 随后 (2h 后) mAB35 IP	1813 40mg/kg IP	取血获得血清
5	PBS	PBS, 随后 (2h 后) mAB35 IP	PBS	取血获得血清

[0482] 诱发疾病的12个小时后每天观察大鼠的疾病病征两次。使用了以下记分系统:0

级,无症状;(1)弱握力、易疲劳和时喘;(2)一般性虚弱,休息时驼背,体重降低,发抖;(3)严重虚弱,濒死;以及(4)死亡。实验方案总结于表5。所得结果如表6和图16所示,结果表明在EAMG模型中mAB 4B4.12降低了疾病的严重性。

[0483] 表6:疾病状态

[0484]

组	未患病	患病
4B4.12	2	4
1813 (mIgG2a)	0	6
PBS	0	6

[0485] 确定了在每个实验组中大鼠的体重降低或体重升高。结果如表7和图17所示,结果表明相对于对应的对照组,经过4B4.12mAB处理的大鼠体重下降。

[0486] 表7:体重变化

[0487]

组	体重升高	体重降低
4B4.12	3	3
1813 (mIgG2a)	0	6
PBS	1	5

[0488] 实施例15:在TG32b小鼠中本发明的抗体对人IgG分解代谢的影响

[0489] 在 $t=0$ 小时(T_0)向成年TG32B小鼠静脉内注射5mg/kg的生物素-hIgG和495 mg/kg的人IgG(MP Biomedicals,Irvine,CA)。然后在第24、48、72、96和120小时,向小鼠静脉内注射50mg/kg的本发明的抗体。在每个时间点使用PBS进行对照注射。在所有时间点注射前以及第168小时取血样。制备血清并在 -20°C 储存直到使用ELISA 测量生物素-hIgG。

[0490] 将链霉亲和素包被的平板(Pierce)使用PBST(含0.05%吐温20的PBS)清洗三次再水化。将血清样品和标准在含2%BSA的PBS(稀释缓冲液)中稀释。样品稀释率为1:10,000、1:20,000、1:30,000和1:40,000。将标准从200ng/ml两倍稀释到1.56ng/ml。将平板在 37°C 孵育2小时随后使用PBST清洗三次。将平板与在稀释缓冲液中以1:25,000稀释的100 μl /孔山羊抗-人Fc-HRP轭合物(Pierce)在室温下孵育30分钟。用PBST清洗三次以后,在平板中加入100 μl TMB溶液(BioFxx)并将平板在暗处于室温下孵育直到适当显色(当最高标准的孔变深蓝色时)。然后加入100 μl /孔的0.25M H_2SO_4 终止显色反应并在450nm测量OD。

[0491] 结果显示3B3.11显著降低生物素-hIgG的血清浓度,表明FcRn阻断后hIgG分解代谢的增加(图18&19)。

[0492] 实施例16:mAb跨物种反应性的总结

[0493] 在FACS结合检测法和FACS抑制检测法中研究了MAB 4B4.12、3B3.11、31.1、4.13和3B5.4对FcRn的跨物种反应性。制备了人FcRn表达细胞(293C11)和猴FcRn 表达细胞。大鼠和小鼠FcRn表达细胞来自布兰迪斯大学的Neil Simister。在阻断实验中,将FcRn表达细胞与Alexa-A488标记的hIgG1(100nM)和各种浓度的mAB(4B4.12、3B3.11、31.1、4.13和3B5.4或同种型对照比如IgG1,IgG2a)在pH6 PBS缓冲液中孵育。45分钟以后,通过荧光染色分析细胞并计算TMFI(具体方法参见实施例6)。如果 mAB对IgG1与相应的FcRn表达细胞的结合的抑制超过了30%,则认为在该物种中该 mAb为阻断mAB。对于结合实验,将FcRn表达

细胞与Alexa-A488标记的mAB(4B4.12、3B3.11、31.1、4.13和3B5.4或同种型对照比如IgG1,IgG2a)在pH7.4PBS缓冲液中孵育60分钟。经过一次PBS缓冲液清洗后,在Coulter流式细胞仪中检测细胞的荧光染色。如果特定mAB与细胞的结合显著超过同种型对照结合(TMFI高50%),则认为该 mAb能够与该物种的FcRn结合。表8和图20显示所得结果的总结。

[0494] 表8:mAB交叉反应性的总结

[0495]

mAB	同种型	结合				阻断			
		人	猴	大鼠	小鼠	人	猴	大鼠	小鼠
4B4.12	IgG2a	是	是	是	是	是	是	是	是
3B3.11	IgG1	是	是	否	是	是	是	否	否
31.1	IgG1	是	否	否	否	是	否	否	否
4.13	IgG1	是	否	是	是	是	否	否	否
3B5.4 (抗- β 2M)	IgG2a	是	是	是	是	是	是	是	否

[0496] 实施例17:使用抗-hFcRn mAB染色的猴FcRn瞬时转染子

[0497] 使用Gene Jammer转染试剂(Stratagene)将Cos1细胞转染猴FcRn重链(pCDNA6)和 β 2M(pED.dc)。48小时以后,收获细胞并使用含0.5%BSA的PBS清洗一次。将 5×10^5 个细胞与mAB一起在冰上孵育45分钟。然后使用含0.5%BSA的PBS洗细胞一次。然后将细胞与Alexa 488标记的山羊抗-小鼠IgG(1:2500稀释)一起在冰上孵育45分钟。清洗一次以后,在Coulter流式细胞仪中分析细胞的荧光染色。结果表示为TMFI。

[0498] 实施例18:使用抗-hFcRn mAB的蛋白印迹

[0499] 将3 μ g可溶性人FcRn(重链胞外域和 β 2M)加样到4-20%Tris-甘氨酸凝胶(Invitrogen)的每条泳道并在200V下电泳60分钟。然后将凝胶和PVDF膜(Amersham)一起放入凝胶印迹仪(Xcell II,Invitrogen)并在室温下、55V印迹1小时。然后使用含5%牛奶的PBST(PBS加0.05%吐温20)阻断膜1小时。此后,将膜在4℃与10 μ g/ml各种mAB一起孵育过夜。PBST洗两次以后,将膜与1:10,000稀释的山羊抗-人IgG HRP(Southern Biotech Associates)一起孵育90分钟。另外两次清洗后,使用ECL试剂盒(Amersham)将膜显色。所得结果表明mAB 3B3.11、3B3.16、3B3.21、3B3.35、4.13、15B6.1和31.1识别人FcRn重链而3B5.4和5A4.9识别 β 2M(图21)。

[0500] 实施例19:3B3.11的Biacore分析

[0501] 使用标准胺偶联技术将大约500RU可溶性人FcRn或可溶性猴FcRn(在pH 4.5稀释100 $\times$ 于醋酸)对CM5阵列(Biacore)包被。开始于最初浓度10 μ g/mL,制备抗体的五个五倍连续稀释。将每个稀释物一式两份以50 μ l/min的流过芯片1分钟。所得数据解读为1:1结合相互作用。检查了在pH 6和pH 7.4二者下的结合(图22和表9)。

[0502] 表9.抗-hFcRn mAb 3B3.11的Biacore分析

[0503]

mAb	人 FcRn			
	pH 6.0		pH 7.4	
	KD (nM)	离解速率 (sec^{-1}) $\times 10^{-4}$	KD (nM)	离解速率 (sec^{-1}) $\times 10^{-4}$
3B3.11	1.17 ± 0.39	1.76 ± 0.79	0.16 (n=2)	0.0145 (n=2)
3B3_11 (犬)	3.23 ± 0.14	5.52 ± 5.4	3.24 ± 0.30	2.47 ± 2.3

[0504] 实施例20:抗-hFcRn mAB的表位作图

[0505] 可溶性人FcRn和小鼠单克隆抗体均为内部制备。除非另外说明,否则所有试剂、缓冲液和化合物均购自Biacore AB (Uppsala, Sweden)。

[0506] 设备和表面制备:使用表面等离子体共振对大分子相互作用的分析已有具体描述(1)。使用了BIACORE 3000设备(Biacore AB)并且所有的结合相互作用均在25℃进行。羧甲基修饰的葡聚糖(CM5)传感芯片被用于该分析。将抗-FcRn单克隆抗体在10 mM醋酸钠(pH 5.0)中稀释到1-10μg/mL并使用如(1)中所述的胺偶联将其固定于传感芯片的一个流动槽内(flow-cell)。最终固定水平为大约10000共振单位(RU)。在存在非FcRn特异性抗体(mAB 1745)的条件下使用相同的步骤在另一个流动槽建立对照抗体表面并将其用作结合研究的参考。

[0507] 检测法设计:以27个肽的连续系列合成可溶性人FcRn(shFcRn)的氨基酸序列,每个肽长度延长20个残基。这些肽具有10个氨基酸的重叠序列。将这个肽溶于100% DMSO到最终浓度1-5mg/mL。在分析中,将该肽溶液于HBS-N缓冲液(10mM HEPES, pH 7.4;150mM NaCl)中稀释100倍并以20uL/min的速度注射到FcRn特异性抗体和参考表面。经过35s. 离解相后,通过30s的10mM甘氨酸(pH 2.0)脉冲和25s的1% SDS脉冲以流速60uL/min恢复表面。作为阳性对照,在检测第一个肽之前和最后一个肽之后将shFcRn注射到特异性和对照流动槽。也将缓冲液对照(含1%DMSO的HBS-N)作为阴性对照流过两个流动槽。

[0508] 数据评估:从FcRn包被的传感图中自动除去对照包被的(非特异性mAB)流动槽中生成的传感图(RU对比时间)。在注射相结束前30s测量平衡状态的反应(Req) (1)。阳性反应表明肽与特异性抗体的特异性结合(Frostell-Karlsson,等J.Med.Chem.,43: 1986-1992 (2000))。

[0509] mAb表位总结

[0510] Syn 558:Ac-SCPHRLREHLERGRGNLEWK-CONH2-----mAB 4B4.12,4.13 (SEQ ID NO: 24)

[0511] Syn 559:Ac-ERGRGNLEWKEPPSMRLKAR-CONH2-----mAB 4B4.12,4.13 (SEQ ID NO: 25)

[0512] Syn 562:Ac-CSAFSFYPPELQLRFLRNGL-CONH2-----mAB 3B3.11,4.13 (SEQ ID NO: 26)

[0513] Syn 544:Ac-APGTPAFWVSGWLGPQQYLS-CONH2-----mAB 31.1 (SEQ ID NO: 27)

[0514] 实施例21:Fab的选择和初级筛选

[0515] A.选择实验方案

[0516] 将可溶性Fab (sFab) 从展示Fab片段的噬菌体展示库中识别出来。使用可溶性人FcRn蛋白 (shFcRn) 或大鼠FcRn蛋白和表达人FcRn蛋白的293 C11细胞进行四种不同的选择。还使用细胞和蛋白靶标的组合、使用相同的洗脱策略进行额外的选择,如下所列:

[0517] (1) 对生物素化的shFcRn的选择:进行三轮对生物素化的shFcRn的选择和在链霉亲和素珠上的消耗。使噬菌粒在酸性结合缓冲液 (pH 6) 中与靶标结合,然后使用含市售非特异性人IgG (Calbiochem, 401114 <http://www.emdbiosciences.com/product/401114>) 和单克隆小鼠抗-人FcRn mAb (3B3) 在酸性缓冲液中洗脱。在竞争性洗脱之后,通过直接珠感染细胞将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用作下一轮选择的输入。

[0518] (2) 对非生物素化的shFcRn的选择:进行三轮对被动固定在96孔ELISA平板上的非生物素化的shFcRn的选择和在BSA包被的孔上的消耗。使噬菌粒在酸性结合缓冲液 (pH 6) 中与靶标结合,然后使用含市售的非特异性人IgG和抗-人FcRn mAb (3B3) 的同样的酸性缓冲液洗脱。在竞争性洗脱之后,通过直接感染细胞和使用pH7.4的缓冲液将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用作下一轮选择的输入。

[0519] (3) 对抗-人FcRn抗体 (17D3) -固定的非生物素化的shFcRn的选择:对使用链霉亲和素珠上生物素化的17D3捕获的hFcRn进行三轮选择。还包括使用链霉亲和素珠上生物素化的17D3在不存在FcRn的条件下的消耗步骤。使噬菌粒在酸性结合缓冲液 (pH 6) 中与靶标结合,然后使用含市售的非特异性人IgG和抗-人FcRn mAb (3B3) 的同样的酸性缓冲液洗脱。在竞争性洗脱之后,通过直接珠感染细胞将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用作下一轮选择的输出。

[0520] (4) 对hFcRn表达细胞的选择:对hFcRn转染细胞进行三轮的选择和在未转染的亲代细胞的消耗。使噬菌粒在酸性结合缓冲液 (pH 6) 中与细胞结合,然后使用含非特异性人IgG和抗-FcRn mAb的同样的酸性缓冲液洗脱。在竞争性洗脱之后,通过磁性链霉亲和素珠的细胞裂解和随后的细菌感染将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用作下一轮选择的输入。对可溶性人FcRn蛋白 (shFcRn) 和hFcRn-表达细胞二者的选择:

[0521] 以上 (1) 和 (2) 和 (4) 所得结果用于使用以上相同的洗脱策略的交替的蛋白:细胞:蛋白和细胞:蛋白:细胞 (第1轮:第2轮:第3轮:第4轮) 选择。

[0522] B). 对FcRn的Fab抑制剂的ELISA筛选。

[0523] 为了鉴别hFcRn结合剂,在噬菌体ELISA中对来自以上所述的对生物素化的shFcRn的每个选择臂的第2和/或3轮的结果进行初级筛选。将噬菌粒上大约768个初级ELISA阳性的Fab重新排列,将DNA测序,并进一步对pH依赖型结合 (pH 6 vs. pH 7.5)、物种特异性 (大鼠 vs. 人)、 β 2微球蛋白结合,和IgG竞争进行第二筛选。

[0524] 通过第二ELISA筛选的一百六十一个独特噬菌粒具有不同的重链。将所有的161个独特噬菌粒亚克隆并以sFab的形式表达且在FACS阻断检测中进行筛选。

[0525] 在4°C的酸性环境下进行的对IgG-Fc与人FcRn-表达293 C11细胞结合的阻断导致发现十一个具有拮抗性抗-FcRn特性的sFab。将所有十一个sFab Fc-FcRn阻断剂重建到IgG1内并重建 (reformat) 为AZ异型并在体外进一步表征其对可溶性人和大鼠FcRn 的亲合性 (通过SPR确定 K_D)、使用FACS分析Fc-FcRn阻断 (IC_{50})、 β 2微球蛋白结合 (使用SPR)、在pH 6和pH 7.5对可溶性蛋白和细胞的pH依赖型结合和阻断 (FACS 中和使用SPR的人和大鼠FcRn)。

[0526] 实施例22:抗FcRn Fab

[0527] 在噬菌体展示库选择中鉴别的示例性抗FcRn的Fab的CDR序列如表10所示。

[0528] 表10. 抗-FcRn噬菌粒Fab的氨基酸CDR序列总结

[0529]

Fab	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
532A-M 0090-F0 9	SGSSSNIGSNT VS (SEQ ID NO: 28)	SDNQRP S (SEQ ID NO: 29)	AAWDDSLK GWV (SEQ ID NO: 30)	DYTMS (SEQ ID NO: 31)	SIWSSGGAT VYADSVKG (SEQ ID NO: 32)	DIRGSRNWF DP (SEQ ID NO: 33)
532A-M 0090-F1 1	TGTGSDVGS YNLVS (SEQ ID NO: 34)	GDSQRP S (SEQ ID NO: 35)	CSYAGSGIY V (SEQ ID NO: 36)	EYAMG (SEQ ID NO: 37)	SIGSSGGQT KYADSVKG (SEQ ID NO: 38)	LSTGELY (SEQ ID NO: 39)
532A-M 0062-C0 9	RSSQSLLHSN GYNYLD (SEQ ID NO: 40)	LVS NRA S (SEQ ID NO: 41)	MQAQQTPTI (SEQ ID NO: 42)	IYSMT (SEQ ID NO: 43)	SIVPSGGETS YADSVKG (SEQ ID NO: 44)	GHSGVGMD V (SEQ ID NO: 45)
532A-M 0064-H0 4	RSSQSLLHGN GHTYLD (SEQ ID NO: 46)	LVS NRA S (SEQ ID NO: 47)	MQGLQTPR T (SEQ ID NO: 48)	FYSMT (SEQ ID NO: 49)	GIRSSGGSTR YADSVKG (SEQ ID NO: 50)	GWGLDAFDV (SEQ ID NO: 51)
532A-M 0057-F0 2	RSSL SLLHSN GYIYLD (SEQ ID NO: 52)	LGSHRA S (SEQ ID NO: 53)	MQPLQTPY T (SEQ ID NO: 54)	YYHMN (SEQ ID NO: 55)	VISPSGGVT MYADSVKG (SEQ ID NO: 56)	GKAFDI (SEQ ID NO: 57)
532A-M 0084-B1 1	SGDKLGDKY VS (SEQ ID NO: 58)	QDNRRP S (SEQ ID NO: 59)	QAWLSNTA SVA (SEQ ID NO: 60)	FYGMH (SEQ ID NO: 61)	GIYSSGGITG YADSVKG (SEQ ID NO: 62)	GLRTFDY (SEQ ID NO: 63)
532A-M 0084-B0 3	RASQPVGSYL A (SEQ ID NO: 64)	GASNRA T (SEQ ID NO: 65)	QHYGHSP YT (SEQ ID NO: 66)	SYAMY (SEQ ID NO: 67)	RIVPSGGGT MYADSVQG (SEQ ID NO: 68)	GMDV (SEQ ID NO: 69)
532A-M 0073-E1 0	RASQSVSSYL A (SEQ ID NO: 70)	DASNRA T (SEQ ID NO: 71)	QQRSNWPL T (SEQ ID NO: 72)	NYNMS (SEQ ID NO: 73)	YISPSGGST WYADSVKG (SEQ ID NO: 74)	YHYGMDV (SEQ ID NO: 75)
532A-M 0056-G0 5	RASQSISNHL V (SEQ ID NO: 76)	DASNRA T (SEQ ID NO: 77)	QQRSNWPP T (SEQ ID NO: 78)	YYGMT (SEQ ID NO: 79)	SISPSGGHTS YADSVKG (SEQ ID NO: 80)	GPEYFFGVY (SEQ ID NO: 81)
532A-M 0055-G1 2	RASQSVGSYL N (SEQ ID NO: 82)	AAYILQS (SEQ ID NO: 83)	QQSYSNRIT (SEQ ID NO: 84)	AYNMI (SEQ ID NO: 85)	SIGPSGGKT VYADSVKG (SEQ ID NO: 86)	VRSGFWSGH DY (SEQ ID NO: 87)
532A-M 0092-D0 2	RASQSVSSSY LA (SEQ ID NO: 88)	GASSRA T (SEQ ID NO: 89)	QQYGSSPRT (SEQ ID NO: 90)	HYGMS (SEQ ID NO: 91)	YIRPSGGKTI YADSVKG (SEQ ID NO: 92)	DSWGSFPND AFDI (SEQ ID NO: 93)

[0530] 这些Fab的轻链可变区(LV)的DNA序列如下所示:

[0531] >M0062-C09 LV_k

[0532] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAA
CTATTTGGATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGGCAGTCTCCGCAGCTCCTGATCTATTT
GGTTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCA
CAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGGATTTTATTACT
GCATGCAAGCTCAACAACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT AAA (SEQ ID NO:94)

[0533] >M0057-F02 LV_k

[0534] CAAGACATCCAGATGACCTAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATGTCCTGCAGGTCTAGTCTGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAT
CTATTTGGATTGGTACCTGCAGAGGCCAGGACAGTCTCCACAGCTCCTGATGTATTT
GGGTTCTCATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCA
CAGATTTTACACTGAACATCAGCAGAGTGGAGGCGGAGGATGTTGGGGTTTATTACT
GCATGCAACCTCTACAACTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATC AAA (SEQ ID NO:95)

[0535] >M0055-G12 LV_k

[0536] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTTGGCAGTTATTTAAATTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGCGAAGCCCCTAAGGCCCTGATCTATGCTGCATACATTTTGCAA
AGTGGGGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGCGGCTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAACAGTCTACAACCTGAAGATTTTGCACCTTATTACTGTCAACAGAGTTACAG
TAATAGAATCACTTTCGGCCCTGGGACCAGAGTGGATGTCAAA (SEQ ID NO:96)

[0537] >M0064-H04 LV_k

[0538] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCACGGAAATGGACACA
CCTATTTGGATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTT
GGTTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCA
CAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTTGGGGTTTATTACT
GCATGCAAGGTCTACAACTCCGAGGACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA (SEQ ID NO:97)

[0539] >M0056-G05 LV_k

[0540] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGCAACCACTTAGTCTGGT
TCCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG
GCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAG
CAACTGGCCTCCCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 98)

[0541] >M0084-B03 LV_k

[0542] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AACAGCCACCCTCTCCTGCCGGGCCAGTCAGCCTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGT

ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAATAGG
GCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CGCCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGAGTGTATTACTGTCAGCACTATGG
TCACTCACCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:99)

[0543] >M0092-D02 LVκ

[0544] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGC
AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA
CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGT
ATGGTAGCTCACCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:100)

[0545] >M0090-F09 LVλ

[0546] CAGAGCGCTTTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGAGACCCCCGGGCAGAGAGT
CACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAGCTGGTA
CCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTGATAATCAGCGGCC
CTCAGGGGTCCCTGACCGATTTCGCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCTGCCTCCCTGGC
CATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAATATCACTGTGCAGCATGGGATG
ACAGCCTGAAGGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACAAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:101)

[0547] >M0084-B11 LVλ

[0548] CAGAGCGCTTTGACTCAGACACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCCGGACAGACAGC
CACCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAGTATGTTTCTTGGTTTCAACA
GAAGCCAGGCCAGTCCCCTATCCTACTCCTTTATCAAGACAACAGGCGGCCCTCTGG
GATCCCTGAACGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACAGCCTCTCTGACCATCAG
CGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTACCACTGTCAGGCGTGGCTCAGCAATA
CTGCTTCCGTGGCATTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCCTC (SEQ ID NO:102)

[0549] >M0073-E10LVκ

[0550] CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGT
ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGG
GCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
CACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAG
CAACTGGCCCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 103)

[0551] >M0090-F11 LVλ

[0552] CAGAGCGTCTTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGGTCTCCTGGACAGTCGAT
CACCATCTCCTGCACTGGGACCGGGAGTGATGTTGGAAGTTATAACCTTGTCTCCTG
GTACCAAAAGTACCCCGGCAAAGCCCCCAAACCTCATCATTTATGGGGACAGTCAGC
GGCCCTCGGGACTTTCTAGTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACTCGGCCTCCC
TGACAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTTGCTCATATG
CAGGTAGTGGCATTTACGTCTTTGGCAGTGGGACCAAGGTACCGTCCT A (SEQ ID NO:104)

[0553] 实施例23:sFab和抗体与FcRn的结合

[0554] 为了进一步表征Fab和其各自的IgG1,对FcRn结合呈阳性的十一个示例性拮抗性抗FcRn抗体克隆进行SPR 8500/BIACORE™分析以确定 K_D 。示例性SPR 8500/BIACORE™数据于表2和3中提供。在pH 6 和7.5检测了sFab和抗体(IgG)与人FcRn(hFcRn)或大鼠FcRn(大鼠FcRn)结合的能力。使用SPR 8500和BIACORE™测量结合并以 K_D 值(nM)表示。观察到8个克隆的结合为pH独立型而3个为pH依赖型。

[0555] 表11A到E:FcRn结合sFab的体外SPR 8500结合数据(K_D (nM))总结;结合/离解速率分析

[0556] A. 结合数据

[0557]

拮抗性抗-FcRn IgG 数据	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500
可溶性 Fab	可溶性 FAB	可溶性 FAB	可溶性 FAB	可溶性 FAB
	可溶性 hFcRn	可溶性 hFcRn	可溶性大鼠 FcRn	可溶性大鼠 FcRn
克隆 #	K_D nM @ pH 6	K_D nM @ pH 7.5	K_D nM @ pH 6	K_D nM @ pH 7.5
532A-M0090-F11	9.2	19.1	31.2	9.9
532A-M0064-H04	28	25.9	无结合	无结合
532A-M0090-F09 (pH 依赖型)	5.7	无结合	无结合	无结合
532A-M0084-B03 (pH 依赖型)	不适合	无结合	无结合	无结合
532A-M0062-C09 (pH 依赖型)	25	无结合	无结合	无结合
532A-M0055-G12	12	39.7	无结合	无结合
532A-M0056-G05	13.6	18.1	无结合	无结合
532A-M0084-B11	17.4	19.6	无结合	无结合
532A-M0092-D02	3.9	18.7	无结合	无结合
532A-M0073-E10	82	9.7	无结合	无结合
532A-M0057-F02	29	11.3	无结合	无结合

[0558] B.hFcRn pH 6

[0559]

	k结合	k离解	KD
17D3	2.77E+05	4.30E-04	1.5E-09
3B3	3.82E+06	1.31E-03	3.4E-10
Fcl	---	---	---
hlgG 骨髓瘤	---	---	---
hlgG 血浆	4.32E+03	2.31E-03	5.3E-07
X0002 - G07	2.06E+04	1.24E-04	6.0E-09
M0055 - G12	1.27E+06	1.53E-02	1.2E-08
M0057 - F02	1.48E+05	4.26E-03	2.9E-08
M0062 - C09	9.44E+04	2.38E-03	2.5E-08
M0064 - H04	1.29E+05	3.68E-03	2.8E-08
M0073 - E10	3.36E+05	2.75E-02	8.2E-08
M0090 - F11	9.68E+04	8.97E-04	9.2E-09
X0002 - A07	---	---	---

[0560] C.hFcRn pH 7.4

	k结合	k离解	KD (
17D3	3.24E+05	5.23E-04	1.61E-09
3B3	2.97E+06	1.76E-03	5.93E-10
Fcl	---	---	---
hlgG 骨髓瘤	---	---	---
hlgG 血浆	---	---	---
X0002 - G07	---	---	---
M0055 - G12	2.01E+05	7.96E-03	3.97E-08
M0057 - F02	3.25E+05	3.67E-03	1.13E-08
M0062 - C09	---	---	---
M0064 - H04	1.55E+05	4.02E-03	2.59E-08
M0073 - E10	3.59E+05	3.49E-03	9.71E-09
M0090 - F11	5.94E+04	1.13E-03	1.91E-08
X0002 - A07	---	---	---

[0562] D.大鼠FcRn pH 6

	k结合	k离解	KD
17D3	1.74E+04	6.03E-03	3.40E-07
3B3	6.83E+05	1.04E-03	1.50E-09
Fcl	2.08E+05	3.29E-03	1.58E-08
hlgG 骨髓瘤	1.30E+05	1.27E-03	9.80E-09
hlgG 血浆	9.13E+04	2.42E-03	2.65E-08
X0002 - G07	9.70E+04	8.62E-04	8.90E-09
M0055 - G12	---	---	---
M0057 - F02	---	---	---
M0062 - C09	---	---	---
M0064 - H04	---	---	---
M0073 - E10	---	---	---
M0090 - F11	1.84E+04	5.73E-04	3.12E-08
X0002 - A07	---	---	---

[0564] E.大鼠FcRn pH 7.4

	k结合	k离解	KD
17D3	---	---	---
3B3	---	---	---
Fcl	---	---	---
hlgG 骨髓瘤	---	---	---
hlgG 血浆	---	---	---
X0002 - G07	---	---	---
M0055 - G12	---	---	---
M0057 - F02	---	---	---
M0062 - C09	---	---	---
M0064 - H04	---	---	---
M0073 - E10	---	---	---
M0090 - F11	2.75E+04	7.40E-04	9.96E-09
X0002 - A07	---	---	---

[0566] 表12A到E:FcRn结合抗体的体外SPR 8500结合数据(K_D(nM))总结;结合/离解速率分析

[0567] A.结合数据

[0568]

拮抗性抗-FcRn IgG 数据	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500	SPR 8500
------------------	----------	----------	----------	----------

[0569]

形式	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	大鼠 FcRn	大鼠 FcRn
克隆 #	K_D @pH 6	K_D @pH 7.5	K_D @pH 6	K_D @pH 7.5
532A-M0090-F11	2.44	10.8	9.8	9.14
532A-M0064-H04	6.82	12.5	31	无结合
532A-M0090-F09 (pH 依赖型)	3.64	不适合	13.9	无结合
532A-M0084-B03 (pH 依赖型)	2.99	不适合	29.6	无结合
532A-M0062-C09 (pH 依赖型)	29.5	不适合	不适合	无结合
532A-M0055-G12	3.1	10.2	16	无结合
532A-M0056-G05	2.48	2.1	22.9	无结合
532A-M0084-B11	3.3	2.59	6.43	无结合
532A-M0092-D02	17.9	24.2	30.2	无结合
532A-M0073-E10	不适合	不适合	不适合	无结合
532A-M0057-F02	NA	NA	NA	无结合

[0570] B.hFcRn pH 6

	k结合	k离解	KD
M62-C9 (Fab)	8.12E+04	1.60E-03	1.97E-08
M90-F11(Fab)	9.21E+04	5.63E-04	6.11E-09
M62-C09 (IgG)	2.36E+05	6.95E-03	2.95E-08
M90-F11 (IgG)	1.02E+06	2.48E-03	2.44E-09
3B3	2.30E+06	9.40E-04	4.09E-10
17D3	8.17E+04	1.81E-04	2.22E-09
M92-D2	3.87E+04	6.92E-04	1.79E-08
M56-G05	1.13E+05	2.80E-04	2.48E-09
M84-B03	1.14E+05	3.40E-04	2.99E-09
SA-A08	---	---	---
FCI	---	---	---
人IgG骨髓瘤	---	---	---
人IgG血浆	3.89E+04	6.85E-04	1.76E-08
X11-5	---	---	---
M55-G12	7.49E+04	2.32E-04	3.10E-09
M73-E10	---	---	---
M84-B11	7.53E+04	2.48E-04	3.30E-09
M64-H04	1.04E+05	7.06E-04	6.82E-09
M90-F09	3.14E+05	1.14E-03	3.64E-09

[0571]

[0572] C.hFcRn pH 7.4

[0573]

	k结合	k离解	KD
M90-F11(Fab)	9.12E+04	6.45E-04	7.08E-09
M90-F11 (IgG)	1.59E+05	1.73E-03	1.08E-08
SA-A08	---	---	---
FCI	---	---	---
M84-B11	1.31E+05	3.41E-04	2.59E-09
M64-H04	2.17E+05	2.71E-03	1.25E-08
M73-E10	---	---	---
M55-G12	7.78E+04	7.97E-04	1.02E-08
X11-5	---	---	---
M62-C09	---	---	---
M62-C09 IgG	---	---	---
M84-B03	---	---	---
M56-G05	4.14E+05	8.68E-04	2.10E-09
M90-F09	---	---	---
3B3	3.41E+06	2.30E-03	6.75E-10
M92-D2	8.16E+04	1.98E-03	2.42E-08
17D3	1.21E+05	2.42E-04	2.01E-09
人IgG骨髓瘤	---	---	---
人IgG血浆	---	---	---

[0574] D. 大鼠FcRn pH 6

[0575]

	k结合	k离解	KD
M90-F11 (IgG)	1.19E+05	1.17E-03	9.80E-09
M90-F11(Fab)	4.30E+04	8.72E-04	2.03E-08
M90-F09	3.21E+05	4.46E-03	1.39E-08
M62-C09 (Fab)	---	---	---
M62-C09	---	---	---
M64-H04	7.80E+04	2.42E-03	3.10E-08
M84-B11	3.14E+05	2.02E-03	6.43E-09
M73-E10	---	---	---
M55-G12	1.99E+05	3.20E-03	1.60E-08
X11-5	---	---	---
M84-B03	1.56E+05	4.63E-03	2.96E-08
M56-G05	4.78E+04	1.09E-03	2.29E-08
M92-D2	4.93E+04	1.49E-03	3.02E-08
M55-G12	1.99E+05	3.20E-03	1.60E-08
3B3	---	---	---
人IgG血浆	2.33E+05	1.42E-03	6.12E-09
人IgG骨髓瘤	---	---	---
FCI	---	---	---
SA-A08	---	---	---

[0576] E. 大鼠FcRn pH 7.4

[0577]

	k结合	k离解	KD
M90-F11	1.17E+06	3.84E-03	3.29E-09
M90-F11 (IgG)	1.25E+05	1.14E-03	9.14E-09
SA-A08	---	---	---
FCI	---	---	---
M84-B11	---	---	---
M64-H04	---	---	---
M73-E10	---	---	---
M55-G12	---	---	---
X11-5	---	---	---
M62-C09	---	---	---
M62-C09 (IgG)	---	---	---
M84-B03	---	---	---
M56-G05	---	---	---
M90-F09	---	---	---
3B3	---	---	---
M92-D2	---	---	---
17D3	---	---	---
人IgG骨髓瘤	---	---	---
人IgG血浆	---	---	---

[0578] 实施例24: sFab和抗体的IC₅₀值

[0579] 在体外模型中检测了对FcRn结合呈阳性的十一个示例性的拮抗性抗FcRn克隆的

sFab和IgG抗体阻断非特异性人IgG-Fc与FcRn结合的能力。使用结合阳性克隆的Fab 或 IgG1、阳性对照抗-大鼠FcRn抗体 (1G3)、阳性对照抗-人FcRn抗体 (3B3)、或 SA-A2阴性对照将表达人FcRn (hFcRn) 或大鼠FcRn (大鼠FcRn) 的293C11细胞培养物进行处理。使用 ALEXAFLUOR® 标记的非特异性IgG-Fc对细胞培养物进行处理并在pH 6缓冲液条件下在4℃孵育。确定IgG-Fc-FcRn结合的量。示例性的sFab和/或其各自IgG的结果如表13中所示。使用流式细胞术(即, FACS) 确定IC₅₀值并以nM表示。

[0580] 表13:FcRn结合抗体的体外FACS抑制数据 (IC₅₀ (nM)) 总结

[0581]

拮抗性抗-FcRn IgG 数据	FACS (阻断)	FACS (阻断)	FACS (阻断)	FACS (阻断)
IC ₅₀	可溶性 FAB	可溶性 FAB	IgG	IgG
	hFcRn (细胞)	大鼠 FcRn (细胞)	hFcRn (细胞)	大鼠 FcRn (细胞)
克隆 #	IC ₅₀ nM @ pH 6	IC ₅₀ nM @ pH 6	IC ₅₀ nM @ pH 6	IC ₅₀ nM @ pH 6
532A-M0090-F11	13	6481	2.6	4.9
532A-M0064-H04	63	无阻断	1.8	20
532A-M0090-F09 (pH 依赖型)	645	无阻断	4.6	5.5
532A-M0084-B03 (pH 依赖型)	754	无阻断	1.8	91
532A-M0062-C09 (pH 依赖型)	35	无阻断	3.9	148
532A-M0055-G12	228	无阻断	1.7	30
532A-M0056-G05	337	无阻断	1.4	18
532A-M0084-B11	355	无阻断	1.9	25
532A-M0092-D02	271	无阻断	1.2	15
532A-M0073-E10	110	无阻断	377	161
532A-M0057-F02 (琥珀终止)	70	无阻断	NA	NA
链霉亲和素结合剂 SA-A2 IgG (阴性对照)	NA	NA	562	101
先导物 3B3 小鼠抗人 FcRn IgG			9.7	
先导物 1G3 小鼠抗大鼠 FcRn IgG	NA	NA		1.5

[0582] 实施例25:动物中FcRn-结合抗体的效能检测

[0583] 使用人FcRn敲入Tg32B转基因小鼠的实验表明,四次连续的每日静脉内注射 M90-F11 (也称为M090-F11和M0090-F11) IgG,在所有被测剂量下 (50、20、10和5 mg/kg) 显著缩短了IgG示踪物 (生物素化的hIgG) 的血清半衰期 (图23&24)。在50 mg/kg,四次iv注射M55-G12仅中度缩短示踪物hIgG的血清半衰期而M84-B11无效能 (图23)。使用单剂量M90-F11 (20mg/kg和5mg/kg) 在TG32B小鼠的血清中显示出中度的生物素-hIgG1示踪物降低 (图25)。

[0584] 用于检测转基因小鼠中的抗-FcRn IgG的实验方案为:

[0585] 1) 在0时间静脉内施用500mg/kg示踪物hIgG (大约1%被生物素化以用于定量)

[0586] 2) 在第24、48、72、96和120小时以50、20、10和5mg/kg静脉内给予抗-FcRn 抗体

[0587] 3) 在第24、48、72、96、120和168小时取血样

[0588] 4) 使用ELISA在血清中对hIgG定量

[0589] 根据Tg小鼠模型的体内数据,选择M90-F11作为进一步先导物(lead)优化的先导物候选物。导入M90-F11轻链的10项种系改变在下文和图29中给出。在重链中所需的一项种系改变没有被导入,然而已将重链的异型由AZ改变为F异型。

轻链恒定区

[0590] 恒定: S Q P K A N P T V T L F P P S S E E L Q A
AGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACCTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCC

种系: GGTCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTCACCTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCC
G Q P K A N P T V T L F P P S S E E L Q A

恒定: N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W
AACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGG

种系: AACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGG
N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W

恒定: K A D G S P V K A G V E T T K F S K Q S N
AAGGCAGATGGCAGCCCCCTCAAGGCGGGAGTGGAGACGACCAAAACCCCTCCAAACAGAGCAAC

种系: AAGGCAGATGGCAGCCCCCTCAAGGCGGGAGTGGAGACGACCAAAACCCCTCCAAACAGAGCAAC
K A D G S P V K A G V E T T K F S K Q S N

恒定: N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S
AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGC

种系: AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGC
N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S

恒定: Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P A E C S
TACAGCTGCCAGGTCAAGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGAGAAATGCTCT

种系: TACAGCTGCCAGGTCAAGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGAGAAATGCTCT
Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P A E C S

[0591] 恒定氨基酸(SEQ ID NO:107)

[0592] 恒定核酸(SEQ ID NO:108)

[0593] 种系核酸(SEQ ID NO:110)

[0594] 种系氨基酸(SEQ ID NO:109)

[0595] 重链氨基酸(SEQ ID NO:111)

[0596] 重链核酸(SEQ ID NO:112)

[0597] 种系核酸(SEQ ID NO:114)

[0598] 种系氨基酸(SEQ ID NO:113)

重: V: V3-23; J: JH1

FR1-H

重: E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C
GAAGTTCAATGTTAGACTCTGGTGGCGGTCTCTGTCAGCCTGGTGGTCTTTACGCTCTTCTTGC

种系: GAGGTSCAGCTGTTGSAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTCTGT
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C

CDR1-H

重: A A S G F T F S E Y A M G W V R Q A P G K G
GCTGCTTCGCGATTCACTTTCTCT GAGTACGCTATGGGT TGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGT

种系: GCAGCCTCTGGAATTCACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGC TGGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
A A S G F T F S S A Y M S W V R Q A P G K G

FR2-H

CDR2-H

重: L E W V S S I G S S G G Q T K Y A D S V K G
TTGGAGTGGGTTTCT TCTATCGGTTCTTCTGGTGGCCAGACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGT

种系: CTGGAGTGGGTTCTCA GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G

[0599]

FR3-H

重: R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A
CGCTTCACTATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCT

种系: CGGTTCAACATCTCCAGAGACAATCCAGAAGACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCC
R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A

CDR3-H

FR4-H

重: E D T A V Y Y C A R L S T G E L Y W G Q G T
GAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGA CTCTCAACAGGGGAGCTCTAC TGGGGCCAGGGCACC

种系: GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA GA.....TAC TGGGGCCAGGGCACC
E D T A V Y Y C A R L S T G E L Y W G Q G T

FR4-H

重: L V T V S S
CTGGTCACCGTCTCAAGC

种系: CTGGTCACCGTCTCATCA

- (a, z) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
- (f) -----
- (a, z) GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX
- (f) -----R
- (a, z) VEPKSCDKHTHTCPPEAPELIGGFSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
- (f) -----
- (a, z) DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
- (f) -----
- (a, z) LNKKEYRCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSPREPQVYT
- (f) -----
- (a, z) LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
- (f) -----M-----
- (a, z) SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
- (f) -----

[0600]

(a, z) (SEQ ID NO: 115)

(f) (SEQ ID NO: 116)

[0601] 实施例26: 亲代克隆M90-F11的种系化, 重建和亲和性成熟

[0602] IgG异型的变化如图30所示, 已将从AZ到F异型的三个氨基酸改变(高亮并以粗体表示) 导入已经在轻链具有作为种系化一部分的10个氨基酸改变的种系化的M90-F11 IgG。

[0603] 种系化的亲代克隆M90-F11在轻链中具有10个氨基酸改变并且作为先导物优化的一部分,将该种系化的克隆重建入在重链Fc区具有F异型序列的IgG中。相比较亲代 M90-F11一共有13处氨基酸改变,为在CHO细胞系中表达而优化重建的克隆的核苷酸序列。核苷酸序列/Genart优化的克隆被冠以DX-2500的名称,其用于生成稳定库。通过Biacore和FACS体外表征亲代M90-F11、种系化的M90-F11 (GL) 和DX-2500以评估其结合和阻断能力。

[0604] 表14和15包括比较高度纯化、亲代、种系化和重建IgG的Biacore和FACS分析结果:

[0605] 表14: Biacore分析: 将hFcRn固定在芯片上并将IgG流过芯片以及FACS分析(IC50)。

[0606]

抗hFcRn抗体数据	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	FACS (细胞)
	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn (细胞)
克隆 #	K_{on} @pH 6	K_{off} @pH 6	K_D @pH 6	K_{on} @pH 7.4	K_{off} @pH 7.4	K_D @pH 7.4	IC50 nM @ pH 6
532A-M0090-F11	2.13E+05	2.52E-04	1.18E-10	9.09E+05	7.02E-04	7.72E-10	0.43
532A-M0090-F11 (种系化的LC改变)	4.45E+06	7.64E-04	1.72E-10	9.96E+05	7.76E-04	7.79E-10	0.38
DX-2500 (种系化的LC&异型HC改变)	2.11E+06	3.36E-04	1.60E-10	1.26E+06	3.38E-04	2.68E-10	0.65

[0607] 表15: Biacore分析: 将IgG固定在芯片上并将hFcRn流过芯片。

[0608]

抗hFcRn抗体数据	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore	biacore
	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn	hFcRn
克隆 #	K_{on} @pH 6	K_{off} @pH 6	K_D @pH 6	K_{on} @pH 7.4	K_{off} @pH 7.4	K_D @pH 7.4
532A-M0090-F11	3.03E+05	3.12E-03	1.03E-08	1.81E+05	3.73E-03	2.05E-08
532A-M0090-F11 (种系化的LC改变)	5.74E+05	1.72E-02	2.99E-08	4.33E+05	1.52E-02	3.52E-08
DX-2500 (种系化的LC&异型HC改变)	6.42E+05	1.77E-02	2.76E-08	3.72E+05	7.52E-02	2.02E-08

[0609] 从前对抗-FcRn单克隆抗体的经验表明在pH7.4的 $K_{离解}$ 对该抗体的体内效能非常关键,在biacore分析中明显显示当抗体被固定在芯片上而靶标hFcRn流过芯片时,在pH 6&7.4种系化的抗体和DX-2500抗体的 $K_{离解}$ 快得多。我们决定使种系化的 M90-F11亲和性成熟以挑选具有比DX2500更佳 $K_{离解}$ 值的克隆。

[0610] 平行方法被用于使种系化的M90-F11亲和性成熟。建立了三个不同的库(LC改组, CDR 1&2和CDR3库)并如图26中所示。为了避免在选择亲和性成熟的先导物以后进一步对序列进行优化,使用了种系化的轻链来建立库2和3。

[0611] 选择实验方案

[0612] 从展示Fab片段的亲和性成熟的M90-F11噬菌粒展示库中鉴别可溶性Fab (sFab)。使用三个不同的亲和性成熟库,使用可溶性人FcRn蛋白(shFcRn)和表达人FcRn蛋白的293 C11细胞进行两种不同的选择。还使用细胞和蛋白靶标的组合、使用相同的洗脱策略进行额外的选择,如下所列:

[0613] i) 对生物素化的shFcRn的选择: 进行两轮对生物素化的shFcRn的选择和在链霉亲和素珠上的消耗。使噬菌粒在酸性结合缓冲液(pH 6)中与靶标结合,然后使用含亲代M90-F11 IgG的pH7.4的缓冲液洗脱。在竞争性洗脱/清洗之后,通过直接珠感染细胞将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用于下一轮选择的输入。第二轮输出用于对hFcRn转染细胞的交替的第三轮选择,并随后使用相同的洗脱策略使用生物素化的shFcRn选择进行

第四轮选择。

[0614] ii) 对hFcRn表达细胞的选择:进行了两轮对hFcRn转染细胞的选择。使噬菌粒在 4 度在酸性结合缓冲液 (pH 6) 中与靶标结合,然后使用含亲代M90-F11 IgG的pH7.4 的缓冲液洗脱。在竞争性洗脱/清洗之后,通过磁性链霉亲和素珠的细胞裂解和随后的细菌感染将所有保持结合的噬菌体洗脱。洗脱的噬菌体输出用作下一轮选择的输入。另外两轮的对生物素化的shFcRn的选择如(i)中所述进行。

[0615] 对FcRn的FAB抑制剂的ELISA筛选。

[0616] 为了鉴别hFcRn结合剂,在噬菌体ELISA中对来自以上所述的对生物素化的shFcRn的每个选择臂(每个库4个)的第3和4轮的输出在pH 6&7.4进行初级筛选。将噬菌粒上大约1152个初级ELISA阳性的Fab进行筛选和DNA测序。

[0617] 选择来自三个亲和性成熟库的、为pH独立型hFcRn结合剂的一百七十八个独特噬菌粒(16个来自轻链改组库,46个来自CDR 1&2库,并有116个来自CDR3库)并进行亚克隆用于表达为sFab。

[0618] 筛选自LC库的16个噬菌粒中有15个具有与亲代M90-F11相同的CDR,表明选择和筛选策略倾向于富集亲代克隆。对亲和性成熟的可溶性FAB克隆(~165)进行高通量的SPR分析,并以pH 7.4下的离解速率和pH 6的K_d值排序,有21个来自CDR3 库的亲和性成熟克隆和一个来自CDR1&2库的克隆比种系化的M90-F11更佳。根据高通量SPR筛选的数据,来自CDR 1&2库的亲和性成熟的M0159-C09克隆交换进入来自CDR3库的亲和性成熟的M0157-H04和M0157-E05的HV CDR 1&2位置。所构建的两个杂种克隆M0171-A01(也被称为M171-A01)和M0171-A03(也被称为 M171-A03)具有完全亲和性成熟的HV CDR 1、2&3和种系化的M90-F11 LC序列。

[0619] 总共将24个sFAB克隆(亲代和种系化的M90-F11,19个来自CDR3库,1个来自CDR 1&2库和2个杂种克隆)测序,中等规模纯化并通过反复SPR分析排序(表16) 并使用FACS分析在Fc-FcRn阻断检测中确定了他们的拮抗性抗-FcRn特性。

[0620] 表16:最佳的22个亲和性成熟可溶性FAB的结合动力学,排序和HV-CDR序列

[0621]

第一次中等规模-第二次SPR	pH 7.4			pH 6.0			超过种系化的M90-F11的Kd改进倍数		pH 7.4	CDR序列差异		
最初克隆 #	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	pH 7.4	pH 6.0	排序	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
532A-M0171-A03	1.3E+05	1.7E-05	1.3E-10	1.3E+05	1.8E-04	1.4E-09	381.6	41.3	1	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0171-A01	1.6E+05	2.3E-04	1.5E-09	1.8E+05	2.9E-04	1.6E-09	19.2	25.7	3	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0161-B04	1.7E+05	2.2E-04	1.3E-09	1.6E+05	1.9E-04	1.2E-09	20.5	39.5	2	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-F08	1.7E+05	2.8E-04	1.6E-09	1.6E+05	2.9E-04	1.6E-09	16.2	28.0	5	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-B08	1.6E+05	3.5E-04	2.2E-09	1.6E+05	2.9E-04	1.6E-09	12.7	25.4	8	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-H04	1.7E+05	3.6E-04	2.2E-09	1.7E+05	3.0E-04	1.8E-09	12.4	25.0	10	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0159-A07	1.9E+05	2.5E-04	1.4E-09	1.8E+05	2.6E-04	1.4E-09	17.7	29.1	4	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0158-H06	2.1E+05	3.5E-04	1.7E-09	2.1E+05	3.1E-04	1.5E-09	12.9	24.1	7	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-A12	1.8E+05	4.9E-04	2.8E-09	1.5E+05	5.1E-04	3.3E-09	9.1	14.7	16	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0158-C04	1.5E+05	4.2E-04	2.7E-09	1.5E+05	4.5E-04	3.0E-09	10.7	18.7	12	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-C05	1.8E+05	4.7E-04	2.6E-09	2.0E+05	4.2E-04	2.1E-09	9.5	17.9	15	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0155-F05	1.8E+05	5.4E-04	3.1E-09	1.9E+05	4.6E-04	2.5E-09	8.3	16.3	19	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0158-A03	1.4E+05	3.5E-04	2.5E-09	1.4E+05	4.8E-04	3.4E-09	12.5	15.8	6	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0159-A10	1.6E+05	4.2E-04	2.6E-09	1.6E+05	4.0E-04	2.5E-09	10.6	18.8	13	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-D11	1.7E+05	4.6E-04	2.6E-09	1.7E+05	3.9E-04	2.3E-09	9.8	19.1	14	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0155-D12	1.4E+05	5.1E-04	3.6E-09	1.5E+05	4.5E-04	3.0E-09	8.8	15.5	18	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-D04	1.9E+05	5.1E-04	2.7E-09	1.8E+05	4.4E-04	2.3E-09	8.9	17.0	17	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0155-C01	1.6E+05	5.7E-04	3.5E-09	1.7E+05	5.1E-04	2.9E-09	7.9	14.5	20	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0157-E05	1.8E+05	3.6E-04	2.0E-09	1.6E+05	3.1E-04	1.7E-09	12.6	24.1	9	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0159-C09	1.4E+05	9.1E-04	6.5E-09	1.3E+05	7.9E-04	6.0E-09	4.9	9.5	22	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0161-G08	1.2E+05	8.1E-04	5.9E-09	1.7E+05	4.2E-04	2.6E-09	5.6	17.7	21	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
替代 M90-F11	1.4E+05	1.9E-03	1.3E-08	1.4E+05	1.5E-03	1.2E-08	2.3	4.7	23	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
532A-M0155-H05	2.9E+05	6.1E-03	2.1E-08	2.0E+05	3.4E-02	1.7E-08	0.7	0.2	25	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV
种系化的 M90-F11	1.9E+05	4.5E-03	2.4E-08	5.5E+05	7.9E-03	1.2E-08	1.0	1.0	25	STAGS	STGTSGGTAAAGVKG	LSLPELV

[0622]

第一次中等规模-第二次SPR	CDR序列差异			SEQ ID NO:
最初克隆 #	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	
532A-M0171-A03	VYAMG	SIGSSGGFTKYADSVKG	LSIRELV	117
532A-M0171-A01	VYAMG	SIGSSGGFTKYADSVKG	LSIVDSY	118
532A-M0161-B04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LAIGDSY	119
532A-M0157-F09	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELI	120
532A-M0157-B08	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELS	121
532A-M0157-H04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELV	122
532A-M0159-A07	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSLGDSY	123
532A-M0158-H06	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVDSF	124
532A-M0157-A12	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELD	125
532A-M0158-C04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH	126
532A-M0157-C05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELS	127
532A-M0155-F05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDSY	128
532A-M0158-A03	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVELD	129
532A-M0159-A10	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF	130
532A-M0157-D11	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRDSY	131
532A-M0155-D12	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIDDFY	132
532A-M0157-D04	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELF	133
532A-M0155-G01	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELY	134
532A-M0157-E05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIVDSY	135
532A-M0159-C09	VYAMG	SIGSSGGFTKYADSVKG	LSTGELY	136
532A-M0161-G06	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSIRELH	137
亲代 M90-F11	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY	138
532A-M0155-H05	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGALS	139
种系化的M90-F11	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVKG	LSTGELY	140

[0623] 表16A:与表16相应的序列

[0624] 所有22个sFAB克隆均重建为IgG,但是只有8个IgG表达,纯化并在pH 6&7.4进行Flexchip分析。根据Flexchip SPR 8500数据,选择了以下4个亲和性成熟的IgG克隆进行进一步的体外(Biacore分析)和在hFcRn转基因小鼠模型中的体内研究。

[0625] 表17A所示为与亲代或DX2500克隆相比,4个亲和性成熟的IgG中的HV-CDR1 &2或3中的氨基酸改变的总数。

[0626] 表17A:最佳的4个亲和性成熟IgG LV&HV-CDR序列和与亲代M90-F11相比较的突变#

[0627]

最初名称	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
亲代 M90-F11	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY
DX-2500	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY
532A-M0171-A03	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY
532A-M0171-A01	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY
532A-M0159-A07	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY
532A-M0161-B04	TGTGSDVGSYNLVS	GDSQRPS	CSYAGSGIYV	EYAMG	SIGSSGGQTKYADSVRG	LSTGELY

[0628] *10个种系改变,3个改变由于AZ到F异型的转变+HV-CDR突变

[0629]

SEQ ID NO	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
亲代M90-F11	141	142	143	144	145	146
Dx-2500	147	148	149	150	151	152
532A-M0171-A03	153	154	155	156	157	158
532A-M0171-A01	159	160	161	162	163	164
532A-M0171-A07	165	166	167	168	169	170
532A-M0171-B04	171	172	173	174	175	176

[0630] 表17A1与表17A相应的SEQ ID NO

[0631] 在pH7.4通过将IgG固定在芯片上并使hFcRn流过对4个亲和性成熟克隆进行的Biacore分析,以及其原始数据和相对DX-2500和亲代M90-F11克隆的倍数增加($K_{\text{离解}}$ 和 K_D)如表17B所示。

[0632] 表17B:先导物4个亲和性成熟IgG的结合动力学,相对DX-2500和亲代 M90-F11倍数增加

[0633]

在pH7.4进行的Biacore数据的比较				K _{离解} 倍数增加		K _D 倍数增加	
克隆#+SPR方法	K _a s ⁻¹ M ⁻¹	K _d s ⁻¹	KD (M)	DX2500	M90-F11	DX2500	M90-F11
M171-A01 IgG Biacore	1.26E+05	1.92E-04	1.52E-09	103	16	58	12
M171-A03 IgG Biacore	1.42E+05	2.84E-04	2.00E-09	69	11	44	9
M159-A07 IgG Biacore	1.27E+05	6.88E-04	5.40E-09	29	4	16	3
M161-B04 IgG Biacore	1.21E+05	8.57E-04	7.06E-09	23	3	12	3
M90-F11 亲代 Biacore	1.61E+05	2.99E-03	1.86E-08	7	1	5	1
DX-2500 Biacore	2.24E+05	1.97E-02	8.79E-08	1	0.15	1	0.21

[0634] 用于在hFcRn转基因小鼠中检测亲和性成熟的抗-FcRn IgG和可溶性FAB的实验方案为:

[0635] • 6组 (1组安慰剂,4组IgG,1组Fab.4只小鼠/组)

[0636] • 在时间=0hr,静脉内注射剂量495mg/kg hIgG+5mg/kg生物素-hIgG

[0637] • 在时间=24hr,静脉内注射剂量5或20mg/kg Ab (1.67或6.67mg/kg的Fab):

[0638] • M171-A01-IgG,

[0639] • M171-A03-IgG,

[0640] • M159-A07-IgG,

[0641] • M161-B04-IgG或

[0642] • S32A-M171-A01-Fab

[0643] • 在24(给药前)、30、48、72、96、120和168hr采集血样。

[0644] • 使用链霉亲和素捕获/Fc检测ELISA对生物素-hIgG血清水平定量并使用Fab捕获/Fc检测ELISA对总体IgG定量。

[0645] 根据图27和28和下表18所示的体内数据,选择M0161-B04和M0171-A01在 Tg32B小鼠中进行检测并与M90-F11和DX-2500正面比较。

[0646] 表18:亲和性成熟的IgG和可溶性FAB对加速Tg32B小鼠中hIgG分解代谢的影响:5&20mg/kg静脉内剂量(生物素IgG&总体IgG)。

[0647]

%PBS对照, 在168hr 保留在血清中的生物素-IgG			%PBS对照, 在168hr 保留在血清中的总体IgG	
igG名称	5mg/kg	20 mg/kg	5mg/kg	20 mg/kg
	(1.7mg/kg sFAB)	(6.7mg/kg sFAB)	(1.7mg/kg sFAB)	(6.7mg/kg sFAB)
亲代 M90-F11	77	63	NA	NA
532A-M0171-A01	124	45	96	40
532A-M0171-A03	128	66	84	44
532A-M0159-A07	131	59	96	40
532A-M0161-B04	100	41	76	24
S32A-M171-A03-sFAB	152	103	140	108

[0648] 实施例27:抗-FcRn抗体对hIgG分解代谢的影响

[0649] 抗-FcRn抗体的体内研究表明了其在消耗循环IgG中的效能。剂量依赖性消耗出现在两种物种中,小鼠和猴,并通过两种施用途径,静脉内和皮下。在猴中,IgG的减少没有伴随着循环IgA、IgM或血清白蛋白的任何改变。

[0650] A) 抗-FcRn抗体对小鼠中hIgG分解代谢的影响

[0651] 在第0天对Tg32B小鼠(小鼠FcRn和小鼠β2-巨球蛋白敲除)/敲入(人FcRn 和人β2-巨球蛋白敲入)施用人IgG。在第1天和第7天对小鼠静脉内施用不同剂量的抗-FcRn抗体M161-B04 (DX-2504) 和M171-A01。在14天内测量小鼠血清中的人IgG 水平。如图31所示,对每个所施抗体,在14天期间,人IgG的血清水平均显著降低。IgG的减少依赖于所施抗-FcRn抗体的浓度。

[0652] B) 皮下注射抗-FcRn抗体对小鼠中hIgG的分解代谢的影响。

[0653] 在第0天对Tg32B小鼠(小鼠FcRn和小鼠β2-巨球蛋白敲除)/敲入(人FcRn 和人β2-巨球蛋白敲入)施用人IgG。在第1天和第7天对小鼠皮下施用不同剂量的抗-FcRn抗体M161-B04 (DX-2504)。在14天内测量小鼠血清中的人IgG水平。如图32 所示,对每个所施抗体,在14天期间,人IgG的血清水平均显著降低。IgG的减少依赖于所施抗-FcRn抗体的浓度。皮下注射施用的效能与静脉内施用相似。

[0654] C) 抗-FcRn抗体对食蟹猴中hIgG分解代谢的影响

[0655] 对食蟹猴施用不同剂量的抗-FcRn抗体M161-B04 (DX-2504) 和媒介物对照。图 33所示为给药的时间表(图33A)及对照的结果(图33B)。在14天内测量猴血清内的 IgG水平。如图34-35(个体猴)和图36(组平均数据)所示,对于每个施用的抗体,在14天期间,IgG水平显著降低。IgG的减少依赖于所施用的抗-FcRn抗体的浓度。皮下施用的效能与静脉内施用相似。图37A-37C描绘了IgA、IgM和血清白蛋白的血清水平未受施用抗-FcRn抗体影响。

[0656] 所有引用的参考文献包括贯穿本申请引用的文献参考、已批准的专利、公布或未

公布的专利申请以及以下所列那些的内容均通过引用明确全文并入本文。如有不一致,以本申请包括本文中任何定义为准。

[0657] 已描述了本发明的一些实施方案。然而应当理解的是可在不背离本发明宗旨和范围下进行各种修改。相应地,其他实施方案在以下权利要求的范围内。

序列表

<110> 戴埃克斯有限公司

生物基因血友制药公司

<120> 针对FCRN的抗体及其用途

<130> D0617.70018W0

<140> NOT YET ASSIGNED

<141> herewith

<150> US 61/048,152

<151> 2008-04-25

<150> US 61/048,500

<151> 2008-04-28

<160> 190

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 365

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30
His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45
Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60
Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65 70 75 80
Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
 85 90 95
Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
 100 105 110
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
 115 120 125
Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
 130 135 140
Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145 150 155 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr		
165	170	175
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg		
180	185	190
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys		
195	200	205
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe		
210	215	220
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu		
225	230	235
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser		
245	250	255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His		
260	265	270
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val		
275	280	285
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val		
290	295	300
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu		
305	310	315
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg		
325	330	335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp		
340	345	350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala		
355	360	365
<210> 2		
<211> 366		
<212> PRT		
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)		
<400> 2		
Met Gly Met Ser Gln Pro Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu		
1	5	10
Leu Pro Gln Thr Trp Gly Ala Glu Pro Arg Leu Pro Leu Met Tyr His		
20	25	30
Leu Ala Ala Val Ser Asp Leu Ser Thr Gly Leu Pro Ser Phe Trp Ala		
35	40	45
Thr Gly Trp Leu Gly Ala Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Asn Asn Leu Arg		
50	55	60

Gln Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Ile Trp Glu Asn Gln Val Ser			
65	70	75	80
Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Lys Ser Lys Glu Gln Leu			
	85	90	95
Phe Leu Glu Ala Ile Arg Thr Leu Glu Asn Gln Ile Asn Gly Thr Phe			
	100	105	110
Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ala Pro Asp Asn Ser Ser			
	115	120	125
Leu Pro Thr Ala Val Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Arg Phe			
	130	135	140
Asn Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ser Gly Glu Trp Pro Glu Thr Asp Ile			
145	150	155	160
Val Gly Asn Leu Trp Met Lys Gln Pro Glu Ala Ala Arg Lys Glu Ser			
	165	170	175
Glu Phe Leu Leu Thr Ser Cys Pro Glu Arg Leu Leu Gly His Leu Glu			
	180	185	190
Arg Gly Arg Gln Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu			
	195	200	205
Lys Ala Arg Pro Gly Asn Ser Gly Ser Ser Val Leu Thr Cys Ala Ala			
	210	215	220
Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Lys Phe Arg Phe Leu Arg Asn Gly			
225	230	235	240
Leu Ala Ser Gly Ser Gly Asn Cys Ser Thr Gly Pro Asn Gly Asp Gly			
	245	250	255
Ser Phe His Ala Trp Ser Leu Leu Glu Val Lys Arg Gly Asp Glu His			
	260	265	270
His Tyr Gln Cys Gln Val Glu His Glu Gly Leu Ala Gln Pro Leu Thr			
	275	280	285
Val Asp Leu Asp Ser Pro Ala Arg Ser Ser Val Pro Val Val Gly Ile			
	290	295	300
Ile Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ala Ile Ala Gly Gly Val Leu			
305	310	315	320
Leu Trp Asn Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Leu Ser Leu			
	325	330	335
Ser Gly Asp Asp Ser Gly Asp Leu Leu Pro Gly Gly Asn Leu Pro Pro			
	340	345	350
Glu Ala Glu Pro Gln Gly Val Asn Ala Phe Pro Ala Thr Ser			
	355	360	365

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

```

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1           5           10           15
Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
           20           25           30
His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
           35           40           45
Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
           50           55           60
Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80
Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
           85           90           95
Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
           100          105          110
Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
           115

```

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 褐家鼠

<400> 4

```

Met Ala Arg Ser Val Thr Val Ile Phe Leu Val Leu Val Ser Leu Ala
1           5           10           15
Val Val Leu Ala Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg
           20           25           30
His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
           35           40           45
Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu Lys Asn Gly Lys
           50           55           60
Lys Ile Pro Asn Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65           70           75           80
Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Thr Asp
           85           90           95
Val Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys Glu Pro Lys Thr
           100          105          110

```

Val Thr Trp Asp Arg Asp Met

115

<210> 5

<211> 1510

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

```

gttccttcagg tacgaggagg gcattgttgt cagtctggac cgagcccgca gagccccctcc 60
tcggcgctcct ggccccggcc gtgccccgcg tgccccggga ggaaggggcg ggccccgggt 120
cgggaggaggt cacgtgcccc ctcccccccc aggtcgtcct ctcagcatgg ggggtccccg 180
gcctcagccc tgggcgctgg ggtcctctgt ctttctcctt cctgggagcc tgggcgcaga 240
aagccacctc tccctcctgt accacettac cgcggtgtcc tcgctgccc cggggactcc 300
tgccttctgg gtgtccggtt ggtctggccc gcagcagtac ctgagctaca atagcctgcg 360
gggcgaggcg gagccctgtg gagcttgggt ctgggaaaac caggtgtcct ggtattggga 420
gaaagagacc acagatctga ggatcaagga gaagctcttt ctggaagctt tcaaagcttt 480
ggggggaaaa ggtccctaca ctctgcaggg cctgctgggc tgtgaactgg gccctgacaa 540
cacctcggtg cccaccgcca agttcgccct gaacggcgag gagttcatga atttcgacct 600
caagcagggc acctgggggt gggactggcc cgaggccctg gctatcagtc agcgggtggca 660
gcagcaggac aaggcgccca acaaggagct caccttcctg ctattctcct gcccgcaccg 720
cctgcgggag cacctggaga ggggccgchg aaacctggag tggaaggagc cccctccat 780
gcgcctgaag gcccagccca gcagccctgg cttttccgtg cttacctgca gcgccttctc 840
cttctaccct ccggagctgc aacttcggtt cctgcggaat gggctggccg ctggcaccgg 900
ccagggtgac ttcggcccca acagtacgg atccttcac gcctcgtcgt cactaacagt 960
caaaagtggc gatgagcacc actactgctg cattgtgcag cacgcggggc tggcgcagcc 1020
cctcagggtg gagctggaat ctccagccaa gtccctcgtg ctctgtggtg gaatcgtcat 1080
cggtgtcttg ctactcacgg cagcggctgt aggaggagct ctgttggtga gaaggatgag 1140
gagtgggctg ccagccccct ggatctccct tcgtggagac gacaccgggg tcctcctgcc 1200
caccccaggg gaggcccagg atgctgattt gaaggatgta aatgtgattc cagccaccgc 1260
ctgaccatcc gccattccga ctgctaaaag cgaatgtagt caggccccct tcatgctgtg 1320
agacctcctg gaacactggc atctctgagc ctccagaagg ggttctgggc ctagttgtcc 1380
tccctctgga gccccgtcct gtggtctgcc tcagtttccc ctctaatac atatggctgt 1440
tttccacctc gataatataa cacgagtttg ggccccgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
aaaaaaaaaa 1510

```

<210> 6

<211> 984

<212> DNA

<213> 智人

<400> 6

```

atgggggtcc cgcgccctca gccctgggcg ctggggctcc tgctctttct ctttctggg 60

```

agcctgggcg cagaaagcca cctctccctc ctgtaccacc ttaccgcggt gtcctcgcct 120
 gccccgggga ctctgcctt ctgggtgtcc ggctggctgg gcccgcagca gtacctgagc 180
 tacaatagcc tgcggggcga ggcggagccc tgtggagctt gggctctggga aaaccaggtg 240
 tcctgggtatt gggagaaaga gaccacagat ctgaggatca aggagaagct ctttctggaa 300
 gctttcaaag ctttgggggg aaaaggtccc tacactctgc agggcctgct gggctgtgaa 360
 ctggggccctg acaacacctc ggtgcccacc gccaaagtgc ccctgaacgg cgaggagttc 420
 atgaatttcg acctcaagca gggcacctgg ggtggggact ggcccaggc cctggctatc 480
 agtcagcggg ggcagcagca ggacaaggcg gccacaagg agctcacctt cctgctattc 540
 tcctgccccg accgcctgcg ggagcacctg gagagggggc gcggaaacct ggagtggaa 600
 gagccccct ccatgcgcct gaaggcccga cccagcagcc ctggcttttc cgtgcttacc 660
 tgcagcgcct tctccttcta cctccggag ctgcaactc ggttctgcg gaatgggctg 720
 gccgctggca ccggccaggg tgacttcggc cccaacagt acggatcctt ccacgcctcg 780
 tcgtcactaa cagtcaaaag tggcgatgag caccactact gctgcattgt gcagcacgcg 840
 gggctggcgc agccccctag ggtggagctg gaatctccag ccaagtctc ccggccgctc 900
 gacgggctac gagcatcagt aacactacta ggcgccaggc tactactatc actactacca 960
 gcactactac gatttgggcc ataa 984

<210> 7

<211> 987

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 7

aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag 60
 atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 120
 atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 180
 aatttcctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg 240
 aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 300
 tctttctatc tcttgtaacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 360
 cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa 420
 gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca tttggattgg atgaattcca aattctgctt 480
 gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt 540
 ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat 600
 gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagcteta ggagggtg caacttagag 660
 gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca 720
 atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta 780
 catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattgaaa 840
 tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt 900
 gataaagtaa ggcatggtg tggttaatct ggtttatttt tgttccacaa gttaaataaa 960

tcataaaact tgatgtgtta tctctta 987

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 8

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 9

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 10

Gln Gln Gly Ser Asn Ile Pro Leu Thr

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 11

Arg Ser Trp Met Asn

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 12

Arg Ile His Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 13

Glu Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 15

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 16

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Arg Thr

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 17

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 18

Val Ile Thr Asn Tyr Tyr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 19

Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Asp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 20

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Val Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Asn Ile Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala
 100 105 110
 Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
 130 135 140
 Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
 180 185 190
 Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Lys Asn Glu
 210

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 21

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser Trp

20	25	30
Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
35	40	45
Arg Ile His Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys		
50	55	60
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Ala Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
65	70	75
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala		
85	90	95
Asn Glu Gly Ser Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp		
165	170	175
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro		
180	185	190
Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys		
195	200	205

Val Asp Lys Lys Leu Glu

210

<210> 22

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 22

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr		
20	25	30
Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Ser Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly		

50	55	60			
Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro					
65	70	75	80		
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Arg					
	85	90	95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala					
	100	105	110		
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly					
	115	120	125		
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile					
	130	135	140		
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu					
145	150	155	160		
Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser					
	165	170	175		
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr					
	180	185	190		
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser					
	195	200	205		
Phe Asn Lys Asn Glu					
210					
<210> 23					
<211> 218					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 重组肽					
<220>					
<221> misc_feature					
<222> (2) .. (2)					
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid					
<400> 23					
Val Xaa Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val Ser					
1	5	10	15		
Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala					
	20	25	30		
Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly					
	35	40	45		
Val Ile Thr Asn Tyr Tyr Gly Asp Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys					

50	55	60
Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
65	70	75
Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala		
195	200	205
Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Leu Glu		
210	215	

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 24

Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn

1

5

10

15

Leu Glu Trp Lys

20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 25

Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg
1 5 10 15

Leu Lys Ala Arg
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 26

Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu
1 5 10 15

Arg Asn Gly Leu
20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 27

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

Gln Tyr Leu Ser
20

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 28

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 29

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 30

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Val

1 5 10

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 31

Asp Tyr Thr Met Ser

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 32

Ser Ile Trp Ser Ser Gly Gly Ala Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 33

Asp Ile Arg Gly Ser Arg Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 34

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 35

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 36

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 37

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 38

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 39

Leu Ser Thr Gly Glu Leu Tyr

1 5

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 40

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 41

Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 42

Met Gln Ala Gln Gln Thr Pro Ile Thr

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 43

Ile Tyr Ser Met Thr

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 44

Ser Ile Val Pro Ser Gly Gly Glu Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 45

Gly His Ser Gly Val Gly Met Asp Val

1 5

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 46

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Gly Asn Gly His Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 47

Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 48

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 49

Phe Tyr Ser Met Thr

1 5

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 50

Gly Ile Arg Ser Ser Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 51

Gly Trp Gly Leu Asp Ala Phe Asp Val

1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 52

Arg Ser Ser Leu Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Ile Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 53

Leu Gly Ser His Arg Ala Ser

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 54

Met Gln Pro Leu Gln Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 55

Tyr Tyr His Met Asn

1 5

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 56

Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Val Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 57

Gly Lys Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 58

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 59

Gln Asp Asn Arg Arg Pro Ser

1 5

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 60

Gln Ala Trp Leu Ser Asn Thr Ala Ser Val Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 61

Phe Tyr Gly Met His

1 5

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 62

Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 63

Gly Leu Arg Thr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 64

Arg Ala Ser Gln Pro Val Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 65

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 66

Gln His Tyr Gly His Ser Pro Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 67

Ser Tyr Ala Met Tyr

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 68

Arg Ile Val Pro Ser Gly Gly Gly Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 69

Gly Met Asp Val

1

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 71

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 72

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 73

Asn Tyr Asn Met Ser

1 5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 74

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

1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 75

Tyr His Tyr Gly Met Asp Val

1 5

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn His Leu Val

1

5

10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 77

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 78

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr

1

5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 79

Tyr Tyr Gly Met Thr

1

5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 80

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 81

Gly Pro Glu Tyr Phe Phe Gly Val Tyr

1

5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Asn

1

5

10

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 83

Ala Ala Tyr Ile Leu Gln Ser

1

5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 84

Gln Gln Ser Tyr Ser Asn Arg Ile Thr

1 5

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 85

Ala Tyr Asn Met Ile

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 86

Ser Ile Gly Pro Ser Gly Gly Lys Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 87

Val Arg Ser Gly Phe Trp Ser Gly His Asp Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 89

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 90

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 91

His Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 92

Tyr Ile Arg Pro Ser Gly Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 93

Asp Ser Trp Gly Ser Phe Pro Asn Asp Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 94

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 94

caagacatcc agatgaccca gtctccagac tccctgcccg tcaccctgg agagccggcc 60
tccatctcct gcaggctctag tcagagcctc ctgcatagta atggatacaa ctatttggat 120
tggtacctgc agaggccagg gcagtctccg cagctcctga tctatttggg ttctaactcg 180
gcctccgggg tccctgacag gttcagtggc agtgggtcag gcacagattt tacactgaaa 240
atcagcagag tggaggctga agatgctgga ttttattact gcatgcaage tcaacaaact 300
ccgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaa 339

<210> 95

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 95

caagacatcc agatgaccta gtctccaact tccctgcccg tcaccctgg agagccggcc 60
tccatgtcct gcaggctctag tctgagcctc ctgcatagta atggatacat ctatttggat 120
tggtacctgc agaggccagg acagtctcca cagctcctga tgtatttggg ttctcatcgg 180
gcctccgggg tccctgacag gttcagtggc agtgggtcag gcacagattt tacactgaac 240
atcagcagag tggaggcgga ggatgttggg gtttattact gcatgcaacc tctacaaact 300
ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 96

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 96

caagacatcc agatgacca gtctccatcc tccctgtctg catctgtagg agacagagtc 60
accatcactt gccgggcaag tcagagcggt ggaggttatt taaattggta tcagcagaaa 120
ccaggcgaag cccctaaggc cctgatctat gctgcataca ttttgcaaag tggggtccca 180
tcgaggttca gtggcagcgg ctctgggaca gatttcactc tcaccatcaa cagtctacaa 240
cctgaagatt ttgcaactta ttactgtcaa cagagttaca gtaatagaat cactttcggc 300
cctgggacca gagtggatgt caaa 324

<210> 97

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 97

caagacatcc agatgacca gtctccactc tccctgcccg tcaccctgg agagccggcc 60
tccatctcct gcaggcttag tcagagcctc ctgcacggaa atggacacac ctatttggat 120
tggtatctgc agaagccagg gcagtctcca cagctcctga tctatttgggt ttctaactcg 180
gcctccgggg tccctgacag gttcagtggc agtggatcag gcacagattt tacactgaaa 240
atcagcagag tggaggctga agatgttggg gtttattact gcatgcaagg tctacaaact 300
ccgaggacgt tcggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 98

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 98

caagacatcc agatgacca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc 60
accctctcct gcagggccag tcagagtatt agcaaccact tagtctgggt ccaacagaaa 120
cctggccagg ctcccaggt cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca 180
gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaact tcaccatcag cagcctagag 240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggcctcc caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 99

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 99

caagacatcc agatgacca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg ggaaacagcc 60
accctctcct gccgggccag tcagcctgtt ggcagctact tagcctggta ccaacagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca atagggccac tggcatccca 180
gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcgccatcag cagcctggag 240
cctgaagatt ttggagtgtg ttactgtcag cactatgggc actcacctcc gtacactttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 100

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 100

caagacatcc agatgacca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc 60
accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagcagct acttagcctg gtaccagcag 120
aaacctggcc aggtctccag gctcctcatc tatggtgcat ccagcagggc cactggcatc 180
ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat cagcagactg 240
gagcctgaag attttgcagt gtattactgt cagcagtatg gtagctcacc tcggacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaa 327

<210> 101

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 101

cagagcgctt tgactcagcc accctcagcg tctgagacce ccgggcagag agtcaccatc 60
tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtaatactg taagctggta ccagcagctc 120
ccaggaacgg ccccaaaact cctcatctat agtgataatc agcgccctc aggggtccct 180
gaccgattcg ctggctccaa gtctggcacc tetgctccc tggccatcag tgggctccag 240
tctgaggatg aggctgaata tcaactgtgca gcatgggatg acagcctgaa gggttgggtg 300
ttcggcggag ggacaaagct gaccgtccta 330

<210> 102

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 102

cagagcgctt tgactcagac accctcagt tccgtgtccc ccggacagac agccaccatc 60
acctgctctg gagataaatt gggggataag tatgtttctt ggtttcaaca gaagccaggc 120
cagtccccta tcctactcct ttatcaagac aacaggcggc cctctgggat ccctgaacga 180
ttctctggct ccaattctgg gaacacagcc tctctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgaggctg actaccactg tcaggcgtgg ctgagcaata ctgcttccgt ggcattcggc 300
ggagggacca ggctgaccgt cctc 324

<210> 103

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 103

caagacatcc agatgacca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg ggaaagagcc 60
accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggta ccaacagaaa 120
cctggccagg ctcccagget cctcatctat gatgcatcca acagggccac tggcatccca 180
gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagcctagag 240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggcccet cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 104

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 104

cagagcgctt tgactcagcc tgcctccgtg tcgggggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcaactg ggaccgggag tgatgttgga agttataacc ttgtctcctg gtacccaaaag 120
taccgccgca aagcccccaa actcatcatt tatggggaca gtcagcggcc ctcgggactt 180
tctagtcgct tctctggctc caagtctggc aactcggeet ccctgacaat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgt tgctcatatg caggtagtgg catttacgctc 300
tttggcagtg ggaccaaggt caccgtccta 330

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 105

Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg

1 5 10

<210> 106

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 106

Cys Ser Ala Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Phe Leu Arg

1 5 10 15

Asn Gly Leu

<210> 107

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 107

Ser Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser

100 105

<210> 108

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 108

```
agtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc ctcctctga ggagctccaa 60
gccacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtgg acaccaccaa accctccaaa 180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtcca gaagacagtg 300
gcccctgcag aatgctct 318
```

<210> 109

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 109

```
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1          5          10          15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
          20          25          30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
          35          40          45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
          50          55          60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65          70          75          80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
          85          90          95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
          100          105
```

<210> 110

<211> 317

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 110

```
ggtcagccca aggccacccc acggtcactc tgttcccgc ctcctctgag gagtccaag 60
ccaacaaggc cacactagtg tgtctgatca gtgacttcta cccgggagct gtgacagtgg 120
cttggaaagg agatggcagc cccgtcaagg cgggagtgga gacgacaaa ccctccaaac 180
```


<210> 113

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 113

```
Glu Val Gly Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
           20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
           100          105          110
```

<210> 114

<211> 331

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组多核苷酸

<400> 114

```
gaggtgcagc tgttggagtc tggggagget tggtacagcc tgggggggtcc ctgagactct 60
cctgtgcagc ctctggattc acctttagca gctatgceat gagctgggtc cgccaggctc 120
cagggaaggg gctggagtgg gtctcagcta ttagtggttag tggtggtagc acatactacg 180
cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgctgtatc 240
tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggccgtata ttactgtgcg aaagatactg 300
gggccagggc accctgggtca ccgtctcatc a 331
```

<210> 115

<211> 338

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 115

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50				55				60					
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
65					70					75					80
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
				85					90					95	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Ala	Pro	Glu
			100					105					110		
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
			115					120					125		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			130				135					140			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
				165						170				175	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
			195				200					205			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			210				215				220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
225					230					235					240
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				245						250				255	
Thr	Cys	Leu	Asx	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
				260						265				270	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
			275				280						285		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Tyr	Val	Asp

290	295	300
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
305	310	315
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		320
	325	330
		335
Gly Lys		
<210> 116		
<211> 338		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 重组肽		
<400> 116		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20	25
		30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35	40
		45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50	55
		60
Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr		
65	70	75
		80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg		
	85	90
		95
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Ala Pro Glu		
	100	105
		110
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	115	120
		125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	130	135
		140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
		160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
	165	170
		175
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
	180	185
		190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	195	200
		205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 225 230 235 240
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 245 250 255
 Thr Cys Leu Asx Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 260 265 270
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 275 280 285
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Tyr Val Asp
 290 295 300
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 305 310 315 320
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325 330 335

Gly Lys

<210> 117

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 117

Val Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Lys Tyr
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Val
 20 25

<210> 118

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 118

Val Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Lys Tyr
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Val Asp Ser Tyr
 20 25

<210> 119

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 119

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr

20 25

<210> 120

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 120

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Ile

20 25

<210> 121

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 121

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Ser

20 25

<210> 122

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 122

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Val
 20 25

<210> 123

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 123

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Leu Gly Asp Ser Tyr
 20 25

<210> 124

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 124

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Val Asp Ser Phe
 20 25

<210> 125

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 125

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Asp
 20 25

<210> 126

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 126

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu His

20 25

<210> 127

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 127

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Ser

20 25

<210> 128

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 128

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Asp Asp Ser Tyr

20 25

<210> 129

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 129

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Val Glu Leu Asp
20 25

<210> 130

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 130

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu Phe
20 25

<210> 131

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 131

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Asp Ser Tyr
20 25

<210> 132

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 132

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Asp Asp Phe Tyr
20 25

<210> 133

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 133

Glu	Tyr	Ala	Met	Gly	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Tyr
1				5				10						15	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu	Leu	Phe			
			20					25							

<210> 134

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 134

Glu	Tyr	Ala	Met	Gly	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Tyr
1				5				10						15	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Leu	Ser	Ile	Arg	Glu	Leu	Tyr			
			20					25							

<210> 135

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 135

Glu	Tyr	Ala	Met	Gly	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Tyr
1				5				10						15	
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Leu	Ser	Ile	Val	Asp	Ser	Tyr			
			20					25							

<210> 136

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 136

Val	Tyr	Ala	Met	Gly	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Thr	Lys	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Ala Asp Ser Val	Lys Gly Leu Ser	Thr Gly Glu Leu	Tyr
20	25		
<210> 137			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重组肽			
<400> 137			
Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr			
1	5	10	15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Ile Arg Glu Leu His			
20	25		
<210> 138			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重组肽			
<400> 138			
Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr			
1	5	10	15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Thr Gly Glu Leu Tyr			
20	25		
<210> 139			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重组肽			
<400> 139			
Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr			
1	5	10	15
Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ser			
20	25		
<210> 140			
<211> 29			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 140

Glu Tyr Ala Met Gly Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr

1 5 10 15

Ala Asp Ser Val Lys Gly Leu Ser Thr Gly Glu Leu Tyr

20 25

<210> 141

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 141

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 142

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 143

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 144

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 145

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 145

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 146

Leu Ser Thr Gly Glu Leu Tyr

1 5

<210> 147

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 147

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 148

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 149

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 150

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 151

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 151

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 152

Leu Ser Thr Gly Glu Leu Tyr

1 5
<210> 153
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重组肽
<400> 153
Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
1 5 10
<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重组肽
<400> 154
Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser
1 5
<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重组肽
<400> 155
Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val
1 5 10
<210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 重组肽
<400> 156
Val Tyr Ala Met Gly
1 5
<210> 157
<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 157

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 158

Leu Ser Ile Arg Glu Leu Val

1

5

<210> 159

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 159

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1

5

10

<210> 160

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 160

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1

5

<210> 161

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 161

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 162

Val Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 163

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 163

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 164

Leu Ser Ile Val Asp Ser Tyr

1 5

<210> 165

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 165

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 166

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 167

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 167

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 168

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 168

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 169

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 169

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 170

Leu Ser Leu Gly Asp Ser Tyr

1 5

<210> 171

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 171

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 172

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 172

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 173

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 174

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 174

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 175

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 175

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Gln Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 176

Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr

1 5

<210> 177

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 177

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr

20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Lys Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Ile	Ile	Tyr	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Leu	Ser	Ser	Arg	Phe
50						55					60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65						70				75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser
						85				90				95	
Gly	Ile	Tyr	Tyr	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	
						100				105				110	

<210> 178

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 178

Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1					5				10					15	
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr
					20				25				30		
Asn	Leu	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
					35				40				45		
Met	Ile	Tyr	Glu	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
50						55					60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65						70				75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser
						85				90				95	
Ser	Thr	Phe	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	
						100				105				110	

<210> 179

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 179

Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu
1					5				10					15	
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe

20	25	30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val		
35	40	45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys		
50	55	60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser		
65	70	75
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu		
85	90	95
Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser		
100	105	

<210> 180

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 180

Gly Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
1	5	10
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe		
20	25	30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val		
35	40	45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys		
50	55	60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser		
65	70	75
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu		
85	90	95
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
100	105	

<210> 181

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 181

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95
 Ser Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 182

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 182

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95
 Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 183

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 183

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		
Ala	Lys	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		

Ser

<210> 184

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 184

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Glu	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90				95		
Ala	Arg	Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Ser	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val
			100					105					110		

Thr Val Ser Ser

115

<210> 185

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 185

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser

85 90 95

Gly Ile Tyr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 186

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 186

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65	70	75	80
Gln Ala Glu Asp	Glu Ala Asp Tyr Tyr	Cys Cys Ser Tyr	Ala Gly Ser
	85	90	95

Ser Thr Phe

<210> 187

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 187

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Phe

<210> 188

<211> 99

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组肽

<400> 188

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

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

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

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

Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	

Ser Thr Leu

<210> 189

<211> 99

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 重组肽

<400> 189

Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr
			20					25					30		

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Ala	Gly	Ser
				85					90					95	

Asn Asn Phe

 $\langle 210 \rangle$ 190

⟨211⟩ 99

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 重组肽

<400> 190

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50						55						60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	
65						70						75				80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ser	
						85						90				95
Ser	Thr	Phe														

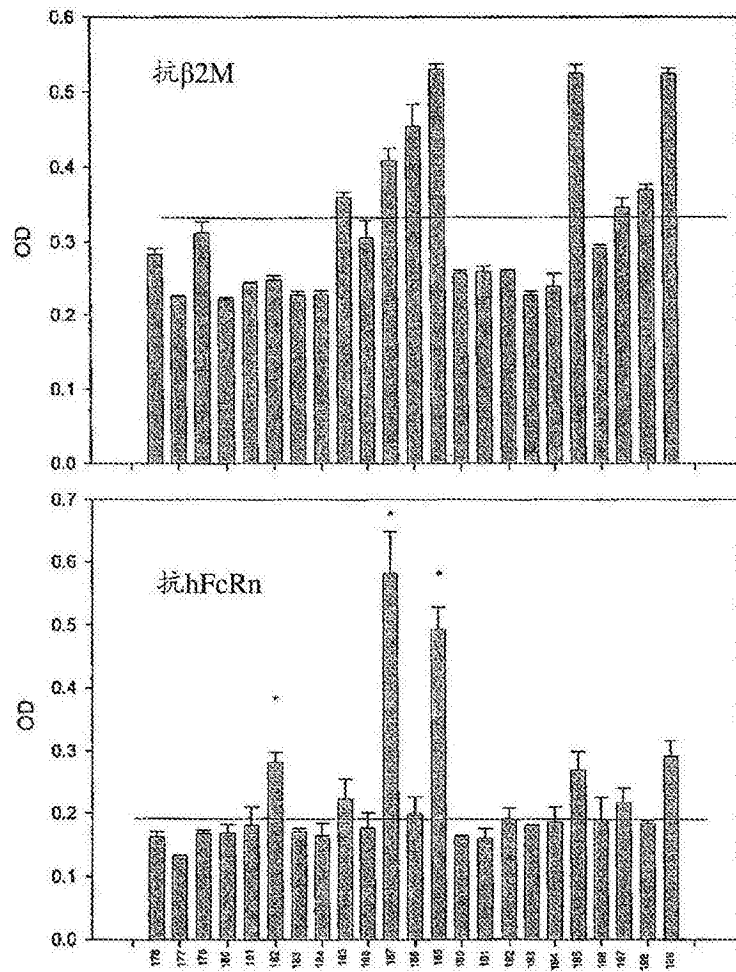


图1

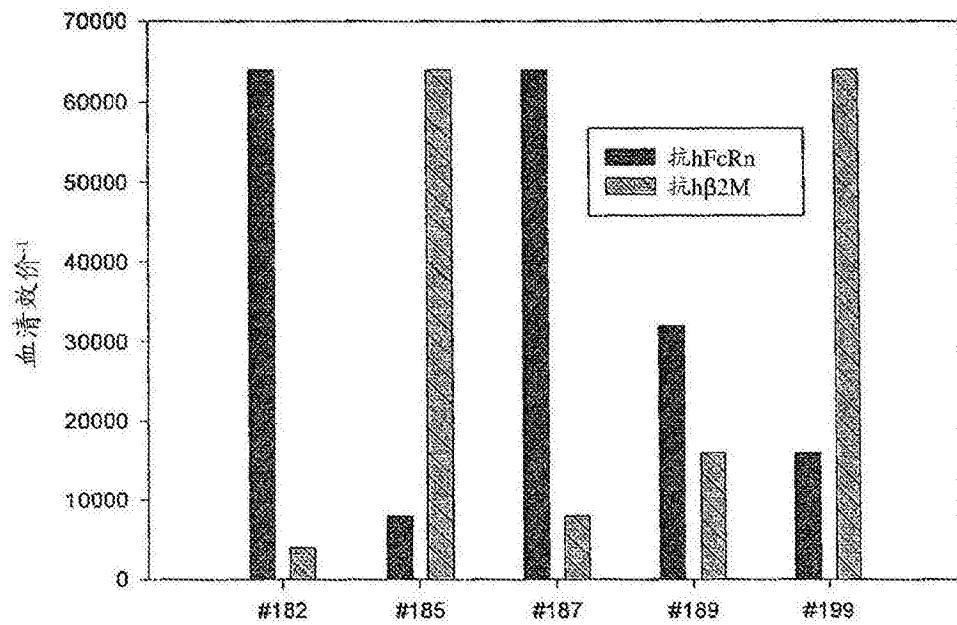


图2

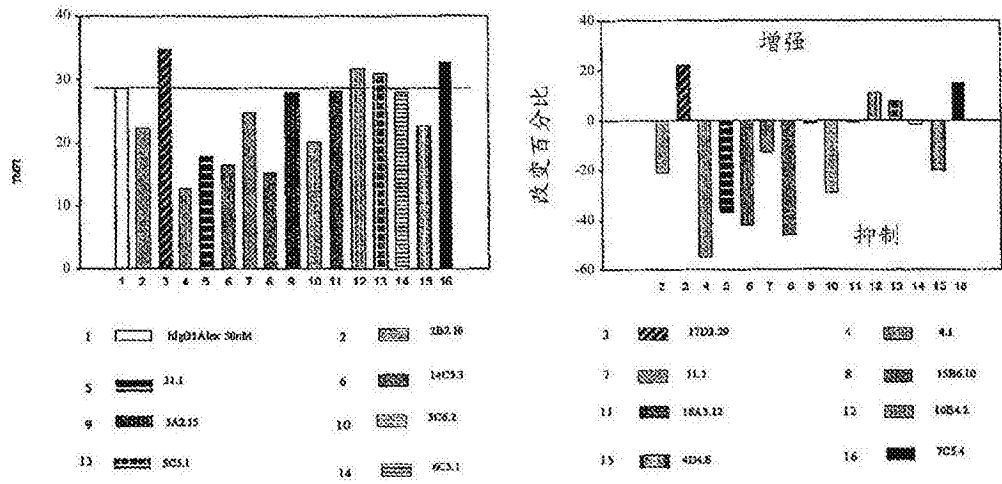


图3A

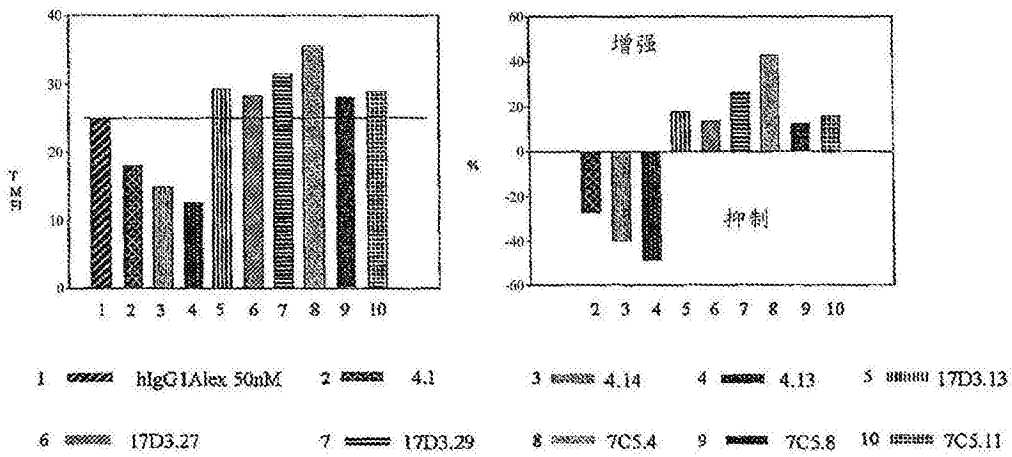
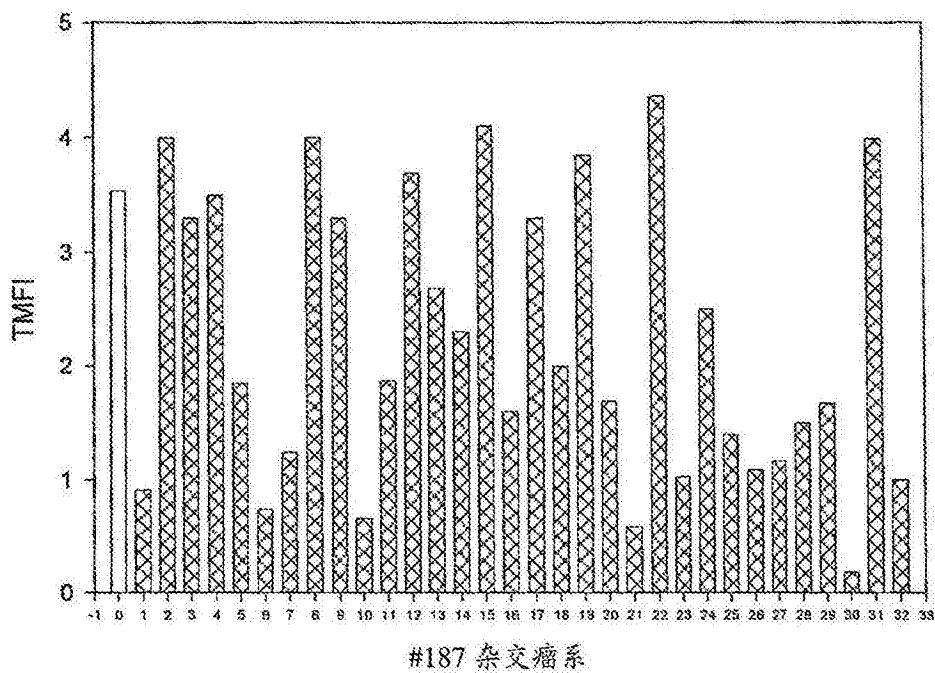


图3B



0: 仅含有 Alexa fluoro 488 标记的 hlgG1 的试管的 TMFI

1: 阳性对照 15B6.1 (来自 #182 融合的抗 hFcRn 阻断性 mAB) 的 TMFI

2-4, 6-7, 9, 12-13, 15-17, 19-20, 22-28, 31-32: 抗 hFcRn mAB 上清。

5, 8, 10, 11, 14, 18, 21, 29 和 30: 抗人 β -2M mAB 上清。

图4A

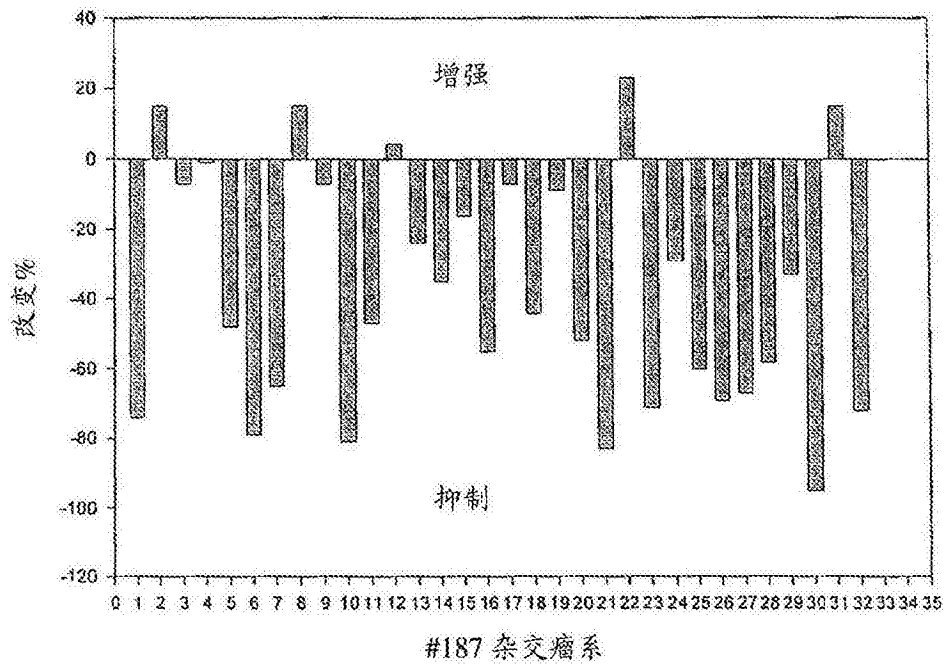


图4B

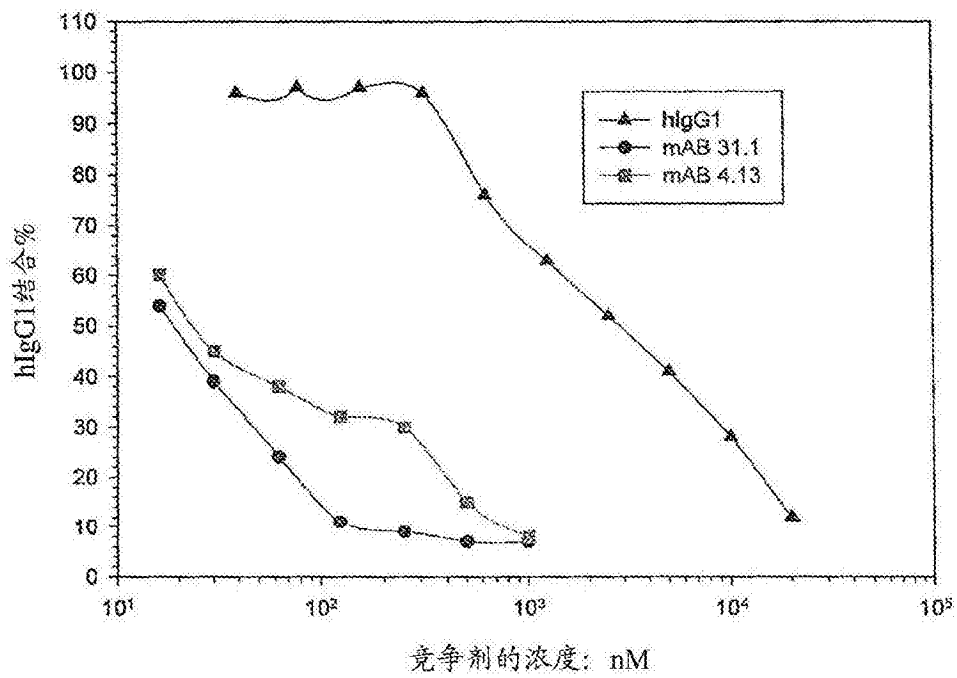


图5A

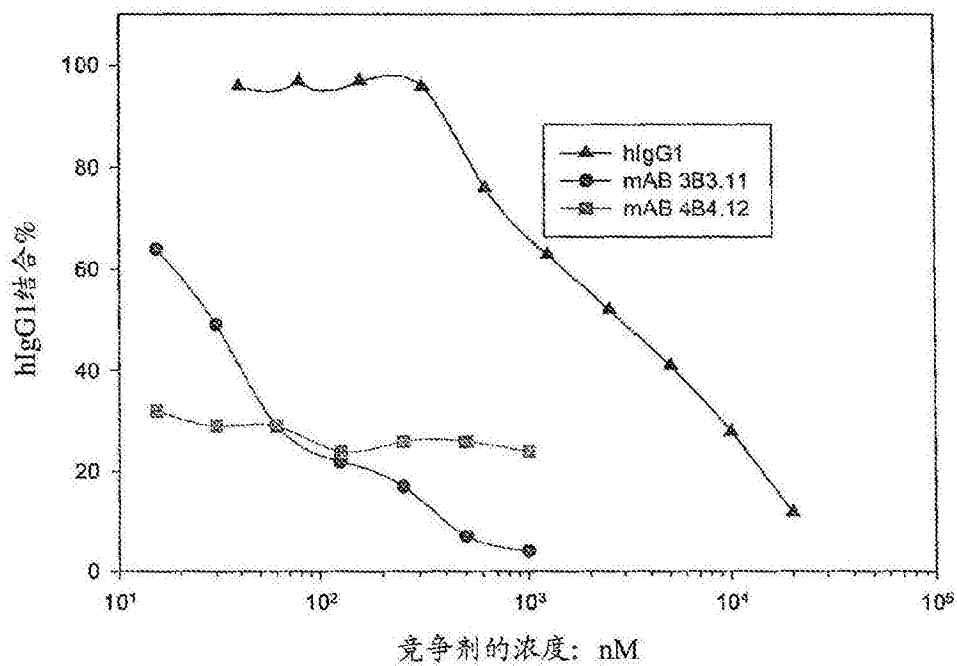
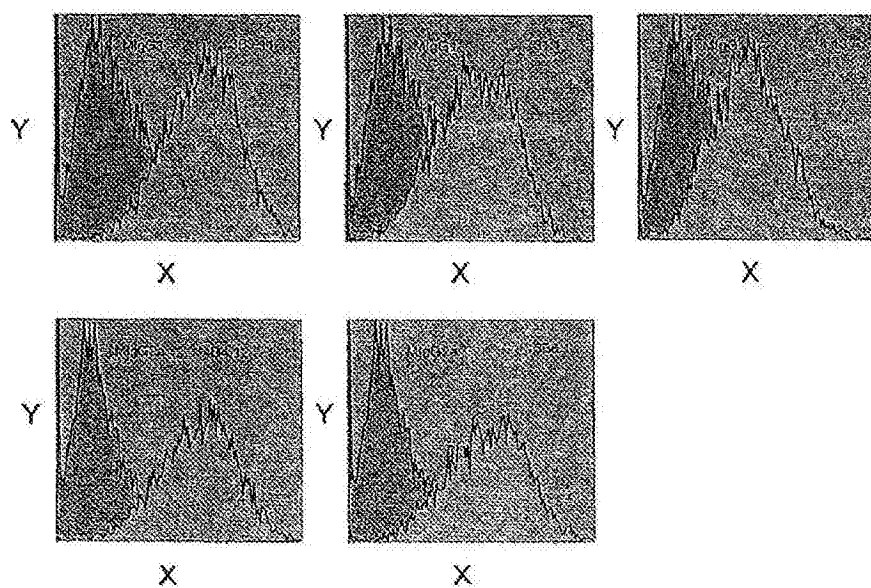


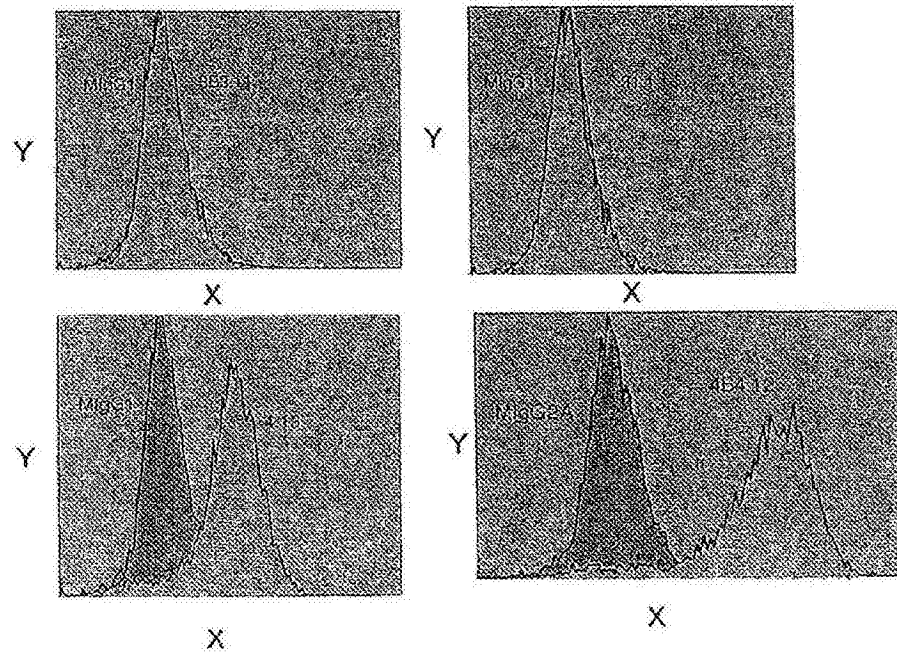
图5B



X为荧光强度

Y为细胞数量

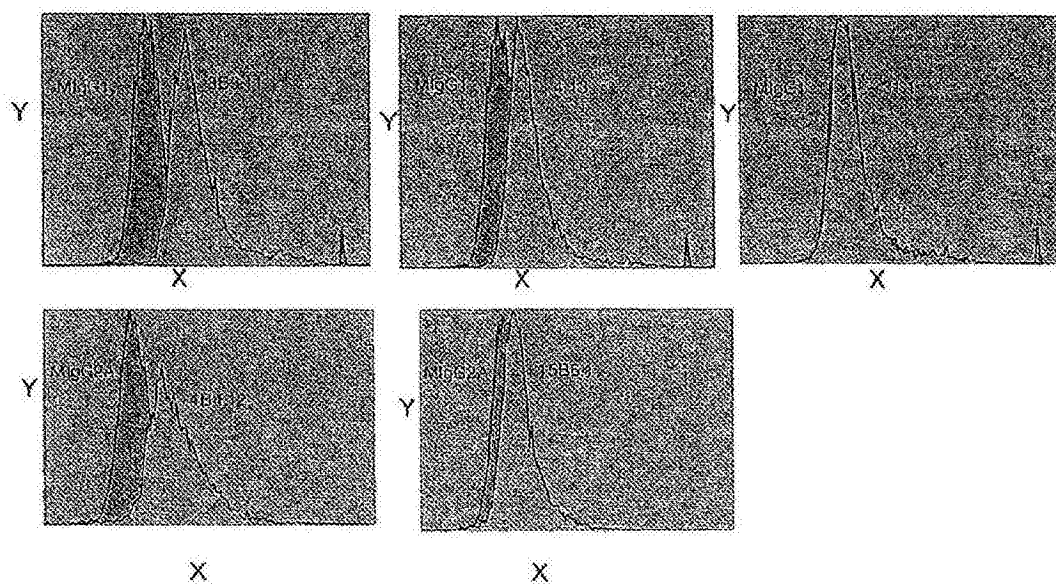
图6



X为荧光强度

Y为细胞数量

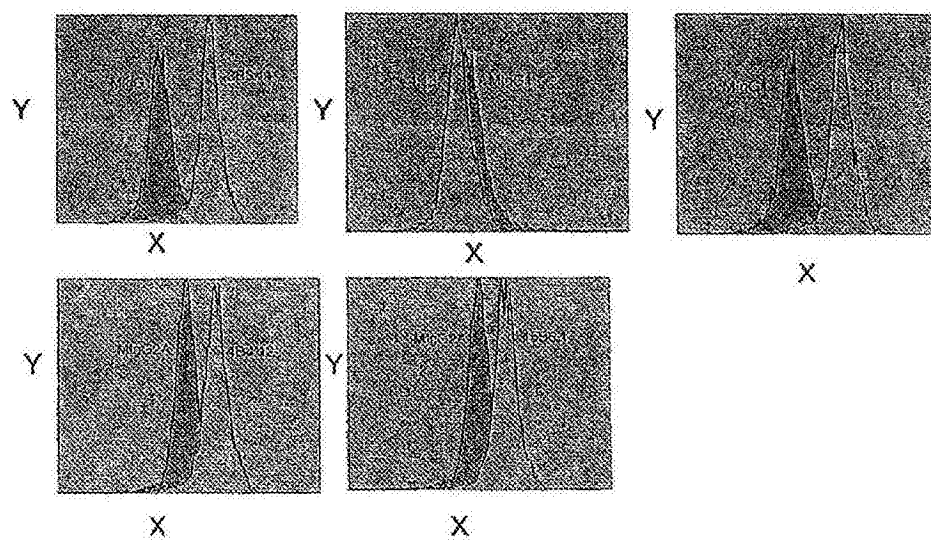
图7



X为荧光强度

Y为细胞数量

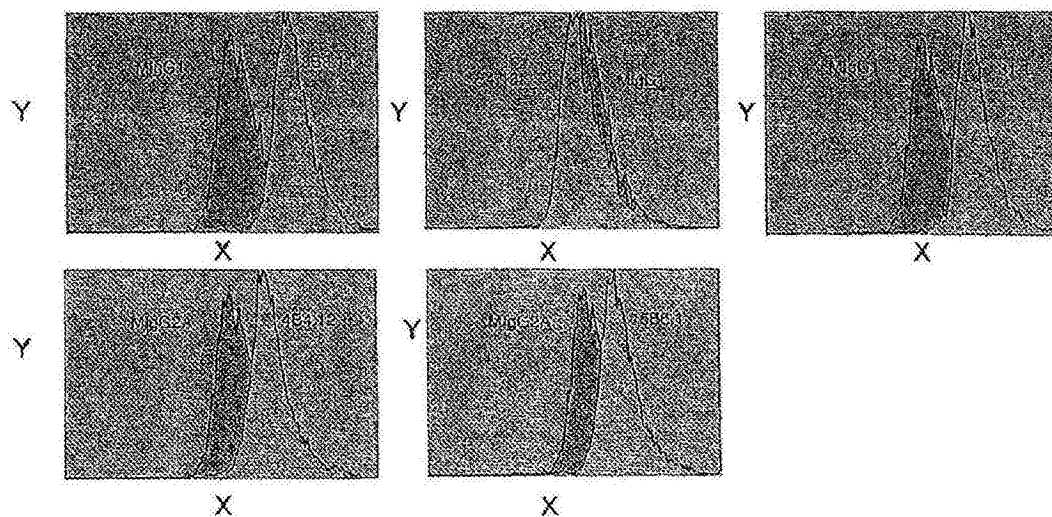
图8



X为荧光强度

Y为细胞数量

图9



X为荧光强度

Y为细胞数量

图10

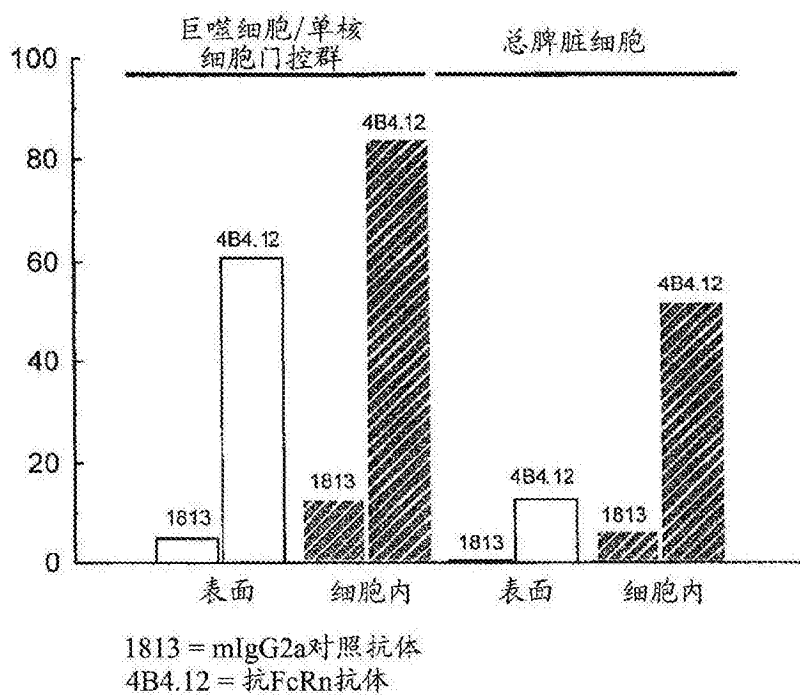


图11A

图11B

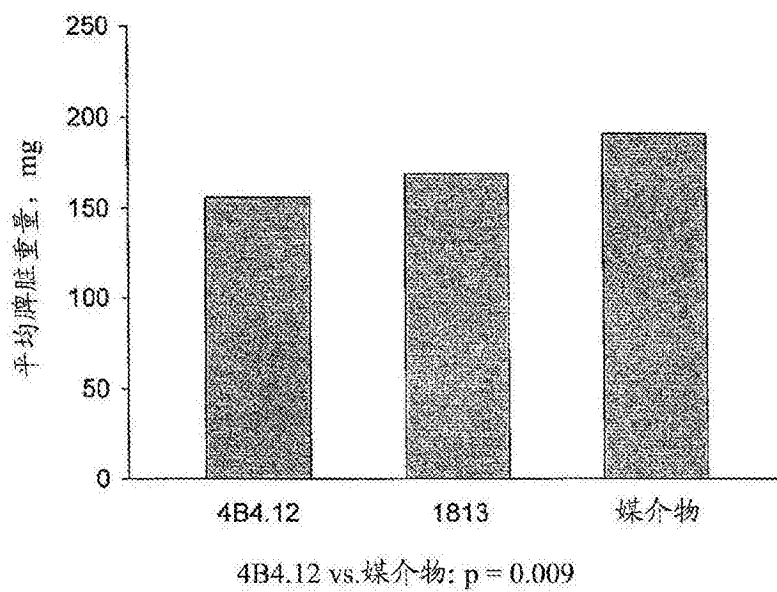


图12A

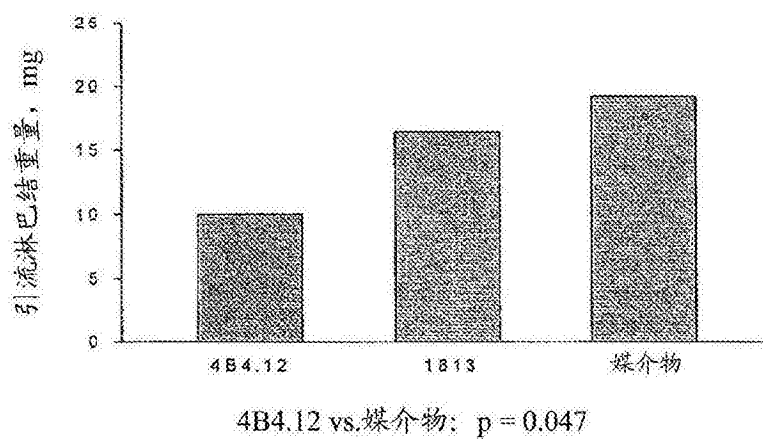


图12B

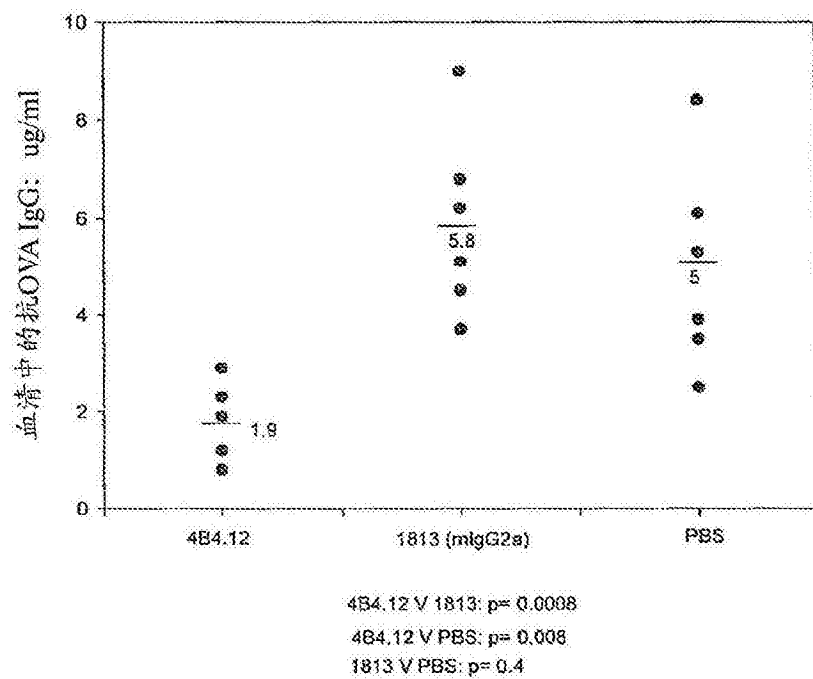


图13

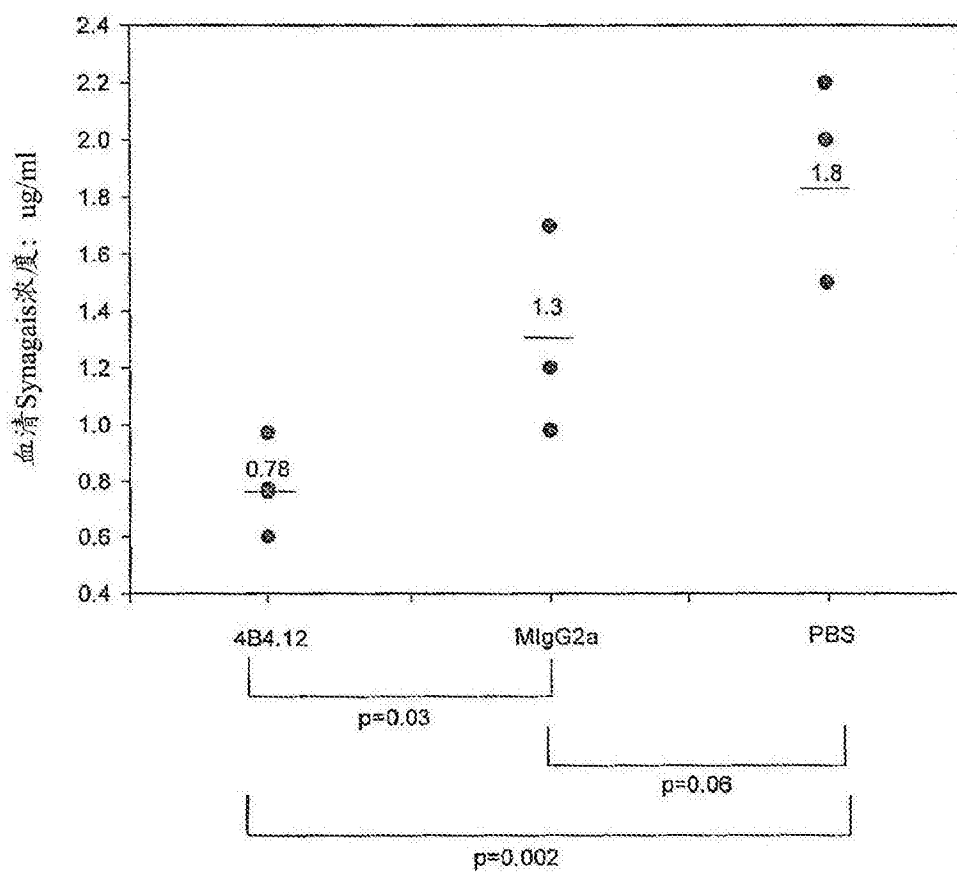


图14

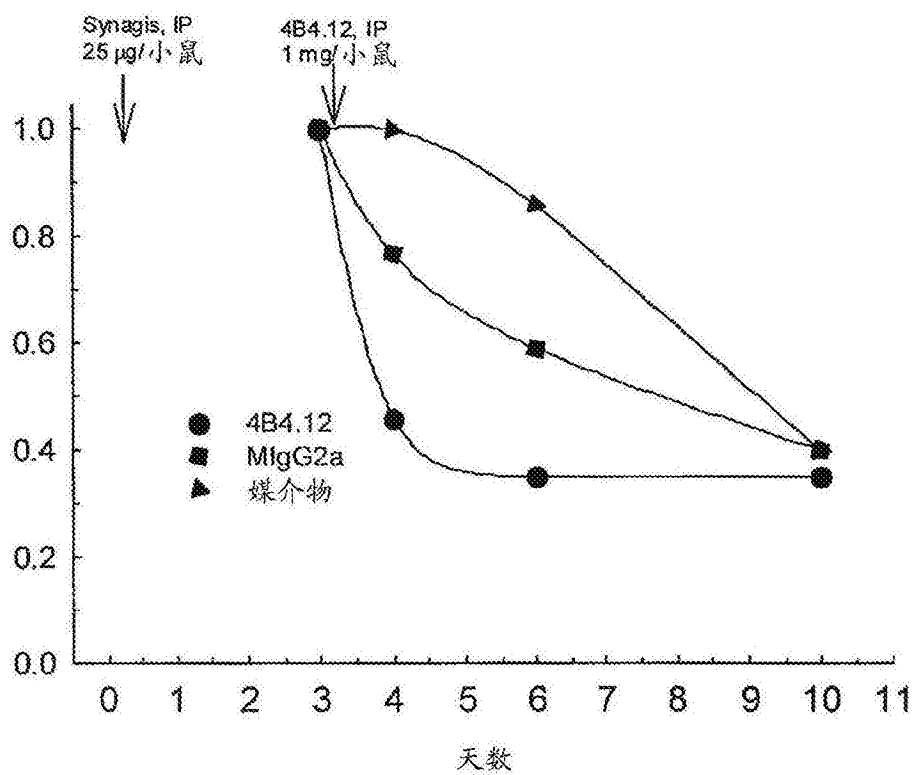
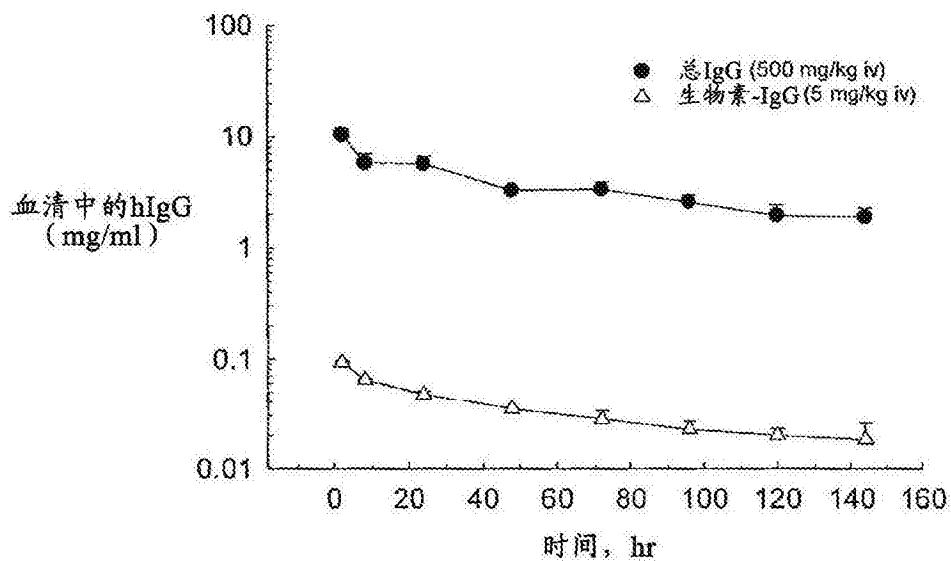


图15

Tg32B小鼠中的静脉内入IgG
(hFcRn +/+, h β 2m +/+, mFcRn -/-, m β 2m -/-)



	$t_{1/2}$ (hr)	C _{max} (mg/ml)	AUC (hr*mg/ml)
总IgG	78	10.41	739
生物素 IgG	87	0.093	7.19

图18

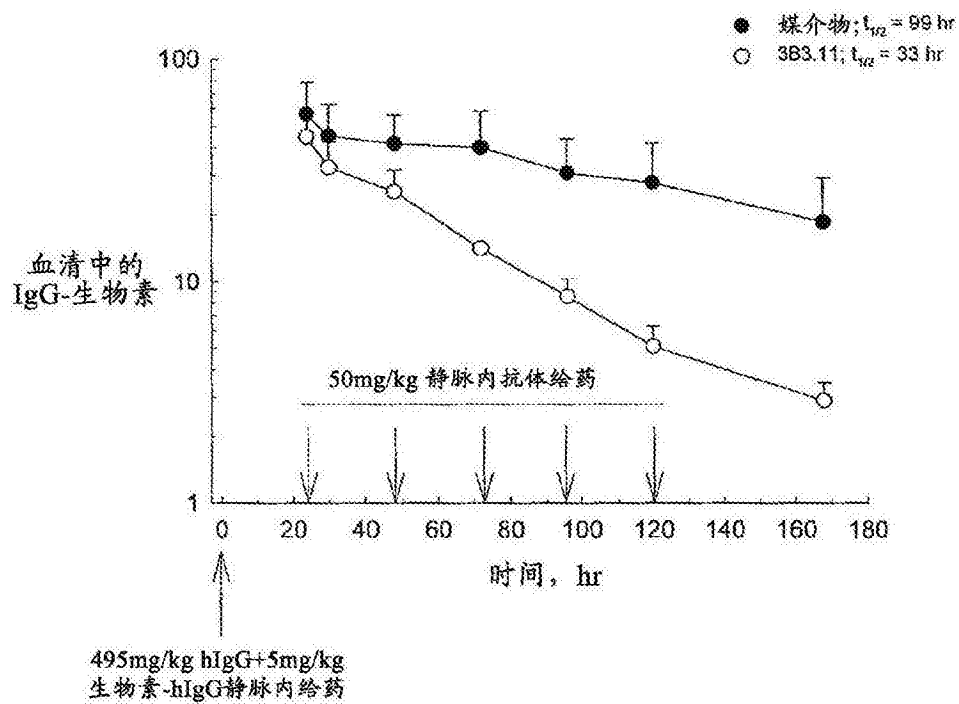


图19

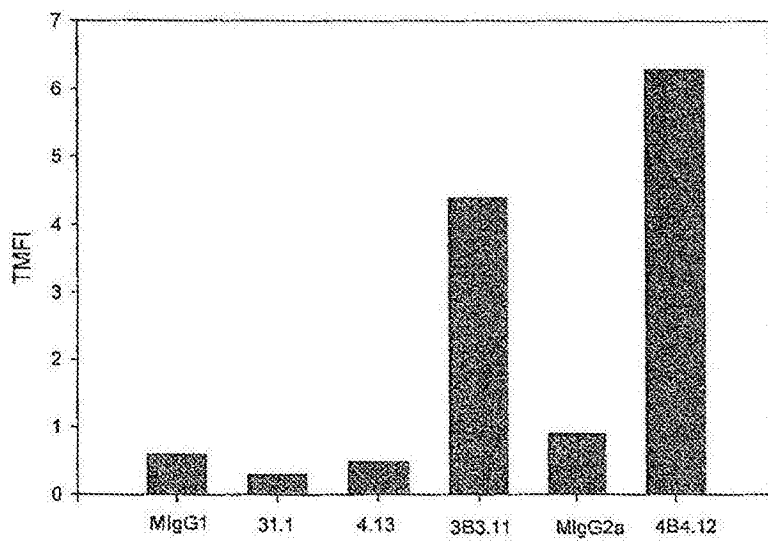


图20

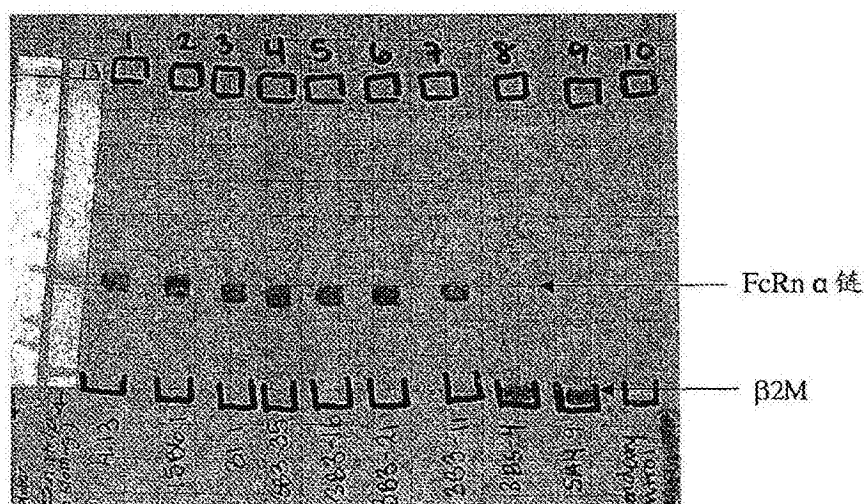


图21

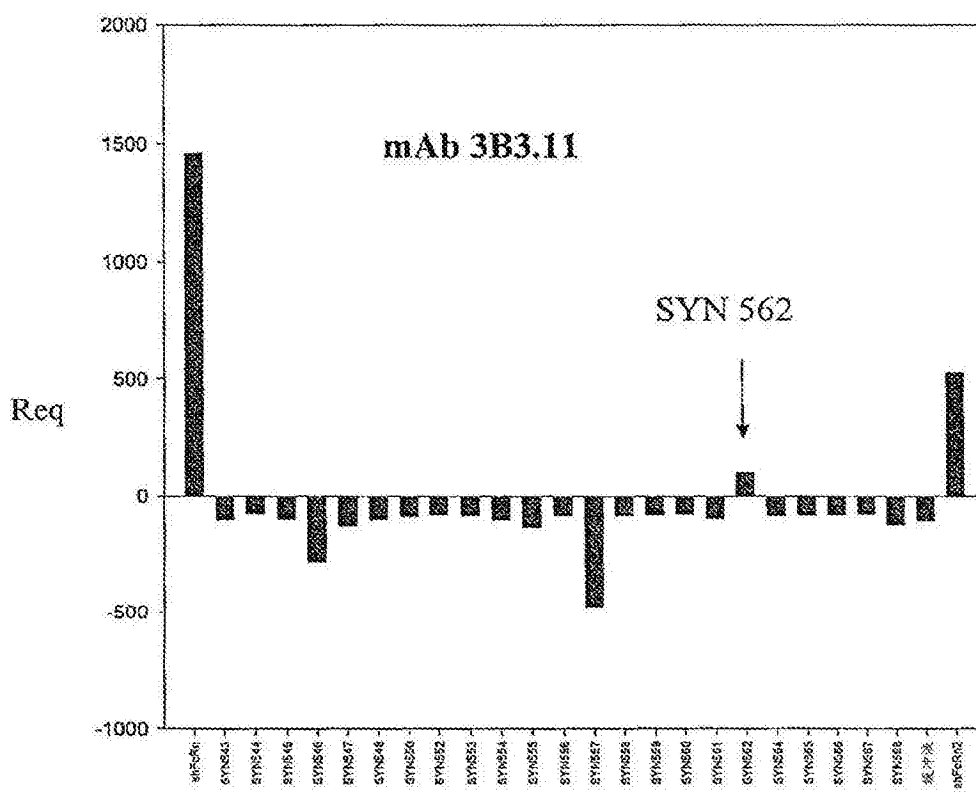


图 22A

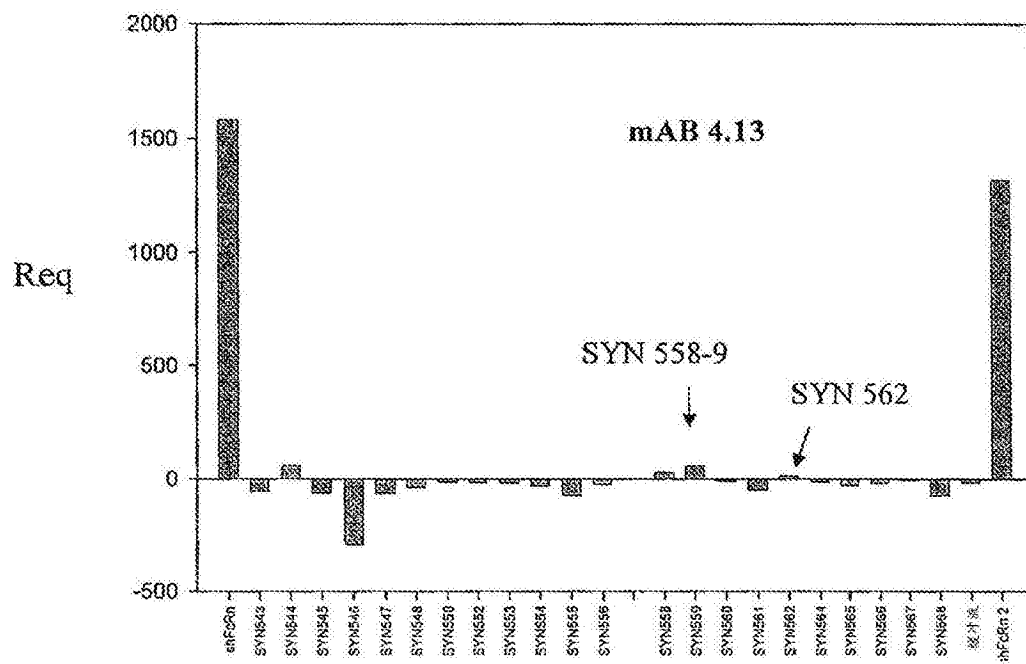


图22B

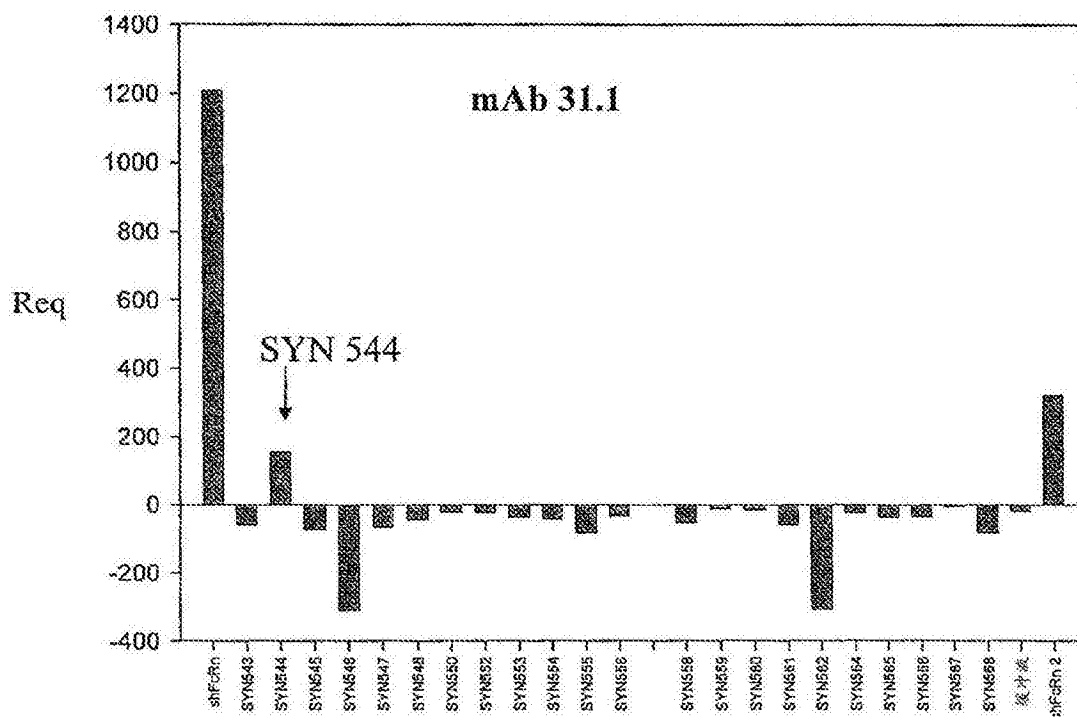


图22C

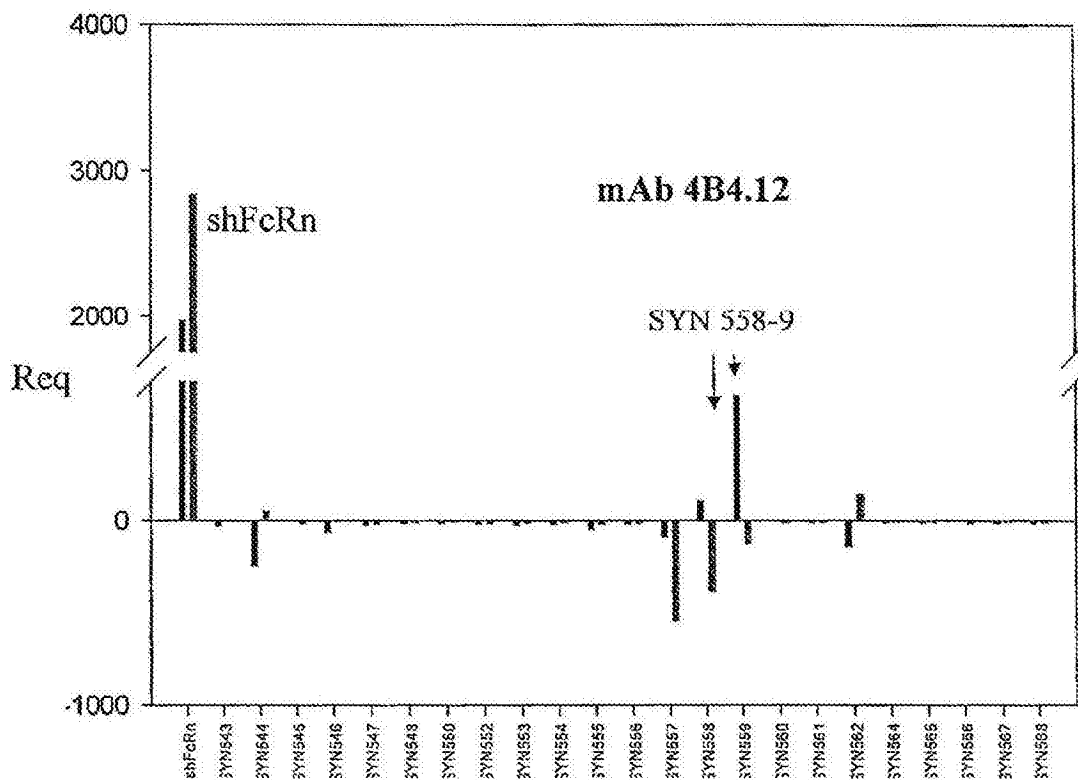


图22D

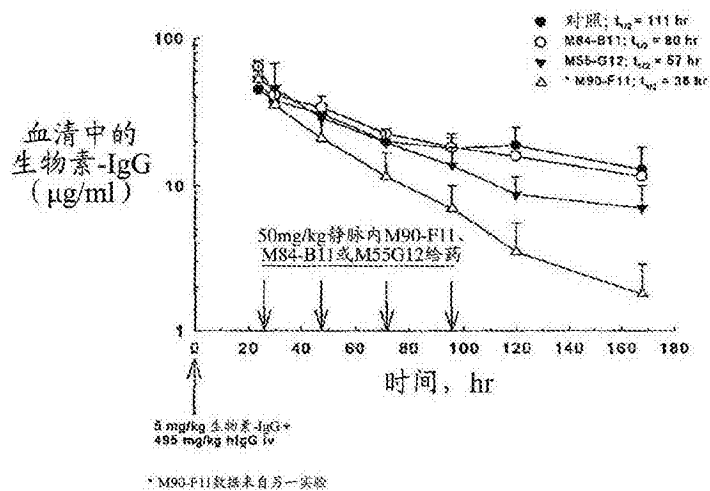


图23

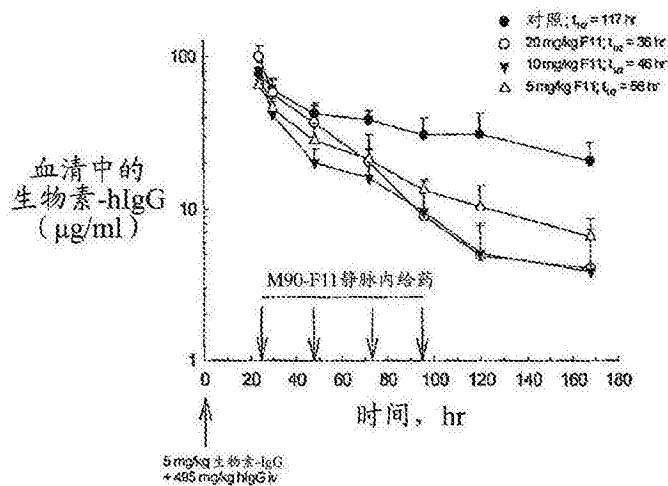


图24

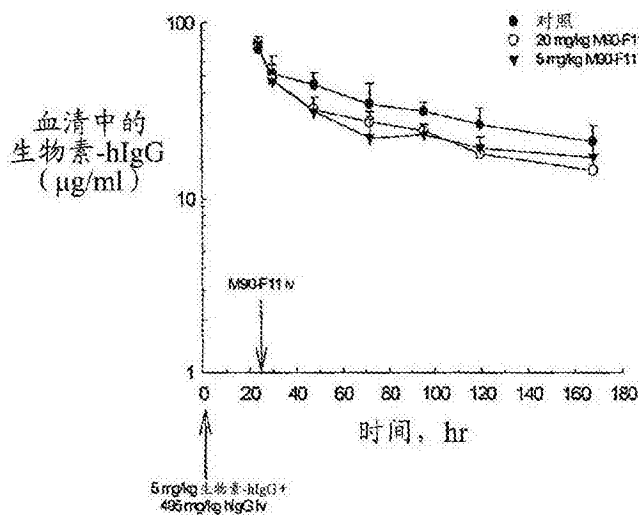


图25

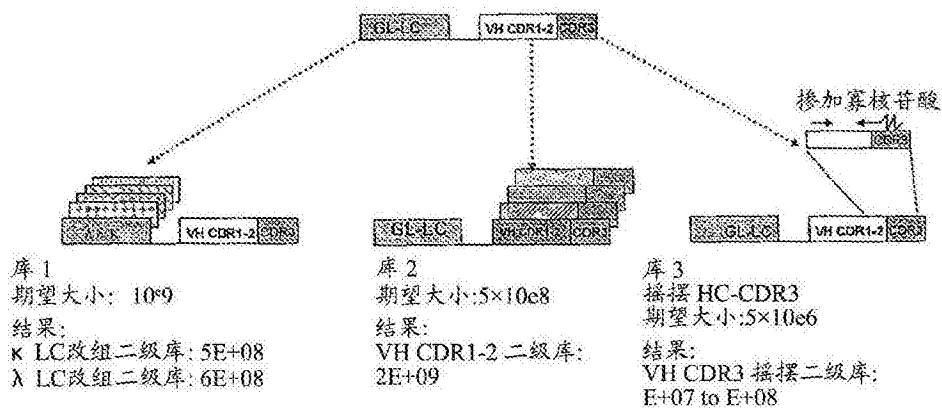


图26

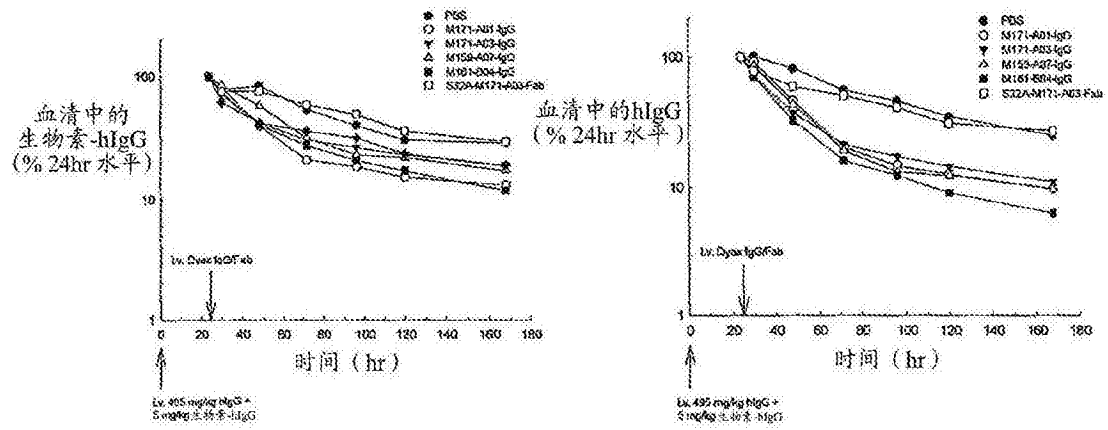


图27

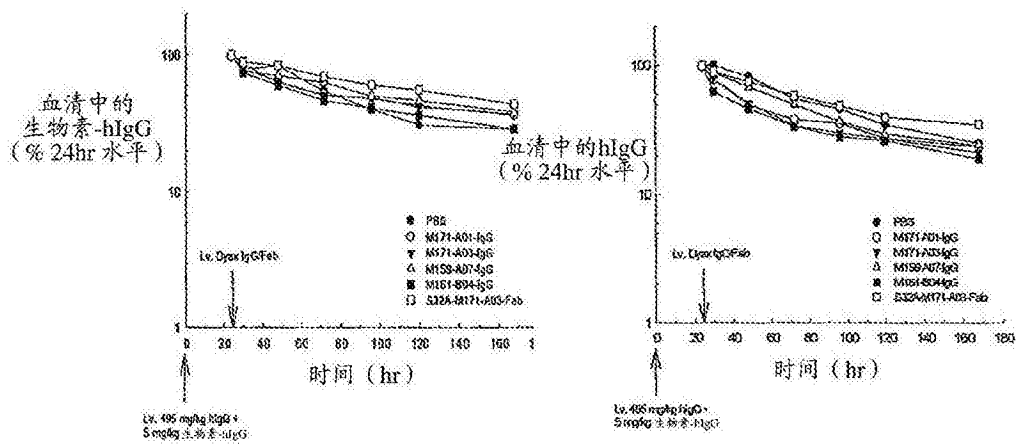


图28

532A-M0090-F11 (532A-R0004-E04)

轻: V:VL2_2b2; J:JL1

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
532A-M0090-F11:	QSVLTQPASVSGSPGQSITISC	TGTGSDVGSYNLVS	WYQKYPGKAPKLIY	GDSQRPS
种系:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHFGKAPKLMY	EVSKRPS

	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
532A-M0090-F11:	GLSSRFSGSKSGNSASLTISGLQAEDEADYYCC	SYAGSGIYYV	FGSGTKVTVL
种系:	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCC	SYAGSSTFYV	FGTGTKVTVL

532A-M0090-F11 (SEQ ID NO: 177);

种系 (SEQ ID NO: 178)

LC-λ 1

532A-M0090-F11-C
 SPKANFTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYL

种系-C:
 GPKANFTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYL

532A-M0090-F11-C SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 179)

种系-C: SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 180)

重: V:VH3-23; J:JH4

	FR1-H	CDR1-H	FR2-H	CDR2-H
532A-M0090-F11:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	EYAMG	WVRQAPGKGLEWVS	
SIGSSGGQTKY				
种系:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SVAMS	WVRQAPGKGLEWVS	
AISGSGGSTYY				

	FR3-H	CDR3-H	FR4-H
532A-M0090-F11:	ADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	LSTGELY	WGQGT LVT VSS
种系:	ADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK		Y WGQGT LVT VSS

532A-M0090-F11 (SEQ ID NO: 111);

种系 (SEQ ID NO: 113)

图 29


```

* (a, z) ASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTS
* (f) -----
* (a, z) GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRK
* (f) -----R
* (a, z) VEEKSCDQTHTCFPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
* (f) -----
* (a, z) DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
* (f) -----
* (a, z) LRGREYRCKVSNRHALPAPTEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSPREPQVYT
* (f) -----
* (a, z) LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
* (f) -----E-M-----
* (a, z) SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
* (f) -----

```

(a, z) (SEQ ID NO: 115)

(f) (SEQ ID NO: 116)

图30

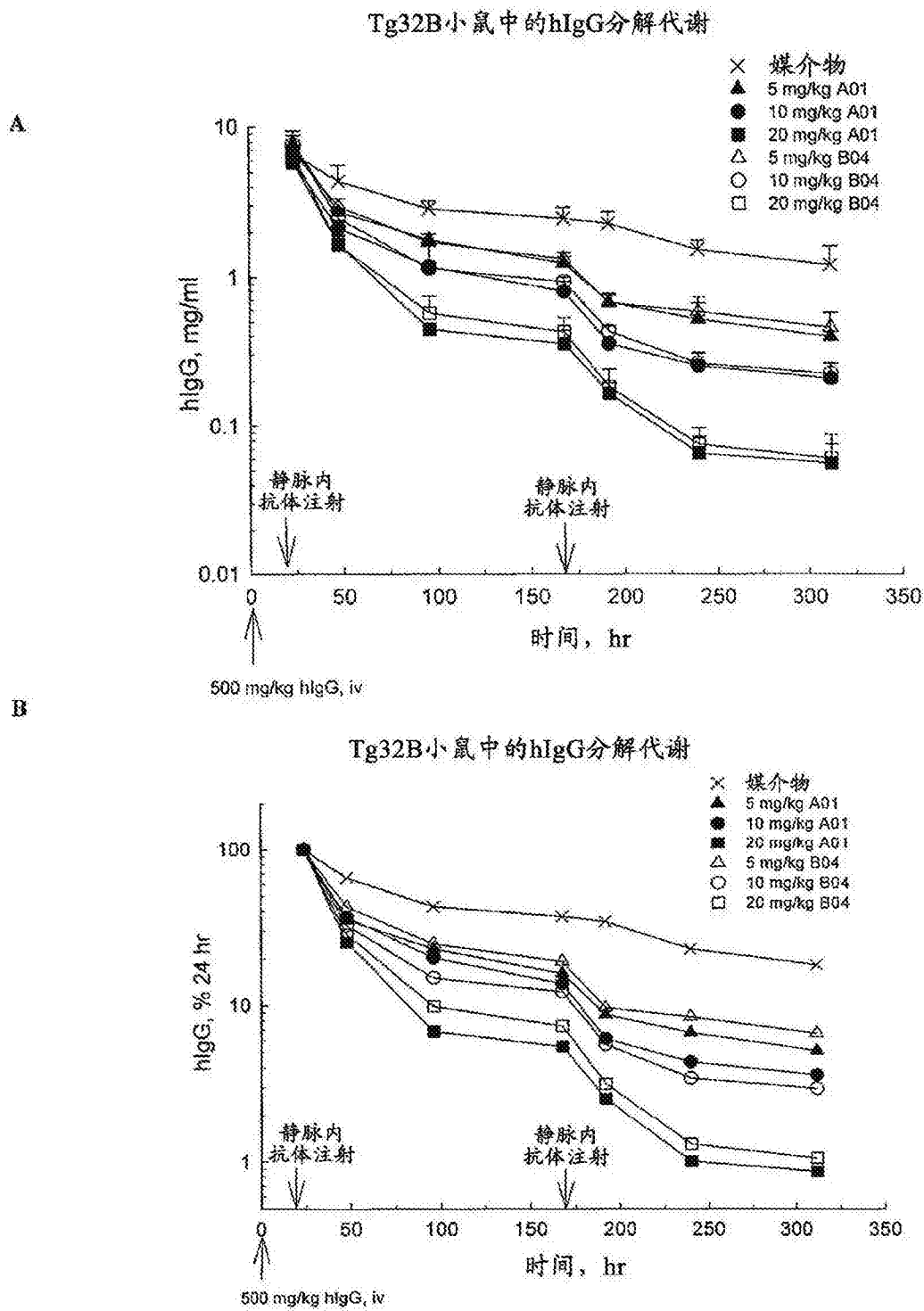


图31

Tg32B小鼠中的hIgG分解代谢

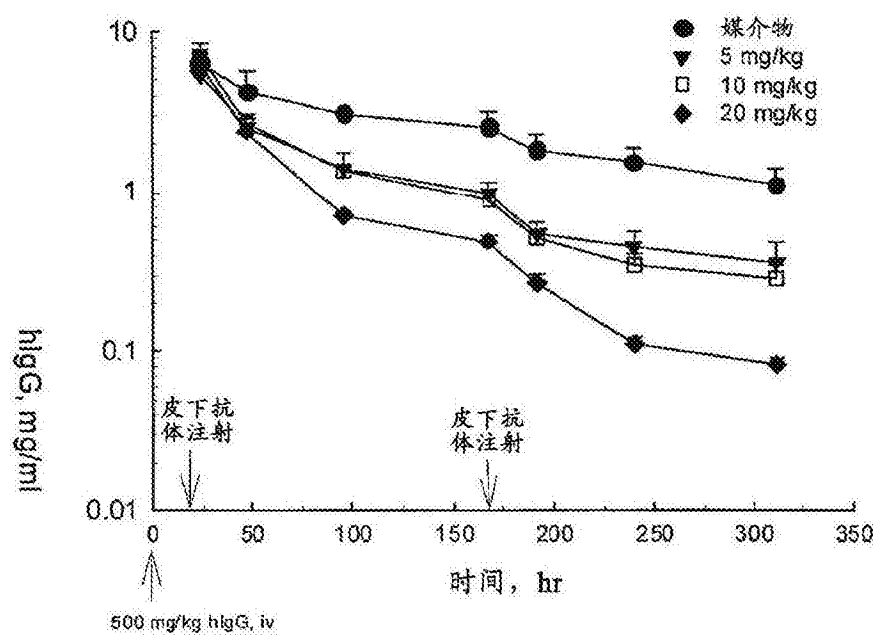


图32

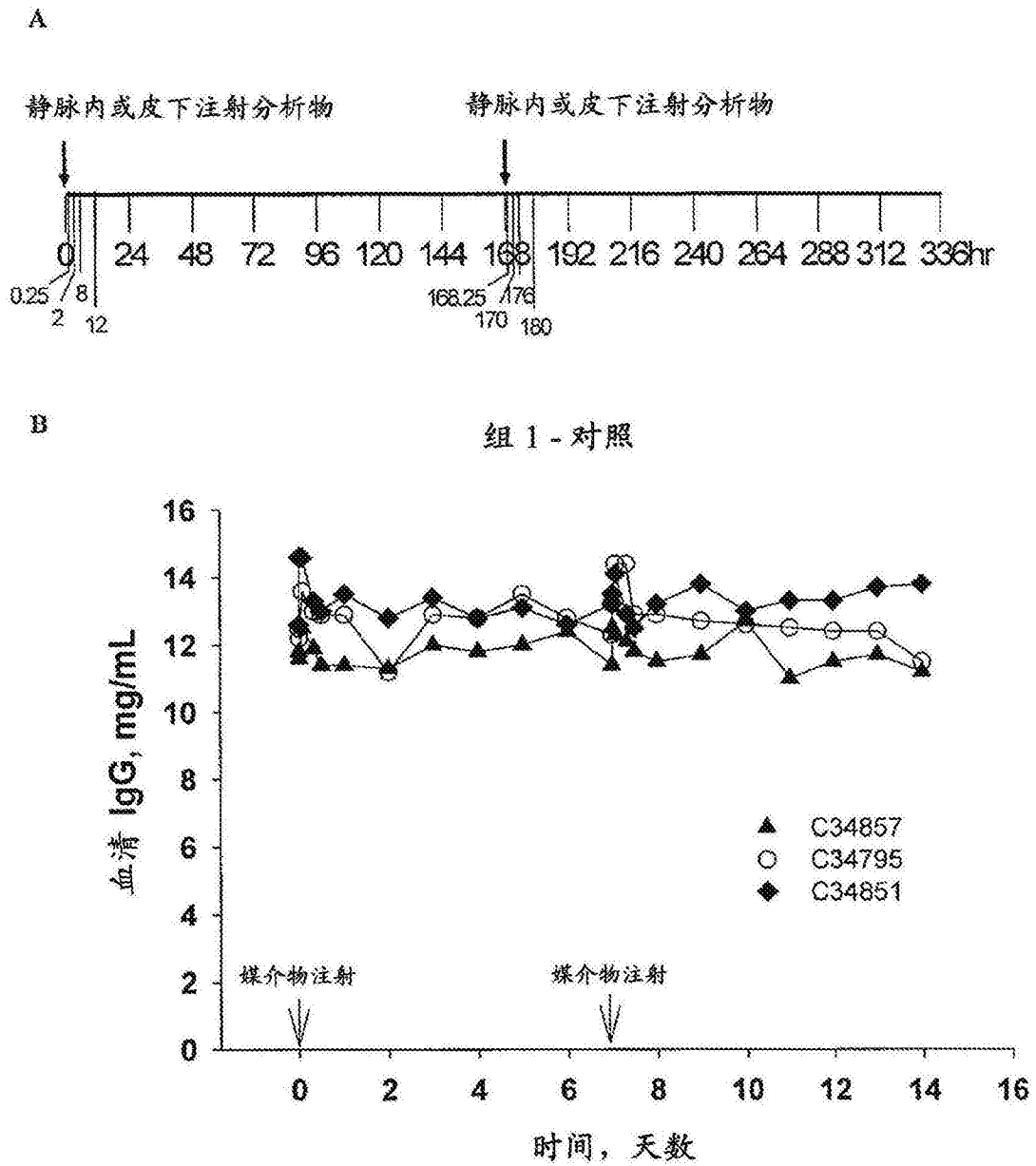
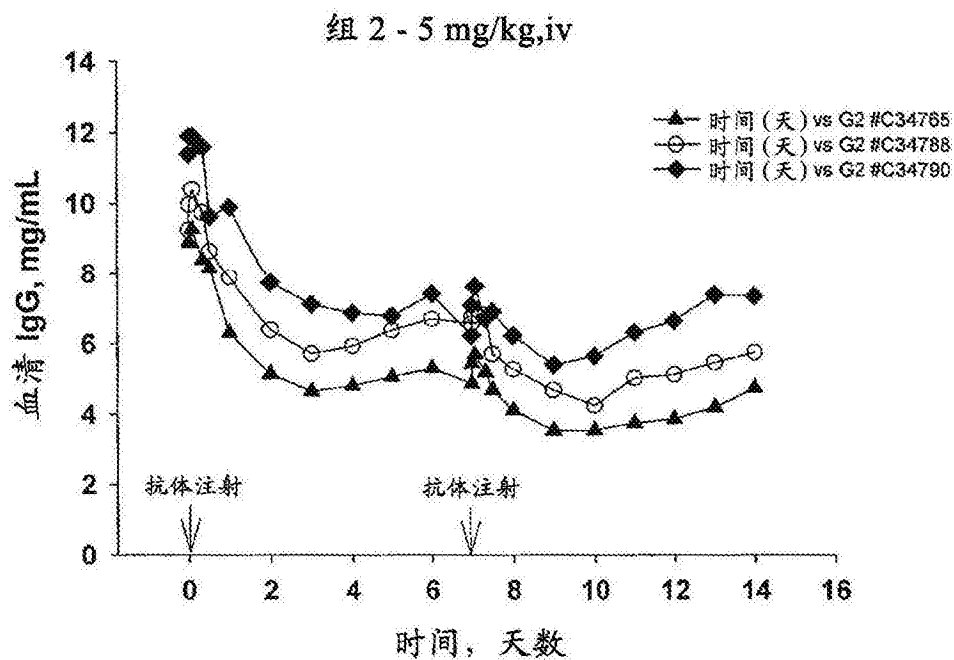


图33

A



B

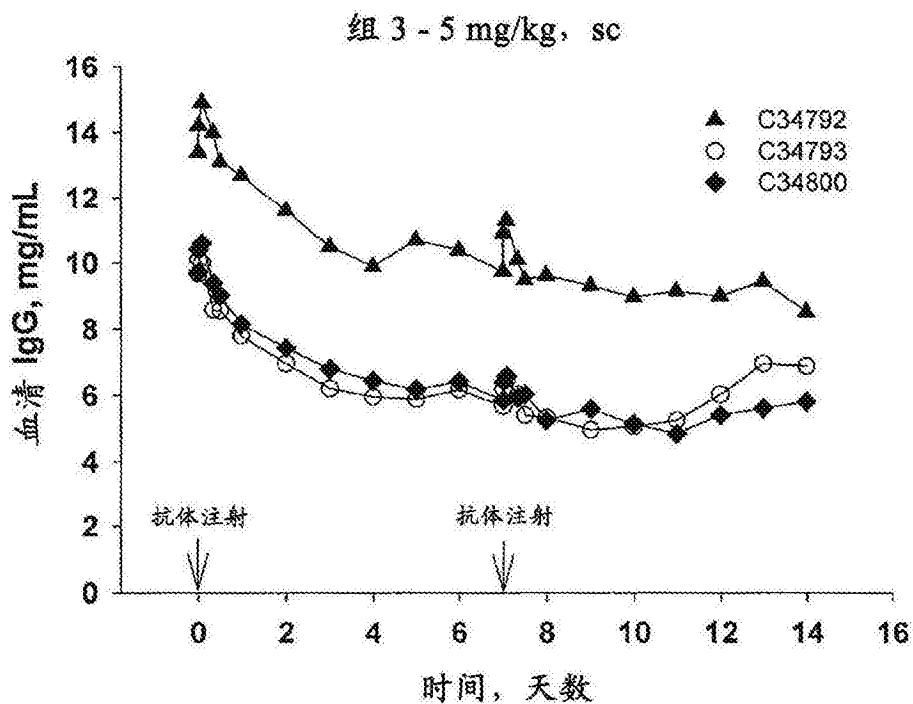


图34

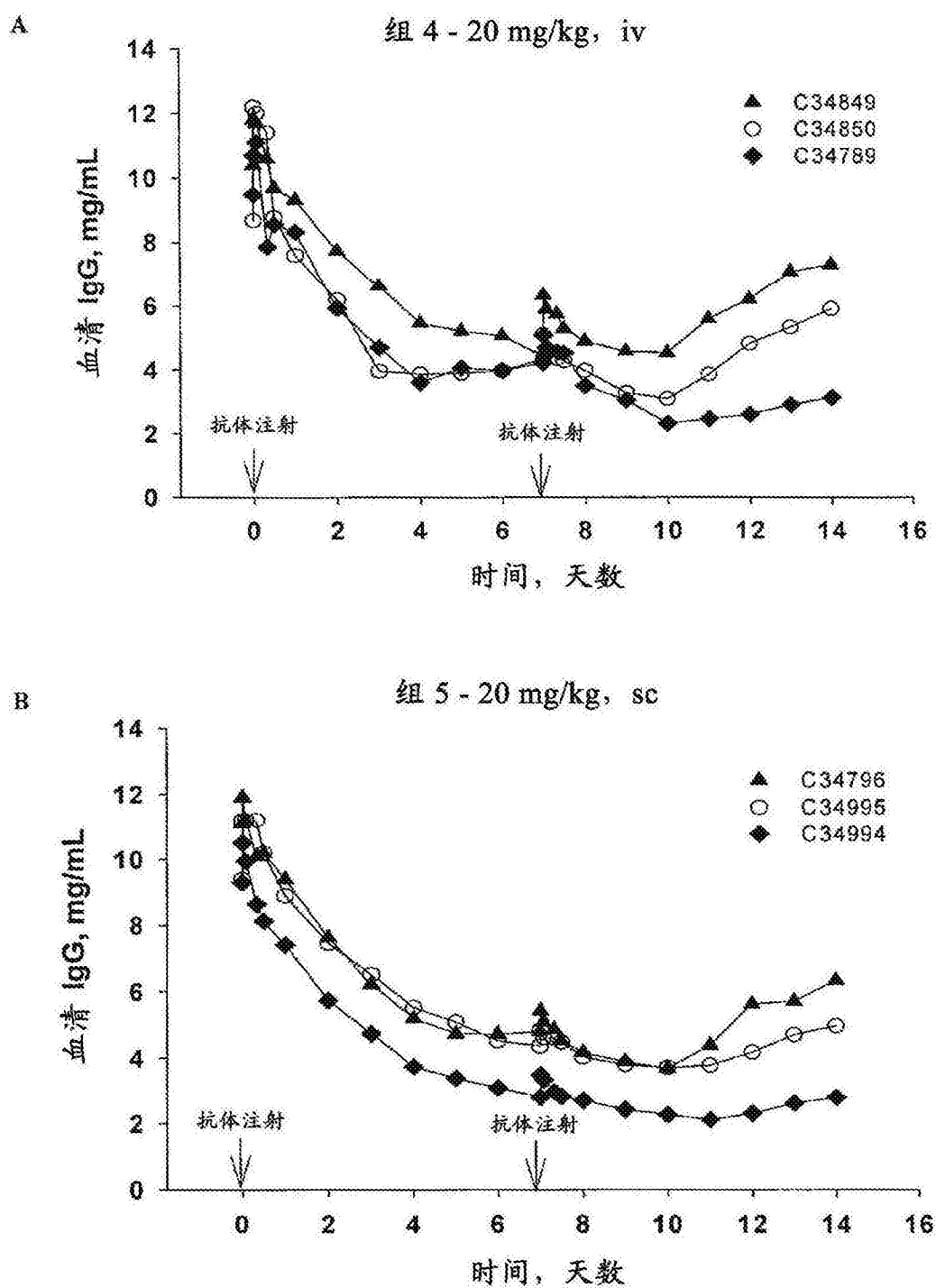


图35

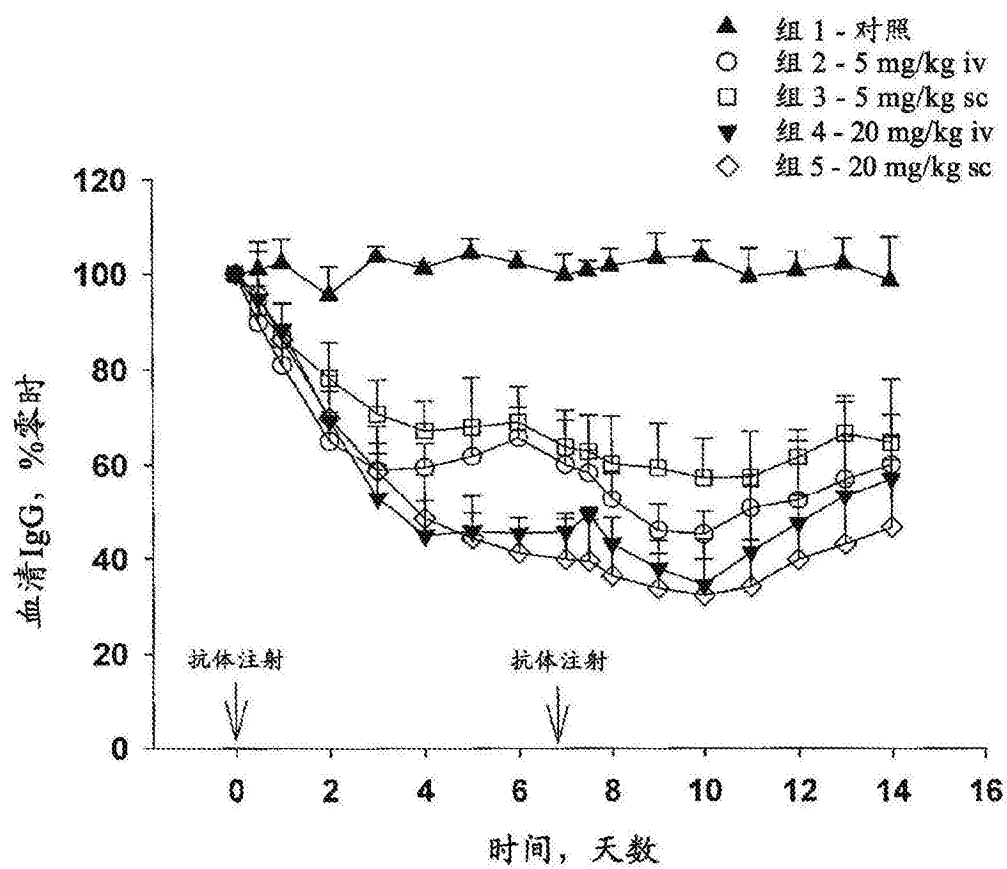


图36

A

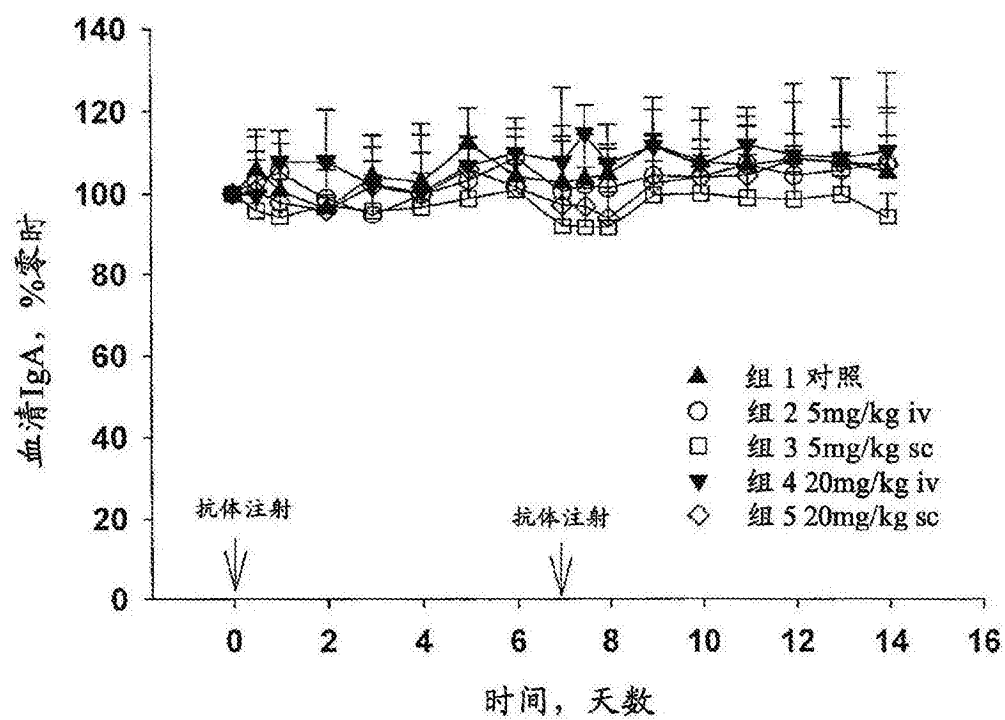


图37

B

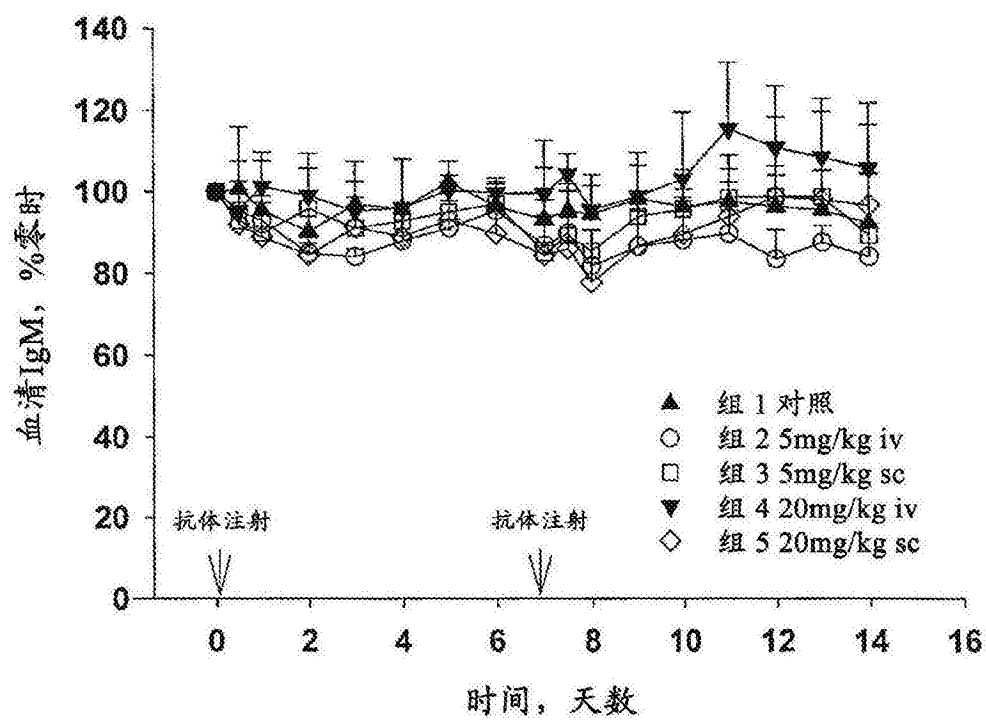


图37

C

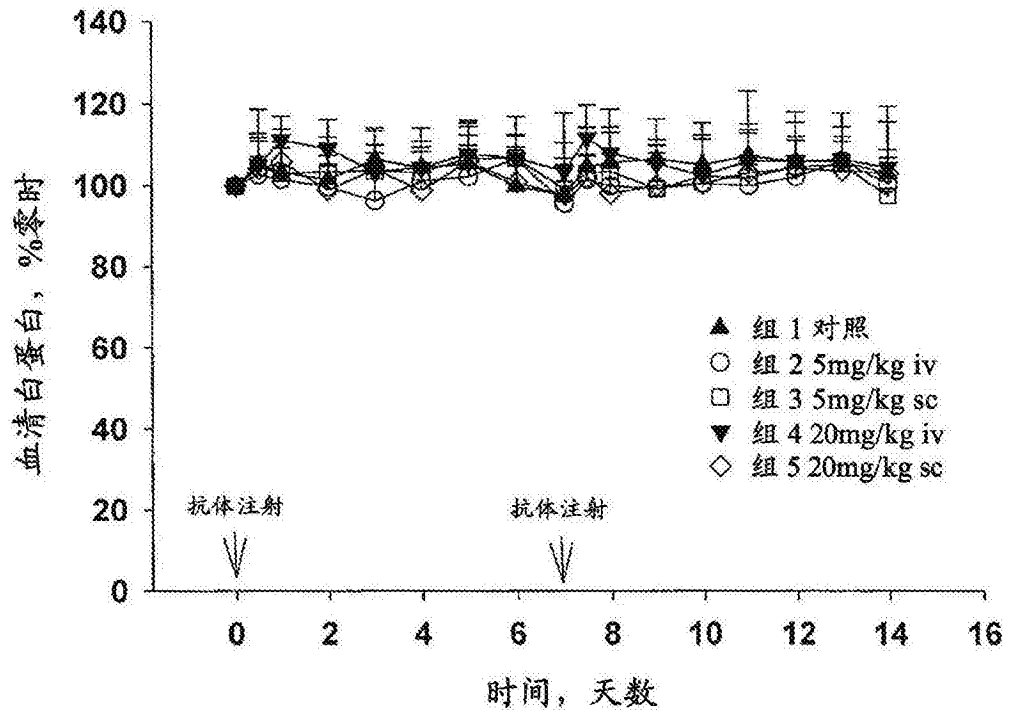


图37

DX-2504 (S32A-M0161-B04)轻 V 基因 = VL2_2b2; J 基因 = JL1

	FR1-L	CDR1-L	FR2-L	CDR2-L
种系:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP

	FR3-L	CDR3-L	FR4-L
种系:	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
DX-2504:	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL

种系 (SEQ ID NO: 181); DX-2504 (SEQ ID NO: 182)

重 V 基因 = VH3-23; J 基因 = JH3

	FR1-H	CDR1-H	FR2-H
种系:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	YAT	WVRQAPGKGLEWVS
DX-2504:	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	YAT	WVRQAPGKGLEWVS

	FR3-H	CDR3-H	FR4-H
种系:	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK		WGQGTMTVTVSS
DX-2504:	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR		WGQGTMTVTVSS

种系 (SEQ ID NO: 183); DX-2504 (SEQ ID NO: 184)

相对种系序列的最优比对

DX-2504:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
VL2_2b2:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
VL2_2e2:	QSALTQPPRSVSGSPGQSVTISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
VL2_2a2:	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
VL2_2c:	QSALTQPPSASGSPGQSVTISC	CTGSELVGSHLV	WYQHPGKAPKLMY	GSPP
VL2_2d:	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISC	CTGSELVGSHLV	WYQPPGTAPKLMY	GSPP

DX-2504:	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
VL2_2b2:	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
VL2_2e2:	GVPDRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
VL2_2a2:	GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
VL2_2c:	GVPDRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL
VL2_2d:	GVPDRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SYAGS	FGTGTKVTVL

DX-2504: SEQ ID NO: 185; VL2_2b2: SEQ ID NO: 186; VL2_2e2: SEQ ID NO: 187;
 VL2_2a2: SEQ ID NO: 188; VL2_2c: SEQ ID NO: 189; VL2_2d: SEQ ID NO: 190;

图38